

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**CYP2C9 ve VKORC1 GENETİK POLİMORFİZMİNİN TÜRK
TOPLUMUNDAKİ WARFARİN KULLANAN ÇOCUKLARDA
DOZ GEREKSİNİMLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Birce Dilge TAŞKIN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Serdar KULA

ANKARA
AĞUSTOS 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**CYP2C9 ve VKORC1 GENETİK POLİMORFİZMİNİN TÜRK
TOPLUMUNDAKİ WARFARİN KULLANAN ÇOCUKLARDA
DOZ GEREKSİNİMLERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Birce Dilge TAŞKIN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Serdar KULA

ANKARA

AĞUSTOS 2012

T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Odyoloji ve Konuşma Ses Bozuklukları Programı çerçevesinde, Hasan Şahin tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07 Temmuz 2012

“Yaşa Bağlı İşitme Kayıplarında İşitme Cihazı Kullanımının İşitsel Algı ve Yaşam Kalitesi Üzerine Etkileri”

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Erdiñ AYDIN

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

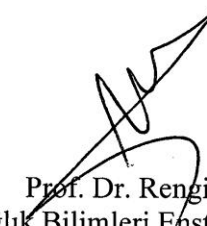
Prof. Dr. Erol BELGİN

Prof. Dr. Levent ÖZLÜOĞLU

Doç. Dr. Erdiñ AYDIN

Yrd. Doç. Dr. Özgöl AKIN ŞENKAL

ONAY: Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun 03/03./2012 tarih, 02 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Rengin Erdal
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

İÇİNDEKİLER.....	i
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. HEMOSTAZ.....	4
2.1.1. Primer hemostaz.....	5
2.1.2. Sekonder hemostaz	6
2.1.2.1. Ekstrensek yol	6
2.1.2.2. İntrensek yol	6
2.1.2.3. Ortak yol.....	7
2.1.3. Tersiyer hemostaz (Fibrinolitik sistem)	8
2.1.4. Antikoagülan mekanizma	8
2.1.5. Pıhtılaşma testleri	9
2.2. PEDİATRİK HASTALARDA ANTİTROMBOTİK TEDAVİ.....	10
2.2.1. Antikoagülan ilaçlar	11
2.2.1.1. Heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparin	11
2.2.1.1.1. Heparin	11
2.2.1.1.2. Düşük moleküler ağırlıklı heparin	13
2.2.1.2. Oral antikoagülanlar	14
2.2.1.2.1. Kumarinler	14
2.2.1.2.1.1. Warfarin	16

2.2.1.2.1.2. Asenokumarol	18
2.2.1.2.1.3. Fenprokumon	19
2.2.1.2.2. Warfarin tedavisinde doz ayarlama	19
2.2.1.2.3. Çocuklarda warfarin tedavi endikasyonları	21
2.2.1.2.3.1. Venöz tromboembolizm (VTE)	21
2.2.1.2.3.2. Mekanik prostatik kalp kapağı	22
2.2.1.2.3.3. Fontan Operasyonu	22
2.2.1.2.3.4. Endovasküler stentler	22
2.2.1.2.3.5. Santral venöz kateter	23
2.2.1.2.3.6. Serebral tromboemboli.....	23
2.2.1.2.3.7. Dilate Kardiyomiyopati (DKMP)	23
2.2.1.2.3.8. Koroner anevrizmanın eşlik ettiği Kawasaki Hastalığı	24
2.2.1.2.3.9. Purpura Fulminans	24
2.2.1.2.4. Warfarin tedavisi komplikasyonları	24
2.2.1.2.5. Warfarin komplikasyonlarında yaklaşım.....	25
2.2.1.2.6. Warfarin biyoyararlanımını etkileyen faktörler.....	26
2.2.1.2.6.1. Warfarin ile ilaç etkileşimleri	27
2.2.1.2.6.2. Warfarin ile gıda etkileşimleri	29
2.3. FARMAKOGENETİK NEDİR?	31
2.4. SİTOKROM P450 2C9 (CYP2C9)	34
2.5. VİTAMİN K EPOKSİT REDÜKTAZ KOMPLEKS SUBÜNİT 1 (VKORC1).....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	42
3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARI.....	42
3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	43

3.2.1. Periferik kandan genomik DNA izolasyonu	43
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP).....	44
3.2.3. İdeal warfarin dozu hesaplama	51
3.2.4. INR takibi.....	52
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	53
4. BULGULAR	54
4.1. KONTROL GRUBUNUN UYGUNLUĞUNUN SAPTANMASI.....	54
4.2. KONTROL VE HASTA GRUPLARININ DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ	54
4.3. GENETİK POLİMORFİZM SIKLIKLARI.....	55
4.4. ALLEL FREKANSI DAĞILIMI	59
4.5. İDEAL DOZ-VERİLEN DOZ KARŞILAŞTIRMASI	59
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇLAR	76
7. KAYNAKLAR.....	78
8. ÖZET.....	93
9. SUMMARY	96
10. ÖZGEÇMİŞ.....	98

KISALTMALAR

INR	: International normalized ratio
CYP2C9	: Sitokrom P450 2C9
VKORC1	: Vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1
NO	: Nitrik oksit
vWF	: von Willebrand Faktör
GP	: Glikoprotein
TXA₂	: Tromboksan A ₂
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
F X	: Faktör X
F III	: Faktör III
TNF α	: Tümör nekrozis faktör alfa
IL 6	: İnterlökin 6
F VII	: Faktör VII
F VIIa	: Aktive Faktör VII
F IX	: Faktör IX
F Xa	: Aktive Faktör X
F V	: Faktör V
F XII	: Faktör XII
F XIIa	: Aktive Faktör XII
F XI	: Faktör XI
F XIa	: Aktive Faktör XI
F IXa	: Aktive Faktör IX
F Xa	: Aktive Faktör X
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
AT III	: Antitrombin III
aPTT	: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
PT	: Protrombin zamanı
VTE	: Venöz tromboembolizm
DVT	: Derin ven trombozu

PE	: Pulmoner emboli
BT	: Bilgisayarlı tomografi
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
DMAH	: Düşük moleküler ağırlıklı heparin
PC	: Protein C
PS	: Protein S
TDP	: Taze donmuş plazma
CYP1A1	: Sitokrom P 450 1A1
CYP1A2	: Sitokrom P 450 1A2
CYP2C19	: Sitokrom P 450 2C19
CYP3A4	: Sitokrom P 450 3A4
CYP4F2	: Sitokrom P 450 4F2
DKMP	: Dilate kardiyomiyopati
GGCX	: Gama-glutamil karboksilaz
APOE	: Apolipoprotein E
CALU	: Kalumenin
EPHX1	: Mikrozomal epoksit hidrolaz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
BÇ	: Baz çifti

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1.	Pediatric hastalarda oral antikoagulan tedavi protokolü	20
Tablo 2.	Warfarin ilişkili kanama sınıflandırması (Makris ve Watson)	25
Tablo 3.	İngiltere'deki warfarine bağlı kanamada tedavi yaklaşımı	26
Tablo 4.	Amerika Birleşik Devletleri'ndeki warfarine bağlı kanamada tedavi yaklaşımı	26
Tablo 5.	Warfarin-ilaç etkileşimleri	28
Tablo 6.	Kullanılan diğer ilaçların warfarin doz ihtiyacına etkisi	29
Tablo 7.	Warfarin metabolizmasında yer alan sitokrom P450 enzimlerini etkileyen gıdalar	30
Tablo 8.	Trombosit agregasyonunu inhibe ederek warfarin etkisini değiştiren gıdalar	31
Tablo 9.	Majör sitokrom P450 enzimlerinin özellikleri	36
Tablo 10.	CYP2C9'un ilaçlarla ilgisi	37
Tablo 11.	CYP2C9 polimorfizmlerinin etnik kökenlere göre farklılıkları	38
Tablo 12.	VKORC1 gen polimorfizminin etnik gruplara göre sıklıkları	40
Tablo 13.	PZR reaksiyonlarının termal döngü cihazındaki derece, süre ve döngü sayıları	45
Tablo 14.	PZR reaksiyonları derece, süre ve döngü sayıları	49
Tablo 15.	Kontrol Grubu İçerisinde Her Bir Gen Bölgesinde Genotip Dağılımlarına İlişkin Hardy-Weinberg Dengesine Ait Uyum Analizi Sonuçları	54
Tablo 16.	Kontrol ve Hasta Gruplarındaki Olguların Demografik Özellikleri	55
Tablo 17.	Kontrol ve Hasta Gruplarına Göre Her Bir Gen Bölgesi İçerisinde Genotipler Yönünden Olguların Dağılımı	56

Tablo 18.	Hasta ve kontrol gruplarında CYP2C9*2 ile CYP2C9*3 birlikte ele alındığında saptanan genetik polimorfizm sıklıkları.....	57
Tablo 19.	Tüm Olgular İçerisinde Her Bir Gen Bölgesine Göre Genotipler Yönünden Olguların Dağılımı.....	58
Tablo 20.	Tüm Olgular İçerisinde CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 Gen Etkileşimine Göre Olguların Frekans Dağılımı.....	58
Tablo 21.	Kontrol ve Hasta Gruplarına Göre Her Bir Gen Bölgesi İçerisinde Allel Frekansı Yönünden Olguların Dağılımı	59
Tablo 22.	Tüm Olgular İçerisinde ve Genotiplere Göre İdeal Doz ile Verilen Doz Ortalamalarının Karşılaştırılması.....	60
Tablo 23.	Tüm Olgular İçerisinde ve Genotiplere Göre İdeal Doz ile Verilen Doz Düzeylerine Ait Uyum Analizi Sonuçları.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1.	Warfarinin VKORC1 vasıtasıyla koagülasyona etkisi	2
Şekil 2.	Primer ve sekonder hemostaz	4
Şekil 3.	Pıhtılaşma kaskadı	7
Şekil 4.	Vitamin K epoksit döngüsü	16
Şekil 5.	Warfarin etki mekanizması	16
Şekil 6.	Warfarin sodyumun kimyasal yapısı	17
Şekil 7.	Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemi yapısı	34
Şekil 8.	Sitokrom P450 familyaları ve metabolize ettikleri ilaç oranları	36
Şekil 9.	Agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra CYP2C9 geni *2 alleleline ait kesim ürünleri	46
Şekil 10.	Agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra CYP2C9 geni *3 alleleline ait kesim ürünleri	47
Şekil 11.	Agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra VKORC1 geni -1639 bölgesine ait kesim ürünleri	48
Şekil 12.	CYP2C9 geni *2 bölgesine ait homozigot normal sonucunun Real time PZR görüntüsü	49
Şekil 13.	CYP2C9 geni *3 bölgesine ait mutant tip sonucunun Real time PZR görüntüsü	50

1. GİRİŞ

Warfarin onlarca yıldır tüm dünyada venöz ve arteriyel tromboembolik olayların profilaksi ve tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçtır. Dar terapötik aralığına, kullanımı sırasında yüksek oranda kanama komplikasyonlarının ortaya çıkmasına ve doz ayarlaması kişiden kişiye çok değişkenlik göstermesine rağmen reçete edilme sıklığı özellikle sanayileşmiş ülkelerde gittikçe artmaktadır. Oral alım kolaylığı ve düşük fiyat bunun nedenidir (1, 2, 3).

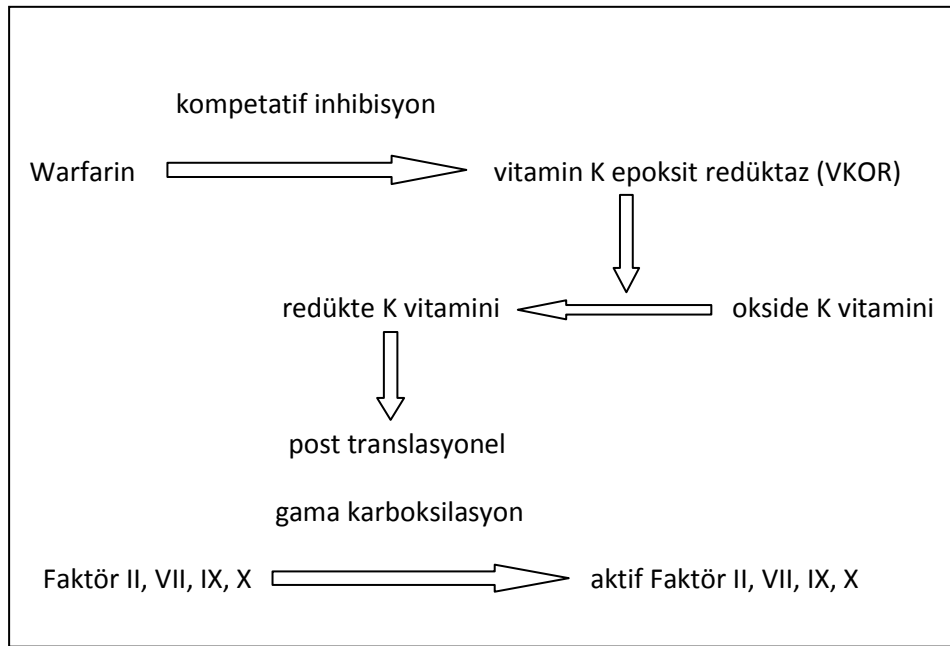
Warfarin etkinliğini ve güvenilir doz aralığını elde etmek ve takip edebilmek amaçlı INR (international normalized ratio) ölçümleri kullanılmaktadır. INR'nin terapötik doz aralığının altında olması tromboembolik olaylara, üstünde olması ise kanama komplikasyonlarına yol açmaktadır. Dünya çapında warfarin ile kronik antikoagülan tedavi alan hastalarda %7,6-16,5 kanama komplikasyonu görülmektedir. Batılı ülkelerde ise hastalarda %1,3-2,7 majör kanamaya rastlanmaktadır (1, 2, 3).

Warfarin doz ayarlamasında yaş, kilo, boy, vücut alanı, cinsiyet gibi bilinen faktörlerin etkisinin yanı sıra sitokrom P450 2C9 (CYP2C9) ve vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1 (VKORC1) genetik polimorfizminin etkisi yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (2).

Warfarinin eliminasyonunda karaciğerde bulunan mikrozomal enzimlerden sitokrom P450 2C9 (CYP2C9) görev almaktadır. CYP2C9, homozigot normal (CYP2C9*1) dışında saptanan 2 allelik varyanta daha sahiptir: CYP2C9*2 ve CYP2C9*3. CYP2C9*2'de 144. amino asit olan arjinin yerine

sistein, CYP2C9*3'de ise 359. amino asit olan izolösin yerine lösin bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda CYP2C9*3 allelik varyantına sahip kişilerde eliminasyon en yavaş ve dolayısıyla warfarin ihtiyacı en azdır. CYP2C9*2 allelik varyantına sahip kişilerde ise doz ihtiyacı orta derecede azalmıştır (2, 3).

Pıhtılaşma faktörlerinden II, VII, IX, X aktif hale gelebilmek için post-translasyonel gama karboksilasyona ihtiyaç duyarlar. Gama karboksilasyonun gerçekleşebilmesi için de okside K vitamininin, redükte K vitaminine dönüşmesi gerekmektedir. Bu dönüşümü yapan enzim vitamin K epoksit redüktaz (VKOR)'dır. Warfarin de antikoagülan etkisini bu enzimde kompetatif inhibisyon yaparak gerçekleştirir (1, 2, 4, 5) (Şekil 1).



Şekil 1. Warfarinin VKORC1 vasıtasıyla koagülasyona etkisi

VKOR, VKORC1 (vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1) geni tarafından kodlanır. VKORC1 geninin -1639. kodonunda meydana gelen yanlış anlamlı (missens) mutasyon sonucu warfarin duyarlılığı ve dolayısıyla da doz

gereksinimi değişmektedir. Homozigot normal VKORC1 (GG)'ye ek olarak ortaya çıkan polimorfizmler: VKORC1 (GA) ve VKORC1 (AA) dır. Yapılan alışmalarda VKORC1 (AA) polimorfizmine sahip kişilerin; warfarine en duyarlı ve sonuç olarak en az doza ihtiyaç duyan, VKORC1 (GA)'ya sahip kişilerin de orta derecede daha az doza ihtiyaç duyan kişiler olduğu gösterilmiştir (1, 2, 4, 5).

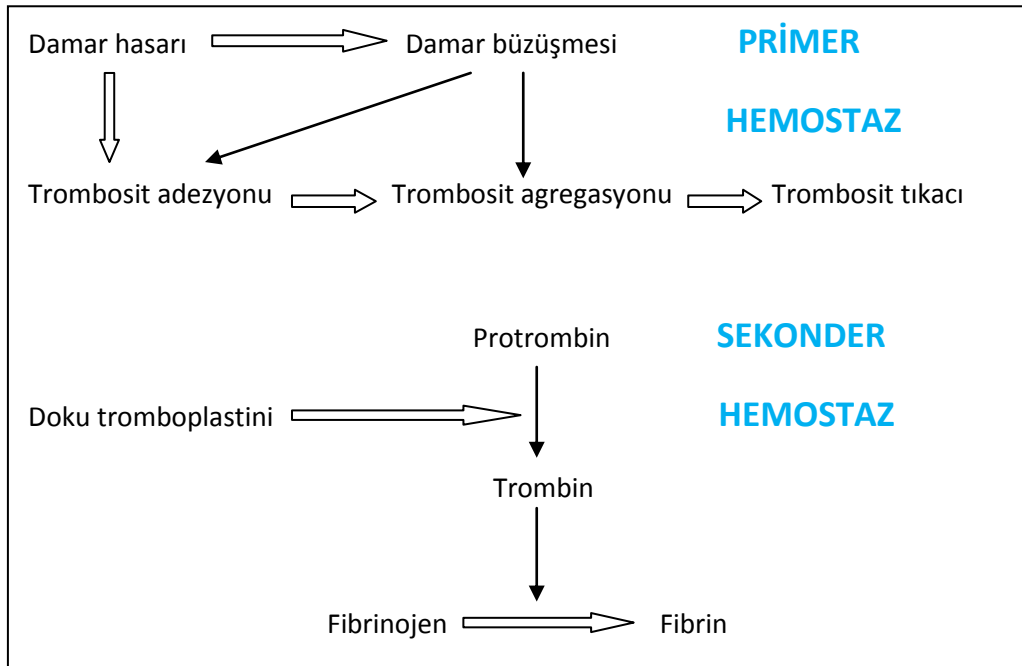
Çalışmamızda, CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizminin Türk toplumundaki pediatrik yaş grubunda sıklıklarının saptanması, warfarin doz ayarlamasında genetik polimorfizmin göz önünde bulundurulması ve sonuç olarak da bu kadar sık kullanılan bir ilacın kanama komplikasyonlarının en düşük seviyelere indirilmesi amaçlanmaktadır. Klinisyenlere warfarin doz ayarlaması konusunda katkıda bulunmak hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEMOSTAZ

Hemostaz vasküler hasarın olduğu bölgede koagülasyonun gelişimi ve hasar alanları ile sınırlı kaldığı dinamik bir süreçtir. Hemostaz iç içe geçen birkaç mekanizma ile sağlanır. Bunlar;

1. Trombositler ile geçici trombosit tıkaçı oluşumu (primer hemostaz)
2. Koagülasyon faktörleri ile kalıcı fibrin tıkaçı oluşumu (sekonder hemostaz)
3. Fibrinolitik mekanizma (tersiyer hemostaz) (6).



Şekil 2. Primer ve sekonder hemostaz

2.1.1. Primer hemostaz

Damar hasar gördükten 1-2 saniye sonra vazokonstriksiyon gelişir. Yavaşlayan kan akımı sonucu trombositlerin endotel ile teması artar ve hemostatik tıkaç oluşur. Bu aşama üçe ayrılır;

1. Trombosit adezyonu: Normalde endotelde sentezlenen nitrik oksit (NO) ve prostoglandin I₂ trombositlerin endotele yapışmasını önler. Damar hasar gördüğünde dolaşımdaki trombositlerin reseptörleri aracılığıyla zedelenen endotele yapışmalarına **adezyon** adı verilir. Damar zedelenmesi sonucu trombositler, von Willebrand Faktör (vWF) ve buna özgü bir reseptör olan trombosit glikoprotein (GP) Ib/IX kompleksi ile subendotelyal bölgedeki kollajen ve fibronektine bağlanarak bölgeye yayılırlar (6, 7).

2. Sekresyon: Trombositlerin yüzeyindeki kollajen reseptörleri olan GP IIb/IIIa aktive olur ve böylece tromboksan A₂ (TXA₂) ve trombosit aktive edici faktörün (PAF) salgılanması gerçekleşir (6, 7).

3. Trombosit agregasyonu: Trombosit aktivasyonu GP IIb/IIIa üzerindeki fibrinojen reseptörlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Fibrinojenler bu reseptöre bağlanarak trombositlerin birbirine yapışarak agregasyonu oluşturmalarına ve böylece trombosit tıkaçının büyümesine ve sağlamlaşmasına neden olurlar. Trombosit tıkaçı sağlam değildir. Sekonder hemostaz ile kalıcı fibrin tıkaçı oluşur (6, 7).

2.1.2. Sekonder hemostaz

Damar zedelenmesi ya da dolaşımda bulunan özel aktivatörlerin etkisi ile protrombin aktivatörü oluşur. Protrombinin trombine çevrilmesine neden olur. Protrombin aktivatörü üç yolla oluşur;

1. Damar duvarı zedelenmesi sonucu doku tromboplastini salınmasıyla başlayan '**ekstresek yol**'
2. Kanın kollajenle teması sonucu başlayan '**intresek yol**'
3. Faktör X'un (F X) katkısı ile protrombinden trombinin geliştiği '**ortak yol**' (6)

2.1.2.1. Ekstresek yol

Zedelenen dokudan doku tromboplastini (Faktör III) açığa çıkar. Doku tromboplastini endotel hücreleri, subendotelyal doku ve monositler tarafından sentezlenir, tümör nekrozis faktör alfa (TNF α), interlökin 6 (IL-6) gibi sitokinler tarafından regüle edilir. Bu kompleks fosfolipidler ve glikoprotein içerir. Doku glikoprotein kompleksine faktör VII (F VII)'nin bağlanması sonucu aktive faktör VII (F VIIa) oluşur. İkisi birlikte faktör IX (F IX)'u aktive ederken bir yandan da doku fosfolipidleri aracılığıyla aktive faktör X (F Xa) oluşumunu sağlar. F Xa, doku tromboplastini fosfolipidleri, kalsiyum ve faktör V (F V) ile protrombin aktivatörünü oluşturur. Bu olay sonucunda protrombin trombine dönüşür (6, 7) (Şekil 3).

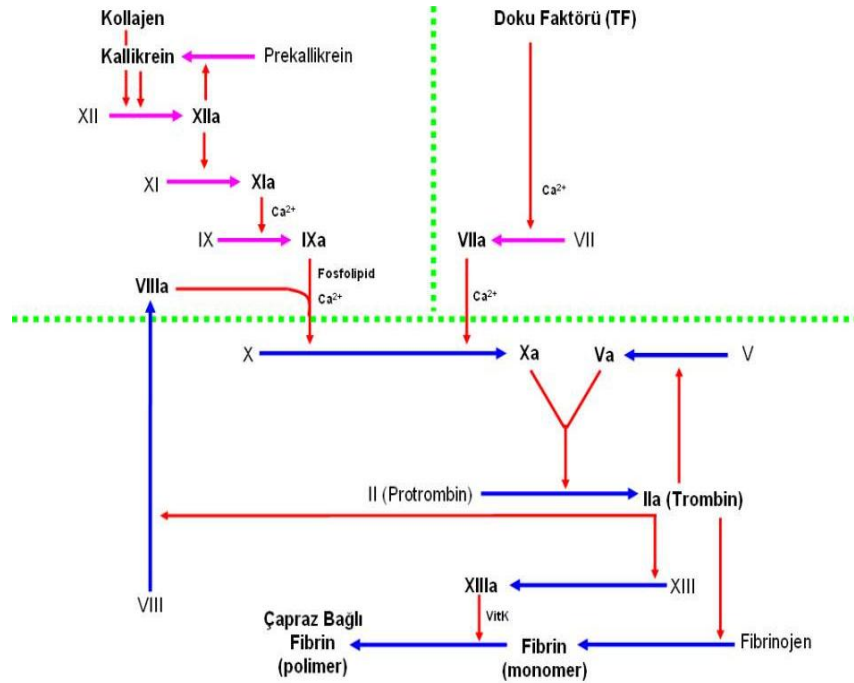
2.1.2.2. İntresek yol

Kanın kollajenle teması sonucu faktör XII (F XII), aktive faktör XII (F XIIa)'ye dönüşür. F XIIa, enzimatik etkiyle faktör XI (F XI)'i aktive faktör XI (F

XIa)'e çevirir. Bu reaksiyon için yüksek moleküler ağırlıklı kininojene ihtiyaç vardır. Prekallikrein de reaksiyonu hızlandırıcı rol oynar. F XIa, faktör IX'u aktive ederek aktive faktör IX (F IXa)'u oluşturur. F IXa kalsiyum, faktör VIII ve trombosit fosfolipidleriyle birlikte faktör X'u aktive eder. Aktive faktör X (F Xa) faktör V (F V) ve trombosit fosfolipidi ile birleşerek protrombin aktivatörü kompleksi oluşumunu sağlar (6, 7) (Şekil 3).

2.1.2.3. Ortak yol

Her iki yol sonucunda oluşan protrombin aktivatörünün etkisiyle protrombin trombine dönüşür. Trombin fibrinojen üzerine etki ederek fibrin monomerlerinin oluşumunu sağlar. Fibrin monomeri polimerize olarak fibrin polimerini oluşturur. Pıhtı fibrin iplik ağı ve aralara tutunmuş kan hücreleri, plazma ve trombositlerden oluşur (6, 7) (Şekil 3).



Şekil 3. Pıhtılaşma kaskadı (8)

Trombin hem trombotik hem de antitrombotik etki gösterir. Trombotik etkisi sonucunda intrinsek ve ekstrinsek yolların aktivasyonu ile fibrinojenden fibrin oluşumunda rol alır. Trombosit agregasyonu, F V, F VIII ve F XIII'ün aktivasyonuna katkıda bulunur. Antikoagülan olarak da antikoagülan ajanlar protein C ve S'i aktive eder. Protein C ve S ise F V ve F VIII'i aktive ederek trombin yapımını sınırlandırır (6).

2.1.3. Tersiyer hemostaz (Fibrinolitik sistem)

Fibrinolitik sistem pıhtının daha fazla büyümesini sınırlandırıp, erimesini sağlar. Pıhtılaşma kaskadının aktivasyonu ile birlikte endotelden doku plazminojen aktivatörü (tPA) salınır. Ürokinaz, F XII, kallikrein de tPA gibi plazminojeni aktive eder. Aktive olan plazminojen plazmine dönüşür. Plazmin fibrini parçalar ve pıhtı erir. Buna **fibrinolizis** adı verilir (6, 7).

2.1.4. Antikoagülan mekanizma

Kanın pıhtılaşması koagülasyonu hızlandıran prokoagülanlar ile koagülasyonu inhibe eden antikoagülanlar arasındaki dengeye bağlıdır. Primer hemostaz aşamasında trombositlerin etkisini inhibe eden en önemli faktörler bradikinin ve endotel hücreleri tarafından salınan prostasiklin ve nitrik oksittir. Trombosit fonksiyonlarını inhibe eden ilaçlar aspirin ve GP IIb/IIIa antagonistleridir (6).

Sekonder hemostazda en önemli antikoagülan antitrombin III (AT III)'dür. Faktör II, IX, X, XI ve XII gibi birçok aktive koagülan proteinleri inaktive eder.

AT III'ün trombine bağlanmasını heparin arttırır. Doku faktör yolu inhibitörü doku faktör yolunu inhibe edip, aktive faktör X ve VII'nin işlevini sınırlandırır. Trombin kendi kendisinin antagonistidir. Endotel hücreesindeki trombomodüline bağlanarak antikoagulan ajanlar olan protein C ve S'i aktive eder. Protein C karaciğerde sentezlenir ve F V ve F VIII'i inhibe eder. Protein S ise protein C'nin etkisini arttırır (6).

2.1.5. Pıhtılaşma testleri

Kanama zamanı: Trombosit fonksiyonlarını ve damar duvarıyla olan etkileşimlerini değerlendirir. Normal değeri 4-8 dakikadır.

Trombosit fonksiyon analizi: Yırtılma, kollajen bağlanması, vWF aracılı adezyon ve trombosit fonksiyon bozukluklarını değerlendirmek amacıyla kullanılır.

Trombosit sayısı: Çocuklarda en yaygın edinsel kanama diyatezi trombositopenidir. Genellikle trombosit sayısı 50 000/mm³'ün altına düşmediği sürece ciddi bir kanama problemi gözlenmez. Trombositoz ise genellikle reaktiftir.

Aktive edilmiş parsivel tromboplastin zamanı (aPTT): Pıhtılaşmanın F XII seviyesinden itibaren pıhtı noktasına gelmesini ölçer. Normal aralığı yaşa göre ve bir laboratuvardan diğerine değişkenlik göstermektedir. Bir yaşından sonra normal aralığı ortalama 26- 36 sn'dir.

Protrombin zamanı (PT): Pıhtılaşmanın F VII seviyesinden itibaren ekstresek yolunu ölçer. Normal aralığı 10-13 sn'dir. Protrombin zamanı, internatinal normalised ratio (INR) ile standardize edilmiştir.

Trombin zamanı: Pıhtılaşma kaskadında fibrinojenin fibrine dönüştüğü en son basamağı ölçer. Normal aralığı laboratuvaradan laboratuvara değişmekle beraber ortalama 11-15 sn'dir (9).

2.2. PEDIATRİK HASTALARDA ANTİTROMBOTİK TEDAVİ

Arterlerin ve venlerin çeperinde ve içinden kan dolaşan yapay yüzeylerde trombüs (damar içi pıhtı) oluşmasını ve gelişmesini engelleyen, oluşmuş pıhtıyı eriten ilaçlara **antitrombotik ilaçlar** denilir (10).

Antitrombotik tedavi üç gruba ayrılmaktadır.

- Antikoagulan tedavi
- Antitrombositik tedavi
- Trombolitik tedavi

Yetişkinlerdeki antitrombotik ilaç kullanımı ile pediatrik yaş grubundaki antitrombotik ilaç kullanımı arasında önemli değişkenler vardır.

1. Pediatrik yaş grubundaki tromboemboli nedenleri ile yetişkinlerdeki tromboemboli nedenleri birbirinden farklıdır.
2. Hemostatik sistem dinamik, değişen bir sistem olduğundan çocuklarda terapötik ajanlara karşı cevap da zaman içinde değişmektedir.
3. Antitrombotik ilaçların dağılım, bağlanma ve eliminasyonu yaşa bağlı olarak değişir.
4. Yaşa bağlı olarak hastanın ek hastalıkları ve aldığı diğer tedaviler değişmektedir.
5. Pediatrik yaş grubunda tanı için yapılan girişimlerde genel anestezi ihtiyacı bulunmaktadır ve bu da tanıyı koymakta zorluk oluşturmaktadır.

6. Pediatrik hastalarda vasküler girişim erişkinlere oranla daha zordur.
7. Antitrombotik ilaçlarda pediatrik hastalara spesifik formüller bulunmamaktadır (özellikle K vitamini antagonistleri ve düşük moleküler ağırlıklı heparin).
8. Diyetteki farklılıklar, oral antikoagülan alımını zorlaştırmaktadır. Özellikle anne sütü ve hazır mamalarda farklı K vitamini düzeyleri bulunmaktadır.
9. Pediatrik yaş grubunda çoğunlukla tedavi aile tarafından uygulandığından ailenin bilinç düzeyi de direk olarak tedaviyi etkilemektedir (11).

2.2.1. Antikoagülan ilaçlar

Antikoagülan faktör etkinliğini arttırarak, pıhtılaşma faktörlerinin etkinliğini ya da sentezini bozarak pıhtılaşmayı inhibe eden ve böylece kanın koagülasyon yeteneğini azaltan ilaçlardır (10). Özellikle venöz trombüslerde etkilidirler. Antikoagülan ilaçlar ikiye ayrılırlar:

1. Heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparin
2. Oral antikoagülanlar

2.2.1.1. Heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparin

2.2.1.1.1. Heparin

Anfraksiyone heparin, diğer adıyla standart heparin, pediatrik yaş grubunda sık kullanılan bir antikoagülan ajandır (12).

Heparin molekülünün antikoagülan etkisi için bir plazma faktörü olan antitrombine (AT) gereksinim duyulur. Heparindeki pentasakkarit zinciri yoluyla molekül AT ile bağlanır. Antitrombin yoluyla faktör Xa' yı inaktive eder. Diğer

bir mekanizma olan heparin kofaktör II aracılığıyla trombini inaktive eder. Heparin AT aracılığı ile etki yaptığından bir indirekt trombin inhibitörü olarak kabul edilmektedir. Heparin-AT kompleksi trombin yanında, FXIa, FXa ve FIXa'yı da inhibe etmektedir (13, 14).

Yenidoğanlarda plazma AT konsantrasyonları fizyolojik olarak düşüktür. Ancak üç aylıkken erişkin düzeye ulaşır (15).

Heparin tedavisinin izlenmesi başlıca aPTT (aktive parsiyel tromboplastin zamanı), daha yüksek dozlar gerektiğinde protamin sülfat titrasyon testi ya da anti-faktör Xa testi ile yapılır. Venöz tromboemboli (VTE) olgularında kritik tedavi edici heparin düzeyi aPTT ile ölçüldüğünde ilk 24 saat içinde hastanın kontrol değerinin ya da normal aPTT' nin üst değerinin 1,5 katına ulaşmalıdır. Bu değerdeki antikoagülan yanıt protamin sülfat titrasyon testi ile 0,2-0,4 U/ml'ye, anti-faktör Xa düzeyi ile 0,35-0,7 U/ml'ye karşılık gelir (16). Venöz tromboembolizm olgularında ilk 24 saat içinde tedavi eden düzeye ulaşılabilmesi tekrarlayan tromboemboli riskini arttırmaktadır (13, 14). Pediatrik hastalarda, özellikle yenidoğanlarda, ilk bakılan aPTT düzeyleri erişkinlere oranla daha yüksektir (17).

Pediatrik hastalarda heparin doz ayarlaması kilo baz alınarak hazırlanmış bir normogram ile yapılır (17). Hastaların %90'ında 75-100 U/kg bolus doz ile başlangıç sonucu terapötik aPTT düzeylerine ulaşılır. İdame heparin dozu ise yaş bağımlıdır. İki aydan küçük hastalarda ortalama 28 U/kg/saat, bir yaşından büyük çocuklarda ise ortalama 20 U/kg/saat, büyük çocuklarda yetişkinlere benzer şekilde 18 U/kg/saat idame heparin dozlarıdır (18).

Heparin tedavisinin komplikasyonlarından en sık görülenler; kanama, osteoporoz ve trombositopenidir (11). Derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner

emboli (PE) nedeniyle heparin tedavisi almakta olan çocuklarda kanama komplikasyonu %1,5 oranında görülmektedir (19).

Heparin tedavisine bağlı oluşan kanama komplikasyonlarının tedavisinde intra venöz (IV) protamin sülfat verilmektedir. Heparin aktivitesini hızlıca nötralize eder. Protamin sülfat, 10 mg/ml konsantrasyonunda 5 mg/dk hızını geçmeyecek şekilde verilmelidir (11).

2.2.1.1.2. Düşük moleküler ağırlıklı heparin

Düşük moleküler ağırlıklı heparin (DMAH), pediatrik hastalarda venöz tromboemboli (VTE) primer profilaksisi ve tedavisinde tercih edilen bir ajandır.

Diğer antikoagülanlara göre avantajları; minimal laboratuvar izlemine ihtiyaç duyulması, diyet ve alınan diğer ilaçlardan etkilenmemesi, osteoporoz ya da trombositopeni yan etkisinin heparine oranla çok daha az görülmesi, daha uzun yarı ömürlü olması, derialtına günde bir ya da iki kez uygulama kolaylığı, tedavinin ayaktan uygulanabilmesi, çoğu olguda hospitalizasyonu gereksiz kıldığından pahalı olmalarına karşın maliyet açısından daha etkin olmasıdır (19, 20, 21).

Anfraksiyone heparin gibi faktör Xa' yı inaktive eder. Plazma proteinlerine daha az bağlandığı için, daha düşük dozda daha belirgin etki gösterir. DMAH'lerin düşük dozda subkutan biyoyararlanımı %100 olup plazma proteinlerine daha az bağlandığı için anfraksiyone heparin ile karşılaştırıldığında uygulanan doza göre yanıt ilişkisi daha belirgindir (13, 14). Eliminasyon yarı ömrü subkutan uygulama sonrası 3-6 saattir, dozdan bağımsızdır. DMAH'ler profilaksi amacıyla sabit dozda, tedavi amacıyla ise vücut ağırlığına göre uygulanır. Laboratuvar izlemi genellikle gerekli değildir. Ancak izlem amacıyla anti-faktör Xa

testi uygulanabilir. Uygulama sonrası anti-faktör Xa aktivitesi ortalama 4 saatte pik yapar ve bu izlem yapılacağı zaman önerilen dönemdir (13, 14).

Reviparin, enoxaparin, dalteparin, tinzaparin farklı DMAH'lerdir. Hepsinin tedavi ve profilaksi dozları birbirinden farklı olmakla birlikte yaş grubuna ve kiloya göre ayarlanır (11).

Düşük moleküler ağırlıklı heparinin en sık komplikasyonu kanamadır. Kanama için protamin sülfat tedavisi kullanılır. Osteoporoz ve trombositopeni komplikasyonuna ait herhangi bir veri bulunmamaktadır (11).

2.2.1.2. Oral antikoagülanlar

Oral antikoagülanlar, antikoagülan etkilerini plazma K vitamini bağımlı faktör düzeylerini (faktör II, VII, IX, X) azaltarak gösterdiklerinden dolayı, **K vitamini antagonistleri** olarak da adlandırılırlar.

Kimyasal yapılarına göre iki alt gruba ayrılırlar:

- Kumarin türevleri; warfarin, dikumarol, asenokumarol, fenprokuman
- İndandion türevleri; fenindion, difenindion (22).

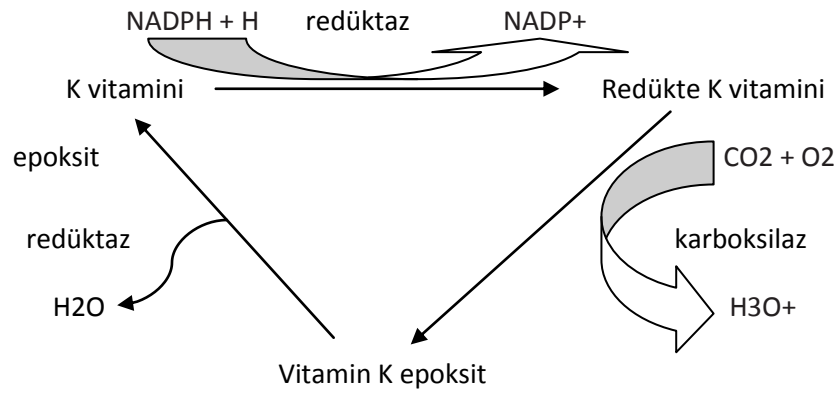
2.2.1.2.1. Kumarinler

Kumarinler oral antikoagülanların en sık kullanılanları olmakla beraber warfarin bütün dünyada en yaygın kullanılan K vitamini antagonistidir. Oral antikoagülan kullanımı üzerine yapılan çalışmaların çoğu warfarin üzerinedir (23, 24) Asenokumarolun Fransa, İtalya, Hollanda ve İspanya gibi bazı Avrupa ve Güney Amerika ülkelerinde kullanımı yaygınlaşmıştır (23, 25) Fenprokumon, özellikle Almanya'da tercih edilen bir oral antikoagülandır (26).

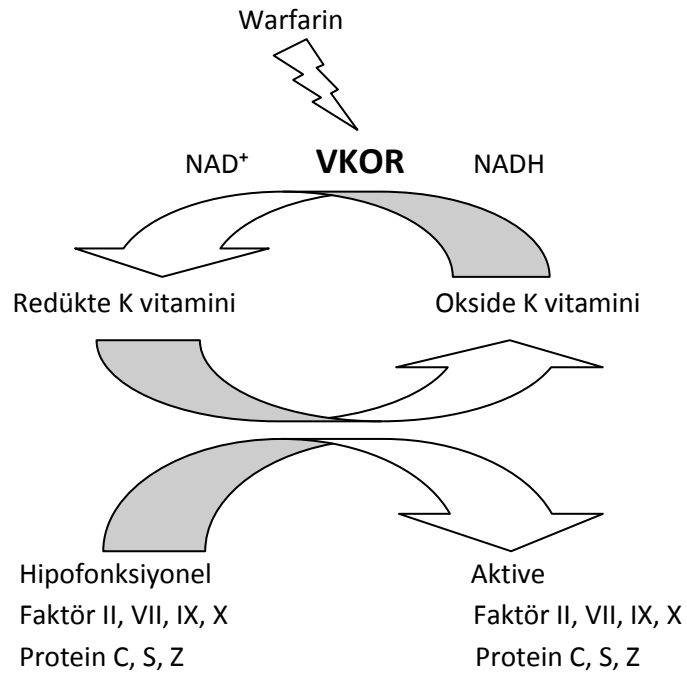
Asenokumarol kısa ömürlü (yarı ömrü: 8 saat), fenprokumon uzun ömürlü (yarı ömrü: 140 saat) bir oral antikoagulandır. Warfarinin yarı ömrü ise ikisinin ortasında, 36 saattir. Bu ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri birbirinden farklıdır (23).

Oral antikoagülanların etki mekanizması K vitamini metabolizmasıyla ilgilidir. Warfarin, karaciğerde K vitaminine bağımlı koagülasyon faktörlerinin (faktör II, VII, IX, X) ve protein C (PC) ile protein S (PS)'deki çeşitli glutamat rezidülerinin gama-karboksilasyonunu bloke eder (27). Pıhtılaşma faktörlerinden II, VII, IX, X'un aktifleşebilmesi için posttranslasyonel gama- karboksilasyona ihtiyaç duyulur. Posttranslasyonel gama-karboksilasyonun gerçekleşmesinde hayati öneme sahip kofaktör K vitamininin düşük formu olan K vitamini 2-3 epoksittir (vitamin KH₂). Karboksilasyon, K vitamini bağımlı proteinlerin fosfolipit yüzeylere tutunmasını sağlar ve böylece kanın pıhtılaşması hızlandırılmış olur. Warfarin, K vitamininin düşük (redükte) formunun oluşumunu K vitamini epoksit redüktaz enzimini kompetatif inhibisyonla engelleyerek durdurur. Bu sayede K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin gama-karboksilasyonunu kısıtlar (28) (Şekil 4). Vitamin K epoksit redüktaz enzimi, VKORC1 (vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1) geni tarafından kodlanır. Bu gendeki mutasyonlara bağlı olarak warfarin rezistansı gelişir ve sonuç olarak daha az dozlarda daha fazla etki ve daha yüksek INR elde edilir (23, 24).

Protein C, pıhtılaşma sisteminin önemli bir doğal inhibitörüdür. Pıhtılaşma önleyici etkisini Protein S ile birlikte faktör Xa ve faktör VIIIa'yı inaktive ederek gösterir. Protein S karaciğer ve endotelde yapılır, PC'nin faktör 10'u inaktive etmesini potansiyalize eder. Bu faktörler ve proteinler glutamik asit rezidülerinin karboksilasyonu olmadan biyolojik olarak inaktiftir (8, 28).



Şekil 4. Vitamin K epoksit döngüsü (24)



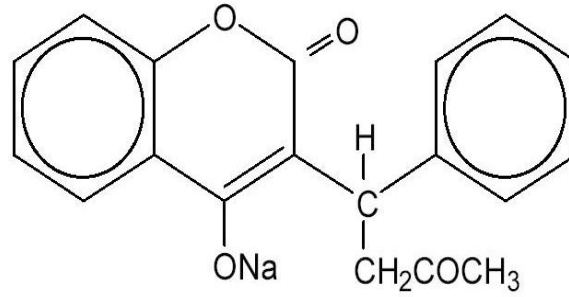
Şekil 5. Warfarin etki mekanizması (29)

2.2.1.2.1.1. Warfarin

Warfarin, ilk olarak 1948 yılında Wisconsin'de Karl Links tarafından keşfedilmiştir. Bir tür zehir olarak kullanılan dikumarol yapısındaki rodentisiti geliştirmek için yapılan çalışmalar sırasında tatlı yoncadan bulunmuştur. Bu

maddenin patent hakkı Dr. Links tarafından Wisconsin Alumni Research Foundation'dan alınmış ve warfarin ismi de buradan türetilmiştir (30, 31). Klinikte 1950'li yıllarda kullanılmaya başlanmıştır (30). Warfarin, tüm dünyada en sık kullanılan oral antikoagülandır (32).

Kristalize yani piyasada kullanılan warfarinin kimyasal olarak açılımı 3-(α -asetonilbenzil)-4-hidroksikumarindir. Ampirik formülü ise $C_{19}H_{15}NaO_4$ şeklindedir. Sodyum warfarinin kimyasal yapısı Şekil 6'da gösterilmektedir (33).



Şekil 6. Warfarin sodyumun kimyasal yapısı (33)

Warfarin molekül olarak -R- ve -S- enantiyomerlerinin rasemik bir karışımıdır. Bu sayede daha potent bir antikoagülan aktiviteye sahiptir. S- izomeri R- izomerine göre 3–5 kat daha fazla aktiftir (34). Terapötik aralığı çok dardır. Özellikle tedavi başlangıcında, doğru olmayan dozlar kanama veya tromboemboli riski taşımaktadır (35). Oral olarak alınan warfarinin neredeyse tamamına yakını, oldukça hızlı bir şekilde absorbe edilir. Pik plazma konsantrasyonuna yetişkinlerde 90 dakikada ulaşır. Yarı ömrü ise 36-42 saattir. Etkisini 2 ila 5 gün içinde gösterir. Doz ayarlaması International Normalized Ratio (INR) kullanılarak yapılır. Doz gereksinimi genetik dışında çevresel faktörlere de bağlı olarak kişiden kişiye değişkenlik gösterir (23).

Warfarinin oral alımından sonra tamamı emilir ve %99'u plazmada albumine ve alfa-1 asit glikoproteine bağlanır. Albumine bağlı olmayan serbest warfarin karaciğer tarafından alınır ve sitokrom P450 (CYP) enzim sistemi ile metabolize olur (36, 37). -S- enantiyomeri metabolizmasının %80-85'inden sitokrom P 450 2C9 (CYP2C9) sorumludur (38). -S- warfarin CYP2C9 tarafından 7- hidroksi warfarine dönüştürölüp safraya atılırken, -R- sitokrom P 450 warfarin 1A1 (CYP1A1), sitokrom P 450 1A2 (CYP1A2), sitokrom 2C19 (CYP2C19) ve sitokrom P 450 3A4 (CYP3A4) ile metabolize edilerek inaktif alkole dönüştürölüp idrarla atılır (36, 37, 39).

Sitokrom P 450 2C9 (CYP2C9), oksidatif metabolizma ile warfarini inaktive eden ana karaciğer enzimidir. Onuncu kromozom üzerinde yer alan bir gen tarafından kodlanır. Homozigot normali ve bunun dışında iki allelik varyantı daha mevcuttur. Homozigot normal (Arg 144/ Ile 359), CYP2C9*1 olarak adlandırılır. Diğer haplotipler ise; CYP2C9*1'deki 144. amino asit olan arjinin yerine sistein gelmesiyle oluşan CYP2C9*2 ve CYP2C9*1'deki 359. amino asit olan izolösin yerine lösin gelmesiyle oluşan CYP2C9*3'dür. CYP2C9*2 enzimatik aktiviteyi %30 oranında azaltırken (40), CYP2C9*3 %80 azaltır (41) ve sonuç olarak warfarinin klirensi yavaşlayarak, antikoagölün etkisi artar ve alınması gereken günlük doz miktarı azalır (42).

2.2.1.2.1.2. Asenokumarol

Yarı ömrü 8 saat olan asenokumarolün metabolitleri antikoagölün etkiyi gösterir. İki rasemik enantiyomeri olan -R- ve -S- karışımından oluşur. -S- asenokumarolün hızlı metabolize olması nedeniyle terapötik etki hemen hemen

tamamen -R- asenokumarole bağlı olarak ortaya çıkar. -S- asenokumarol sitokrom P 450 2C9 tarafından metabolize edilirken, -R- asenokumarol CYP2C9, CYP2C19 ve CYP1A2 tarafından metabolize edilir. CYP2C9 enzim aktivitesindeki azalma -S- asenokumarolü etkilerken, -R- asenokumarolü diğer sitokromlar nedeniyle az etkiler. Böylelikle ilaç etkinliği fazla etkilenmez (23).

2.2.1.2.1.3. Fenprokumon

İki rasemik enantiyomerin karışımını içeren yaygın preparatları vardır. -S- enantiyomeri, -R-‘a göre daha potent bir antikoagülandır. Warfarinden daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir. Ortalama 157 saattir (43).

2.2.1.2.2. Warfarin tedavisinde doz ayarlama

Hemostatik sistem sürekli hareket halinde olup, değişen bir sistemdir. Pıhtılaşmaya katkıda bulunan bir çok protein geç ergenliğe kadar erişkin düzeylerine ulaşamaz. Ergenliğe kadar K vitamini bağımlı pıhtılaşma proteinlerinin ortalama düzeyleri erişkinlerden %20 civarında daha düşüktür (44).

Tedavide doz ayarlamak zordur çünkü warfarinin terapötik doz aralığı dardır. Aynı zamanda uygun doz kişiden kişiye çok değişmektedir. Yapılan çok sayıda araştırmaya göre warfarin dozunu etkileyen faktörler oldukça çeşitlidir. Bunlar; yaş, cinsiyet, diyet, hastanın aldığı diğer ilaçlar, boy, kilo ve genetik faktörlerdir. Doz ayarlamasında INR kullanılmaktadır. Hastanın yaşı herşeyden bağımsız olarak tedaviden bütün beklentilerimizi etkiler. Bir yaşından küçük hastalar daha fazla warfarin dozlarına, ihtiyaç duyarlar. Bu yaş grubunda doz

ayarlayabilmek için daha sık INR takibine ihtiyaç duyulurken, hedeflenen INR değerleri daha düşüktür (24, 36).

Çocuklarda oral antikoagülan kullanım endikasyonları son derece fazladır. Kalp kapak replasmanı sonrası ömür boyu kullanım endikasyonu vardır ve istenen INR dozu 2,5-3,5'dir. Yine tekrarlayan tromboz atakları olan çocuklarda ömür boyu kullanım gerekirken, istenen INR 2,5-3,5'dur. Risk faktörleri olmayan ilk tromboz atağında ve pulmoner embolide 6 ay kullanım endikeyken, istenen INR 2-3'dür. Risk faktörleri olan ilk tromboz atağında ise, başlangıçtaki 3 ay boyunca INR 2,3-3 arasında tutulmaya çalışılırken, risk faktörleri ortadan kalkana kadar tedaviye devam edilir ve o dönemde de INR 1,4-1,8 arasında tutulmaya çalışılır (23, 43).

Pediyatrik hastalarda INR'yi 2-3 arasında tutabilmek için Michelson ve arkadaşları tarafından tekrar gözden geçirilmiş bir oral antikoagülan tedavi protokolü bulunmaktadır (11, 19) (Tablo 1).

Tablo 1. Pediyatrik hastalarda oral antikoagülan tedavi protokolü (19)

Süre	INR	Doz ayarlaması
I) Birinci gün	1,0-1,3	0,2 mg/kg
	1,1-1,3	Aynı doza devam
	1,4-1,9	Dozu %50 azalt
II) 2-4. günler	2,0-3,0	Dozu %50 azalt
	3,1-3,5	Dozu %75 azalt
	>3,5	INR <3,5 olana kadar ilaç verme, sonra idame protokolüne göre doz ayarla
III) İdame	1,1-1,4	Dozu %20 arttır
	1,5-1,9	Dozu %10 arttır
	2,0-3,0	Aynı doza devam
	3,1-3,5	Dozu %10 azalt
	>3,5	INR <3,5 olana kadar ilaç verme, sonra son dozun %80'ini ver

Warfarin tedavisi sırasında terapötik dozu ayarlama ve takip açısından doz antikoagülan seviyelerini değerlendirmek için protrombin zamanı (PT) ve INR değerleri kullanılmaktadır (45). Protrombin Zamanı (PT), pıhtılaşmanın ekstremsel ve ortak yolunu değerlendirmede kullanılır. Test sitrat plazmaya kalsiyum ve tromboplastinin eklenmesi ile gerçekleştirilir (28). Ekstremsel yoldan fibrin pıhtısı oluşana kadar geçen süre ölçülür.

INR ise, PT'nin standardize edilmiş metodudur (46). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 1983 yılında sunduğu raporda INR'yi, PT'nin standardize edilmiş şekli olarak bildirmiştir (45).

INR değeri formülasyonu;

INR: (Hastanın PT değeri / Kontrol PT değeri)^{ISI} (45).

"International Sensitivity Index" (Uluslararası duyarlılık indeksi / ISI) tromboplastinlerin duyarlılığını ölçmek için saptanan birimdir. İnsan beyin tromboplastinleri değeri 1 olarak belirlenmiştir (45). Tromboplastinin ISI değerine göre INR değeri değişiklik gösterebilir. Ne kadar düşükse pıhtılaşma faktörlerine duyarlılığı o kadar yüksektir (47).

Tedavi başlangıcında INR değerine istenilen düzeye gelene kadar sık aralıklarla bakılmalıdır. Uzun süre sabit olsa bile aylık kontroller yapılmalıdır (22).

2.2.1.2.3. Çocuklarda warfarin tedavi endikasyonları

2.2.1.2.3.1. Venöz tromboembolizm (VTE)

Çocuklarda derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin sonuçları tam olarak bilinmemektedir. Kanada'da yapılan bir çalışmada çocuklarda VTE'ye

bağlı ölüm oranı %2,2, tekrarlayan tromboz riski %7, post-trombotik sendrom %12,4 olarak saptanmıştır (44). Arjantin’de yapılan bir çalışmada ise ölüm oranı %1,5, tekrarlayan tromboz %4, post-trombotik sendrom %18 olarak saptanmıştır. Tedavide öncelikle unfraksiyone heparin veya düşük moleküler ağırlıklı heparin 5-10 gün verildikten sonra oral antikoagülanlara (genellikle warfarin) geçilir. İstenen INR dozu 2-3’dür (48, 49).

2.2.1.2.3.2. Mekanik prostatik kalp kapağı

Mekanik prostatik kalp kapak replasmanı sonrası antitrombotik tedavi verilmezse, tromboemboli riski %5’den fazladır. Warfarin tedavisinde; hedef INR dozu 2,5-3,5 olmalıdır (23).

2.2.1.2.3.3. Fontan Operasyonu

Yapılan bir çok retrospektif çalışma sonucu, Fontan operasyonu sonrasında tromboemboli insidansının %3-%20 arasında arttığı gösterilmiştir. Bu yüzden profilaktik oral antikoagülan tedavi verilmelidir (23, 50).

2.2.1.2.3.4. Endovasküler stentler

Endovasküler stentlerin aort koarktasyonu, konjenital kalp hastalıkları ve postoperatif damar stenozlarında kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Oral antikoagülanların stent tıkanmasına engel olacağına dair kanıtlanmış bir çalışma olmamasına rağmen, 4 mm ve daha dar çaplı stenti olan, vena cava superior ya da pulmoner vende stenti olanlar uzun dönem oral antikoagülan tedavi almaktadır (23).

2.2.1.2.3.5. Santral venöz kateter

Santral venöz kateterden uzun süreli total parenteral nutrisyon (TPN) alacak 8 çocukta yapılan tek bir çalışma dışında bu konuyla ilgili şimdiye kadar yapılmış başka çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada bütün hastalar kateter ilişkili tromboz profilaksisi veya tedavisi amacıyla warfarin tedavisi almış. Sonuç olarak santral venöz kateterin kullanılabilme süresini uzattığı saptanmıştır (23, 51).

2.2.1.2.3.6. Serebral tromboemboli

Şimdiye kadar yapılmış randomize çalışma bulunmamaktadır. Oral antikoagülanların kardiyembolik inme, arteriyal disseksiyon, persistan hiperkoagülabilité durumlarında (lupus antikoagülanı ve/veya antifosfolipid antikorları) çocuk hastalarda kullanımı önerilmektedir. Sinovenöz trombozlu çocuklarda tedaviye düşük moleküler ağırlıklı heparin ile başlayıp warfarin ile 3 ay devam edilmesi sonucu hastalarda kanama komplikasyonu görülmemiştir (52, 53, 54, 55).

2.2.1.2.3.7. Dilate Kardiyomiyopati (DKMP)

Dilate kardiyomiyopati (DKMP)'li çocuk hastalarda kardiyak transplantasyon listesindeyken warfarin tedavisi verilmektedir. INR değerinin 2-3 arasında (ortalama 2,5) tutulması hedeflenmektedir (11).

2.2.1.2.3.8. Koroner anevrizmanın eşlik ettiği Kawasaki Hastalığı

Çocuklarda dev koroner arter anevrizmasının eşlik ettiği Kawasaki hastalığında oral antikoagülan kullanılabilir. Tedavi uzun süreli ve INR 2-3 arasında tutulacak şekilde verilir. Fakat etkinlik ve güvenilirliği tam olarak bilinmemektedir (11).

2.2.1.2.3.9. Purpura Fulminans

Pediyatrik hastalarda purpura fulminansın uzun dönem tedavisinde oral antikoagülanlar önerilmektedir (11).

2.2.1.2.4. Warfarin tedavisi komplikasyonları

Oral antikoagülanların önemli yan etkileri kanamadır. Çocuklarda majör kanama riski bir hasta için yılda 0-0,5%, minör kanama riski bir hasta için yılda %1,3-2,3 arasında değişmektedir (36).

Pediyatrik hastalarda warfarin kullanımının uzun dönem komplikasyonlarından biri de; osteoporoz olarak saptanmıştır (37). Trakeal kalsifikasyon ve saç dökülmesi de çocuklarda bildirilmiştir (56). Nadir görülen bir komplikasyonu da deri nekrozudur. Tedavi başlangıcından sonra 2-5 gün içinde ortaya çıkar. Keskin sınırlı, eritematöz lezyonlar en çok uyluk, gluteal bölge, meme ve ayak parmaklarında görülür. Tipik olarak lezyon merkezinde yavaş yavaş nekrotik bir hal almaya başlar. Ağır protein C veya protein S eksikliği olan çocuklarda bildirilmiştir (57).

Gebelikte kullanılan warfarin, plasentadan geçerek teratojen etki gösterir. Bebekte nazal hipoplazi, epifiz patolojileri, frontal bossing ve körlüğün eşlik ettiği sendromik durum ortaya çıkar (58). Warfarin emziren annelerde süte geçer fakat oran önemsiz düzeydedir ve laktasyonda kullanılabilir (59).

2.2.1.2.5. Warfarin komplikasyonlarında yaklaşım

En önemli komplikasyonu kanamadır ve hastanın kliniği yaklaşımda bize yol gösterir. Ciddi kanamalar acil tedavi gerektirir (60). Kanama komplikasyonları fatal, majör ve minör olarak ayrılır (61) (Tablo 2).

Tablo 2. Warfarin ilişkili kanama sınıflandırması (Makris ve Watson) (61)

	Kanama karakteristiği	Tanı
Ölümcül (fatal)	Kanamanın neden olduğu ölüm İntrakranial, Retroperitoneal, İntraoküler,	BT veya MRG
Majör	Kas içi kanama + kompartman sendromu, Kanamayı durdurmak için invaziv yöntemlere ihtiyaç duyulan kanamalar, Herhangi bir yerden aktif kanama + sistolik kan basıncının < 90 mm Hg olması veya oligüri veya hemoglobin düzeyinde > 2 g düşme	BT veya MRG
Minör	Diğer kanamalar	

Eğer warfarin tedavisine bağlı kanama komplikasyonu ortaya çıktıysa, hastanın kliniğine göre, tedavi belirlenir. İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılan yaklaşımlar tablo 3 ve 4'de verilmiştir (62, 63).

Tablo 3. İngiltere’deki warfarine bağlı kanamada tedavi yaklaşımı (62)

Klinik durum	Tedavi
Majör kanama	Warfarin vermeyi kes K vitamini (5 mg IV/oral) Protrombin kompleks konsantresi (50 U/kg) veya TDP (15 ml/kg)
Majör olmayan kanama	
• INR <6,0	Warfarini kes
• INR >6,0 - <8,0	Warfarini kes
Kanama yok / minör kanama	
• INR >8,0	Warfarini kes
• INR >8,0 + kanama için diğer risk faktörleri	Warfarini kes + 0,5-2,5 mg K vitamini (IV veya oral)

Tablo 4. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki warfarine bağlı kanamada tedavi yaklaşımı (63)

INR	Klinik	Tedavi
< 5	Kanama yok	Warfarini kes veya dozunu azalt
5-9	Kanama yok Kanama riski yüksek	Warfarini kes, sık INR takibi K vitamini (1-2,5 mg oral, 2-4 mg oral eğer acil düşme isteniyorsa)
>9	Kanama yok	Warfarini kes, K vitamini (3-5 mg oral)
>20	Ciddi kanama	K vitamini (10 mg IV) TDP veya protrombin kompleks konsantresi
Herhangi bir değer	Hayatı tehdit eden kanama	K vitamini (10 mg IV) Protrombin kompleks konsantresi

2.2.1.2.6. Warfarin biyoyararlanımını etkileyen faktörler

Warfarin biyoyararlanımını etkileyen genetik ve genetik olmayan faktörler mevcuttur. Genetik faktörler; sitokrom P450 kompleks subunit 2C9 (CYP2C9) ve Vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1 (VKORC1) genleridir (64). Bir süre önce gama-glutamil karboksilaz (GGCX) genindeki polimorfizmlerin de

warfarin biyoyararlanımına etki ettiğini gösteren çalışmalar yapılmaya başlandı fakat yeterli düzeyde veri bulunmamaktadır (4, 65). Genetik olmayan faktörler; yaş, ırk, vücut ağırlığı, vücut alanı, boy, cinsiyet, ilaç etkileşimleri, ek hastalıklar, sigara, alkol, diyetle alınan K vitamini miktarıdır (64, 66).

Yetişkinlerde warfarin ideal dozu genetik faktörlere bağlı olarak %30-40 arasında, genetik olmayan faktörlere bağlı olarak ise %15-22 arasında varyasyon göstermektedir (4).

2.2.1.2.6.1. Warfarin ile ilaç etkileşimleri

Oral antikoagülanlarla ortaya çıkan ilaç etkileşimleri farmakokinetik ve farmakodinamik şekilde olabilir. Farmakokinetik olarak enzim indüksiyonu ve inhibisyonu ayrıca plazma proteinlerine bağlanmanın azalması şeklinde ortaya çıkabilir. Farmakodinamik olarak etkileşim sinerjizma ve K vitamini ile olduğu gibi yarışmalı antagonizmadır (67).

Warfarinle ilgili en ciddi etkileşim antikoagülan etkinin artması ve kanama olmasıdır. Antikoagülan etkiyi arttıran ilaçlar INR değerini yükseltir, azaltan ilaçlar ise INR değerini düşürürler (67). Warfarinle olan ilaç etkileşimleri tablo 5’de gösterilmiştir (68).

Tablo 5. Warfarin-ilaç etkileşimleri (68)

	Antibiyotikler	Kardiyo- vasküler ilaçlar	Analjezik, Antiinflamatuvar ilaçlar	Santral Sinir Sistemi etkili ilaçlar	Gastro- intestinal Sistem ilaçları	Diğer ilaçlar
INR'yi arttıran	Amoksisilin/ Klavulonat					
	Azitromisin					
	Sefamandol					
	Sefazolin					Akarboz
	Kloramfenikol	Asetilsalisilik asit				Anabolik steroidler
	Siprofloksasin	Amiodaron				Danazol
	Klaritromisin	Atorvastatin	Asetaminofen	Sitalopram		Doksifluridin
	Kotrimaksazol	Bezafibrat	Allopürinol	Kloralhidrat		Etoposid/ Karboplatin
	Doksisiklin	Klofibrat	Selekoksib	Disulfiram		Fluorourasil
	Efavirenz	Diltiazem	İndometazin	Duloksetin		Gemsitabin
	Etravirin	Disopramid	İnterferon	Entakapon		İfosfamid
	Eritromisin	Ezetimib	Leflunomid	Felbamat	Simetidin	Levamisol/ Fluorourasil
	Flukanazol	Fenofibrat	Metilprednizolon	Fluoksetin	Omeprazol	Oksolamin
	Gatifloksasin	Fluvastatin	Nabumeton	Fluvoksamin	Orlistat	Paklitaksel
	İzoniiazid	Gemfibrozil	Fenbutazon	Marihuana		Tamoksifen
	İtrakanazol	Glukagon	Piroksikam	Metilfenidat		Tolterodin
	Levofloksasin	Lovastatin	Sulindak	Fenitoin (bifazik etki)		Trastuzumab
	Metronidazol	Metolazon	Tolmetin	Ketiapin		Zafirlukast
	Mikonazol	Propafenon	Topikal salisilat	Ropinirol		Zileuton
	Moksifloksasin	Propranolol	Tramadol			
	Nalidiksik asit	Kinidin				
	Norfloksasin	Rosuvastatin				
	Nevirapin	Simvastatin				
	Ofloksasin					
	Ritonavir					
	Terbinafin					
	Tetrasiklin					
	Vorikonazol					
INR'yi azaltan	Kloksasillin					
	Dikloksasillin					
	Fosamprenavir					Siklosporin
	Griseofulvin					Etretinat
	Lopinavir/ Ritonavir	Bosentan	Azatiopürin	Barbituratlar		İnfluenza aşısı
	Nafsillin	Kolestamin	Mesalamin	Karbamazepin	Sukralfat	Mentol
	Nevirapin	Telmisartan	Sulfasalazin	Klordiazepoksid		Metimazol
	Ribavirin			Propofol		Multivitamin preparatları
	Rifampin					Raloksifen
	Teikoplanin					hidroklorid
	Terbinafin (sistemik)					

Warfarin tedavisi alan hastaların kullandığı ek ilaçlar ihtiyaç duyulan warfarin dozunu yakından etkilemektedir. Bazı ilaçlarla beraber kullanıldığında ihtiyaç duyulan warfarin doz değişiklikleri tablo 6’da gösterilmiştir (69).

Tablo 6. Kullanılan diğer ilaçların warfarin doz ihtiyacına etkisi (69)

Kullanılan diğer ilaçlar	Ek ilaç olmadan ihtiyaç duyulan warfarin dozu	Ek ilaç ile beraber ihtiyaç duyulan warfarin dozu	Dozdaki değişiklik (%)	p
Amlodipin	34,53 mg	26,74 mg	%22,6 (↓)	0,001
Amiodaron	34,27 mg	24,77 mg	%27,7 (↓)	<0,001
β-bloker	35,91 mg	31,90 mg	%11,2 (↓)	0,028
Karbamazepin	33,17 mg	47,14 mg	%42,1 (↑)	0,019
Diüretik	37,22 mg	31,49 mg	%15,4 (↓)	0,001
Statinler	35,29 mg	31,07 mg	%12 (↓)	0,019

2.2.1.2.6.2. Warfarin ile gıda etkileşimleri

Oral antikoagülan tedavi alan hastalarda, warfarinin etki mekanizması nedeniyle diyetle alınan K vitamini önemlidir. Gıda içeriğindeki K vitamini oranına bağlı olarak INR seviyelerinde dalgalanmalar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca hastalarda komplikasyonlar ortaya çıkıp, hayatı tehdit edici kanama veya trombozlar görülebilmektedir. Primer olarak diyetle K1 vitamini (filokinon) alınmaktadır. K vitamininin bitkilerde bulunan formu olan K1 vitamini en çok yeşil yapraklı sebzelerde (marul, ıspanak, pazı, lahana, yeşil çay) bulunmaktadır. Hayvansal gıda olarak da karaciğer, peynir ve yumurta da K vitamini içermektedir. Vücut K vitamini ana deposu karaciğerdir. Burada döngüsü hızlıdır ve diyetle yeteri kadar alınmadığında bir kaç gün içinde karaciğerdeki depolarında azalma meydana gelir. Fakat erişkin yaş grubunda klinik olarak K vitamini

eksikliğine nadir rastlanır. Protrombin zamanında uzama K vitamini eksikliğini gösterir ancak sadece büyük çaplı eksikliklere duyarlıdır (70, 71).

Filokinonun 1-10 mg/gün dozunda kullanımı warfarinin antikoagülan etkisini bloke eder. Genellikle sebze bazlı beslenenlerde, diyet yapanlarda ve beslenme takviyesi olarak multivitamin alanlarda görülür (70, 71).

Warfarin-gıda etkileşmesi üç değişik formda karşımıza çıkabilmektedir. Bunlar warfarin kullanan hastanın;

1. Çok yüksek oranda K vitamini içeren diyetle beslenmesine bağlı gelişen kazanılmış geçici warfarin rezistansı
2. Yüksek oranda K vitamini içeren diyetle beslenmesine bağlı gelişen düşük antikoagülan etki
3. Düşük oranda K vitamini içeren diyetle beslenmesine bağlı gelişen yüksek antikoagülan etki olarak sıralanabilir (70).

Bazı gıdalar sitokrom P450 enzimlerini indükleyerek ya da inhibe ederek warfarin biyoyararlanımını etkilemektedir (68) (Tablo 7).

Tablo 7. Warfarin metabolizmasında yer alan sitokrom P450 enzimlerini etkileyen gıdalar (68)

Alınan gıda	İndüklenen enzim	İnhibe olan enzim
Amerikan üzümü		CYP2C9
Ekinezya		CYP3A4
Okaliptus		CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4
Sarımsak		CYP2C9, CYP3A4
Ginseng	CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4	
Üzüm	CYP1A2	
Greyfurt suyu		CYP1A2, CYP3A4
Meyan kökü		CYP3A4
Nane		CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4
Kedi otu		CYP3A4
Yaban vişnesi		CYP3A4

Bazı gıdalar da trombosit agregasyonunu inhibe ederek warfarinin etkinliğini değiştirirler (68). Tablo 8’de gıdalar ve etkileri gösterilmiştir.

Tablo 8. Trombosit agregasyonunu inhibe ederek warfarin etkisini değiştiren gıdalar (68)

TROMBOSİT AGREGASYONUNU İNHİBE EDEN GIDALAR		
Kafein	Balık yağı	Sarımsak
Zencefil	Ginkgo	Ginseng
Soğan	E vitamini preparatları	(>800 U/gün)
Öksürük otu	Çemen	Zerdeçal

2.3. FARMAKOGENETİK NEDİR?

İlaç kinetiğinin ve ilaçlara karşı kişinin verdiği yanıtın genetik yapıya göre bireyler arasında farklılık göstermesi ve buna bağlı olarak ilaç etkinliğinin etnik kökenler arasında değişmesi ile ilgilenen bilim dalına **farmakogenetik** denilmektedir (10). İlaç tedavisinin bireyler arası farklılık gösterdiği 20. yüzyıldan beri bilinmektedir. Farmakogenetik, genetik varyasyonlara göre ilacın vücutta emilimi, metabolize edilmesi, ilacın etki yeri reseptörleri, ilacı ve metabolitlerini atma yeteneğindeki farklılıkları inceler (72).

İlaçların eşdeğer dozları bazı bireylerde yeterli etkinlik göstermezken, bir kısım hastalarda toksisiteye yol açabilir (73).

Genetik faktörler; ilaca yanıtta bireysel farklılıkların %20–40, yan etkilerin %50’sinden sorumludur. Tüm farmakogenetik farklılıklar poligenik ve multifaktöriyel özelliklerdir (72).

Uluslararası HapMap Projesi, insan DNA sekans varyasyonlarını gösteren insan genomunun haplotip haritasını (the HapMap) geliştirmeyi planlamaktadır. Diyabet, kanser, inme, kalp hastalıkları, depresyon, astım gibi birçok yaygın

hastalığın ortaya çıkması hem çevresel hem de genetik faktörlere bağlıdır. İki kan bağı olmayan alakasız insanın DNA sekansları %99,9 eşittir. Fakat geride kalan %0,1'lik kısma göre kişilerin hangi hastalıklar açısından risk altında oldukları ya da ilaçlara verdikleri yanıtlar birbirinden ayrılmaktadır. HapMap projesi tamamlandığında, tedaviye yanıtaki bireysel farklılıkları oluşturan diğer tek nükleotid polimorfizmleri belirlenebilecektir (39).

Farmakokinetik, ilaçların absorpsiyon (emilim), dağılım, metabolizma veya atılımının vücudu ne şekilde etkilediğini inceler. Kısaca vücudun ilaca ne yaptığıyla ilgilenir. Bu süreçte organizma ilacı metabolitlerine ayrıştırır ve ilacın plazma konsantrasyonunu oluşturarak, ilacın dokulara dağılmasına neden olur. Farmakokinetik, ilacın veya onun metabolitlerinin konsantrasyon seviyelerindeki varyasyonlara yol açan polimorfizmlerle ilgilidir. Farmakodinamik, ilaçların biyokimyasal ve fizyolojik etkileri ile onların etki mekanizmalarını inceler. Kısaca ilacın vücuda yaptığıyla ilgilenir. İlacın etki ettiği bölgeden başlayarak, reseptör ve reseptör sonrası olayları inceler (72).

Farmakogenetik sayesinde;

1. Genlerle ilgili bilgiler ışığında proteinler, enzimler ve RNA moleküllerinin esasına dayalı daha etkili ilaçlar üretebilecektir.
2. İlaç keşfi kolaylaşacak ve spesifik hastalıkların tedavisini hedefleyen ilaçların yapılması sağlanacaktır.
3. Hastaların tedavinin başlangıcında doğru ilaçlarla karşılaşması sağlanacaktır.
4. İyileşme süreci kısılacak ve yan etki olasılığı azalacaktır.

5. Bireylerin genetik kodunu bilmek; erken yaşta uygun yaşam stili ve çevresel değişiklikler yapılmasına izin verecek, genetik hastalıkların etkisini azaltacak veya ortaya çıkışını önleyebilecektir.
6. Belirli bir hastalığa yatkınlığın bilinmesi, dikkatli izleme ve tedavi etmeyi sağlayabilecektir (72).

Warfarin tedavisinde son yıllarda farmakogenetik önemli yere sahiptir. Sitokrom P450 2C9 (CYP2C9) ve vitamin K epoksit redüktaz subunit protein 1 (VKORC1) genlerindeki polimorfizmler tedavi yanıtını değiştirmektedir (65). Bunlara ek olarak yakın zaman önce gama- glutamil karboksilaz (GGCX) geninin 1181 T>G bölgesinde yeni bir polimorfizm açıklandı. Gama-glutamil karboksilaz, faktör II, VII, IX, X'un aktiveşebilmeleri için gerekli olan gama karboksilasyonu sağlayan enzimdir. GGCX geni ise bu enzimi kodlayan gendir. Bu genle ilgili çalışmalar da devam etmektedir (4, 65). Sitokrom P450 4F2 (CYP4F2) 1347C>T ve 494C>T bölgelerindeki polimorfizmlerin de warfarin doz ihtiyacı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir fakat yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yine protein C (PC), apolipoprotein E (APOE), faktör 7 (F7), kalumenin (CALU) ve mikrozomal epoksit hidrolaz (EPHX1) genleri de warfarin doz ayarlamasıyla ilişkilidir ve çalışmalar devam etmektedir (69).

Warfarin tedavisinde farmakogenetiğin bir çok faydası vardır. Tedavi başlangıcında stabil INR değerine ulaşmak daha kısa sürede olacağından bu konuyla ilgili sağlık harcamaları azalacaktır. Yan etki görülme riski ve sıklığı ayrıca hastaneye yatış süreleri azalacaktır (65). Ayrıca 2007 yılında, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) warfarin tedavisi başlanacak hastalarda tedavi başlangıcından önce, genetik polimorfizm bakılmasını uygun görmüştür (65, 66).

2.4. SİTOKROM P450 2C9 (CYP2C9)

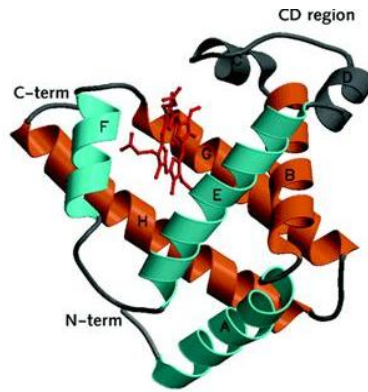
İlaçlar büyük oranda karaciğerde, böbreklerde, gastrointestinal sistemde, ciltte ve akciğerde çeşitli enzimlerle metabolize olurlar. Bu enzimler, hücrenin endoplazmik retikulumunda bulunur ve mikrozomal enzimler olarak adlandırılırlar (74).

İki tip ilaç metabolize eden enzim grubu vardır.

1- Faz I enzimleri: Oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon ve demetilasyon işlemlerini yaparlar. Böylece yabancı maddeler (ksenobiotikler) faz II'ye hazırlanmış olur.

2- Faz II enzimleri: Glukronat veya sulfat ile konjugasyon ve asetilasyon işlemlerini yaparlar (74).

Faz I metabolizması büyük ölçüde sitokrom P450 enzimleri ile gerçekleşir. Bunlar hem ve bir globin kıvrımından meydana gelirler. Globin kıvrımı hepsi helikal yaklaşık 3 + 3 heliksdan oluşur. Birincil olarak karaciğerde bulunurlar. Dört yüz elli (450) rakamı "hem" içeren karaciğer pigmentlerinin, karbonmonoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığa ait dalga boyunun nanometre olarak en yüksek değerini ifade eder (74).

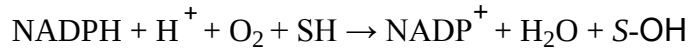


Şekil 7. Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemi yapısı (75)

Spesifik CYP enzimlerini kodlayan genin izole edilmesiyle bu enzimlerin amino asit dizilimleri belirlenebilmiştir. Böylece farklı enzimler aminoasit dizilimine göre yapısal olarak sınıflandırılmıştır. CYP enzimleri rakamlar ile ailelere (familya) ayrılmıştır. Amino asit dizilimi yönünden en az %40 benzerlik gösteren enzimler aynı aile içine alınmaktadır. Harfler ile alt grup ailelere (subfamilya) ayrılmaktadır. Aynı subfamilyada ise amino asit dizilim homolojisi en az %55 olmaktadır. En son numara ise enzimi kodlayan genin numarasıdır (76).

Bu enzimler steroidojenik ve ksenobiotik CYP enzimleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Ksenobiotikler tüketilen maddelerin detoksifikasyonunu yaparlar ve familya 1, 2, 3, 4'ü kapsarlar. Steroidojenikler tüketilen maddeleri biyolojik kullanım yapılarına dönüştürürler ve familya 7, 11, 17, 19, 21, 27'yi kapsarlar (76).

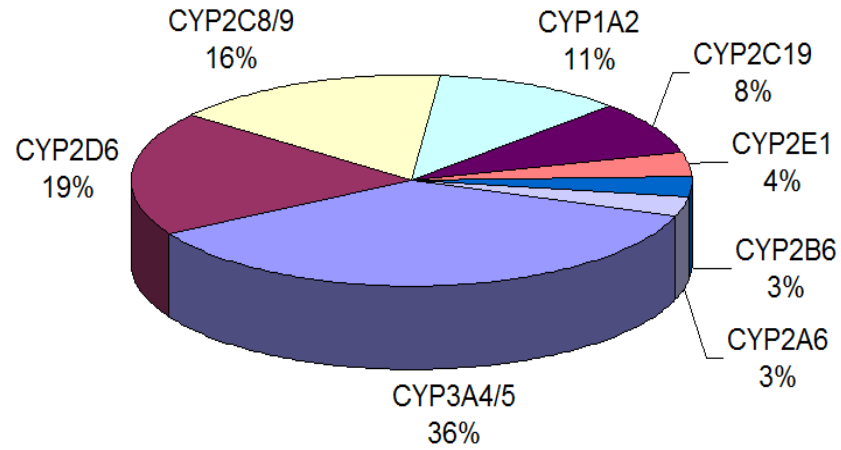
CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon şu şekilde gösterilir;



Reaksiyondaki substrat (S); bir steroid, yağ asidi, ilaç veya oksijen bağlanma yeri olarak görev yapan alkan, alken, aromatik alkan, aromatik halka veya heterosiklik halka ekleri olan diğer kimyasal maddeler olabilir. Substrata, iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri adı verilmektedir (77).

Tablo 9. Majör sitokrom P450 enzimlerinin özellikleri (77)

Enzim	Substratları	İndükleyicileri	İnhibitörleri
CYP1A2	Asetaminofen	Sigara içme	Siprofloksasin
	Teofilin	Kızartma yiyecekler	Enoksasin
	Kafein	Omeprazol	Norfloksasin
	Fenasetin		Fluvoksamin
CYP2C	Dapson	Diazepam	Deksametason
	S-warfarin	Tolbutamid	Fenobarbital
	Fenitoin		Amiodaron
CYP2D6	Beta blokerler		Simetidin
	Debrisoquine		Sertralin
	Omeprazol		Klomipramin
	Dekstrometorfan		Desipramin
	Trisiklik antidepresanlar		Fluoksetin
			Paroksetin
CYP2E1	Asetaminofen	Etanol	Kinidin
	Etanol	İsoniazid	Sertralin
CYP3A4	Sisaprid	Kortikosteroidler	Tioridazin
	Siklosporin	Dapson	Disulfiram
	Dekstrometorfan	Diazepam	Simetidin
	Diltiazem	Enalapril	İtrakonazol
	İtrakonazol	Ketokonazol	Ketokonazol
	Lovastatin	Makrolidler	Makrolidler
	Midazolam	Nifedipine	Nifedipin
	Kinidin	Gonadal hormonlar	Verapamil
	Takrolimus	R-warfarin	Sertralin
	Terfenadine	Teofilin	Fluoksetin
	Triazolam	Verapamil	

**Şekil 8.** Sitokrom P450 ailyaları ve metabolize ettikleri ilaç oranları (78)

Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemlerinden biri olan sitokrom P450 familya 2 subfamilya C polipeptit 9, CYP2C9 şeklinde kısaltılmaktadır.

CYP2C9 enzimi birçok ilaç ile etkileşir. Metabolizmasında rol aldığı ilaçlar (substratları), enzimi indükleyen ve inhibe eden ilaçlar tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. CYP2C9'un ilaçlarla ilgisi (79, 80, 81)

Substratlar	İndükleyiciler	İnhibitörler		
Warfarin	Rifampisin	Amiodarone	Trimetoprim	Diklofenak
Fenitoin	Barbitüratlar	Flukanazol	Siprofloksasin	Levofloksasin
Taksol	Fenitoin	Metronidazol	Anastrazol	Ketoprofen
Tamoksifen	Karbamazepin	Sulfinpirazon	Lovastatin	Sulfonamidler
Fluvastatin		Disülfiram	Teniposid	Fenilbutazon
Diazepam		Paroksetin	Fluvastatin	Sertralin
NSAİD		Fluvoksamin	Simetidin	Flurbiprofen
		İzoniazid	Sulfafenazol	Simvastatin
		Troglitazon	Ritonavir	Zafirlukast

Warfarin doz ihtiyacı CYP2C9*1/*1 (homozigot normal) ile karşılaştırıldığında, CYP2C9*2 taşıyıcılarında %17 ve CYP2C9*3 taşıyıcılarında ise %37 daha azdır (64, 75). Yine homozigot normale göre, CYP2C9*1/*2 (CYP2C9*2 alleli heterozigot) %19,6, CYP2C9*1/*3 (CYP2C9*3 alleli heterozigot) %33,7, CYP2C9*2/*2 (CYP2C9*2 alleli homozigot mutant) %36, CYP2C9*2/*3 (CYP2C9*2 alleli heterozigot, CYP2C9*3 alleli heterozigot) %56,7, CYP2C9*3/*3 (CYP2C9*3 alleli homozigot mutant) taşıyıcılarında ise %78,1 az doza ihtiyaç duyulmaktadır (64, 78).

Tablo 11. CYP2C9 polimorfizmlerinin etnik kökenlere göre farklılıkları

Etnik köken	Kaynak	*1*1 (%)	*1*2 (%)	*1*3 (%)	*2*2 (%)	*2*3 (%)	*3*3 (%)	Kişi sayısı
Beyaz ırk	Scordo ve ark. (82)	65	15	14	2,5	1,9	1,6	157
Beyaz ırk (pediatrik hasta)	Margaglioni ve ark. (42)	48,8	34,4	15,5	0	1,3	0	180
	Aynacıoğlu ve ark. (83)	66,7	18,04	17,23	1	1,1	0,8	499
	Nowak-Göttl ve ark. (4)	66,1	18,6	13,6	1,7	0	0	59
Afrikan-Amerikan	Sullivan-Klose ve ark. (84)	97	2	1	0	0	0	100
Japon	Nasu ve ark. (85)	95,8	0	4,2	0	0	0	218
Kore	Yoon ve ark. (86)	97,7	0	2,3	0	0	0	574
Türk	Özer ve ark. (87)	50	21	*2*3 ile toplamı 29	0	*1*3 ile toplamı 29	0	100
İran	Azarpira ve ark. (71)	41,2	37,8	9,5	1,4	10,1	0	150
Mısır	Hamdy SI ve ark. (71, 81)	66,3	19	12	2,4	0	0,3	247
Yunan	Arvanitidis K ve ark (71, 88)	62	20	13,5	1,5	3	0	283
Rus	Gaikovitch EA ve ark (69, 71)	68	18,3	11,4	0,7	1,3	0,3	290
Çinli	Gin Gin Gan ve ark (88)	91,5	0	7,5	0	0	1	93
Malezya	Gin Gin Gan ve ark (88)	92	1	6	0	0	1	85
Hindistan	Gin Gin Gan ve ark (88)	85	2,5	10	0	2,5	0	40

2.5. VİTAMİN K EPOKSİT REDÜKTAZ KOMPLEKS SUBÜNİT 1 (VKORC1)

Vitamin K epoksit redüktaz subunit 1 (VKORC1), VKORC1 geni tarafından kodlanır. 16p11.2 'de lokalizedir ve genin uzunluğu yaklaşık 11 kb'dır (4, 64, 69). İlk olarak 2005'te D'Andrea G. ve arkadaşları tarafından iki tane yaygın tek nükleotid polimorfizmi bulundu. Bunlar; intron 1'deki 1173 C>T ve 3'-translasyona uğramayan bölgedeki 3730 A>G. Aynı yıl Yuan HY ve ark. ayrıca Sconce ve ark. tarafından 5'-upstream bölgesindeki -1639 G>A promotor polimorfizmini buldular (39, 64, 82). Warfarin doz ayarlamasında etki eden en yaygın mutasyonlar 1173, 3730 ve -1639 tek nükleotid polimorfizmleridir. VKORC1 1173 C alleleline, -1639 G alleleline ve 3730 A alleleline sahip kişiler daha yüksek doz warfarine ihtiyaç duymaktadır (39, 64, 82, 88).

Warfarin doz ihtiyacı, CYP2C9 ve VKORC1 gen polimorfizmlerine ek olarak yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığını da göz önünde bulundurduğumuzda %50,4-%64,1 arasında değişim göstermektedir (64, 74, 76, 80, 88).

Warfarin tedavisinde VKORC1 gen polimorfizmi doz ayarlamasında etkili bir faktördür ve etnik kökenlere göre varyasyonlar göstermektedir (64). Tablo 11'de farklı etnik kökenli gruplarda şimdiye kadar yapılan çalışmalardaki VKORC1 genotip sıklıkları gösterilmiştir (64).

Tablo 12. VKORC1 gen polimorfizminin etnik gruplara göre sıklıkları

Çalışma	Etnik grup	1173 C>T CC (%)	1173 C>T CT (%)	1173 C>T TT (%)	3730 A>G GG (%)	3730 A>G GA (%)	3730 A>G AA (%)	-1639 G>A AA (%)	-1639 G>A AG (%)	-1639 G>A GG (%)
D'Andrea G, 2005 (89)	Beyaz ırk	36,8	46,9	16,3	45,5	39,5	15,0	-	-	-
Yuan HY, 2005 (90)	Çinli	-	-	-	-	-	-	79,8	18,3	1,90
Sconce EA, 2005 (2)	Beyaz ırk	-	-	-	-	-	-	19	56	25
Aquilante CL, 2006 (91)	Amerikalı	-	-	-	-	-	-	13,8	51,5	48,5
Carlquist JF, 2006 (92)	Amerikalı	36,1	50,7	12,7	-	-	-	-	-	-
Borgiani P, 2007 (93)	İtalyan	26,4	43,2	25,0	48,0	43,9	8,1	-	-	-
Jiang NX, 2007 (94)	Çinli	2,9	15,7	81,4	-	-	-	-	-	-
Kimura R, 2007 (95)	Japon	0	84,9	15,1	84,9	15,1	0	0	84,9	15,1
Miao L, 2007 (96)	Çinli	-	-	-	-	-	-	83,7	15,7	0,6
Nakai K, 2007 (97)	Japon	3,2	12,9	83,9	-	-	-	-	-	-
Schelleman H, 2007 (98)	Beyaz ırk	40,8	50,8	8,4	-	-	-	7,6	55,1	37,3
	Afrikanlı- Amerikalı	86,5	12,6	0,9	-	-	-	0	20,4	79,6
Zhang WP, 2007 (99)	Çinli	-	-	-	-	-	-	74,4	23,3	2,3
Zhu Y, 2007 (100)	Beyaz ırk	-	-	-	-	-	-	12,3	35,4	52,3
Haug KB, 2008 (101)	Beyaz ırk	34,5	50	15,5	-	-	-	-	-	-
Obayashi K, 2008 (102)	Japon	0,8	19,8	79,4	-	-	-	0,8	19,8	79,4
Ozgon GO, 2008 (103)	Türk	-	-	-	-	-	-	28,8	42,4	28,8
Perini JA, 2008 (104)	Beyaz	-	-	-	-	-	-	15	45	40
	Melez	-	-	-	-	-	-	8	52	40
	Zenci	-	-	-	-	-	-	3	39	58
Wadelius M, 2009 (105)	Beyaz ırk	-	-	-	-	-	-	14,9	48,9	36,2
Yoshizawa M, 2009 (106)	Japon	-	-	-	-	-	-	81,9	17	1,1
Nihat Ö, 2010 (87)	Türk	-	-	-	-	-	-	17	47	36
Ulrike N-G, 2010 (4)	Beyaz ırk (pediatrik yaş grubu)	-	-	-	-	-	-	11,9	42,4	45,7
Negar A, 2010 (71)	İranlı	-	-	-	-	-	-	27	57	16
Gin Gin Gan, 2010 (88)	Malezya	-	-	-	-	-	-	55	37	8
Gin Gin Gan, 2010 (88)	Çinli	-	-	-	-	-	-	67	27	6
Gin Gin Gan, 2010 (88)	Hindistan	-	-	-	-	-	-	7	13	80
Yuya K, 2011 (107)	Japon (pediatrik yaş grubu)	CC- CT 20,9	CC- CT 20,9	79,1	-	-	-	-	-	-

Günlük ortalama warfarin ihtiyacı -1639 AA taşıyıcılarıyla karşılaştırıldığında, -1639 GA taşıyıcıları %52, -1639 GG taşıyıcıları %102 daha fazla doza ihtiyaç duymaktadır (39, 64, 65).

Bütün yapılan çalışmalar sonucunda, warfarin doz ihtiyacında VKORC1 ve CYP2C9 gen polimorfizmlerinin etkili olduğu yeteri kadar bilinmektedir. En çok Avrupa'lı ve Asya'lılar üzerine çalışmalar yapılmıştır ve Afrika'lılar için literatürde yeterli bilgi bulunmamaktadır. Türk popülasyonu da çok sayıda farklı etnik grup içeren Avrupa ve Asya karışımı bir topluluktur. Ama Türk toplumuna yönelik warfarin doz ayarlaması açısından, VKORC1 ve CYP2C9 gen polimorfizm sıklıklarının araştırılması ile ilgili fazla veri bulunmamaktadır (87). Yapılan çalışmalar genellikle erişkinlere yöneliktir. Pediatrik yaş grubunda yapılan bir Japon çalışmasında 48 hasta ele alınmış ve VKORC1 -1639 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi bakılmamıştır (107). Pediatrik hastalarda da warfarin tercih edilen bir ilaçtır ve çok sayıda endikasyonu mevcuttur. Bu çalışma ile amaçlanan; Türk toplumunda pediatrik yaş grubundaki VKORC1 ve CYP2C9 gen polimorfizm sıklıklarının hesaplanması, diğer etnik gruplarla karşılaştırılması, genetik polimorfizme göre warfarin ideal doz ayarlaması ve bu sayede warfarin tedavisinin komplikasyonlarını en düşük seviyeye indirerek klinisyenlere yardımcı olmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada, warfarin tedavisi almakta olan 58 çocuk hastadan ve 149 warfarin tedavisi almayan sağlıklı gönüllüden (kontrol grubu) EDTA'lı tüpe kan örneği alınıp, DNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lardan PZR yöntemi kullanılarak CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve VKORC1 genetik polimorfizmleri araştırılmıştır. Böylece CYP2C9 ve VKORC1 genlerine ait polimorfizmlerin Türk Toplumunda pediatrik yaş grubundaki allel sıklıkları saptanmıştır. Ayrıca warfarin tedavisi almakta olan çocukların yaş, boy ve genetik polimorfizmleri de göz önünde bulundurularak, hedef INR'ye ulaşmak için alması gereken ideal warfarin dozu hesaplanıp, bu doz ile verilen dozlar karşılaştırılmıştır. Çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (G.Ü.T.F.) Etik Kurulu tarafından 27 Nisan 2009 tarih ve 190 onay numarası ile onaylandıktan sonra başlatılmıştır. Hastalardan ve kontrol grubundaki çocuklardan ve ailelerinden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARI

Bu çalışmaya Haziran 2009- Haziran 2011 tarihleri arasında G.Ü.T.F. Hastanesi Çocuk Kardiyoloji ve Çocuk Hematoloji Bilim Dalları, Sami Ulus Çocuk Hastanesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı, Yüksek İhtisas Hastanesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı, Başkent Hastanesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı ve Dışkapı Hematoloji-Onkoloji Hastanesi Çocuk Kardiyoloji Bilim Dalı'nda izlenen ve warfarin tedavisi alan 58 çocuk hasta ile G.Ü.T.F. Hastanesi Genel Çocuk

Polikliniği'ne herhangi bir nedenle başvuran ve warfarin tedavisi almayan 149 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 207 olgu alındı.

Warfarin tedavisi alan 58 olgunun yaş, cinsiyet, kilo, boy, INR (bazal), warfarin tedavisi alma nedeni (primer hastalık), warfarin tedavisi başlangıç tarihi, saptanan CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve VKORC1 genlerine ait polimorfizmleri kaydedildi. Hastalarla ve aileleriyle warfarin etkililiğini azaltan gıdalar (pazı, lahana, maydonoz, ıspanak, semizotu, şalgam, brokoli, sarımsak ve zencefil) dan uzak durmaları konusunda konuşuldu.

Warfarin ile etkileşen (CYP2C9 ile metabolize olan) ilaç (amiodaron, azol grubu, statinler, HMG CoA redüktaz inhibitörleri) ve sigara kullanımı, karaciğer hastalığı olan hastalar sorgulandı ve kullanmak zorunda olanlar çalışma dışında bırakıldı. Warfarin tedavisi altındaki hastaların ilaç etkinliği derecesi INR ile takip edildi.

Warfarin tedavisi almayan 149 olgunun yaş, cinsiyet ve saptanan CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve VKORC1 genlerine ait polimorfizmleri kaydedildi.

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Periferik kandan genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu firmadan sağlanmış olan kit (Macherey-Nagel GmbH&Co.KG) ile yapıldı. Hasta ve kontrol grubundan EDTA'lı tüpe 5 cc periferik kan örneği alındı. 200 µl kan üzerine 25 µl proteinaz K eklendi. Üstüne 200 µl B₃ buffer eklendi. 10-20 saniye vortekslendi, 70 °C'de benmaride 10-15 dakika inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra örneklerin üzerine 210 µl %96-100 etanol eklendi ve vortekslendi. Her örnek nükleospin kolona aktarıldı ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Dibe çöken kısım atıldı. Filtreli olan tüpün altına yeni bir toplama tüpü koyuldu. Örneklerin üzerine 500 µl BW buffer eklendi. 11000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki tüp atıldı, yenisi kondu. Örnekler 600 µl B5 buffer ekledi. 11000 g'de 1 dakika 2 kere çevrildi. Filtreli tüp DNA'nın saklanacağı 1,5 ml'lik ependorf tüp içine yerleştirildi. Üzerine önceden 70 °C'de ısıtılmış BE (elution buffer) tamponundan 100 µl koyuldu, 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 11000 g'de 1 dakika çevrildi. Filtreli tüp atıldı ve DNA örneği elde edildi.

Elde edilen DNA'ların spektrofotometrede 260/280 nm dalga boyunda optik dansite ölçümleri yapıldı.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP)

CYP2C9 ve VKORC1 genlerine ait polimorfizmler öncelikle PZR-RFLP yöntemiyle saptandı. Daha sonra Real time- PZR yöntemiyle tekrar çalışıldı. PZR-RFLP ile sonuçlara ulaşmak en az iki gün alırken, Real time-PZR ile bir buçuk saat gibi kısa bir sürede sonuçlar elde edildi. İki yöntem ile saptanan polimorfizm sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldı. Sonuçlar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Böylece Real time-PZR gibi çok kısa sürede sonuç veren bir yöntemin güvenilirliği de kanıtlanmış oldu.

PZR RFLP ile Genotiplendirme

- CYP2C9 geni *2 bölgesi için;
5'-AATTTTGGGATGGGGAAGAG-3'
5'-CCGCTTCACATGAGCTAACA-3' primer çiftleri,
- CYP2C9 geni *3 bölgesi için;
5'-TGCACGAGGTCCAGAGATG-3'
5'-ATGAATTTGGGGACTTCGAAAA-3' primer çiftleri,
- VKORC1 -1639 gen bölgesi için;
5'-CCTCTGGGAAGTCAAGCAAG-3'
5'-AAGTGGTTCTCGTGCCTCAG-3' primer çiftleri ile amplifikasyon yapıldı.

PZR reaksiyonları termal döngü cihazında her 3 bölge için aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

Tablo 13. PZR reaksiyonlarının termal döngü cihazındaki derece, süre ve döngü sayıları

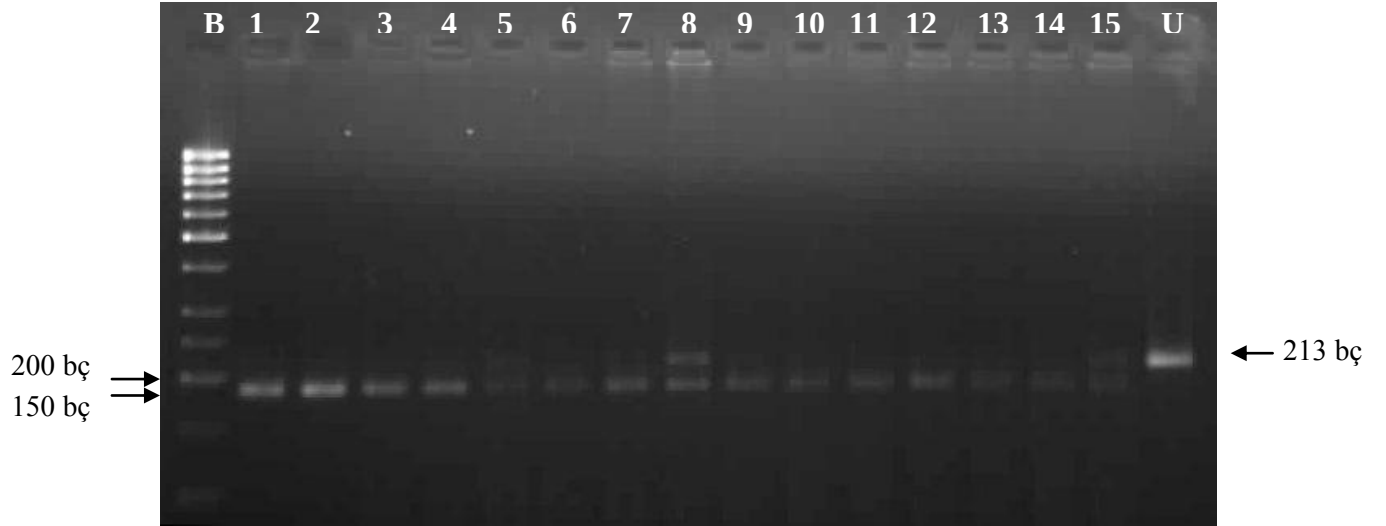
94 ⁰ C	5 dk	1 döngü
94 ⁰ C	30 sn	
60 ⁰ C	30 sn	30 döngü
72 ⁰ C	30 sn	
72 ⁰ C	5dk	1 döngü

PZR reaksiyonu sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jel elektroforezinde 90 V'da 90 dk yürütüldükten sonra CYP2C9 geni *2 için 213 bp, CYP2C9 geni *3 için 150 bp ve VKORC1 için ise 244 bp ürünler saptanmıştır

Daha sonra bu ürünler bir gece 37⁰C ‘de restriksiyon enzimlerle kesildikten sonra iki bağımsız gözlemci tarafından genotiplendirme yapılmıştır (Şekil 9, 10, 11).

CYP2C9 geni *2 için PZR ürünleri, AvaII enzimi ile bir gece 37⁰C’de inkübe edildikten sonra aşağıdaki kesim sonuçları elde edilmiştir:

183+30 bç	homozigot normal tipi (CC)
213+183+30 bç	heterozigot tipi (CT)
213 bç	mutant tipi (TT) göstermiştir.

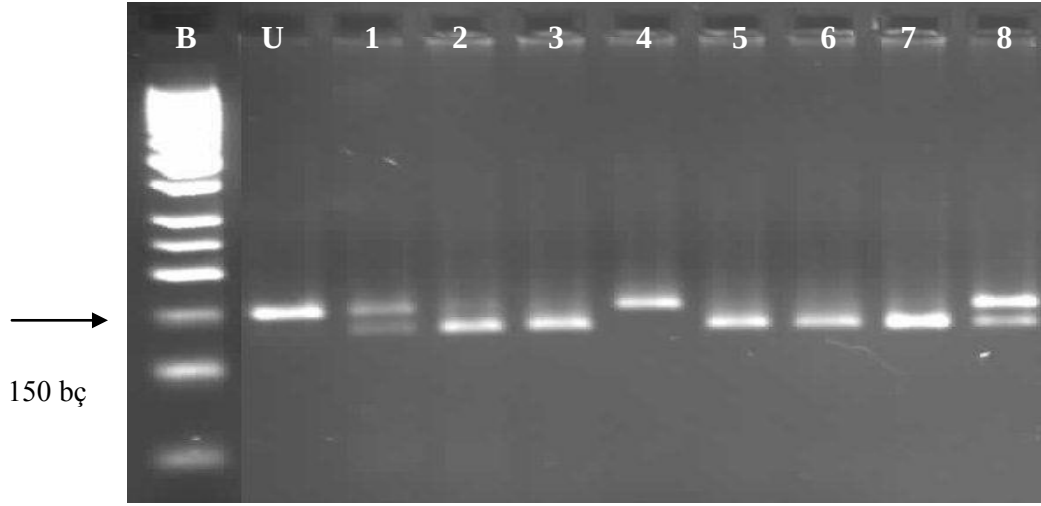


B: 50 bç belirteç, 1-7, 9-14: homozigot normal tip; 8, 15: heterozigot tip, U: PZR ürünü

Şekil 9. Agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra CYP2C9 geni *2 alleleline ait kesim ürünleri

CYP2C9 geni *3 için PZR ürünleri, NsiI enzimi ile bir gece 37⁰C’de inkübe edildikten sonra aşağıdaki kesim sonuçları elde edilmiştir:

129+21 bç	homozigot normal tipi (AA)
150+129+21 bç	heterozigot tipi (AC)
150 bç	mutant tipi (CC) göstermiştir.

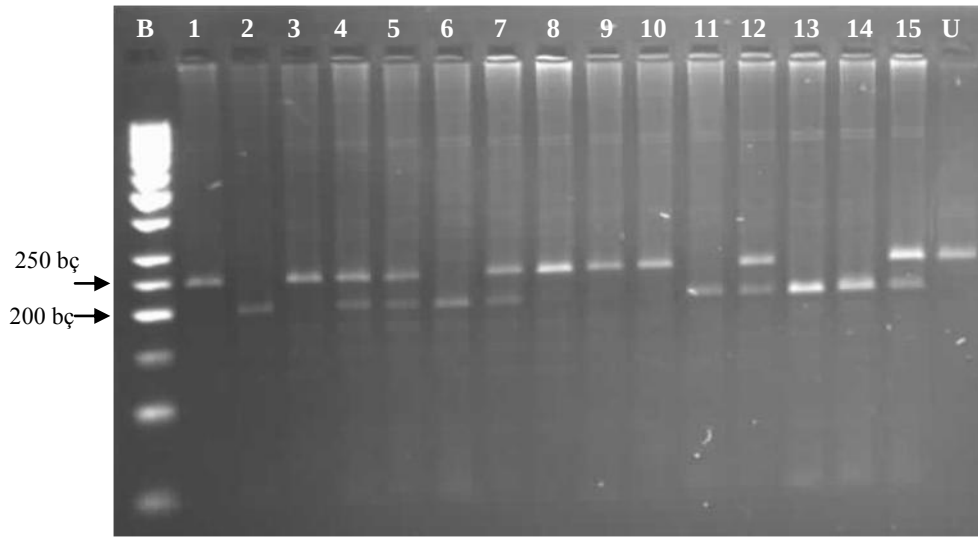


B: 50 bç belirteç, 2, 3, 5-7: homozigot normal tip; 1, 8: heterozigot tip, 4: mutant tip, U: PZR ürünü

Şekil 10. Agaroze jel elektroforezinde yürütüldükten sonra CYP2C9 geni *3 alleleline ait kesim ürünleri

VKORC1 -1639 G/A için PZR ürünleri, NciI enzimi ile bir gece 37⁰C’de inkübe edildikten sonra aşağıdaki kesim sonuçları elde edilmiştir:

197+47 bç	homozigot normal tipi (GG)
244+197+47 bç	heterozigot tipi (GA)
244 bç	mutant tipi (AA) göstermiştir.



B: 50 bç belirteç, 1, 6, 11, 13, 14: homozigot normal tip; 4, 5, 7, 12, 15: heterozigot tip, 1, 3, 8-10: mutant tip, U: PZR ürünü

Şekil 11. Agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra VKORC1 geni -1639 bölgesine ait kesim ürünleri

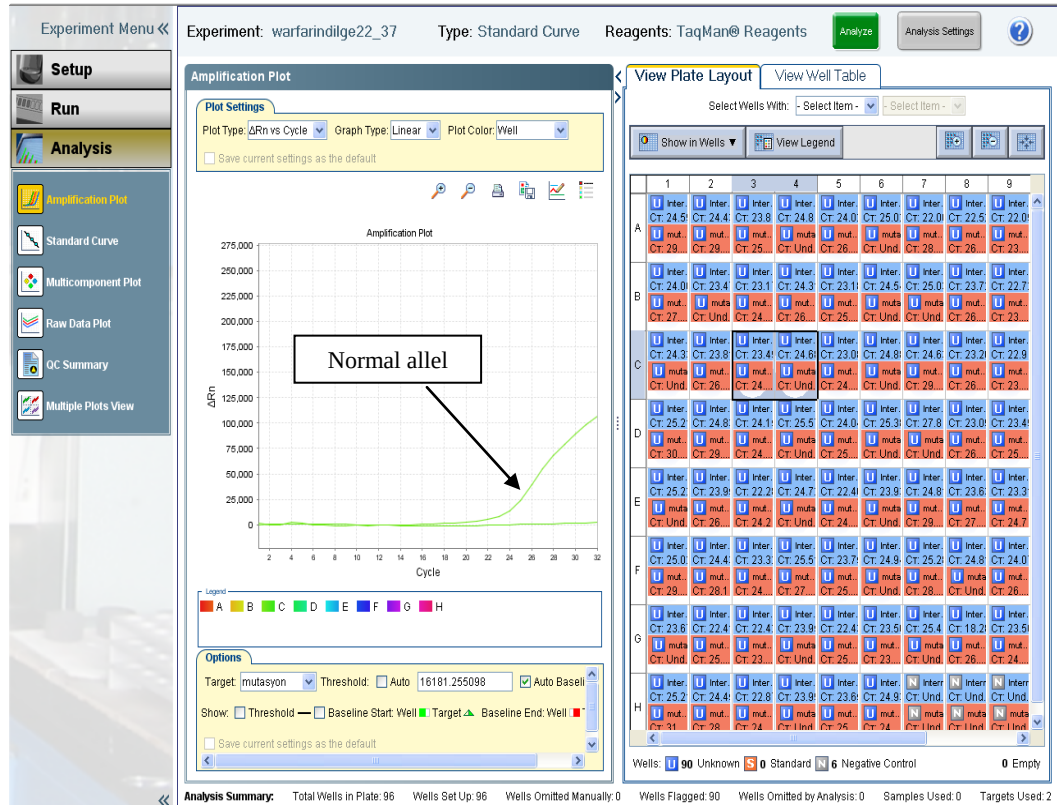
Real time PZR ile Genotiplendirme

CYP2C9 geni *2, *3 ve VKORC1 -1639 G/A bölgelerine spesifik normal ve mutant olmak üzere iki ayrı mastermiks ile çalışıldı. CYP2C9 geni *2 bölgesi c.430C>T; *3 bölgesi c.1075A>C ve VKORC1 bölgesi ise -1639 G>A değişimlerine göre bu primerler hazırlandı. Her 3 bölge için ayrı ayrı olarak 0,2 ml optik PZR tüplerine 20,5 µl hacimde normal ve mutant mastermiksler eklendi, ardından tüplere 0,3 µl Taq DNA polimeraz ve hasta ile kontrollere ait DNA’lar

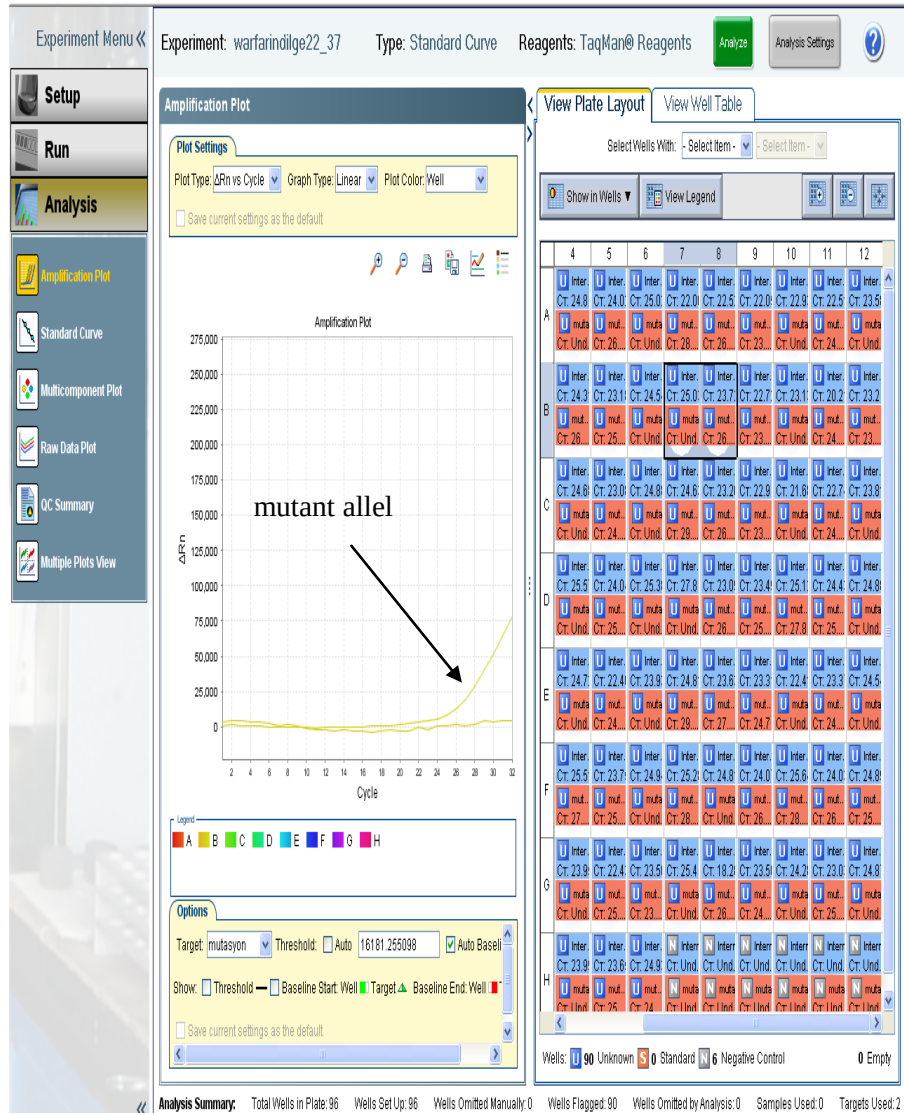
4,5 µl olarak eklendi. Mikropipet ile karışımın iyice karışması sağlandı ve Real time PZR cihazına konularak aşağıdaki program ile çalışıldı. Sonuçlar grafikler eşliğinde değerlendirildi (Şekil 12, 13, 14).

Tablo 14. PZR reaksiyonları derece, süre ve döngü sayıları

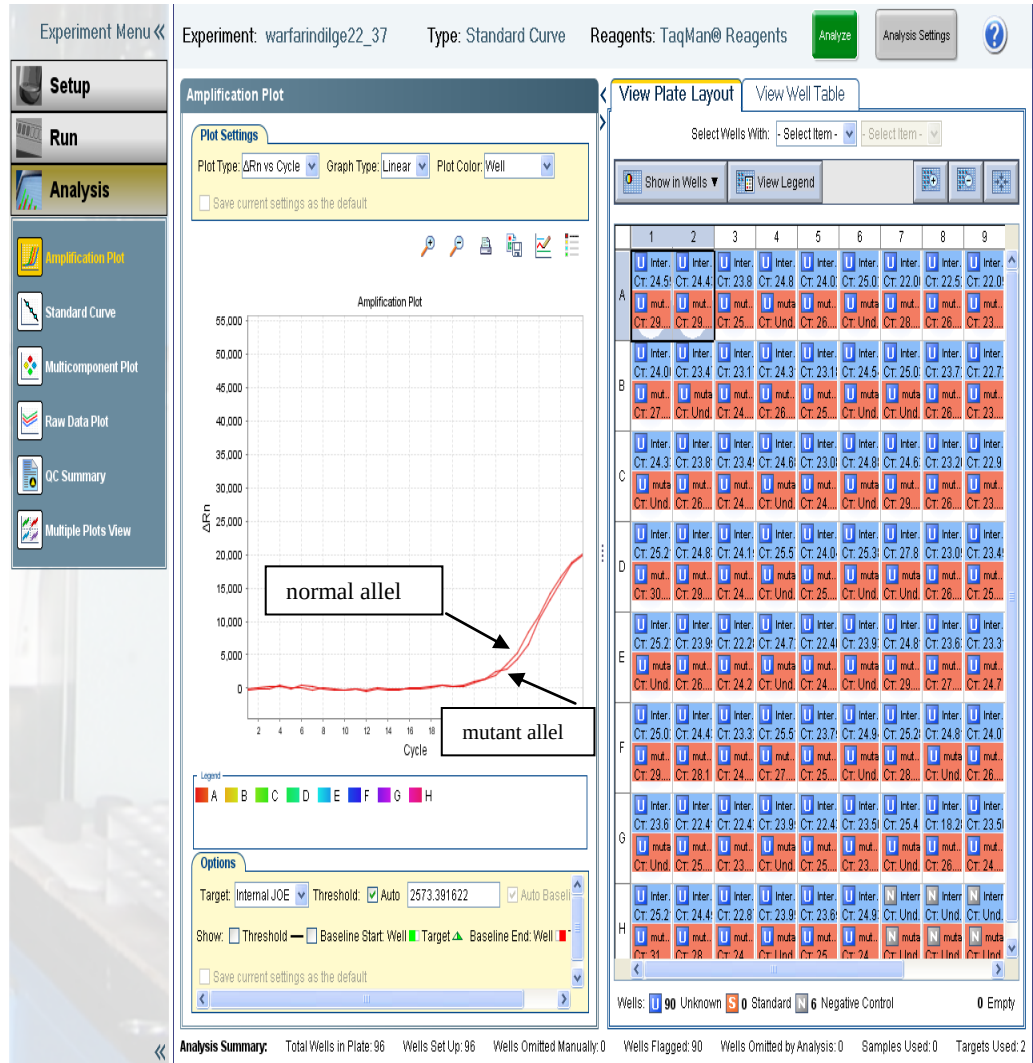
95 °C	10 dk	} 40 döngü
95 °C	10 sn	
60 °C	1 dk	



Şekil 12. CYP2C9 geni *2 bölgesine ait homozigot normal sonucunun Real time PZR görüntüsü



Şekil 13. CYP2C9 geni *3 bölgesine ait mutant tip sonucunun Real time PZR görüntüsü



Şekil 14. VKORC1 -1639 G/A gen bölgesine ait heterozigot tip sonucunun Real time PZR görüntüsü

3.2.3. İdeal warfarin dozu hesaplama

İdeal warfarin dozu hesaplanırken Elizabeth A. Sconce ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmadan faydalanıldı. Bu çalışmada günlük warfarin doz ihtiyacı hastaların boy, yaş, CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve

VKORC1 genetik polimorfizmleri göz önünde bulundurularak bir denklem modeli kurulmuş (2).

$$\sqrt{\text{Doz}} = 0,628 - 0,0135 (\text{Yaş}) - 0,240 (\text{CYP2C9*2}) - 0,370 \\ (\text{CYP2C9*3}) - 0,241 (\text{VKORC1}) + 0,0162 (\text{Boy})$$

Bu denklemde; yaş yıl olarak, boy ise santimetre üzerinden hesaplandı. CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 genotiplerinde homozigot normalse 0, heterozigotsa 1, homozigot mutantsa 2 olarak hesap edilirken, VKORC1 genotipinde ise homozigot normalse 1, heterozigotsa 2, homozigot mutantsa 3 olarak hesap edildi.

3.2.4. INR takibi

Warfarin tedavisi alan 58 hastanın tamamında hedeflenen INR değeri; 2-3 (ortalama 2,5) idi. Hastaların aldığı warfarin dozları ve o dozu alırken saptanan INR değerlerinin takipleri kaydedildi. Hastaların INR değerlerinin 2-3 arasında olduğu sırada aldığı dozlar saptandı ve bu dozların aritmetik ortalamaları alındı. Saptanan ortalama dozlar hesaplanan ideal warfarin dozları ile karşılaştırıldı.

Hastalardan 11 tanesinin verilerinin eksik olması ya da düzenli kontrole gelmemeleri nedeniyle takipleri sırasında hedeflenen INR değeri olan 2-3 arasında bir değere ulaşamadığı görüldü. Bu hastalar verilen doz ile hesaplanan ideal doz arasındaki ilişki saptanırken analiz dışı bırakıldı. İlişkiye 47 hasta üzerinde bakıldı.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizi SPSS (Statistical Package for Social Science) 11.5 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli ölçümlü değişkenler için ortalama, standart sapma, en küçük ve en büyük biçiminde, kategorik değişkenler ise gözlem sayısı ve (%) şeklinde gösterildi. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği Student's t testiyle incelendi. Kategorik değişkenler Pearson'un Ki-Kare testi ya da Tek Değişkenli Lojistik Regresyon analiziyle değerlendirildi. Her bir gen bölgesi içerisinde Hardy Weinberg dengesinin sağlanıp sağlanmadığı kontrol edildi. Her bir gen bölgesi içerisinde genotip ve allel frekansı dağılımı ile hastalık arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olup olmadığı Odds Oranı ve %95 güven aralığı hesaplanarak incelendi. Genotip etkileşimlerinin hastalık üzerindeki etkisi Çoklu Değişkenli Lojistik Regresyon analiziyle araştırıldı. Gruplar içerisinde ideal doz ve verilen doz ortalamaları arasındaki farkın önemliliği Bağımlı t-testiyle incelenirken ideal ve verilen doz düzeylerinin uyumluluğu Sınıfıçı Korelasyon Katsayısı ve %95 güven aralığı hesaplanarak değerlendirildi. $p < 0,05$ için tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. KONTROL GRUBUNUN UYGUNLUĞUNUN SAPTANMASI

Hardey-Weinberg dengesi ile kontrol grubunun uygun olup olmadığına bakıldı ve uyumlu olduğu saptandı. Tablo 15’de uyum analizi sonuçları verilmiştir. Hem hasta hem de kontrol grubunda CYP2C9*2 gen bölgesine ait mutant olgu saptanmadığından analize katılmadı.

Tablo 15. Kontrol Grubu İçerisinde Her Bir Gen Bölgesinde Genotip Dağılımlarına İlişkin Hardy-Weinberg Dengesine Ait Uyum Analizi Sonuçları

Bölgeler	Homozigot normal	Heterozigot	Mutant	χ^2 Değeri	p-değeri
CYP2C9*3				0,002	0,965
Gözlenen Frekans	116	31	2		
Beklenen Frekans	116,1	30,9	2,1		
VKORC1				0,028	0,866
Gözlenen Frekans	44	73	32		
Beklenen Frekans	43,5	74	31,5		

4.2. KONTROL VE HASTA GRUPLARININ DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya katılan warfarin kullanan hasta olguların 31 (%53,4) tanesi erkek, 27 (%46,6) tanesi kız olup yaş ortalaması ise 13,4±4,7 (0,2-18) olarak saptandı. Kontrol grubunun ise 63 (%42,3) tanesi erkek, 86 (%57,7) tanesi kız olup yaş ortalaması 9,7±4,8 (0,5-18) olarak saptandı. Warfarin kullanan hasta olguların yaş ortalaması kontrol grubuna göre daha büyükken, her 2 grubun kız ve erkek dağılımları homojen bulundu (Tablo 16).

Tablo 16. Kontrol ve Hasta Gruplarındaki Olguların Demografik Özellikleri

Değişkenler	Kontrol Grubu (n:149)	Hasta Grubu (n:58)	p-değeri
Yaş	9,7±4,8 (0,5-18)	13,4±4,7 (0,2-18)	<0,001
Cinsiyet			0,147
Kız	86 (%57,7)	27 (%46,6)	
Erkek	63 (%42,3)	31 (%53,4)	

4.3. GENETİK POLİMORFİZM SIKLIKLARI

Çalışmaya katılan hem warfarin kullanan hasta grubunda, hem de sağlıklı gönüllü kontrol grubunda CYP2C9*2 gen bölgesinde homozigot mutant olguya rastlanmadı. Warfarin kullanan hasta grubunda 45 (%77,6) olgu homozigot normalken, 13 (%22,4) olgu heterozigot olarak saptandı. Kontrol grubunda ise 122 (%81,9) olgu homozigot normalken, 27 (%18,1) olgu heterozigot olarak saptandı. CYP2C9*2 genetik polimorfizm sıklığı açısından warfarin kullanan hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

CYP2C9*3 genetik polimorfizmi açısından bakıldığında; warfarin kullanan olgularda 31 (%53,4) olgu homozigot normalken, 25 (%43,1) olgu heterozigot, 2 (%3,4) olgu da mutant olarak saptandı. Kontrol grubunda ise 116 (%77,9) olgu homozigot normalken, 31 (%20,8) olgu heterozigot, 2 (%1,3) olgunun da mutant olduğu gösterildi. CYP2C9*3 gen bölgesinde, kontrol grubuna kıyasla warfarin kullanan hasta grubunda heterozigot genotip anlamlı olarak yüksek saptandı.

VKORC1 genetik polimorfizmine bakıldığında; warfarin kullanan hasta grubunda 11 (%19,0) olgu homozigot normalken, 36 (%62,1) olgu heterozigot, 11 (%19,0) olgu da mutant olarak saptandı. Kontrol grubunda ise 44 (%29,5) olgu

homozigot normalken, 73 (%49,0) olgu heterozigot, 32 (%21,5) olgunun da mutant olduğu gösterildi. VKORC1 genetik polimorfizm sıklığı açısından warfarin kullanan hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. Tablo 17’de detaylı olarak gösterilmiştir.

Tablo 17. Kontrol ve Hasta Gruplarına Göre Her Bir Gen Bölgesi İçerisinde Genotipler Yönünden Olguların Dağılımı

Bölgeler	Genotip	Kontrol Grubu (n:149)	Hasta Grubu (n:58)	p-değeri	Odds Oranı (%95 Güven Aralığı)
CYP2C9*2	Homozigot normal	122 (%81,9)	45 (%77,6)	-	1,000
	Heterozigot	27 (%18,1)	13 (%22,4)	0,482	1,305 (0,620-2,749)
CYP2C9*3	Homozigot normal	116 (%77,9)	31 (%53,4)	-	1,000
	Heterozigot	31 (%20,8)	25 (%43,1)	<0,001	3,018 (1,561-5,834)
	Mutant	2 (%1,3)	2 (%3,4)	0,196	3,742 (0,507-27,639)
	H/M	33 (%22,1)	27 (%46,5)	<0,001	3,062 (1,607-5,834)
VKORC1	Homozigot normal	44 (%29,5)	11 (%19,0)	-	1,000
	Heterozigot	73 (%49,0)	36 (%62,1)	0,085	1,973 (0,912-4,269)
	Mutant	32 (%21,5)	11 (%19,0)	0,512	1,375 (0,531-3,562)
	H/M	105 (%70,5)	47 (%81,1)	0,122	1,790 (0,850-3,771)

H/M: Heterozigot/Mutant

Hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubundaki genetik polimorfizmler tek tek saptandıktan sonra daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırmak amacıyla CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 gen bölgeleri birlikte ele alındı. Hasta grubunda CYP2C9 allel dağılımları; *1/*1 %37,9, *1/*3 %36,2, *3/*3 %3,4, *1/*2 %15,5, *2/*3 %6,9 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda ise CYP2C9*1/*1 %61,1, *1/*3 %19,5, *3/*3 %1,3, *1/*2 %16,8, *2/*3 %1,3 olarak saptandı. Tablo 18’de

kontrol ve hasta gruplarında ayrı ayrı CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 birlikte ele alındığında saptanan sonuçlar detaylı olarak gösterilmektedir.

Tablo 18. Hasta ve kontrol gruplarında CYP2C9*2 ile CYP2C9*3 birlikte ele alındığında saptanan genetik polimorfizm sıklıkları

Haplotipler	Kontrol Grubu (n:149)	Hasta Grubu (n:58)	p-değeri	Odds Oranı (%95 Güven Aralığı)
CYP2C9*1/*1	91 (%61,1)	22 (%37,9)	-	1,000
CYP2C9*1/*3	29 (%19,5)	21 (%36,2)	0,003	2,995 (1,444-6,213)
CYP2C9*3/*3	2 (%1,3)	2 (%3,4)	0,167	4,136 (0,552-31,011)
CYP2C9*1/*2	25 (%16,8)	9 (%15,5)	0,382	1,489 (0,610-3,637)
CYP2C9*2/*3	2 (%1,3)	4 (%6,9)	0,019	8,273 (1,423-48,089)

CYP2C9*1/*1 homozigot normal, CYP2C9*1/*2 ve CYP2C9*1/*3 heterozigot, CYP2C9*3/*3 mutant, CYP2C9*2/*3 bitişik heterozigot

Warfarin kullanan 58 çocuk hasta ile warfarin kullanmayan 149 kontrol grubundaki çocuklar beraber ele alındığında, toplam 207 olguya göre Türk Toplumundaki pediatrik yaş grubunda genetik polimorfizm sıklıkları saptandı. CYP2C9*2 gen bölgesinde homozigot mutant olguya rastlanmadı. Homozigot normal %80,7, heterozigot olgular %19,3 olarak hesaplandı. CYP2C9*3 gen bölgesinde, homozigot normal %71,0, heterozigotlar %27,1 ve mutant olgular %1,9 saptandı. VKORC1 gen bölgesinde ise, homozigot normal %26,6, heterozigotlar %52,7 ve mutant olguların %20,8 oranında olduğu görüldü (Tablo 19).

Tablo 19. Tüm Olgular İçerisinde Her Bir Gen Bölgesine Göre Genotipler Yönünden Olguların Dağılımı

Bölgeler	n (%)
CYP2C9*2	
Homozigot normal	167 (80,7)
Heterozigot	40 (19,3)
CYP2C9*3	
Homozigot normal	147 (71,0)
Heterozigot	56 (27,1)
Mutant	4 (1,9)
H/M	60 (29,0)
VKORC1	
Homozigot normal	55 (26,6)
Heterozigot	109 (52,7)
Mutant	43 (20,8)
H/M	152 (73,5)

H/M: Heterozigot/Mutant

Önceki çalışmalarla karşılaştırmak amacıyla tüm popülasyonda CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 gen bölgeleri birlikte ele alındı. CYP2C9 allel dağılımları; *1/*1 54,6%, *1/*3 %24,2, *3/*3 %1,9, *1/*2 %16,4, *2/*3 %2,9 olarak hesaplandı (Tablo 20).

Tablo 20. Tüm Olgular İçerisinde CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 Gen Etkileşimine Göre Olguların Frekans Dağılımı

Haplotip	Olgu Sayısı (n:207)	Yüzde (%)
CYP2C9*1/*1	113	54,6
CYP2C9*1/*3	50	24,2
CYP2C9*3/*3	4	1,9
CYP2C9*1/*2	34	16,4
CYP2C9*2/*3	6	2,9

CYP2C9*1/*1 homozigot normal, CYP2C9*1/*2 ve CYP2C9*1/*3 heterozigot, CYP2C9*3/*3 mutant, CYP2C9*2/*3 bitişik heterozigot

4.4. ALLEL FREKANSI DAĞILIMI

CYP2C9*3 gen bölgesi için A nükleotidi yabancı alleli, C nükleotidi ise mutant alleli göstermektedir. C alleli sıklığı warfarin kullanan hasta grubunda %25 iken, warfarin kullanmayan kontrol grubunda %11,7 sıklıkta saptanması anlamlı bir fark olduğunu gösterdi ($p<0,001$).

VKORC1 gen bölgesi için G nükleotidi yabancı alleli, A nükleotidi ise mutant alleli göstermektedir. Allel frekanslarına bakıldığında, warfarin kullanan hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p-değeri: 0,461) (Tablo 21).

Tablo 21. Kontrol ve Hasta Gruplarına Göre Her Bir Gen Bölgesi İçerisinde Allel Frekansı Yönünden Olguların Dağılımı

Bölgeler	Kontrol Grubu (n:298)	Hasta Grubu (n:116)	p- değeri	Odds Oranı (%95 Güven Aralığı)
CYP2C9*3				
Homozigot normal	263 (%88,3)	87 (%75,0)	-	1,000
Mutant	35 (%11,7)	29 (%25,0)	<0,001	2,505 (1,447-4,335)
VKORC1				
Homozigot normal	161 (%54,0)	58 (%50,0)	-	1,000
Mutant	137 (%46,0)	58 (%50,0)	0,461	1,175 (0,765-1,805)

4.5. İDEAL DOZ-VERİLEN DOZ KARŞILAŞTIRMASI

Warfarin kullanan hastaların yaş, boy, CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerine göre hesapladığımız ideal warfarin dozları ile verilen doz ortalamaları karşılaştırıldığında ideal dozlar tüm gruplarda daha yüksek olarak saptandı. Hastalar genotiplerine göre gruplandırıldı ve tüm olgularda total ortalama dozlar hesaplandı. Sonuçlar tablo 22’de detaylı olarak gösterilmiştir.

Tablo 22. Tüm Olgular İçerisinde ve Genotiplere Göre İdeal Doz ile Verilen Doz Ortalamalarının Karşılaştırılması

Değişkenler	İdeal Doz	Verilen Doz	p-değeri	Fark
CYP2C9*2				
Homozigot normal	5,18±1,63	4,35±1,25	<0,001	0,83±1,14
Heterozigot	4,06±1,74	3,67±1,38	0,193	0,38±0,86
CYP2C9*3				
Homozigot normal	5,22±1,73	4,40±1,39	<0,001	0,82±0,99
Heterozigot	4,76±1,60	3,98±1,13	0,003	0,77±1,00
VKORC1				
Homozigot normal	5,81±1,99	4,80±1,55	0,035	1,01±1,09
Heterozigot	5,00±1,58	4,26±1,24	<0,001	0,75±0,97
Mutant	4,05±1,54	3,58±1,09	0,328	0,47±1,45
Tüm Olgular	4,94±1,70	4,21±1,29	<0,001	0,73±1,09

CYP2C9*2 gen bölgesi için polimorfizm bulunmayan olgularda, ideal doz ortalaması 5,18±1,63 iken, verilen doz ortalaması 4,35±1,25 olarak bulundu. Dozlar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). CYP2C9*2 gen bölgesi için polimorfizm bulunan heterozigot olgularda ise, ideal doz ortalaması 4,06±1,74 iken, verilen doz ortalaması 3,67±1,38 olarak bulundu. Arada anlamlı fark saptanmadı, korele oldukları görüldü.

CYP2C9*3 gen bölgesi için homozigot olgularda, ideal doz ortalaması 5,22±1,73 iken, verilen doz ortalaması 4,40±1,39, heterozigot olgularda ise ideal doz ortalaması 4,76±1,60, verilen doz ortalaması 3,98±1,13 bulundu. Homozigot olgular için de heterozigot olgular için de dozlar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$).

VKORC1 gen bölgesi için homozigot olgularda, ideal doz ortalaması 5,81±1,99 iken, verilen doz ortalaması 4,80±1,55, heterozigotlarda ideal doz

ortalaması $5,00 \pm 1,58$, verilen doz ortalaması $4,26 \pm 1,24$, mutantlarda ideal doz ortalaması $4,05 \pm 1,54$, verilen doz ortalaması $3,58 \pm 1,09$ bulundu. Homozigot ve heterozigotlarda dozlar arasında anlamlı fark saptanırken, mutant olgularda dozlar arasında uyum olduğu görüldü.

Tüm olgular içerisinde ve genotiplere göre ideal doz ile verilen doz düzeylerine ait sınıf içi korelasyon katsayısına göre uyum analizi yapıldı. Sınıf içi korelasyon katsayısı bize verdiğimiz doz ile ideal doz arasındaki uyumu gösterdi ve tüm olgular ele alındığında 0,64 saptandı. Sonuç olarak ideal doz ile verilen doz arasında yeterince uyum bulunduğu görüldü (Tablo 23).

VKORC1 gen bölgesi mutant olan olgularda sınıf içi korelasyon katsayısı 0,407 saptandı. Bu sonuç uyum olmadığını göstermemektedir çünkü bu gruptaki olgu sayımız yeterli değildi.

Tablo 23. Tüm Olgular İçerisinde ve Genotiplere Göre İdeal Doz ile Verilen Doz Düzeylerine Ait Uyum Analizi Sonuçları

Değişkenler	Sınıf içi Korelasyon	%95 Güven Aralığı	p-değeri
CYP2C9*2			
Homozigot normal	0,570	0,308-0,752	<0,001
Heterozigot	0,838	0,500-0,956	<0,001
CYP2C9*3			
Homozigot normal	0,692	0,427-0,848	<0,001
Heterozigot	0,626	0,262-0,836	<0,001
VKORC1			
Homozigot normal	0,699	0,110-0,930	0,013
Heterozigot	0,654	0,388-0,821	<0,001
Mutant	0,407	<0-0,808	0,097
Tüm Olgular	0,645	0,444-0,785	<0,001

5. TARTIŞMA

Warfarin tüm dünyada sık olarak tercih edilen bir ilaçtır. Pediatrik hastalarda warfarin tedavisi endikasyonları arasında venöz tromboemboliler ve mekanik prostetik kalp kapağı ön planda yer almaktadır (39). Bir ilacın dozunun ayarlanması sırasındaki hedefler ilacın etkisini en üst düzeyde tutmak ve yan etkileriyle karşılaşmamaktır. Bunu başarmak özellikle warfarin gibi terapötik indeksi dar ilaçlar için daha zordur. Warfarin tedavisinin özellikle başlangıç aşamasında yüksek oranda ciddi kanama komplikasyonlarıyla karşılaşmaktadır (2). Fakat hem terapötik aralığının darlığı hem de doz ihtiyacının çok değişken olması nedeniyle warfarin, son zamanlarda farmakogenetik çalışmaların önemli bir ilacı durumuna gelmiştir (64). Warfarine bağlı majör kanama komplikasyonu ortaya çıkma oranı %12, kanamaya bağlı mortalite oranı ise %2 olarak belirlenmiştir (108). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından warfarinin 1990-2000 yılları arasında en fazla ciddi yan etkiye neden olan ilk 10 ilaç arasında olduğu gösterilmiş ve warfarin başlangıç dozunun CYP2C9 ve VKORC1 genotipleri göz önünde bulundurularak ayarlanması önerilmiştir (39, 109). Bütün bu nedenlerden dolayı warfarin tedavisinin özellikle başlangıç aşamasında sık aralıklarla INR takibi yapılması önemlidir (88).

Warfarinin -S- ve -R- olmak üzere iki adet enantiyomeri bulunmaktadır. Antikoagülan etkide S-warfarin, R-warfarine göre 5 kat daha potenttir. S-warfarin CYP2C9 ile metabolize olurken, R-warfarin CYP1A2, CYP2C19 ve CYP3A4 ile metabolize olmaktadır (39). Bu nedenle S-warfarin klirensine katkıda bulunan

etkenlerin; yaşı, genotip ve vücut yüzey alanı, R-warfarin klirensine katkıda bulunan etkenlerin; yaşı ve vücut yüzey alanı olduğu gösterilmiştir (2).

Warfarin metabolizması, CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmleri dışında yaşı, ırk, vücut ağırlığı, vücut alanı, boy, cinsiyet, ilaç etkileşimleri, ek hastalıklar, sigara, alkol, diyetle alınan K vitamini miktarından etkilenmektedir (64, 66). Önceki yapılan çalışmalarda warfarin doz ihtiyacının, genetik polimorfizm ve boyu hesaba katmaksızın, 20-90 yaşları arasında her on yılda 0,5-0,7 mg azaldığı gösterilmiştir (2). Yaşı faktörü yaşlandıkça warfarin metabolizmasındaki azalma ile bağdaştırılabilir (110).

Literatürde erişkin yaşı grubunda yapılmış, warfarin doz ihtiyacının genetik polimorfizmlerle ilişkisi hakkında bir çok çalışma bulunmasına rağmen pediatrik yaşı grubunda yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Bizim çalışmamız hem pediatrik yaşı grubunda yapılan nadir çalışmalardan biri hem de Türk Toplumundaki pediatrik yaşı grubunda yapılan ilk çalışma olması nedeniyle büyük öneme sahiptir. Yuya Kato ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada Japon pediatrik hastalarda, VKORC1 genetik polimorfizminin ve yaşı warfarin doz ihtiyacını etkileyen en önemli iki faktör oldukları belirtilmiştir (107). Rieder ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmleri beraber ele alındığında doz ihtiyacını %50-60 değiştirebilmektedir. Fakat doz ihtiyacını belirlemede VKORC1 genetik polimorfizminin CYP2C9'dan daha önemli olduğu gösterilmiştir (111). Michelson ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptığı çalışmada; hedef INR olan 2-3 aralığına ulaşmak için infantlarda ortalama 0,32 mg/kg/gün, ergenlerde ise

ortalama 0,09 mg/kg/gün warfarin tedavisi verilmesi gerektiği belirtilmiştir (112). Puehringer ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada warfarin dışındaki kumarinlerden fenprokumunun doz gereksinimini etkileyen en önemli faktörün de VKORC1 -1639 G>A genetik polimorfizmi olduğu gösterilmiştir. İkinci en etkili faktörün yaş olduğu belirtilmiş, CYP2C9*3 genetik polimorfizmi ise üçüncü sırayı almıştır (113).

Sconce ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerinin warfarin doz ihtiyacına etkisi araştırılmış. Hem CYP2C9 hem de VKORC1 (-1639) gen bölgelerindeki mutasyonların belirgin bir biçimde doz ihtiyacını azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre warfarin doz gereksinimi ile cinsiyet arasında bir ilişki saptanamamıştır fakat yine de erkeklerin doz ihtiyaçları daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni ise erkeklerin vücut yüzey alanı ve boylarının daha fazla olmasıdır. Bu çalışmada; yaş, boy, CYP2C9 ve VKORC1 genotiplerinin warfarin idame dozunu hesaplamada en yol gösterici etkenler olduğu saptanmış ve formül oluşturulmuştur (2). Biz de çalışmamızda bu formülü esas alarak ideal warfarin dozlarını hesapladık.

Muszkat ve arkadaşlarının 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada homozigot normal ile karşılaştırıldığında CYP2C9*3 heterozigot allelik varyantına sahip kişilerin %33 daha düşük warfarin dozuna ihtiyaç duydukları gösterilmiştir. Düşük warfarin dozuna ihtiyaç duymalarına rağmen takiplerinde yüksek INR değerleri saptandığı ve kanama komplikasyonu geliştirme konusunda daha yüksek risk altında oldukları belirtilmiştir. Yine bu çalışmada CYP2C9*2

heterozigot allelik varyantına sahip kişilerin ise homozigot normalden daha yüksek fakat CYP2C9*3 heterozigot allelik varyantından daha düşük warfarin dozlarına ihtiyaç duydukları gösterilmiştir. Yine bu çalışmada antibiyotik tedavisi ile birlikte warfarin kullanırken daha düşük dozlara ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (3). Biz de çalışmamızda bunu göz önünde bulundurarak warfarin metabolizmasını etkileyecek ilaç kullanımı olmayan hastaları çalışmaya dahil ettik.

Literatürde CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 genetik polimorfizmlerinin warfarin doz ihtiyacını azalttığını gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Sanderson ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmaya göre; CYP2C9*2 genetik polimorfizmine sahip kişilerde doz gereksinimi %17, CYP2C9*3 genetik polimorfizmine sahip kişilerde ise doz gereksinimi %37 azalmaktadır (114). Yine Lindh ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış oldukları 8000 hastayı kapsayan çalışmada CYP2C9 *1/*1 (homozigot normal) diğer taşıyıcılarla karşılaştırılmıştır. Buna göre; doz gereksinimlerinin CYP2C9 *1/*2’de %19,6, *1/*3’de %33,7, *2/*2’de %36,0, *2/*3’de %56,7, *3/*3’de ise %78,1 oranlarında azaldığı gösterilmiştir (115). Biz çalışmamızda ideal doz gereksinimlerini hesap ederken CYP2C9 dışında, VKORC1 genetik polimorfizmini, yaş ve boyu da göz önünde bulundurduk. Hastalara verilen dozlara bakıldığında, ortalama miktarların homozigot normallere oranla genetik polimorfizmi olanlarda daha az olduğunu gördük. Tablo 20’de detaylı olarak gösterilen bulgular kısaca; CYP2C9*2’de mutasyon yokken verilen ortalama doz; $4,35 \pm 1,25$, varken verilen ortalama doz ise; $3,67 \pm 1,38$. Yine CYP2C9*3’de

mutasyon yokken verilen ortalama doz; $4,40 \pm 1,39$, varken verilen ortalama doz ise; $3,98 \pm 1,13$ olarak bulundu.

Özer ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerinin warfarin başlangıç dozunu hesaplamada en önemli faktörler oldukları gösterilmiştir. VKORC1 geninde belirlenmiş bir çok polimorfizm warfarin doz gereksinimini değiştirebilmektedir. Ancak Özer ve arkadaşları VKORC1 -1639 G>A polimorfizminin en önemli role sahip olduğunu belirtmiş ve bu polimorfizm üzerine çalışmışlardır (87). Yine Gin Gin Gan ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada, VKORC1 -1639 G>A gen bölgesinde GG genotipine sahip hastaların en yüksek, AG genotipine sahip hastaların orta, AA genotipine sahip hastaların ise en düşük miktarda warfarin doz gereksinimleri olduğu gösterilmiştir (88). Biz de çalışmamızda VKORC1 -1639 G>A polimorfizminin warfarin doz gereksinimlerine etkisini araştırdık. Ayrıca Özer ve arkadaşlarının çalışmasında CYP2C9 homozigot normallerde terapötik INR seviyelerine ulaşmanın daha uzun zaman aldığı belirtilirken Limdi ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada ise CYP2C9 veya VKORC1 genetik polimorfizmlerinin bu süreyi etkilemediği gösterilmiştir (116). Bu farklı sonuçlar tedaviye başlama dozları, tedaviyi devam ettirme protokolleri ve warfarin ile etkileşim gösteren diğer ilaçların kullanımı ile açıklanabilmektedir.

Nowak-Göttl ve arkadaşlarının 2010 yılında pediatrik yaş grubunda yapmış oldukları çalışmada warfarin doz ihtiyacına etki eden en önemli faktörün yaş olduğunu göstermişlerdir. Yaş faktörü ile dozdaki varyasyonu %28,3, CYP2C9 genetik polimorfizmi ile %0,4 ve VKORC1 genetik polimorfizmi ile

doz değişimini %3,7 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada yaşı warfarin doz ihtiyacına etkisinin pediatrik yaş grubu ile erişkin yaş grubu arasında farklılık gösterdiği de belirtilmiştir. Pediatrik yaş grubunda yaş faktörü ile doz varyasyonu %28,3 iken, erişkinlerde bu oran %4-%21 arasında değişmektedir. Erişkin yaş grubunda warfarin doz gereksiniminde en etkili faktörün, CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerinin birlikte ele alınması olduğu gösterilmiştir (2, 4, 105). Biz de çalışmamızda hem yaşı hem de iki genetik polimorfizmi birden göz önünde bulundurarak ideal dozlarımızı hesapladık.

Genel olarak, beyaz ırkta CYP2C9 genetik polimorfizmi Asya nüfusuna göre daha yüksek oranda bulunmaktadır (117, 118). Yoon ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada Asya nüfusundaki düşük CYP2C9 polimorfizm oranı Kore nüfusunda kanıtlanmıştır (86). Fakat diğer bir çalışmada Japonlar'da hesaplanan ortalama idame warfarin dozu beyaz ırktan %31 daha düşüktür (117, 118). Bu durum doz ihtiyacının sadece CYP2C9 genotipine göre hesaplanamayacağını, VKORC1 genetik polimorfizminin ve genetik olmayan daha bir çok etkenin de göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir. Botton ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada warfarin kullanan hastaların aldıkları ekstra ilaç tedavilerinin warfarin doz gereksiniminde oldukça önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (69). Yine Zhong ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada; CYP2C9 enziminin orta derecede inhibitörü olan amiodaron ve simvastatin ayrıca CYP2C9 enziminin kuvvetli inhibitörü olan flukonazol kullanımı ile birlikte warfarin kullanan hastalarda aşırı antikoagölasyonun ortaya çıktığı bunun da kanama riskini arttırdığı gösterilmiştir

(81). Bizim çalışmamızda warfarin ile etkileşen (CYP2C9 ile metabolize olan) ilaç (amiodaron, azol grubu, statinler, HMG CoA redüktaz inhibitörleri) ve sigara kullanımı, karaciğer hastalığı olan hastalar sorgulandı. Kullanmak zorunda olanlar çalışma dışında bırakıldı. Daha önce yapılmış bir çok çalışma bunu göz ardı etmiştir.

Bizim çalışmamızda warfarin kullanan 58 çocuk olguda ve 149 sağlıklı çocukda CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerinin incelenmesi ve warfarin tedavisinde bu genlerin etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerinin Türk Toplumu'nda pediatrik yaş grubundaki sıklıkları saptandı. Elde edilen sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldı.

Babaoğlu ve arkadaşlarının 2004 yılında 93 olguda yapmış oldukları çalışmada Türk Toplumu'nda CYP2C9 allelik varyantlarını PZR-RFLP yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre CYP2C9*1/*1 varyant frekansı %68,2 ve diğer varyantların (*1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3 ve *3/*3) frekansları %31,8 olarak bulunmuştur (119). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kontrol grubunda CYP2C9*1/*1 frekansı %61,1, diğer varyantların frekansı %38,9 olarak saptanmıştır. Babaoğlu ve arkadaşlarının çalışması ile bezerlik göstermektedir. Fakat, warfarin kullanan hasta grubuna baktığımızda; CYP2C9*1/*1 allel frekansı %37,9 ve diğer varyantların frekansı %62,1 olarak saptanmıştır. Burada farkı yaratan en büyük etken; warfarin kullanan çocuklarda CYP2C9*1/*3 varyantının sağlıklı kontrol grubuna kıyasla çok daha yüksek oranda görülmesidir. Bu sonuçlar warfarin kullanan çocuklarda CYP2C9 mutasyon oranının daha yüksek

olduğunu kanıtlamakla beraber, mutasyonu olan kişilerin warfarin kullanma endikasyonu olan hastalıklara daha yatkın olduğu fikrini de doğrulamaktadır.

Aynacıoğlu ve arkadaşlarının 1999 yılında PZR-RFLP yöntemini kullanarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yaptıkları çalışmayla bizim çalışmamızı kıyasladığımızda da aynı sonuçlarla karşılaşılmıştır. Aynacıoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında Türk Toplumu'nda CYP2C9 *1/*1 varyant frekansı %61,72, diğer genotip varyantların frekansı ise (*1/*2 için %18,04, *2/*2 için %1, *1/*3 için %17,23, *2/*3 için %1,1 ve *3/*3 için %0,8) %38,28 olarak saptanmıştır (83). Bu oranlar ile bizim yapmış olduğumuz çalışmadaki sağlıklı kontrol grubunun varyant sıklıkları benzerlik göstermektedir. Fakat warfarin kullanan hasta grubunda CYP2C9*1/*1 daha düşük oranlarda gözlenirken özellikle CYP2C9*1/*3 varyantı daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Tüm olgulara baktığımızda bizim çalışmamızın oranları; CYP2C9 *1/*1 için %54,6, *1/*2 için %16,4, *1/*3 için %24,2, *2/*3 için %2,9 ve *3/*3 için %1,9 olarak saptandı. Tüm popülasyon sonuçlarını Aynacıoğlu ve arkadaşlarının sonuçları ile karşılaştırdığımızda; bizim çalışmamızda *1/*3 ve *2/*3 varyant frekansları daha yüksek saptanırken, *2/*2 varyantına rastlanmadı.

Nowak-Göttl ve arkadaşlarının beyaz ırk pediatrik hasta grubu üzerinde yaptıkları, CYP2C9 polimorfizm sıklıklarını araştıran çalışma ile bizim çalışmamızı karşılaştırdık. Buna göre; beyaz ırkta CYP2C9 *1/*1 (homozigot normal) insidansı Türk Toplumu'ndaki pediatrik yaş grubuna göre daha yüksek oranda saptanırken, *1/*3, *2/*3 ve *3/*3 allel frekansları bizim çalışmamızda

daha yüksek oranlarda saptandı (4). Yani Türk Toplumu'nda CYP2C9*3 genetik polimorfizmi daha yüksek oranda bulunmaktadır.

CYP2C9 genetik polimorfizminin Asya Toplumu'ndaki sıklıkları ile bizim çalışmamıza göre Türk Toplumu'ndaki sıklıklarını karşılaştırdık. Nasu ve arkadaşlarının Japon Toplumu'nda yaptıkları, Yoon ve arkadaşlarının Koreliler'de yaptıkları ve Gin Gin Gan ve arkadaşlarının Çin, Malezya ve Hindistan Toplumlari'nda yaptıkları çalışmalara göre Asyalılar'da genel olarak CYP2C9 *1/*1 (homozigot normal) sıklıkları %90'ın üzerinde saptanırken, bizim çalışmamızda kontrol grubunda %61,1, hasta grubunda ise %37,9 olarak saptanmıştır (85, 86, 88). Bu da Türk Toplumu'nda Asyalılar'a oranla CYP2C9 genetik polimorfizm sıklığının çok daha yüksek oranda görüldüğünü göstermektedir.

Arvanitidis ve arkadaşlarının Yunan Toplumu'nda, Hamdy ve arkadaşlarının da Mısır Toplumu'nda yaptıkları, CYP2C9 genetik polimorfizm sıklıklarını gösteren çalışmalarla bizim çalışmamız karşılaştırıldığında allel frekansları benzer oranlarda bulunmuştur (71, 81, 88). Bu da Türk Toplumu ile Yunan ve Mısır Toplumu'ndaki CYP2C9 genetik polimorfizm sıklıklarının birbirine yakın oranlarda olduğunu göstermektedir.

Dünyada farklı toplumlarda CYP2C9 genotip frekanslarının belirlenmesi amacıyla yapılan birçok çalışma mevcuttur (Tablo 11). CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 genotip frekansları etnik gruplar arasında yüksek oranda değişiklik göstermektedir. Bizim çalışmamıza göre CYP2C9*2 ve *3 genotip frekansları açısından en yakın benzerlik Avrupa toplumları ile görülmektedir.

Özgön ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada Türk Toplumunda VKORC1 -1639 G/G normal genotipe sahip bireylerin frekansı %28,8, -1639 G/A heterozigot genotipe sahip bireylerin frekansı %42,4 ve -1639 A/A homozigot mutant genotipe sahip bireylerin frekansı %28,8 olarak saptanmıştır (103). Bu çalışma Türk Toplumunda VKORC1 genotipleri üzerine yapılan ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Özgön ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ile bizim çalışmamızın VKORC1 genotip frekansları açısından dağılımları benzerlik göstermektedir. Fakat, biz çalışmamızda sağlıklı kontrol grubu ve warfarin kullanan hasta grubu VKORC1 genotip frekanslarını ayrı ayrı hesapladık. Sağlıklı gönüllü kontrol grubunda VKORC1 -1639 G/G homozigot normal %29,5, -1639 G/A heterozigot %49,0 ve -1639 A/A homozigot mutant %21,5 oranlarında bulunurken, warfarin kullanan hasta çocuklarda VKORC1 -1639 G/G homozigot normal %19,0, -1639 G/A heterozigot %62,1 ve -1639 A/A homozigot mutant %19,0 oranlarında saptandı. Bu sonuçlar aynen CYP2C9 geninde olduğu gibi, warfarin kullanan çocuklarda VKORC1 mutasyon oranının daha yüksek olduğunu kanıtlamakla beraber, mutasyonu olan kişilerin warfarin kullanma endikasyonu olan hastalıklara daha yatkın olduğu fikrini de doğrulamaktadır. Çalışmamızda hasta grubu ve kontrol grubunu beraber yani tüm popülasyonu ele aldığımızda ise oranlar; VKORC1 homozigot normal %26,6, heterozigot %52,7 ve homozigot mutant %20,8 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre genel olarak bizim çalışmamızda heterozigot olguların frekansı daha yüksek saptanırken, Özgön ve arkadaşlarının çalışmasında homozigot mutant olguların frekansının daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Özer ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada Türk Toplumundaki VKORC1 genetik polimorfizm sıklıkları; homozigot normal %36, heterozigot %47 ve homozigot mutant %17 oranlarında bulunmuştur (87). Biz de çalışmamızda benzer oranlar bulmakla beraber, genel olarak homozigot normal sıklığını daha düşük, homozigot mutant sıklığını ise daha yüksek saptadık. Yine Özer ve arkadaşlarının çalışmasında Türk Toplumundaki VKORC1 allel frekansları Asya ırklarından ve Afrikalı Amerikalılar'dan oldukça farklı bulunup, beyaz ırka yakın oranda saptanmıştır (87). Bu sonuçlar Özgön ve arkadaşlarının çalışmasıyla da benzerlik göstermektedir (103).

Biz de çalışmamızda Türk Toplumundaki VKORC1 allel frekansları ile diğer toplumlardaki sıklıkları karşılaştırdık. Nowak-Göttl ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada beyaz ırk pediatrik yaş grubundaki VKORC1 genetik polimorfizm sıklıkları saptanmıştır. Bulunan sonuçlarla bizim sonuçlarımızı karşılaştırdık. Beyaz ırka oranla Türk Toplumunda pediatrik yaş grubundaki homozigot normal sıklığının daha düşük, heterozigot sıklığının hemen hemen aynı, homozigot mutant sıklığının ise belirgin biçimde daha yüksek olduğunu gördük (4). Yine Sconce ve arkadaşlarının 2005 yılında erişkin yaş grubundaki beyaz ırkta yapmış oldukları çalışmadaki oranlarla Türk Toplumundaki VKORC1 allel frekans oranlarını karşılaştırdığımızda Nowak-Göttl ve arkadaşlarının çalışmasına kıyasla sıklıkların çok daha benzer olduğunu gördük (2). Wadelius ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada beyaz ırktaki VKORC1 allel frekansları ortaya konmuştur. Saptanan sonuçlar ile kendi çalışmamızın sonuçlarını karşılaştırdığımızda, aynen Özer ve Özgön'ün

çalışmalarında bulduğu gibi, Türk Toplumu'ndaki VKORC1 allel frekanslarının beyaz ırka çok yakın oranda olduğunu gördük (105).

Önceden yapılan bir çok çalışmayı incelediğimizde şu sonuçlara vardık. Japon Irkı'nda VKORC1 -1639 G/G homozigot normal oranı son derece yüksekken (%79,4), -1639 A/A homozigot mutant oranı yok sayılabilecek kadar düşüktür (%0,8) (64). Gin Gin Gan ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada, Malezyalı ve Çinliler'de VKORC1 genetik polimorfizminin oldukça sık fakat Hintliler'de ise Japonlar'daki gibi oldukça düşük oranlarda bulunduğu gösterilmiştir (88). Türk Toplumu'ndaki sıklıklar bu oranların arasında bir yerde bulunmaktadır. Yine Negar ve arkadaşlarının İran Toplumu'nda yapmış oldukları çalışmayla bizim çalışmamız karşılaştırıldığında, benzer oranlar bulunmakla beraber İran Toplumu'nda VKORC1 -1639 G/A heterozigot ve -1639 A/A homozigot mutant sıklıklarının daha yüksek olduğu görüldü (71).

Bütün bu sonuçlar ve karşılaştırmalar göz önünde bulundurulduğunda, Türk Toplumu'nda CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmlerinin bir çok topluma oranla daha sık olduğu görülmüştür. Toplumda mutasyon miktarının yüksek olması sonucu warfarin tedavisi esnasında kişilerde kanama komplikasyonları gelişme riski daha yüksektir. VKORC1 ve CYP2C9 genetik polimorfizmlerinin warfarin doz ayarlamasındaki önemi bir çok çalışmada kanıtlanmakla beraber tedavi öncesi bu polimorfizmlerin araştırılması Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından da önerilmektedir (120). Bu yüzden Türk Toplumu'nda warfarin tedavisine başlamadan önce VKORC1 ve CYP2C9 genetik polimorfizmlerine bakılması klinisyenlerin ideal doza ulaşmasını kolaylaştırırken,

hastalarda gelişen kanama komplikasyonlarını da azaltacaktır. Testin sadece bir tüp kan ile bir defada ve Real-Time PZR ile birkaç saat gibi kısa bir sürede yapılıp, sonuca ulaşılması da testin uygulanmasının yeteri kadar kolay olduğunu göstermektedir.

Genetik polimorfizmler, boy ve yaş göz önünde bulundurularak ideal warfarin dozları hesaplanıp, verilen dozlarla karşılaştırıldı. Hastaların takibinde, hedef INR değeri olan 2-3 arasındayken aldıkları warfarin dozlarının aritmetik ortalamaları alınarak verilen doz ortalamaları hesaplandı. Bu dozlar, yaş, boy, VKORC1 ve CYP2C9 genetik polimorfizmlerini Sconce ve arkadaşlarının oluşturduğu formülde yerine koyarak hesaplanan ideal dozlarla karşılaştırıldı. Verilen dozlar ve ideal dozlar arasında %65’lik bir uyum saptandı ki bu da yeterli derecede bir uyumu göstermektedir. Buna dayanarak, çalışmamızda hem terapötik doza daha çabuk ulaşılması hem de kanama komplikasyonlarının azaltılması açısından, tedavi başlangıcında CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmleri göz önünde bulundurularak warfarin doz ayarlaması yapılmasının klinisyenlere yarar sağlayabileceği kanıtlandı.

Çalışmamızın sınırlı kaldığı durumlar da mevcuttur. Warfarin kullanan hasta çocuk sayısı sınırlıdır. İdeal doz hesaplarırken CYP2C9 ve VKORC1 polimorfizmleri dışındaki sitokrom P450 4F2 (CYP4F2), apolipoprotein E (APOE), gamma-glutamil karboksilaz (GGCX) gibi diğer genetik polimorfizmler hesaba alınmamıştır. Yine VKORC1 geninin sadece -1639G>A bölgesindeki polimorfizm göz önünde bulundurulurken, 3730G>A, 3588G>A ve 1173C>T genetik polimorfizmleri hesaba katılmamıştır. Ayrıca elimizdeki veriler

doğrultusunda, INR takibi yapılan hastaların 11 tanesinde hedef INR olan 2-3 aralığına ulaşamadığı için hesapladığımız ideal doz ile verilen doz karşılaştırılması 47 hasta üzerinde yapılmıştır.

6. SONUÇLAR

Warfarin kullanan hasta grubu ve kullanmayan sağlıklı gönüllü kontrol grubunda CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizm sıklıklarının araştırıldığı ve genotipler göz önünde bulundurularak ideal warfarin dozlarının hesaplanıp, verilen doz- ideal doz karşılaştırılmasının yapıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

1. Çalışmamız yaşları $13,4 \pm 4,7$ (0,2-18) arasında değişen 58 warfarin tedavisi alan hasta ve yaşları $9,7 \pm 4,8$ (0,5-18) arasında değişen 149 sağlıklı gönüllü ile gerçekleştirilmiştir.
2. Hasta grubunda %46,6 kız, %53,4 erkek bulunurken, sağlıklı gönüllü kontrol grubunda %57,7 kız, %42,3 erkek bulunmaktadır.
3. Warfarin kullanan hasta grubunda CYP2C9 genotip varyant sıklıkları, *1/*1 için %37,9, *1/*2 için %15,5, *1/*3 için %36,2, *2/*3 için %6,9, *3/*3 için %3,4 olarak saptanırken, sağlıklı gönüllü kontrol grubunda; *1/*1 için %61,1, *1/*2 için %16,8, *1/*3 için %19,5, *2/*3 için %1,3, *3/*3 için %1,3 olarak bulundu. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler açısından, Türk Toplumu'ndaki CYP2C9 genotip varyant sıklıkları, *1/*1 için %54,6, *1/*2 için %16,4, *1/*3 için %24,2, *2/*3 için %2,9, *3/*3 için %1,9 olarak saptandı. CYP2C9*2/*2 varyantı hem warfarin kullanan hasta grubunda, hem de sağlıklı kontrol grubunda saptanmamıştır.

4. Warfarin kullanan hasta grubunda VKORC1 -1639 G>A polimorfizm sıklıkları; G/G için %19,0, G/A için %62,1 ve A/A için %19,0 saptanırken, sağlıklı gönüllü kontrol grubunda; G/G için %29,5, G/A için %49,0 ve A/A için %21,5 olarak bulundu. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler açısından, Türk Toplumu'ndaki VKORC1 geni -1639 G>A polimorfizmi genotip dağılımları G/G için %26,6, G/A için %52,7 ve A/A için %20,8 olarak saptanmıştır.
5. Warfarin kullanan çocuklarda CYP2C9 ve VKORC1 mutasyon oranlarının daha yüksek olması, mutasyonu olan kişilerin warfarin kullanma endikasyonu olan hastalıklara daha yatkın olduğu düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Bu durum konuyla ilgili daha bir çok çalışmanın yapılması gerektiğini göstermektedir.
6. Türk Toplumu'ndaki CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizm sıklıkları etnik gruplar arasında en yakın benzerliği Avrupa toplumları ile göstermektedir. Asya toplumları ile karşılaştırıldığında oranlar son derece farklıdır.
7. Warfarin doz hesaplama programı ile hesapladığımız ideal dozlar ile hastalara hedeflenen INR değerindeyken verilen dozlar arasında %65 korelasyon saptanması çalışmamızın amacına ulaşabileceğini göstermektedir.
8. Bu çalışma sayesinde rutin olarak kullanılmakta olan PZR-RFLP ile Real time PZR yöntemleri de karşılaştırıldı. Sonuçlar arasında korelasyon saptandı ve çok daha kısa sürede, güvenilir şekilde sonuç veren Real time PZR yöntemi de rutin olarak kullanılmaya başlandı.

7. KAYNAKLAR

1. Oldenburg J, Müller CR, Watzka M, Vitamin K epoxide reductase (VKORC1): pharmacogenetics and oral anticoagulation. Hematology Education:the education program for the annual congress of the European Hematology Assosiation 2007; 1: 45-50.
2. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, ann K. Daly and Farhad Kamali. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements:proposal for a new dosing regimen. Blood,1 october 2005; 106/7.
3. Muszkat M, Blotnik S, Elami A, Krasilnikov I, Caraco Y. 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 2007; 29/3.
4. Nowak-Göttl U, Dietrich K, Schaffranek D, Eldin NS, Yasui Y, Geisen C, Mitchell LG, In pediatric patients, age has more impact on dosing of vitamin K antagonists VKORC1 or CYP2C9 genotypes. Blood, september 2010; 116: 6101-6105.
5. WiWanitkit V, Pharmacogenomic Effect of cytochrome P450 2C9 Polymorphisms in Different Populations. Clinical and Applied Trombosis/Hemostasis 2006; 12(2): 219-222.
6. Hasanoğlu E, Düşünsel R, Bideci A Temel Pediatri. S. Anak editör. Hemorajik ve Trombotik Hastalıklar: Hemostaz. Güneş Tıp Kitabevleri. 2010; 1000-1005.

7. Rizza C, Lowe G. Haemophilia & Other Inherited bleeding Disorder. In: Bruce Bennett editor. Normal Haemostasis. W. B. Saunders Company. 1997; 1-30.
8. Özgön GÖ. Varfarin Kullanan Hastalarda Vitamin K Epoksit Redüktaz 1 Gen Polimorfizmleri ve Varfarin Doz İlişkisi. Doktora tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
9. Behrman, Kliegman, Jenson. Nelson Pediatri. Teoman Akçay çeviri editörü. Hemorajik ve Trombotik Hastalıklar: Hemostaz. Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; 1651-1656.
10. Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Dokuzuncu baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 2002.
11. Monagle P, Chan A, Massicotte P, Chalmers E, Michelson AD. Seventh ACCP Conference on Antithrombotic Therapy in Children: The Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Chest 2004; 126: 645-687.
12. Newall F, Barnes C, Ignjatovic V, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in children. J Paediatr Child Health 2003; 39: 289–292.
13. Fareed J, Hoppensteadt DA, Bick RL. An update on heparin at the beginning of the new millenium. Semin Thromb Hemost 2000; 26: 5-21.
14. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic therapy. Chest 2004; 126: 188.
15. Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. Am J Pediatr Hematol Oncol 1990; 12:95–104.
16. Hirsh J. Heparin. N Engl J Med 1991; 324: 1565–1574.

17. Andrew M, Marzinotto V, Massicotte P, et al. Heparin therapy in pediatric patients: a prospective cohort study. *Pediatr Res* 1994; 35: 78–83.
18. Raschke RA, Reilly BM, Guidry JR, et al. The weight-based heparin dosing nomogram compared with a “standard care” nomogram: a randomized controlled trial. *Ann Intern Med* 1993; 119: 874–881.
19. Michelson AD, Bovill E, Andrew M. Antithrombotic therapy in children. *Chest* 1995; 108: 506–522.
20. Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy and safety. *Chest* 1998; 114: 489–510.
21. Antitrombotik tedavi ilkeleri [cited August 2011]. Available from: URL: http://ichastaliklari.uludag.edu.tr/hematoloji/antitrombotik_tedavi.pdf
22. Antikoagulan tedavi [cited August 2011]. Available from: URL: http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/2007thtk_15.pdf
23. Bonduel MM. Oral anticoagulation therapy in children. *Thrombosis Research* 2006; 118: 85-94.
24. Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Ansell J, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 2001; 119: 8 – 21.
25. Bonduel M, Sciuccati G, Hepner M, Feliu´ Torres A, Pieroni G, Frontroth JP, et al. Acenocoumarol therapy in pediatric patients. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1740 –3.
26. Gadisseur APA, van del Meer FJM, Adriaansen HJ, Fihn SD, Rosendaal FR. Therapeutic quality control of oral anticoagulant therapy comparing the short-acting acenocoumarol and the long-acting phenprocoumon. *Br J Haematol* 2002; 117: 940 –6.

27. Ünverir P, Dağ T, Peynirci H, Demir E, Canbay C, Kaya A, Yanturalı S, Acil Serviste Varfarin Kullanımına Bağlı Kanama Komplikasyonlarının İncelenmesi, Türkiye Acil Tıp Dergisi 2006; 6(3): 117-121.
28. Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin J L, American College of Cardiology Foundation Guide to Warfarin Therapy, American Heart Association 2003; 107: 1692.
29. Varfarin etki mekanizması [cited August 2011]. Available from: URL: <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/583/138/pharm583138.fig1.gif>
30. Rettie AE, Tai G, The pharmacogenomics of warfarin: Closing in on personalized medicine, Molecular Interventions 2006; 6: 223-227.
31. Kardiyolojide ilaçlar [cited August 2011]. Available from: URL: <http://www.ahmetalpman.com/defilacoku.asp>
32. Libby P, Bonow RO, Zipes DP, Mann DL, Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Volume 2, Seventh Edition, Saunders Elsevier, 2004.
33. Current Medication Information [cited August 2011]. Available from: URL: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/image.cfm>
34. Wadelius M, Pirmohamed M, Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges, Pharmacogenomics J. 2006; 7 (2): 99-111.
35. Landefeld C, Beyth R, Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction and prevention. Am J Med, 1993; 95: 315-328.
36. Streif W, Andrew M, Marzinotto V, Massicotte P, Chan AKC, Julian JA, et al. Analysis of warfarin therapy in pediatric patients: a prospective cohort study of 319 patients. Blood 1999; 94: 3007– 14.

37. Cheung AM, Halton J, Dinyari M, Chan A, Shaughnessy S, Webber C, et al. Bone mineral density (BMD) in a cohort of children on long term warfarin therapy. *J Thromb Haemost* 2001; 1729.
38. Eunice Y, Ivelina G, Stephen W, Danny S, Leon A. Ethnic differences in the population pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2010; 37: 3-24.
39. You M, Kenji N, Yoshiki S. Clinical Significance of Combined CYP2C9 and VKORC1 Genotypes in Japanese Patients Requiring Warfarin. *Int Heart J* January 2011; 52: 44-49.
40. 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 – 10.
41. Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M, Chiba K. CYP2C9 Ile 359 and Leu 359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 95 – 104.
42. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemos* 2000; 84: 775–8.
43. Haustein KO. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral anticoagulants, especially phenprocumon. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25: 5– 11.
44. Andrew M, Monagle PT, Brooker L. Developmental hemostasis: relevance to thromboembolic complications in pediatric patients. In: Andrew M, Monagle PT, Brooker L, editors. *BC Hamilton, London: Decker Inc.*; 2000; 5– 46.

45. Stern R, Karlis V, Kinney L, Glickman R, Using the international normalized ratio to standardize prothrombin time, J. Am. Dent. Assoc., 1997; 128(8): 1121-1122.
46. Kjeldsen J, Lassen JF, Petersen PH, Brandslund I, Biological variation of International Normalized Ratio for prothrombin times, and consequences in monitoring oral anticoagulant therapy: computer simulation of serial measurements with goalsetting for analytical quality, Clinical Chemistry 1997; 43: 2175-2182.
47. Dahlback B. Blood. Coagulation. Lancet. 2000; 355: 1627.
48. Monagle P, Michelson AD, Bovill E, Andrew M. Antithrombotic therapy in children. Chest 2001; 119: 344 – 70.
49. Monagle P, Adams M, Mahoney M, Ali K, Barnard D, Bernstein M, et al. Outcome of pediatric thromboembolic disease: a report from the Canadian childhood thrombophilia registry. Pediatr Res 2000; 47: 763 –6.
50. Shirai LK, Rosenthal DN, Reitz BA, Robbins RC, Dubin AM. Arrhythmias and thromboembolic complications after the extra cardiac Fontan operation. J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 115: 499 – 505.
51. Newall F, Barnes C, Savoia H, Campbell J, Monagle P. Warfarin therapy in children who require long-term total parenteral nutrition. Pediatrics 2003; 12: 386–8.
52. Nowak-Göttl U, Straeter R, Sebire G, Kirkham F. Antithrombotic drug treatment of pediatric patients with ischemic stroke. Paediatr Drugs 2003; 5: 167 – 75.
53. Bonduel M, Sciuccati G, Hepner M, Torres AF, Pieroni G, Frontroth JP. Prethrombotic disorders in children with arterial ischemic stroke and sinovenous thrombosis. Arch Neurol 1999; 56: 967 – 71.

54. deVeber G, Chan A, Monagle P, Marzinotto V, Armstrong D, Massicotte P, et al. Anticoagulation therapy in pediatric patients with sinovenous thrombosis: a cohort study. *Arch Neurol* 1998; 55: 1533 –7.
55. Bonduel M, Sciuccati G, Hepner M, Pieroni G, Feliu´ Torres A, Frontroth J et al. Cerebral sinovenous thrombosis [SVT] in children: a prospective ten-year registry in Argentina *J Thromb Haemost* 2003; 1003.
56. Hooshang T, Capitanio M. Tracheobronchial calcification: an observation in three children after mitral valve replacement and warfarin sodium therapy. *Radiology* 1990; 176: 728 – 30.
57. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H. Hematology Basic Principles and Practice. In: Barbara C. Furie and Bruce Furie editors. *Antithrombotic Drugs, Oral Anticoagulants*. Churchill Livingstone Elsevier. Fifth edition. 2009; 2077-2079
58. Bony C, Zyka F, Tiran-Rajaofera I, Attali T, De Napoli S, Alessandri JL. Warfarin fetopathy. *Arch Pediatr* 2002; 9: 705–8.
59. Kliegman, Behrman, Jenson, Stanton. *Nelson Textbook of Pediatrics* 18th ed. Saunders Elsevier, 2007; 2078.
60. Hanley JP. Warfarin reversal. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1132–1139.
61. Makris M, Watson HG. The management of coumarin-induced overanticoagulation. *Br J Haematol* 2001; 114: 271–80.
62. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on oral anticoagulation, 3rd ed. *Br J Haematol* 1998; 101: 374–87.
63. Ansell J, Hirsch J, Dalen J, et al. Managing oral anticoagulant therapy (sixth ACCP consensus conference on antithrombotic therapy). *Chest* 2001; 119: 22S–38S.

64. Limei Yang, Weihong Ge, Feng Yu, Huaijun Zhu. Impact of VKORC1 gene polymorphism on interindividual and interethnic warfarin dosage requirement- A systematic review and meta analysis. *Thrombosis Research*, 2010; 125: 159-166.
65. Rai AJ, Udar N, Saad R, Fleisher M. A multiplex assay for detecting genetic variations in CYP2C9, VKORC1 and GGCX involved in warfarin metabolism. *Clinical Chemistry*, 2009; 55(4): 823- 826.
66. Shiew- Mei Huang. Pharmacogenomics and Warfarin Testing: The Case for Personalized Medicine. AMCP's 21st Annual Meeting& Showcase. April 15-18 2009.
67. Sağ C, Baysan O, Varfarin Kullanımı ve İlaç Etkileşimleri, İ.Ü. Kardiyol. Enst. Derg, 2007; 6(2): 26–32.
68. Nutescu E, Chuatrisorn I, Hellenbart E. Drug and dietary interactions of warfarin and novel oral anticoagulants: an update. *J Thromb Thrombolysis*, 2011; 31: 326-343.
69. Botton MR, Bandinelli E, Paim LE, Amon LC, Hutz MH. Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. *The British Journal of Clinical Pharmacology* 2011.
70. Göz M, Varfarin-gıda etkileşmesi: Olgu sunumu ve literatürün gözden geçirilmesi, *Turkish J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006; 14 (4): 320-324.
71. Negar A, Soha N, Fatemeh H, Maryam B, Masumeh D. Investigation of allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran. *Pharmacological Reports*, 2010; 62: 740-746.
72. Mised, ıssn 1303-2550, 2007, Fersa Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.

73. Ingelman-Sundberg M, Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy, J. Intern. Med. 2001; 250: 186-200.
74. You M, Kenji N, Yoshiki S. Clinical Significance of Combined CYP2C9 and VKORC1 Genotypes in Japanese Patients Requiring Warfarin. Int Heart J January 2011; 52: 44-49.
75. Sitokrom P450 enzim sistemleri ve ilaç etkileşimleri. Available from: URL: <http://www.klinikpsikiyatri.org/files/journals/1/305.pdf>
76. Sitokrom P450 enzim sistemleri. [cited August 2011] Available from: URL: <http://www.cumhuriyet.dundar.dr.tr/Donem2/IV.../Biyokimya/ogecetinkaya/oge1.ppt>
77. Sitokrom P450 enzim sistemi. [cited August 2011] Available from: URL: <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/cocukruh/cyp.htm>
78. Özerol E, Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri, Journal of Turgut Özal Medical Center, 1996; 3: 3.
79. Cytochrome P450. [cited August 2011] Available from: URL: http://www.en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_P450
80. Sitokrom P450 2C9. [cited August 2011] Available from: URL: <http://www.tkd.org.tr/sunumerkezi/?s=295829275F582C5729>
81. Shi- Long Zhong, Yuan Liu, Xi- Yong Yu, Dan Xu, Hong- Hong Tan, Qiu- Xiong Lin, Min Yang, Hai- yan Lao, Shu- Guang Lin. The influence of genetic polymorphisms and interacting drugs on initial response to warfarin in Chinese patients with heart valve replacement. Eur J Clin Pharmacol 2011; 67(6): 581-590.

82. Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl M-L, Gusella M, Padrini R. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther*, 2002; 72: 702-10.
83. Aynacioglu AS, Brockmöller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen Z, et al. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48: 409-415
84. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM et al. The role of the CYP 2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*, 1996; 6: 341-349.
85. Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics*. 1997 Oct; 7(5): 405-9.
86. Yoon YR, Shon JH, Kim MK, Lim YC, Lee HR, Park JY, Cha IJ, Shin JG. Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol*. 2001 Mar; 51(3): 277-80.
87. Özer N, Cam N, Tanyürek B, Özer S, Uyarel H, Öz D, Güney MR, Çiloğlu F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements in an adult Turkish population. *Heart Vessels* 2010; 25: 155-162.
88. Gan GG, Phipps ME, Lee MM, Lu LS, Subramaniam RY, Bee PC, Chang SH. Contribution of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms in the interethnic variability of warfarin dose in Malaysian populations. *Ann Hematol* 2010 Jun; 90(6): 635-4.

89. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 63: 1135-41.
90. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and interethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1745-51.
91. Aquilante CL, Langaee TY, Lopez LM, Yarandi HN, Tromberg JS, Mohuczy D, et al. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79: 291-302.
92. Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, Lappé 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: 191-7.
93. Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, Romano S, Federici G, Novelli G. Allelic variants in the CYP2C9 and VKORC1 loci and interindividual variability in the anticoagulant dose effect of warfarin in Italians. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1545-50.
94. Jiang NX, Song J, Xu B. Vitamin K epoxide reductase complex 1 gene polymorphism and warfarin dose requirement in Chinese patients. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2007; 35: 652-4.

95. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, Akaiwa Y, Otsubo R, Nagatsuka K, et al. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, γ -glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res* 2007; 120: 181–6.
96. Miao L, Yang J, Huang C, Shen Z. Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 1135–41.
97. Nakai K, Tsuboi J, Okabayashi H, Fukuhiro Y, Oka T, Habano W, et al. Ethnic differences in the VKORC1 gene polymorphism and an association with warfarin dosage requirements in cardiovascular surgery patients. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 713–9.
98. Schelleman H, Chen Z, Kealey C, Whitehead AS, Christie J, Price M, et al. Warfarin Response and Vitamin K Epoxide Reductase Complex 1 in African Americans and Caucasians. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 742–7.
99. Zhang WP, Chen H, Luo JW, Wu XY. Influence of VKORC1–1639 G>A and CYP2C9 1061 A/C polymorphisms on warfarin dose. *J Med Mol Biol* 2007; 4: 396–400.
100. Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes Jr R, et al. Estimation of Warfarin Maintenance Dose Based on VKORC1 (–1639 G>A) and CYP2C9 Genotypes. *Clin. Chem.* 2007; 53: 1199–205.
101. Haug KB, Sharikabad MN, Kringen MK, Narum S, Sjaatil ST, Johansen PW, et al. Warfarin dose and INR related to genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in patients with myocardial infarction. *Thromb J* 2008; 6: 7.

102. Obayashi K, Nakamura K, Kawana J, Ogata H, Hanada K, Kurabayashi M, et al. VKORC1 gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 169–78.
103. Özgön GO, Langae TY, Feng H, Buyru NT, Hatemi AC, Siva A, Saip S, Johnson JA, VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms are associated with warfarin dose requirements in Turkish patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2008; 64 (9): 889-94.
104. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, Santana IS, Rangel F, Ojopi EB, et al. Pharmacogenetics of Warfarin: Development of a Dosing Algorithm for Brazilian Patients. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 722–8.
105. Wadelius M, Chen LY, Lindth JD. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009; 113(4): 784-792.
106. Yoshizawa M, Hayashi H, Tashiro Y, Sakawa S, Moriwaki H, Akimoto T, et al. Effect of VKORC1 –1639 G A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients. *Thromb. Res.* 2009; 124(2): 161–6.
107. Yuya K, Fukiko I, Kazuyoshi S, Kazuhiro W, Keiichi H, Toshio M, Naoki Y, Isao H, Masato T, Yukiya H. Effect of the VKORC1 genotype on warfarin dose requirements in Japanese pediatric patients. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2011 Jun; 26(3): 295-9.
108. Li T, Lange LA, Li X, Susswein L, Bryant B, Malone R, Lange EM, Huang T Y, Stafford DW, Evans JP. Polymorphism in the VKORC1 gene is strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. *J Med Genet* 2006; 43: 740-744.
109. Wysowski DK, Nourjah P, Swartz L. Bleeding complications with warfarin use: a prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1414-1419.

110. Wynne H, Cope L, Kelly P, Whittingham T, Edwards C, Kamali F. The influence of age, liver size and enantiomer concentrations on warfarin requirements. *Br J Pharmacol* 1995; 40: 203-207.
111. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL. Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose. *N Eng J Med* 2005; 352: 2285-93.
112. Michelson AD, Bovill E, Monagle P, Andrew M. Antithrombotic therapy in children. *Chest* 1998; 114: 748-769.
113. Puehringer H, Loreth RM, Klose G, Schreyer B, Krugluger W, Schneider B, Oberkanis C. VKORC1 -1639G>A and CYP2C9*3 are the major genetic predictors of phenprocoumon dose requirement. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66: 591-598.
114. Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: A HuGenet™ systemic review and meta-analysis. *Genet Med* 2005; 7: 97-104.
115. Lindh JD, Holm L, Andersson ML, Rane A. Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements- a systemic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65: 365-75.
116. Limdi NA, Arnett DK, Goldstein JA, Beasley TM, McGwin G, Adler BK, Acton RT. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European-americans and African-Americans. *Pharmacogenomics* 2008; 9(5): 511-526.
117. Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 253-63.

118. Wang SL, Huang J, Lai MD, Tsai JJ. Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 37-42.
119. Babaoğlu M, Yasar U, Sandberg M, Eliasson E, Dahl ML, Kayaalp SO, Bozkurt A, CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2004; 60 (5): 337-42.
120. Overview of pharmacogenomics. [cited August 2011] Available from: URL: <http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>

8. ÖZET

CYP2C9 ve VKORC1 Genetik Polimorfizminin Türk Toplumu'ndaki Warfarin Kullanan Çocuklarda Doz Gereksinimlerine Etkisinin Araştırılması

Warfarin onlarca yıldır tüm dünyada venöz ve arteriyel tromboembolik olayların profilaksi ve tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçtır. Dar terapötik aralığı, kullanımı sırasında yüksek oranda kanama komplikasyonlarının ortaya çıkması ve doz ayarlaması kişiden kişiye çok değişkenlik göstermesine rağmen reçete edilme sıklığı özellikle sanayileşmiş ülkelerde gittikçe artmaktadır. Oral alım kolaylığı ve düşük fiyat bunun nedenidir. Warfarin etkinliğini ve güvenilir doz aralığını elde etmek ve takip edebilmek amaçlı INR (international normalized ratio) ölçümleri kullanılmaktadır. INR'nin terapötik doz aralığının altında olması; tromboembolik olaylara, üstünde olması ise kanama komplikasyonlarına yol açmaktadır.

Warfarin doz ayarlamasında yaş, kilo, boy, vücut alanı, cinsiyet gibi bilinen faktörlerin etkisinin yanı sıra CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizminin etkisi yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir.

Warfarinin eliminasyonunda karaciğerde bulunan mikrozomal enzimlerden sitokrom P450 2C9 (CYP2C9) görev almaktadır. CYP2C9, homozigot normal (CYP2C9*1) dışında saptanan 2 allelik varyanta daha sahiptir: CYP2C9*2 ve CYP2C9*3. Yapılan çalışmalarda; CYP2C9*3 allelik varyantına sahip kişilerde eliminasyon en yavaş ve dolayısıyla warfarin ihtiyacı en azdır.

CYP2C9*2 allelik varyantına sahip kişilerde ise doz ihtiyacı orta derecede azalmıştır.

Vitamin K epoksit redüktaz (VKOR) warfarin tarafından inhibe edilen ve K vitamini döngüsünde yer alıp, pıhtılaşmaya katkıda bulunan bir enzimdir. VKOR, VKORC1 (vitamin K epoksit redüktaz kompleks subunit 1) geni tarafından kodlanır. VKORC1 (GG) genindeki polimorfizm sonucu ortaya çıkan varyantları; VKORC1 (GA) ve VKORC1 (AA)'dır. Yapılan çalışmalarda VKORC1 (AA) polimorfizmine sahip kişilerin warfarine en duyarlı ve en az doza ihtiyaç duyan, VKORC1 (GA) polimorfizmine sahip kişilerin de orta derecede daha az doza ihtiyaç duyan kişiler olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda 58 adet warfarin kullanan hastadan ve 149 adet warfarin kullanmayan sağlıklı gönüllüden (kontrol grubu) 5 cc EDTA'lı tüpe kan örneği alınıp, DNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen DNA'lardan PZR yöntemi kullanılarak CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve VKORC1 genetik polimorfizmleri araştırıldı. Böylece CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizminin Türk Toplumu'nda pediatrik yaş grubundaki sıklıkları saptandı.

Warfarin tedavisi altındaki hastaların ilaç etkinliği derecesi INR (international normalized ratio) ile takip edildi. Hastaların her biri için genetik polimorfizmleri, yaş ve boyları göz önünde bulundurularak ideal warfarin dozları hesaplandı. CYP2C9*2, CYP2C9*3 ve VKORC1 allelik varyantlarına sahip kişilerde doz ihtiyacının diğer faktörlerden bağımsız olarak azaldığı gösterildi. Hesaplanan ideal dozlarla ulaşılmak istenen INR düzeyindeyken hastaya verilen dozlar karşılaştırıldı. Hesaplanan ideal warfarin dozları ile hastanın istenen INR

düzeyine ulaştığı sırada aldığı warfarin dozu arasında %65 korelasyon olduğu saptandı.

Çalışmamızda hem terapötik doza daha çabuk ulaşılması hem de kanama komplikasyonlarının azaltılması açısından, tedavi başlangıcında CYP2C9 ve VKORC1 genetik polimorfizmleri göz önünde bulundurularak warfarin doz ayarlaması yapılmasının klinisyenlere yarar sağlayacağı kanıtlandı.

Anahtar Sözcükler: warfarin, CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1, çocuk, farmakogenetik, genetik polimorfizm, doz gereksinimi

9. SUMMARY

The Effect of CYP2C9 and VKORC1 Genetic Polymorphism to Warfarin Dose Requirements in Turkish Pediatric Patients

Warfarin is the most commonly prescribed anticoagulant drug for the prophylaxis and treatment of venous and arterial thromboembolic disorders for decades. Despite the limitations of a narrow therapeutic range, the broad variation of intra and inter-individual drug requirement, and relatively high incidence of bleeding complications, therapy with coumarins is rising in industrialised countries. The effectiveness and safety of warfarin is critically dependent on maintaining the prothrombin time, expressed as the international normalized ratio (INR).

The anticoagulant response to warfarin is affected by both environmental influences and also by genetically determined levels of critical enzymes. These include; the cytochrome P-450 2C9 (CYP2C9) enzyme that is involved in the metabolism of warfarin, and also vitamin K epoxide reductase (VKORC1), which is the enzyme inhibited by warfarin. The clearance of warfarin is almost entirely the result of hepatic metabolism, and CYP2C9 is the most important enzyme mediating its clearance. The polymorphisms in CYP2C9 are; CYP2C9*2 and CYP2C9*3. VKORC1 is the target of warfarin that function as competitive inhibitors. The polymorphisms in VKORC1 (GG) are; VKORC1 (GA) and VKORC1 (AA). Previous studies have showed that, the mean warfarin daily dose requirement was highest in CYP2C9 wild-type patients, compared with the variant *2 and *3 alleles and also was higher in patients with the VKORC1 GG genotype compared with those with either GA or AA.

The study population consisted of 58 pediatric patients who are taking warfarin treatment and 149 healthy voluntary control children. We took 5 cc blood from all of the population and isolated their DNA from the blood. We investigated CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 genetic polymorphisms from the isolated DNA samples using PZR. Thus we confirmed that the frequencies of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms in Turkish pediatric population.

We determined the requirements of warfarin dose for each patient by INR controls. We calculated ideal warfarin dose for all patients using age, height and CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 genetic polymorphisms. This study showed that the patients who have allelic variants require lower warfarin doses.

We compared the doses of we gave and the ideal doses. In conclusion we confirmed %65 correlation between ideal doses and the doses that the patients use.

In our study, we have proved that if the clinicians calculate the warfarin doses with considering CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms before the beginning of warfarin treatment, reaching the ideal INR values will be easier and the bleeding complications will be lower.

Key words: Warfarin, CYP2C9, VKORC1, pharmacogenetic, genetic polymorphism, dose requirement.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Birce Dilge Taşkın

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 04.08.1983

Uyruğu : T.C.

Medeni Hali : Bekar

Adres : Bilkent Çamlık Sitesi D6 Blok No:26 Bilkent / Ankara /
Türkiye

Telefon : 0312 266 64 91

0532 490 42 22

e-posta : birdilge@gmail.com

Öğrenim durumu:

İlkokul : Yükseliş Koleji (1989-1994)

Orta Öğretim-Lise : Ankara Atatürk Anadolu Lisesi (1994-2001)

Tıp Fakültesi : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (2001-2007)

İhtisas Eğitimi : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (2007- halen)

Yabancı Dil : İngilizce

Bilimsel Etkinlik:

1. IFMSA Standing Committee on Professional Exchange, S.Anna Hospital, Ferrara, Italy, Cardiology Department (01.07.2005- 31.07.2005)
2. Ankara Üni. Tıp Fak. Çocuk Destek Grubu Ölümcül Hastaya Yaklaşım ve Organ Nakli Konulu Seminer (13.05.2006)
3. Neonatal Resüsitasyon Programı Uygulayıcı Kursu (14.04.2008- 16.04.2008)
4. 2. Uluslararası Katılımlı Çocuk İstismarını ve İhmalini Önleme Sempozyumu (08.05.2008- 10.05.2008)
5. IV. Ankara Pediatri Günleri (25.12.2008- 26.12.2008)
6. 54. Milli Pediatri Kongresi (20.10.2010- 24.10.2010)
7. 55. Milli Pediatri Kongresi (12.10.2011- 16.10.2011)
8. VI. Ankara Pediatri Günleri (02.12.2011- 03.12.2011)

Yayınlar:

1. Taşkın B D, Aslan A T, Akyürek N A, Türkteş H, Köktürk N, Boyunağa Ö L, Memiş L. Çocukluk Çağında Pasif Sigara Maruziyeti İntersitisyel Akciğer Hastalığına Neden Olur mu? poster sunumu. 55. Milli Pediatri Kongresi Poster Sunumu, 2011.
2. Rudolph's Pediatrics 2011 kitap çevirisi. Chapter 312-314.
3. Kula S, Taşkın B D. Neden Hala Ağlıyor? Aktüel Medicine Dergisi Şubat 2012.