

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ACİL TIP ANABİLİM DALI

ANTİKOAGÜLAN TEDAVİSİ ALAN HASTALARDA CYP2C9  
GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ  
DR. TUTKU ERARSLAN

DANIŞMAN  
PROF.DR. İBRAHİM TÜRKÇÜER

DENİZLİ – 2017

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ACİL TIP ANABİLİM DALI**

**ANTİKOAGÜLAN TEDAVİSİ ALAN HASTALARDA CYP2C9  
GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. TUTKU ERARSLAN**

**DANIŞMAN**

**PROF.DR. İBRAHİM TÜRKÇÜER**

**DENİZLİ – 2017**

Prof. Dr. İbrahim TÜRKÜER ..... danışmanlığında Aras. Gül Dr.  
Tutku ERARSLAN ..... tarafından  
yapılan Anti-Haagülen Tedavisi Alan Hastalarda CYP2C9 Geni  
Polimorfizminin Araştırılması ..... " başlıklı tez çalışması gün.../.../  
tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu  
jürimiz tarafından Arslan Tıp ..... Anabilim Dalı'nda  
TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edildi.

Prof. Dr. Bolent Erdur  
BAŞKAN

Prof. Dr. İbrahim Türküer  
ÜYE

Doc. Dr. Önder Tomruk  
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

07.12.2017

Prof. Dr. ....

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez çalışmam süresince beni destekleyen tecrübesi, engin bilgisi ve tecrübesiyle bana ilham veren Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. İbrahim TÜRKCÜER'e

&

Her yardım istediğimde hiç geri çevirmeden destek veren Sayın Doç.Dr. Aylin KÖSELER'e

&

Akademisyenliği ve kişiliği ile her zaman bana örnek olan, yetişmemde katkıları olan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp AD 'daki hocalarım Prof.Dr Bülent ERDUR'a, Yard. Doç.Dr. Atakan YILMAZ'a, Yard. Doç. Dr Mert ÖZEN'e

&

Hayatımın her aşamasında sevgisiyle ve sabrıyla yanımda olan, beni destekleyen Aileme, Eşime,

&

Tez çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen Pamukkale Üniversitesi Eğitim, Uygulama ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp A.D.'nda görevli meslektaşlarıma sonsuz TEŞEKKÜR EDERİM...

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
ÖZET .....	XI
İNGİLİZCE ÖZET .....	XIII
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
KOAGÜLASYON .....	3
Tanım-Mekanizma .....	3
Koagülasyon Testleri .....	5
ANTİKOAGÜLANLAR.....	7
Heparin.....	7
Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinler .....	7
<i>DMAH'lerin Yapısı, Farmakokinetik Özellikleri ve Etki</i> <i>Mekanizması</i> .....	7
ORAL ANTİKOAGÜLANLAR .....	8
Warfarin sodyum.....	8
<i>Warfarinin Tarihçesi</i> .....	8
<i>Warfarinin Farmakolojisi, Farmakodinamiği,</i> <i>Farmakokinetiği</i> .....	8
<i>Warfarinin Yan etkileri</i> .....	10
<i>Warfarinin Etkilesimleri</i> .....	11
<i>Warfarin Kullanımında Yönetim ve Doz Uygulaması</i> .....	14
<i>Warfarin Tedavisi Üzerine Etki Eden Faktörler</i> .....	15
CYP ENZİMLERİ.....	16
CYP2C9 Enzimi.....	16
<i>CYP2C9 Allelleri</i> .....	16

<b>POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ (PCR)</b>	19		
<b>Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Oluşum Mekanizması</b>	20		
<b>DNA'nın Denatürasyonu</b> .....	20		
<b>Primerlerin</b>	<b>Bağlanması</b>		
<b>(annealing)</b> .....	20		
<b>Primerlerin</b>	<b>uzatılması</b>	<b>(extension)</b>	<b>ve</b>
<b>Amplifikasyon</b> .....	20		
<b>PCR'ın Temel Bileşenleri</b>	20		
<b>Kalıp</b>			
<b>DNA</b> .....	21		
<b>Polimerazlar</b> .....	21		
<b>Primerler</b> .....	21		
<b>Deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP)</b> .....	22		
<b>Tamponlar ve MgCl<sub>2</sub></b> .....	22		
<b>ELEKTROFOREZ</b> .....	22		
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	24		
<b>BULGULAR</b> .....	36		
<b>TARTIŞMA</b> .....	51		
<b>SONUÇLAR</b> .....	60		
<b>KAYNAKLAR</b> .....	61		
<b>EK-1</b> .....	72		
<b>EK-2</b> .....	74		
<b>EK-3</b> .....	77		

## SİMGELER VE KISALTMALAR

CYP2C9	Sitokrom P450 2C9
VKORC1	Vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1
GP	Glikoprotein
PGI2	Prostasiklin
TXA2	Tromboksan A2
5HT	5-hidroksitriptamin
APTT	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
ISI	International Sensitivity Index
VTE	Venöz tromboemboli
DMAH	Düşük molekül ağırlıklı heparinler
PT	Protrombin zamanı
NSAİ	Nonsteroid antiienflamatuvar
TDP	Taze donmuş plazma
RFVIIa	Rekombinant Faktör VIIa
PCR	Polymerase Chain Reaction
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
dNTP	Deksiribonükleozid Trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TBE	Tris-Boat EDTA
UV	Ultraviyole
mtDNA	Mitokondriyel DNA

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>		
		<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1</b>	Plateletler ve Platelet Agregasyonu	4
<b>Şekil 2</b>	Koagülasyon Kaskadı	5
<b>Şekil 3</b>	Koagülasyon Kaskadı ve Koagülasyon Testleri	6
<b>Şekil 4</b>	Virchow Triadı	7
<b>Şekil 5</b>	Warfarin Metabolizması	10
<b>Şekil 6</b>	Warfarine Bağlı INR Yükselmesi Yönetimi	14
<b>Şekil 7</b>	Önerilen INR Düzeyleri	15
<b>Şekil 8</b>	CYP2C9 Allelleri	17
<b>Şekil 9</b>	CYP2C9 Allelleri, Baz ve Aminoasit Değişimleri	18
<b>Şekil 10</b>	Elektroforezde %2' lik agaroz jel'de 90 volt'ta 30 dakika yürütülen DNA örneklerinin görüntümü	29
<b>Şekil 11</b>	<i>CYP2C9</i> geni polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü	31
<b>Şekil 12</b>	CYP2C9 alellerinin agaroz jelde görüntülenmesi	32
<b>Şekil 13</b>	IWPC Warfarin Doz Hesaplayıcısı	61



<b>TABLolar DİZİNİ</b>		
		<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Warfarinin Etkisini Artıran İlaçlar	12
<b>Tablo 2</b>	Warfarinin Etkisini Azaltan İlaçlar	12
<b>Tablo 3</b>	Warfarini Pozitif Yönde Etkileyen Tıbbi Durumlar	15
<b>Tablo 4</b>	Warfarini Negatif Yönde Etkileyen Tıbbi Durumlar	15
<b>Tablo 5</b>	<b>PCR İşlem Prosedürü</b>	30
<b>Tablo 6</b>	<b>Mitokondriyel DNA (mtDNA) HVR I ve II bölgelerinde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyon için ideal hacim ve konsantrasyonları</b>	30
<b>Tablo 7</b>	Sağlıklı ve Hasta Grupta Cinsiyete Dair Veriler	36
<b>Tablo 8</b>	Sağlıklı ve Hasta Grupların Yaşa Dair Verileri	36
<b>Tablo 9</b>	Sağlıklı ve Warfarin Kullanan Gruplar ve Kilo Ortalamaları	37
<b>Tablo 10</b>	Warfarin Kullanan Grupta INR Değerleri	37
<b>Tablo 11</b>	INR Kategorik Verileri ve Populasyonda Oranları	37
<b>Tablo 12</b>	Cinsiyete Göre INR Aralıkları	38
<b>Tablo 13</b>	Kilo Bazlı Günlük Warfarin Kullanım Dozu	38
<b>Tablo 14</b>	Bireylerdeki AVA_II mutasyonu	39
<b>Tablo 15</b>	AVA_II Mutasyonu Ve Cinsiyet Tablosu	39
<b>Tablo 16</b>	Bireylerdeki AVA_III Mutasyonu	40
<b>Tablo 17</b>	AVA_III Mutasyonu Ve Cinsiyet Tablosu	40
<b>Tablo 18</b>	Gruplardaki AVA_II, AVA_III Mutasyonları	41
<b>Tablo 19</b>	AVA_II Mutasyonu Varlığı ve Hastalardaki INR Düzeyleri	42
<b>Tablo 20</b>	AVA_III Mutasyonu Varlığı ve Hastalardaki INR Düzeyleri	42
<b>Tablo 21</b>	Mutasyonlar ve INR Aralıkları	43
<b>Tablo 22</b>	Haftalık Warfarin Dozları Gruplaması	44

<b>Tablo 23</b>	AVA II Mutasyonu, Haftalık Warfarin Dozu, INR Düzeyi	45
<b>Tablo 24</b>	AVA III Mutasyonu, Haftalık Warfarin Dozu, INR Düzeyi Tablosu	47
<b>Tablo 25</b>	Mutasyon Sayısı-INR-Warfarin Dozu İlişkisi-A	48
<b>Tablo-26</b>	Mutasyon Sayısı-INR-Warfarin Dozu İlişkisi-B	49

<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b>		
		<b>Sayfa No</b>
<b>Grafik 1</b>	Haftalık Warfarin kullanım Dozu-Mutasyon Varlığı	44
<b>Grafik 2</b>	Mutasyon Varlığı ve INR Ortalamaları	50
<b>Grafik 3</b>	Mutasyon Varlığı ile İlk INR ve Pik INR Değerlerinin İlişkisi	51

## ÖZET

Oral antikoagulanlar, tromboembolik bozuklukların tedavisinde ve profilaksisinde sık kullanılmaktadırlar. (1–5). Warfarin, dünyada oral antikoagulan olarak en yaygın kullanılan ilaçtır (6). Hastalar, international normalized ratio (INR) ile yakın takip edilir.

Sitokrom P450 2C9 (CYP2C9), warfarin gibi birçok önemli ilacın oksidatif metabolizması için gerekli olan bir karaciğer enzimidir ve CYP2C9 bölgesinde bir dizi genetik polimorfizm tanımlandı

Bu genetik mutasyonlardan biri; exon 3 pozisyon 144' de, arjininin sisteinle yer değiştiği CYP2C9\*2 alleli (Arg144Cys), diğeri exon 7 pozisyon 359' da izolösinin lösinele yer değiştirdiği CYP2C9\*3 alleli'(Ile359Leu)' tür ki bu mutasyonlar invitro warfarin hidroksilasyondaki bozulmayı gösterir (12,13). CYP2C9 alellerinden biri, CYP2C9\*1 alleli wild, en yaygın tip olup, doğal tip genotip olarak bilinir.

CYP2C9\*2 allelini taşıyan hastalardaki enzim aktivitesi, wild tip enzim aktivitesinin %12'si, CYP2C9\*3 allelini taşıyan hastalardaki enzim aktivitesi ise %5' idir (12,14,15).

Kumarin türevi olan warfarin, antikoagulan etkinliğini vitamin-K-epoksi-redüktaz enzim sentezini inhibe ederek göstermektedir.

Warfarin sodyum gastrointestinal sistemden hızla emilmekte ve pik serum konsantrasyonuna 2–8 saatte ulaşmaktadır. Plazma proteinlerine tama yakın bağlanır ve karaciğerde birikir. Warfarin, S- izomer ve R-izomer'den oluşan rasemik karışım olarak kullanılır. S- izomer, R-izomer'den 3–5 kat daha etkindir.

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servisine başvuran, warfarin tedavisi kullanan, toplam 100 hasta ve 100 gönüllü sağlıklı denekten oluşan kontrol grubu çalışma kapsamına alındı.

CYP2C9\*2 ve CYP2C9\*3 varyantlarını saptamak için ilgili genin gen değişimini içeren bölgesi

**CYP2C9\*2 varyantı için:**

5' TACAAATACAATGAAAATATCATG 3'

5' CTAACAACCAGACTCATAATG 3'

**CYP2C9\*3 varyantı için:**

5' AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC 3'

5' GATACTATGAATTTGGG 3' primerleri kullanılarak PCR tekniği ile çoğaltıldı.

Hastalardan başvuru sonrasında tetkik ve tedavileri sürecinde kan alınırken ortalama 5 ml (1 hemogram tüpü) kadar kan çalışma için ayrıldı.

Çalışmaya acil servise herhangi bir şikayetle gelen, bireylerde basit rastgele örneklem metodu ile belirlenen, warfarin kullanan 100 hasta alındı. Kontrol grubu olarak sağlıklı deneklerden oluşan 100 gönüllü birey çalışmaya alındı.

Warfarin kullanan grupta INR değeri, warfarin kullanım dozu mutasyon varlığı açısından değerlendirildiğinde mutasyon varlığı ile değerlendirildiğinde gruplar arası istatistiksel fark saptanmadı. Hastalardan warfarin dozu stabilize haldeyken bakılan INR değerleri çalışmamızda kullanılmasının bu duruma sebep olduğunu düşünmekteyiz.

Warfarin kullanan grupta tedavi sürecindeki ilk saptanan INR ve pik INR değerleri mutasyon alt gruplarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

Haftalık warfarin kullanım dozu stabil olan hastalarda INR düzeyi ortalamaları arasında istatistiksel anlamlı farkın bulunmamış olması da FDA, IWPC ve CPIC'ın önerileri (21,118,119) doğrultusunda warfarin metabolizması açısından gen mutasyonuna warfarin başlandığı dönemde bakılması, warfarin kullanım dozunun stabilize olduğu hastalarda ise bakılmasının anlam taşımadığını düşündürmektedir.

## SUMMARY

Oral anticoagulants are frequently used in the treatment and prophylaxis of thromboembolic disorders. (1-5). Warfarin is the most commonly used drug in the world as oral anticoagulant (6). Patients are closely followed by international normalized ratio (INR).

Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) is a liver enzyme required for the oxidative metabolism of several important drugs such as warfarin, and a number of genetic polymorphisms have been identified in the CYP2C9 region.

One of these genetic mutations; exon 3 position 144, CYP2C9 \* 2 allele (Arg144Cys) where arginine replaces cysteine, and CYP2C9 \* 3 allele '(Ile359Leu)' in which exolon 7 replaces isoleucine with leucine at position 359 (Ile359Leu), indicating the degradation of in vitro warfarin hydroxylation , 13). One of the CYP2C9 alleles is known as the CYP2C9 \* 1 allele wild type.

The enzyme activity in patients with the CYP2C9 \* 2 allele is 12% of the wild type enzyme activity, while the enzyme activity in patients with the CYP2C9 \* 3 allele is 5% (12,14,15).

The gamma derivative, warfarin, demonstrates its anticoagulant activity by inhibiting the synthesis of vitamin-K-epoxy-reductase enzyme.

Warfarin Na is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract and reaches a peak serum concentration within 2-8 hours. It binds closely to plasma proteins and accumulates in the liver. It is used as a racemic mixture of warfarin, S-isomer and R-isomer. The S-isomer is 3-5 times more effective than the R-isomer.

A control group consisting of 100 patients and 100 healthy volunteers who applied to the Emergency Department of PU Faculty of Medicine and who were on warfarin treatment were included in the study.

In order to detect variants of CYP2C9 \* 2 and CYP2C9 \* 3,

**For the CYP2C9 \* 2 variant:**

5 'TACAAATACAATGAAAATATCATG 3'

5 'CTAACAACCACACTCATAATG 3'

**For the CYP2C9 \* 3 variant:**

5 'AATAATAATATGCACGAGGTCCAGAGATGC 3'

5 'GATACTATGAATTTGGG 3' primers.

The blood samples were collected from the patients for an average of 5 ml (1 hemogram tube) while blood was collected during the follow-up examination and treatment.

100 patients who received warfarin were selected by simple random sampling method in the individuals who came to the study with an emergency service complaint. As a control group, 100 volunteers from healthy subjects were included in the study.

In the group using warfarin, when the INR value was evaluated in terms of warfarin use dozu mutation presence, no statistical difference was found between the groups when evaluated with mutation presence. We think that the use of INR values which are seen during the stabilization of warfarin in patients with this disease is caused by this condition.

In the warfarin group, there was a statistically significant difference when comparing the initial INR and peak INR values in the treatment subgroups.

The fact that there was no statistically significant difference between INR level averages in patients with weekly warfarin use-stabilized patients suggests that the observation of warfarin metabolism in terms of warfarin metabolism during warfarin initiation in the direction of the FDA, IWPC and CPIC recommendations (21,118,119)

## GİRİŞ

Oral antikoagulanlar, tromboembolik bozuklukların tedavisinde ve profilaksisinde sık kullanılmaktadırlar. (1–5). Warfarin, dünyada oral antikoagulan olarak en yaygın kullanılan ilaçtır (6). Bireylerin varfarine olan yanıtı çok farklıdır. Hastalar, international normalized ratio (INR) ile yakın takip edilir. Takibe rağmen yine de her yıl tahmini olarak %7,6–16,5 oranında kanama komplikasyonu görülür. Kanama komplikasyonu en sık warfarin tedavisinin başlangıç döneminde görülür (2,7).

Warfarin, antikoagulan etkisini, vitamin K epoksit'den, indirgenmiş vitamin K oluşumunu sağlayan vitamin K epoksit redüktaz enzimini inhibe ederek göstermektedir (8).

Bu protein, vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1 geni (VKORC1) olarak kodlanmış olup, bu gen mutasyonlarında pıhtılaşma faktör eksiklikleri ve warfarin direnci olduğu bildirildi (9).

Sitokrom P450 2C9 (CYP2C9), warfarin gibi birçok önemli ilacın oksidatif metabolizması için gerekli olan bir karaciğer enzimidir ve CYP2C9 bölgesinde bir dizi genetik polimorfizm tanımlandı (10,11).

Bu genetik mutasyonlardan biri; exon 3 pozisyon 144' de, arjininin sisteinle yer değiştiği CYP2C9\*2 alleli (Arg144Cys), diğeri exon 7 pozisyon 359' da izolösünün lösinle yer değiştirdiği CYP2C9\*3 alleli'(Ile359Leu)' tür ki bu mutasyonlar invitro warfarin hidrosilasyondaki bozulmayı gösterir (12,13). CYP2C9 alellerinden biri, CYP2C9\*1 alleli wild, en yaygın tip olup, doğal tip genotip olarak bilinir.

CYP2C9\*2 allelini taşıyan hastalardaki enzim aktivitesi, wild tip enzim aktivitesinin %12'si, CYP2C9\*3 allelini taşıyan hastalardaki enzim aktivitesi ise %5' idir (12,14,15).

Her iki varyant allelin, kararlı dozu elde etme güçlüğüne sebep olduğu, warfarin doz gereksiniminde azalma ve ilaç kullanımının erken döneminde daha yüksek kanama riski ile ilişkisi olduğu görüldü (16–22).

Warfarin tedavi uygulamasında dozun, hastanın diyeti, eşlik eden hastalık durumu, kilosu, diğeri kullandığı ilaçlar ve genetik faktörlere göre ayarlanması gerektiği için, etkili ve güvenli doz ayarımı yapmak zordur.

Çalışmadaki amacımız; warfarin tedavisi almakta olup hastanemize başvuran hastalarda, genetik yapı ile haftalık doz ihtiyacı, INR düzeyi, cinsiyet ve kilo arasında ilişkiyi incelemektir.



## GENEL BİLGİLER

### KOAGÜLASYON

#### Tanım-Mekanizma

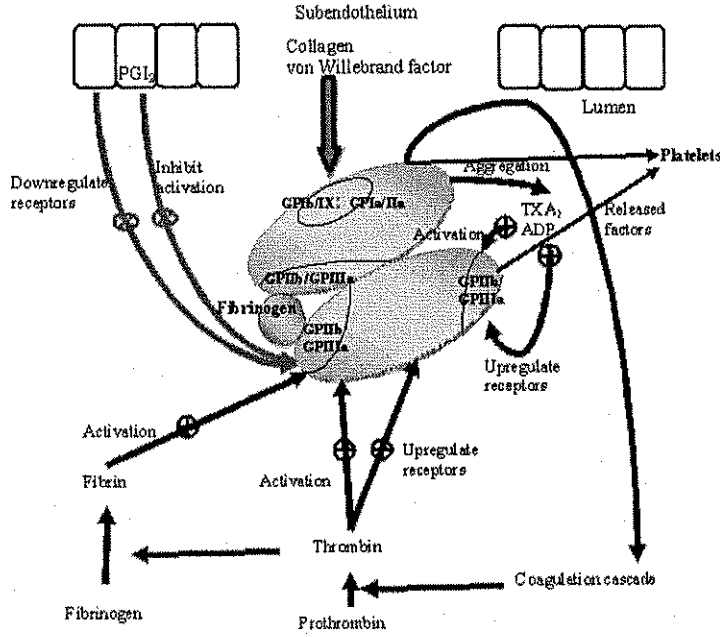
Koagülasyon kanın pıhtılaşmasıdır. Tromboz, normal hemostatik işlemlerin uygun olmayan bir şekilde aktive edildiği durumdur. Trombositler, pıhtılaşma kaskadında, hasarlı bir damar ile temas ettikten sonra aktifleşirler ve bölgeye toplanırlar (23).

Endotel hücrelerinden gelen prostasiklin (PGI<sub>2</sub>), GPIIb / IIIa reseptörleri ile trombosit aktivasyonunu ve artışını engeller. Von Willebrand Factor ve kolajen gibi subendoteldeki yaralanma durumunda, aktive edilmemiş trombositler, GPIb / IX yüzeyinde glikoprotein (GP) reseptörleri ailesi (integrin reseptörleri) ile etkileşime girer, GPIa / IIa ve GPVI oluşur ve trombüs oluşur (23).

Trombosit tıkaçının uzatılması, G-protein bağlantılı reseptörler, tromboksan A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>), kollajen ve trombin ile gerçekleştirilir. Trombosit aktivasyonu ile hücre içi Ca<sup>+2</sup> miktarı artar, böylece miyozin hafif zincirlerinin fosforilasyonu sağlanır. Bu, plateletlerde GPIIb / IIIa reseptörlerinin artışı ve aktivasyonu ile hücre biçiminde değişikliğe neden olur (23).

Hücresinin içerisindeki Ca<sup>+2</sup> miktarının artmasının diğer etkisi ise, araziidonik asit salınan fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivasyonudur.

Tromboksan A<sub>2</sub>, GPIIb / IIIa yüzey reseptörlerinin sentezini daha da artırır. Trombosit agregasyonu, aktifleştirilmiş GPIIb / IIIa ve fibrinojen arasındaki çapraz bağa ihtiyaç duyar ve trombosit depolama granüllerinin boşalmasına ve 5-hidroksitriptamin (5HT), ADP, β-tromboglobulin ve platelet faktör 4'ün salınmasına yol açar. Bu metabolitlerin salınımı, vasküler endotelden PGI<sub>2</sub> sentezi, vasküler endotelden salınan heparini inhibe eder ve daha ileri trombosit agregasyonuna yol açar (23).

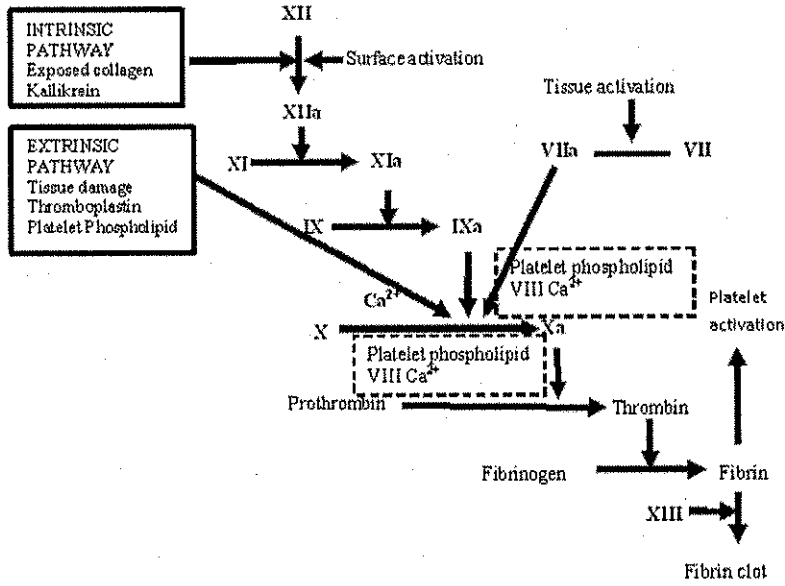


Şekil-1 Plateletler ve Platelet Agregasyonu (23).

Trombüs üretmek için intrinsik ve ekstrinsik yollar harekete geçer. Ekstrinsik yol hasar gören dokudan tromboplastinin salınmasıyla aktive edilir ve birkaç dakika endotel hasarından sonra gerçekleşir. İntrinsik yol, subendotelik kollajen gibi negatif yüklü bir doku ile kan teması ile aktive edilir ve doku zedelenmesi sonrasında 10 dakikadan fazla sürer.

Trombin, son basamağın aktivasyonundan sorumludur ve bunun eylemi, dolaşımdaki antitrombin tarafından engellenmektedir.

Koagülasyon kaskadı, trombin oluşumuna yol açan pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonunu içeren bir dizi enzim aracılığı reaksiyonu içerir. Aktive edilen pıhtılaşma faktörü son derece hızlı bir şekilde etkisiz hale getirilir (24) (Şekil-2).



**Şekil-2** Koagülasyon Kaskadı

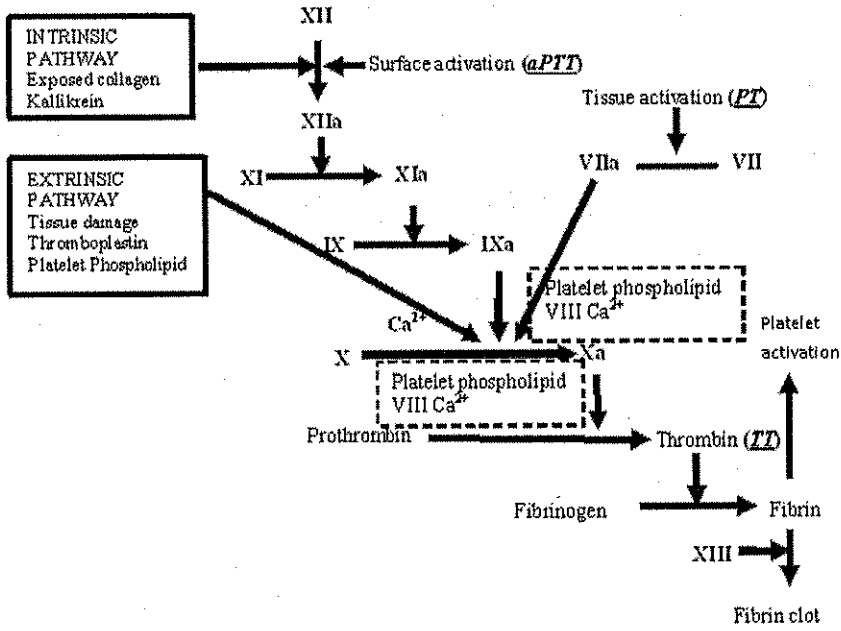
### Koagülasyon Testleri

APTT (Aktive parsiyel tromboplastin zamanı), intrinsik yolun başlangıcından fibrin üretmek için gerekli zamanı ölçer. Faktör XII'nin etkinleştirilmesi, faktör VII'yi aktive etmeden faktör XII'yi aktive edebilen harici bir ajan (ör., Kaolin) ile gerçekleştirilir. (Şekil-3)

25 saniyenin altındaki veya 39 saniyenin üzerindeki değerler genellikle anormaldir (25).

Genellikle ekstrinsik yol ölçen protrombin zamanı ile birlikte yapılır. Protrombin zamanı ölçümü sırasında kan, antikoagülan olarak sitrat içeren bir test tüpüne alınır ve kan hücrelerinin çökeltilmesi için santrifüje tabi tutulur. Sonra sitratın etkisini tersine çevirmek ve pıhtılaşmayı tekrar etkinleştirmek için kalsiyum eklenir. Doku faktörü (faktör III) pıhtı oluşumu sırasındaki süreyi belirlemek için eklenir. (25).

Trombin zamanı, trombin varlığında fibrinojenin fibrine reaksiyonunu sürmek için gerekli zamanı ölçer. (Şekil-3)



**Şekil-3** Koagülasyon Kaskadı ve Koagülasyon Testleri (25).

Kullanılan reaktifler açısından laboratuvar koşulları arasındaki farklılıklar, protrombin zamanı için farklılıklara neden olabilir. Pıhtılaşma için evrensel ölçüm birimi olarak uluslararası normalleştirilmiş oran (INR) kabul edilmektedir. Dahası, üreticiler, ürettikleri doku faktörleri için ISI (International Sensitivity Index) değerini atar ve aşağıdaki formüller sonuçları standartlaştırmak için uygular:

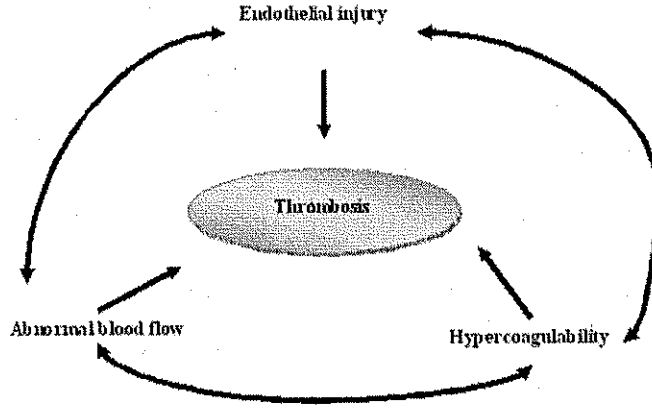
INR, hastanın protrombin zamanı ile kullanılan bir analitik sistem için ISI değerinin gücüne yükselen bir kontrol numunesi oranıdır. ISI genelde 1.0 ve 2.0 arasındadır.  $INR = 5$  gibi yüksek bir INR seviyesi, kanama şansının yüksek olduğunu, buna karşın  $INR = 0.5$  ise, pıhtılaşma şansı yüksek olduğunu gösterir.

Sağlıklı bir kişi için normal aralık 0.9-1.3 ve warfarin tedavisi görenler için 2.0-3.0; ancak belirli INR hedefi daha yüksek olabilir (26).

### **Tromboz**

Tromboz, normal hemostatik işlemlerin uygun olmayan bir şekilde aktive edildiği patolojik bir durumu tanımlar. Trombozda koagülasyon reaksiyonları uygunsuz bir şekilde düzenlenir, böylece bir pıhtı kontrol edilemez bir şekilde büyür ve bir kan damarının lümenini tıkar.

Tromboz oluşumuna üç ana faktör yatkındır: endotel hasarı, anormal kan akımı ve hiper koagülabilite. Bu üç faktör birbirini etkiler ve Virchow triadı olarak bilinir (27), (Şekil-4).



Şekil-4 Virchow Triadı

Venöz trombüs, esasen fibrin ve kırmızı hücrelerden oluşan intravasküler birikimlerdir, arteryel trombüs baskın olarak trombositlerden oluşur. Büyüyen trombüs lümeni yerel lümeni tıkayabilir veya embolize edebilir ve uzaktaki damarlara ilerleyebilir (25).

## ANTİKOAGÜLANLAR

### Heparin

20. yüzyılın başlarından beri venöz tromboemboli (VTE) ve akut koroner hastalıklarının tedavisinde kullanılan heparin, trombin ve bazı pıhtılaşma faktörlerini inhibe ederek antikoagülan etki gösteren bir moleküldür (28).

### Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinler

SH'in yararlılığını artırmak ve sakıncalarını azaltmak amacıyla 1980'lerde SH'in depolarizasyonu ile düşük molekül ağırlıklı heparinler (DMAH)'ler üretildi. Son yirmi yılda yapılan yoğun araştırmalar ve klinik kullanımlar sonucu, DMAH'ler, önemli antitrombotik bileşikler olarak klinik kullanıma girmişlerdir (29).

### *DMAH'lerin Yapısı, Farmakokinetik Özellikleri ve Etki Mekanizması*

DMAH'ler, SH'in yararlılığını artırmak ve sakıncalarını azaltmak amacıyla 1980'lerde onun polimerizasyonu yoluyla üretilmişlerdir (7). DMAH'lerde, antikoagülan etkide esas sorumlu olan antitrombine bağlanan bir pentasakkarid sekansıdır. Bu bağlanmayı faktör Ha, faktör Xa ve faktör XI a'nın inhibisyonu takip eder. (30, 31).

## ORAL ANTİKOAGÜLANLAR

Oral antikoagulanlar, kumarin türevleri ve indandion türevleri olmak üzere iki gruba ayrılır.

Pıhtılaşma faktörlerinin üretim basamaklarını bozarak gecikmeye sebep olurlar, fonksiyonlarını etkilemezler (32,33). Bu da etkilerinin ortaya çıkması için geçen süreyi açıklamaktadır.

Kumarin türevleri arasında dikumarol, tromekzan, kumadin, siklokumarol mevcuttur.

Karaciğerde protrombin, faktör VII, faktör IX ve faktör X' un sentezini engelleyerek koagülasyonu önlerler (34). Kumarin bileşiklerinin etkisiyle hem protrombin zamanı (PT) hem de aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) uzar, etkileri protrombin zamanının değerlendirilmesiyle ölçülür (35,36).

İndandion türevleri kimyasal yapıları kumarinden farklıdır ancak farmakolojik özellikleri benzerlik gösterir. K vitaminini antagonize ederler. Protrombin oluşumunu önleyerek etki gösterirler. Ağız yoluyla kullanılırlar. Bu bileşiklere karşı alerjik reaksiyonlar ve agranülositoz tarif edildi. Fenindion, Difenadion, Anisidon bu gruptadır (32).

### **Warfarin sodyum**

#### ***Warfarinin Tarihçesi***

Dr. Link süt çiftliklerinde karşılaşılan kemirgen kontrol sorunu üzerine çalışmakta iken arkadaşları ile birlikte dikumarolden yola çıkarak daha güçlü bileşikleri izole etmeyi başardı. Patent hakları warfarinin isminin adından türediği (WARF+ coumarin) finanse eden vakfa (WARF) verildi. 1948 yılında, warfarin yeni bir ticari ürün olarak piyasaya sürüldü (37).

#### ***Warfarinin Farmakolojisi, Farmakodinamiği, Farmakokinetiği***

Kumarin türevi olan warfarin, antikoagülan etkinliğini vitamin-K-epoksi-redüktaz enzim sentezini inhibe ederek göstermekte, sonuç olarak K vitaminine bağımlı olarak g-karboksilasyona uğrayan II, VII, IX, X gibi koagülasyon faktörlerinin üretimini engellemektedir.

Warfarin 4-Hidroksi-3-(3-oxo-1-phenylbutyl) coumarin'in sodyum tuzudur. Beyaz higroskopik tozudur. Su ve alkolde oldukça çözünebilir bir moleküldür ve sudaki %1 solüsyonunun PH:7,6-8,6'dır (38).

Warfarin sodyum gastrointestinal sistemden hızla emilmekte ve pik serum konsantrasyonuna 2–8 saatte ulaşmaktadır. Plazma proteinlerine tama yakın bağlanır ve karaciğerde birikir. Warfarin, S- izomer ve R-izomer'den oluşan rasemik karışım olarak kullanılır. S- izomer, R-izomer'den 3–5 kat daha etkindir. Karaciğer'de, sitokrom P450 CYP2C9 izoenzimi warfarin'in oksidatif metabolizmasından sorumludur.

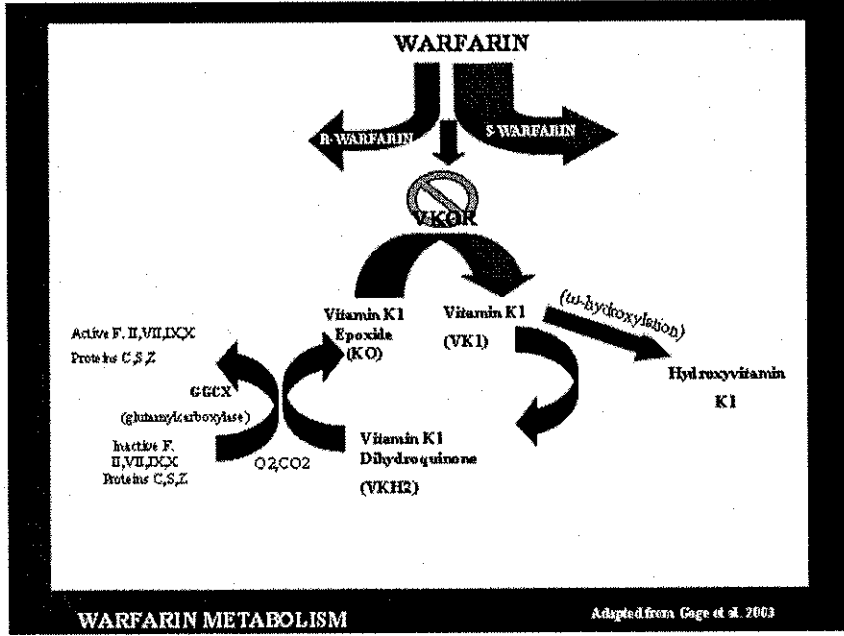
R-warfarin çoğunlukla, CYP1A2 ve CYP 3A4'ü içeren birçok sitokrom P450 izoenzimi ile metabolize edilirken S- warfarin çoğunlukla polimorfik CYP2C9 ile 7-hidroksi warfarin'e metabolize edilir (39,40). Metabolitler, safraya reabsorbe edildikten sonra idrarla atılır.

Warfarin'in plazma yarıömrü ortalama 40 saattir ve etki süresi 2–5 gündür (41). Bazı hastalar warfarin'e herediter rezistans gösterebilir veya CYP2C9 enzim sistemindeki genetik polimorfizm sonucu azalmış metabolizma, kronik böbrek yetmezliği, kronik karaciğer yetmezliği ve yaşlılık gibi nongenetik faktörlerle duyarlılık oluşabilir (42). Warfarin, plasentadan geçer fakat anne sütünde önemsiz miktardadır.

Warfarinin antikoagülan etkisi, vitamin K epoksid redüktazı inhibe ederek, vitamin K antagonizması ile oluşur. Vitamin K'nın redükte formu, faktör 2, 7, 9 ve 10 ile ayrıca natürel koagülan protein C ve S'nin, aktivasyonunda kofaktör olarak rol alır (41), (Şekil-5).

Warfarin'in etki mekanizması indirektir ve mevcut olan pıhtı üzerine etki etmez. Pıhtılaşma faktörlerinin yarı ömrü 6–60 saat olduğundan, warfarinin etkisini görmek için süre gereklidir.

Belirgin terapötik etki genellikle 24 saat içinde gelişir fakat bir pik etkisi genellikle 2–3 güne kadar gelişmez. Warfarinin antikoagülasyon etkisi geç ortaya çıktığı için ilk 2–3 günü kapsamak üzere heparin i.v veya s.c. olarak verilmesi gereklidir (43,44).



**Şekil-5** Warfarin Metabolizması

Warfarin, tromboembolik hastalıkların primer ve sekonder korumasında kullanılan bir antikoagülandır. Atrial fibrilasyon ve prostetik kalp kapağı bulunan veya miyokard infarktüsü geçiren hastalarda sistemik tromboembolizm ve iskemik inme gelişmesini önlemek; ayrıca sinus trombozu ve bazı protrombotik durumlarda iskemik atakların tedavi ve korumasında kullanılmaktadır (42-46).

#### **Warfarinin Yan etkileri**

Warfarin tedavisinin kan üzerine yan etkisi, hemen her organda oluşabilecek kanama ve bunun neticesinde oluşan hematom ve anemidir (38).

Kanama riski birincil olarak, tedavi dozu ile ilişkilidir. Diğer risk faktörleri, ileri yaş (> 65), inme ve gastrointestinal kanama hikayesi, beraberinde aspirin kullanımı, böbrek, karaciğer yetmezliği ve genetik olarak artmış duyarlılığa bağlı olabilir (47).

Toplam kanama riski antikoagülasyon tedavi süresi ile ilişkili olmasına rağmen en yüksek risk, tedavinin erken döneminde gelişir (42,48).

Vitamin K kemik metabolizması ile ilişkilidir ve vitamin K yetersizliği, artmış osteoporotik kırıklara neden olur. Uzun süreli oral antikoagülan tedavi altındaki hastalar, artmış osteoporoz ve kırık riski altındadır (49).

Warfarin fetüs üzerine teratojen kabul edilir. Artmış düşük ve ölü doğum riski ile ilişkilidir. Birinci trimestırda verilen warfarin, fetal warfarin sendromu veya kemik değişiklikleri ve nazal hipoplazi ile karakterize warfarin embriyopatisine;



ikinci ve üçüncü trimestirda kullanımıysa santral sinir sistemi anormalliklerine neden olabilmektedir. Ayrıca gebeliğin geç döneminde kullanımı fetal hemorajiye yol açabilir. (50-51).

Warfarin alan hastalarda, kolestatik karaciğer hasarı olan birkaç vaka rapor edilmiş ve bu vakalarda karaciğer hasarı, ilacın kesilmesi ile geri dönmüştür. Ayrıca ilaca bağlı pankreatit saptanan vakalar mevcuttur (52).

Cilt nekrozu, subkutan yağ dokusundaki venül ve kapillerlerin trombozu sonucu tedavinin ilk 10 günü içinde gelişen warfarinin nadir bir komplikasyonudur (53).

### ***Warfarinin Etkileşimleri***

Etkileşim; artmış veya azalmış antikoagülan metabolizması, warfarin stereoizomerleri üzerine seçici etki, ilaç absorpsiyonundaki ve plazma proteinlerine bağlanma oranındaki değişiklikler şeklinde olabilir.

Pek çok nonsteroid antiinflamatuar (NSAI) ilaç trombosit fonksiyonunu inhibe eder ve gastrointestinal irritasyonla hemoraji riskini artırır. Bazı NSAI'lar, koagülasyon üzerinde intrinsik etki ile veya warfarini plazma protein bölgesinden ayırarak hipoprotrombinemik etkisini artırabilirler. Bu etki genellikle geçicidir ve başladıktan sonraki ilk haftalarda oluşmaktadır özellikle bu dönemde antikoagülasyonun yakın takibi gereklidir.

Yüksek doz aspirin ve diğer salisilatlar warfarinin hipoprotrombinemik etkisini artırır ve oral antikoagülan almakta olan hastalarda bu ilaçların kullanımından sakınılmalıdır.

Fenilbutazon, oksifenbutazon; warfarinin R ve S izomerlerinin metabolizmasını farklı yollarla değiştirerek antikoagülasyon aktivitesini artırır.

Diflunisanol, flurbiprofen, indometazin, ketoprofen, meklofenomat Na, mefenamik asid ve piroksikamı içeren ilaçların; warfarinin hipoprotrombinemik etkisini artırdığını gösteren çalışma sayısı azdır (Tablo-1).

Antiarritmiklerden amiodaronun warfarinin metabolizmasını inhibe ederek aktivitesini artırdığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (54,55) (Tablo-1).

Antiepileptiklerden fenobarbital ve primidon gibi barbitüratlar, warfarin metabolizmasını artırarak aktivitesini azaltırlar. (Tablo-1) Karbamazepinin de benzer

etkiye sahip olduğu gösterildi (56). Valproat trombosit fonksiyonunu inhibe eder ve warfarin ile birlikte verildiğinde dikkatli olunması gerekir (57) (Tablo-1).

Eritromisin, klaritromisin; warfarin metabolizmasını inhibe ederek warfarin etkisini potansiyalize eder.

Rifampisin; warfarini metabolize eden enzimleri aktive ederek, etkisinin azalmasına neden olur (38,58), (Tablo-2).

Asetaminofen	Flukonazol	Kinidin
Allopürinol	Furosemid	Kinin
Amiodaron	Gemfibrozil	Kinolonlar
Amoksisilin	Kloksasilin	Prednizon
Anabolik steroidler	Izoniazid	Sülfınperazon
Aspirin (>1.5 g/gün)	Itrakonazol	Sülfonilüre
Sefalosporinler (sefaklor)	Ketokonazol	Tamoksifen
Simetidin	Metronidazol	Tetrasiklin
Klofibrat	Fenilbutazon	Tiroid hormonları
Siklofosfamid	Omeprazol	Trisiklik antidepresanlar
Disülfiram	Propafenon	Selektif serotonin geri alım inhibitörleri
Ranitidin	Trimetoprim-sülfometoksazol	Heparin
Eritromisin	Propranolol	Vitamin E

**Tablo-1** Warfarinin Etkisini Artıran İlaçlar

Alkol	Fenitoin	Rifampin
Barbitürat	Kolestiramin	Sukralfat
Karbamazepin	Östrojenler	K vitamini
Kortikosteroidler	Griseofulvin	Fenobarbütal

**Tablo-2** Warfarinin Etkisini Azaltan İlaçlar

### ***Warfarin Kullanımına Bağlı Komplikasyonlar ve Yönetimi***

Warfarin tedavisinin iki majör komplikasyonu kanama ve cilt nekrozudur. Kanama riskini etkileyen en önemli faktör antikoagülan tedavinin yoğunluğudur. Birçok amaç için, hedef INR 2.0-3.0 arasındır, INR 2.5-3.5 arası olacak şekilde genellikle daha yoğun antikoagülasyon gerektiren mekanik kalp kapağı ve antifosfolipid antikor sendromu olan hastalar hariçtir.

INR 3.0-4.5 aralığında olduğunda klinik olarak anlamlı kanama riski artar ve eğer INR>5.0 ise kanama olaylarında katsal bir artış olur. Cilt nekrozu öncelikle (sadece değil) protein C eksikliği olan hastalarda meydana gelir. Bu komplikasyon

genellikle tedavi başlangıcından 3-8 gün sonra gelişir ve yüzeysel küçük damarların trombozu sebeplidir.

Warfarin kullanan hastalar INR uzaması ile birlikte kanadığında iki genel prensip önemlidir:

- 1-Kanama sebebini tanımlamaya ve hafifletmeye çalışmak ve
- 2-Antikoagülan etkinin şiddetini azaltmak.

Klinik belirgin bir kanama olmadan INR'de ılımlı yükselme olan bir hastada, warfarinin kesilmesi, dikkatli izlem ve periyodik ölçüm en güvenli yolu oluşturmaktadır (59, 60). Bunun aksine, INR belirgin şekilde yükseldiğinde veya klinik olarak anlamlı kanama olduğunda tersine çevirme önerilmektedir (59, 62).

Warfarine bağlı koagülopatinin tersine çevrilmesinde üç yaklaşım kullanılır (59, 64).

- 1- Warfarin tedavisinin kesilmesi;
- 2- Vitamin K verilmesi
- 3- Taze donmuş plazma (TDP), protrombin kompleks konsantresi veya rekombinant Faktör VIIa (rFVIIa) verilmesidir.

Asemptomatik olup INR seviyesi warfarine bağlı 5-9 arasına yükselen hastalarda oral vitamin K INR'yi subkütan vitamin K'den daha hızlı düşürür. Bu hastalar için, oral 1.0-2.5 miligram vitamin K, 16 saat içinde INR'de ölçülebilir düşüş elde etmeyi, ikinci günde terapötik seviyeyi sağlar (43, 44). INR seviyesi >10 olan asemptomatik hastada da oral 2 miligram vitamin K etkilidir, fakat INR'de düşüş daha uzun sürer (65).

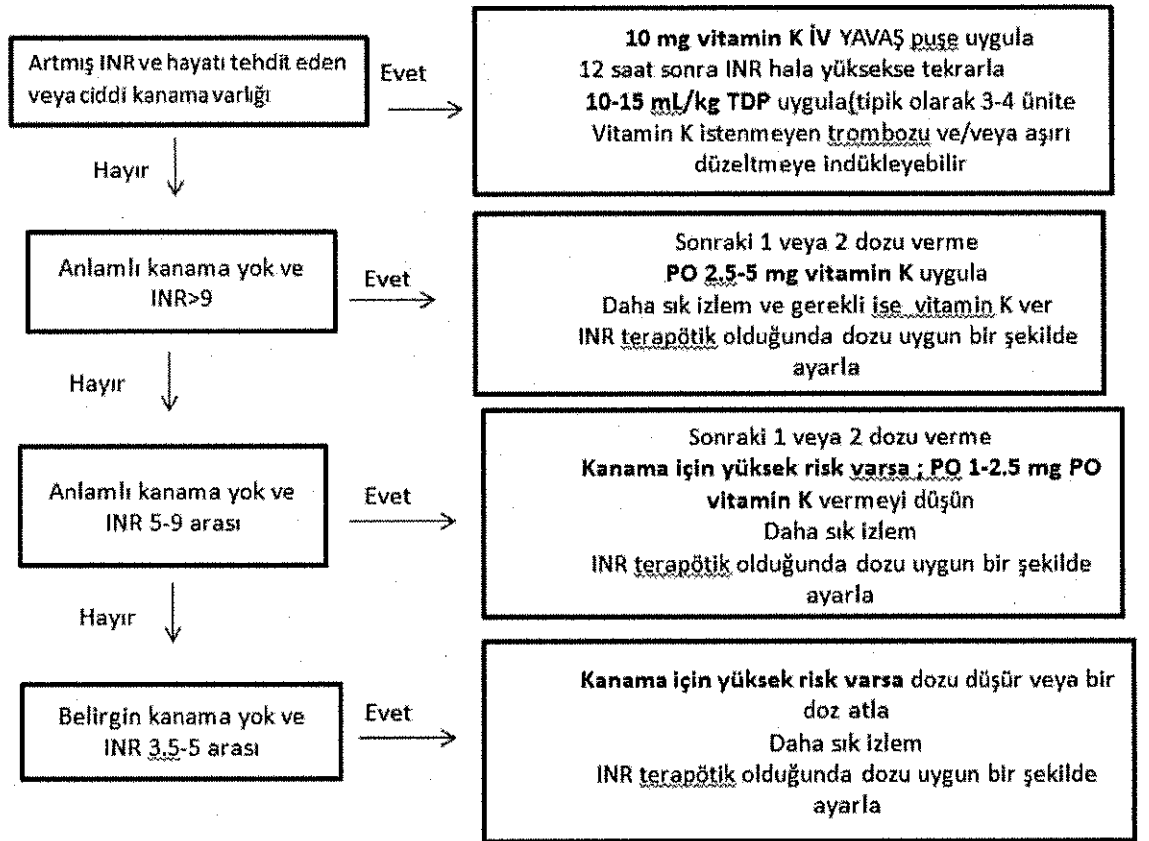
Devamlı antikoagülasyon gerektiren hastalar için İV uygulama ayrıca, oral ve subkütan kullanım ile ilişkilendirilmemiş aşırı düzeltme riski taşır. İV vitamin K hayatı tehdit eden kanama veya INR >20, warfarin (intihar amaçlı aşırı doz) veya rodentisit (örn; brodifacoum) alımı ile zehirlenmiş semptomatik hastalar ile sınırlandırılmalıdır.

Terapötik aşırı antikoagülasyonu ters çevirmenin en hızlı yolu, TDP, konsantre protrombin kompleksi veya rFVIIa kullanılarak yapılan koagülasyon faktör infüzyonudur (64-67). INR değerleri ile pıhtılaşma faktör aktivitesi arasında doğrusal olmayan bir ilişki vardır: 1.7-1.8 arasındaki INR normal pıhtılaşma faktör aktivitesinin yaklaşık %30'una karşılık gelir (68). Bu seviyede normal erişkin plazma

hacmi olarak 35mL/kg kullanılarak, 10-15mL/kg TDP dozunun koagülasyon faktörlerini eski haline getirmesi beklenir (69).

Ne var ki, warfarin aşırı antikoagülasyonu tedavisi için TDP infüzyonuna INR yanıtı analiz edildiğinde bu muhtemel ilişki arasında büyük değişkenlik bulunmuş ve warfarine bağlı aşırı antikoagülasyon için TDP dozunun büyük ölçüde ampirik olduğu sonucu çıkarıldı (70).

Hayatı tehdit eden kanaması olan hastalar ve hızlı, tamamıyla tersine çevirme gerekenlerde protrombin kompleks konsantresi veya olarak dahilinde rekombinant faktör VIIa (rFVIIa) daha güvenilir ve tercih edilir (63, 64).



Kanama için yüksek risk: Yaş > 75, antitrombotik ilaç kullanımı, çoklu ilaç kullanımı, karaciğer veya böbrek hastalığı, alkolizm, yakın zamanda olmuş cerrahi ve travma

Şekil-6 Warfarine Bağlı INR Yükselmesi Yönetimi

### Warfarin Kullanımında Yönetim ve Doz Uygulaması

Antikoagülan tedavi altındaki her bir hasta için ayrı doz miktarı belirlenmesi gerekir. Hızlı antikoagülasyon gerektiği durumlarda ilk 2 gün için günlük 10 mg warfarin başlangıç dozu kullanılabilir ancak pek çok durumda 5 mg warfarin dozu

yeterlidir. 5mg altındaki başlangıç dozları, yaşlı ve artmış kanama riski bulunan hastalarda kullanılabilir. Sonraki takip eden dozlar genellikle günlük 3–9 mg arasındadır. Warfarin dozları her gün aynı zamanda verilmelidir (38).

Warfarin tedavi sürecinde bireyler arası ilaç yanıt farklılıkları, warfarine özgü dar terapötik pencere ve ilaç etkisinin nötralize edilmesindeki zorluklarla karşılaşmakta ve hastalar tedavi sürecinde kanama veya tromboemboli gibi ciddi komplikasyonlarla karşı karşıya kalabilmektedir (66). Warfarin kullanımı ve terapötik doz aralıkları farklı hastalık gruplarında değişkenlik gösteririr (Şekil-7).

ÖNERİLEN INR	Hastalık (durum)
2.0-3.0	Atriyal fibrilasyon, kalp kapak hastalığı
	Biyoprotetik kalp kapağı, akut MI
	Sistemik emboli profilaksisi
	Serebral ven trombozu
	Servikosefalik arteriyel diseksiyon
2.5-3.5	Yüksek riskli cerrahi hastaların venöz tromboemboli profilaksisi
	Mekanik protetik kalp kapak hastaları profilaksisi
	Antifosfolipid antikor sendromu

**Şekil-7** Önerilen INR Düzeyleri

#### *Warfarin Tedavisi Üzerine Etki Eden Faktörler*

Warfarin dozu; hastanın diyetindeki K vitamini miktarı, karaciğer fonksiyonu, eşlik eden medikal hastalıklar, eşzamanlı tedaviler, yaygın CYP2C9 mutasyonunun varlığı veya yokluğunu içeren çok sayıda değişkenlerden etkilenir (67-69). Warfarini pozitif ve negatif yönde etkileyen tıbbi durumlar Tablo 3 ve 4'te verildi.

İleri Yaş	Malabsorbsiyon	Vitamin K eksikliği
Karaciğer hastalıkları	Ateş	Malignite
Safra sistem hastalıkları	Hipertiroidizm	Kollajen doku hastalığı
Kalp yetmezliği	Malnütrisyon	İshal-steatore

**Tablo 3.** Warfarini Pozitif Yönde Etkileyen Tıbbi Durumlar (48).

Diyetle aşırı miktar Vitamin K alımı	Doğuştan warfarin direnci
Hipotiroidizm	Nefrotik sendrom

**Tablo 4.** Warfarini Negatif Yönde Etkileyen Tıbbi Durumlar (48).

## **CYP ENZİMLERİ**

### **CYP2C9 Enzimi**

Bireyler arasında genetik yapının değişikliğine bağlı olarak ilaçların eliminasyonu farklı olabilir veya ilaç farmakokinetiginde bir değişiklik olmaksızın, reseptörlerin yapılarındaki genetik değişiklikler kişiler arası ilaç etkisinin farklılığına yol açabilir. (66).

Sitokrom P450 enzimleri, çeşitli ilaçların faz 1 metabolizmasından ve lipidlerin sentezinden sorumlu hepatik mikrozomal enzimler grubudur. Sitokrom enzim genleri üzerinde pek çok nokta mutasyonu 'SNP' tanımlandı ve bunların fonksiyonel önemi klinik çalışmalarla ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonların fonksiyonel önemleri dışında diğer bir ilgi alanı ise ırksal olarak gözlenen farklılıklardır. Bu mutasyonların alel frekansları her ırk için farklılık gösterebilmektedir (71,72).

Sitokrom P450 enzimleri, kodladıkları genlerin dizi benzerliklerine göre %55'in üzerinde alt üniteye sahip olup, CYP2A, CYP3A, CYP2B, CYP2C, CYP2D şeklinde sınıflandırılırlar (73).

### ***CYP2C9 Allelleri***

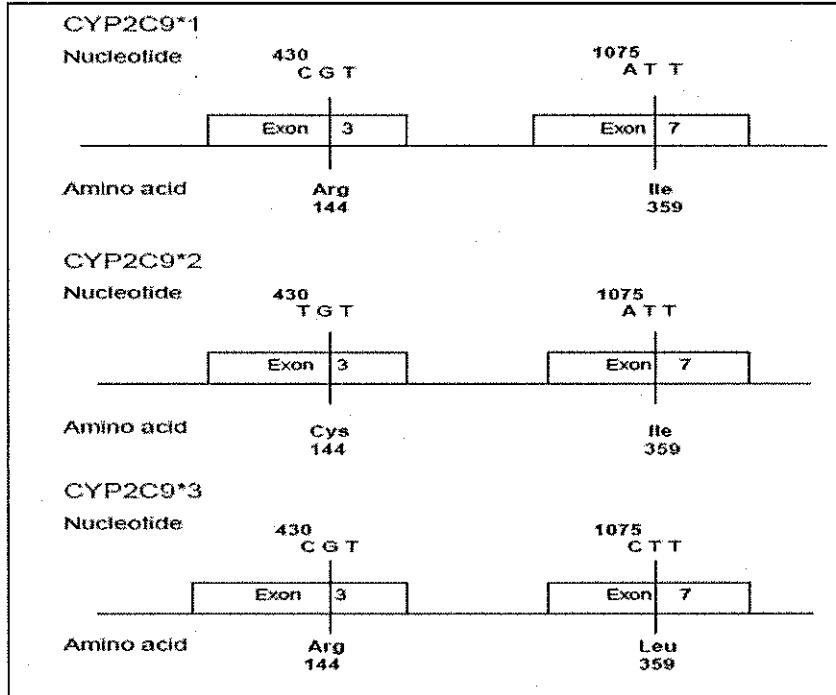
CYP2C9 insan karaciğerinde ilaç metabolize eden önemli bir enzimdir. Oral antikoagülan ilaçlar, phenitoin, oral antidiyabetik ilaçlar, bazı anjiyotensin reseptör blokörleri ve non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar olmak üzere klinik olarak önemli birçok ilacın oksidatif metabolizmasından sorumludur (70-75).

Warfarin; 'S' ve 'R' warfarin olmak üzere 2 izomerden oluşan rasemik bir karışımdır. Bunlardan S-izomer, R-izomerden 3-5 kat daha potentdir. R-warfarin çoğunlukla, CYP1A2 ve CYP 3A4'ü içeren birçok sitokrom P450 izoenzimi ile metabolize edilirken, S-warfarin çoğunlukla polimorfik CYP2C9 ile 7-hidroksi warfarin'e metabolize edilmektedir. S-warfarin, R-warfarin'e göre yaklaşık 3-5 kat daha fazla etkili olması nedeni ile CYP2C9 aktivitesindeki değişiklik, antikoagülan cevabında belirgin farklılığa sebep olur (76).

CYP2C9'u kodlayan gen,10. kromozom'un uzun kolunda (10q 24.2) sitokrom P450 genlerinin kodlandığı kümenin içinde haritalandı. Sitokrom enzimlerinin çoğu nokta mutasyonları nedeniyle genetik polimorfizm göstermektedir. CYP2C9 enziminin kodlandığı gen üzerinde 20 değişik alel formu

bildirildi. CYP2C9\*1(wild type allele / reference allele/ yaygın tip alel) en çok gözlenen formdur. CYP2C9\*2 ve CYP2C9\*3 ise, enzim genleri üzerindeki tek nükleotid polimorfizmi ‘SNP’ sonucu oluşan varyant alellerdir.

En az bir varyant CYP2C9 aleli taşıyan hastalar, homozigot CYP2C9\*1/\*1 genotip’li hastalara göre azalmış enzim metabolizmasına neden olmaktadır (102). Exon 3 üzerindeki tek nükleotid polimorfizmi ‘SNP’; genetik zincirde CGT yerine TGT baz yapısının gelmesine ve genetik yapıdaki bu değişiklik, CYP2C9 enziminde 144.amino asid olan arjinin yerine sistein geçmesine ‘Arg 144 Cys’ yol açar, bu varyasyon CYP2C9\*2 varyant aleli olarak belirtilir (Şekil 1). En az bir CYP2C9\*2 varyant aleli taşıyan hastalar, CYP2C9\*1 alel için homozigot (\*1/\*1) hastalara göre %30-%50 azalmış enzim metabolizması ile ilişkilidir ve warfarin dozunun %14-%20 oranında azaltılması ihtiyacına neden olur.



Şekil-8. CYP2C9 Alelleri

Exon 7 üzerindeki tek nükleotid polimorfizmi ‘SNP’; genetik zincirde ATT yerine CTT baz yapısının gelmesine ve genetik yapıdaki bu değişiklik, CYP2C9 enziminde 359.aminoasid olan isolösin yerine lösin geçmesine ‘Ile 359 Leu’ yol açar, bu varyasyon CYP2C9\*3 varyant aleli olarak belirtilir (Şekil 2). En az bir CYP2C9\*3 varyant alel taşıyan hastalar, CYP2C9\*1/\*1 genotipli hastalara göre

%80–90 azalmış enzim metabolizmasına sahiptir ve %21-49 oranında azalmış ortalama warfarin doz ihtiyacına neden olur (75-79).

Allel:	Baz değişimi:	Aminoasit değişimi:
CYP2C9*1	yok	Arg144 Ile359
CYP2C9*2	(Ekzon 3) CGT→TGT	Cys144 Ile359
CYP2C9*3	(Ekzon 7) ATT→CTT	Arg144 Leu359

şekil-9 CYP2C9 Alelleri, Baz ve Aminoasit Değişimleri

### Warfarinin Bireylerarası Doz Değişkenliği

Karaciğerde büyük lęde P450 sitokrom enzim türleri (CYP2C9, CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 ve CYP2C19) tarafından hidrosillenerek inaktive edilir. Warfarin metabolitleri idrar ve dışkıyla dışarı atılır (70-90).

Bir grup hastada yapılan bir çalışmada, protrombin düzeyinin normalin %10-20'si arasında tutulması için hastalara verilmesi gereken günlük dozun en düşük değeri ile en yüksek değeri arasında yaklaşık 4 kat fark bulundu (91).

Son bulgular CYP2C9 ve VKORC1 gen polimorfizmlerinin warfarinin farmakokinetik ve farmakodinamiğinde önemli etkisi olduğunu gösterdi (92). Oral antikoagülanlarla tedavi sırasında doz, hastada elde edilen yanıtta göre bireyselleştirilmelidir (93-94).

Daha önce bu konuda yapılan çalışmalar; hastaların genotipinin bilinmesinin, warfarinin optimal dozunu tespit edilip hedef INR değerine hızlı bir şekilde erişmeyi sağladığını gösterdi (93-94).



## **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ (PCR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi; bir organizmaya ait normal ya da parçalanmış DNA ya da RNA'nın in vitro ortamda çoğaltılarak genetik farklılıkların incelenmesine olanak veren bir metod'dur. Teorik olarak 1970'lerde ortaya atılmış olmakla birlikte 1980'lerde Kary Mullis ve arkadaşları *Escherichia coli* DNA Polimeraz I'in Klenow fragmanını kullanarak in vitro ortamda tek kopya memeli genini çoğaltmayı başarmışlardır. Saiki ve arkadaşları tarafından 1988 yılında termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus* ile yapılan çalışmalarda ısıya dayanıklı polimerazın kullanılmasıyla metod geliştirilmiş, otomasyonu sağlanmış ve bilim dünyasında moleküler biyoloji, adli tıp, prenatal tanı ve arkeolojiye kadar uzanan geniş bir yelpazede kendisine kullanım alanı buldu (95).

PCR metodu ile 1 µg'dan daha az DNA örneğinin istenilen miktarda çoğaltılarak DNA analizinin saatlerle ifade edilen süreler içerisinde yapılması mümkündür. Ayrıca bu yöntemde DNA amplifikasyonu belirli bir noktada amplifikasyon durdurulduğunda onun devam etmediğinden emin olunmaktadır.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Oluşum Mekanizması**

Bu reaksiyon çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması prensibine dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar ve bu sayede kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur (96).

Bir PCR döngüsü üç evreden oluşmaktadır. Bunlar sırası ile denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) evreleridir.

### **DNA'nın Denatürasyonu**

Bu aşamada çoğaltılması istenen çift sarmal DNA; sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. DNA

sarmallarının birbirinden ayrılması için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler olmakla birlikte 95-100 °C'ye kadar ısıtmak uygulanabilecek en basit ve ekonomik yöntemdir. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin denatürasyon sıcaklığı 92-95 °C'dir (95).

#### ***Primerlerin Bağlanması (annealing)***

Bu evrede primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan sentetik oligonükleotid; ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisi ile bağlanır. Primerler, hedef DNA sarmalının amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanılırlar. Primerler minimum 17-19 nükleotidden oluşmuş oligomerlerdir. Primerlerin bağlanması aşamasında deney ortamının ısısı 40-60 °C'ye düşürülür.

#### ***Primerlerin uzatılması (extension) ve Amplifikasyon***

Primerlerin bağlanması aşaması tamamlandıktan sonra primer hibridleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil olan ve *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Nükleotidleri orijinal DNA sarmalına komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Oluşan yeni DNA sarmalları bir sonraki döngüde primerler için kalıp olarak rol oynarlar.

Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75 °C'lerde ısı uygulanır. 72 °C'de nükleotid eşleşme hızı; tampon, pH, tuz konsantrasyonu ve DNA kalıbının yapısına bağlı olarak saniyede 35-100 nükleotid olarak gerçekleşir. 72 °C'de bir dakikalık uzama süresi 2 kilobayt (kb) uzunluğundaki bir amplifikasyon ürünü için yeterli kabul edilir.

PCR uygulamasında üç evre bir döngü olarak kabul edilir, bir döngü 3-5 dakika sürer ve 20-40 kez tekrarlanır. Her döngü sonunda DNA miktarı geometrik dizi şeklinde iki katına çıkar. Döngü sayısı "n" olarak kabul edilirse "2<sup>n</sup>" çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir (95). Termostabil DNA polimerazları ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlanabilen PCR aletlerinin ("thermal cycler") kullanıma sunulması, PCR'nin verimi ve kullanımında önemli gelişmelere yol açdı (96).

PCR yönteminin uygulanabilmesi için öncelikle tam doğru bir baz dizisi bilgisine ihtiyaç bulunmaktadır. Yöntemin son derece duyarlı olması nedeniyle çok

küçük miktarlardaki kontaminasyon bile yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. PCR çalışmalarında diğer bir dezavantaj ise, her primer çiftinin kendine özgü annealing ve uzama koşulları (ısı, döngü uzunluğu, primer yoğunluğu,  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu, enzim ve DNA miktarı) olmasıdır (95).

### **PCR'in Temel Bileşenleri**

PCR'in temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) karışımı, tampon ve  $MgCl_2$ 'dür.

### ***Kalıp DNA***

PCR yönteminde insan genomik DNA'sı kullanılabilirdiği gibi, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR 'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA da kullanılması mümkündür.

### ***Polimerazlar***

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal iplikteki baz bilgisini kullanarak dNTP'lerden uzun polinükleotid zinciri sentezinin katalizinde rol oynarlar. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan primerlere gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu gerçekleşir. Etkinliğine, büyük DNA ürünlerini çoğaltma yeteneğine göre değişik enzimler seçilebilir. Termotabil DNA polimerazlardan Taq DNA polimerazın polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80 °C'de 35-100'dür.

### ***Primerler***

DNA'nın istenilen bölgesinin çoğaltılması sırasındaki reaksiyonların verimini ve spesifikliğini etkileyen faktörler içerisinde en kritik basamak primer dizaynıdır. Titizlikle dizayn edilmiş primerler, yüksek kalitede ürün elde edilmesini ve istenmeyen bölgelerin çoğaltılmasının önlenmesini sağlarlar.

Primerler, hedef dizinin her iki ucuna uyan oligonükleotidlerdir. Bu iki oligonükleotidden biri, çift zincirli bir DNA molekülünün zincirlerinden birinin

ucundaki hedef diziye, diğeriye, diğeri uçtaki diziye tamamlayıcı olarak uyması için tasarlandı (97).

### ***Deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP)***

Deoksiribonükleaz trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) saflık oranı yüksek tek tek veya dördü karışım halinde bulunurlar. Taq DNA polimeraz  $\mu\text{M}$  ile ifade edilen düşük dNTP konsantrasyonlarında kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR, 100  $\mu\text{M}$  dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir (96).

### ***Tamponlar ve $\text{MgCl}_2$***

Tampon çözeltiler PCR'da ortam pH'ını ayarlamak için kullanılır. Tampon çözeltisinin içeriğindeki Tris-Cl, pH'yı oda sıcaklığında 8.3-8.8 aralığında tutar. 72°C'de sıcaklıkta pH 7.2'ye kadar düşer.

Bütün polimeraz enzimlerinin aktivitelerini gösterebilmeleri için reaksiyon ortamında kation bulunmalıdır. Bu amaçla genellikle  $\text{Mg}^{+2}$  1-1,5 mM aralığında konsantrasyonlarda kullanılır. Düşük  $\text{Mg}^{+2}$  ürün oluşumunda azalmaya yüksek konsantrasyonlar ise spesifik olmayan ürün artışına yol açar.

Standart PCR tamponu, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl ve 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  içerir. PCR'da  $\text{Mg}^{+2}$  konsantrasyonunun iyi ayarlanamaması; primer yapışması, PCR ürünü ve kalıpların ayrılması ve ürün spesifikliğinde istenmeyen değişiklikler gibi sonuçlara yol açar (96,98).

### **ELEKTROFOREZ**

Ortamda çözülmüş olarak bulunan yüklü moleküllerin bir elektrik alanı içerisinde elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda alan içerisindeki dağılımının izlenmesi tekniğine dayanan yöntem elektroforez adı verilir. Analiz edilecek numune destek ortamı vazifesi gören selüloz veya jellere uygulanır. İşlem, içerisinde uygun bir tampon bulunan elektroforez aygıtına yerleştirilerek yapılır. Numune, jelin üzerine nokta şeklinde veya ince bir bant olarak uygulanır.

Moleküllerin jel üzerindeki hareketi moleküllerin yükü, boyutu, biçimi ve elektriksel alanın şiddetine bağlıdır. Elektroforez az miktardaki protein ya da nükleik asit karışımlarının saflaştırma ve analiz işlemlerinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Tipi ya da konumu değişik elektroforez çeşitlerini görmek mümkündür. Dikey ya da yatay konumdaki destek ortamı selüloz ya da poliakrilamid veya agaroz ince jellerden hazırlanmış olabilir. Elektroforez, bir proteinin saflığının, kompozisyonunun ve antijenik özelliğinin analizinde çok faydalıdır (96).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Paü Tıp Fakültesi Acil Servisine başvuran, warfarin tedavisi kullanan, toplam 100 hasta ve 100 gönüllü sağlıklı denekten oluşan kontrol grubu çalışma kapsamına alındı. Evrendeki birey sayısı bilinmeyen örneklem genişliği formülüne göre ( $\alpha=0.05$ ,  $p=0.07$ ,  $d=0.05$ ) evreni temsil edecek en az örnek büyüklüğü 100 olarak bulundu (prevalans %7).

Çalışmada yer alabilecek olan gönüllü bireylerden ortalama 5 ml antikogülanlı (K3EDTA) vakumlu tüplere kan alınarak, standart fenol-kloroform yöntemine göre genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bireylerden alınan 4-5 ml kan örnekleri %2'lik 1 ml etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren tüplere konulduktan sonra DNA'lar izole edilmek için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi.

Hasta grubunun verileri geriye dönük tarandı ve pik INR değeri ile warfarin tedavisine başlandığında ilk bakılan INR değerleri kaydedildi.

Elde edilen genomik DNA'larda; PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile CYP2C9 genine özgü bölge çoğaltılarak ve bu bölgelerde yer alan polimorfik odaklar restriksiyon enzimi ile kesilerek, yüksek çözünürlükteki agaroz jelde gözlenecek ve PCR/RFLP tabanına dayalı genotipleme yapıldı.

### **CYP2C9\*2 ve CYP2C9\*3 alelik varyantlarının belirlenmesi**

CYP2C9\*2 ve CYP2C9\*3 varyantlarını saptamak için ilgili genin gen değişimini içeren bölgesi

#### ***CYP2C9\*2 varyantı için kullanılan primer çifti:***

Ön (Forward) 5' -TAC AAA TAC AAT GAA AAT ATC ATG- 3'

Ters (Reverse) 5' - CTA ACA ACC AGA CTC ATA ATG- 3'

#### ***CYP2C9\*3 varyantı için kullanılan primer çifti:***

Ön (Forward) 5' - AAT AAT AAT ATG CAC GAG GTC CAG AGA TGC - 3'

Ters (Reverse) 5' - GAT ACT ATG AAT TTG GG - 3'

CYP2C9\*2 varyantının taranması için AvaII, CYP2C9\*3 varyantının taranması için AvaIII enzimleri kullanıldı.

Çalışmaya başlanmadan önce etik kurul onayı alınmış olup çalışmaya sonrasında başlandı. Pamukkale üniversitesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulu başkanlığı tarafından 15/12/2015 tarihinde 21 sayılı kararı ile etik kurul onayı alındı.

### **Kandan Numunelerinden Genomik DNA'nın İzolasyonu**

PCR tekniklerinin uygulanabilmesi ve sağlıklı sonuçlar alınabilmesi öncelikle hücre DNA'sının yüksek saflıkta elde edilmesini gerektirir. DNA izolasyonu ard arda yürüyen üç basamakla gerçekleşir. Bu basamaklar sırasıyla;

1. Hücre parçalanması sonucu yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın açığa çıkması,
2. Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin birbirinden ayrılması ve DNA'nın çözünebilir duruma getirilmesi,
3. DNA'nın basit kimyasal ve enzimatik yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden temizlenmesi.

Bu aşamaların ardından da farklı kaynaklı ya da farklı özellikteki DNA moleküllerinin ayrılması gerekmektedir. Bu amaçla kromatografik yöntemlerden yararlanılabilmekle beraber jel elektroforezi yöntemi daha yüksek ayırma gücü nedeniyle nükleik asitleri ayırmada en yaygın kullanılan yöntemdir (97).

Çalışmamızda DNA izolasyonu için kullanılan yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile çöktürülmesi ve üstteki sıvı kısmında bulunan DNA'nın etanol yardımı ile yoğunlaşması sağlanarak izole edilmesine dayanır.

DNA izolasyonu için olgu gruplarından elde edilen 4-5 ml venöz kan örneklerinin her birinden 1 ml alındı. Üzerlerine 5 ml retikülosit tuz çözeltisi konularak hafifçe karıştırıldı. Santrifüjleme (3500 rpm'de 15 dakika) sonrası üstte yer alan süpernatant sıvı atıldı. Elde edilen çökelti, üç kez retikülosit tuz çözeltisi ile yıkandı ve her seferinde 15 dakika 3500 rpm'de santrifüjlendi.

Temiz 15 ml'lik santrifüj tüpleri içerisine aktarılan son çökeltilerin üzerine 3'er ml soğuk parçalayıcı çözelti (lizat hazırlama çözeltisi) eklenerek en az 15 dakika berraklaşma sağlanana kadar derin dondurucuda bekletildi. Daha sonra tüpler 3500 rpm'de 15'er dakika santrifüjlenerek üst sıvılar atıldı. Çökelti üzerine 1 ml STE çözeltisi eklendi. Karıştırılarak bir kez daha 3500 rpm'de santrifüj edilip üst sıvılar atıldı.

Elde edilen nükleer pellet çökeltiden kaybetmeksizin tüpler ters çevrilerek filtre kağıtları üzerinde 15'er dakika bekletildi. Daha sonra nükleer pelletler üzerine 1-2 ml STE çözeltisi eklenerek vortekste karıştırıldı. Üzerine ml'de 100 µg olacak şekilde Proteinaz-K ve hacimce %1 oranında SDS eklenerek karıştırıldı. Tüpler oda ısısında bir gece boyunca ve ardından 37 °C sıcaklıkta 2-4 saat süre ile bekletildi. Tüplerin üzerine içerindeki madde ile eşit miktarda doymuş fenol eklenerek karıştırıldı. Bu karışımlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Üstteki su fazı, temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Su fazı üzerine eşit miktarda fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklendi, karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek üstteki su fazları bir erlen içerisine alındı. Alınan su fazı üzerine hacminin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (pH:5) eklendi ve saf etanol ile 20 kat hacmine kadar çoğaltıldı. DNA çöktünceye kadar karıştırıldı. Normal olarak ipliksi görünümde birkaç dakika içerisinde çökelen DNA otomatik pipet ucu yardımıyla Eppendorf tüpleri içerisine konuldu.

Eppendorf tüpü içerisinde bulunan DNA üzerine %70'lik etanol eklenerek karıştırıldı ve tekrar santrifüjlenerek etanol atıldı. Bu şekilde yıkanmış olan DNA, steril saf su yardımıyla çözüldü.

### **Genomik DNA'nın Spektrofotometrik Analizi**

DNA numunelerinin konsantrasyonu ve saflığını belirlemek için 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri Eppendorf® spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

DNA molekülü 260 nm'de azami absorpsiyonu verir. Bu dalga boyunda okunan değer, çift sarmallı DNA molekülünün yaklaşık 50 µg/ml konsantrasyonunda 1.0 optik yoğunluğa (O.Y.) sahip olması temel bilgisine dayanılarak numunedeki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanması esasına dayanır.

### **DNA Derişimi (µg/ml) = O.Y.<sub>260 nm</sub> x Seyreltme Faktörü**

260 nm ve 280 nm arasındaki O.Y. değerleri arasındaki oran (O.Y.<sub>260 nm</sub> / O.Y.<sub>280 nm</sub> oranı) nükleik asit saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA preparatlarında bu oran 1.8'dir. Daha yüksek veya düşük değerler, genellikle sırasıyla RNA, protein veya fenol kontaminasyonlarını gösterir. Protein veya fenol bulaşısı olmadan saf olarak DNA izolasyonu, çalışmamızın kritik basamaklarından birini teşkil etmektedir. Spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilen numunelerden O.Y.<sub>260</sub>



nm / O.Y 280 nm değeri 1,7'den aşağı ve 1,9'dan yukarı olan numuneler elendi ve yeniden izolasyon sürecine başlandı.

### **Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Safılık Kontrolü**

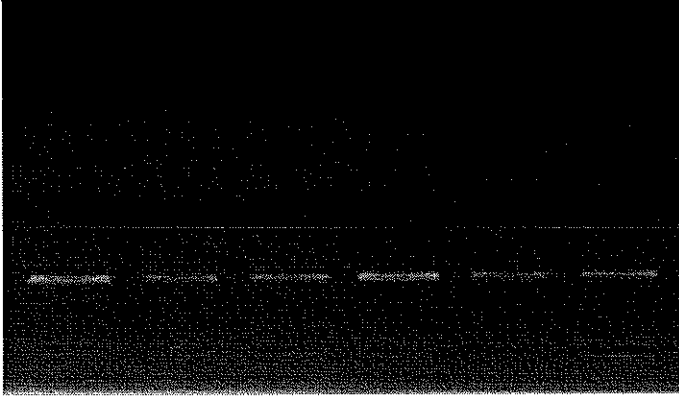
Safılık tayini için DNA numuneleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile de test edildi. Bu amaçla Wealtec® Elite 300 Plus model güç kaynağına bağlı Cleaver® marka yatay jel tepsili elektroforez kabı kullanıldı.

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 0,6 gram toz agaroz hassas terazi ile tartıldı. Temiz bir erlene aktarıldı. Üzerine 30 ml 0,5X TBE (Tris-Borat-EDTA, pH8,3) tamponu eklendi. Erlen'in ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Hafifçe karıştırıp Beko® MD-1610 mikrodalga fırına koyuldu. Ara ara kontrol ederek erlen içerisindeki agaroz kristallerinin eridiğinden emin olana kadar ortalama iki dakika ısıtıldı. Kristaller tamamen eriyip sulu fazın altında jel oluştuğunu görünce soğumaya bırakıldı. Heterojen soğumayı engellemek için doğrudan banko üzerinde soğumaya bırakılmadı. Solüsyon yaklaşık 60 °C'ye kadar soğuduğunda üzerine UV ışık altında bantların görülmesini sağlayan etidyum bromür'den 3 µl ilave edildi ve karışım yavaşça çalkalandı. Bu işlemler devam ederken, diğer yandan elektroforez kabı, tepsisi ve jel tarakları önce distile su ile ardından %70'lik etanol ile yıkayıp temizlendi. Tepsinin kenarlarına kauçuk bariyerler geçirildi ve üzerinde bulunan bölmelere jel tarakları yerleştirildi. Sıcak jel ve etidyum bromür karışımını içeren erlen, tepsinin 3-4 cm yukarisından tutularak kabın içerisine yavaşça döküldükten sonra jel üzerinde oluşan hava kabarcığı eğer var ise pipet ucu yardımıyla alınarak oda sıcaklığında 30-40 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.

Sürenin sonunda jelin iyice katılaştığını gözlemledikten sonra elektroforez tepsisinin kenarlarındaki kauçuk bariyerler çıkarıldı. Tepsi, yaklaşık 350 ml civarında 0.5X TBE tamponu ile doldurduğumuz yatay elektroforez tankına jelin üzerindeki kuyular negatif kutup olan katot'a bakacak şekilde yerleştirildi. Jelin üzerindeki tarak yavaşça ve dikkatli bir şekilde kaldırıldı. Jelin üzerini 1-1.5 mm kaplayacak şekilde bir miktar daha 0.5X TBE tamponu ilavesi yapıldı. Oluşan bir hava kabarcığı var ise pipet ucu yardımı ile alındı. DNA numunesi [5 µl (0,25-0,5 ng)] ve 1 µl yükleme tamponu (loading buffer), mikropipet ile birkaç defa çekip bırakmak suretiyle iyice karıştırıldı. Karışım (6 µl'lik), mikropipet yardımı ile jelin üzerindeki kuyulardan birine yüklendi. Her bir DNA numunesi için aynı işlem tekrar

edilerek jelin üzerindeki kuyulara sıra ile yüklendi. En son sırada bulunan kuyuya elektroforez sonucu oluşan bantların yerinin net olarak gözlemlenmesini sağlayan 50-1000 baz çiftleri arasında belli aralıklarla kuvvetli bantlar veren DNA merdiveni yüklendi. Elektroforez kabının kapağı kapatıldı. Güç kaynağının elektroforez kabına kablo bağlantıları yapıldı. Güç kaynağı 90 volt'a ayarlanarak numuneler elektroforezde 30 dakika boyunca yürütüldü.

Sürenin sonunda jel UV ışığı altında bilgisayar destekli İntaş® jel görüntüleme sistemi ile görüntülenip kayıt edildi. Jelin kuyularına yerleştirdiğimiz saf DNA, elektroforezde kuvvetli bir tek band şeklinde gözlenmektedir (Şekil-10). Elektroforez sonucunda jel üzerinde değişik bantlara ait leke ve izler bulunması DNA'nın bozunmaya uğradığını gösterir.



Şekil-10 Elektroforezde %2' lik agaroz jel'de 90 volt'ta 30 dakika yürütülen DNA örneklerinin görünümü

### PCR İşlemi

mtDNA HVR I ve II bölgelerine ait tek bir bant elde edebilmek için PCR'de değişik parametreler test edildi. Bu parametreler arasında, MgCl<sub>2</sub> 'ün 1,0 ile 3,0 mM arasındaki konsantrasyonları, primer çiftlerinin 20 ile 100 pmol arasındaki konsantrasyonları ve kalıp DNA'nın 100, 200,300 ve 500 ng gibi değişik konsantrasyonları ile çalışmaların yapılması yer almaktadır. İzlenen genel protokol Tablo-5'te, PCR ile çoğaltma programında kullanılan bileşenlerin ideal hacim ve konsantrasyonları Tablo-6'da sunuldu.

Denatürasyon	94 °C	1 dk	36 siklus
Primer eşleşmesi	55 °C	1 dk	

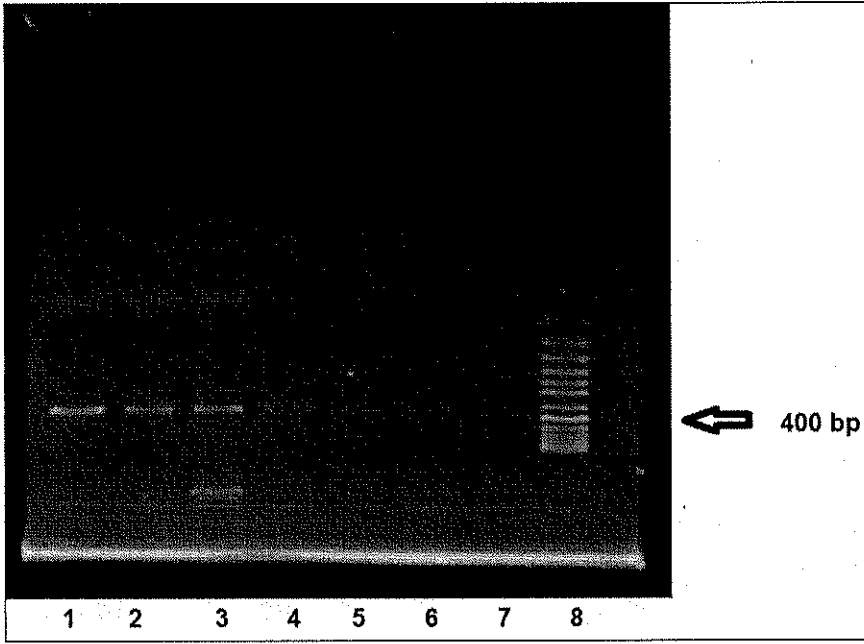
Zincir Uzaması	72 °C	1 dk	
Final Uzatması	72 °C	1 dk	

**Tablo-5** PCR işlem Prosedürü

İçerik	Stok Konsantrasyon	Eklenecek Hacim	50 µl Reaksiyon Karışımındaki Konsantrasyon
Kalıp DNA	3 µl	3 µl	~4 ng/ µl
Tampon	10x	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl	1,5 mM
dNTP Karışımı	10 mM	1 µl	200 µM
Ön Primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Ters Primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Taq DNA Polimeraz Enzimi	5 U/L	1 µl	5 U
Steril Su		50 µl'ye tamamlanır.	

**Tablo-6** mtDNA HVR I ve II bölgelerinde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyon için ideal hacim ve konsantrasyonları

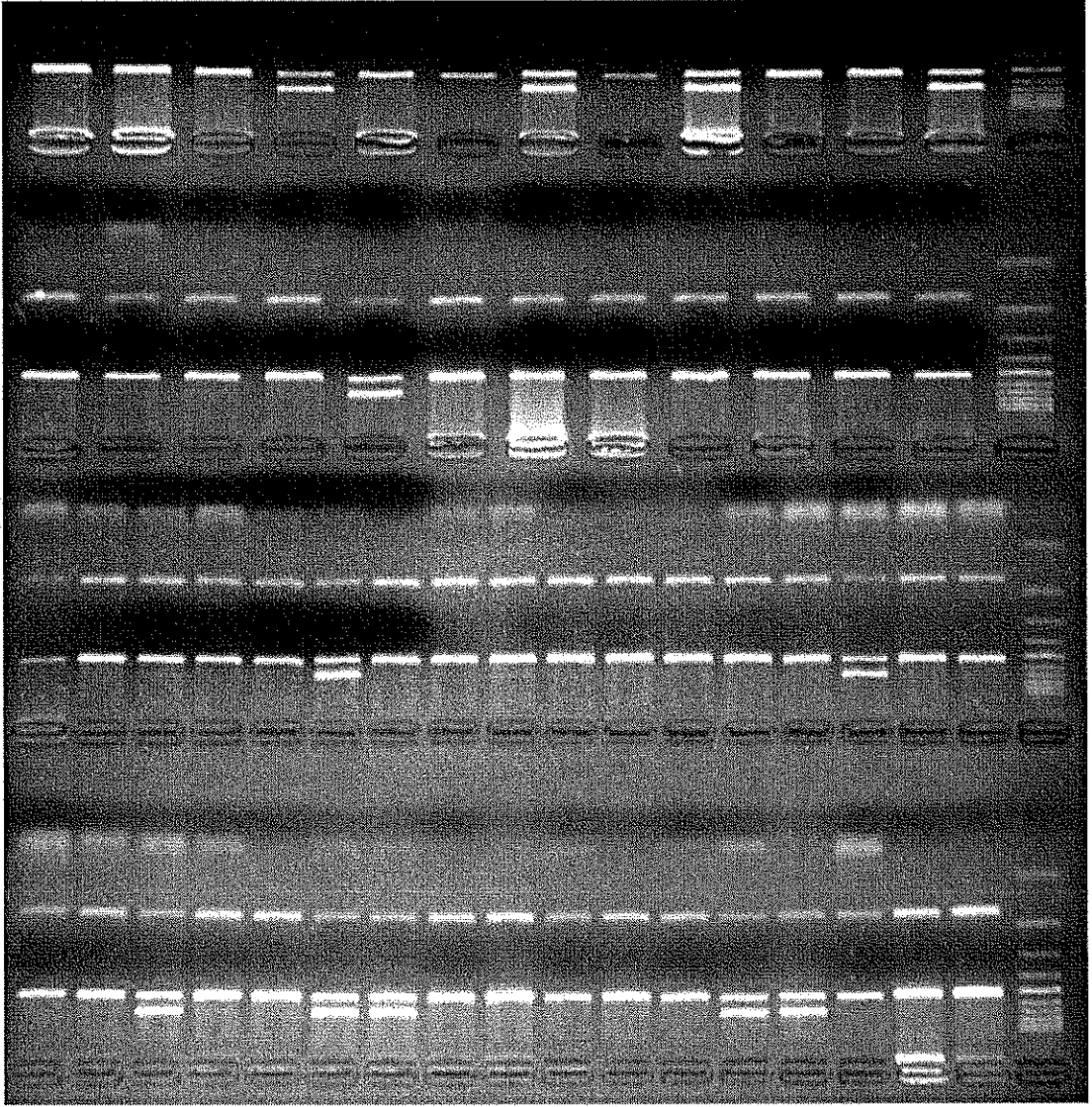
PCR ürünleri sırasıyla 1'er µl yükleme tamponu ile (loading buffer) karıştırılarak jelin kuyularına yüklendi. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde 90 voltta 30 dakika yürütülmesinin ardından yapılan görüntülemeye ~400 bç hizasında ilgili bölgeye ait tek bantlar gözlemlendi. Şekil-11 'de PstI/RsaI PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü örneği sunuldu.



**Şekil-11** *CYP2C9* geni polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü (%2'lik Jel, yüklendikten sonra 90 Volttta 30 dakika yürütüldü. 1-6 numaralı hatlar PCR ürünleri 7 numaralı hat boş, 8 numaralı hat 50-1000 bp marker).

Çalışmamızda, 100 sağlıklı bireyden kan alınarak elde edilen genomik DNA'lardan; PCR yöntemi ile *CYP2C9* genine özgü bölge çoğaltıldı.

Kullanılan primer çiftlerinin baz dizileri Şekil-11'de gösterildi. Bu bölgelerde yer alan polimorfik odaklar restriksiyon enzimi ile kesilerek, yüksek çözünürlükteki agaroz jelde gözlenmiş ve PCR/RFLP tabanına dayalı genotipleme yapıldı. *CYP2C9\*2* varyantı için *AvaII*, *CYP2C9\*3* varyantı için *AvaIII* enzimleri kullanıldı.



**Şekil -12 CYP2C9 alellerinin agaroz jelde görüntülenmesi**

### **Denek Seçimi**

Çalışmaya alınması planlanan hastalara (rasgele seçilen 18 yaşından büyük bireyler) çalışma hakkında bilgi verildi, çalışmaya katılmayı kabul edenlerden yazılı onamları alındı. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ektedir (Ek-1).

Çalışma formunda (Ek-2) gönüllülerin demografik özellikleri, çalışmaya dahil olma veya dışlama kriterleri, karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinin normal olup olmadığı, INR değerleri, haftalık toplam warfarin dozları, CYP2C9\*2 ve/veya CYP2C9\*3 allelik varyantlarının varlığı kayda alındı.

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulu başkanlığına başvuruldu. Çalışma için alınan etik kurul onayından sonra çalışmaya başlandı. Çalışma sırasında gönüllülerin normal tetkik ve tedavi

süreçlerinde alınan kan örnekleri haricinde cilt bütünlüğünü bozacak ya da komplikasyon yapabilecek materyal ya da metot kullanılmadı. Hastalardan başvuru sonrasında tetkik ve tedavileri sürecinde kan alınırken ortalama 5 ml (1 hemogram tüpü) kadar kan çalışma için ayrıldı. Gönüllülerin mahremiyeti ve bilgilendirilmesi için azami dikkat sağlandı.

Çalışmaya acil servise herhangi bir şikayetle gelen, bireylerde basit rastgele örneklem metodu ile belirlenen, warfarin kullanan 100 hasta alındı. 18 yaş üzeri olması, çalışmayı kabul etmesi ve çalışmaya dahil olabilmek için yazılı onam verebilecek yeterliliğe sahip olması, bilincinin açık olması, gebe olmaması, 3 aydan uzun süredir warfarin kullanıyor olması, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu olmaması, bilinen kanama diyatezi olmaması çalışmaya alınma kriterleri olarak belirlendi.

On sekiz yaş altı olmak, çalışmayı kabul etmemek, çalışmaya dair gönüllülük rızasını geri almış olmak, gebe olmak, bilinci kapalı olmak, rıza verebilecek yeterlilikte olmamak (psikoz kliniğinde olmak) warfarin kullanımına 90 günden daha önce başlanmış olması, warfarinin yanında başka antikoagülan kullanımı olması, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu olması, bilinen kanama diyatezi olması dışlama kriteri olarak kabul edildi.

Kontrol grubu olarak sağlıklı deneklerden oluşan 100 gönüllü birey çalışmaya alındı.

Hem hasta grubu hem de sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubundan genetik materyal olur formu onayı alındı (Ek-3)

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

Hasta grubu:

Çalışmaya dahil olmak için yazılı onamı mevcut olmak

18 yaş ve üzeri yaşta olmak

Çalışmayı kabul etmek,

Çalışmaya dahil olabilmek için yazılı onam verebilecek yeterliliğe sahip olmak,

Bilincin açık olmak,

Gebe olmamak,

Karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinin olağan olması

Bilinen kanama diyatezine sahip olmamak

En az 3 aydır aynı dozda Warfarin kullanmak

Kontrol Grubu:

18 yaş üzeri olmak,

Çalışmayı kabul etmek,

Çalışmaya dahil olabilmek için yazılı onam verebilecek yeterliliğe sahip olmak,

Bilinci açık olmak,

Gebe olmamak,

Karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerinin olağan olması,

Bilinen kanama diyatezine sahip olmamak

Tromboembolik olay geçirmemiş, ailede tromboemboli öyküsü tespit edilmemiş olmak

Sigara ve kronik alkol kullanıcısı olmamak,

Kronik hastalık ve ilaç kullanım öyküsü mevcut olmamak,

Warfarin ve benzeri koagülasyon üzerine etkili ilaç kullanmamak,

Acil sağlık hizmetine ihtiyaç duyacağı bir hastalığı mevcut olmamak,

**Gönüllüler İçin Dışlama Kriterleri:**

Hasta grubu:

18 yaş ve altı

Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen

Gebelik

Bilinci Kapalı ve/veya Entübe Edilmiş Hastalar

Warfarin kullanımına 90 günden önce başlanmış olması,

Warfarinin yanında başka antikoagülan kullanımı olması,

Karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu olması,

Bilinen kanama diyatezi varlığı

Kontrol Grubu:

18 yaş ve altı

Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen

Gebe hastalar

Bilinci Kapalı ve/veya Entübe Edilmiş Hastalar

Warfarinin yanında başka antikoagölan kullanımı olması,  
Karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu olması,  
Bilinen kanama diyatezi varlığı,

**Gönüllüler için çalışmadan çıkarılma kriterleri:**

Gönüllüler (hasta ve kontrol grubu) çalışmanın istediği aşamasında çalışmadan çıkmak istediğini belirtebilir.

**İstatistiksel Analiz**

Veri analizinde "SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 17.0" istatistik paket programı kullanıldı.

CYP2C9 alel ve genotip frekansları kontrol ve hasta gruplarındaki farklılıklar ki kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. CYP2C9 genotiplerinin ana etkileri multivariate unconditional logistic regression kullanılarak tahmin edilen odds ratio (OR) ve güven aralığı değerleri saptandı.



## BULGULAR

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Acil Servisine başvuran, dahil etme kriterlerine uygun olan, warfarin kullanan 100 hasta ve dahil etme kriterlerine uygun olan 100 sağlıklı gönüllü alındı.

Çalışmaya alınan kişilerin (warfarin kullanan+sağlıklı) 103'ü erkek (%51,5), 97'si kadındır (%48,5). Sağlıklı grubun 56'sı(%56) erkek, warfarin kullanan grubun ise 47'si (%47) erkeklerden oluşmaktadır (Tablo-7).

	WARFARİN GRUBU		SAĞLIKLI GRUP		TOPLAM
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	
KADIN	53	%53	44	%44	97(%48,5)
ERKEK	47	%47	56	%56	103(%51,5)
TOPLAM	100	%100	100	%100	200(%100)

Tablo-7 Sağlıklı ve Hasta Grupta Cinsiyete Dair Veriler

	WARFARİN GRUBU	SAĞLIKLI GRUP
ORTALAMA	65,41	58,72
ORTANCA	67,50	59
Std. SAPMA	13,880	15,756

Tablo-8 Sağlıklı ve Hasta Grupların Yaşa Dair Verileri

Sağlıklı ve warfarin kullanan popülasyonun tamamının yaş ortalaması 61,95  $\pm$ 14,46 medyan yaş 63 saptandı. Sağlıklı grubun yaş ortalaması 58,72 $\pm$ 15,756, medyan değeri 59 saptandı. Hasta grubun ise yaş ortalaması 65,41  $\pm$ 13,880, medyan değeri olarak saptandı (Tablo-8)

Çalışmaya alınan popülasyonun kiloları değerlendirildiğinde sağlıklı grubun kilo ortalaması 72,80 $\pm$ 14,310, medyan kilo değeri 71 olarak saptandı. En yüksek kilo değeri 121, en düşük kilo değeri ise 47 olarak saptandı.

Warfarin kullanan grubun kilo ortalaması 58,72 $\pm$ 15,756, medyan kilo değeri ise 59 olarak saptandı. En yüksek kilo değeri 135, en düşük kilo değeri ise 35 olarak saptandı (Tablo-9)

	WARFARİN GRUBU	SAĞLIKLI GRUP
ORTALAMA	58,72	72,80
ORTANCA	59	71
Std. SAPMA	14,310	15,756

**Tablo-9** Sağlıklı ve Warfarin Kullanan Gruplar ve Kilo Ortalamaları

Warfarin kullanan grubun ortalama INR değeri  $3,59 \pm 3,49$ , olarak saptandı. Medyan INR değeri 2,42 saptandı. En yüksek saptanan INR değeri 18,90, en düşük INR değeri ise 0,92 olarak bulundu (Tablo-10).

	WARFARİN GRUBU-INR
ORTALAMA	3,59
ORTANCA	2,42
Std. SAPMA	3,49
EN YÜKSEK INR	18,90
EN DÜŞÜK INR	0,92

**Tablo-10** Warfarin Kullanan Grupta INR Değerleri

Warfarin kullanan grupta INR değerleri aşağıdaki şekilde kategorize edildi.

- INR <2,5
- $3,5 > \text{INR} \geq 2,5$
- INR  $\geq 3,5$

INR değeri <2,5 ölçülen kişi sayısı 52(%52) olarak bulundu. INR değeri 2,5-3,5 aralığında ölçülen kişi sayısı 18 (%18), INR değeri  $\geq 3,5$  ölçülen kişi sayısı ise 30 (%30) olarak saptandı (Tablo-11).

INR DEĞERİ	SAYI	YÜZDE
INR <2,5	52	%52
$3,5 > \text{INR} \geq 2,5$	18	%18
INR $\geq 3,5$	30	%30

**Tablo-11** INR Kategorik Verileri ve Populasyonda Oranları

Warfarin kullanan grup erkeklerinde INR <2,5 olan kişi sayısı 25, INR 2,5-3,5 arası ölçülen kişi sayısı 11, INR si 3,5'tan yüksek ölçülen kişi sayısı ise 11 olarak saptandı.

Warfarin grubu kadınlarında ise INR <2,5 olan kişi sayısı 27, INR 2,5-3,5 arası ölçülen kişi sayısı 7, INR si 3,5'tan yüksek ölçülen kişi sayısı ise 19 olarak saptandı (Tablo-12).

			INR			Toplam
			2,49 ve Altı	2,5- 3,49 arası	3,5 ve üzeri	
CİNSİYET	ERKEK	Sayı	25	11	11	47
		%	48,1%	61,1%	36,7%	47,0%
	KADIN	Sayı	27	7	19	53
		%	51,9%	38,9%	63,3%	53,0%
TOPLAM		Sayı	52	18	30	100
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tablo-12** Cinsiyete Göre INR Aralıkları

Warfarin kullanan grubun haftalık ortalama warfarin kullanım dozu  $29,250 \pm 11,69$ mg, medyan doz 28,750 mg olarak saptandı. En yüksek doz kullanımı 70 mg en düşük doz kullanımı ise 8,75 mg olarak saptandı.

Hastaların vücut ağırlıkları da değerlendirmeye alındı ve kumadin kullanım dozunun hastaların vücut ağırlıkları ile de ilişkili oldukları da göz önünde bulundurularak (70) kişilerin kilolarına göre günlük warfarin kullanım dozları hesaplandı. Günlük ortalama warfarin dozu  $0,058 \pm 0,265$  mg/kg/gün olarak bulundu. Ortanca değeri 0,534 mg/kg/gün, en yüksek warfarin kullanım düzeyi 0,17 mg/kg/gün, en düşük warfarin kullanım düzeyi ise 0,02 mg/kg /gün olarak bulundu (Tablo-13).

<b>ORTALAMA</b>	0,058mg
<b>ORTANCA</b>	0,053 mg
<b>Std. Sapma</b>	0,0265 mg
<b>EN YÜKSEK</b>	0,02 mg
<b>EN DÜŞÜK</b>	0,17 mg

**Tablo-13** Kilo Bazlı Günlük Warfarin Kullanım Dozu

Warfarin kullanan grupta CYP2C9 geni AVA\_II mutasyonu taşıyan bireylerin sayısı 37(%37), AVA\_ II mutasyonuna sahip olmayan bireylerin sayısı ise 63 olarak saptandı (Tablo-14).

Sağlıklı grupta ise 17 kişide AVA\_II mutasyonu tespit edildi.83 bireyde ise AVA\_II mutasyonu tespit edilmedi (Tablo-14).

AVA_II MUTASYONU		Sağlam	Warfarin	Toplam
AVA_II SAĞLAM	Sayı	63	83	146
	%	63,0%	83,0%	73,0%
AVA_II MUTASYONU	Sayı	37	17	54
	%	37,0%	17,0%	27,0%
TOPLAM	Sayı	100	100	200
	%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-14** Bireylerdeki AVA\_II mutasyonu

AVA\_II mutasyonunun cinsiyete göre dağılımına bakacak olursak warfarin kullanan erkeklerde 20 kişide, sağlıklı erkeklerde 4 kişide; warfarin kullanan kadınlarda 17 kişide, sağlıklı kadınlarda ise 17 kişide AVA\_II” mutasyonu tespit edildi(TABLO-15)

		AVA_II SAĞLAM	AVA_II MUTASYONU	TOPLAM
CİNSİYET (SAĞLAM))	ERKEK	43(%90,5)	4(%8,5)	47
	KADIN	40(%75,5)	13(%24,5)	53
CİNSİYET (WARFARİN	ERKEK	36(%64,3)	20(%35,7)	56
	KADIN	27(%61,4)	17(%38,6)	44

**TABLO-15** AVA\_II Mutasyonu Ve Cinsiyet Tablosu

Warfarin kullanan grupta CUP2C9 geni AVA\_III mutasyonu taşıyan bireylerin sayısı 35(%35), AVA\_III mutasyonuna sahip olmayan bireylerin sayısı ise 65 olarak saptandı (TABLO-16).

Sağlıklı grupta ise 29 kişide AVA\_III mutasyonu tespit edildi.71 bireyde ise AVA\_II mutasyonu tespit edilmedi (TABLO-16).

		SAĞLAM	WARFARİN	TOPLAM
AVA_III SAĞLAM	SAYI	71	65	136
	%	71,0%	65,0%	68,0%
AVA_III MUTASYONU	SAYI	29	35	64
	%	29,0%	35,0%	32,0%
TOPLAM	SAYI	100	100	200
	%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-16** Bireylerdeki AVA\_III Mutasyonu

AVA\_III mutasyonunun cinsiyete göre dağılımına bakacak olursak warfarin kullanan erkeklerde 17 kişide, sağlıklı erkeklerde 14 kişide; warfarin kullanan kadınlarda 18 kişide, sağlıklı kadınlarda ise 15 kişide AVA\_III mutasyonu tespit edildi(TABLO-17)

		AVA_III SAĞLAM	AVA_III MUTASYONU	TOPLAM
CİNSİYET (WARFARİN)	ERKEK	30	17	47
	KADIN	35	18	53
CİNSİYET (SAĞLAM)	ERKEK	42	14	56
	KADIN	29	15	44

**TABLO-17** AVA\_III Mutasyonu Ve Cinsiyet Tablosu

Tüm gruplarda AVA\_II ve AVA\_III mutasyonlarına bakıldığında warfarin kullanan grupta 54 hastada hem AVA\_II hem de AVA\_III mutasyonu olmadığı saptandı.29 hastada AVA\_III mutasyonu mevcut fakat AVA\_II mutasyonu saptanmamış,11 hastada ise AVA\_II mutasyonu mevcut iken AVA\_III mutasyonu saptanmadı.6 hastada da her iki gende mutasyon saptandı.

Sağlıklı bireylerden oluşan grupta 39 hastada hem AVA\_II hem de AVA\_III mutasyonu olmadığı saptandı. 24 hastada AVA\_III mutasyonu mevcut fakat AVA\_II mutasyonu saptanmamış,32 hastada ise AVA\_II mutasyonu mevcut iken AVA\_III mutasyonu saptanmadı. 5 hastada da her iki gende mutasyon saptandı (Tablo-18)

AVA_II, AVA_III MUTASYONLARI		SAGLAM	WARFARİN	TOPLAM
Hiç Mutasyon Yok	SAYI	39	54	93
	%	39,0%	54,0%	46,5%
AVA_III var AVA_II Sağlam	SAYI	24	29	53
	%	24,0%	29,0%	26,5%
AVA_II var AVA_III Sağlam	SAYI	32	11	43
	%	32,0%	11,0%	21,5%
İkisinde De Mutasyon Var	SAYI	5	6	11
	%	5,0%	6,0%	5,5%
Herhangi Birinde Mutasyon Var	SAYI	56	40	96
	%	56,0%	40,0%	48,0%
TOPLAM	SAYI	100	100	200
	%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-18** Gruplardaki AVA\_II, Ava\_III Mutasyonları

Warfarin kullanan grupta hastaların INR aralıkları ve AVA\_II mutasyonları incelendiğinde AVA\_II mutasyonu saptanan hastaların %47'sinin INR düzeyi 2,5 ve altında saptandı. %17'sinde hastanın INR si 2,5-3,5 aralığında, %36'sında ise hastanın INR düzeyi ise 3,5 ve üzerinde saptandı.

AVA\_II mutasyonu saptanmayan hastaların %53 ünde ise (44hasta) hastanın INR düzeyi 2,5 ve altında saptandı. %18 'inde hastanın INR si 2,5-3,5 aralığında, %29'unda ise hastanın INR düzeyi ise 3,5 ve üzerinde saptandı (TABLO-19).

		INR ARALIKLARI			TOPLAM
		2,5 Ve Altı	2,5- 3,49 Arası	3,5 Ve Üzeri	
<b>AVA II</b>					
<b>AVA_II SAĞLAM</b>	<b>SAYI</b>	44	15	24	83
	<b>%</b>	53%	18%	29%	100%
<b>AVA_II MUTASYONLU</b>	<b>SAYI</b>	8	3	6	17
	<b>%</b>	47%	16,7%	20,0%	17,0%
<b>TOPLAM</b>	<b>SAYI</b>	52	18	30	100
	<b>%</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-19** AVA\_II Mutasyonu Varlığı ve Hastalardaki INR Düzeyleri

Warfarin kullanan grupta hastaların INR aralıkları ve AVA\_ III mutasyonları incelendiğinde AVA\_ III mutasyonu saptanan hastaların %62,8'inde INR düzeyi 2,5 ve altında saptandı. %17,1'inde hastanın INR si 2,5-3,5 aralığında, %20,1'inde ise hastanın INR düzeyi ise 3,5 ve üzerinde saptandı.

AVA\_ III mutasyonu saptanmayan hastaların %46'sının ise (44hasta) hastanın INR düzeyi 2,5 ve altında saptandı. %8,4 ünde hastanın INR si 2,5-3,5 aralığında, %35,5'inde ise hastanın INR düzeyi ise 3,5 ve üzerinde saptandı (TABLO-20).

		INR ARALIKLARI			TOPLAM
		2,5 Ve Altı	2,5- 3,49 Arası	3,5 Ve Üzeri	
<b>AVA III</b>					
<b>AVA_III SAĞLAM</b>	<b>SAYI</b>	30	12	23	65
	<b>%</b>	46,1%	18,4%	35,5%	100%
<b>AVA_III MUTASYONLU</b>	<b>SAYI</b>	22	6	7	35
	<b>%</b>	62,8%	17,1%	20,1%	100%
<b>TOPLAM</b>	<b>SAYI</b>	52	18	30	100
	<b>%</b>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-20** AVA\_III Mutasyonu Varlığı ve Hastalardaki INR Düzeyleri

Warfarin grubunda tüm mutasyonlar ve INR düzeyleri birlikte incelendiğinde hiçbir mutasyon saptanmayan hastaların %46,2'sinde(25 hasta) INR düzeyi 2,5 ve altında ölçüldü. %18,5'inde(10 hasta) ise INR düzey 2,5-3,5 aralığında, %35,1'inde(19 hasta) ise INR düzeyi 3,5 ve üzerinde ölçüldü (TABLO-19).

AVA III mutasyonlu AVA II Sağlam grupta hastaların %65,4'ünde (19 hasta) INR düzeyi 2,5 ve altında ölçüldü. %17,3'ünde(5 hasta) ise INR düzey 2,5-3,5

aralığında, %17,3'ünde(5 hasta) ise INR düzeyi 3,5 ve üzerinde ölçüldü (TABLO-21).

AVA II mutasyonlu AVA III Sağlam grupta hastaların %45,5'inde (5 hasta) INR düzeyi 2,5 ve altında ölçüldü. %18,1'inde(2 hasta) ise INR düzeyi 2,5-3,5 aralığında, %36,3'ünde(4 hasta) ise INR düzeyi 3,5 ve üzerinde ölçüldü (TABLO-21).

Her iki mutasyonun da görüldüğü grupta ise 6 kişinin 3'ünde INR 2,5 ve altında,1 kişide INR 2,5-3,5 aralığında,2 kişide ise INR 3,5 ve üzerinde ölçüldü (TABLO-21)

		INR ARALIKLARI			TOPLAM
		2,5 Ve Altı	2,5- 3,49 Arası	3,5 Ve Üzeri	
Hiç Mutasyon Yok	SAYI	25	10	19	54
	%	46,2%	%18,5	35,3%	100%
AVA III var AVA II Sağlam	SAYI	19	5	5	29
	%	65,5%	27,8%	16,7%	100%
AVA II var AVA III Sağlam	SAYI	5	2	4	11
	%	45,5%	18,1%	36,4%	100%
Herhangi Birinde Mutasyon Var	SAYI	24	7	9	40
	%	46,2%	38,9%	30,0%	40,0%
Her İkisinde De Mutasyon Var	SAYI	3	1	2	6
	%	50%	16,7%	33,3%	100%
TOPLAM	SAYI	52	18	30	100
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

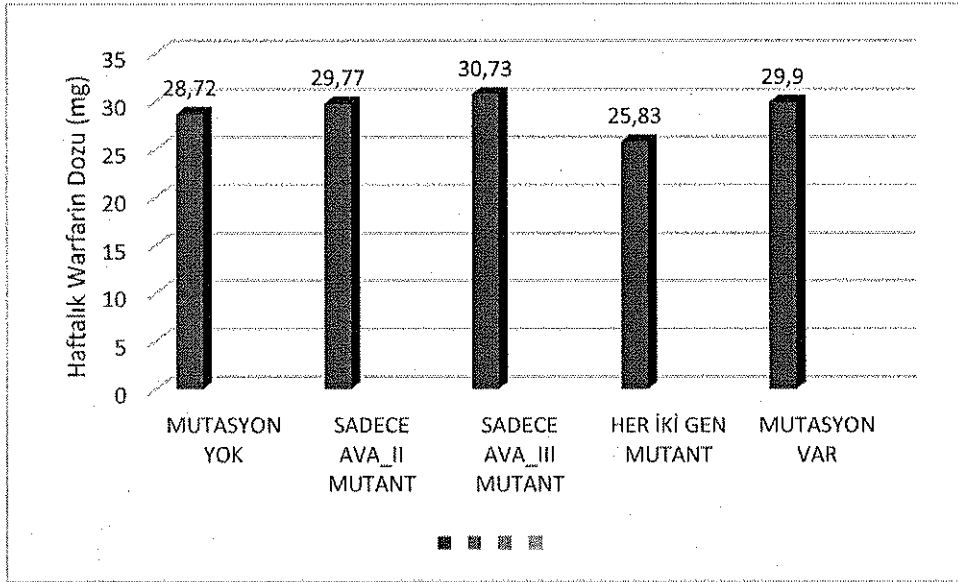
**TABLO-21** Mutasyonlar ve INR Aralıkları

AVA\_II mutasyonuna sahip olan bireylerin haftalık warfarin kullanım doz ortalaması  $29,7 \pm 11,2$  olarak saptandı.

AVA\_III mutasyonuna sahip olan bireylerin haftalık warfarin kullanım doz ortalaması  $30,77 \pm 13,2$  olarak saptandı.

Her iki mutasyona da sahip olan bireylerin haftalık warfarin kullanım dozu ortalaması  $25,83 \pm 11,1$  olarak, hiçbir mutasyona sahip olmayan bireylerin haftalık warfarin kullanım dozu ise  $25,83 \pm 11,4$  olarak saptandı (Grafik-1).





**Grafik-1** Haftalık Warfarin kullanım Dozu-Mutasyon Varlığı

Hastaların haftalık warfarin kullanım dozları gruplandırıldı. Haftalık warfarin kullanım dozu 20mg'ın altında olan hasta sayısı 26, 20-40mg arası warfarin kullanan hasta sayısı 58, 4mg dan daha fazla warfarin kullanan hasta sayısı ise 16 olarak saptandı (Tablo-22).

Haftalık Warfarin Dozu	SAYI	%
19,99 ve altı	26	26,0
20- 39,99 arası	58	58,0
40 ve üzeri	16	16,0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>50,0</b>

**TABLO-22** Haftalık Warfarin Dozları Gruplaması

Hastaların haftalık warfarin kullanım dozları, AVA\_II mutasyonu olup olmadığı ve INR düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde; haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_II mutasyonu tespit edilen 10 hastanın 5'inde(%50) INR düzeyi terapötik değer olan 2,5'un altında kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_II mutasyonu saptanmayan 46 hastanın 24'ünde(%52,8) INR değeri 2,5'un altında kaldı (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_II mutasyonu tespit edilen 10 hastanın 3'ünde(%30) INR düzeyi terapötik değer olan 2,5-3,5 aralığında

kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_II mutasyonu saptanmayan 46 hastanın 8'inde(%17,3) INR değeri 2,5-3,5 aralığında kaldı. (TABLO-23).

HAFTALIK WARFARİN KULLANIM DOZU				INR DÜZEYİ			TOPLAM
				2,5 ve altı	2,5- 3,49 arası	3,5 ve üzeri	
35 mg'dan Az	AVA_II MUTASYONU	AVA_II SAĞLAM	SAYI	24	8	14	46
			%	52,8%	17,3%	39,9%	100%
		AVA_II MUTASYONU	SAYI	5	3	2	10
			%	50%	30%	20%	100%
		TOPLAM	SAYI	29	11	16	56
			%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
35mg.ÜSTÜ	AVA_II MUTASYONU	AVA_II SAĞLAM	SAYI	20	7	10	37
			%	54,0%	18,9%	27,1%	100%
		AVA_II MUTASYONU	SAYI	3	0	4	7
			%	42,8%	0,0%	57,2%	100%
		TOPLAM	SAYI	23	7	14	44
			%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
TOPLAM	AVA_II	AVA_II SAĞLAM	SAYI	44	15	24	83
			%	84,6%	83,3%	80,0%	83,0%
		AVA_II MUTASYONU	SAYI	8	3	6	17
			%	15,4%	16,7%	20,0%	17,0%
		TOPLAM	SAYI	52	18	30	100
			%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-23** AVA II Mutasyonu, Haftalık Warfarin Dozu, INR Düzeyi Tablosu

Haftalık warfarin kullanım dozu 35 mg'dan az olup AVA\_II mutasyonu tespit edilen 10 hastanın 2'sinde(%50) INR düzeyi 3,5'un üzerinde kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_II mutasyonu saptanmayan 46 hastanın 14'ünde(%39,9) INR değeri 3,5'un üzerinde kaldı (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_II mutasyonu tespit edilen 7 hastanın 3'ünde(%42,8) INR düzeyi terapötik değer olan 2,5'un altında kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_II mutasyonu saptanmayan 37 hastanın 20'sinde(%52,8) INR değeri 2,5'un altında kaldı (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_II mutasyonu tespit edilen 7 hastanın hiçbirinde INR düzeyi terapötik değer olan 2,5-3,5 aralığında

değildir. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_II mutasyonu saptanmayan 37 hastanın 7'inde(%18,9) INR değeri 2,5-3,5 aralığında kaldı. (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanım dozu 35 mg'dan fazla olup AVA\_II mutasyonu tespit edilen 7 hastanın 4'ünde(%57,2) INR düzeyi 3,5'un üzerinde kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_II mutasyonu saptanmayan 37 hastanın 10 'unda (%27,1) INR değeri 3,5'un üzerinde kaldı (TABLO-23).

Hastaların haftalık warfarin kullanım dozları, AVA\_III mutasyonu olup olmadığı ve INR düzeyleri birlikte değerlendirildiğinde; haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_III mutasyonu tespit edilen 19 hastanın 11'inde (%57,8) INR düzeyi terapötik değer olan 2,5'un altında kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_III mutasyonu saptanmayan 37 hastanın 18'inde (%48,6) INR değeri 2,5'un altında kaldı (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_III mutasyonu tespit edilen 19 hastanın 4'ünde(%21,1) INR düzeyi terapötik değer olan 2,5-3,5 aralığında kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_III mutasyonu saptanmayan 37 hastanın 7'sinde(%18,9) INR değeri 2,5-3,5 aralığında kaldı. (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanım dozu 35 mg'dan az olup AVA\_III mutasyonu tespit edilen 19 hastanın 4'ünde(%21,1) INR düzeyi 3,5'un üzerinde kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan az olup AVA\_III mutasyonu saptanmayan 37 hastanın 12'sinde(%32,5) INR değeri 3,5'un üzerinde kaldı (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_III mutasyonu tespit edilen 16 hastanın 11'ünde(%68,7) INR düzeyi terapötik değer olan 2,5'un altında kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_III mutasyonu saptanmayan 28 hastanın 12'sinde(%42,8) INR değeri 2,5'un altında kaldı (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_III mutasyonu tespit edilen 16 hastanın 2'sinde(%12,5) INR düzeyi terapötik değer olan 2,5-3,5 aralığındadır. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_II mutasyonu saptanmayan 28 hastanın 5'inde(%17,8) INR değeri 2,5-3,5 aralığında kaldı. (TABLO-23).

Haftalık warfarin kullanım dozu 35 mg'dan fazla olup AVA\_III mutasyonu tespit edilen 16 hastanın 3'ünde(%18,8) INR düzeyi 3,5'un üzerinde kaldı. Haftalık warfarin kullanımı 35 mg'dan fazla olup AVA\_III mutasyonu saptanmayan 28 hastanın 11 'inde (%39,4) INR değeri 3,5'un üzerinde kaldı (TABLO-23).

HAFTALIK WARFARİN KULLANIM DOZU				INR DÜZEYİ			TOPLAM
				2,49 ve altı	2,5-3,49 arası	3,5 ve üzeri	
35 mg'dan Az	AVA_III MUTASYONU	AVA_III SAĞLAM	SAYI	18	7	12	37
			%	48,6%	18,9%	32,5%	100%
		AVA_III MUTASYONU	SAYI	11	4	4	19
			%	57,8%	21,1%	21,1%	100%
		TOPLAM	SAYI	29	11	16	56
			%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
35mg.ÜSTÜ	AVA_III MUTASYONU	AVA_III SAĞLAM	SAYI	12	5	11	28
			%	42,8%	17,8%	39,4%	100%
		AVA_III MUTASYONU	SAYI	11	2	3	16
			%	68,7%	12,5%	18,8%	100%
		TOPLAM	SAYI	23	7	14	44
			%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
TOPLAM	AVA_III	AVA_III SAĞLAM	SAYI	30	12	23	65
			%	57,7%	66,7%	76,7%	65,0%
		AVA_III MUTASYONU	SAYI	22	6	7	35
			%	42,3%	33,3%	23,3%	35,0%
		TOPLAM	SAYI	52	18	30	100
			%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-24** AVA III Mutasyonu, Haftalık Warfarin Dozu, INR Düzeyi

Haftalık kullanılan warfarin dozları, INR düzeyleri, her iki mutasyonun birden varlığı ve en fazla bir mutasyon varlığı incelendiğinde; haftalık warfarin dozu 35 mg'ın altında olan, en fazla 1 mutasyona sahip 51 hastanın 26'sında(%50,9), INR düzeyi 2,5'un altında,10'unda(%19,6) 2,5-3,5 arasında, 15 tanesinde (%29,5) ise 3,5'tan yüksek saptandı(TABLO-24).

Haftalık warfarin dozu 35 mg'ın altında olan, her 2 mutasyona da sahip 5 hastanın 3'ünde (%60) INR düzeyi 2,5'un altında,1'inde (%20) 2,5-3,5 arasında,1 tanesinde (%20) ise 3,5'tan yüksek saptandı(TABLO-25).

Haftalık warfarin dozu 35 mg ve üzerinde olan, en fazla 1 mutasyona sahip olan 43 hastadan 23'ünün(%51,1) INR düzeyi 2,5'un altında,7 sinin (%16,2) 2,5-3,5 aralığında,13'ünün (%32,7) ise INR düzeyi 3,5'un üzerindedir (TABLO-25).

Haftalık warfarin dozu 35 mg'ın üzerinde olup her iki mutasyona birden sahip olan tek 1 hasta mevcut olup bu hastanın INR düzeyi ise 3,5'un üzerindedir(TABLO-25).

HAFTALIK WARFARİN DOZU		INR DÜZEYİ			Total	
		2,5 ve altı	2,5- 3,49 arası	3,5 ve üzeri		
35 mg'ın Altı	Mutasyon Yok Ya Da 1 Tane Var	SAYI	26	10	15	51
		%	50,9%	19,6%	29,5%	100%
	Her İki Mutasyona Sahip	SAYI	3	1	1	5
		%	60%	20%	20%	100%
	TOPLAM	SAYI	29	11	16	56
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
35 mg ve Üzeri	Mutasyon Yok Ya Da 1 Tane Var	SAYI	23	7	13	43
		%	51,1%	16,2%	32,7%	100%
	Her İki Mutasyona Sahip	SAYI	0	0	1	1
		%	0,0%	0,0%	7,1%	2,3%
	TOPLAM	SAYI	23	7	14	44
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
TOPLAM	Mutasyon Yok Ya Da 1 Tane Var	SAYI	49	17	28	94
		%	94,2%	94,4%	93,3%	100%
	Her İki Mutasyona Sahip	SAYI	3	1	2	6
		%	5,8%	5,6%	6,7%	100%
	TOPLAM	SAYI	52	18	30	100
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**TABLO-25** Mutasyon Sayısı-INR-Warfarin Dozu İlişkisi-A

Warfarin kullanan grupta AVA II ve AVA III mutasyon varlığı-yokluğu, INR düzeyi ve haftalık kullanılan warfarin dozu birlikte değerlendirildiğinde haftalık warfarin dozu 35 mg'dan az olan, hiçbir mutasyona sahip olmayan 32 hastanın 16'sında(%50) INR 2,5'un altında,5 tanesinde (%15,6),11 tanesinde (%34,4) ise 3,5'un üzerinde saptandı (Tablo-26).

Warfarin grubunda AVA III mutasyonu olup AVA II mutasyonu olmayan 14 hasta mevcut olup bu hastaların 8'inin(%57,2) INR düzeyi 2,5'un altında,3 tanesinin (%21,4) 2,5-3,5 aralığında,3 tanesinin (%21,4) ise 3,5'un üzerindedir(Tablo-26).

Warfarin grubunda AVA II mutasyonu olup AVA III mutasyonu olmayan 5 hasta mevcut olup bu hastaların 2'sinin(%40) INR düzeyi 2,5'un altında,2 tanesinin (%40) 2,5-3,5 aralığında,1 tanesinin (%20) ise 3,5'un üzerindedir (Tablo-26).

Warfarin kullanan grupta haftalık warfarin dozu 35 mg'dan fazla olan, hiçbir mutasyona sahip olmayan 22 hastanın 9'unda(%41) INR 2,5'un altında,5 tanesinde (%22,7),8 tanesinde (%36,3) ise 3,5'un üzerinde saptandı (Tablo-26).

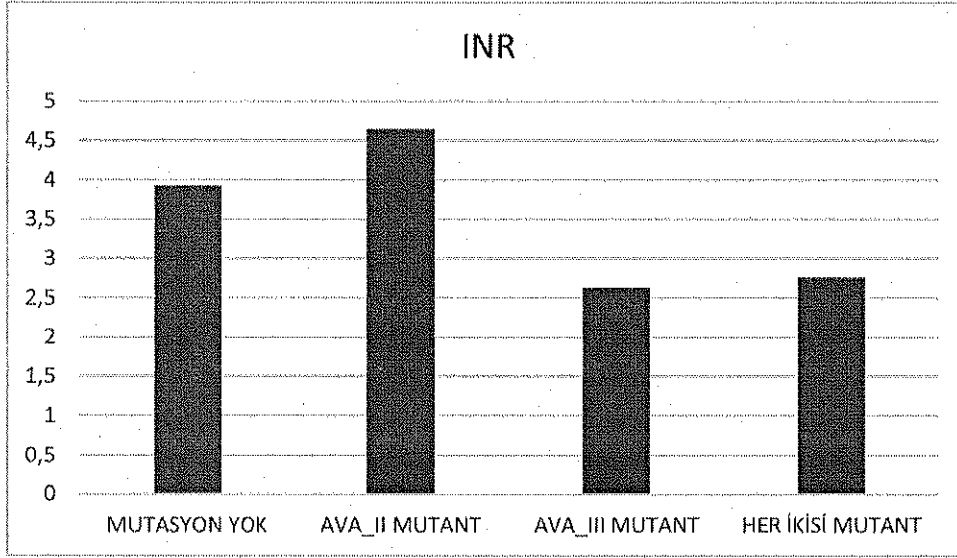
Warfarin grubunda AVA III mutasyonu olup AVA II mutasyonu olmayan 15 hasta mevcut olup bu hastaların 11'inin(%73,4) INR düzeyi 2,5'un altında,2 tanesinin (%13,3) 2,5-3,5 aralığında,2 tanesinin (%13,3) ise 3,5'un üzerindedir (Tablo-26).

Warfarin grubunda AVA II mutasyonu olup AVA III mutasyonu olmayan 6 hasta mevcut olup bu hastaların 3'ünün(%50) INR düzeyi 2,5'un altında,3 tanesinin (%50) ise 3,5'un üzerindedir (Tablo-26).

HAFTALIK WARFARİN DOZU		INR DÜZEYİ			TOPLAM	
		2,5 ve altı	2,5- 3,49 arası	3,5 ve üzeri		
35 mg ve Altı	Hiç Mutasyon Yok	SAYI	16	5	11	32
		%	50%	15,6%	34,4%	100%
	AVA III Mutasyon AVA II Sağlam	SAYI	8	3	3	14
		%	57,2%	21,4%	21,4%	100%
	AVA II Mutasyon AVA III Sağlam	SAYI	2	2	1	5
		%	40%	20%	20%	100%
Her İkisinde De Mutasyon Var	SAYI	3	1	1	5	
	%	10,3%	9,1%	6,3%	8,9%	
TOPLAM		SAYI	29	11	16	56
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
35 mg ve üzeri Tüm Alt Sınıflar	Hiç Mutasyon Yok	SAYI	9	5	8	22
		%	39,1%	71,4%	57,1%	50,0%
	AVA III Mutasyon AVA II Sağlam	SAYI	11	2	2	15
		%	73,4%	13,3%	13,3%	34,1%
	AVA II Mutasyon AVA III Sağlam	SAYI	3	0	3	6
		%	13,0%	0,0%	21,4%	13,6%
Her İkisinde De Mutasyon Var	SAYI	0	0	1	1	
	%	0,0%	0,0%	7,1%	2,3%	
TOPLAM		SAYI	23	7	14	44
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
TOPLAM	Hiç Mutasyon Yok	SAYI	25	10	19	54
		%	48,1%	55,6%	63,3%	100%
	AVA III Var AVA II Sağlam	SAYI	19	5	5	29
		%	36,5%	27,8%	16,7%	100,0%
	AVA II Var AVA III Sağlam	SAYI	5	2	4	11
		%	9,6%	11,1%	13,3%	100%
Her İkisinde De Mutasyon Var	SAYI	3	1	2	6	
	%	5,8%	5,6%	6,7%	100%	
TOPLAM		SAYI	52	18	30	100
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tablo-26 Mutasyon Sayısı-INR-Warfarin Dozu İlişkisi

AVA\_II ve AVA\_III mutasyonları ile INR değerlerinin ortalamaları değerlendirildiğinde; AVA\_II ve AVA\_III mutasyonunun her ikisine de sahip olmayan hastaların INR ortalaması  $3,93 \pm 3,77$ , sadece AVA\_II mutasyonu olanların ortalaması  $4,63 \pm 5,36$ , AVA\_III mutasyonuna sahip olan hastaların INR ortalamaları  $2,63 \pm 1,87$ , her iki mutasyona da sahip olanların ortalaması ise  $2,75 \pm 1,90$  olarak saptandı(Grafik-2).



**Grafik-2** Mutasyon Varlığı ve INR Ortalamaları

Gruplar arası ortalamalar karşılaştırıldığında mutasyonsuz grup ile AVA\_II mutasyonlu grup karşılaştırması yeterli sayıda örnek büyüklüğüne ulaşamadığı için yapılamadı.

Mutasyonsuz grup ile sadece AVA\_III mutasyonuna sahip grup ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (Sigma=0,141)

Mutasyonsuz grup ve herhangi bir mutasyonu olan grup ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,145).

AVA\_II ve AVA\_III mutasyonlu gruplar ve her iki mutasyona sahip olan gruplar arasında ise yeterli örneklem büyüklüğüne ulaşamaması sebebiyle ortalamaların karşılaştırılması yapılamadı.

Hastaların geriye dönük laboratuvar verileri incelendi, warfarin başlanması sonrası ilk INR düzeyleri warfarin tedavisi süresince ölçülen pik INR düzeyleri kaydedildi.

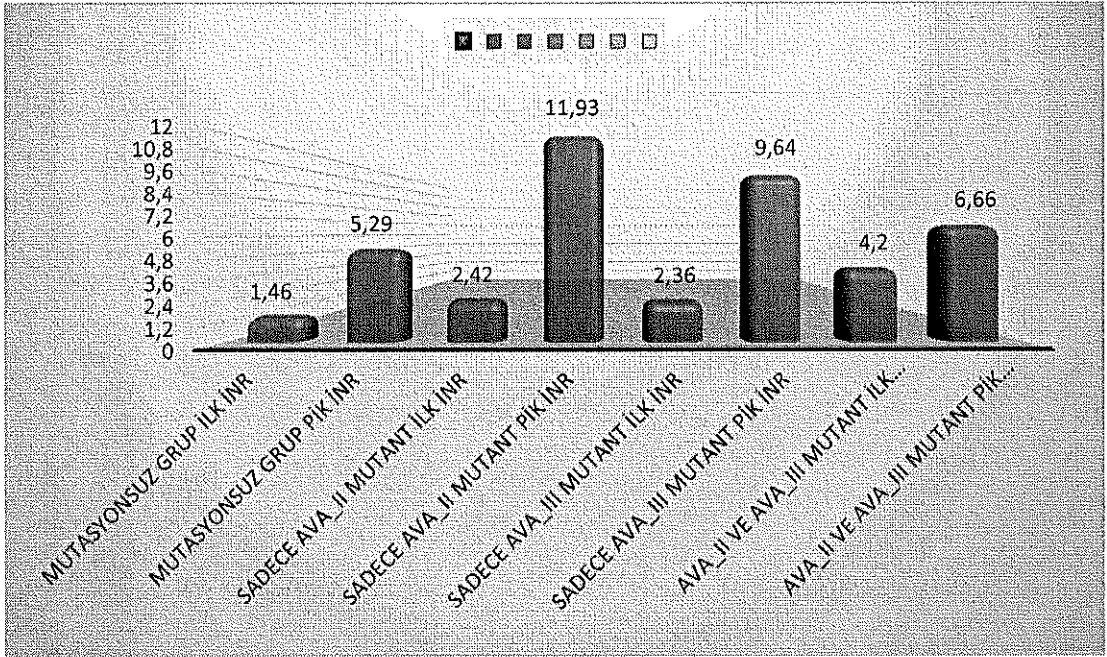
Mutasyonsuz grupta warfarin tedavisi başlangıcı sonrası ilk ölçülen INR ortalaması  $1,46 \pm 0,226$ , tedavi sürecinde en yüksek ölçülen INR değeri ortalaması ise  $5,29 \pm 1,88$  olarak saptandı.

Hem AVA\_II hem AVA\_III mutasyonuna sahip olan bireylerin warfarin tedavisi başlangıcı sonrası ilk INR ortalamaları  $4,20 \pm 2,45$ , tedavi sürecindeki en yüksek INR düzeyi ortalamaları ise  $6,66 \pm 1,97$  olarak saptandı.

Sadece AVA\_II mutasyonuna sahip olan grubun ilk INR değeri ortalaması  $2,42 \pm 0,65$ , en yüksek INR değeri ortalaması ise  $11,93 \pm 5,29$  olarak saptandı.

Sadece AVA\_III mutasyonuna sahip olan grubun ilk INR ortalaması  $2,36 \pm 0,72$ , en yüksek INR değeri ortalaması ise  $9,64 \pm 2,96$  olarak saptandı.

Gruplar arası ortalamaların farklılığı analizinde AVA\_II mutasyonlu, sadece AVA\_III mutasyonlu ve her iki mutasyona da sahip olan grupların ilk INR ve pik INR değeri ortalamalarının mutasyonsuz gruba göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık arz ettiği saptandı ( $p < 0,05$ ) (Grafik-3).



**Grafik-3** Mutasyon Varlığı ile İlk INR ve Pik INR Değerlerinin İlişkisi



## TARTIŞMA

Erişkin toplumda yapılan birçok çalışmada; diyetteki vitamin K desteğinin varfarin dozu ve antikoagülasyona önemli oranda etkisi olduğu vurgulandı. Vitamin K'dan zayıf beslenme ile daha düşük varfarin doz gereksinimi ve INR kontrolünün daha zor olduğu belirtildi (99).

Bin dokuzyüz doksanlara kadar varfarine olan yanıtın, karaciğer hastalığı, hipertroidizm, kalp yetmezliği gibi durumlarda değiştiği, varfarinin bazı ilaçlarla etkileştiği ve ileri yaşlarda ilaca hassasiyetin arttığı bilinmiyordu (7). Genetik polimorfizmlerin tanınması ile ilaçların yan etkileri ile genotip arasındaki ilişkileri gösteren çalışmalar yapıldı.

CYP2C9 genotipi ve kanama arasındaki ilişkinin klinik önemi vurgulanmış, CYP2C9 genotipinin, varfarin tedavisinin özellikle başlangıç evrelerinde olan kanamalarda, bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtildi (21).

Farklı ırklarda ve toplumlarda bu iki genin sıklığı da değişmektedir. Son yıllarda warfarin yanıtına farklılıkta etnik toplulukların temel genetik modülatör olduğu belirtilmektedir. Toplam 453 Kafkas kökenli hastanın CYP2C9 genotip sıklığının incelendiği çalışmada \*1\*1(mutasyon yok), \*1\*2(AVA\_II mutasyonu var) \*1\*3(AVA\_III mutasyonu var) \*2\*2, \*2\*3(Her ikisi de mutant) ve \*3\*3 genotiplerinin toplumda görülme sıklığı sırasıyla %65, %19, %12, %1.6, %1.8 ve %0.4 bulundu (18).

Allelik varyantlar, kodlayıcı bölgedeki amino asit tek nükleotid değişimlerinden kaynaklanmaktadır. Vahşi tip protein CYP2C9 \* 1 (Arg144, Ile359, Asp360) ve en önemli allelik varyant CYP2C9 \* 2 (Cys144, Ile359, Asp360), CYP2C9 \* 3 (Arg144, Leu359, Asp360) (11,13,14,96,97)'dir.

Araştırmalar CYP2C9 \* 2 ve CYP2C9 \* 3 varyantlarının beyaz popülasyonlar arasında önemli olduğunu gösterdi (68,73,96,98-99). Başka bir çalışmada, Afrikalı (Afrikalı Amerikalılar ve Etiyopyalılar) ve Asyalılar üzerinde bu değişkenler daha az sıklıkta görüldüğü saptandı. CYP2C9 \* 2 Asyalılar'da gösterilmedi (10, 68,73,100,102-105).

Varyant allel frekansları Özer N ve ark.'nın çalışmasında CYP2C9 \*2 %13, \*3 %15 olup, diğer bir Türk popülasyonu çalışmasında aynı alleller için sıklıklar sırasıyla %13 ve %10 bulundu (106-107).

Türkiye'den yapılan çalışmalarda allel sıklığı sonuçları genel itibariyle birbiriyile uyumludur. Ayrıca Türk hastaların sonuçları, en çok Kafkas popülasyonu ile benzemektedir (106) (Tablo-24)

Çin popülasyonunda CYP2C9 \*1\*1 genotip sıklığı %95, \*1\*3 %5 ve \*3 \*3 %0 olup, \*2, \*4 ve \*5 varyantlarının da olmadığı bildirildi (23).

Populasyon	Allel Frekansı %	
	*2	*3
İran Kökenli Türkmen	8	4
Tahran (İran)	11	6
Güney İran	25.3	9.8
İtalyan	12.5	9.7
Yunan	12.8	8.1
Rus	10.5	6.7
İsveçli	10.6	7.4
Sloven	12	6.2
İngiltere	10.6	5.2
Mısırlı	11.8	6.2
Türk	0.131	0.08
Japon	0.254	0.11
Afrikalı	3.6	1
İspanyol	13.3	7.7
Ekvadorlu	0.5	3.7

**Tablo 24** Irklar ve CYP2C9 Allel frekansları

Çalışmamızda warfarin kullanan gruptaki AVA\_II mutasyonuna sahip bireylerin oranı %11 olarak saptanmış olup 2005 yılında Sanderson ve ark. tarafından yayınlanan meta analizde verilen literatür bilgileriyle paralel olarak bulundu. Bu meta analizde 11 çalışmadaki toplam 2775 hasta değerlendirmeye alınmış ve CYP2C9\*2 allelini taşıyan bireylerin oranı %9,5- %15 aralığında belirtildi (107).

Warfarin kullanan grupta %29 oranında saptadığımız AVA\_III allelini taşıyan birey oranı ise yine aynı meta analizde verilen %6,5-%7,9 oran aralığına göre 4 kat daha fazla olması dikkat çekicidir. Bu konuda Aynacıoğlu ve ark. tarafından 1999 yapılan çalışmada bu oran %10 düzeyinde saptandı (108). Sordo ve ark.'nın çalışmasında ise Kafkas ırkında ise bu oran %9 düzeyinde bulundu (68).

2011 yılında Dr. Rahşan YILDIRIM ve ark tarafından yapılan "Erzurum Bölgesinde Cyp2c9 Gen Polimorfizmi Ve Warfarin Doz Gereksinimi" başlıklı yan dal uzmanlık tezinde ise CYP2C9\*3 gen mutasyonuna sahip olan bireylerin oranı %26 olarak bulundu. Hem bizim çalışmamız hem de Dr. Rahşan YILDIRIM ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki birey sayılarının azlığının bu oranları verdiği kanaatine varmaktayız (109).

Her iki mutasyona da sahip olan bireylerin oranı %6 olup Buzoianu (110) ve ark tarafından ve Scordo ve ark. tarafından yayınlanan çalışmalardaki literatür verileri ile uyumludur (22).

Türk nüfusu, Avrupa ve Asya kökenli farklı etnik gruplardan oluşmaktadır. Türk toplumunda CYP2C9 allel sıklığı ve gen polimorfizmlerinin warfarin doz gereksinimleri üzerine etkileri hakkında yayınlanan birkaç çalışma vardır (110-112).

Toplam 100 Türk hastada yapılan çalışmada warfarin ortalama günlük dozu 4.1 mg/gün ve warfarin doz gereksinimi 1.16 ile 9.33 mg/gün, arasında farklılıklar göstermektedir.

Türk hastalarda VKORC1 ve CYP2C9 polimorfizmlerinin haftalık warfarin dozunda %40'lık bir azalmaya neden olması dikkat çekicidir (112).

Kuzey Amerikan toplumunda warfarin doz gereksinimi CYP2C9 \*2 için %19, \*3 için %30, yaşın her 10 yılı için %8, vücut yüzey alanındaki standart deviasyondaki azalma başına %13, beyazlarda Afrika kökenli Amerikalılarla karşılaştırıldığında %11 daha az olarak hesaplandı. Bu faktörler ve cinsiyetin dahil olduğu verilerin analizi sonucunda warfarin idame dozunda varyansın %39 olduğu açıklandı (113).

AVA\_II veya AVA\_III mutasyonlarından herhangi birinde mutasyona sahip olan 40 hastanın 24 'ünde INR değerinin hedef düzeyin altında kalması literatür verilerine aykırı gibi görünse de çalışmamızdaki hastalar warfarin başlandıktan bir süre sonrasında acil servise başvuran ve warfarin kullanım dozu belirli ölçüde

sabitlenmiş hastalardır. Bu sebeple bu veriler warfarin tedavisine başlanmış ve CYP2C9\*2 veya 3 gen mutasyonuna sahip hastalarda INR düzeyi ayarlanmasında yaşanan zorluklar sebebiyle; optimal warfarin dozuna ulaşmak istenirken INR düzeyi hedefinden sapılabileceğini düşündürmektedir.

CYP2C9 \* 1 warfarini normal olarak metabolize eder, CYP2C9 \* 2 warfarin metabolizmasını %30, CYP2C9 \* 3 ise warfarin metabolizmasını%90 oranında azaltır. \* 2 veya \* 3 varyantlarına sahip hastalara verilecek olan warfarin daha az metabolize olurken, ilacın dolaşımı daha uzun süre devam edecektir, bu nedenle antikoagülasyon sağlamak için düşük warfarin dozları gerekecektir (114).

Miners JO ve ark çalışmasında ve Wang B ve arkadaşlarının çalışmasında CYP2C9 \* 1 / \* 2 ve \* 1 / \* 3 genotipleri olan kişilerin, vahşi tipli bireylerle karşılaştırıldığında sırasıyla %10-20 ve %20-50 düşük S-warfarin dozlarına ihtiyaç duyduğunu gösterdi (112). CYP2C9'un birçok varyantının in vitro ve in vivo araştırmalarda azaltılmış enzimatik aktiviteyi gösterdiğini gösterildi. (115-116).

Blaisdell J. ve ark. CYP2C9 \* 2 ve CYP2C9 \* 3 allelerini Afrika kökenli Amerikalılar ve Kafkaslar'da göstermişlerdir (114). Bu alleller, warfarin ile tedavi edilen denekleri etkileyebilecek ana CYP2C9 ile ilgili faktörlerdir. CYP2C9.2 ve CYP2C9.3 varyantlarının enzim aktivitesini, S-warfarinin metabolizmasını ve warfarinin doz gereksinimlerini azalttığını ortaya koymuşlardır (117).

Lin M.Q ve ark. tarafından farmakogenetik bazlı günlük warfarin kullanım dozu hesaplama algoritması geliştirilmeye çalışılmış ve bu algoritma istenen INR ye ulaşmak için gereken dozu %49 oranında tahmin edebilmiş (118).

Siddiqi ve ark tarafından yapılan çalışmada her iki gen mutasyonuna birlikte sahip olan grupta günlük warfarin kullanım dozu en düşük olarak saptandı (119)

Çalışmamızda her iki gen mutasyonuna birlikte sahip olan hastaların haftalık warfarin kullanım dozu herhangi bir AVA gen mutasyonuna sahip olmayanlardan %10, bir gen mutasyonu bulunanlardan da %20 ye yakın oranda daha azdır. Bu veriler literatür verileri ile bire bir örtüşmese de kullanım dozu stabil hale gelmiş hasta popülasyonu verileri olduğu için önem taşımaktadır. Ayrıca popülasyonumuzda sadece CYP2C9 mutasyonu çalışıldığı için warfarin doz gereksinimini etkilediği düşünülen diğer gen varyasyonlarının varlığı bilinmemekte ve verilerin bu sebeple farklılık arz ettiği de düşünülmektedir.

Çalışmamızda mutasyon varlığına bakmadığımız özellikle VKORC1 gen defekti warfarin kullanım dozunda önemli bir etken teşkil etmekte ve bu durumun çalışma popülasyonumuzun haftalık warfarin kullanım dozunu etkileyeceğini düşünmekteyiz.

Mutasyon varlığı ve INR değerleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde mutasyonsuz gruptaki INR ortalamaları sadece AVA\_II ve sadece AVA\_III mutasyonlu grup ile farklılık gösterse de istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır (Grafik-2). Özellikle AVA\_III mutasyonlu grupta INR ortalamasının normal gruba göre %60 oranında olmasını warfarin kullanımında doz stabilizasyonu sağlanmasının mutasyonlu hastalarda daha zor olup hekimince daha agresif tedavi verildiğini düşünmekteyiz.

Grafik-1'de görüleceği üzere tek bir mutasyona sahip olan grup normal gruba göre %3, her iki mutasyona birden sahip olan grup ise %10 daha az dozda warfarin kullanmaktadır. Literatür verileri kronik warfarin kullanımında mutasyonlu grupta günlük-haftalık kullanım dozunun daha düşük olacağını belirtmekte olup verilerimiz literatürün bu öngörüsünü sağlamaktadır (120). Popülasyonumuz warfarin tedavisi stabilize olup warfarin sebepli komplikasyona sahip olmayan bireylerden oluşmaktadır ve bu hususta fikir sağlayabilecektir.

Çalışmamızdaki warfarin kullanan kişilerin geriye dönük laboratuvar verileri incelendiğinde mutasyonsuz grupta ilk INR değerleri ortalaması sadece AVA\_II ve sadece AVA\_III mutasyonlu grup ortalaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0,05$ ).

Sadece AVA\_II mutasyonlu grup ilk INR ortalaması mutasyonsuz grubun ilk INR ortalamasının 1,65 katına tekabül etmekte, Sadece AVA\_III mutasyonuna sahip olan grubun ilk INR ortalaması ise mutasyonsuz grubun ilk INR ortalamasının 1,61 katına tekabül etmektedir. AVA mutasyonu varlığı başlangıç dozunda INR düzeyini %60 kadar değiştirebilmekte olduğunu düşünmekteyiz.

Her iki gen mutasyonu olan grubun ilk INR ortalaması 4,20 saptanmış olsa da sadece 6 hasta varlığında objektif değerlendirme imkânı tanımamaktadır. Eğer hasta popülasyonu daha geniş olursa bu konuda da fikir verebilecektir.

Çalışmamızda warfarin kullanan grupta acil servise başvurusu öncesi laboratuvar verilerinden hastanın tedavisi sürecinde ölçülen en yüksek INR

değerlerine bakıldığında Sadece AVA\_II mutasyonuna sahip olan grubun pik INR değeri herhangi bir mutasyon saptanmayan grubun pik INR değerinin 2,25 katı olması hem AVA\_II mutasyonunun INR stabilizasyonu ve optimal warfarin kullanım dozunda oluşturduğu zorluğu ortaya koymaktadır. Bu hastalarda INR stabilizasyonu ve optimal INR değerine ulaşmak için warfarin kullanım dozu optimize edildiği süreçte dahi INR 3,5'un üzerinde kaldı. Bu da literatürde belirtilen AVA\_II mutasyonu ve INR yüksekliği ile ilgili çalışmalarla paralel bir veridir (10).

Ayrıca bu çalışmada VKORC1 gibi warfarin metabolizmasına etki ettiği bilinen genetik mutasyonun analizi yapılmadığı için INR değerinin 3,5 üzerinde kalmasında sadece CYP2C9\*2 allel mutasyonuna sahip olmanın etken olduğu söylenemez. AVA\_II mutasyon varlığı INR değerini warfarin kullanım dozu stabilizasyonu sağlandığında dahi mutasyonsuz gruba göre %20 artırdı. Bu veriler literatür ile uyumludur (22).

Sadece AVA\_III mutasyonuna sahip olan grubun pik INR değeri herhangi bir mutasyon saptanmayan grubun pik INR değerinin 1,8 katına tekabül etmektedir bu veri de warfarin tedavi dozu ve INR düzeyi optimizasyonunda AVA\_III mutasyonlu grupta zorluklarla karşılaşıldığını düşündürmektedir. Grafik 2'deki verilerle birlikte değerlendirildiğinde bu hastalardaki warfarin kullanım dozunun stabilizasyonu ve hedef INR değerine ulaşılabilmesi için diğer hastalara göre daha agresif davranıldığı düşünülmektedir.

Literatür verilerine bakıldığında normal metabolizanlarla karşılaştırıldığında, \* 2 veya \* 3'ün bir veya iki kopyasını alan hastalar warfarine karşı daha duyarlıdırlar, daha düşük dozları gerektirirler ve warfarin tedavisi başlangıç döneminde kanama riskini arttırırlar (10).

Mutasyonsuz grup ve AVA\_II mutasyonlu grupta INR değeri ortalaması hedef aralık olan 2,5-3,5 düzeyinin üzerinde iken AVA\_III mutasyonlu grupta INR değeri ortalaması 2,5-3,5 aralığında saptandı. Ayrıca sadece AVA\_III mutasyonlu grupta haftalık warfarin kullanım dozu ortalamasının sadece AVA\_II mutasyonlu ve mutasyonsuz gruba göre sırasıyla %4 ve %7 daha fazla olsa da istatistiksel olarak gruplar arası fark mevcut değildir ( $p=0,145$ ). Bu durum warfarin kullanımına başlandığı dönemde INR stabilizasyonunun AVA\_III mutasyonlu grupta daha zor oluşu ile açıklanabilir. Hastaların geriye dönük verileri incelendiğinde kanama, hedef

INR düzeyinden sapılması durumu ve warfarin tedavisi doz değişimleri incelenirse bu verilerde AVA\_III mutasyonlu grup ile mutasyonsuz grup arasında anlamlı fark ortaya konabileceğini düşünmekteyiz.

Her iki mutasyona da sahip olan 6 hastanın geriye dönük laboratuvar verilerinde pik INR ortalama değeri mutasyonsuz grubun pik INR ortalama değerinin %25 fazlasına tekabül etmektedir.6 hasta değerlendirme yapmak için yeterli görünmese de mutasyonsuz gruba göre INR değerine mevcut rölatif etkisinin göz önünde bulundurulması gerektiğini düşünmekteyiz. Daha çok sayıda hem AVA\_II hem de AVA\_III mutasyonlu birey incelendiğinde bu konuda daha net fikir edilebilecektir.

2015 ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) yapılan açıklamada:

Hastanın CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri bilinmiyorsa, başlangıçta günde bir kez 2-5 mg olan warfarin dozu kullanımı önerilmektedir. INR yanıtı ve tedavi edilen endikasyon dikkate alınarak her hastanın doz gereksinimlerini belirlenmesi önerilmektedir. İdame dozu dozları günde bir kez 2 ila 10 mg arasında önerilmektedir.

Hastanın CYP2C9 ve / veya VKORC1 genotipi biliniyorsa, bu aralıkları başlangıç dozu seçiminde göz önünde bulundurun. CYP2C9 \* 1 / \* 3, \* 2 / \* 2, \* 2 / \* 3 ve \* 3 / \* 3'e sahip hastalar, belirli bir dozaj rejimi için maksimum INR efekti elde etmek için daha uzun süre (> 2 ila 4 hafta) ihtiyaç duyabilirler (21).

Sitokrom P450-2C9 (CYP2C9) ve vitamin K epoksit redüktaz kompleksi altbirim 1 (VKORC1) varyant alleli testleri, warfarin dozlaması için FDA tarafından önerilmektedir (21).

2014 Klinik Farmakogenetics Uygulama Konsorsiyumu Bildirgesi'nde (CPIC): Gerekli olan warfarin dozunu belirlemek için mümkün olduğunda <http://www.warfarindosing.org> adresinde bulunan farmakogenetik algoritmalar kullanılması yönünde öneri mevcuttur.

Bu tür algoritmaların, farklı etnik popülasyonlardaki büyük araştırmalardan elde edildi ve hem warfarin yanıtındaki değişkenliği etkileyen genetik ve genetik olmayan faktörleri dikkate almakta olduğu, nadir görülen genetik varyantların varlığının, bireylerin warfarin dozlarının iyi tahmin edilmemesinden sorumlu olabileceği düşünöldü.

Bununla birlikte, dozlama denklemleri genel olarak iyi doğrulanmış ve oldukça hassas olmuştur. Ancak, sabit doz yaklaşımına tercih edilen, tablo bazlı dozlama yaklaşımı kullanılmazsa, bir farmakogenetik algoritmaya elektronik erişim mümkün değildir (121).

VKORC1: -1639G>A	CYP2C9*1/*1	CYP2C9*1/*2	CYP2C9*1/*3	CYP2C9*2/*2	CYP2C9*2/*3	CYP2C9*3/*3
GG	5-7	5-7	3-4	3-4	3-4	0.5-2
GA	5-7	3-4	3-4	3-4	0.5-2	0.5-2
AA	3-4	3-4	0.5-2	0.5-2	0.5-2	0.5-2

**Tablo-25** Genotip Varyant ve Önerilen Günlük Warfarin Dozu

VKORC1 ve CYP2C9 genotipleri varfarin dozlamasının en önemli genetik belirleyicileridir. Katkısı VKORC1 dozu gereksinimi değişime katkısı daha büyük (yaklaşık olarak %30) CYP2C9 (genellikle en az%10) (122).

Genetik testten yararlanma olasılığı en yüksek kişiler, henüz warfarin tedavisine başlamayan kişilerdir. Bununla birlikte, genotip kılavuzluğundaki warfarin dozlaması çoğu sağlık sisteminde standart değildir ve yakın tarihli çalışmalardan çoğu, genotip kılavuzluğundaki dozlama algoritmalarının kullanılması, antikoagülasyon kontrolünü ilk anda iyileştirmediğini bildirdi (112-126).

ACCE çalışması ve American College of Medical Genetics (ACMG) kılavuzu CYP2C9 ve VKORC1 varyantlarının kararlı warfarin dozu ile korele olduğuna dair kanıt bulunduğunu bildirmiştir. CYP2C9 ile şiddetli kanama olayları arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar sınırlıdır ve VKORC1 ile ilişkili kanama olayları için kanıt bulunmamaktadır (127-128)

Warfarin dozunu tahmin etmek için INR değerlerini (tedavinin 4., 5. gününü), klinik faktörleri ve genotipi kullanarak bir klinik algoritmayı farmakogenetik algoritma ile karşılaştırmak üzere tasarlanan bir çalışmada 969 kişilik hasta grubunda, klinik algoritmanın warfarin dozunu tahmin etme katsayısı %48, farmakogenetik algoritmada ise %63 idi.

Bağımsız doğrulama kümelerinde, klinik algoritma, warfarin dozunu tahmin etmede%26-43'lük katsayıya farmakogenetik algoritma %42-58'lik bir katsayıya sahiptir (129).

Warfarin dozunu tahmin etmede farmakogenetik warfarin dozlama algoritmalarının doğruluğunu incelemek için tasarlanan retrospektif bir kohort



çalışması yapılmış. Poliklinikte ayaktan antikoagülasyon başlananan hastalardan istikrarlı, terapötik bir varfarin dozuna ulaşmış olan olan 71 yetişkin hastadan elde edilen veriler analize dahil edilmiş. Altı farklı farmakogenetik varfarin dozlama algoritması ve 5 mg sabit doz yaklaşımı değerlendirilmiş. Gage ve ark. Tarafından yayınlanan algoritmalar; 2008 ve IWPC 2009, çalışma popülasyonunda varfarin dozunun tahmininde en doğru olarak saptanmış (130)

Uluslararası Warfarin Farmakogenetics Consoritum (IWPC) algoritmasının, Japon hastaların kohortunda (n = 200) klinik bir algoritma ile karşılaştırılması için tasarlanan bir çalışmada, tahmin edilen dozun fiilen verilen dozdan haftada 7 mg'dan daha az sapmış olduğu Japon hastalarının yüzdesini belirlenmiş. IWPC algoritması, hedef INR'yi elde etmek için klinik algoritmadan daha büyük bir hasta yüzdesini tespit etmiştir (131)

IWPC algoritmasının Türkiye nüfusunda 2014 sağlık istatistikleri boy ortalaması doğrultusunda (132) boy değeri 163 cm kabul edilip genetik mutasyonu bilinmiyor, ayrıca Türk hastaların sonuçları, en çok Kafkas popülasyonu ile benzemekte olduğu göz önünde bulundurularak, ortalama kilo ve yaşın çalışmamızdaki varfarin kullanan grubun yaş ortalaması verileri ile doldurulması sonucunda hesaplayıcının önerdiği haftalık varfarin kullanım başlangıç dozu önerisi 30 mg/hf'dır(Şekil-13).

Çalışmamızda ise başlangıç dozları değil de stabilize olmuş haftalık varfarin kullanım dozları kaydedildi. Daha önce belirtildiği gibi AVA\_II mutasyonuna sahip olan bireylerin haftalık varfarin kullanım doz ortalaması  $29,7 \pm 11,2$ ; AVA\_III mutasyonuna sahip olan bireylerin haftalık varfarin kullanım doz ortalaması  $30,77 \pm 13,2$ ; Her iki mutasyona da sahip olan bireylerin haftalık varfarin kullanım dozu ortalaması  $25,83 \pm 11,1$  olarak, hiçbir mutasyona sahip olmayan bireylerin haftalık varfarin kullanım dozu ise  $25,83 \pm 11,4$  olarak saptanmış olması ve bu grupların pik ve ilk INR değerlerinde mutasyonsuz gruba göre daha yüksek değerler saptanmış olması mutasyonlu gruplarda başlangıç dozlarından daha düşük düzeye inildiğini ifade etmektedir.

Hastalara genetik varyasyonları bilinmeden bu algoritma ile varfarin başlanmış olsaydı her iki mutasyona birlikte sahip bireylerde başlangıç dozundan stabilize doza ulaşma kadar yaklaşık %14 azaltılacaktı. Hiçbir mutasyona sahip

olmayan bireylerde de benzer oranlar mevcuttur.AVA\_II mutasyonuna sahip bireyde %1 doz azaltımı olacakken AVA\_III mutasyonuna sahip bireylerde yaklaşık %2,5 oranında doz artırımı olacaktır.

Mutasyona sahip bireylerde mutasyonsuz gruba göre pik ve ilk INR değerlerinin yüksektir.Mutasyonlu ve mutasyonsuz grubun stabil warfarin dozuna ulaşım sürecinde kaç kez istenen aralıktan yüksek değerde INR ölçüldüğü ve warfarin kullanım dozunun kaç kez değiştirildiği verileri bilinmemektedir.Fakat pik INR değeri ortalaması mutasyonlu grupta terapötik aralık olan 2,5-3,5 aralığından önemli derecede yüksektir.Bu durum başlangıç dozu belirleme algoritması benzeri, hastaların beklenen stabilize warfarin kullanım dozunu ön görebilecek bir algoritmanın geliştirilmesinin klinik açıdan kullanışlı olabileceğini düşündürmektedir.

IWPC Warfarin Dose Calculator				
detailed instructions and examples can be found at the Instructions tab				
Variable	Units or Allowed Values	Enter Value	Error Messages/Warnings	Validation Result
Age	Years	65		OK
Height	Centimeters (cm)	163		OK
Weight	Kilograms (kg)	59		OK
VKORC1 genotype	A/A A/G G/G U (for Unknown)	U		OK
CYP2C9 genotype	*1/*1 *1/*2 *1/*3 *2/*2 *2/*3 *3/*3 U (for Unknown)	U		OK
Race	A (for Asian) B (for Black or African American) C (for Caucasian or White) U (for Unknown or Mixed Race)	C		OK
Taking Enzyme Inducer	Y (for Yes) N (for No or not known)	N		OK
Taking Amiodarone	Y (for Yes) N (for No or not known)	N		OK
<b>Computed Weekly Starting Dose (mg/week):</b>		<b>30</b>		
			0	Error count
			0	Warning count

Şekil-13 IWPC Warfarin Doz Hesaplayıcısı

Limidi ve ark.'ları tarafından CYP2C9 ve VKORC1 genotiplerinin INR artışı, antikoagülasyon riski ve 30 günde doz değişikliği üzerine etkisini incelemek üzere tasarlanan bir çalışma yapılmış (133).

VKORC1 (olan / olmayan varyant genotip CYP2C9 varyantı genotip) Avrupa kökenli Amerikalılarda daha fazla antikoagülasyon açısından yüksek risk ifade etmekte fakat afrikalı amerikalılar için bu ilişki saptanmamış.

Minör kanama riski CYP2C9 veya VKORC1 genotipinden etkilenmemiş.

Tedavinin ilk 30 günü boyunca, CYP2C9 ve VKORC1 genotip farklılığı, doz değişikliğindeki varyansın %6,3'ünü açıklayabilmiş.

IWPC, genetik ve klinik verilere dayanan bir algoritmanın, uygun başlangıç dozunda varfarinin tahmininde saf bir klinik algoritmadan veya sabit dozda bir yaklaşımdan daha iyi sonuç verdiğini bildirdi (134)

Randomize bir klinik araştırmanın sonuçları, klinik faktörlerle birlikte CYP2C9 ve VKORC1'i içeren bir algoritmanın ampirik bir protokole kıyasla varfarin dozunun doğruluğunu ve verimliliğini arttırdığını önermektedir; Bununla birlikte, INR'nin terapötik aralık dışında olma süreleri arasında herhangi bir fark yoktu (135).

Genetik test CYP2C9 ve VKORC1 için mevcuttur. Rutin olarak test edilen varyantlar CYP2C9 \* 2, CYP2C9 \* 3 ve -1639G> A'dır. Bu varyantlar, tedaviyi yönlendirmek için FDA tablosunda ve International Warfarin Pharmacogenomics Consortium (IWPC) algoritmasında da kullanılmaktadır (136).

Teh LK ve ark.'larının warfarin kullanan hastalarda VKORC1'in (G-1639A ve C1173T) ve CYP2C9 \* 3'ün klinik açıdan öneminin incelendiği çalışmada warfarin kullanım dozu stabilize olan, INR düzeyi 2-4 arasında olan hastalar değerlendirmeye alınmış. Bu çalışmada VKORC1 (G-1639A) ve (C1173T) alelleri ve yaş, 6. ayda warfarin dozu ile korele bulunmuş. INR değerleri ile hastalar tarafından alınan doz arasında bir ilişki saptanmamış (137).

Shalia KK ve arkadaşları tarafından Hint popülasyonunda VKORC1 ve CYP2C9 gen polimorfizmlerinin prevalansı ve bunun warfarin cevabı üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada 100 sağlıklı birey ve 83 aort veya mitral kapak operasyonu sonrası warfarin tedavisi başlanan birey incelenmiş (138).

Vahşi tipli allellere kıyasla daha az olmasına rağmen, çalışma popülasyonunda CYP2C9 \* 2 ve \* 3 varyant alelleri ile VKORC1 polimorfizmlerinin (C1173T ve G-1639A) varyantları araştırılmış. Warfarin'in ortalama idame dozu (mg / gün) yukarıda belirtilen tüm polimorfizmlerin vahşi tip genotiplerine kıyasla daha az bulunmuş. INR, ilk dozdan sonra mutant varyantlar

(3.8 ila 4) için yüksek bulunmuş, ortalama günlük düşük warfarin dozunun düşürülmesini gerektirdiği belirtilmiş.

Meckley LM ve ark.'nın çalışmasında warfarin kullanan hastalarda VKORC-1 ve CYP2C9 gen varyantlarının antikoagülan ilişkili durumları incelenmiş. CYP2C9 gen varyantlarına sahip olan hastalarda gen varyansına sahip olmayan gruba göre %48 oranda daha geç sürede warfarin dozu stabilizasyonu sağlanmıştır. Tedavinin ilk ayında varyant grupta daha yüksek INR seviyeleri saptanmıştır (139).

Hastaların haftalık warfarin tedavisi dozları stabilize olduğu dönemde özellikle AVA\_II mutasyonlu grupta INR ortalamalarının hedeflenen aralığın üzerinde olması, AVA\_III mutasyonlu grupta ise INR düzeyinin istenen aralıkta olmasını sağlarken diğer gruplara göre daha yüksek dozda warfarin tedavisi uygulanmakta olması warfarin tedavisi başlanırken hastanın CYP2C9 ve VKORC1 gen mutasyonunun bakılmasının tedavi rejiminin düzenlenmesinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızdan warfarin kullanım dozunun stabilizasyonu sonrasında genetik mutasyon bakılmasının hastanın idame warfarin tedavisi dozunu değiştirmeyeceğini düşünmekteyiz.

## SONUÇLAR

Çalışma verilerinden hareketle AVA\_II veya AVA\_III mutasyonlu hastaların ilk ve pik INR değerlerinin mutasyonsuz olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmış olması ve aynı hastaların warfarin kullanım dozu stabilize olduktan sonrasında INR düzeylerinin hedef aralıkta tutulmasının zorluğu aşıkardır.

Özellikle AVA\_III mutasyonu mevcut olan hasta grubunda hekimlerin hedef INR düzeyine ulaşmak sürecinde daha agresif yaklaşımda bulduklarını düşünmekteyiz.

Haftalık warfarin kullanım dozu stabilize olan hastalarda özellikle AVA\_III mutasyonu olan hastalarda daha mutasyonlu gruba göre istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da yüksek dozda warfarin verilmesine karşın INR değerlerinin mutasyonlu gruba göre düşük saptanması literatür verilerine ters gibi görünmektedir. Bu durum esasen hastaların warfarin tedavi kullanımına başlaması sürecinde yine literatür verilerinde belirtildiği gibi daha çok komplikasyona sahip olması ve tedavi dozlarının sık sık bu sebeple değiştirilmesinin sonucu olabilir.

Haftalık warfarin kullanım dozu stabil olan hastalarda INR düzeyi ortalamaları arasında istatistiksel anlamlı farkın bulunmamış olması da FDA, IWPC ve CPIC'in önerileri (21,118,119) doğrultusunda warfarin metabolizması açısından gen mutasyonuna warfarin başlandığı dönemde bakılması, warfarin kullanım dozunun stabilize olduğu hastalarda ise bakılmasının anlam taşımadığını düşündürmektedir.

Hastaların geriye dönük verileri taranarak mutasyon-komplikasyon ilişkisi, tedavi gerektiren INR yüksekliği gibi parametreler ve VKORC1 mutasyonu da bakıldığında warfarin tedavisine başlanma esnasında gen mutasyon analizi yapılmasının klinik faydası hususunda daha geniş fikir elde edilebilecektir.

Hastaların warfarin kullanım idame dozu açısından da bir algoritma geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Fihn SD, McDonnell M, Martin D, et al. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group. A multicentre study. *Ann Intern Med* 1993; 118: 511-520.
2. Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med* 1993; 95: 315-328.
3. Levine MN, Hirsh J, Landefeld CS, Raskob G. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest* 1992; 102: 352-363.
4. Van der Meer FJ, Rosendaal FR, Vanderbroucke JP, Briet E. Bleeding complications in oral anticoagulant therapy: an analysis of risk factors. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1557-1562.
5. Palareti G, Leali N, Coccheri S, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study. *Lancet* 1996; 348: 423-428.
6. Hirsh J, Fuster V, Ansell J, et al. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1633-1652.
7. Douketis JD, Foster GA, Crowther MA, et al. Clinical risk factors and timing of recurrent venous thromboembolism during the initial 3 months of anticoagulant therapy. *Arch Intern Med* 2000; 160: 3431-3436.
8. Choonara IA, Malia RG, Haynes BP, et al. The relationship between inhibition of vitamin K1 2,3-epoxide reductase and reduction of clotting factor activity with warfarin. *Br J Clin Pharmacol* 1988; 25: 1-7.

9. Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze KL, et al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P450: a role for P450C9 in the etiology of (S)-warfarin drug interactions. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 54-59.
10. Laura Dean, MD, Warfarin Therapy and the Genotypes CYP2C9 and VKORC1. Created: March 8, 2012; Last Update: June 8, 2016.
11. Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired S warfarin metabolism catalyzed by R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 39-42.
12. Steward DJ, Haining RL, Henne KR, et al. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9\*3. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 361-367.
13. Haining RL, Hunter AP, Veronese ME, Trager WF, Rettie AE. Allelic variants of human cytochrome P450C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333: 447-458.
14. Crespi CL, Miller VP. The R144C change in the CYP2C9\*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 203-210.
15. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999; 353: 717-719.
16. Ogg MS, Brennan P, Meade T, Humphries SE. CYP2C9\*3 allelic variant and bleeding complications. *Lancet* 1999; 354: 1124.
17. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000; 84: 775-778.
18. Freeman BD, Zehnbauer BA, McGrath S, Borecki I, Buchman TG. Cytochrome P450 polymorphisms are associated with reduced warfarin dose. *Surgery* 2000; 128: 281- 285.
19. Furuya H, Fernandez-Salguero P, Gregory W, et al. Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 389-392.

20. Takahashi H, Kashima T, Nomizo Y, et al. Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different CYP2C9 and CYP2C19 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63: 519-528.
21. COUMADIN (warfarin sodium tablet) Princeton, NJ: Bristol-Myers Squibb Pharma Company; 2015. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=d91934a0-902e-c26c-23ca-d5accc4151b6>. (Son Erişim 14.11.2017)
22. Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl ML, Gusella M, Padrini R. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 702-710.
23. Waller, D. G., A. G. Renwick, and K. Hillier, *Medical Pharmacology and Therapeutics*, Elsevier, 2005.
24. David, G. E., H. A. Tashjian, E. J. Armstrong, and W. A. Armstrong, *The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008.
25. Walker, H. K., W. D. Hall, and J. W. Hurst, *Clinical Methods: The History, Physical and Laboratory Examinations*, Boston, Butterworths, 1990.
26. Jackson, C. M., and M. P. Esnouf, "Has the time arrived to replace the quick prothrombin time test for monitoring oral anticoagulant therapy?" *Clin. Chem.*, Vol. 51, 10, 1905-1910, 2005.
27. Greenstein B., and A. Greenstein, *Concise Clinical Pharmacology*, Pharmaceutical Press, London, 2007.
28. Frisbie, J. H.: Wound healing in acute spinal cord injury, effect of anticoagulation, *Arch. Phys. Med. Rehab.*, 67, 311-3, 1986.
29. Price, G. C., Thompson, S. A, Kam, P. C.: Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor, *Anaesthesia.*, 59, 5, 483-92, 2004.
30. Pletcher, C. H., Nelsestuen, G. L.: Two-substrate reaction model for the heparin catalyzed bovine antithrombin protease reaction, *J Biol Chem.*, 258, 2, 1086-91, 1983.
31. Planes, A, Şamama, M. M., Lensing, A. W, Buller, H. R., Barre, J., Vochelle, N., Beau, B.: Prevention of deep vein thrombosis after hip replacement comparison between two low molecular heparins, tinzaparin and enoxaparin, *Thromb Haemost.*, 81, 22, 5, 1999.



32. Özalp Dural E. Farmakoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2002; 353- 365.
33. Gacar N, Komsuoğlu B, Utkan T. Kalp– Damar Hastalıkları Farmakolojisi.1. Baskı, Kocaeli: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2005; 223- 254.
34. Kwon PH, Laskin DM. Clinician's manual of Oral and Maxillofacial Surgery, 2nd.Ed, Illinois: Quintessence Publishing Co.1997; 111-114.
35. Cawson RA, Spector RG, Skelly AM. Basic Pharmacology and Clinical Drug Use in Dentistry. 6 th Ed., Edinburgh: Churchill Livingstone Inc., 1995.
36. Sarioğlu T, Erek E, Yalçınbaş YK, Salihoğlu E. İstanbul Kalp Cerrahisi Vakfı Oral Antikoagülasyon Tedavisi Hasta Kılavuzu. İstanbul: Eczacıbaşı İlaç Paz 1995.
37. <http://www.setma.com/Your-Life-Your-Health/pdfs/Coumadin-The-Story-of-a-Drug.pdf> (Son Erişim Tarihi 23 Ekim 2017)
38. Martindale: The complete drug reference. Thirty fifth edition, edited by Sean C Sweetman. Cardiovascular Drugs; Warfarin Sodium, 2007; 1281-1288.
39. Takahashi H, Echizen H, Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. Clin. Pharmacokinet. 2001; 40:587-603.
40. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA, Cytochrome P450C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in vitro and human data. Pharmacogenetics. 2002;12:251-263.
41. Hirsh J, Dalen JE, Anderson D, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness and optimal therapeutic range. Chest 1998; 114:445-469.
42. Mordechai M, Simcha B, Amir E, Irena K, Yoseph C. Warfarin metabolism and anticoagulant effect: A Prospective, observational study of the Impact of CYP2C9 genetic polymorphism in the presence of drug-disease and drug-drug interactions. Clinical Therapeutics/ Volume 29, Number 3, 2007.
43. Mungall DR, et al. Population pharmacokinetics of racemic warfarin in adult patients. Pharmacokinet Biopharm 1985; 13: 213-227.
44. Holford NHG. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin: understanding the dose-effect relationship. Clin Pharmacokinet 1986;11:483-504.
45. Albers GW, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. Chest 1998; 114. 683-698.

46. The European Atrial fibrillation Trial Study Group. Optimal oral anticoagulant therapy in patients with non-rheumatic atrial fibrillation and recent cerebral ischemia. *N. Engl J Med* 1995; 333:5-10.
47. WHO Task Force on Stroke and Other Cerebrovascular Disorders, recommendations on stroke prevention, diagnosis and therapy. *Stroke* 1989; 20:1407-31.
48. Levine M, Raskob GE, Landefeld S, Kearon C. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest* 1998; 114: 511S-523S.
49. Carabello PJ, et al. Long term use of oral anticoagulants and the risk of fracture. *Arch Intern Med* 1999; 159:1750-56.
50. Chan WS, et al. Anticoagulation of pregnant woman with mechanical heart valves: a systemic review of the literature. *Arch Intern Med* 2000; 160: 191-96.
51. Ginsberg JS et al. Use of antithrombotic agents during pregnancy. *Chest* 2001;119 (suppl):122S-131S.
52. Adler E, et al. Cholestatic hepatic injury related to warfarin exposure. *Arch Intern Med* 1986; 146: 1837-9.
53. Comp. PC. Coumarin-induced skin necrosis: incidence, mechanism, management and avoidance. *Drug Safety* 1993; 8: 128-35.
54. Kerin NZ, et al. The incidence, magnitude and time course of the amiodarone warfarin interaction. *Arch Intern Med* 1988; 148: 1779-81.
55. Serpa MD, et al. Moricizine-warfarin: a possible drug interaction. *Ann Pharmacother* 1992; 26:127.
56. Ross JRY, Beeley L. Interaction between carbamazepine and warfarin *Br Med J* 1980; 280:1415-16.
57. Guthrie SK, et al. Hypothesized interaction between valproic acid and warfarin. *J Clin Psychopharmacol* 1995,15:138-9.
58. Weibert RT, et al. Effect of erythromycin in patients receiving long-term warfarin therapy. *Clin Pharm* 1989; 8:210-14.
59. Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN: Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008 Jun;133(6 Suppl):257S-298S.

60. Crowther MA, Ageno W, Garcia D, et al: Oral vitamin K versus placebo to correct excessive anticoagulation in patients receiving warfarin: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009 Mar 3;150(5):293-300.
61. Denas G, Marzot F, Offelli P, et al: Effectiveness and safety of a management protocol to correct over-anticoagulation with oral vitamin K: a retrospective study of 1,043 cases. *J Thromb Thrombolysis* 2009 Apr;27(3):3407.
62. Gunther KE, Conway G, Leibach L, Crowther MA: Low-dose oral vitamin K is safe and effective for outpatient management of patients with an INR>10. *Thromb Res* 2004;113(3-4):205-
63. Rosovsky RP, Crowther MA: What is the evidence for the off-label use of recombinant factor VIIa (rFVIIa) in the acute reversal of warfarin? ASH evidence-based review 2008. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2008, 2008 (1) : 36-38.
64. Schulman S: Clinical practice. Care of patients receiving long-term anticoagulant therapy. *N Engl J Med* 2003; 349:675-683
65. Lessinger CA, Blatt PM, Hoots WK, Ewenstein B: Role of prothrombin complex concentrates in reversing warfarin anticoagulation: a review of the literature. *Am J Hematol* 2008 Feb;83(2):137-43.
66. Brian F Gage, Charles Eby, Paul E. Milligian, Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* 2004;91:87-94
67. LeeCR, Goldstein JA. Cytochrome P450C9 polymorphisms: A comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002;12:251-263.
68. Scordo MG, Aklillu E, Yasar Ü, Dahl M-L, Spina E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of Cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a Black-African population. *Br J of Clin Pharmacol* 2001,52,447-50.
69. Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 429-439.
70. Goldstein JA, de Morais SM. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C9 subfamily. *Pharmacogenetics* 1994;4:285-299.

71. Maurizio Margaglione, Donatella Colaizzo, Giovanna D' Andrea. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin, *Thromb Haemost* 2000;84:775-778.
72. Erico Shikata, Ichiro Leiri, Shingo Ishiguro. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors 2,7,9,10; proteins-S and C; and Gglutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *BLOOD*.2004;103:2630-2635.
73. Loebstein R, Yonath H, Peleg D, et al. Interindividual variability in sensitivity to warfarin. *Clinical Pharmacology Ther.* 2001;70:159-164.
74. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, et al Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation –related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002; 287: 1690-8.
75. Takanashi K, Tainaka H, KobayashiK, et al. CYP2C9 Ile359 and Leu 359 variants. *Pharmacogenetics*.2000;10:95-104.
76. Candan İ, Oral D. Antikoagülanlar. Candan İ, Oral D, editörler. *Kardiyoloji*. Ankara: ANTIP A.Ş. Yayınları; 2002. p. 1360-2.
77. Opie HL, Gersh BJ. Drugs For The Heart. In: Fox KA, White H, Opie JS, Gersh B, Opie L, eds. *Antithrombotic Agents: Platelet Inhibitors, Anticoagulants and Fibrinolytics*. 7 th ed. Philadelphia: Elseiver Saunders; 2009. p. 319-24.
78. Beans K, Fandek N, Lenkiewicz A, Wallace J. *Professional Quick Reference*. North Wales: Springhouse Corporation; 1995.
79. Müderrisoğlu H, Yıldırım A. Kalp Kapak Hastalıklarında Güncel Sorunlar. Müderrisoğlu H, Sezgin T, editör. *Kapak Hastalıklarında Antitrombosit ve Antikoagülan Kullanımı*. Ankara: Form Reklam; 2006.
80. Goldman L, Ausiella D. *Cecil Textbook of Medicine*. Ünal S, çeviri editörü. 22. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.
81. Gregory HYL, Blann AD. *ABC of Anticoagulan Therapy*. London: BMJ Publishing Group; 2003.
82. Yang KY, Graff LR, Caughey AB. *Pharmacology-Anticoagulant Agents*. Malden: Blueprint Notes&Cases Nackwell Publishing; 2004. p. 29-31.
83. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic&Clinical Pharmacology*. 11 th ed. China: McGraw-Hill Medical; 2009.

84. Küçükkaya R. Oral Antikoagülan Tedavi Hasta Kılavuzu. İstanbul: Eczacıbaşı Yayınları; 2005.
85. Süzer Ö. Süzer Farmakoloji. İstanbul: Klinisyen Tıp Kitapevleri Yayınları; 2005. p. 460-3.
86. Dökmeci İ. Farmakoloji-İlaçlar ve Etkileri. İstanbul: Alfa Yayınları; 2007. p. 369-375.
87. Uras F, Uras AR. Protrombinin dünü-bugünü. IV. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi Kitabı. İstanbul: 2003. p. 85-95.
88. Breckenridge A, Orme M, Wesseling H, Lewis RJ, Gibbons R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of warfarin in man. Clin Pharmacol Ther 1974;15(4):424-30.
89. Limdi NA, Veenstra DL. Warfarin pharmacogenetics. Pharmacotherapy 2008;28:1084-97.
90. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. Nature 2004;427(6974):541-4.
91. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature 2004;427(6974):537-41.
92. Wilke RA, Berg RL, Vidaillet HJ, Caldwell MD, Burmester JK, Hillman MA. Impact of age, CYP2C9 genotype and concomitant medication on the rate of rise for prothrombin time during the first 30 days of warfarin therapy. Clin Med Res 2005; 3:207-213.
93. Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. Blood 2000; 96: 1816-1819.
94. Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ, Glurich I, Schmelzer JR, Yale SH, et al. Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. Clin Med Res 2007; 5: 8-16.
95. Solak M, Bağcı H, Şengil AZ, Öztaş S. Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. 1. Baskı, Ankara: Uyum Ajans, 2000.

96. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 2004.

97. Baykal Y, Özet A, Güran Ş, Özet G. P53 ve Onkogenezdaki Rolü. Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi,1996; 6(2):111-115.

98 Akar N. Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş. 2. Baskı, Antıp A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları, 1999: 167-230.

99. Kamali F., Wynne H. Pharmacogenetics of Warfarin. Annu Rev Med 2010; 61: 63-75.

100. Jeiri I, Tainaka H, Morita T, et al. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. Ther Drug Monit 2000; 22: 237-44.

101. Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, et al. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9\*5) selectively expressed among African Americans. Mol Pharm 2001; 60: 317-23.

102. Yasar M, Eliasson E, Dahl ML, et al. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: Frequencies of mutant alleles in a Swedish population. Biochem Biophys Res Commun 1999; 254: 628-31.

103. Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, et al. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. Eur J Clin Pharmacol 2001; 57: 47-9.

104. Wang SL, Huang J, Lai MD, et al. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. Pharmacogenetics 1995; 5: 37-42.

105. Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. Pharmacogenetics 1997; 7: 405-9.

106. Ozer N, Cam N, Tangurek B, Ozer S, Uyarel H, Oz D, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon

warfarin dose requirements in an adult Turkish population. *Heart Vessels* 2010;25(2):155-62.

107. Sanderson S1, Emery J, Higgins J. Genet CYP2C9 gene variants drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. *Med.* 2005 Feb;7(2):97-104.

108. Aynacioglu AS, Brockmüller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen Z, et al. Frequency of cytochrome P450CYP2C9 variants in Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:409-15.

109. Uz. Dr. Raşan Yıldırım, Erzurum Bölgesinde Cyp2c9 Gen Polimorfizmi Ve Varfarin Doz Gereksinimi, Yan Dal Uzmanlık Tezi -Tez Danışmanı Prof. Dr. Mehmet GÜNDOĞDU, Atatürk Üniversitesi-2011

110. Anca D, Buzoianu, Adrian P Trifa, Dafin F Mureşanu, Sorin Crişan, Analysis of CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 and VKORC1 -1639 G>A polymorphisms in a population from South-Eastern Europe *Clin Pharmacol Ther.* 2002 Dec;72(6):702-10.

111. Oner Ozgon G, Langae TY, Feng H, Buyru N, Ulutin T, Hatemi AC, et al. VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms are associated with warfarin dose requirements in Turkish patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64:889-94.

112. Dericioglu N, Babaoglu MO, Saygi S, Bozkurt A, Yasar U. Warfarin resistance with poor CYP2C9 activity and CYP2C9 \*1\*2 genotype. *Ann Pharmacother* 2004;38(5):899.

113. Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, Lappe DL, Whiting BM, Kolek MJ, et al. Genotypes of the cytochrome P450 isoform, CYP2C9 and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J Thromb Thrombolysis* 2006;22:191-97.

114. <https://emedicine.medscape.com/article/1733331-overview#showall> (Son Erişim Tarihi 14.11.2017)

115. 49] Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: An enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45: 525-38.

116. [50] Wang B, Wang J, Huang SQ, et al. Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 2C9 gene and its clinical significance. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 781-834.

117. Blaisdell J, Jorge-Nebert LF, Coulter S, et al. Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 527-37.
118. M.Q. Lin J. et al. Pharmacogenetics-based warfarin dose prediction algorithm for patients with heart valve replacement in Southeast China *Genet. Mol. Res.* 16(3): Published: July 28, 2017
119. Siddiqi A1, Khan DA, Khan FA, Naveed AK. Impact of CYP2C9 genetic polymorphism on warfarin dose requirements in Pakistani population. *Pak J Pharm Sci.* 2010 Oct;23(4):417-22.
120. Birce Dilge Taşkın, Serdar Kula,1 Mehmet Ali Ergün,2 Demet Altun,4 Rana Olguntürk,1 Fatma Sedef Tunaoglu,1 Ayşe Deniz Oğuz,1 and Türkiz Gürsel3 , The effect of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms on warfarin dose requirements in a pediatric population, *Anatol J Cardiol.* 2016 Oct; 16(10): 791–796. Published online 2016 Jan 25.
121. Johnson J.A., Gong L., Whirl-Carrillo M., Gage B.F., et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2011;90(4):625–9.
122. Verhoef T.I., Ragia G., de Boer A., Barallon R., et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of acenocoumarol and phenprocoumon. *N Engl J Med.* 2013;369(24):2304–12.
123. Stergiopoulos K., Brown D.L. Genotype-guided vs clinical dosing of warfarin and its analogues: meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Intern Med.* 2014;174(8):1330–8.
124. Kimmel S.E., French B., Kasner S.E., Johnson J.A., et al. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N Engl J Med.* 2013;369(24):2283–93.
125. Finkelman B.S., French B., Bershaw L., Kimmel S.E. Factors affecting time to maintenance dose in patients initiating warfarin. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2015;24(3):228–36.
126. Belley-Cote E.P., Hanif H., D'Aragon F., Eikelboom J.W., et al. Genotype-guided versus standard vitamin K antagonist dosing algorithms in patients initiating



anticoagulation. A systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2015;114(4):768–77.

127. McClain MR, Palomaki GE, Piper M, Haddow JE. A rapid-ACCE review of CYP2C9 and VKORC1 alleles testing to inform warfarin dosing in adults at elevated risk for thrombotic events to avoid serious bleeding. *Genet Med.* 2008 Feb;10(2):89-98. Review.

128. Flockhart DA, O'Kane D, Williams MS, Watson MS, Gage B, Gandolfi R, King R, Lyon E, Nussbaum R, O'Kane D, Schulman K, Veenstra D, Williams MS, Watson MS; ACMG Working Group on Pharmacogenetic Testing of CYP2C9, VKORC1 Alleles for Warfarin Use. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. *Genet Med.* 2008 Feb;10(2):139-50.

129. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, Caldwell MD, Limdi N, Burmester JK, Dowd MB, Angchaisuksiri P, Bass AR, Chen J, Eriksson N, Rane A, Lindh JD, Carlquist JF, Horne BD, Grice G, Milligan PE, Eby C, Shin J, Kim H, Kurnik D, Stein CM, McMillin G, Pendleton RC, Berg RL, Deloukas P, Gage BF. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 May;87(5):572-8.

130. Shaw PB, Donovan JL, Tran MT, Lemon SC, Burgwinkle P, Gore J. Accuracy assessment of pharmacogenetically predictive warfarin dosing algorithms in patients of an academic medical center anticoagulation clinic. *J Thromb Thrombolysis.* 2010 Mar 5.

131. Takeuchi F, Kashida M, Okazaki O, Tanaka Y, Fukuda S, Kashima T, Hosaka S, Hiroe M, Kimura S, Kato N. Evaluation of Pharmacogenetic Algorithm for Warfarin Dose Requirements in Japanese Patients. *Circ J.* 2010 Mar 26.

132. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/5119,yilliktrpdf.pdf> (Son Erişim Tarihi 01.12.2017)

133. Limdi NA, Wiener H, Goldstein JA, Acton RT, Beasley TM. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin response during initiation of therapy. *Blood Cells Mol Dis.* 2009 Jul-Aug;43(1):119-28. Epub 2009 Mar 17

134. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner

MJ, Caldwell MD, Johnson JA. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med.* 2009 Feb 19;360(8):753-64. Erratum in: *N Engl*

*J Med.* 2009 Oct 15;361(16):1613.

135 Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, Kahn SF, May HT, Samuelson KM, Muhlestein JB, Carlquist JF; Couma-Gen Investigators.

Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation.* 2007 Nov 27;116(22):2563-70

136. <https://www.pharmgkb.org/guideline/PA166104949> (Son Erişim Tarihi 14.11.2017)

137. Teh LK, Langmia IM, Fazleen Haslinda MH, Ngow HA, Roziyah MJ, Harun R, Zakaria ZA, Salleh MZ. Clinical relevance of VKORC1 (G-1639A and C1173T) and CYP2C9\*3 among patients on warfarin. *J Clin Pharm Ther.* 2012 Apr;37(2):232-6.

138. Shalia KK, Doshi SM, Parikh S, Pawar PP, Divekar SS, Varma SP, Mehta R, Doctor T, Shah VK, Saranath D. Prevalence of VKORC1 and CYP2C9 gene polymorphisms in Indian population and its effect on warfarin response. *J Assoc Physicians India.* 2012 Dec; 60: 34-8.

139. Meckley LM, Wittkowsky AK, Rieder MJ, Rettie AE, Veenstra DL. An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin-treated patients. *Thromb Haemost.* 2008 Aug;100(2):229-39.

EK-1

**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR BELGESİ**  
**(Sağlıklı kontrol grubu için)**

Dr.....'in sorumlu araştırmacısı olduğu,  
"....." isimli bir araştırma yapılması  
planlanmaktadır.

Çalışmanın amacı warfarin kullanan hastalarda genetik varyasyonların saptanması ve bu varyasyonların INR düzeyi, warfarin kullanım dozu gibi durumlara etkisinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmanın bilimsel olarak yürütülebilmesi için, araştırmaya katılan hasta kişiler dışında, sağlıklı kişilerden 5 ml kan alınmasına gereksinim vardır. Bu sayede, hasta kişilerin verileri, siz sağlıklı kişiler ile karşılaştırılabilecektir.

Bu çalışmaya, "**sağlıklı kontrol grubu**" olarak katılmayı kabul ederseniz, sizden istenen tek şey, bir kez 5 ml kan vermenizdir.

Vereceğiniz kanda CYP2C9 gen mutasyonları araştırılacaktır. Araştırmacı sizden elde edilen sonuçları, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimliğiniz gizli tutulacaktır.

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız için size verilecektir.

**(Katılımcının Beyanı)**

..... Anabilim Dalında / Kliniğinde, Dr..... tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu koşullarla "**sağlıklı kontrol grubu**" olarak, ..... kez, ..... ml kan vermeyi ve/veya ..... işlemini kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı:**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Katılımcı ile görüşen araştırıcı:**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR BELGESİ**

(Çalışma grubu için)

“Antikoagülan Tedavisi Alan Hastalarda Cyp2c9 Gen Polimorfizminin Araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın ne amaçla yapılmak istendiğini ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve sorularınıza açık yanıtlar isteyin. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

- **Çalışmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?**

Çalışmamız Denizli bölgesinde warfarin kullanan hastaların genetik mutasyon profilini ortaya koymayı amaçlamaktadır. Bu genetik profilin ortaya konması warfarin tedavisi başlanan ve tedavi devamında kanama vb komplikasyonlar yaşayan hastaların önceden ön görülebilmesi açısından fikir oluşturmalarını beklemekteyiz.

Tıp literatüründe bu yönde çalışmalar olup çeşitli gen mutasyonları saptandı

Çalışmamıza toplamda 100 adet warfarin kullanan ,100 adet de sağlıklı gönüllü olmak üzere toplam 200 kişi katılacaktır.

- **Bu çalışmaya katılmalı mıyım?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalasanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemezseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

- **Bu çalışmaya katılırsam beni neler bekliyor?**

Bu çalışmada mevcut tedavinizin dışına çıkılmayacak olup mevcut tedaviniz sürecinde kan alınırken 1 tüp fazlada alınıp genetik laboratuvarında analiz yapılacaktır.

Kişisel verileriniz 2. Ve 3. Şahıslar ile paylaşılmayacak olup genetik analiz sonucunuzu hem çalışmayı yürüten hem de analizi yapan kişiler bilmeyecektir.

- **Çalışmada yer almamanın yararları nelerdir?**

Çalışmaya katılmanız bilimsel açıdan warfarin kullanan ve birçok komplikasyonla karşılaşılan hastalarda bu komplikasyonlar oluşmadan önce önlem alınabilmesi adına genetik yatkınlıklar ve problemleri saptayabilmek açısından faydalı olacaktır.

- **Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?**

Çalışmaya katılmakla herhangi bir parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

- **Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?**

Araştırmacınız kişisel bilgilerinizi; araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ve kimlik bilgileriniz çalışma boyunca araştırmacınız tarafından gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda, araştırma sonucu ile ilgili olarak bilgi istemeye hakkınız vardır. Yazılı izniniz olmadan, sizinle ilgili bilgiler başka kimse tarafından görülemez ve açıklanamaz. Çalışma sonuçları çalışma tamamlandığında bilimsel yayınlarda kullanılabilir, ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

- **Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?**

- Çalışma ile ilgili bir sorunuz ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Dr.Tutku ERARSLAN

GÖREVİ : Araştırmacı Dr.

TELEFON : 05545888861

*(Gönüllünün/Hastanın Beyanı)*

..... Anabilim Dalında / Kliniğinde, Dr. .... tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili **yukarıdaki bilgiler** bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

- a. **Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi. Bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.**
- b. **Sorumlu araştırmacı/hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim. Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmeyeceğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim).**
- c. **Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı/hekim, çalışma programının gereklerini yerine getirme konusundaki ihmali nedeniyle tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.**
- d. **Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.**
- e. **Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili olarak herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.**
- f. **Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.**

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Görüşme tanığı**

**Bilgilendiren Araştırmacı**

Adı soyadı, unvanı:

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:



**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ARAŞTIRMALAR**  
**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR BELGESİ**

Warfarin kullanım dozu ve INR düzeyinin kişiler arası değişkenliğinin genetik (kalıtsal) nedenlerini bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. “Antikoagülan Tedavisi Alan Hastalarda Cyp2c9 Gen Polimorfizminin Araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Araştırmaya davet edilmeniz nedeni warfarin kullanıyor olmanızdır. Pamukkale Üniversitesi Acil Tıp Anabilim Dalı kişileri arası warfarin kullanım dozu farklılığı ve INR değerlerinin farklılığının nedenlerini ortaya çıkaracak bir araştırma gerçekleştirilecektir. Kendinizde bir şikayet olmasa bile katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın ne amaçla yapılmak istendiğini ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve sorularınıza açık yanıtlar isteyin. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

**Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?**

*Bu bölümde aşağıdaki sorular cevaplanmalıdır.*

a. *Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?*

*Genler DNA olarak isimlendirilen materyallerden oluşmakta ve kişilerin genlerindeki farklılıklar ilaçların vücutta bulunma miktarlarında ve vücutta etkilerinde farklılıklara yol açmaktadır.*

*Warfarin kullanan hastalarda da birtakım genlerin INR düzeyine etki ettiği saptandı. Bu çalışma sizin DNA'nızın çalışılarak toplumumuzda bu gen farklılıklarının saptanabilmesine katkı sağlayacak ve warfarin kullanan hastalarda genetik farklılıkların kullanıma başlamadan önce bakılıp bakılmaması konusunda fikir verebilecektir.*

b. *Çalışmaya toplam kaç kişinin katılması planlanmaktadır?*

*Çalışmaya warfarin kullanan 100 kişi ve ilaç kullanmayan 100 kişi olmak üzere toplamda 200 kişi katılacaktır.*

**Bu genetik çalışmaya katılmamalı mıyım?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

## **Genetik araştırma nasıl yapılacak?**

a. Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacak ?

*Çalışmaya katılmayı kabul ederseniz sizden 1 tüp(5 ml) kadar kan alınacaktır. Bu kan alımı ayrıca size girişim uygulayarak değil tedaviniz için damar yolu açıldığında 1 tüp fazladan alınarak yapılacaktır. Bu kandan ise genetik materyal elde edilecektir.*

b. Örnekte neler araştırılacak ?

Örnekte CYP2C9 geninin \*1 , \*2 , \*3 numaralı alt tiplerinin var olup olmadığı araştırılacaktır

Örnekler nerede çalışılacak?

*Örnekler Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Laboratuvarında çalışılacaktır.*

c. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor?

İşlem sonrası genetik materyaller tıbbi atık olarak yok edilecektir.

### **Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilir mi?**

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

1-  Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin\* yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

2-  Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

3-  Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

4-  Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

\*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

### **Çalışmanın riskleri nelerdir?**

Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz ve kolda morarma olabilir. Düşük bir olasılık da olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, veya enfeksiyon riski vardır.

Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler: Yapılan testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden

etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

Size ait genetik bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Ancak hemen belirtmemiz gerekir ki; yaptığımız testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötü yönde kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de etkileyebilir. Sizin anormal bir gen taşıdığınızı saptadığımızda bulgularımızı herhangi bir ücret talep etmeden size bildireceğiz. Ancak böylesi bir bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Yine hemen belirtmeliyiz ki; bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izninizle olacaktır.

### **Çalışmanın yararları nelerdir?**

Böyle bir analiz ilgili genetik farklılığın nedeninin öğrenilmesinde yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size veya çocuğunuza bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini bilmiyoruz. Ancak ilgili durumun temelinde yatan nedenlerin öğrenilmesi ileride ilgili hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirseniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

### **Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?**

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

- Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum
- Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Kendinizle ilgili genetik bilgiyi öğrenmeyi seçmeniz durumunda size (varsa) sağaltım ile ilgili bilgiler ve genetik danışmanlık hizmeti verilecektir.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde bilimsel yayınlarda kullanılabilir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

- Kanınız genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızdaki bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.

- Kan Örneklerinin Saklanması

- Sizden alınan örneklerin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örnekleri bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

### **Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?**

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

### **Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?**

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

### **Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak?**

- Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğunun ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağını; bu konudaki tüm harcamaların üstlenileceğini belirtiniz.

### **Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?**

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI :Dr.Tutku ERARSLAN  
GÖREVİ : Araştırma Yürütücüsü  
TELEFON: 05545888861

### **(Gönüllünün/Hastanın Beyanı)** (Bu bölüm aynen korunacaktır)

PAÜTF ..... Anabilim dalında, Dr. .... tarafından genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

- g. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi. Bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.
- h. Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim. Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediyim ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum. (Ancak

*araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim).*

- i. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı/hekim, gerekli gördüğü şartlarda tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Tutku ERARSLAN 'ı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Acil Servisi'nde

05545888861 'den arayabileceğimi biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı ve tarihli bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

**Görüşme tanığı:**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih: