



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROPSİKİYATRİK HASTALARDA CYP2D6 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SAFA CAN POLAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. F. SIRRI ÇAM

MANİSA
2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAFA CAN POLAT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM
Prof. Dr. Afig BERDELİ
Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ

(Tez Danışmanı)
(Jüri Üyesi)
(Jüri Üyesi)

MANİSA-2019

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Safa Can POLAT
2019

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitim hayatımda bilgileri ve imkânları ile bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM'a; Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ'a bilimsel bilgi ve birikimleri ile sağladıkları desteklerden dolayı Doktora Öğrencisi Arş.Grv. M. Burak BATIR'a araştırmalarım boyunca destek veren ekip arkadaşlarım Uzm. Bio. Elif SOYA, Uzm Bio. Ezgi ERSÖZ, Yüksek Lisans Öğrencisi İsmail DEĞERLİ' ye; desteklerini her zaman hissettiğim Çalışma arkadaşlarıma; tüm yaşamım boyunca bana maddi ve manevi destek olan aileme sonsuz teşekkürler.

Safa Can POLAT
Manisa, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	ix
ÖZET.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	1
2.1. FARMAKOGENETİK.....	1
2.2. SİTOKROM P450 (CYP450)	2
2.2.1. Sitokrom P450 Enzimlerinin Sınıflandırılması ve Adlandırılması.....	4
2.2.2. Sitokrom P450 ve Genetik.....	5
2.2.3. Nöropsikiyatrik Hastalarda CYP450 Molekül Mekanizması	10
2.3. CYP450 ENZİMLERİ.....	9
2.4. CYP2D6 ENZİMİ VE POLİMORFİZMİ	10
2.4.1. CYP2D Lokusunun Yapısı	10
2.4.2. CYP2D6 Allelleri	11
2.4.2.1. Yavaş-Zayıf Metabolizörler	12
2.4.2.2. Normal Metabolize Edici Alleller (EM)	13
2.4.2.3. Orta Seviyede Metabolize Ediciler (IM).....	13
2.4.2.4. Hızlı Metabolizörler (UM).....	14
2.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR).....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. GEREÇ	20
3.2. YÖNTEM.....	20
3.2.1. Periferik Kandan Dna İzolasyonu	18
3.2.2. Multiplex (Çoklu) PCR	19
3.2.3. PCR Amplikonlarının Ekzo-Fosfataz İşlemi.....	20
3.2.4. PCR Amplikonlarına ASPU (Allel Spesifik Primer Uzantısı) Ekleme.....	21
3.2.5. Boncuk Hibridizasyonu	22
3.2.6. LUMİNEX XTAG® Cihaz Analiz Çıktısının Tdas Programı Aracılığıyla Değerlendirilmesi	22

3.2.7. İstatiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA	5
6. KAYNAKLAR	9
7. EKLER.....	39
8. ÖZGEÇMİŞ.....	42



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Alınan aynı ilacın bireyler arasında gösterebileceği farklı etkileri.....	1
Şekil 2.2. CYP2D6 genlerinin adlandırılması	5
Şekil 2.3. CYP enzimlerini karaciğerde ekspresyon oranları	6
Şekil 2.4: Karaciğer CYP enzimlerinin ilaç metabolizmasına katılım oranları.....	7
Şekil 2.5. CYP2D lokusunda bulunan genler.	11
Şekil 2.6. CYP 450 enzimlerini kodlayan genlerdeki varyasyonların ilaç metabolizması üzerindeki olası etkileri	12
Şekil 2.7. CYP2D6 enzimi ile metabolize olan ilaçlar	15
Şekil 2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun sematik görüntüsü	16
Şekil 3.1. Multiplex PCR ısıtım döngü koşulları.	20
Şekil 3.2. Ekzo-Fosfataz PCR ısıtım döngü koşulları.....	21
Şekil 3.3. ASPU ısıtım döngü koşulları	21
Şekil 3.4. Boncuk hibridizasyonu ısıtım döngü koşulları	22

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Master miks reaksiyon bileşenleri.....	19
Tablo 3.2. Master miks reaksiyon bileşenleri.....	19
Tablo 3.3. Ekzo-Fosfataz reaksiyon bileşenleri	20
Tablo 3.4. ASPU reaksiyon bileşenleri	21
Tablo 4.1. xTAG CYP2D6 kiti ile tespit edilebilen değişimler	1
Tablo 4.2. Olguların fenotip dağılımları.....	1
Tablo 4.3. Olguların allel sıklıkları	2
Tablo 4.4. Normal metabolizör olgularında genotip dağılımları.....	2
Tablo 4.5. Orta metabolizör olguların genotip dağılımları.....	3
Tablo 4.6. Yavaş metabolizör olgularının genotip dağılımları.....	3
Tablo 4.7. Hızlı metabolizör olgularının genotip dağılımları.....	3
Tablo 4.8. Cinsiyete göre genotiplerin dağılımı.....	3

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ARK	Arkadaşları
CO ₂	Karbondioksit
CYP	Sitokromlar
DNA	Deoksi ribonükleik asit
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfatlar
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EM	Extensive metabolizer
FAD-FMN	Flavin adenin di nükleotid
FG	Farmakogenetik
HCL	Hidroklorik asit
IM	Intermediate metabolizer
KB	Kilobayt
Mg ⁺²	Magnezyum
ml	Mililitre
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NM	Nanometre
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
PZR	Polimer zincir reaksiyonu
µl	Mikrolitre

NÖROPSİKİYATRİK HASTALARDA CYP2D6 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Öğrencinin Adı: Safa Can POLAT

Danışmanı: Prof. Dr.Fethi Sırrı ÇAM

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

ÖZET

Amaç: Sitokrom p450 sistemi, farklı izoenzimlerden oluşan ilaç metabolizmasından sorumlu hepatik enzim sistemidir. Tüm sitokrom enzimlerinin yaklaşık %2-4'ünü oluşturan CYP2D6 enzimi klinikte kullanılan ilaçların %25'inin metabolizmasından sorumludur. Bu enzim geninin genetik polimorfizmleri kullanılan ilaçların etkinliğini ve ilaç toksisitesini değiştirebilmektedir. Bu çalışmada Nöropsikiyatrik hastalarda CYP2D6 gen polimorfizmlerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri kliniğinden laboratuvarımıza yönlendirilen 192 hastadan multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve multiplex Allel Spesifik Primer Ekstensiyon (ASPE) yöntemiyle CYP2D6 enzim geni polimorfizmleri belirlenmiştir.

Bulgular: Olguların %82,29'u normal metabolizör, %12,5'i orta metabolizör, %2,08'i yavaş metabolizör ve %3,13'ü hızlı metabolizör olarak saptanmıştır. Çalışmamızda en sık rastlanan alleler sırasıyla *1 (37,63%), *2 (24,75%), *41 (15,15%), *4 (9,85%) ve *10 (4,29%), olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: İncelenen popülasyonda Normal metabolizör (EM) oranlarının Türk toplumunda yapılan çalışmalara göre daha yüksek olduğu, Yavaş-Düşük metabolizör (PM) ile Hızlı metabolizör (UM) sıklığının daha düşük oranda olduğu tespit edilmiştir. Enzim fonksiyonun da azalma ile seyreden *41 alleli bu çalışmada en sık mutant allel olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda enzim aktivitesinde değişim tespit edilen olguların %17,71 oranında olması, tedavi öncesi olgularda CYP2D6 gen değişimlerinin belirlenmesi bakımından yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Farmakogenetik, CYP2D6, Polimorfizm, Sitokrom p450,

INVESTIGATION OF THE CYP2D6 GENE POLYMORPHISMS IN THE PATIENTS WITH NEUROPSYCHIATRIC DISEASES

Student's Name: Safa Can POLAT

Advisor: Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM

Department: Medical Biology

ABSTRACT

Aim: The system cytochrome p450 is a hepatic enzyme system that comprises of different isoenzymes and is responsible for drug metabolism. The enzyme CYP2D6 that generates about 2-4% of all cytochrome enzymes is responsible for the metabolism of 25% of drugs that are used in clinic. Genetic polymorphisms of this enzyme gene can modify the effectiveness of the drugs that are used and drug toxicity. In this study it is retrospectively aimed that the consideration of CYP2D6 gene polymorphisms that affects the enzyme activity in Turkish society.

Material and Methods: Polymorphisms of enzyme gene CYP2D6 has been detected on 192 patients that have been directed to our laboratory from psychiatry clinic in the ways of the multiplex Polymerase chain reaction (PCR) and multiplex Allele Specific Primary Extension (ASPE).

Results: 82,29% of the cases have been detected as normal metabolizer and 12,5% of them as medium metabolizer and 2,08% of them as slow metabolizer and 3,13% of them as fast metabolizer. In the study the most common alleles in an descending order are these; *1 (37,63%), *2 (24,75%), *41 (15,15%), *4 (9,85%) ve *10 (4,29%).

Conclusions: It has been detected that the rates of normal metabolizer (EM) are higher according to studies in Turkish society and the rates of Slow-Low metabolizer (PM) and Fast metabolizer are less in the population that has been investigated. The most common mutant has been detected as allele in this study with 41 alleles that follows with a decrease in enzyme function. In the study that the cases in which have been detected changes in their enzyme activity are in the rate of 17,71% is advantageous with regard to determining of the changes of CYP2D6 gene in phenomena that are before treatment.

Keywords: Pharmacogenetic, CYP2D6, Polymorphism, Cytochrome p450

1. GİRİŞ

İlaç metabolizmasındaki ve ilaç yanıtındaki kişiler arası çeşitlilik, kapsamlı bir konudur (Ingelman-Sundberg, M. 2005). İki kişinin plazmalarındaki ilaç seviyeleri 1000 kattan fazla çeşitlilik gösterebilir. Bu çeşitliliğin nedeni, fizyolojik, genetik, patofizyolojik ve çevresel kökenli olabilmektedir. Son yıllarda genetik faktörlerin, bu çeşitlilikteki önemi çok daha etkin bir şekilde çalışılmaktadır. Sitokrom P450, pek çok ksenobiyotik ve ilacın metabolize edilmesinden sorumludur (Ingelman-Sundberg, M., 2004).

Organizma ksenobiyotik maddelerin zararlı etkilerinden korunmak için çeşitli koruyucu sistemler geliştirmiştir. Bu koruyucu sistemlerden bazıları özelleşmiş enzimlerden oluşmaktadır. Sitokrom P450 enzim ailesinde bu özelleşmiş enzim sistemlerinden biridir (Hasler ve ark.1999).

Günümüzde, ilaca karşı verilen yanıtta görülen değişikliklerin %20-40'ından ve ilaç yan etkilerinin de %50 kadarından genetik farklılıklar sorumlu tutulmaktadır. Farmakogenetik farklılıklar poligenik kalıtım göstermektedirler. Poligenik kalıtım modelinde en az iki major gen, ve yüzlerce modifiye edici gen söz konusudur. İnsan genomunda da binlerce metabolize edici gen olduğu düşünülmektedir. Faz1 ve Faz2 enzimlerine ek olarak transport sistemine ve reseptörlere ait genlerde bulunan polimorfizmlerin de ilaç metabolizmasına etkisi olacağı bildirilmiştir (Kayaalp, S. O.2008; Peppercorn J., ve ark. 2013).

CYP2D6 genine ait polimorfizmler özellikle antidepresan, nöroleptik, antiaritmik, antihipertansif, beta bloker ve morfin derivelerinin terapötik kullanımında klinik etkiye değişkenlik oluşturur. Zayıf metabolize edici bireylerin bu ilaçları standart dozda kullanımları sonrası plazmalarında bu ilaçların konsantrasyonlarında artış ve buna bağlı olarak yan etkiler ortaya çıktığı bildirilmiştir (Abraham BK, Adithan 2001).

CYP2D6 geni 22q13.1 kromozom bölgesine lokalizedir. Bu genin ürünü olan enzimin 2 izoformu vardır: Birinci izoformu 9 ekzon ve 497 aminoasitten oluşurken, ikinci izoformu ise 8 ekzon ve 446 aminoasitten oluşmaktadır (Teh LK, Bertilsson L. 2012).

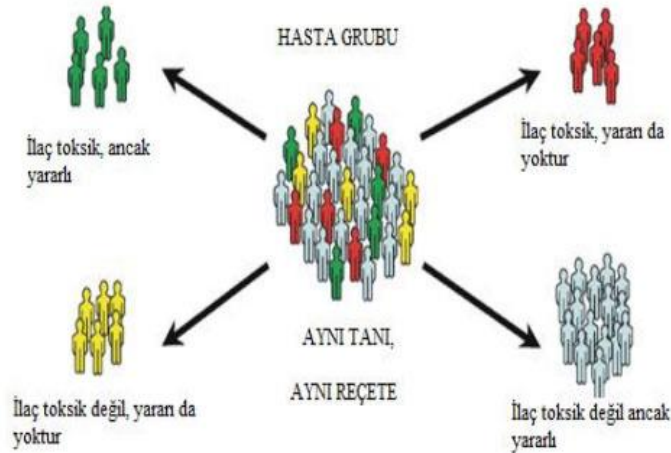
Türk toplumunda CYP2D6 ile yapılan çalışmalara göre; allel sıklıkları CYP2D6*1 için %37; *2 için %35; *4 için %11; *10 için %6; *5 için %1 ve *17 için %1 olarak bildirilmiştir. Ülkemizdeki zayıf metabolize edicilerin oranı %1.49 olarak bildirilmiştir (Aynacıoğlu ve ark.1999).

Bu çalışmada CYP2D6 geninin polimorfizmleri psikiyatri poliklinik hastaları olan 192 bireyde araştırılmıştır. Türk toplumunda CYP2D6 fenotip ve allel frekansları belirlenmiştir. Bu sonuçlar farklı metabolize ediciler hakkında bilgi edinmemizi sağlamıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. FARMAKOGENETİK

Farmakogenetik terimi farmakoloji ve genetik kelimelerin kombinasyonundan oluşur. Farmakoloji ilaçların, ilaç olabilecek her türlü maddenin insan vücudunda çalışmasını ve biyolojik sistemler ile olan etkileşimini inceleyen bir bilim dalıdır. Genetik ise tek bir genin veya birkaç genin aynı anda etkileri sonucu özelliklerin nasıl kalıtsallandığını ve vücut hücrelerinde nasıl çalıştığını inceleyen bir bilim dalıdır. Bundan dolayı, Farmako Genetik (FG) bir ilacın çalışmasını etkileyen her türlü genetik faktörünü inceleyen bir bilim dalı olmaktadır. Farmakogenetiğin kapsamının genişlemesi farmakogenomik dalının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Farmakogenomik, tüm insan genleri, onların ürünleri ve işlevleri, ekspresyonlarındaki bireyler arası ve birey içi farklılığın sistematik olarak belirlenmesini inceleyen bir bilim dalıdır. FG amacı hastalığa yatkınlıkta, ilaç metabolizmasında ve ilaç yanıtını değiştirebilen genetik faktörlerdeki varyasyonları (özellikle tek nükleotid polimorfizm, ve kopya sayısı farklılıkları) tanımlamaktır (Uçkun 2011).



Şekil 2.1. Alınan aynı ilacın bireyler arasında gösterebileceği farklı etkileri (<http://www2.eur.nl/fgg/ch1/cellbiology/images/patrinis2.jpg>)

Bu zamana kadar Farmakogenetik çalışmaların çoğu ilaç metabolize eden enzimlerdeki genetik polimorfizm üzerine yoğunlaşmıştır. Sitokrom P450 CYP3A, 2D6, 2C19 ve 2C9 izoenzimlerin antidepresantların metabolizmasında önemli olduğu bulunmuştur. Farklı ilaçlar farklı enzimlerle metabolize olur. Farmakogenetiğin yararlarını şu şekilde sıralamak mümkündür; İlaçların terapötik etkileri artırılabilir, yan etkileri azaltılarak sağlıklı hücrelere zarar verilmesi kısmen önlenir. Doktorlarda deneme ve yanılmaya karşı hastaların genetik profili baz alınarak ilacın kullanılması düşüncesi gelişebilir ve doz alımında hastanın vücut ağırlığı ve yaşı ile birlikte genetik profili de göz önüne alınabilir. Bunun sonucunda oluşabilecek advers ilaç reaksiyon olasılığı azaltılabilir, ilacın etkililiği artırılabilir, istenen tedavi sonuçlarına kısa sürede ulaşılabilir.

2.2. SİTOKROM P450 (CYP450)

Sitokrom P450 (CYP450), ilk defa, sıçan karaciğerinden mikrozom fraksiyonları ile spektrofotometrik çalışmalarda bulunan Martin Klingenberg tarafından tanımlanmıştır. CYP450 Sistemi katalitik fonksiyonları keşfedilmeden önce spektral özellikleri ile bilinmekteydi. Bu gruptaki proteinlerin, kendine özgü bir absorbans spektrumu vardır. Endoplazmik retikulum vesiküllerinden hazırlanan mikrozom süspansiyonundan CO₂ gazı geçirildikten sonra indirgeyici bir ajan eklendiğinde spesifik bir absorbans spektrumu gözlenir. Bu işlem esnasında indirgenmiş “hem” proteinine CO₂ bağlanır ve 450 nm.’de en yüksek absorbans elde edilir (Hasler ve ark. 1999).

İsimlerinde yer alan “450” sayısının sebebi bu proteinlerin karbonmonokside bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığın dalga boyunun 450nm’de pik göstermesidir. CYP450 enzim sistemi; dışardan alınan ilaçlar, pestisidler, endüstriyel kimyasallar, alkaloidler gibi maddeleri yani zenobiyotikleri metabolize eder. Sitokromlar tüm doku ve ince barsak sistemi, beyin, böbrek, akciğerler, lenfositler ve plasenta gibi organlarda, en fazla da karaciğer hücrelerinin Endoplazmik retikulum membranları üzerindedirler. Steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler, lökotrienler ve biyogenaminleri bu enzimlerin fizyolojik substratlarıdır. İlaçlar, bitki toksinleri ve

toksik kimyasallar gibi zenobiyotikler de bu enzimler tarafından metabolize edilir. (Graw-Hill, 2001)

Mikrozomal Sitokrom P450 enzim sisteminin monooksijenaz aktivitesi, NADPH'ten gelen elektronların sistem içerisindeki akışı ve moleküler oksijenin indirgenmesi ile oluşur. Reaksiyon sırasında moleküler oksijenin bir tanesi substratın moleküler yapısına eklenirken, diğeri de suya indirgenir (Estabrook ve ark., 1968). Bu sebeple, genellikle CYPP450 tarafından katalizlenen reaksiyonlar monooksijenasyon reaksiyonu olarak ifade edilir.

Sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz sisteminin komponentlerinden NADPH bağımlı sitokrom P450 redüktaz, yapısında FAD-FMN flavoproteinlerini içeren ve elektronların NADPH'ten CYPP450 enzimlerine transferini yapan tek cins bir enzimdir (Iyanagi ve Mason, 1973, Iyanagi ve ark., 1974).

Sitokrom P450 enzimleri ise, farklı ve çok çeşitli substrat özgülüklerine sahip olan enzim ailesidir. Bu enzimler; çevresel kirleticiler, ilaçlar, antioksidanlar, kimyasallar, organik çözücüler, anestezi ajanlar, gibi ekzojen bileşiklerin metabolizmasında rol almalarının yanı sıra, steroid hormonlar, kolesterol, safra asidi, yağ asitleri, biyojenik aminler, prostoglandinler, retinoidler gibi endojen kökenli bileşiklerin de oksidatif, redüktatif ve peroksidatif metabolizmasında da görevlidir (Gonzalez, 1989; Guengerich, 1992; Waterman, 1996).

Sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenazların katalizlediği genel reaksiyondur. Organizmada ekzojen ve endojen kaynaklı bileşiklerin metabolizmasında ve çeşitli fizyolojik işlevlerinde çok önemli göreve sahip sitokrom P450 enzimleri mayalara, funguslara, arklere, bitkilerden hayvanlara kadar yaşamın tüm formlarında mevcuttur (Cardini ve Jurtshuk, 1967; Ferris ve ark., 1973; Klingenberg, 1958; Lindenmayer ve Smith, 1964; Murphy ve West, 1969; Wright ve ark., 1996).

Memelilerde en fazla karaciğerde ekspres edilen bu enzimler böbrek, akciğer, ince bağırsak, deri, beyin, pankreas, kemik iliği, ovaryum, testis gibi ekstrahepatik

dokularda da bulunmakta ve ekspresyon düzeyleri dokudan dokuya deęiřilik gösterebilmektedir (Krishna ve Klotz, 1994; WrigtonveStevens, 1992).

CYP enzimleri ile gerçekleştirilen başlıca reaksiyonlar: N-oksidasyon, deaminasyon, dehalojenasyon, aromatik hidroksilasyon reaksiyonlarıdır. CYP grubunun sadece 3 üyesi (P450 1/CYP1, P450 2/CYP2, P450 3/CYP3) ilaç metabolizmasından sorumludur.

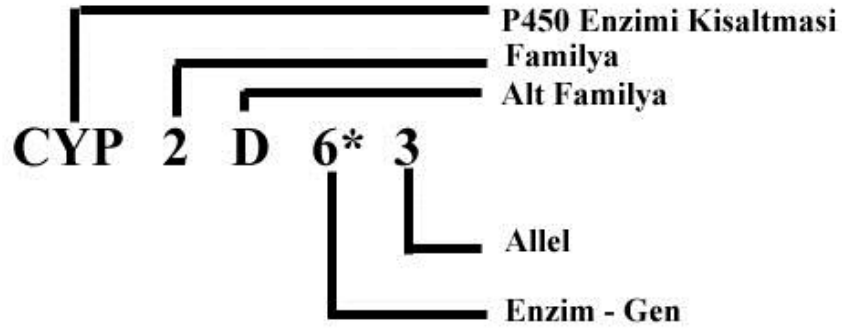
2.2.1. Sitokrom P450 Enzimlerinin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Bahsedildiği üzere farklı birçok dokuda bulunan sitokrom P450 enzimleri, hücre içinde endoplazmik retikulumda lokalize olur. Endoplazmik retikulum membranlarından fraksiyonel santrifüjlemeyle yapay olarak elde edilen mikrozomlar, karbonmonoksit gazı ile süspanse edilirse sodyum di thionit gibi indirgeyici bir ajan varlığında indirgenerek 450 nm’despesifik bir absorbans spektrumu verirler. Bu nedenle bu proteinlere CYP450 adı verilmiştir (Klingenberg, 1958; Omura ve Sato, 1964).

Sitokrom P450 enzimleri farklı substrat özğüllüklerine sahip olan bir süper enzim topluluğudur. Bu süper aile altındaki CYP450 izozimleri, aminoasit dizilimlerindeki benzerliklere göre, ailelere ve alt ailelere ayrılmıştır. Aminoasit diziliminde, %40’dan fazla benzerlik gösteren proteinler aynı aile altında toplanırken, %55’den fazla benzerlik gösterenler ise aynı alt aile altında sınıflandırılmıştır (Nebert ve McKinnon, 1994; Nelson ve ark., 1996).

Sitokrom P450 süper ailesi altında çok fazla izozimin mevcut olması sistematik bir isimlendirme geliştirilmesi ihtiyaını ortaya çıkarmıştır (Nebert ve ark., 1987).

Bu sistemde tek bir CYP450 izoziminin adlandırılması sırasında ilk olarak, İngilizce Cytochrome P450 kelimesinin kısaltması olan CYP kullanılır. CYP kısaltmasından sonra gelen rakam ise, belirli bir aileyi belirtmektedir (CYP1 ve CYP2 ailesi gibi). Aileyi tanımlayan rakamdan sonra gelen büyük harf ise, alt aileyi göstermektedir (CYP1 ailesi altında CYP1A ve CYP1B alt aileleri gibi).



Şekil 2.2. CYP2D6 genlerinin adlandırılması

Aile ve alt aileyi takip eden rakam ise, spesifik CYP izozimlerini gösterir. (CYP1A alt ailesi altında CYP1A1 ve CYP1A2 izozimleri gibi) (Evans ve Relling, 1999; Trafalis ve ark., 2010).

İnsanda 18 tane sitokrom P450 ailesi ve bunların altında toplamda 59 CYP izozimi bulunmaktadır. Bunlardan CYP5-51 ailelerinde bulunan izozimler endojen metabolizmasında özellikle steroid hormonların biyosentezinde rol oynarken, CYP1-3 aileleri ilaç moleküllerinin ve diğer ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol alır (Evans ve Relling, 1999; Trafalis ve ark., 2010).

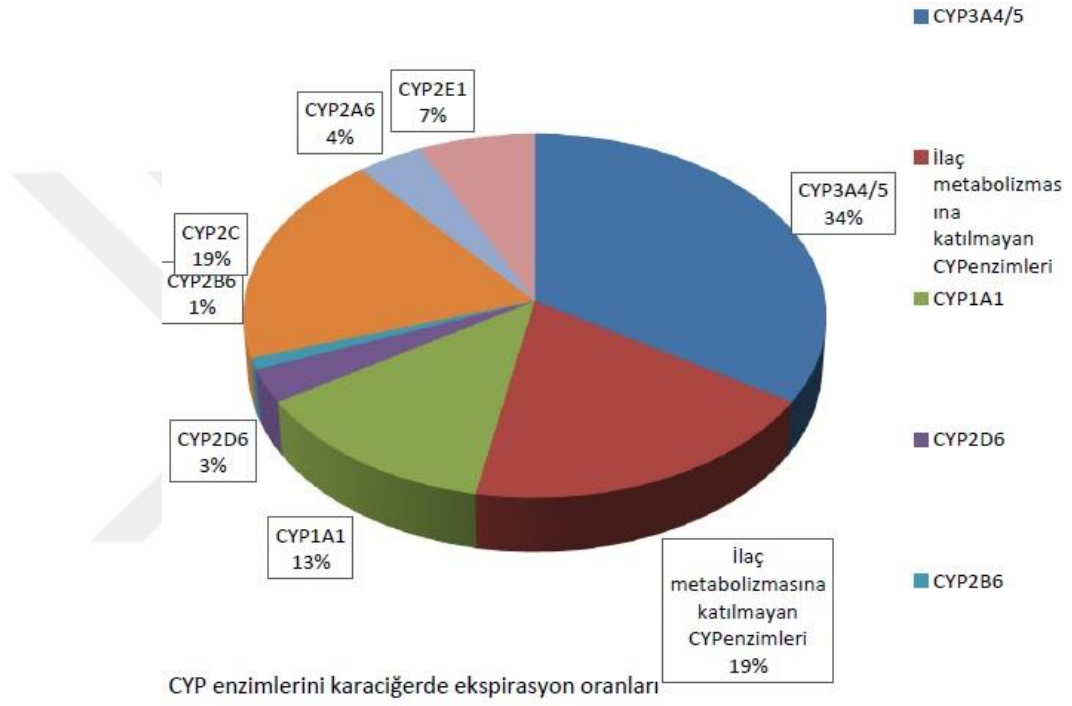
CYP1-3 günümüzde kullanılan klinik ilaçların ve günlük hayatta maruz kaldığımız binlerce farklı kimyasalın Faz I metabolizmasının % 80'inden sorumlu olduğu için toksikolojik ve farmakolojik açıdan önemlidir.

2.2.2. Sitokrom P450 ve Genetik

İnsan genomu üzerinde yapılan CYP çalışmalarında ise 57 fonksiyonel gen olduğu, ayrıca 58 psödojenin bulunduğu belirlenmiştir. 1A2, 1B1, 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 enzimleri ksenobiyotik metabolizmasında önemli görevleri bulunmaktadır.. CYP enzimi, karaciğer ve tüm gastrointestinal kanalda ve daha düşük yoğunlukta olmak üzere akciğer, böbrek ve santral sinir sisteminde

eksprese edilmekle birlikte gastrointestinal sistemden emilen gıda ve ilaçların ilk temas yeri olması ve çok yoğun CYP enzimi içermesi nedeniyle karaciğer, CYP enzimlerinin primer etkinlik gösterdiği yerdir.

Farklı CYP enzimlerinin farklı ekspresyon göstermesinin sebebi beslenme ve dış etkenlerle indüklenebilir olmasından ve bireyler arasındaki polimorfizm farklılığının olmasındandır.



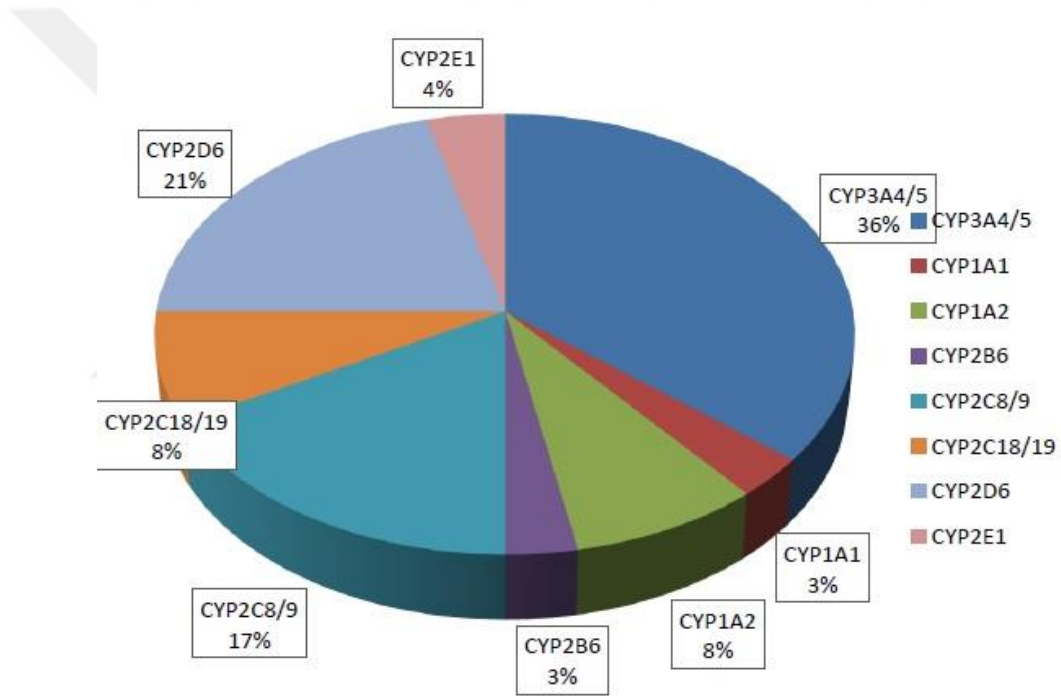
Şekil 2.3. CYP enzimlerini karaciğerde ekspresyon oranları (Uçkun 2011)

Karaciğerde CYP1A1;%13, CYPD6; %3, CYP1B6; %1, CYP2C; %19, CYP2A6; % 4, CYP2E1; %7 oranında eksprese edilmektedir.

İlaçların metabolizmasında CYP2C, CYP2D, CYP3A alt aileleri, en aktif CYP enzim gruplarıdır. CYP enzimleri içerisinde CYP3A4 enzimi ilaç metabolizmasında en aktif olan enzimdir. CYP enzimlerinden başlıcaları olan CYP3A4/5; %36, CYP2D6; %21, CYP2C8/9; %17, CYP2C18/19; %8, CYP1A2; %8, CYP2E1; %4, CYP1A1; %3, CYP2B6; %3, oranında ilaç metabolizmasına katılmaktadır (Şekil2.4). CYP2D6 enzimi karaciğerde %3 gibi küçük bir oranda eksprese

edilmekle birlikte ilaç metabolizmasında %21 oranında görev almaktadır. CYP1A, CYP1B, CYP2A, CYP2B ve CYP2E enzimleri birçok protoksin ve prokarsinojenin en son reaktif metabolitine dönüşümünde görev almakla birlikte terapötik ilaç metabolizmasında çok belirgin bir etkinlik göstermemektedir (Taşkın 2014).

Klinik farmakolojik çalışmalar ve insan karaciğer doku örneği ekspresyon analizleri ile CYP enzim aktivitesinin bireyler arasında belirgin farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. Bireyler arasında böyle bir farklılık polimorfizme ve diğer bireysel özelliklerin farklı olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Relling MV, GLaurence L. Brunton, John S.Lazo, Keith L. Parker, 2005).



Şekil 2.4: Karaciğer CYP enzimlerinin ilaç metabolizmasına katılım oranları: (Uçkun 2011)

CYP3A4/5 %36; CYP1A1 %3; CYP1A2 % 8; CYP2B6 %3; CYP2C8/9 %17; CYP2C18/19 %8; CYP2D6 %21; CYP2E1 %4 oranında ilaç metabolizmasına katılmaktadır. CYP2D6 enzimi karaciğerde %3 gibi küçük bir oranda ekspresse edilmekle birlikte ilaç metabolizmasında %21 oranında görev almaktadır. İnsanda CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP2D6 genleri başta olmak üzere bazı CYP genleri yüksek oranda polimorfizm göstermektedir. CYP1B1 ve CYP3A4 genlerinde

ise allelik varyant daha az oranda görülmektedir (Relling MV, GLaurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker, 2005).

2.2.3. Nöropsikriyatrik Hastalarda CYP450 Molekül Mekanizması

Sitokrom P450-2D6 (CYP2D6), birçok tipik ve atipik antipsikotiğin ve antidepresanların metabolizmasında rol oynamaktadır. Sertindol CYP2D6 üzerinden, risperidon temel olarak CYP2D6 çok az olarak CYP3A4, olanzapin CYP1A2 ve CYP2D6 ve klozapin birincil olarak CYP1A2 ve CYP3A4 ikincil olarak CYP2C9 ve CYP2D6 üzerinden metabolize edilmektedir (Prior ve ark. 1999).

CYP2D6 enzimi trisiklik antidepresanların çoğu, bazı selektif serotonin geri alım inhibitörleri, bazı diğer antidepresanlar(venlafaksin ve nefazodonun metaboliti m-klorofenilpiperazin ve trazodon), β -blokörler, antiaritmikler ve opiatların metabolizmasından sorumludur (Bertz ve Granneman 1997; Aynacıoğlu 1999).

Bu enzimin aktivitesi toplumdan topluma değişiklik gösterebildiği gibi psikiyatrik hasta grubunda bu farklılıkların normal popülasyondan farklı olabileceği belirtilmektedir.

ABD. ve Avrupa’da yavaş metabolizör oranı yaklaşık % 7 iken (Chen ve ark. 1996, Sachse ve ark. 1997). ABD’de bir psikiyatri hastanesinde yatarak tedavi gören 100 hasta üzerinde yapılan çalışmada hastaların %14’ünün yavaş metabolizör oldukları bulunmuştur (De Leon ve ark. 1998).

CYP2D6 enzimini inhibe eden fluoksetin ve kinidin gibi ilaçlar P450-2D6 ile metabolize edilen ilaçlarla birlikte kullanıldığında, beraber kullanıldıkları ilaçların etki sürelerinin uzamasına veya toksik konsantrasyonlara çıkmasına neden olabilmektedir.

CYP2D6 enzimini inhibe eden ilaçların kullanılması sırasında hızlı metabolizörler yavaş metabolizör gibi davranmaktadır. Paroksetin, norfluoksetin, fluoksetin, sertralin, klomipramin, desipramin, amitriptilin, sitalopram, fluvoksamin gibi antidepresanlar ve flufenazin, haloperidol, levopromazin, perfenazin, ve

tiyoridazin gibi antipsikotikler CYP2D6 enzimini inhibe etmektedirler (Yüksel 2000).

2.3. CYP450 ENZİMLERİ

Alınan ilacın aktif veya inaktif formlarına dönüşüm oranı ile ilaç ve metabolitlerinin vücutta erişecekleri konsantrasyon miktarını, ilaçların ve metabolitlerinin eliminasyon oranını belirlemektedir.

CYP2D6'nın enzimatik reaksiyon esnasında gösterdiği aktivite kullanılan substrata göre değişiklik göstermektedir. Örneğin CYP2D6*17'nin azalmış fonksiyone aktiviteden sorumlu olduğu gözlenmiştir. Buna bazı ilaçları örnek verilecek olursa CYP2D6 ile metabolize olan dekstrometorfan, risperidon, kodein ve haloperidol'ün CYP2D6 ile metabolizması sırasında bireyler arasında büyük değişiklikler görülebildiği bildirilmiştir. Klinik sonuçlar CYP2D6 polimorfizminin hem ilaç yan etkilerine hem de değişmiş ilaç yanıtına sebep olduğu belirlenmiştir. CYP2D6 polimorfizminden etkilenen ilaçlar CYP2D6 ile ya aktif forma dönüşürler veya atılımları için CYP2D6'ya ihtiyaç duyarlar (Zhou SF.2009).

Çok sayıda aktif allele sahip kişiler ilaçları daha az sayıda allele sahip kişilere göre daha hızlı metabolize ettikleri için bu kişilerde kullanılan standart ilaç dozu ile istenilen etkiye ulaşamaya bilmektedir. Aktif CYP2D6 allelleri eksik olan bireylerde ise ilgili substratların daha yavaş metabolize edilmeleri sonucunda başta entoksikasyon gibi birçok advers ilaç reaksiyonu ile karşılaşılabilir. Bu ilaçların kullanımını daha güvenli hale getirebilmek için, ilaçların klirensini belirlemede metabolizmalarından sorumlu CYP2D6 enzimi genotiplendirmesinin faydalı olduğu görülmüştür (Ingelman-Sundberg M. 2001).

Genotip-fenotip ilişkisine dayalı birçok çalışma ve ilaç metabolizasyonunun polimorfizmi ile ilgili, kişiler arası çeşitliliği gösteren çalışmalar yapılmıştır (Ingelman-Sundberg, M. ve ark. 1999; Daly, A.K. 2003; Zanger, U.M. ve ark. 2004).

2.4. CYP2D6 ENZİMİ VE POLİMORFİZMİ

CYP2D6 enzimi; İsveç'te Folke Sjöqvists Laboratuvarı, Londra'da Bob Smith ve ark. ile Bonn'da Michel Eichelbaum tarafından yapılan aynı zamanlı çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Klinikte kullanılan ilaçların %20-25'i CYP2D6 enzimi tarafından metabolize edilmektedir. Yine klinikte kullanılan ilaçların %50'sinin farmakokinetiği üzerine belirgin etkisi vardır. CYP2D6 substratı olan ilaçlarla tedavi edilenlerin yaklaşık %30-40 kadarında CYP2D6 genotiplemesinin yararlı olduğu kabul görmektedir. Bu oran klinikte kullanılan ilaçların %7-10'una karşılık gelmektedir (Ingelman-Sundberg M. 2005).

CYP2D6 enzimi karaciğer CYP enzimlerinin yaklaşık %2-4 gibi çok küçük bir bölümünü oluşturmakla birlikte, polimorfizm açısından üzerine en çok çalışma yapılan CYP enzimidir. Kişiler arasında enzim aktivitesi yönünden geniş bir çeşitlilik gösterir. Farklı etnik gruplar arasında CYP2D6 allelleri oldukça geniş bir yelpazede bulunmaktadır. Bu nedenle zayıf metabolize ediciler (poor metabolizer; PM), orta düzeyde metabolize ediciler (intermediate metabolizer; IM); hızlı metabolize ediciler (extensive metabolizer; EM) ve aşırı hızlı metabolize ediciler (ultra rapid metabolizer; UM) olarak bireyler gruplandırıldığında farklı toplumlarda farklı oranlarda dağılım gözlenebilmektedir (Zhou SF. 2009).

CYP2D6, metabolize ettiği 70' in üzerinde ilaç olması nedeniyle önemli bir enzimdir, bu özelliği sebebiyle, en fazla çalışma yapılan enzimdir. CYP2D6 bilinen tüm ilaçların %25'inin metabolizmasından sorumludur (Nelson, D. 2003).

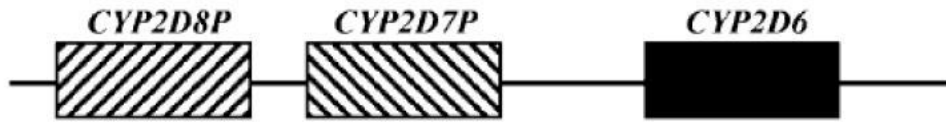
Sitokrom P450 enzimleri piyasadaki ilaçların %40-45'inin metabolizmasından ve yine bu ilaçların faz 1 ile metabolize olanlarının %70-80' inin metabolizmasında etkilidir (Ingelman-Sundberg M. 2005)

2.4.1. CYP2D Lokusunun Yapısı

İnsan CYP2 ailesi, 13 alt aileye; 16 normal, 16 psödogene sahiptir (Nelson, D. 2003). Bu 13 alt aileden biri olan CYP2D' nin bulunduğu CYP2D lokusu 1989'da

Kimura ve ark. tarafından izole edilen ve baz dizini belirlenen bu lokus, 22. kromozomun uzun kolu üzerinde, oldukça homolog üç gen içerir (Kimura, S. ve ark. 1989; Geadigk, A. ve ark.1991) .

CYP2D8P, CYP2D7P ve CYP2D6 diye adlandırılan bu genler 45 kb.lik bir bölgede bulunmaktadır (Kimura, S. ve ark. 1989). CYP2 gen ailesinin diğer üyeleri gibi 2D genleri de 9 ekson, 8 intron içerirler. CYP2D8P, birçok delesyon ve insersiyonlar içeren gerçek bir psödogendir ve okuma çerçevesi kapalıdır. CYP2D7P geni ise, CYP2D8P' ye göre CYP2D6' ya daha benzerdir. İlk eksonunda sadece bir tane T138 insersiyonu içerir ve bu insersiyon okuma çerçevesini değiştirerek translasyonu erken sonlandırır. Bundan dolayı, CYP2D7P de bir psödogen olarak bilinir. CYP2D8P ve CYP2D7P genleri psödogendir, CYP2D6 geni ise fonksiyonel bir genidir.



Şekil 2.5. CYP2D lokusunda bulunan genler (Endrizzi, K. ve ark. 2002).

2.4.2. CYP2D6 Allelleri

CYP2D6 geni 22. kromozomun q13.1 bölgesinde lokalizeve iki adet (CYP2D7 ve CYP2D8) psödogen ile beraber bu lokusta bulunurlar (Bertilsson ve ark. 2012).

Birbirine çok benzer ve yakın psödogenler sayesinde mutasyonlar çok daha kolay gerçekleşmektedir. Eşit olmayan crossing over oluşmasıyla çok sayıda varyant CYP2D6 alleli oluşabilir. Böylece defektif gen kodlayan yeni bir kodon üretilmektedir. CYP2C odağı ile karşılaştırıldığında CYP2D lokusunun aktivitesinin çok yüksek olması, çok sayıda varyant alleli çok kısa bir süre içinde oluşturmaktadır (Clark AG. 1994).

Günümüzde 74 allelik varyant ve subvaryant serileri belirtilmiştir ve bu sayı artmaktadır. En önemli allel varyantları; *2, *3, *4, *5, *10, *17 ve *41 olarak kabul edilmektedir (Sobrinove ark. 2005)

CYP2D6 allel dağılımı etnik özelliklere göre farklılıklar göstermekte ve beraberinde kullanılan bazı ilaçlar (CYP2D6 inhibitörleri gibi) enzimin aktivitesini etkileyebilmektedir (Meyer 2000).

Genlerdeki varyasyonlar olası dört fenotipe yol açar. Yavaş-Zayıf (PM, Poor Metabolizer), hızlı (EM, Extensive Metabolizer), orta hızlı (IM, Intermediate Metabolizer) ve ultra hızlı (UM, Ultra-rapid Metabolizer) metabolize ediciler bulunmaktadır.

Metabolizör durumu	Genotip	Beklenen ilaç etkileri
UM (ultra hızlı, ultra-rapid)	Aktif allelin dublikasyonu ya da multidublikasyonu 3 ya da daha fazla aktif allel	Bireylerde ilaç terapötik plazma konsantrasyonlarına ulaşmayabilir. Dolayısıyla yanıt olmayabilir.
EM (hızlı, extensive)	2 aktif allel 1 aktif allel ve 1 kısmi aktif allel	Standart dozlar terapötik plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Yanıt vardır.
IM (orta hızlı, intermediate)	Aktif allel – inaktif allel; kısmi aktif allel – kısmi aktif allel	EM ve PM arasındaki ilaç etkileri görülür.
PM (Zayıf, poor)	İnaktif allel-inaktif allel Kısmi aktif allel-inaktif allel	EM fenotipli bireyler için tespit edilen terapötik plazma konsantrasyonlarına ulaşamayabilir. Bu bireylerde toksik reaksiyon riski artabilir.

Şekil 2.6. CYP 450 enzimlerini kodlayan genlerdeki varyasyonların ilaç metabolizması üzerindeki olası etkileri (The Duke Evidence-basedPractice Center (EPC), 2006).

2.4.2.1. Yavaş-Zayıf Metabolizörler

PM.'ler Beyaz ırk popülasyonun %5-10' u yavaş metabolize eden enzim üreten alellere sahiptir. Bu grubun %93-97,5' inin ise, CYP2D6 *3, *4, *5 ve *6 alelleri

sahip olduğu bilinmektedir (Marez, D. ve ark. 1997; Daly, A.K. ve ark. 1996a; Sachse, C., ve ark. 1997; Roberts, L.R. ve Kennedy, M.A. 2006).

Beyaz ırk topluluğunun zayıf metabolizörlerinin %23'ünde CYP2D6*4 aleli bulunmaktadır, %4'ü ise *5 aleline sahiptir (Heim, M. ve Meyer, U.A. 1990). 208 kişi ile yapılan bir beyaz ırk popülasyonu araştırmasında, CYP2D6*5 allelinin sıklığı 0.038 bulunmuştur (Geadigk A. 1999).

Avrupa topluluğunun yaklaşık %5'inde ve Oryantal ırkın %1'inde CYP2D6 enzimi inaktiftir (Daly, A.K., 2003). Yavaş metabolizörlerin normal metabolizörlere göre, ilaç plazma seviyeleri daha yüksek görülür ve bu kişiler ters ilaç etkisi göstermeye daha yatkındır (Sachse, C. ve ark., 1997; Herken, H. ve ark. 2001).

2.4.2.2. Normal Metabolize Edici Alleller (EM)

İki aktif alleli bulunan ya da biri kısmi aktif diğer alleli aktif allel olan bireyler normal metabolize edici olarak (EM) tanımlanır (3, 14, 22). fenotipine sahip olabilmeleri için en az bir adet bulundurmaları gereken normal aktivite gösterdiği kabul edilen alleller yabancı tip ya da fonksiyonel alleller olarak adlandırılmaktadır. CYP2D6*1, *2, *33 *35 allelleri yabancı tip olarak bildirilmiş allellerdir (Sobrinho ve ark. 2005).

2.4.2.3. Orta Seviyede Metabolize Ediciler (IM)

Bir aktif ve diğeri inaktif alleli olan ya da iki kısmi allele sahip olan bireyler orta düzeyde metabolize ediciler olarak tanımlanır. Yeterli tedavi cevabı için bu grup hastalarda ilaç dozu standart dozdan daha az kullanılabileceği tavsiye edilmektedir. Yine bu grupta yer alan hastaları için ön ilaçların dozunun yeniden düzenlenmesi yada alternatif bir tedavi seçeneği üzerinde durulması gereği bazı araştırmalarda bildirilmiştir. Bu alleller azalmış aktivite gösteren veya substrat bağımlı allellerdir. Başlıca aktif alleller: CYP2D6 *9, *10, *17, *36 *41 dir (Sobrinho ve ark. 2005; Ingelman-Sundberg 2005)

Sarı insan ırkında görülen *10 alleli yabancıl tip allelle kıyaslanabilecek kadar sık olarak görülmektedir. Bu durum sarı ırkın ilaç metabolize etme hızının beyaz ırka göre düşük olduğunu göstermektedir (Yagihashi T, ve ark. 2009)

2.4.2.4. Hızlı Metabolizörler (UM)

Bu fenotipe sahip kişilerde CYP2D6 geninin birden fazla kopyası bulunmaktadır. Gen duplikasyonu sayısının 12' ye kadar çıktığı görülmüştür. Bir ailenin üç üyesi olan baba ve iki çocuğunda bu genin 12 kopyası tespit edilmiştir (Johansson, I. ve ark. 1993; Ingelman-Sundberg 1999).

Bu kişilerde, artmış ilaç eliminasyon hızlarından dolayı tedavide başarısızlık riski 20 kat daha fazla olabilmektedir, ve aktif ilaç metabolitlerinin hızla artmasından dolayı yan etki riskinde artar. Standart ilaç dozlarında tedaviye cevap alınamayabilir. Tedavide yüksek doz ilaca ihtiyaç duyulabilir. Yan etkilerin azaltılması için ise daha düşük doz kullanılmalıdır (Zanger ve ark. 2004).

Beyaz insan ırkında %7 sıklıkta görülen bu enzimler, yüksek derecede aktivite gösterirler ve plazmadaki metabolit seviyeleri etkin dozun çok altında olduğundan, ilgili ilaç ya da madde beklenen etkiyi gösteremez (Linda ve ark 1998; Zanger ve ark. 2004; Lovlie ve ark. 1996).

UM bireylerin sıklığı beyaz ırk'ta %1-5, sarı ırkta %0-2, siyah ırkta %2, Etyopyalılar ve Suudi Arabistanlılarda %10-16 oranında bildirilmiştir. Bu oran batı toplumlarında %5,45'tir (Ingelman-Sundberg M. 2005.) Türk Toplumunda ise %4 olarak bildirilmiştir (Aynacioglu ve ark. 1999).

Psikotropikler		Antihistaminikler	Opiatlar	Diğerleri
Amphetamines	Fluoxetine	Chlorpheniramine	Codeine	Phenacetin
Amitriptyline	Fluvoxamine	Diphenhydramine	Hydrocodone	Propafenone
Aripiprazole	Haloperidol	Hydroxyzine	Oxycodone	Rythmol
Atomoxetine	Imipramine		Tramadol	Ranitidine
Benztrapine	Mirtazapine	Beta Blokerler	Diğerleri	Tamoxifen
Chlorpromazine	Nortriptyline	Carvedilol	Dolasetron(p)	Tolterodine
Citalopram	Paroxetine	Metoprolol	Doxorubicin	Tropisetron
Clomipramine	Perphenazine	Propranolol	Encainide	
Desipramine	Risperidone	Timolol	Ecstasy(MDMA)	
Doxepin	Sertraline		Metoclopramide	
Duloxetine	Thioridazine		Reglan	
	Venlafaxine		Mexiletine	
CYP2D6 ENZİMİNİ AKTİVE EDENLER*				
* : CYP2D6 yavaş metabolizör veya orta metabolizörlerin normal metabolizör gibi davranmasına neden olabilir				
Rifampin				
CYP2D6 ENZİMİNİ İNHİBE EDENLER**				
** : CYP2D6 hızlı metabolizör veya normal metabolizörlerin yavaş metabolizör gibi davranmasına neden olabilir.				
Amiodarone	Cinacalcet	Duloxetine	Imipramine	Quinidine/quinine
Amitriptyline	Citalopram	Fluvoxamine	Methadone	Ritonavir
Bupropion	Chlorpheniramine	Fluoxetine	Metoclopramide	Sertraline
Celecoxib	Clomipramine	Goldenseal	Moclobemide	Terbinafine
Chlorpheniramine	Desipramine	Halofantrine	Paroxetine	Thioridazine
Chlorpromazine	Diphenhydramine	Haloperidol	Pimozide	Ticlopidine
Cimetidine	Doxepin	Hydroxyzine	Propafenone	

ekil 2.7. CYP2D6 enzimi ile metabolize olan ilaçlar (Sardas.2007)

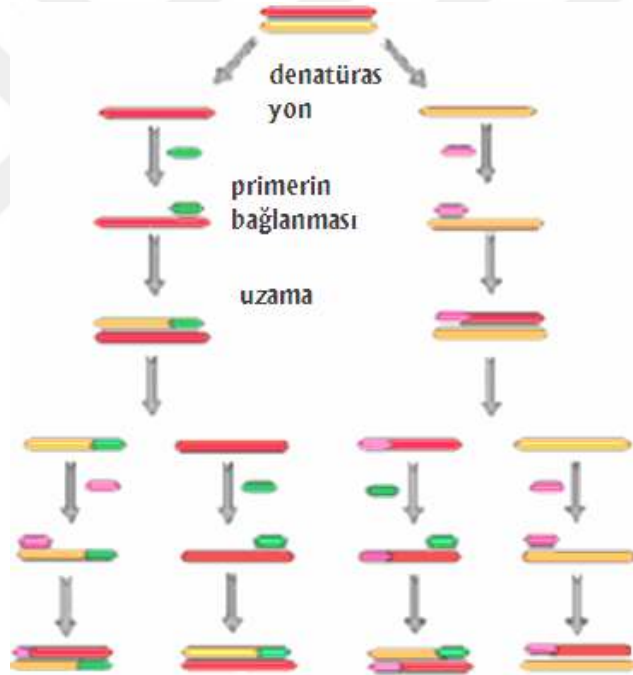
2.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

PZR, in vitro koşullarında klonlamaya gerek olmadan DNA'nın belirli bir bölgesinin çoğaltılması işlemidir. 1985 yılında Cetus adlı biyoteknoloji enstitüsünde çalışan KaryMullis ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. *Escherichiacoli* DNA polimeraz I Klenow fragmanı kullanılarak in vitro tek kopya memeli geni çoğaltılmıştır. PZR temelde üç aşamadan oluşmaktadır (Stephenson 2003).

Bu aşamalar şunlardır; Denatürasyon (DNA zincirinin açılması) Kalıp DNA'nın (template DNA) yüksek sıcaklıkta tutularak (92-98 °C) tek zincir haline getirilme işlemidir. Bazı durumlarda ön ısıtma yapmak gerekebilir. Primerlerin yapışması (Annealing) Reaksiyon sıcaklığının 65-72 °C' ye getirilerek oligonükleotid primerlerin baz dizilerinin DNA üzerindeki hedef bölgelerle eşleşmesi, yapışması işlemidir. Sıcaklığın düşürülmesindeki amaç özgül hibridizasyona olanak sağlamaktır. Uzama (Sentez) DNA zinciri üzerinde yapışan primerlere Mg+2

iyonların varlığında katalizör olan DNA polimeraz enzimin (Taq DNA polimeraz) ile primerlere nükleotidlerin eklenmesi ile zincirin uzaması işlemidir. DNA polimeraz enzimi yüksek aktivitesini 72 °C’de gösterdiğinden dolayı genellikle bu aşama 72 °C’de olur (Erllich ve ark. 1991).

Üç aşamadan oluşan (denatürasyon, primer yapışması ve uzama) işlem bir döngüyü temsil eder. Bu işlem 25 ile 40 kez tekrarlanarak milyonlarca DNA hedef gen bölgesi çoğaltılır. Yukarıda anlatılan PZR aşamaların gerçekleşmesi için DNA, DNA polimeraz, oligonükleotid primerler, deoksिनुकлеотид trifosfatlar (dNTP; dATP, dGTP, dTTP ve dCTP), iki değerlikli katyonlar (genellikle Mg²⁺ kullanılır), PZR tamponu (genellikle Tris-HCl kullanılır) gereklidir. (Uçkun Z. 2011)



Şekil 2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun sematik görüntüsü (<http://www.gazete.itu.edu.tr/mart/4genetik>).2008

PZR kullanım alanlarını şu şekilde sıralamak mümkündür;

- DNA dizi analizinde
- Prenatal tanıda
- Onkojenezin araştırılmasında

- Bilinmeyen dizilerin tayininde
- Adli tıpta
- Restriksiyon parça uzunluk polimorfizim analizinde
- DNA-protein etkileşiminin araştırılmasında
- Klonlamada ve gen ekspresyon araştırmalarında
- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı
- Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanmasında
- Geçmişe ait DNA'ların incelenmesi ve evrimin aydınlatılmasında

İn vitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve implantasyonun gerçekleştirilmesi ile bebeğın normal doğmasının sağlanması

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Bu çalışmaya nöroloji ve psikiyatri polikliniklerinden yönlendirilen 192 hasta (96 kadın, 96 erkek) dahil edildi. Hastaların yazılı onamları ve Manisa Cealal Bayar Üniveristesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulundan onay alındı (Ek.3)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Hastalara ait EDTA'lı tüpe alınan periferik venöz kan örneklerinden Qiagen Mini DNA İzolasyon kiti (Hilden, Almanya) ile uygun saflık ve kalitede DNA elde edildi. Bunun için; 1 örnek İçin 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kan alınır vortex ya da pipetaj ile 200 µl AL Buffer ve 20 µl Proteinaz K karıştırılır. Kan örneği 56 °C'de 15 dk. ısıtıcı blokta bekletilir ardından 210 µl %96'lık etanol (etil alkol) eklenir ve sonra pipetaj/vortex yapılarak örnek spin kolona aktarılır. Örnek 7000 – 8000 rpm (rotor per minute) 1 dakika santrifüj yapılır. Filtreli kısmı alınır ve temiz bir spin kolon tüpüne koyulur ve filtre üzerine 500 µl AW1 wash buffer eklenir. Örnek 7000 – 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılır. Filtreli kısmı alınır ve temiz bir spin kolon tüpüne koyulur ve filtre üzerine 500 µl AW2 wash buffer eklenir. Örnek 7000 – 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılır. Filtreli kısmı alınır ve temiz bir spin kolon tüpüne koyulur ve bu sefer filtre üzerine hiçbir şey koymadan 14.000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapılır. Filtreli kısım alınır ve yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyulur ve üzerlerine ısıtıcı blokta bekleyen elution buffer dan 100 µl koyulur ve ardından 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılarak DNA elde edilir.

3.2.2. MULTİPLEX (ÇOKLU) PCR

xTAG 2D6 v3 PCR Primer Miks A ve xTAG 2D6 v3 PCR Primer Miks B tüplerinin buzu çözündürüldü ve oda sıcaklığına getirildi. 10 ila 15 dakika arası bekleyerek 37°C’de xTAG 10x Taq tamponunun buzu çözöldü. Hazırlanan reaktifleri karıştırmak için tüpler 5 saniye vortekslendi. Reaktifleri tüplerin dibine indirmek için 5 saniye santrifüjlenir. PCR A için uygun sayıda PCR tüpü etiketlendi (örneğin; 1A, 2A). PCR B için ikinci bir PCR tüpü dizisi etiketlendi (örneğin; 1B, 2B). 1,5 mL’lik bir mikrosantrifüj tüpü “Master Miks-MM” olarak etiketlendi ve tablo 3.2.1’de olduğu gibi bir master miks hazırlandı.

Tablo 3.1. Master miks reaksiyon bileşenleri

Master Miks Reaktifi	1 Reaksiyon
DNaz ve RNaz içermeyen distile su	16,2 µL
xTAG 10x Taq Tamponu	3,3 µL
xTAG Hot Start Taq	0,5 µL
Toplam Hacim	20,0 µL

Hazırlanan master miks vortekslenir ve reaktifler tüpün dibinde toplanması için kısa süre santrifüjlenir. 1,5 mL’lik bir mikro santrifüj tüpü “Master Miks A-MMA” olarak diğer tüp ise “Master Miks B-MMB” olarak etiketlendi. Tablo 3.2.2’deki gibi, master miksten ve xTAG 2D6 v3 Primer Miks A’dan ve daha sonra xTAG 2D6 v3 Primer Mix B’den örnek alındı.

Tablo 3.2. Master miks reaksiyon bileşenleri

Master Miks A (MMA)	1 Reaksiyon
xTAG 2D6 v3 Primer Miks A	3,0 µL
Master Miks	9,0 µL
Toplam Hacim	12,0 µL
Master Miks B (MMB)	1 Reaksiyon
xTAG 2D6 v3 Primer Miks B	3,0 µL
Master Miks	9,0 µL
Toplam Hacim	12,0 µL

Master Miks A (MMA) ve B (MMB) vortekslenir ve reaktiflerin tüpün dibinde toplanması için kısa süre santrifüjlenir. 1A etiketli her bir PCR tüpüne her bir MMA'dan 12 µL'alındı. 1B etiketli her bir PCR tüpüne her bir MMB'dan 12 µL'alındı. Her bir numune için, PCR A tüplerine 3 µL DNA kalıbı ve PCR B tüplerine 3 µL DNA kalıbı eklendi. Negatif için ise 3 µL su eklendi. Reaktiflerin hazırlandığı tüpler vortekslenir ve reaktiflerin tüpün dibinde toplanması için kısa süre santrifüjlenir. Tüpler ısıtıcı döngüleyici Applied Biosystems 9700 PCR (Kaliforniya, Amerika) cihazına aktarılır ve şekil 3.2.1'deki koşullar yerine getirilerek döngü gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Multiplex PCR ısıtıcı döngü koşulları.

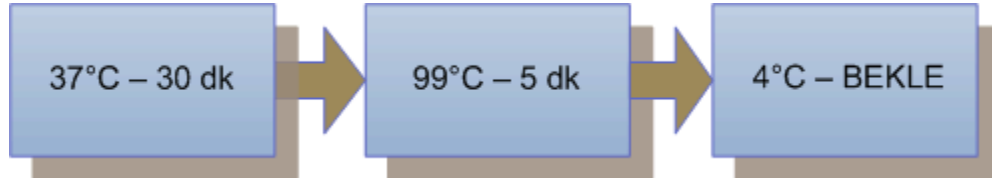
3.2.3. PCR Amplikonlarının Ekzo-Fosfataz İşlemi

Her bir örnek için, eşleşen PCR A ve PCR B reaksiyonları birleştirildi. Örneğin, toplamda yaklaşık 30 µL'lik toplam bileşik hacmi elde etmek için, tüp 1B'nin tüm hacmi (~15 µL) tüp 1A'nın (~15 µL) toplam hacmiyle birleştirildi. 1,5 mL mikro santrifüj tüpünde tablo 3.3.1'deki gibi enzim karışımı hazırlanır.

Tablo 3.3. Ekzo-Fosfataz reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	1 Reaksiyon
xTAG Karides Alkalın Fosfataz	2,8 µL
xTAG Ekzonükleaz I	1,0 µL
Toplam Hacim	3,8 µL

Negatif kontrol tüpleri dâhil olmak üzere, yaklaşık olarak 30 µL toplanan PCR reaksiyonu içeren PCR tüplerinin her birisine 3,8 µL'lik enzim miksi pipet yardımı ile ilave edilir ve pipetaj yapılır. Örnek reaksiyonlarının bulunduğu tüpler, şekil 3.3.1'deki gibi programlanmış olan Applied Biosystems 9700 PCR (Kaliforniya, Amerika) cihazına aktarıldı.



Şekil 3.2. Ekzo-Fosfataz PCR ısı döngü koşulları

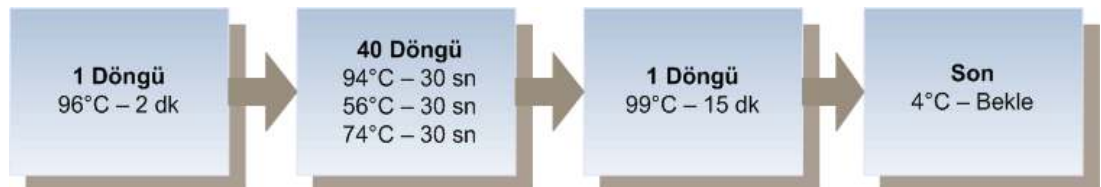
3.2.4. PCR Amplikonlarına ASPU (Allel Spesifik Primer Uzantısı) Ekleme

xTAG 2D6 v3 ASPU Primer Miks ve 5X Platinum Tfi Reaksiyon Tamponu ve Tfi 50 mM MgCl₂'nin buzunu çözdürüldü ve oda sıcaklığına getirildi. Örnek PCR tüplerine karşılık gelen sayıda 0,2 mL ince duvarlı tüpler numaralanarak işaretlendi. 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpü ASPU master miks (AMM) olarak işaretlendi ve tablo 3.4.1'deki gibi hazırlandı.

Tablo 3.4. ASPU reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	1 Reaksiyon
DNaz ve RNaz içermeyen distile su	10,5 µL
Platinum Tfi Reaksiyon Tampon Çözeltisi, 5x	4,0 µL
Tfi 50 mM MgCl ₂	0,6 µL
xTAG® 2D6 v3 ASPU Primer Miks	1,5 µL
Platinum Tfi Exo(-) DNA Polimeraz	0,4 µL
Toplam Hacim	17,0 µL

İşaretlenen 0,2 mL PCR ASPU tüplerinin her birine 17 µL ASPU master miksi dağıtıldı. Ekzo-Fosfataz işlemi yapılmış örnek PCR ürünlerinin 3 µL'si, 17 µL ASPU master miksi içeren uygun işaretlenmiş tüplere eklendi. Tüpler ısı döngüleyiciye yerleştirildi ve şekil 3.4.1'deki gibi programlanmış olan Applied Biosystems 9700 PCR (Kaliforniya, Amerika) cihazına aktarıldı.



Şekil 3.3. ASPU ısı döngü koşulları

3.2.5. Boncuk Hibridizasyonu

Örnek ampliconlarına eklenen ASPU'lara Luminex (Amerika) cihazında analiz yapılabilmesi amacıyla ilgili uzantılara spesifik boncuklar hibridize edilir. Bunun için, xTAG 2D6 v3 Boncuk Miksi ve xTAG Raportör Tamponunun buzu çözündürüldü ve odasıcağına getirildi. Bir 96-kuyucuklu Costar plağından hibridizasyon reaksiyonu için örnek sayısına uygun sayıda kuyucuk kesildi ve kuyucuklara karşılık gelen ASPE reaksiyonları işaretlendi. xTAG 2D6 v3 Boncuk karışımı tüpleri 10 saniye vortekslendi. İşaretlenen kuyucukların her birine 22,5 µL boncuk miksi dağıtıldı. Tamamlanan ASPU reaksiyonlarının 2,5 µL'sini karşılık gelen işaretli kuyucuklara pipet yardımı ile aktarıldı. Kullanılan kuyucuklar mikroseal ile kapatıldı. Tüpler, şekil 3.5.1'deki gibi programlanmış olan Applied Biosystems 9700 PCR (Kaliforniya, Amerika) cihazına aktarıldı.



Şekil 3.4. Boncuk hibridizasyonu ısı döngü koşulları

Bir sonraki adıma geçmeden önce (inkübasyonun tamamlanmasından yaklaşık 10 dakika önce) TAG 2D6 v3 Streptavidin,R-Phycoerythrin konjugatı (SA-PE) çözeltisi hazırlandı. SA-PE bir 1,5 m'lik bir mikrosantrifüj tüpü içinde Raportör Tampon çözeltisi ile 100 kez seyreltildi. Ardından hazırlanan çözeltiden her bir örneğe ait boncuk hibridizasyon reaksiyonu üzerine 100 µL ilave edildi ve örneklerle ait reaksiyonlar Luminex xTAG® (Amerika) cihazında CYP2D6 polimorfizmlerinin belirlenmesi amacıyla okutulur

3.2.6. Luminex xTAG® Cihaz Analiz Çıktısının TDAS Programı Aracılığıyla Değerlendirilmesi

Luminex çıktı dosyasının, TDAS CYP2D6'nın kurulmuş olduğu bilgisayar tarafından erişilebilir olduğunu kontrol edildi. Bilgisayarda Start (Başlat) > All

Programs (Bütün Programlar) menüsü aracılığıyla veya masaüstündeki simgeyi çift tıklarak TDAS CYP2D6 analiz programı başlatıldı ve Luminex çalışma dosyası açıldı. TDAS program analiz sonucuna göre herbir örneğe ait CYP2D6 allel sonuçları elde edildi.

3.2.6. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için "Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 15" programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tamamlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma) kullanılmıştır. Genotip dağılım ve sıklığının gruplar arası farklılıkları ki-kare testi ile allelik dağılım ve sıklığının gruplar arası farklılıkları da tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi, yüzdeleri ve p değerleri hesaplandı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Tablo 4.1’de tespit edilebilen duplikasyon, delesyon, polimorfizmler ve/veya mutasyonlar ve bu değişimlere göre belirlenen alleller gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre alleller belirlenmiş ve fenotip tablosu ile hastanın fenotipi tespit edilmiştir.

Tablo 4.1. xTAG CYP2D6 kiti ile tespit edilebilen değişimler

Genotip	Mutasyonlar ve Polimorfizmler		Enzim Aktivitesi
	PCR A	PCR B	
*1	None	None	Normal
*2	-1584 C>G, 1661 G>C	2850 C>T, 4180 G>C	None
*3		2549 A>del	None
*4	100 C>T, 1661 G>C, 1846 G>A	2850 C>T, 4180 G>C	None
*5		Deletion	None
*6	1707 T>del	4180 G>C	None
*7		2935 A>C	None
*8	1661 G>C, 1758 G>T	2850 C>T, 4180 G>C	None
*9		2613-2615 delAGA	Reduced
*10	100 C>T	1661 G>C, 4180 G>C	Reduced
*11	883 G>C, 1661 G>C	2850 C>T, 4180 G>C	None
*14A	100 C>T, 1661 G>C, 1758 G>A	2850 C>T, 4180 G>C	None
*15	138 insT		None
*17	1023 C>T, 1661 G>C	2850 C>T, 4180 G>C	Reduced
*41	1661 G>C	2850 C>T, 2988 G>A, 4180 G>C	Reduced
DUP	Duplication		Enhanced

Hastaların fenotipleri; %2,08 yavaş metabolizör, %82,29 normal metabolizör, %12,5 orta metabolizör, %3,13 hızlı metabolizör olarak bulunmuştur (tablo 4.2).

Tablo 4.2. Olguların fenotip dağılımları

Fenotip	Olgu Sayısı	Sıklık (%)
Yavaş metabolizör (PM)	4	2.08
Orta metabolizör (IM)	24	12.5
Normal metabolizör (EM)	158	82.29
Hızlı metabolizör (UM)	6	3.13
Toplam	192	100

CYP2D6 geninde en sık alleller sırasıyla; *1, *2, *41, *4, *10 olarak tespit edilmiştir. Normal fonksiyonlu allel oranı %62,37 tespit edilmiştir (tablo 4.3).

Nonfonksiyonel allel oranı %13,64 oranında tespit edilmiş, 8 ve 14A alleli ise hiçbir olguda tespit edilmemiştir. Fonksiyonu azalmış allel oranının %20,96 olduğu bulunmuştur. Duplikatif allel oranı ise olguların %3,03'ünde tespit edilmiştir (tablo 4.3).

Tablo 4.3. Olguların allel sıklıklar

Allel	Sıklık(%)
CYP2D6 *1	37.63
CYP2D6 *2	24.75
CYP2D6 *41	15.15
CYP2D6 *4	9.85
CYP2D6 *10	4.29
CYP2D6 *5	2.02
CYP2D6 *6	1.01
CYP2D6 *9	0.76
CYP2D6 *7	0.25
CYP2D6 *17	0.76
CYP2D6 *3	0.25
CYP2D6 *1XN	2.02
CYP2D6 *2XN	1.01

Normal metabolizör tespit edilen olgularda 16 farklı genotip tespit edilmiş olup *1/*2 genotipinin en fazla oranda olduğu görülmüştür (tablo 4.4).

Tablo 4.4. Normal metabolizör olgularında genotip dağılımları

Genotip	Olgusayısı	Sıklık (%)
*1/*2	39	20,31
*1/*1	27	14,06
*1/*41	22	11,46
*2/*41	13	6,77
*2/*2	11	5,73
*1/*4	11	5,73
*2/*4	11	5,73
*1/*10	7	3,65
*2/*10	4	2,08
*1/*5	4	2,08
*2/*5	3	1,57
*1/*9	2	1,04

*2/*17	1	0,52
*1/*17	1	0,52
*1/*6	1	0,52
*1/*3	1	0,52
Toplam	158	82,29

Enzim aktivasyonunda azalmaya neden olan *41 alleli 4 orta metabolizör hasta hariç tüm orta metabolizör olgularda tespit edilmiştir. Olgularda en sık saptanan *4/*41 genotipi olmuştur (tablo 4.5).

Tablo 4.5. Orta metabolizör olguların genotip dağılımları

Genotip	Olgusayısı	Sıklık (%)
*4/*41	8	4,16
*41/*41	6	3,13
*4/*10	3	1,57
*10/*41	2	1,04
*7/*41	1	0,52
*4/*9	1	0,52
*5/*41	1	0,52
*17/*41	1	0,52
*10/*11	1	0,52
Toplam	24	12,5

Enzim inaktivasyonuna neden olan *4 alleli hastaların %9,85’inde saptanmış olup, yavaş metabolizör olan beş hastanın genotipleri; *4/*4, *4/*6, *6/*6 ve *10/*11 şeklinde belirlenmiştir.

Tablo 4.6. Yavaş metabolizör olgularının genotip dağılımları

Genotip	Olgusayısı	Sıklık (%)
*4/*4	2	1,04
*4/*6	1	0,52
*6/*6	1	0,52
Toplam	4	2,08

Hızlı metabolizör olan tüm hastalarda *1 ve *2 allellerinin duplikasyonu tespit edilmiştir

Tablo 4.7. Hızlı metabolizör olgularının genotip dağılımları

Genotip	Olgusayısı	Sıklık (%)
*1/*1DUP	3	1,57
*1/*2DUP	2	1,04
*2/*2DUP	1	0,52
Toplam	6	3,13

Tablo 4.8. Cinsiyete göre genotiplerin dağılımı

Genotip	Erkek	Kadın	P (<0,05)
*1	51	67	
*2	28	14	
*3	1	0	
*4	5	11	
*5	0	1	
*6	1	0	
*7	1	0	
*8	0	0	0.065
*9	0	1	
*10	2	1	
*11	1	0	
*14A	0	0	
*15	0	0	
*17	1	0	
*41	4	2	
DUP	2	4	

Çalışmaya alınan gönüllülerin cinsiyetine göre genotiplerin dağılımı incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı (p=0,065) olmadığı saptandı.

5. TARTIŞMA

CYP2D6 enzim gen polimorfizmlerinin ve fenotiplerinin değerlendirildiği bu çalışmada, Türk toplumunda önceki yapılan çalışmalardan farklı olarak normal metabolizör fenotipinin daha yüksek olduğu, içinden daha az yavaş metabolizör ve hızlı metabolizör bulunduğu görülmüştür. Etnik ve bireysel farklılık gösteren CYP2D6 gen polimorfizmlerine bağlı enzim fenotipleri farklı toplumlarda farklı sıklıklarda saptanabilmektedir.

CYP2D6 enzimi özellikle psikiyatrik ilaçlar olmak üzere klinikte kullanılan ilaçların %25' inin metabolizmasında önemli rolü olan sitokrom izoenzimidir. Bu enzim geninin allelik farklılıkları enzim aktivitesini etkileyebilmekte ve oluşan enzim fenotipine göre kullanılan ilaçların serum düzeyini değiştirebilmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda Türk toplumu üzerinde CYP2D6 geni için 16 farklı allel, fenotip ve genotip frekansı Luminex ve XMap analiz sistemi ile belirlenmiştir.

Düşük metabolizör fenotip görülme sıklığı Asyalılarda %0-2, Beyazlar'da %5-10 Araplarda %0-2, Afrikalılarda %0-19 arasındadır. Bu çalışmada ise, PM fenotip frekansının ~%2,1 olduğu görülmüştür. Bu olgular ilaç intoksikasyonları ve oluşabilecek yan etkiler açısından riskli grubu oluşturmaktadır. Elde edilen bu oranın Avrupa'da bildirilen oranlara (% 5-10) göre çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ve Türk toplumu üzerinde yapılan diğer çalışmalarla birlikte Türk popülasyonunda PM fenotip frekansının % 1-4 arasında olduğu görülmektedir.

Türk popülasyonu için CYP2D6*4 alleli üzerinde daha önce yapılmış çalışmalarda frekans değeri %10,0-13,9 arasında bulunmuştur. Bu çalışmada ise *4 alleli, Türk toplumu üzerinde yapılmış olan diğer çalışmalara yakın derecede, non-fonksiyonel alleller içerisinde en yüksek oranda (%9,85) tespit edilmiştir. Beyaz ırktaki non-fonksiyonel alleller içerisinde CYP2D6*4 alleli yaklaşık %75'lik ve CYP2D6 *3, *4, *5, *6 allelleri ise yaklaşık %98' lik bir frekans dağılımıyla bulunur. Bu çalışmada da yine benzer şekilde Türk toplumunda non-fonksiyonel

alleller içersinde CYP2D6*4 alleli yaklaşık %72'lik ve CYP2D6*3, *4, *5, *6 allelleri ise yaklaşık %96' lik bir frekans dağılımıyla bulunmuştur. İlginç bir şekilde bu çalışmada, Türk popülasyonunda PM fenotipine neden olan CYP2D6 non-fonksiyonel allel frekansının Beyaz ırkın sahip olduğu allel frekansına yakın derecede benzediği görülmekle birlikte, Türk PM fenotip frekansı (~%2) Beyaz ırktan (%5-10) düşük çıkmıştır.

Enzim aktivitesinde azalma ile seyreden orta metabolizör olgular çalışmamızda (%12,5) Serin ve ark. yapmış olduğu çalışmaya (%12) benzer oranda tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Aynacıoğlu ve ark. yapmış olduğu çalışmada orta metabolizör olgular %23,8 oranında bildirilmiştir. Fenotipi etkileyen bu diğer faktörlerin varlığı orta metabolizör olgular açısından oldukça önemlidir. Enzim aktivitesinde azalma ile seyreden orta metabolizör olgularda enzimi etkileyen diğer faktörlerle biraraya geldiğinde ilaç toksikasyonlarına neden olabilir. Bu açıdan IM olguların ilacın yan etkileri açısından sorgulanması ve hastaların bu konuda bilgilendirilmesi gerekmektedir.

Allel sıklıkları açısından değerlendirildiğinde bu çalışmada dikkat çeken bulgu *41 allelinin popülasyonumuzda en sık mutant allel olarak tespit edilmesidir. Enzim aktivitesinde azalma ile seyreden bu allel Türk toplumunda ilk kez değerlendirilmiş olup allel sıklığının yüksek bir oranda (%15,15) olduğu görülmüştür. IM'lerin % 82'sinde en az bir allelde saptanan *41 alleli, normal metabolizör olgularda %18,3 oranında en az bir allelde tespit edilmiştir. Raimundo ve ark. 2000, Beyaz ırktaki allerler içersinde *41 allel frekansını ~%69 ve *41 allelinin genel popülasyon frekansını ise ~%20 olarak hesaplamıştır. Bizim çalışmamızda ise, *41 allelinin genel popülasyon frekansı %15,15 ve düşük allelleriçersindeki frekansı ise %72 olarak bulunmuştur.

Coğrafi yapısına bağlı olarak Türkiye Batı ile Doğu ve Orta Doğu arasında tarih boyunca bir köprü vazifesi görmüştür. Bu duruma bağlı olarak, CYP2D6 mutasyon sptekturumu etnik kökene göre değişiklikleri yansıtmaktadır. Çalışmamızda, fonksiyonu azalmış *17 allelinin frekans değeri %0,76 Aynacıoğlunun çalışmasında ise %1,11 olarak bulunmuştur. Tarihsel atalarımızın Kuzey göç güzergahı üzerindeki

Afrika, Suudi Arabistan, Türkiye ve Avrupa coğrafyasına sırasıyla baktığımızda baktığımızda, *17 allelinin frekans dağılım değerinin, %20-35, %3-9, %0-1 ve %0 olduğunu görürüz. Türk toplumunda ki fonksiyonu azalmış allel *10 frekansının ise, bu çalışma ve Türk toplumu üzerinde yapılan diğer çalışmalarla birlikte, %4-6 arasında olduğu görülmektedir. fonksiyonu azalmış *10 allelinin Afrika, Suudi Arabistan, Avrupa ve Asya'da ki frekans değerleri ise sırasıyla, %6, %3-9, %1-2 ve %5,1 olarak bulunmuştur.

Fonksiyonel olmayan CYP2D6 * 3 ve azaltılmış * 9 allellerin sıklığı, polimorfik frekanslara ulaşmalarına rağmen, Avrupa ile sınırlandırılmıştır. (>1%). Benzer şekilde, hem bu çalışmada hem de Aynacioğlu ve ark. çalışmalarında CYP2D6*3 ve *9 allellerinin frekans değeri %1' i geçmemektedir. Yine, çalışmamızda CYP2D6 *7 ve *11 allellerinin frekans değeri %0,25' i geçmemiştir.

Fonksiyonel enzim kodlanması ile ilişkili olan CYP2D6 *1 ve *2 allellerinden en az birinin bulunduğu extensive metabolizör (EM) bireylerin frekans değeri, beyaz ırk (%84), arap (%76), afrika (%77) ve asya (%80) 'ların yaşadığı bölgelerde farklılık göstermektedir. Fakat, beyaz ırkın yaşadığı bölgelerdeki EM bireylerin frekans değeri diğer ırklara göre daha fazladır. Avrasya bölgesinde bulunan Türk toplumu üzerinde, Serin ve ark. tarafından yapılan çalışmada EM bireylerin frekans değeri %63, Aynacioğlu ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise %66,1 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada ise EM bireylerin frekans değerinin %82,29 olduğu görülmüştür. Ortaya çıkan bu farklılık ise çalışmalarda kullanılan yöntemlerden ve tespiti yapılan allellerden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada, Serin ve ark.'nın çalışmasında tespit edilen allellere ek olarak CYP2D6 *1, *2, *7, *8, *11, *14A, *15, *17, *41 allelleri ve Aynacioğlu ve ark.'nın çalışmasında tespit edilen allellere ek olarak ise CYP2D6 *41 alleli çalışılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada geniş kapsamlı olarak Türkiye'nin farklı bölgelerinden (Anadolu, Ege, Marmara) gelen hastalar çalışıldığından, diğer çalışmalarla ortaya çıkan bu farklılığın bölgesel farklılığa bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Beyaz ırkta fonksiyonel CYP2D6 *1 (%34,4) ve *2 (%28,7) allellerinin toplam frekans değeri %63,1' dir. Bu çalışmada ise, Türk toplumunda CYP2D6 *1 (37,6) ve

*2 (24,8) allellerinin toplam frekans değeri %62,4'dür. Suudi Arabistanlılar, Afrikalılar ve Asyalılarda ise CYP2D6 *1 ve *2 allellerinin toplam frekans değeri sırasıyla, (%60,1), (%57,1), (%59,8)' dir. Her ne kadar Asya ve Orta Doğu ile etkileşim halinde olsa bile Türk toplumunun CYP2D6 *1 ve *2 allel frekans değerlerinin Beyaz ırk frekans değerlerine yakın olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, frekans dağılımı SPSS veri analiz yöntemleriyle belirlenmiştir. Hızlı metabolizör (UM) fenotiplerin frekans dağılımının (%3,13) olduğu ve Avrupadaki çoğu ülkede tespit edilen frekans dağılımına (%2-3) benzer olduğu görülmüştür. Türk toplumunda Serin ve ark. tarafından bildirilen UM fenotip bireylerin frekans dağılımı %4, Aynacıoğlu ve ark tarafından bildirilen frekans dağılımı ise %8,66 olarak bildirilmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, bu çalışmayla diğer çalışmalarla ortaya çıkan farklılığın bölgesel ve teşhis yönteminin farklılığına bağlı olabileceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Türk toplumunda ki CYP2D6 fenotip ve allel frekansları belirlenmiştir. Buna göre, Türk toplumunda gözlemlenen fonksiyonu azalmış ve non-fonksiyonel CYP2D6 allelleri içinde *3, *4, *5, *6, *9, *41 allel varyantlarının frekans dağılımı Beyaz ırkında gözlemlenen frekans dağılımı ile benzer bulunmuştur. Beyaz ırkında olduğu gibi Türk toplumunda da fonksiyonu azalmış CYP2D6 allelleri içinde *41 ve fonksiyonel olmayan alleller içinde de *4 alleli en yüksek frekans dağılımında bulunmuştur. Bununla beraber, Türk popülasyonunda ki PM (%2,08) ve IM (%12,5) fenotiplerinin frekans dağılımları Beyaz ırkında gözlemlenen PM (%7,5) ve IM (%6) fenotiplerinin frekans dağılımlarından belirgin bir biçimde farklılık göstermiştir.

Türk toplumu açısından CYP2D6 fenotip frekans dağılımlarının ve allel frekanslarının tespiti bölgesel farklılıkların ortaya konmasında ve tedavi izleminde yol gösterici olacaktır. Ayrıca, yakın gelecek bizlere Sitokrom p450 gen ailesi üzerinde yapılan çalışmaların ve ortaya konan çabaların hem klinik hem de pratikte ne kadar kullanılabileceğini gösterecektir.

6. KAYNAKLAR

Aynacioglu, A.S., Sachse, C., Bozkurt, A., Kortunay, S., Nacak, M., Schröder, T. Kayaalp, S.O., Roots, I., and Brockmüller, J. (1999) Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 66(2) :185-192.

Basci NE, Brosen K, Bozkurt A, Isimer A, Sayal A, Kayaalp SO. S-mephenytoin, sparteine and debrisoquine oxidation: genetic polymorphisms in a Turkish population. *Br J Clin Pharmacol*. 1994; 38 (5): 463-5.

Bertz RJ, Granneman GR (1997) Use of in vitro and data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet*, 32:210-258.

Cardini G. ve Jurtshuk P., 1968. CytochromeP-450 Involvement in the Oxidation of NOctaneby Cell-Free Extracts of Corynebacterium sp. Strain 7E1C. *J. Biol. Chem.*, 243: 6070-6072.

Chen S, Chou W, Blouin R ve ark. (1996) Clinical and Practicial aspects to screening for the cytochrome P450-2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism, *Clin Pharmacol Ther*, 60:522-534.

Clark AG. Invasion and maintenance of a gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (8): 2950-4.

Daly AK, Brockmüller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, et all., Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics*. 1996; 6 (3): 193-201.

Daly, A.K., Brockmoller, J., Broly, F., Eichelbaum, M., Evans, W.E., Gonzalez, F.J., Huang, J.D., Idle, J.R., Ingelman-Sundberg, M., Ishizaki, T., Jacqz-Aigrain, E., Meyer, U.A., Nebert, D.W., Steen, V.M., Wolf, C.R., Zanger, U.M. (1996) Nomenclature for human CYP2D6 alleles, *Pharmacogenetics*, 6: 193-201.

De Leon J, Barnhill J, Rogers T ve ark. (1998) Pilot study of the cytochrome P450-2D6 genotype in a psychiatric state hospital. *Am J Psychiatry*, 155:1278-1280.

Erlich, H.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. (1991). Recent advances in polymerase chain reaction. *Science*, 252: 1643-1650.

Evans W.E. ve Relling M.V., 1999. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science*, 286(5439): 487-491.

Hasler, J.A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P. (1999) Human Cytochromes P450, *Mol. Aspects. Med.* 20: 1-137.

Herken, H., Aynacıoğlu, S., Esgü, K., Vırt, O. (2001) Psikiyatri Hastalarında Sitokrom P450 2D6 Yavaş ve Ultra Hızlı Metabolizör Sıklıkları, *Türk Psikiyatri Dergisi*, 12(2): 83-88.

Ingelman-Sundberg M. Implications of polymorphic cytochrome p450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29: 570-3.

Iyanagi T. ve Mason H.S., 1973. Some Properties of Hepatic Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome C Reductase. *Biochemistry*, 12: 2297-2308

Iyanagi T., Makino R. ve Mason H.S., 1974. Redox Properties of the Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome P-450 and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide- Cytochrome b5 Reductases. *Biochemistry*, 13: 1701–1710.

Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjöqvist, F., Ingelman-Sundberg, M. (1993) Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 11825-11829.

Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R.C., Meyer, U.A., Gonzalez, F.J. (1989) The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene, *Am. J. Hum. Genet.* 45:889-904.

Klingenberg M., 1958. Pigments of Rat Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 75(2): 376–386.

Krishna D.R. ve Klotz U., 1994. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. *Clinical Pharmacokinetics*, 26: 144–160.

Linda S.W. Steijns and Jan Van Der Weide (1998) Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of *CYP2D6* gene duplication, *Clinical Chemistry*, 44(5): 914-917.

Lovlie, R., Daly, A.K., Molven, A., Idle, J.R., Steen, V.M. (1996) Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene, *FEBS Lett.*, 392: 30-34.

Marez, D., Legrand, M., Sabbagh, N., Guidice, J.M., Spire, C., Lafitte, J.J., Meyer, U.A., Broly, F. (1997) Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution, *Pharmacogenetics*, 7: 193-202

McKinnon, R.A., Evans, A.M. (2000) Cytochrome P450: Clinically relevant drug interactions. *Aust J. Hosp Pharm.* 30: 102-105.

Murphy P. ve West C.A., 1969. The Role of Mixed Function Oxidases in Kaurene Metabolism in *Echinocystis macrocarpa* Green Endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.*, 133: 395–407.

Nebert D.W. ve McKinnon R.A., 1994. Cytochrome P450: Evolution and Functional Diversity. *Prog. Liver. Dis.*, 12: 63-97.

Nebert D.W., Adesnik M., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Levin W., Phillips I.R., Sato R. Ve Waterman M.R., 1987. The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*, 6(1): 1-11.

Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus L.C. ve Nebert D.W., 1996. P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.

Parkinson, A. (2001) Biotransformation of Xenobiotics, Casarett&Doull' s Toxycology The Basic Science of Poisons (Klaassen C.D. edt.) 6th, Vol 6, pp 133-224, McGraw-Hill, New York.

Prior TI, Chue PS, Tibbo P ve ark. (1999) Drug metabolism and atypical antipsychotics. *Eur Neuropsychopharmacol*, 9:301- 309.

Relling MV, Giacomini KM: Farmakogenetik; Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5.edition. San Diego, California, 2005

Relling MV, Giacomini KM: Farmakogenetik; Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5.edition. San Diego, California, 2005

Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S., Roots, I. (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences, *Am. J. Hum.Genet.*, 60: 284-295.

Serin A, Canan H, Alper B, Gulmen M. The frequencies of mutated alleles of CYP2D6 gene in a Turkish population. *Forensic Sci Int.* 2012 ;222 (1-3): 332-4.

Sobrino, B., Brion, M., Carracedo, A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, *Forensic Sci Int.*, 154: 181-194.

Stephenson, F.H. (2003). Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (A Guide to Mathematics in the Laboratory). "Chapter 8".

Uçkun Z. Major Depresyon Hastalarında Sitalporamin Farmakogenetik ve Farmakokinetik Yönünden Araştırılması Doktora Tezi, 2011 Ankara (Danışman: Prof. Dr M.A. Ergün)

Wright R.L., Harris K., Solow B., White R.H. ve Kennelly P.J., 1996. Cloning of a Potential Cytochrome P450 from the Archaeon *sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett.*, 384: 235–239.

Yagihashi T, Mizuno M, Chino B, Sato Y, Sakuma K, Takebayashi T, et al., Effects of the CYP2D6*10 alleles and co-medication with CYP2D6-dependent drugs on risperidone metabolism in patients with schizophrenia. *Hum Psychopharmacol.* 2009; 24 (4): 301-8.

Yagihashi T, Mizuno M, Chino B, Sato Y, Sakuma K, Takebayashi T, et al., Effects of the CYP2D6*10 alleles and co-medication with CYP2D6-dependent drugs

on risperidone metabolism in patients with schizophrenia. Hum Psychopharmacol. 2009 ;24 (4): 301-8.

Yüksel N (2000) Birinci basamakta depresyon tanı ve tedavi Çizgi Tıp Yayınevi Ankara s.218:221-222.

Yüksel N (1998) Psikofarmakoloji: içinde Psikotrop ilaç etkileşimleri. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, s.371-412.

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004;369 (1): 23-37.

Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. Clin Pharmacokinet. 2009;48(11):689-723.

7. EKLER

EK 1


MANİSA
CELAL BAYAR
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Safa Can POLAT'ın Tez Konusu Hk.

SBE TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 23.02.2018 tarih ve 8/8 sayılı yönetim kurulu toplantısında, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 151353001 numaralı yüksek lisans programı öğrencisi Safa Can POLAT'ın tez konusunun etik kurul onayı alınması kaydı ile "**Nöropsikiyatrik Hastalarda CYP2D6 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması**" olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi. Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ
Enstitü Müdürü

13/04/2018 Bilgisayar İşletmeni
13/04/2018 Şef
13/04/2018 Enstitü Sekreteri

Bilal SEKİN
Birsen KARAN
Aynur PALAMUTÇUOĞLU

EK 2

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı: Nöropsikiyatrik hastalarda CYP2D6 gen polimorfizmlerinin araştırılması

Tezime ilişkin 01/02/2019 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

05/02/2019

Adı Soyadı : Safa Can POLAT
Öğrenci No : 151353001
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Programı : Tıbbi Biyoloji

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
Prof. Dr. F. Sirri ÇAM

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreci içerisinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süreç gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

EK 3

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	18 / 04 / 2018/ 20.478.486 -		
ARAŞTIRMANIN ADI	Nöropsikiyatrik hastalarda CYP2D6 gen polimorfizmlerinin araştırılması		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. F. Sırrı ÇAM - Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Tıbbi Biyoloji YL Öğrencisi Safa Can POLAT		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐	YÜKSEK LİSANS-DOKTORA-TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	08 / 03 / 2018 / Tarih ve 13898 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.		
Unvan/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvan/Adı/Soyadı
Prof. Dr. Zeki ARI Tıbbi Biyokimya AD	☒	☐	Doç. Dr. Sendar TOK Spor Bilimleri Fakültesi
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD	☒	☐	Dr. Öğr. Üyesi Selim ALTAN Tıbbi Etik AD
Prof. Dr. Betül ERSOY Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	☒	☐	Dr. Öğr. Üyesi Nurgül Güngör TAVŞANLI Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü
Doç. Dr. Beyhan Cangiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD	☒	☐	Mukadder YILMAZER Avukat
Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD	☒	☐	Sivil Üye Hüseyin TUNÇAY
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. <u>Araştırmanız Her Hangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme - Denetleme" Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir.</u> Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname - Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim. Prof. Dr. Zeki ARI Başkan			

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı	SAFA CAN	Soyadı	POLAT
Doğum Yeri	ÜZÜMLÜ	Doğum Tarihi	29.09.1989
Uyruğu	T.C	Telefon	0530 521 24 24
E-mail	safacanpolat@gmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2015-Devam etmekte
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2010 – 2013
Ön Lisans	Atatürk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü	2007– 2009
Lise	Erzincan Tarım Meslek Lisesi, Laborant Bölümü	2003-2007

İş Deneyimi Görevi	Kurum	Süre	Yer
Laborant	Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi	Ağustos 2009 – Devam etmekte	Kütahya

Eğitimler/Sertifikalar

- 01.12.2015 İş Sağlığı ve Güvenliği İşe Başlama Eğitimi Katılım Sertifikası.

Dumlupınar Üniversitesi

- 09.02.2016 Deney Hayvanları Kullanma Sertifikası

Dumlupınar Üniversitesi

Bilgisayar Bilgisi

- Microsoft Office Programları
- Adobe Photoshop CS6

Eğitim Sınav Sonuçları

- Lisans Bitirme Puanı: 2.46 / 4.00, 21.08.2013
- Ön Lisans Bitirme Puanı: 3.26 / 4.00, 18.12.2009
- Lise: Bitirme puanı: 84.0 / 100, 15.06.2007