

**METOTREKSAT (MTX) KULLANAN
ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA
MTHFR GENİ C677T ve A1298C
POLİMORFİZMLERİNİN
İLAÇ ETKİNLİĞİ ve İLAÇ TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sinan DÜNDAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Rifat BİRCAN

2014

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**METOTREKSAT (MTX) KULLANAN ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA
MTHFR GENİ C677T ve A1298C POLİMORFİZMLERİNİN
İLAÇ ETKİNLİĞİ ve İLAÇ TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Sinan DÜNDAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Rifat BİRCAN

TEKİRDAĞ-2014

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

METOTREKSAT (MTX) KULLANAN ROMATOİD ARTRİT HASTALARINDA MTHFR GENİ C677T VE A1298C POLİMORFİZMLERİNİN İLAÇ ETKİNLİĞİ VE İLAÇ TOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Sinan DÜNDAR

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Rıfat BİRCAN

Romatoid artrit (RA) zamanla birçok eklemde iltihaba neden olan, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen otoimmün bir hastalıktır. RA, son yıllarda yaygın olarak, hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan biri olan Metotreksat (MTX) ile tedavi edilmeye başlanmıştır. Bununla beraber folik asit antagonisti olan MTX'in kullanımında, çevresel nedenler yanında bireyin genetik yapısındaki varyasyonların ilacın etkinliği ve ilaç toksisite gelişimi üzerine etkisi olabileceği literatürde yer almaktadır. Özellikle, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T ve A1298C polimorfizmlerinin MTX metabolizması ile ilişkili olduğunu ileri süren çalışmalar literatürde mevcuttur. Bununla beraber, konu ile ilgili olarak literatürde yaralan ve çeşitli toplumlar üzerinde yapılan genetik çalışmalara ait veriler arasında bir uyumsuzluk söz konusudur. Bu nedenle, yapılan bu tez çalışmasında Türk toplumunda, MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin MTX'in RA hastalarındaki etkinliği üzerine etkisinin olup olmadığı ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin ilaç toksisite gelişimi üzerinde etkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, Eylül 2010 ile Haziran 2014 tarihleri arasında Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Romatoloji Servisi'nde tedavi olan 88 romatoid artrit hastasından kan örnekleri alınmış ve bu örneklerden standart fenol-kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben, hastalara ait MTHFR genotiplerinin tespit edilmesi amacıyla PZR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi PASW® Statistics 18 programı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada en az bir yan etki görülen 11 birey ile herhangi bir yan etki görülmeyen 77 bireye ait MTHFR C677T ve A1298C genotipleri karşılaştırıldığında, MTHFR C677T ve

A1298C polimorfizmleri ile ilaç toksisitesi arasında ilişkiyi gösteren herhangi bir istatistiksel fark saptanmamıştır (P değerleri; MTHFR 677CC için 0.235, 677TC için 0.283, 677TT için 0.526, MTHFR 1298 AA için 0.906, 1298 AC için 0.906, 1298AA için 0.686'dır) Ayrıca çalışmaya dahil edilen RA hastalarına ait hastalık aktivite parametrelerinin (HAQ, DAS28, ESR, CRP) MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerine göre dağılımları incelendiğinde, genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin RA hastalarında MTX ilaç etkinliği ve ilaç toksisitesi ile ilişkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. Ancak alışma kapsamına alınan hasta örnekleme sayısının yetersiz olması nedeniyle Türk toplumunda RA hastalarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin MTX etkinliği ve ilaç toksisitesi ile ilişkisinin belirlenebilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Metotreksat, romatoid artrit, MTHFR C677T polimorfizmi, MTHFR A1298C polimorfizmi

2014, 61 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

EFFECTS OF MTHFR GENE C677T and A1298C POLYMORPHISMS on DRUG EFFICIENCY and TOXICITY in RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS USING METHOTREXATE (MTX)

SİNAN DÜNDAR

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Rıfat BİRCAN

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease with unknown etiology, and causes multiple joint inflammation with time. In recent years, RA is commonly treated by methotrexate (MTX), one of disease-modifying antirheumatic drugs. However, it is suggested in literature that besides environmental factors, genetic variations in individuals may affect the efficiency and the development of drug toxicity in the use of MTX, a folic acid antagonist. Studies in which especially, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms are suggested to be associated with MTX metabolism exist in literature. Nevertheless, there is a conflict in published data of relevant genetic studies which were conducted on different populations. For this reason, this thesis aims to investigate whether MTHFR C677T and A1298C polymorphisms affect the efficiency of MTX and the development of drug toxicity in RA patients in Turkish population. For the study, blood samples were taken from 88 RA patients who were treated in the Rheumatology Department, Faculty of Medicine, Bezmialem Vakıf University between September 2010 and June 2014, and DNA was isolated from these samples by using standard phenol chloroform method. Then, PCR-RFLP method was employed to determine MTHFR genotypes. Statistical data analysis was performed using PASW Statistics 18. The present study found no statistically significant relationship between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and drug toxicity (P values being 0.235 for MTHFR 677CC, 0,283 for 677TC, 0.526 for 677TT, 0.906 for MTHFR 1298AA, 0.906 for 1298AC and 0.686 for 1298AA), when MTHFR C677T and A1298 genotypes of 11 patients who had at least one side effect and 77 patients who had no side effects were compared. Additionally, there was no statistically significant relationship

among genotypes, when the distribution of disease activity parameters (HAQ, DAS28, ESR, CRP) by MTHFR C677T and A1298C polymorphisms was considered. As a result, one observed with this study that MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are not associated with MTX efficiency and drug toxicity in RA patients. However, further studies with large numbers of patients are necessary to determine any relationship between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and MTX efficiency and drug toxicity in Turkish RA patients, since limited number of patients were included in the present study.

Keywords: Methotrexate, rheumatoid arthritis, MTHFR C677T polymorphism, MTHFR A1298C polymorphism

2014, 61 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGE DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
ÖNSÖZ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Romatoid Artrit.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Etiyoloji.....	4
2.1.3. Genetik yatkınlık ve genetik yatkınlığa neden olan faktörler	4
2.1.4. Patoloji	6
2.1.5. Klinik bulgular	7
2.1.6. Romatoid artrit tedavisi.....	11
2.2. Farmakogenetiğe Giriş.....	14
2.2.1. Romatoid artrit farmakogenetiği	15
2.2.2. MTX'in farmakogenetiği	16
2.2.3. Hücre içi MTX metabolizması.....	18
2.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR).....	20
2.3.1. MTHFR enziminin yapısı ve görevleri	20
2.3.2. MTHFR geninin yapısı ve özellikleri	23
2.3.3. MTHFR polimorfizmleri ve hastalıklarla ilişkisi.....	24
2.3.4. MTHFR geninin diğer alelik varyantları.....	27
2.4. Çalışmanın Amacı.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30

3.1.1. Hasta Grubu.....	30
3.1.2. Kullanılan aletler	31
3.1.3. Kullanılan kimyasallar	32
3.1.3.1. Primerler.....	32
3.2. Yöntemler	34
3.2.1. Periferel kan dokusundan DNA'nın izolasyonu	34
3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu	35
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi.....	36
3.2.4. PZR ürünlerinin RFLP yöntemi ile kesimi	37
3.2.5. RFLP ürünlerinin poliakrilamid jelde yürütülmesi	40
3.2.6. İstatistiksel analizler	40
4. BULGULAR	41
4.1. DNA Miktar Tayini	41
4.2. PZR Sonuçları.....	43
4.3. C677T ve A1298 C polimorfizimlerinin RFLP bulguları	44
4.4. RFLP Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
6. KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: Romatoid artrit ACR 1987 tanı kriterleri.....	8
Çizelge 2.2: ACR/EULAR 2010 romatoid artrit sınıflandırma kriterleri (Daniel ve ark.).....	10
Çizelge 2.3: Romatoid artritte eklem dışı diğer bulgular	10
Çizelge 2.4: MTX kullanan romatoid artrit hastalarında farmakogenetik çalışmaların değerlendirilmesi.....	18
Çizelge 2.5: MTHFR geninin diğer alelik varyantları.....	28
Çizelge 3.1: Hastalara ait demografik ve klinik bilgiler	30
Çizelge 3.2: Monoterapi gören (Sadece MTX kullanan) romatoid artrit hastalarında görülen yan etkiler.....	31
Çizelge 3.3: Her iki polimorfizm için PZR reaksiyon protokolü.....	35
Çizelge 3.4: PZR ürünlerinin (C677T ve A1298C) RFLP protokolleri.....	38
Çizelge 4.1: Romatoid artrit hastalarına ait kan dokularından elde edilen DNA miktarlarının kantitatif sonuçları.....	41
Çizelge 4.2: MTX toksisitesi ile MTHFR C677T ve A1298C polimorfizimleri arasındaki ilişki.....	47
Çizelge 4.3: Romatoid artrit hastalarında hastalık aktivite parametrelerinin MTHFR C677T polimorfizmine göre dağılımları.....	47
Çizelge 4.4: Romatoid artrit hastalarında hastalık aktivite parametrelerinin MTHFR A1298C polimorfizmine göre dağılımları.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Romatoid artrit hastalığında eklem hatlarında meydana gelen anatomik ve fizyolojik değişiklikler.....	3
Şekil 2.2: Popliteal kist (Baker kisti).....	9
Şekil 2.3: MTX'in hücre içerisine giriş yolağı (Hider ve ark. 2007).....	19
Şekil 2.4: Homosistein'in transsülfürasyon ve remetilasyon metabolize yolları.....	22
Şekil 2.5: MTHFR geninin lokalizasyonu (Anonim 3).....	23
Şekil 2.6: MTHFR C677T polimorfizmi (Lucock ve Yates 2006).....	25
Şekil 3.1: Poliakrilamid jelin polimerleşme tepkimesi (Güneştutar ve Rodop 2009).....	39
Şekil 4.1: MTHFR C677T polimorfizmini içeren gen bölgesinin çoğaltılması sonucu oluşan PZR ürünü.....	43
Şekil 4.2: MTHFR A1298C polimorfizmini içeren gen bölgesinin çoğaltılması sonucu oluşan PZR ürünü.....	44
Şekil 4.3: MTHFR C677T RFLP kesim sonuçları. 1, 5, 6, 9 ve 11 normal bireye, 2-4, 8 ve 10 heterozigot mutant bir bireye, 7 homozigot mutant bireye ait RFLP analizi örneği. 12 belirteçtir (25 bp step ladder).....	45
Şekil 4.4: A1298C RFLP kesim sonuçları. 4, 6, 11 ve 12 normal bireye, 1, 2, 3, 5, 8 ve 9 heterozigot mutant bir bireye, 7 homozigot mutant bireye, 10 boş kuyuya ait RFLP analizi örneği 13 belirteçtir (20 bp step ladder).....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
ABC	: ATP bağlayıcı kaset
ABCB1	: ATP bağlayıcı kaset B 1
ABCC1	: ATP bağlayıcı kaset C 1
ABCG2	: ATP bağlayıcı kaset G 2
ACR	: Amerika Romatoloji Koleji
AICAR	: 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonükleotit
ALT	: Alanin transaminaz
AMPD 1	: Adenozin monofosfat deaminaz 1
APS	: Amonyum persülfat
Arg	: Arjinin
AST	: Aspartat transaminaz
ATIC	: Amino imidazol karboksiamid ribonükleotit transformilaz
ATP	: Adenozin trifosfat
bç	: Baz çifti
BHMT	: Betainhomosistein metil transferaz
BMI	: Vücut kitle endeksi
BSA	: Sığır serum albümini
C	: Sitozin
CCP	: Siklikstrülinlenmiş peptit
CD4+	: Yardımcı T hücreleri
cDNA	: Komplementer DNA
CL	: Sistasyonin γ liyaz
CRP	: C-reaktif protein
CS	: Sistasyonin β sentetaz
C-uç	: Karboksi uç
Cys	: Sistein
DAS	: Hastalık aktivite skoru
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
DMAP	: Dimetil amino propionitril
DMARD	: Hastalığı modifiye eden ilaç

DMG	: Dimetil glisin
DR1	: İnsan lökosit antijeni DR1 tipi
DR4	: İnsan lökosit antijeni DR4 tipi
DRB	: İnsan lökosit antijeni DRB tipi
EBV	: Epstein-Barr virüsü
EC	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilen daimin tetraasetik asit
ESH	: Eritrosit sedimentasyon hızı
EtBr	: Etidyum bromür
EULAR	: Avrupa antiromatizma ligi
FAD	: Flavin adenin dinükleotit
Fc	: İmmüoglobulinin yapısındaki kristalize fragment
FPGS	: Folipoliglutamat sentaz
GGH	: Gamaglutamil hidrolaz
GI	: Gastrointestinal
Glu	: Glutamin
HAQ	: Sağlık değerlendirme anketi
HLA	: İnsan lökosit antijeni
Ig	: İmmüoglobulin
IL	: İnterlökin
ITPA	: İnozin trifosfat fosforilaz
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilodalton
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MHC	: Major histokompatibilite kompleksi
µLt	: Mikrolitre
MKF	: Metakarpofalangeal
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MS	: Metiyonin sentaz
MT	: Metil transferaz
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
MTX	: Metotreksat

MTXPG	: Metotreksat poliglutamata
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
N-uç	: Amino uç
PAGE	: Poliakrilamit jel
PİF	: Proksimal interfalangial
pmol	: Pikomol
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RA	: Romatoid artrit
RF	: Romatoid faktör
RFC	: İndirgenmiş folat taşıyıcısı
RFLP	: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
rpm	: Dakikada devir sayısı
SAH	: S-adenozil homosistein
SAM	: S-adenozil metiyonin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jeli
Ser	: Serin
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmi
T	: Timin
TBE	: Tris borik asit edta
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGA	: Stop kodonu
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
THF	: Tetrahidrofolat
Tm	: Erime sıcaklığı
TNF	: Tümör nekroz faktör
Tris-HCL	: Tris hidroklorik asit
TYMS	: Timidilat sentaz
UV	: Ultraviyole

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim sürecinde desteğini, emeğini ve kıymetli zamanını benden esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Rıfat BİRCAN' a;

Tez çalışmamın deney ve hazırlanma aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Cenk ARAL ve değerli çalışma arkadaşım Serdar FINDIK ile diğer tüm Biyoloji Anabilim Dalı mensuplarına;

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmamda yardımını esirgemeyen, çeviriler konusunda her zaman yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nadim YILMAZER'e;

Tez çalışmamda kullandığım örneklerin sağlanmasında yardımcı olan Bezmi Alem Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Aylin Rezvani hocama ve Anabilim dalı mensuplarına;

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca maddi manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen ve yüksek lisans öğrenimimi tamamlamamda şüphesiz büyük payı olan sevgili ailem ve beni bu yolda hiç yalnız bırakmayan sevgili eşim Merve DÜNDAR' a çok teşekkür ederim.

Eylül, 2014

Sinan DÜNDAR

Öğr. Gör.

Okan Üniversitesi Patoloji

Laboratuvar Teknolojileri

1. GİRİŞ

Romatoid artrit (RA) aynı anda birçok eklemden tutukluğa neden olan, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen ağrılı ve iltihaplı otoimmün bir hastalıktır. RA eklemlerde deformasyon ve işlev yeteneğinde azalmalara neden olur (Hamuryudan 2003). RA'nın kesin olarak etiyolojisi bilinmemesine rağmen immünogenetik, hormonal ve çevresel birtakım faktörlerin hastalığın gelişiminde rol oynadığı öngörülmektedir (Lee ve Weinblatt 2001, Ranganathan ve ark. 2003).

RA eklemlerin sinovyal membranlarında kronik inflamasyonla karakterizedir. Hastalığın ilk belirtisi, genellikle parmak eklemlerinde meydana gelen ağrı ve şişliktir. Daha sonra büyük eklemler, özellikle diz, dirsek ve omuz etkilenir. Aktive olmuş enflamatuar mediatörler, sinovyal membranlardan infiltre olarak kemik ve kıkırdakta hasara yol açarlar. Deri altında romatoid nodüller oluşur. RA sistemik bir hastalık olduğu için daha ileri aşamalarda vücudun diğer bölümleri ve organları da etkilenir (Ranganathan ve ark. 2003). RA sadece eklem iltihabı veya eklem şişliği gibi etkilerle sınırlı kalmayan, solunum sistemi, dolaşım sistemi, göz tutulması, kas tutulması gibi eklem dışı etkilere de sahip olan bir hastalıktır.

RA tanısının erken konulması, tedavi ile eklem dokusundaki hasarın önüne geçilebilmesi açısından çok önemlidir. RA kronik bir poliartrittir ve başlangıç şekli hastadan hastaya farklılık gösterir. Tipik semptomları olanlarda sıklıkla hastalığın ilk yılında tanı kolaylıkla konulabilir. Fakat çoğu zaman hastalığın ilk dönemlerinde klinik semptomlar belirgin değildir. Atipik ilerleme gösteren semptomlara sahip birçok hastada tanı koymak için uzun zaman geçebilir. Bu nedenle, tanı için özgül ve duyarlı serolojik testlere ihtiyaç vardır.

Hastalığın teşhisi ilk defa 1950 yıllarında Amerika Romatizma Derneği tarafından oluşturulan, daha sonra 1987 ve 2010 yıllarında güncellenen hastalık tespit çizelgeleri ile konulmaktadır. Çizelgede hastalığın seyri, eklemlerdeki deformasyonlar ve meydana geldiği eklem çeşidine göre numaralandırma yapılarak hastalık hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Bu ölçütlerin duyarlılık ve özgüllüğü %90'a yakındır. Ölçütlerden en az 4 tanesinin hastada bulunması ve hastanın yakınmalarının 6 haftadır devam ediyor olması ayırıcı tanı için gerekli kriterlerdir (Yazıcı ve Erkan 2003).

RA tedavisinde sıklıkla Methotrexate (MTX), Leflunomide, Sulfasalizin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar bazı hastalarda mide ağrısı, kusma, diyare şeklinde ortaya çıkan gastrointestinal sistem komplikasyonları (GİS) ve karaciğer fonksiyon değerlerindeki artış sonucu hepatotoksisite gelişimi oluşturmaktadır. Bu durumlar ortaya çıktığında tedavinin kesilmesi önerilmektedir (Buch ve Emery 2002, Bailey ve ark. 2002, Dervieux ve ark. 2006). Genel olarak bireyler ilaç tedavilerine karşı farklı yanıtlar vermektedirler. Bu farklı yanıt verme nedenleri arasında hastanın yaşı, ırkı, cinsiyeti, çevre, ilaç etkileşimleri, eşlik eden başka hastalıklar ve hastanın eş zamanlı aldığı tedaviler gibi pek çok neden sayılabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, ilaçlara karşı oluşan yanıt farklılıklarında bu nedenlerin yanında bireyler arasındaki genomik farklılıkların da önemli oranda etkili oldukları belirtilmektedir (Lee ve Weinblatt 2001, Hamuryudan 2007). İlaç tedavilerinde bu bireysel farklılıklarını araştırılma gerekliliğinin doğması farmakogenetik biliminin önem kazanmasına neden olmuştur. Farmakogenetik, bireylerin genetik yapılarındaki değişkenliğe bağlı olarak ilaç metabolizmalarına karşı verdikleri yanıt ile birey üzerinde oluşabilecek farklı etkileri inceleyen bir bilim dalıdır (Norris ve ark. 1996).

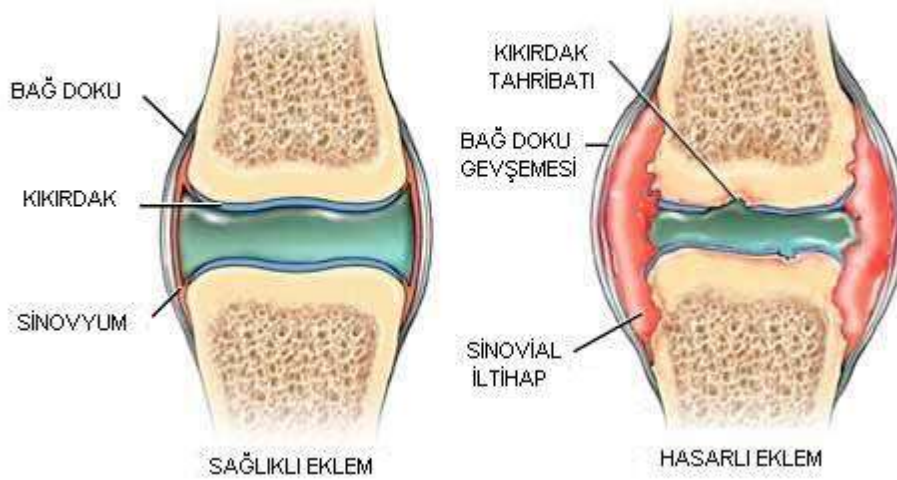
RA'in farmakogenetiğinde çok sayıda aday gen çalışmaları mevcuttur, ancak bunlardan en önemlileri metilentetrahidrofolat redüktaz geninde meydana gelen C677T ve A1298C polimorfizmleridir. MTHFR geni MTHFR enzimini kodlar ve bu gende meydana gelen polimorfizmler enzimin çalışma etkinliğini düşürmektedir. MTHFR proenflamatuvar yanıtla ilgili bir amino asit olan homosistein metabolizmasında görev alan enzimi kodlar. Çok fazla sayıda aday gen çalışmaları yapılmış olsa da bu genler ve MTX tedavi yanıtı arasındaki gerçek ilişki hala belirsizdir (Kurzawski ve ark. 2007).

Bu çalışmanın amacı, bireylerin ilaçlara verdiği yanıtta bireysel farklılıkların ilaç metabolizmasında görevli olan enzimler ve bu enzimleri kodlayan genlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının tespit edilmesidir. Yapılan bu çalışmada, MTX kullanan romatoid artrit hastalarında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizimlerinin ilaç etkinliği ve toksisitesi üzerine olası etkilerinin saptanması hedeflenmiştir. Böylece ilaç tedavisi sonucu oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesi ve etkin bir tedavinin sağlanmasına katkıda bulunmak amacıyla bu tez çalışması planlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Romatoid Artrit

RA, birçok eklemi aynı anda tutabilen, etiyojisi bilinmeyen, kronik sistemik iltihabi bir otoimmün hastalıktır. Romatoid artrit eklem tutulumu ve şekil bozukluğu yaparak zaman içinde önemli sakatlıklara yol açabilmektedir. Vücuttaki diğer organları da etkileyebilmesi nedeniyle bu hastalığı sadece bir eklem rahatsızlığı olarak görmek doğru değildir. Hastalığın klinik seyri, hastadan hastaya büyük değişiklikler gösterir. Bazı hastalarda az sayıda, hafif seyirli ve kısa süreli eklem tutulumları görülürken, bazı hastalarda ise tedavi ne kadar yoğun olursa olsun, kısa sürede sakatlıklar ve önemli organ hasarları gelişebilmektedir (Hamuryudan 2003). Aşağıdaki şekilde sağlam kişi ile hasta kişilerin eklem yapılarında meydana gelen değişimler gösterilmektedir. Kısaca, romatoid artrit tüm dünya popülasyonunun %0,5-1'ini etkileyen, bireylerde çalışma kaybı, eklemlerde ağrı, depresyon ve hareket kısıtlılığı gibi önemli komplikasyonlara neden olan kronik bir hastalık olarak tanımlanabilir (Lee ve Weinblatt 2001, Ranganathan ve McLeod 2006).



Şekil 2.1. Romatoid artrit hastalığında eklem hatlarında meydana gelen anatomik ve fizyolojik değişiklikler

2.1.1. Epidemiyoloji

RA tüm dünya popülasyonunun %0.5-1'ini etkileyen kronik bir hastalıktır (Ranganathan ve ark. 2003). Birçok romatolojik hastalıkta olduğu gibi RA'nın kesin nedeni bilinmemekle beraber, immünogenetik, hormonal ve çevresel birtakım faktörlerin hastalığın gelişiminde rol oynadığı öngörülmektedir. Hastalık tüm dünya genelinde görülmesine rağmen çevresel ve genetik faktörlere bağlı olarak, hastalığın görülme sıklığı ülkeler ve toplumlar arasında farklılıklar göstermektedir (Göksoy 2002). RA'e, diğer otoimmün hastalıklarda da olduğu gibi kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha sık rastlanmaktadır. Hastalık her yaşta görülebilmekle beraber, sıklıkla 40 ve 50'li yaşlarda başlar (Buch ve Emery 2002).

2.1.2. Etiyoloji

Etiyolojisi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, RA genetik ve çevresel faktörlerin işin içine girdiği multifaktoriyel bir hastalık olarak kabul edilir.

2.1.3. Genetik yatkınlık ve genetik yatkınlığa neden olan faktörler

Genetik yatkınlık, fizyolojik durum oluşumunun ya da bir hastalık gelişiminin kalıtsal riski olarak tanımlanabilir. Bir bireyde herhangi bir hastalığa karşı genetik yatkınlığın bulunması, bu bireyin mutlaka hastalığa yakalanacağı anlamına gelmemektedir. Sadece genel popülasyon ile karşılaştırıldığında, bu bireyin hastalığa yakalanma riskinin daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. RA için genetik yatkınlığa neden olan faktörler incelendiğinde:

- 1) Hastalığa yatkın olan bireyin mensubu olduğu aile içinde hastalık birden çok kişide görülmektedir.
- 2) Tek yumurta ikizlerinde hastalığın her iki bireyde görülme sıklığı %15–20 arasındadır. Bu oran çift yumurta ikizleri ile karşılaştırıldığında 4 kat daha fazla bir hastalık insidansına işaret eder.
- 3) HLA DR4 ve HLA DR1 genlerindeki polimorfizmler veya haplotip farklılıkları romatoid artrit yatkınlık yaratan genlerin başında gelmektedirler. HLA DR4 geni en az 22 alelden oluşmaktadır. Bu alellerden romatoid artrit ile ilişkili bulunanların hepsinde benzer amino asit dizilimi gösteren bir bölge olduğu görülmüştür. Bu bölge DRB molekülünün 67–74. amino

asitleri arasında bulunur ve ortak epitop olarak adlandırılır. Bugün için ortak epitop bölgesinin romatoid artritte genetik yatkınlık yarattığı düşünülmektedir. Ayrıca, romatoid artrit ile ilişkili alelleri taşıyan kişilerde hastalığın daha ağır seyrettiğini bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Hamuryudan 2003).

RA'ya genetik yatkınlığın araştırılması amacıyla yapılan aile çalışmalarında, RA'in hastalık tanısı konan bireylerin birinci dereceden akrabalarında genel popülasyondan 3-4 kat daha sık görüldüğü belirtilmektedir ve bu oran %10 olarak tespit edilmiştir. İkizler üzerinde yapılan çalışmalarda da genel popülasyon ile karşılaştırıldığında tek yumurta ikizleri arasında hastalığın görülme sıklığı %30, çift yumurta ikizleri arasında %5 daha fazla olduğu saptanmıştır (Mevorach ve Paget 2000, Buch ve Emery 2002).

Bunun yanı sıra, Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) veya bilinen diğer adıyla İnsan Lökosit Antijenleri (HLA), MHC sınıf I ve II ürünleri ile T hücrelerine antijenik peptitleri sunan sistemi sağlayan bir gen bölgesidir. RA'in HLA-DR4 ve -DR1 gen lokusları ile ilişkili olduğu literatürde gösterilmiştir. HLA-DR4'un alt gruplarından HLA-DRB1 0401, -0404, -0408 RA ile ilişkili olduğu düşünülen alellerdir. Bu MHC genlerinin sadece hastalığın başlaması ile değil, seyri ve şiddeti ile de ilişkili olduğu görülmüştür. Hastalık HLA-DRB1 0401, 0404, 0408 alelerini taşımayanlarda daha hafif ve seronegatif seyretmekteyken, DRB1 04 alelini homozigot olarak taşıyan bireylerde daha ağır ve ekstraartiküler tutulumlu bir hastalık tablosu oluştuğu bildirilmiştir (Öncel ve ark. 2002). HLA DR2, DR3 ve DR7'nin hastalık riskini azalttığı kabul edilmektedir (Hajeer ve ark. 2000).

HLA kompleksi dışındaki bazı genler de RA'te genetik yatkınlığa katkıda bulunmaktadır. Bunlar, T hücrelerinde antijen reseptörünün ekspresyonunu ve immunoglobulinlerin (Ig) hem hafif hem de ağır zincirlerini kontrol eden genlerdir. Ayrıca tümör nekroz faktör α (TNF- α) ve interlökin (IL) 10 genlerindeki polimorfizmler ve kromozom 3 (3q13)'deki bir bölgenin de RA ile ilişkili olduğu literatürde belirtilmiştir (Gümüüşdiş ve Doğanavşargil 1999).

2.1.3.1. Çevresel faktörler

Sigara kullanımı bugün için seropozitif RA gelişimi için önerülen önemli risk faktörüdür. Kızamıkçık, parvovirüs 19, EBV gibi çeşitli enfeksiyon ajanlarının da RA

gelişimine katkıda bulunduğu öne sürülmüş, ancak literatürde bu biyolojik ajanların hastalıkla olan ilişkisi kesin olarak ispat edilememiştir. Hastalığın kadınlarda daha fazla görülmesi, patogeneizde hormonların da yer aldığına işaret etmektedir. Ancak bilinen tek şey doğum kontrol hapı kullanımının hastalığın ağır seyrine karşı koruyucu olduğudur (Hamuryudan 2003).

2.1.4. Patoloji

RA’te görülen histolojik değişiklikler hastalığa spesifik değildir ve tutulan organa göre değişen özellikler gösterirler. Ana değişiklikler sinovyum içeren tüm diartrodial eklemler, tendon kılıfları ve bursalarda görülür. Bu bölgelerde gelişen iki ana değişiklik, sinovyal hücrelerde kronik iltihaba bağlı hipertrofi ve çoğunlukla nötrofillerden oluşan infiltrasyondur. Zamanla hücresel elemanların proliferasyonu sonucu hipertrofiye neden olan sinovyum villöz bir hal alır ve kıkırdak içine parmak gibi uzanan pannus olarak adlandırılan oluşumlar gelişir. Pannusta bulunan makrofajların salgıladıkları proteinaz ve kolejenazların yıkıcı etkileri sonucu subkondral kemikte eklem harabiyetinin ilk göstergesi olan erozyonlar gelişir (Hamuryudan 2003).

Ayrıntılı yapısal çalışmalarla, sinovyal hücrelerin makrofaj veya fibroblast yapısında olan hücreler olduğu ortaya konmuştur. Köken olarak kemik iliği kaynaklı ve makrofaj yapısında olan sinovyositler, Fc reseptörleri içerirler ve fagositoz yapma yeteneğindedirler. Bu hücreler ayrıca, yüzeylerinde HLA sınıf 2 moleküllerini de taşırlar. Fibroblast yapısında olanlar ise mezenşimal kökenlidirler ve diğer hücre tipindeki yapısal özellikleri göstermezler. RA’te sinovyumda bu iki hücre tipi başlangıçta birlikte artmakla beraber, kronikleştikçe fibroblast tipi olan sinovyositlerin arttığı gözlenir. Bu hücreler pannusun esas hücre grubunu oluştururlar. Romatoid sinovyumda histopatolojik olarak enflamatuvar yapı incelendiğinde, mononükleer hücreler, T-lenfositler, makrofajlar ve plazma hücreler ilk bakışta dikkati çekerler. Anjiogenez başlangıçtan itibaren vardır. Anjiogenez uyarılmasında makrofajlar, fibroblastlar ve lenfositlerden salınan büyüme faktörleri önemli rol oynarlar. Sonuç olarak kısa zamanda sinovya hücrelerinde artış gözlenir ve villöz oluşumlar meydana gelir (Gümüüşdiş ve Doğanavşargil 1999).

Bu prolifer olmuş sinovyal oluşumlara pannus adı verilir. Bunlar eklemin anatomisinin bozulmasında ve deformatelerin oluşmasında birinci derecede rol oynarlar. Pannusların etkili olduğu alan, kıkırdakla kemiğin birleştiği bölgedir. Büyümeye etkili sitokinlerden TGF- β 'nın (Transforme edici büyüme faktörü- β) pannus oluşumunda rolü olduğu kabul edilmektedir. RA'li olgularda sinovyal zarda en fazla görülen T-hücre grubunu daha çok CD4+ yardımcı T-hücreleri oluşturur (Gümüşdiş ve Doğanavşargil 1999).

2.1.5. Klinik bulgular

RA'in klinik belirtileri sistemik iltihap (halsizlik, amiloidoz), serozit (sinovit, perikardit, plörezi), granülomlar (deri altı ve iç organlarda nodül gelişimi) ve vaskülitlerdir (deri, sinir ve iç organ). Hastalığın başlangıcında halsizlik, terleme ve hafif kilo kaybı görülür ve bu belirtiler zaman zaman eklem yakınmalarının önüne geçebilir (Hamuryudan 2007).

Dikkatli bir klinik değerlendirme, en uygun tedavinin mümkün olduğunca erken başlatılması için kritik aşamadır. Sabah tutukluğu, günlük aktivitelerde zorlanma, diffüz ve simetrik eklem ağrıları ve periferik küçük eklemlerin şişliği en sık rastlanan yakınmalardır. RA kronik bir poliartrittir ve başlangıç şekli hastadan hastaya farklılık gösterir. Hastalık olguların %55-70 kadarında yavaş ve sinsi olarak başlar.

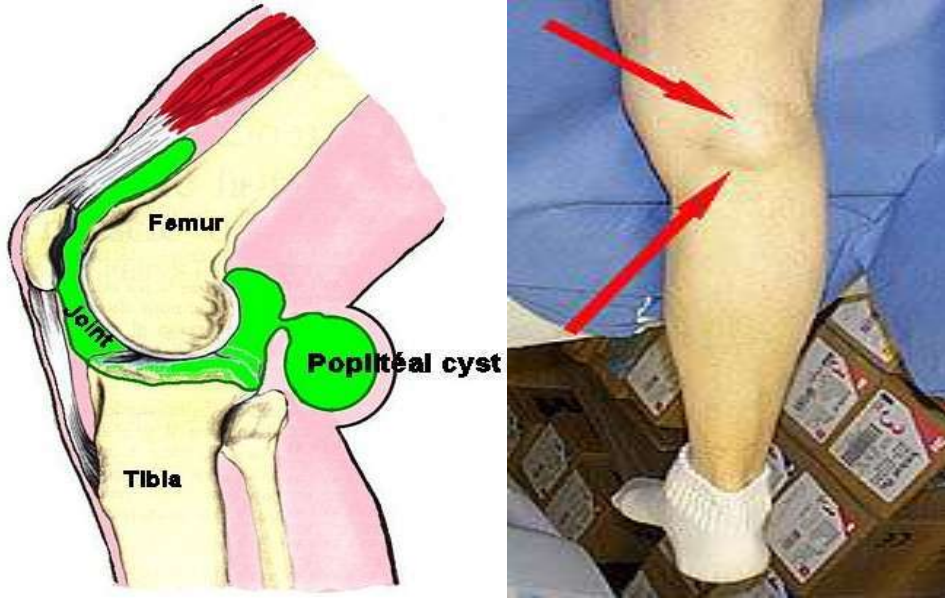
Amerikan Romatizma Derneği ilk olarak 1958 yılında RA tanı kriterlerini geliştirmiş, 1987 yılında bunları yenilemiştir. Bu kriterlerin duyarlılık ve özgülüğu %90'a yakındır. Kriterlerden en az 4 tanesinin hastada bulunması ve hastanın yakınmalarının 6 haftadır devam ediyor olması ayırıcı tanı için gerekli kriterlerdir (Yazıcı ve Erkan 2003). Aşağıda Amerikan Romatizma Koleji'nin (ACR) 1987 yılında yaptığı ve hala günümüzde de geçerliliğini koruyan RA'in belirlenmesinde yararlanılan çizelge yer almaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Romatoid artrit ACR 1987 tanı kriterleri

Sabah tutukluğu	Eklemler ve çevrelerinde en az 1 saat süren
Üç veya daha fazla eklemden artrit	Bir hekim tarafından tespit edilen, en az 6 haftalık eklem şişliği
El eklemlerinde artrit	El bileği, MKF ve PİF eklemlerinde en az 6 haftalık şişlik
Romatoid nodül	Eklem kenarları ve temas bölgelerinde bir hekim tarafından tespit edilen deri altı nodülleri
Romatoid faktör	Normal kişilerde %5'den daha düşük pozitif
Radyolojik değişiklikler	Ön-arka planda çekilmiş düz el grafilerinde görülen erozyonlar ve periartiküler osteoporoz

RA'te eklem belirtileri en sık rastlanan belirtilerdir. Sabah tutukluğu, hareket kısıtlılığı, ağrı ve şişlik görülür. En çok tutulan eklemler metakarpofalanjial (MKF), el bilekleri, proksimal interfalanjial (PİF) eklemlerdir. Eklem tutulumu simetriktir. İlerlemiş vakalarda ellerde düğme iliği, kuğu boynu deformiteleri, ulnar deviasyon gelişebilir (Gümişdiş 2003).

Yorgunluk, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı, yaygın kas-iskelet ağrıları ilk özgül olmayan yakınmalardır. Bazen düşük dereceli ateş, Raynaud fenomeni gibi atipik bulgular olabilir. Haftalar veya aylar süren bir süreçte artraljiler, sabah tutukluğu ve eklemlerde şişlikler oluşur. Sabah tutukluğu, ağrıdan önce ortaya çıkan ilk bulgu olabilir. Bu fenomen büyük olasılıkla uyku esnasında inflamasyonlu dokularda ödeme bağlı olabilir. Hareketin başlamasıyla kasların kullanımına bağlı olarak damarlarda dolaşımın hızlanmasıyla ödem azaldıkça tutukluk azalır (Ergin 2000). Hastalık ilerledikçe tutulan eklem sayısı da yavaş yavaş artar. Hastaların %25 kadarı akut başlangıç gösterir. Başlangıçta tek veya az sayıda eklemi tutan şekli ise daha çok genç kadınlarda görülür ve RF negatiftir. Sistemik başlangıç orta yaşlı erkeklerde daha sıktır. Hastalarda ateş, anemi, plörezi, perikardit, döküntü gibi eklem dışı klinik bulgular görülebilir. Palindromik başlangıç, ortalama iki-üç gün süren, düzensiz aralıklarla tekrarlayan, akut mono veya oligoartiküler artrit ile karakterizedir.



Şekil 2.2. Popliteal kist (Baker kisti)

Şekil 2.2’de RA’in neden olduğu diz eklemi örneği verilmiştir. Sabah tutukluğu ile omuz ve kalça çevrelerinde ağrı ön plandadır. Zaman içinde eklem bulgularının yerleşmesi ile tanı konulur. Daha sonra tanıyı takiben, belirtilen bulgular değerlendirilip bu bulgulara göre hastalığın teşhisi konusunda bir skala ortaya çıkarılır. Aşağıda 2010 yılında güncellenen, romatoid artrit hastalık tanısı ölçütlerine ait çizelge gösterilmektedir (Çizelge 2.2). Bu çizelgede yer alan puanlama sistemi yardımıyla hastalığın tanısı konulmaktadır (Gümüşiş 2003).

2010 ACR/EULAR Romatoid artrit sınıflandırma kriterleri

1. En az bir ekleminde klinik sinovit (şişlik) olan,
2. Sinovitin başka bir hastalıkla açıklanamadığı hastalarda, kesin RA sınıflaması için hasta skorunun $\geq 6/10$ olması gerekir.

Çizelge 2.2. ACR/EULAR 2010 romatoid artrit sınıflandırma kriterleri (Anonim 1)

A. EKLEM TUTULUMU	SKOR
1 büyük eklem	0
2-10 büyük eklem	1
4-10 küçük eklem (\pm büyük eklem)	3
> 10 eklem (en az bir küçük eklem)	5
B. SEROLOJİ	
RF ve anti-CCP antikorları negatif	0
RF veya anti-CCP antikorları düşük pozitif (\leq normalin üst sınırının 3 katı)	2
RF veya anti-CCP antikorları yüksek pozitif ($>$ normalin üst sınırının 3 katı)	3
C. AKUT-FAZ REAKTANLARI	
CRP ve ESH normal	0
CRP veya ESH yüksek	1
D. BELİRTİLERİN SÜRESİ	
< 6 hafta	0
\geq 6 hafta	1

RA, eklem tutulmalarının yanı sıra diğer bazı sistemleri de etkileyen bulgular verir. RA' in eklem dışı bulguları Çizelge 2.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Romatoid artrit'e eklem dışı diğer bulgular.

Deri tutulumu	Romatoid nodüller, Palmar eritem, Vaskülitik deri lezyonları
Solunum sistemi	Plörezi, İnterstisyel akciğer fibrozu, Nodüller, Bronşiolit, Pulmoner hipertansiyona yol açan artrit
Dolaşım sistemi	Perikardit, Mitral valvülopati, İleti bozuklukları, Koroner vaskülit
Göz tutulumu	Keratokonjunktivit sikka, Skelerit, Keleromalasi perforans
Nörolojik tutulum	Bası nöropatileri, Periferik nöropati, Mononörit multipleks
Musküler tutulum	Güçsüzlük ve artrofi
Hematolojik tutulum	Felty sendromu, Anemiler, Lenfoma

2.1.6. Romatoid artrit tedavisi

RA tedavisi son 10 yıl içinde büyük değişikliğe uğramış ve birçok yeni ilaç kullanıma girmiştir. Bu dönem süresince hastalığın erken tanısı konulup tedavi edilmediğinde ilerlediği ve kalıcı eklem hasarına neden olduğu anlaşılmıştır (Gümişdiş 2003, Hamuryudan 2007). Bu açıdan dikkat edilmesi gereken üç nokta vardır.

- Erken tanı
- Prognostik faktörlerin belirlenmesi
- Erken ve agresif tedavi

Erken tanı sonucu, ilk iki üç ayda tedavisine başlanan hastada, hastalığın ilerleyişi durdurulup kalıcı eklem hasarları engellenmiş olur. Hastalarda prognostik faktörler belirlenip, tedavi buna göre başlandığında daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Kötü prognostik faktörler, erken ve yaygın sinovit, eklem erozyonu, eklem dışı bulgular, RF pozitifliği, sabah sertliğinin süresi, aile hikayesinin bulunması olarak sayılabilir (Paget 1997, Weinblatt 1997, Gümişdiş 2003, Hamuryudan 2007).

RA tedavisinde, yeni geliştirilen ilaçlar da dahil olmak üzere kullanılan ilaçların hiç biri hastalığın tamamen ortadan kalkmasını sağlamamaktadır. Yine de son yıllarda RA'in tedavisinde olumlu gelişmeler gözlemlenmektedir. Bu gelişmeler, hastalığın erken tanısına ve tedavinin uzun vadedeki prognozuna olumlu katkıda bulunmuş, özellikle hastalığın erken evrelerinde ilaçların kombine kullanılmasının tek tek kullanılmasından daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber tedaviye verilen yanıtı değerlendirmede ve hastaların sağlık durumunu ölçmede kullanılan çeşitli ölçüm yöntemleri de geliştirilmiştir (Hamuryudan 2003).

Günümüzde RA tedavisinde kullanılan ilaçları,

- a) nonsteroid antiinflatuar ilaçlar,
- b) kortizon;
- c) hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar (DMARD'lar; DMARD=Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs) olarak özetlemek mümkündür.

Hastalığın tedavisi bu ilaçların bir arada kullanılmasından ibarettir. İntravenöz ve tek tek eklemlere yönelik lokal kortizon uygulamaları da yapılmaktadır. Hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar prognozu engelleyerek doku erozyonu gelişimini durdurduğu veya

geciktirdiği kabul edilen ilaçlardır. Metotreksat, sulfasalazin, leflunomid ve hidroksiklorokin bu grupta en çok kullanılan ilaçlardır (Hamuryudan 2007).

2.1.6.1. Nonsteroid antiienflamatuar ilaçlar

Eklem ağrısı ve sabah tutukluğunu gidermede oldukça etkili olan bu ilaçların etkileri yarı ömürleri ile sınırlıdır. Sedimentasyon, CRP gibi akut faz yanıtlarını baskılamazlar ve ayrıca hastalığın ilerlemesi ve eklem hasarının gelişmesine etkileri yoktur. Etki bakımından aralarında büyük bir fark olmayan bu ilaçların seçimlerinde yarılanma süreleri, gastrointestinal sistem başta olmak üzere çeşitli yan etkiler, hasta uyumu ve fiyat rol oynamaktadır (Hamuryudan 2003).

2.1.6.2. Kortizon

RA'in eklem bulguları düşük doz (günde 5–7.5 mg prednizolon) kortizona iyi yanıt verirse de, ilacın dozu ve kullanıldığı süreye bağlı olarak gelişen yan etkiler kortizon kullanımını kısıtlar. Yine de düşük doz prednizolon böbrek, gastrointestinal sistem, kalp gibi eşlik eden hastalığı olanlarda, yaşlılarda ve gebelerde çoğu zaman tercih edilen ilaç olmaktadır. Düşük doz prednizolon doku erozyonu gelişmesini geciktirmektedir. Organ tutulumlarında tutulumun şiddetine bağlı olarak daha yüksek dozlarda kortizon gerekebilmektedir. Hastalığın alevli dönemlerinde kısa süreli intravenöz ve tek tek eklemlere yönelik lokal kortizon uygulamaları da yapılmaktadır (Hamuryudan 2003).

2.1.6.3. Hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar (DMARD'lar)

DMARD'lar daha öncede belirtildiği üzere hastalığın seyrini değiştirerek doku erozyonu gelişimini durdurduğu veya geciktirdiği kabul edilen ilaçlardır. Bütün RA'li hastalarda tanı konduktan sonra gecikmeden başlanılmalıdır. Metotreksat, sulfasalazin, leflunomid ve hidroksiklorokin bu grupta en çok kullanılan ilaçlardır (Hamuryudan 2003, Demirel ve Kırnay 2010).

Yakın zamana kadar RA tedavisi “piramit prensibi” olarak isimlendirilen bir yaklaşıma göre yapılmaktaydı (Tetik 2006). Bu tedavide hastalar bir süre sadece birinci basamakta yer alan nonsteroid antiienflamatuar ilaçlarla, daha sonra ikinci basamağı oluşturan

hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar ile tedavi edilmekteydiler. Genel olarak birinci basamak ilaçların temelini oluşturan nonsteroidlerin, eklem ağrısı ve sabah tutukluğunun giderilmesinde etkili olduğu, sadece alındıkları süre ile kısıtlı olup sedimantasyon, CRP gibi akut faz yanıtlarını baskılayamadıkları ve eklem hasarının gelişmesini engelleyemedikleri ileri sürülmekteydi (Tetik 2006). Aralarında büyük bir fark olmayan bu ilaçların seçimi, ilaçların yarılanma süreleri, yan etki oluşturup oluşturmamaları, hasta uyumu ve fiyat gibi etkenler göz önünde tutularak yapılmaktaydı. İkinci basamak ilaçlar ise uygun şekilde kullanıldıklarında, doku erozyonlarının ortaya çıkışını önlemeleri veya yavaşlatmaları nedeniyle hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar olarak değerlendirilmekteydi. Bu ilaçların etkileri nispeten geç ortaya çıkmakla birlikte, nonsteroid ilaçlara nazaran, tedavinin bitiminden sonra bile etkilerini bir süre daha devam ettirmeleri nedeniyle birinci basamak ilaçlardan farklılık göstermektedirler (Hamuryudan 2007).

Son 10 yıldır, RA tedavisindeki geleneksel bakış ve net olmayan tedavi, yerini uygun tedavinin kanıta dayalı tutumu ile değiştirmiştir. Bu değişim, hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar olarak bilinen ilaçların en etkili şekilde kullanılmaya başlanması, DMARD'ların erken dönemde ve kombinasyon halinde kullanılması, ayrıca biyolojik DMARD'ları içeren yeni hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçların geliştirilmesi ile olmuştur. Örneğin; monoterapide kullanılan metotreksat, TNF inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanıldığında etki oranı artmaktadır (Lynden ve ark. 2006). Bugün hastalık modifiye edici ilaçların (DMARD) kullanılmasıyla birlikte RA hastalarında gözlenen deformite, güçsüzlük ve tutulmalar azalmaya başlamıştır (Berkun ve ark. 2004). Bu ilaçlardan en önemlisi olan Metotreksat ilk kez 1940 yılında kanser hastalarında kullanılmak üzere geliştirilen folik asitin spesifik antagonistidir (Chan ve Cronstein 2002). 1972'de ilk kez romatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmış, rutin tedaviye ancak 1980'lerden sonra girmiştir. RA hastalarının yarısından fazlasının MTX tedavisi görmesi ve yaygın olarak kullanılması, MTX'ı en sık kullanılan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç haline getirmiştir (Fresko 1999, Gaffney ve Scott 2005, Yazıcı ve ark. 2005).

MTX ile tedavi edilen RA hasta oranının 1985'li yıllarda %10'dan 2000'li yıllarda %76'lara kadar yükseldiği belirtilmektedir (Lynden ve ark. 2006). Tedavide MTX kullanımı oranındaki bu artışın nedeni, monoterapide hastalık aktivitesini ve eklem erozyonlarının oranını azaltması yanında, uzun dönem mortalitede de azalmaya yol açmasıdır. Buna ek olarak monoterapide MTX kullanımı RA hastalarında uzun süreli mortalitede önemli bir

azalma ile ilişkilendirilmiştir. MTX'in sağladığı hayatta kalma şansı, DMARD grubuna ait sulfasalazin, hidroksiklorokin, altın ve penicilamin gibi diğer ilaçlar tarafından sağlanamamaktadır. Düşük doz haftalık MTX'in güvenli özgeçmiş diğer seçeneklerle karşılaştırıldığında, 1980 yılından itibaren pratikte yaygın olarak kullanıma başlanmıştır (Lynden ve ark. 2006). Ancak, günümüzde MTX kullanımını sınırlandıran bazı etmenler bulunmaktadır. Bunlardan en önemliside ilacın bazı hastalarda toksisite gelişimine neden olmasıdır (Ranganathan ve ark. 2003). Yapılan klinik araştırmalar, monoterapi uygulanan RA hastalarının yaklaşık %10-30'unda toksisite gelişimi nedeniyle MTX tedavisine devam edilemediğini göstermektedir (Van Ede ve ark. 2002, Ranganathan ve McLeod 2006). Bununla beraber, son yıllarda yapılan ilaç araştırmalarıyla, ilaca verilen bireysel yanıtta çevre, beslenme, yaş, cinsiyet, kilo, ilaç etkileşimlerinin yanı sıra genetik faktörlerin de önemli olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, bireyin ilaç metabolize edici enzimleri, transport proteinleri ve reseptörlerinin genetik şifreleri ve bu şifrelerde meydana gelen değişiklikler (polimorfizmler) göz önünde bulundurularak, en uygun ilaç ve doz seçimine olanak sağlayan farmakogenetik yaklaşım, bireye özgü tedavilerin geliştirilmesinde giderek önem kazanmaktadır.

2.2. Farmakogenetiğe Giriş

Farmakoloji, ilaçların ve ilaç olabilme potansiyeli olan maddelerin kaynakları, aktivitelerini, etki mekanizmalarını, yararlarını ve yan etkilerini, kısaca biyolojik etkilerini inceleyen bilim dalıdır. Farmakolojinin alt dallarından biri de farmakogenetiktir. Farmakogenetik, bireyler arasında ilaca verilen farklı yanıtların veya ilaçların farklı etki göstermelerinin sebebi olarak, genetik görünümde bulunan farklılıklardan kaynaklandığını savunan bilim dalıdır.

Genetik faktörler, bireylerde ilaçların eliminasyon hızını, ilaç reseptörlerinin ve hedef hücrelerde ki diğer yapıların niteliğini ve niceliğini değiştirerek ilaç etkisinin bireyler arasında, etnik gruplar arasında ve ırklar arasında değişkenlik göstermesinde önemli rol oynar. Farmakogenetik, yetersiz ilaç tedavisi, advers/toksik reaksiyonlar, farmakolojik etkinin uzaması, ön-ilaç aktivasyonunun olmaması, ilaç-ilaç etkileşimlerinin artması, metabolizmanın alternatif yollara kayması ve bazı hastalıklara yatkınlık açısından önemlidir. Aslında çoğunlukla ilacın etkinliği ile ilgilenmesine rağmen, klinik açıdan oluşan yan etkilerde

oldukça önemlidir. Hastaneye başvuranların yaklaşık %5'i, yatan hastaların %10-20'si yan etkilerden yakınmaktadır (Ingelman-Sundberg 2001, Anonim 2).

Bireyler arasında ilaca verilen yanıtta değişkenlik olduğunu fark eden farmakologlar, bir ilacın etkinliğini, popülasyonun %50'sinde beklenen etkisini gösterdiği dozla ifade ederler. Çünkü reçete edilen ilacın belirli bir dozunu alan bireyler arasında sıklıkla etkinin değiştiği görülmektedir (Anonim 2). Bugünkü bilgilerimize göre, bu durumun nedeni her bireyin kendine has bir "farmakogenetik görünümü" olmasıdır. Hastaların tedavisinde hedef, kullanılan ilacın "tedavi edici plazma düzeyine" ulaşmasıdır (Ingelman-Sundberg 2001).

2.2.1. Romatoid artrit farmakogenetiği

Vücudumuzda farmakogenetik etmenlerin genetiği, karmaşık hastalıkların genetiği ile benzerlik gösterebilmektedir. Her iki durumda da proteinlerin kıyaslanabilir miktarının saptanması karmaşıktır ve her gendeki genetik çeşitlilik klinik olarak gözlenebilen toplam çeşitliliğe katkı sağlayabilir. Bu durum aynı zamanda DMARD'lar ve RA için de geçerlidir (Johnson ve Lima 2003).

RA'te DMARD'ların ve enflamatuvar yolakların hipotetik etki mekanizması hakkında artan bilgiler genetik çeşitliliğe sebep olup bu çeşitlilik içerisinde en önemlisi SNP'dir. SNP DMARD'ların tedavi etkinliği üzerine etkili olur (Chan ve Cronstein 2002, Radstake ve ark. 2007). Yapılan bir derlemede, derlemenin kapsamı tamamen DMARD farmakogenetiği üzerinedir. Bu derlemede MTX ve TNF inhibitörleri ile tedavi edilen romatoid artrit hastalarında genetik varyantlar ile her bir hastanın ilaca verdiği yanıt odak noktası olmuştur (Kooloos ve ark. 2010).

Bununla beraber MTX, kemik erozyonlarının gelişimini stabilize ettiği veya geciktirdiği ve hastalık aktivitesini azalttığı ispatlanmış olan ve RA tedavisinde yaygın olarak kullanılan hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçtır (Judith ve ark. 2006).

RA'in aktivitesinin baskılanması için gerekli olan MTX dozunun, farklı toplumlarda RA'li hastalar arasında farklılıklar oluşturabileceği hatta bazı durumlarda MTX tedavisinin etkisiz kalabileceği yapılan çalışmalar ile literatürde belirtilmektedir (Urano ve ark. 2002).

2.2.2. MTX'in farmakogenetiği

MTX'in etki mekanizması ve metabolizması tam olarak bilinmemesine rağmen, çok sayıda enzimlerin antiproliferatif ve immunosupresif etkilerinde MTX'in önemli olduğu gösterilmiştir (Cutolo ve ark. 2001, Chan ve Cronstein 2002). MTX'in hücre içi metabolizmayı düzenlemeden önce, hücre içerisine taşıyıcı enzimler ile, örneğin RFC (RFC=İndirgenmiş folat taşıyıcısı) ile girişi sağlanır. Bu girişi ATP bağlayıcı kasetler (ABC=ATP-binding cassette), özellikle ABCC1 ve 5, ABCG2 ve ABCB1 gibi taşıyıcılar kolaylaştırır (Norris ve ark. 1996, Hooijberg ve ark. 1999). MTX' in hücre içerisine girişi ile ilaç poliglutamasyona uğrar ve MTX'e glutamik asit gruplarının bağlanmasıyla MTX işlevsel hale dönüşür. Bu dönüşüm folipoliglutamat sentaz (FPGS=folypolyglutamate synthetase) enzimi tarafından kataliz edilir. Gamaglutamil hidrolaz (GGH=gamma-glutamyl hydrolase) enzimi ise FPGS enziminin işlevinin tersini yaparak MTX'a bağlı glutamik asit gruplarını koparır. Aynı zamanda bu iki enzim birbirleri ile eşgüdümlü olarak çalışır.

MTX poliglutamat (MTXPG), timidilat sentaz (TYMS) ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) gibi birkaç enzim üzerine doğrudan inhibitör etki gösterirken, folat yolağında anahtar enzim olan MTHFR üzerine dolaylı olarak inhibitör etki gösterir (Chan ve Cronstein 2002). Ayrıca, MTXPG'lar 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonükleotitten (AICAR) formil-AICAR'e dönüşümü kataliz eden AICAR transformilaz (ATIC) enzimini inhibe ederek, tepkimenin gerçekleşmesine engel olur. AICAR birikimi adenozin monofosfat deaminaz (AMPD1) gibi enzimler üzerinde doğrudan inhibitör etkisi vardır. Bu birikim anti enflamatuar etkisi olan adenozinin salınımına neden olabilir (Montesinos ve ark. 2000, Cronstein 2005).

Bugüne kadar, MTX'in farmakogenetiği ile ilgili yapılan çalışmalarda SNP seçimi MTX'in etki mekanizmasındaki yollarda etkin olan enzimleri kodlayan genler üzerindeki varsayımlar ile yapılmıştır. Ancak mevcut polimorfizm çalışmalarından karmaşık sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 4'te MTX monoterapisi ile tedavi olan RA hastalarında farmakogenetik sonuçlar gösterilmektedir.

Taşıyıcı enzimleri kodlayan ABCB1, RFC, ABCC2 genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin MTX tedavi sonucunu etkilediğini ortaya koyan çalışmalar literatürde yer almaktadır. Özellikle ABCB1 ve RFC proteinleri üzerine yapılan genetik çalışmalarda, ABCB1 ve RFC genlerindeki SNP'lerin MTX tedavisi ve etkinliği üzerinde etkili olduğu

literatürde bildirilmektedir. (Chatzikiyakidou ve ark. 2007, Ranganathan ve ark. 2008, Bohanec ve ark. 2008).

MTX farmakogenetiği üzerine yapılan en dikkat çekici çalışmalar, folat yolağında anahtar enzimi kodlayan MTHFR geni yapısında meydana gelen C677T ve A1298C polimorfizmlerin araştırılmasıdır (Van Ede ve ark. 2001, Judith ve ark. 2006, Chatzikiyakidou ve ark. 2007, Wessels ve ark. 2007). Bu enzim çeşitli metabolik reaksiyonlarla homosisteinden metiyonine dönüşümü kataliz eder (Cronstein 2005). Fonksiyonel çalışmalar bu iki mutasyonun, MTHFR enzim aktivitesinde azalmaya ve bunun neticesinde homosisteinemiye neden olacağını ortaya koymuştur (Haagsma ve ark. 1999). MTX monoterapi alan RA hastalarında, gerçekte enzim eksikliği homosisteinemiye neden olur ve toksik etki yapması söz konusudur. Bu durum sindirim sistemini etkileyebilir (Haagsma ve ark. 1999). Sonuç olarak birçok toplumda, MTHFR C677T ve A1298C ile yapılan birçok çalışmada toksisite rapor edilmiştir. MTHFR C677T ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda genel olarak MTX'a bağlı toksisite arasında bağlantı bulunamamıştır; buna karşın yapılan diğer çalışmalarda CT genotipi ile GI toksisite arasında bir bağlantının olduğu literatürde yer almaktadır (Banerjee ve ark. 2002). Yine aynı çalışmalarda 677T alel taşıyıcılarında yüksek karaciğer enzim düzeylerine bağlı olarak MTX tedavisinin kesildiği bildirilmektedir. Bununla beraber, MTHFR A1298C polimorfizmi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda çelişkili sonuçlar yer almaktadır. Literatürde yer alan iki çalışmada MTHFR 1298A aleli taşıyıcılarında ilacın yan etkileri görüldüğü bildirilirken (Kumagai ve ark. 2003, Dervieux ve ark. 2006), literatürde yer alan diğer çalışmalarda A1298C polimorfizminin MTX yan etkisi ile ilişkisi olmadığı belirtilmektedir (Genestier ve ark. 2000, Taniguchi ve ark. 2007). Bununla beraber, bazı çalışmalar ise MTHFR 1298C taşıyıcılarında gastrointestinal ve genel toksisitenin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla görüldüğünü bildirmektedir (Cronstein 1997).

Çizelge2.4. MTX kullanan romatoid artrit hastalarında farmakogenetik çalışmaların değerlendirilmesi

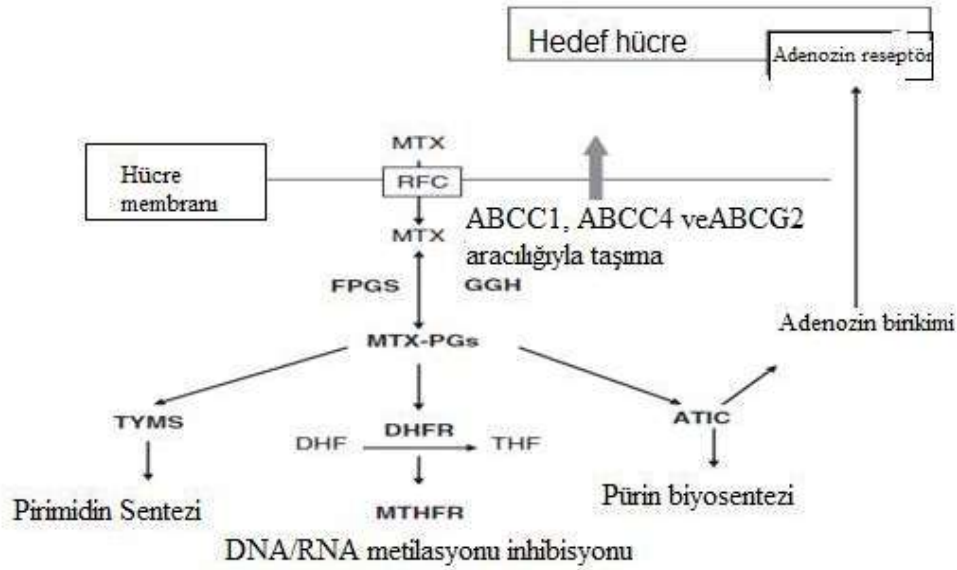
Gen	Fonksiyon	Genetik polimorfizmler	Klinik etkisi	
			Toksisitesi	Etkinliği
MTHFR	Metilen THF'dan metil-THF dönüşümünü katalizler.	C677T	T aleli taşıyanlarda GI toksisite ve artan karaciğer enzimi ilişkisi bazı çalışmalarda bulunmamıştır.	Bazı çalışmalarda etkinliği saptanmamışken, bazılarında etkinliği ile ilişkilendirilmiştir.
		A1298 C	A aleli toksisiteye neden olur, C- aleli toksisite ve GI toksisitesi ile ilişkili, toksik değildir.	Bazı çalışmalarda etkinliği yokken, bazı çalışmalarda etkinlik gösterir. Bazılarında ise etkinliği etkileyebileceği saptanmıştır.

2.2.3. Hücre içi MTX metabolizması

MTX hücre içerisine indirgenmiş folat taşıyıcısı aracılığı ile aktif taşıma yoluyla alınır (Genestier ve ark. 2000). Bu taşıma ATP-bağlayıcı kasetler aracılığıyla, özellikle ABCC1,5 ve ABCG2 gibi araçlarla yapılır (Hooijberg ve ark. 1999, Wielinga ve ark. 2005). MTX metabolizması Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Hücre içerisine giren MTX'in 2. ve 7. karbonlarına glutamik asit gruplarının eklenmesiyle, MTX poliglutamasyona uğratılır. Bu dönüşüm folipoliglutamat sentaz enzimi tarafından kataliz edilir. Poliglutamik form sayesinde MTX membran dışına çıkamaz ve böylece MTX'in hücre içerisinde yarılanma ömrü artar (Genestier ve ark. 2000). Gamaglutamil hidrolaz enzimi poliglutamasyon işleminin tersini yapar ve glutamik asit gruplarını koparır.

Dihidrofolat redüktaz ve timidilat sentaz dahil olmak üzere birçok önemli enzimler üzerinde MTXPG anahtar rol oynar. Çalışmalar MTX'in öncül ilaç olduğunu ve RA'teki

etkisinde poliglutamit formunun ana ilaç olduğunu düşündürmektedir (Chan ve Cronstein 2002). Bu nedenle, hatalı poliglutamasyon MTX'a ait olmayan yanıtın potansiyel mekanizmalardan birisi olduğunu söylemişlerdir (Galpin ve ark. 1997, Genestier ve ark. 2000). Hem ergin lösemilerde hem de RA'te MTX-PG tedavi etkinliği ile korelasyonunu göstermişlerdir (Banerjee ve ark. 2002, Dervieux ve ark. 2006). Ek olarak, MTX ayrıca MTHFR enziminin aktivitelerini hücre içi folat yoluyla etkilemektedir. Yinede MTX-PG tarafından en güçlü şekilde inhibe edilen enzim reaksiyonu 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid (AICAR)'in formil-AICAR'e dönüşüme aracılık eden AICAR transformilaz enzimi üzerinedir. AICAR ve metabolitlerinin birikimi adenozin deaminaz ve adenozin monofosfat deaminaz içeren adenozin yolağındaki diğer birçok enzim üzerinde doğrudan bir inhibitör etkisine sahiptir. Bu olayın net sonucu güçlü bir antienflamatuar etkisi olan adenozinin azalmasıdır. Bu durum hastalarda yangı şikâyetlerinin artmasına neden olmaktadır. Bu yüzden MTX metabolizmasına aracılık eden ve potansiyel farmakogenetik hedefler olabilecek birçok anahtar enzim olduğu düşünülmektedir (Cronstein 1997, Hider ve ark. 2007).



MTX metabolizmasına katılan anahtar enzimlerden bazıları. RFC; İndirgenmiş folat taşıyıcısı, MTX-PGs; metotreksat-poliglutamitler, FPGS; folipoliglutamit sentaz, GGH; gama glutamil hidrolaz, DHF; dihidrofolat, THF; tetrahidrofolat, TYMS; timidilat sentaz, DHFR; dihidrofolat redüktaz, MTHFR; metilentetrahidrofolat redüktaz, ATIC; 5-aminoimidazol-4-karboksiamit ribonukleotit transformilaz.

Şekil 2.3. MTX'in hücre içerisine giriş yolağı (Hider ve ark 2007)

RA tedavisinde en yaygın olarak kullanılan ilaç MTX'tir. Ancak birçok hastada yeterince cevap vermeyen diğer ilaçların yanı sıra hastalığı modifiye eden ilaçlar gibi etki göstermektedir (Weinblatt ve ark. 1994, Kinder ve ark. 2005). MTX yaygın olarak kullanılmasına rağmen etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır ve tedaviye verilen yanıtta belirleyicileri tam olarak karakterize edilememiştir.

Aday gen çalışmalarında MTX'in etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve tedaviye verilen yanıtta genetik belirleyicilerin keşfine odaklanılmıştır. Çalışmalarda MTX tedavi yanıtında ve MTX metabolizmasında rol oynayan birçok gen ile enflamasyon yolları arasında bir ilişkinin olduğu ileri sürülmüştür. 5-aminoimidazol-4-karboksiamit ribonükleotit transformilaz (ATIC) (Dervieux ve ark. 2004, Wessels ve ark. 2007), inozin trifosfat fosforilaz (ITPA) (Wessels ve ark. 2006 ve 2007) ve 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) aday genler olarak belirlenmiş ve bu genler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Dervieux ve ark. 2006, Kurzawski ve ark. 2007).

ATIC ve ITPA adenosin yolağındaki genlerdir. Bunlar antienflamatuar özelliğe sahip bir molekül olan ekstraselüler adenosinin salınımında görevli olan enzimleri kodlar (Wessels ve ark. 2006). MTHFR ise homosistein metabolizmasında görev alan enzimi kodlar. Bu proenflamatuar yanıtla ilgili bir amin oasit olan homosistein metabolizmasında görevli bir enzimdir. Çok fazla sayıda aday gen çalışmaları yapılmış olsa da, bu genler ve MTX tedavi yanıtı arasındaki gerçek ilişki hala belirsizdir (Kurzawski ve ark. 2007).

2.3. Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)

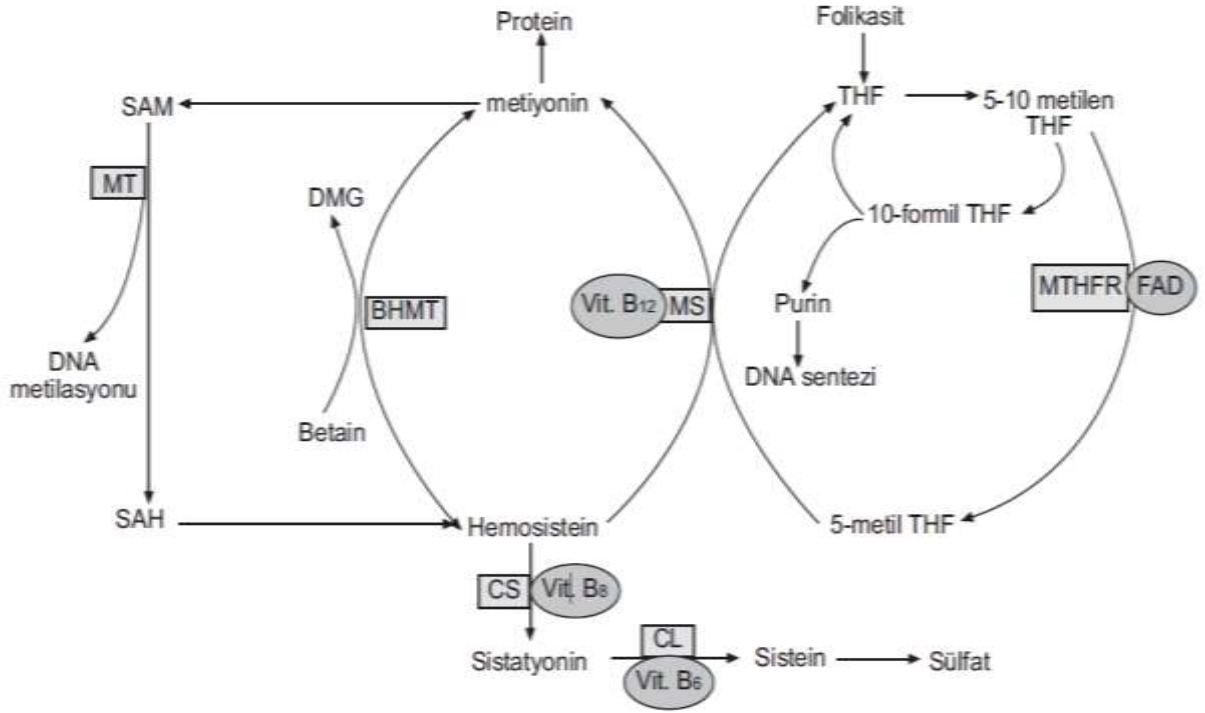
2.3.1. MTHFR enziminin yapısı ve görevleri

5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR) bir flavoprotein olup, MTHFR ailesinin (EC 1.5.2.20) bir üyesidir (Fodinger ve ark. 2000, Goyette ve Rozen 2000, Homberger ve ark. 2000). Memelilerde MTHFR'in yapısı hakkındaki ilk bilgiler, domuz karaciğer enziminin saflaştırılması ile elde edilmiştir (Rozen 1998, Sibani ve ark. 2000). Enzim sitoplazmik bir protein olup, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır (Sibani ve ark. 2000). İnsanlarda yapılan Western analizleri sonucu iki izoformunun olduğu açıklanmıştır. Bu izoformlar dokulara özgü olup, 70 kDa'luk küçük alt birimlere sahip

izoform karaciğerden, 77kDa'luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan saflaştırılmıştır (Rozen 1998, Homberger ve ark. 2000). Enzim, tripsinle proteolize uğratıldığında, 77 kDa'luk alt birim 40 kDa ve 37 kDa'luk kısımlara ayrılmaktadır. Bu ayrılma sonucunda S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkar, ancak enzimin katalitik aktivitesi değişmez. Yapılan çalışmalar sonucunda katalitik bölge olan 40 kDa'luk N-uç bölgenin substrat ve koenzim bağlama kısımlarına sahip olduğu, regülatör bölge olan 37 kDa'luk C-uç bölgesinin ise SAM bağlama kısmına sahip olduğu gösterilmiştir (Rozen 1998, Sibani ve ark. 2000). Memeli enzimi kendisine nonkovalent olarak bağlı FAD koenzimi içerir. Bu koenzim, NADPH'ın metilentetrahidrofolata transferini sağlar (Fodinger ve ark. 2000, Sibani ve ark. 2000).

MTHFR folat metabolizmasında önemli bir enzimdir ve 656 amino asitten oluşur (Homberger ve ark. 2000, Rosenblatt 2001). MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde (homosistein, transsülfürasyon ve remetilasyon yollarını kullanarak metabolize olur) görev yapar (Homberger ve ark. 2000). MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolat (5,10-metilenTHF)'ı geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolat (5-metil THF)'a dönüştürür (Şekil 2.4) (Bagley ve Jacob 1998, Homberger ve ark. 2000). 5-metil THF, DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. Bunun için 5-metil THF, metil grubunu vererek homosisteinin dönüşümünde rol oynar. 5,10-metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken, bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır (Bagley ve Jacob 1998). MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır (Peng ve ark. 2001). Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5-metil THF düzeyi azalmakta, 5,10-metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (Peng ve ark. 2001, Bailey ve ark. 2002).

MTHFR enziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği anlaşılmaktadır. Hiper homosisteinemi ve homosisteinürinin ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde, periferik nöropati, gelişme geriliği, hipotoni, inme, tromboz gibi klinik özellikler görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara popülasyon genelinde oldukça sık rastlanır, bu durumda arterial hastalıkların oluşumunda bir risk faktörüdür (Goyette ve ark. 1998, Rady ve ark. 1999).

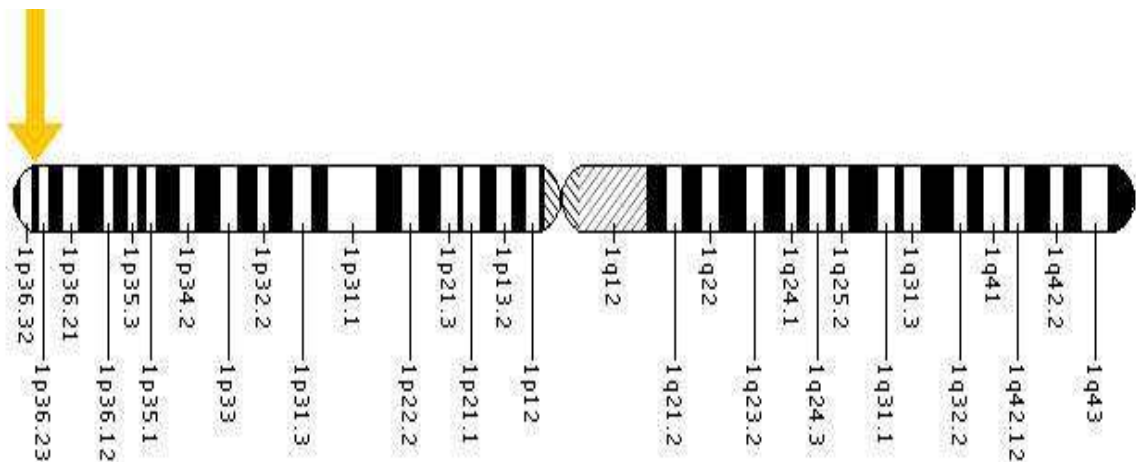


Şekil 2.4. Homosistein'in transsülfürasyon ve remetilasyonu ile ilgili metabolik yollar. (MTHFR: metilentetrahidrofolat redüktaz, MS: Metiyonin sentetaz, CS: Sistatyonin β sentetaz, CL: Sistatyonin γ liyaz, BHMT: Betain homosistein metil transferaz, MT: Metil transferaz, SAM: S-adenozilmetiyonin, SAH: S-adenozilhomosistein THF: Tetrahidrofolat, DMG: Dimetilglisin). Vücuttaki homosistein, transsülfürasyon veya yeniden metilasyon (remetilasyon) yollarını kullanarak metabolize olur. Transsülfürasyon yolunda homosistein, vitamin B6 bağımlı bir enzim olan sistatyonin β sentetaz katalizörlüğünde sistatyonin'e, o da sisteine hidrolize olur. Bu sistein de daha sonra sülfata hidrolize olarak idrarla atılır. Remetilasyon yolunda homosisteinden metiyonin'in yeniden sentezi iki farklı yolla gerçekleşir: Kısa yoldabetain homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimi, bir metil vericisi olan betainin metil grubunu, homosisteine aktararak metiyonin oluştururken, kendisi dimetilglisine dönüşür. Metilen, metil grubundan daha yükseltgenmiş olduğundan, metilentetrahidrofolatın hem bir karbon verici hem de bir hidrid iyonu tedarik edici rolü vardır. 5-metiltetrahidrofolatın bir metil grubu, kobalamin (vitamin B12) bağımlı enzim olan metiyonin sentaz aracılığı ile homosisteine aktarılarak metiyonin oluşturulurken diğer taraftan da tetrahidrofolat meydana gelir. Bu tetrahidrofolat tekrar 5-10 metilentetrahidrofolata dönüşür. Fazla metiyoninin bir kısmı proteinlerin yapısına katılırken, bir taraftan da SAM'ı, o da SAH'ı meydana getirir (Rozen 1998, Botto ve Yang 2000, Diaz-Arrastia 2000, Fodinger ve ark. 2000, Kim ve ark. 2004)

2.3.2. MTHFR geninin yapısı ve özellikleri

MTHFR geni 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimini şifreler (Martinez 2006). Goyette ve arkadaşları (1994) floresan in situ hibridizasyon yöntemiyle MTHFR geninin 1p36.3 üzerinde yer aldığını belirlemişlerdir (Şekil2.5). Gen 150 kDa'luk, 656 amino asitten oluşan homodimerik bir proteini şifreler. İnsanda MTHFR geni 11 ekzondan oluşur (Langevin ve ark. 2009). MTHFR geni 77kDa'dan oluşan birbirine eş iki alt birimi olan enzimi kodlar. Bu alt birimlerin her biri 40 kDa N-terminal domen ve 37 kDa C-terminal domen içerir (Shelnutt ve ark. 2004).

MTHFR, folat metabolizmasında anahtar enzim rolündedir. Enzim folat koenzimlerinin pürin, pirimidin sentezi ve metiyonin sentezi için paylaşımını sağlayarak organizmanın fizyolojik fonksiyonlarında düzenleyici görev alır. MTHFR, 5,10 metilen THF'in, 5-metil tetrahidrofolata (THF) indirgenmesini katalizler. Bunun için kofaktör olarak FAD'ı kullanır (Martinez 2006). 5-metil THF, metiyoninsentezi için metil grubu sağlar ve dolaylı olarak DNA metilasyonuna katılır. DNA sentezi için de, deoksiüridülatın timidilata dönüşmesinde 5,10-metil-THF gereklidir (Taşçıoğlu 2005). Bununla birlikte metil THF, folatın temel halkasal formudur ve homosisteinin metionine remetilasyonunda karbon vericisidir (Slattery ve ark. 1999). MTHFR'in aktivitesi, dihidrofolat (DHF) ve S-adenozil metiyoninin (SAM) bağlanması ile inhibe edilebilir (Jencks ve Mathews 1987).



Şekil 2.5. MTHFR geninin lokalizasyonu (Anonim 3)

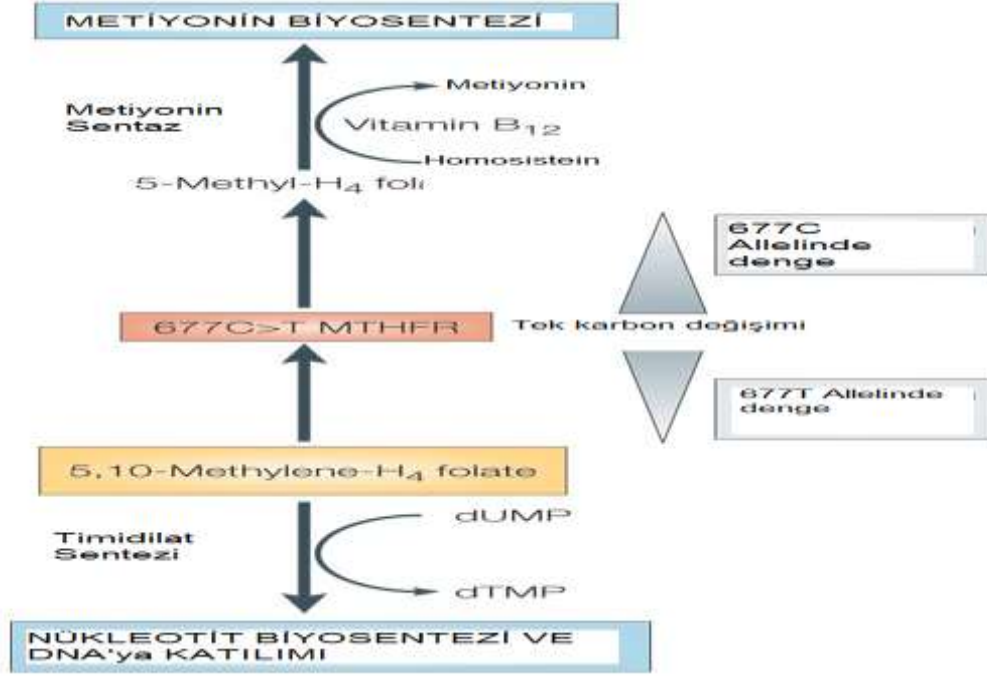
Folatın tetrahidrofolat havuzuna tekrar girmesi sadece B vitaminine bağımlı metiyonin sentetaz reaksiyonu ile olmaktadır (Sibani ve ark. 2000). MTHFR aktivitesinin DNA metilasyonu, DNA tamiri ve DNA sentezindeki potansiyel etkisi MTHFR'yi kanser etkileyici gen yapmıştır (Rosenblatt 2001).

2.3.3. MTHFR polimorfizmleri ve hastalıklarla ilişkisi

İlk olarak, MTHFR C677T polimorfizmi Frosst ve arkadaşları tarafından 1995 yılında tanımlanmıştır. 4. ekzon ve 677. baz çiftindeki sitozin\timin değişimi MTHFR'de alanin\valin yer değiştirmesine ve bunun neticesinde enzim aktivitesinde azalma (%60 oranında) ve sıcaklığa dayanıksızlığında artmaya sebep olmaktadır (Giovannucci 2002, Boris ve ark. 2004).

MTHFR geninde yabanıl tipe karşı C677T polimorfizmi içeren bireylerde enzim seviyelerinde farklılık gözlenir. Bu farklılıkların DNA metilasyonu ve nükleotit havuzu büyüklüğü ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. MTHFR geninin varyant formunda homozigot olarak bulunan bireyler (TT) yabanıl tipe göre düşük oranda kolon kanser riski taşımaktadırlar. Yüksek oranda folat, B6 ve B12 vitamini alan TT genotipli bireylerde bu risk yabanıl tipe göre %30-40 oranında azalmaktadır (Rady ve ark. 1999). Bunun nedeni, kolorektal kanser ve lösemnin çok hızla çoğalan dokulardan meydana gelmesi ve DNA sentezine yüksek oranda gereksinim duymasındır (Skibola ve ark. 1999).

Toplumda bireylerin %15 kadarına varan bir oranda rastlanan bu mutasyon enzim aktivitesinin azalması ile homosistein birikimine neden olur. MTHFR enziminin aktivitesindeki bir azalma metil THF'in azalması, dolayısıyla metilen THF'in artmasına sebep olur (Boris ve ark. 2004, Boccia ve ark. 2009).



Şekil 2.6. MTHFR C677T polimorfizmi (Lucock ve Yates 2006)

Homozigot mutant genotip (677TT) düşük serum folatı, yüksek plazma homosisteini, hücrelerde farklı folatların dağılımlarında değişikliklik ve koroner kalp hastalığı gibi farklı kronik rahatsızlıklarda değişik risk ve çeşitli kanserler ile bağdaştırılmıştır (Götze ve ark. 2007). C677T polimorfizmine bağlı olarak meydana gelen MTHFR aktivitesindeki azalma vasküler hastalıklar, nöral tüp defekti, erkek infertilitesi, Down sendromu gibi farklı hastalıklarla da ilişkili bulunmuştur (Stuppia ve ark. 2002).

MTHFR geninde ikinci sıklıkta karşılaşılan polimorfizm genin 7. Ekzonunda 1298. baz çiftinde, enzimin C-terminal regülatör domeninde glutamatın alanine dönüşmesi ile sonuçlanan A-C polimorfizmidir. Homozigot varyant (CC), heterozigot varyant (AC) ve normal (AA) genotiplerinden oluşur. Bu polimorfizm ilk kez Viel ve arkadaşları tarafından ovaryum kanserli olgularda bulunmuştur, ama daha sonra bu hastalık ile karakterize edilememiştir. Homozigot varyant genotipte enzim aktivitesinde %60'a varan azalma görülür. Bu polimorfizmdeki alel frekansı %33'ü bulur (Skibola ve ark. 1999, Boccia ve ark. 2009).

DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların bipolar bozukluk (manik depresyon)'ta etkili olması ve MTHFR geninin DNA metilasyonunda görev almasından dolayı bu hastalık ile C677T mutasyonu ilişkilendirilmiştir (Chen ve ark. 2009).

C677T ve A1298C polimorfizmleri ile baş, boyun ve akciğer kanserleri arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalarda, düşük folat alımı gerçekleşen hastalarda kanser riskinin arttığı ama folat alımı yüksek olan hastalarda bir risk bulunmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, bu polimorfizmlerin genetik olarak katkılarının tek başına kanser gelişimine yol açmadığı, bu polimorfizmlerin çevresel faktörlerle beraber kanser gelişiminde etkili olduğu kanısına varılmış ve yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiği literatürde belirtilmiştir (Boccia ve ark. 2009).

Capecitabine ile tedavi edilen kolorektal kanserli hastaları kapsayan bir diğer çalışmada, MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri ile hastalık arasında bir ilişki olduğu saptanmış, bu hastalara ait plazma homosistein seviyesinde bir artış ve plazma folat seviyesinde bir azalma olduğu gözlenmiştir (Bononi ve ark. 2008). Ancak mide kanseri hastaları üzerine yapılan bir başka çalışmada ise MTHFR gen mutasyonları ile mide kanseri arasında anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır (Giovannucci 2002). Kolon ve rektum kanserleri üzerine yapılan iki çalışmada ise MTHFR 677TT polimorfizminin kolon ve rektum kanser riskini azalttığı, ancak CC ve CT genotiplerinde kanser riskinin arttığı belirtilmiştir. Bununla beraber, folat alınımı arttıkça da bu riskin azaldığı gözlenmiştir (Wu ve ark. 2009).

İnsan lenfositleriyle yapılan iki farklı çalışmada, MTHFR varyantı hücrelere uygun besi yerinde farklı folat seviyeleri uygulanmış ve 677TT varyantı olan hücrelerin diğerlerine oranla daha kolay çoğalarak daha dirençli oldukları saptanmış, buna karşın 677CC ve 677CT genotiplerine sahip hücrelerin hücresel strese toleranslarının daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, lenfosit hücrelerine farklı folat seviyelerinde uygulanan radyasyona karşılık, folat seviyesi azaldıkça hücrelerde kromozom kırıkları ve kayıpları arttığı literatürde bildirilmiştir (Leopardi ve ark. 2006, Wu ve ark. 2009).

2.3.4. MTHFR geninin diğer alelik varyantları

2.3.4.1. MTHFR C599T ARG184TER

Goyette ve arkadaşları (1994), MTHFR eksikliği görölen bir hastada 559. nükleotitte C\T değişimi sonucu, 184. pozisyondaki Arg→Stop kodonuna dönüştüren ARG184TER varyantını tanımlamıştır (Çizelge 2.5).

2.3.4.2. MTHFR G482A ARG158GLN

Goyette ve arkadaşları (1994), MTHFR eksikliğine bağlı olarak gelişen homosisteinürlü hastalarda 482. nükleotitte G\A değişimi sonucu, 158. pozisyondaki Arg→Glu değişikliğini ARG158GLN varyantı olarak tanımlamıştır (Çizelge 2.5).

2.3.4.3. MTHFR A983G, ASN324SER

Wendel ve Bremer (1984), Hyland ve arkadaşları (1988) ve Kluijtmans ve arkadaşları (1998) tarafından şiddetli MTHFR enzim eksikliği gözlenen Yunan/Makedon soyundan bir hasta kadında, MTHFR geninde 324. pozisyonunda Asn→Ser'e dönüşümü sonucu oluşan homozigot A983G mutasyonunu tanımlamıştır (Çizelge 2.5).

2.3.4.4. MTHFR T1027G, TRP339GLY

Kluijtmans ve arkadaşları (1998), MTHFR eksikliği gözlenen Türk soyundan bir çocukta MTHFR geninde 1027. nükleotitte T\G değişimi tanımlamıştır. Bu mutasyon triptofan kalıntısını glisine dönüştürmektedir (Çizelge 2.5).

2.3.4.5. MTHFR C-1084T

Hyland ve arkadaşları (1988) ve Kluijtmans ve arkadaşları (1998) kan bağı olan sağlıklı Türk ailesinin bir erkek çocuğunda MTHFR cDNA'da 1084. nükleotitte C\T değişimi sonucu, Arg→TGA (stop) kodonu değişikliği ile MTHFR C1084T varyantını tanımlamışlardır (Çizelge 2.5).

2.3.4.6. MTHFR C1711T

Kluijtmans ve arkadaşları (1998), MTHFR geninde 1711. nükleotitte C\T değişimi sonucu, Arg→TGA (stop) kodonuna değişimini MTHFR C1711T varyantı olarak tanımlamışlardır (Çizelge 2.5).

2.3.4.7. MTHFR, 1081C-T

Tonetti ve arkadaşları (2000), serum ve kırmızı kan hücrelerinde düşük folat seviyesi ile ilişkili olarak oluşan hiper homosisteinemi'li ve hipometiyoninemi dördü kardeş çocukta ekzon 6'da 1081. nükleotitte C\Tdeğişimi sonucu Arg→Cys değişikliğini MTHFR, C1081T varyantı olarak tanımlamıştır (Çizelge 2.5).

2.3.4.8. MTHFR G1755A MET581ILE

Beckman ve arkadaşları (1987), MTHFR eksikliği olan bir hastada 1755. nükleotitteki G\A değişikliği şeklinde bir polimorfizm tanımlamıştır. Selzer ve arkadaşları (2003) ise Met→Ile değişimine neden olan bu mutasyonun azalmış enzim fonksiyonu ile ilişkili olan MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri ile birlikte kalıtıldığını göstermiştir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. MTHFR geninin diğer alelik varyantları

Değişen nükleotit	Değişen Amino Asit
C ⁵⁵⁹ T	Arg ¹⁸⁴ →Ter
G ⁴⁸² A	Arg ¹⁵⁸ →Gln
C ⁶⁷⁷ T	Ala ²²² →Val
A ¹²⁹⁸ C	Glu ⁴²⁹ →Ala
A ⁹⁸³ G	Asn ³²⁴ →Ser
T ¹⁰²⁷ G	Trp ³³⁹ →Gly
C ¹⁰⁸¹ T	Arg→STOP
C ¹⁷¹¹ T	Arg→STOP
C ¹⁰⁸¹ T	Arg→Cys
G ¹⁷⁵⁵ A	Met ⁵⁸¹ →Ile

2.4. Çalışmanın Amacı

Çalışmamızda romatoid artrit tanısı konulan ve MTX ilacı kullanan Türk popülasyonundaki hastalarda C677T ve A1298C polimorfizmlerinin ilaç etkinliği ve ilaç toksisitesi üzerine etkilerinin saptanması amaçlanmıştır. RA'in prevalansı yaklaşık olarak %1 dolayındadır. RA tedavisinde en çok kullanılan ilaç MTX olmasına rağmen literatürde, hastaların 1/3'nün tedaviye olumlu yanıt verdiği bildirilirken, geriye kalan hasta grubunda istenilen tedavi yanıtı alınmadığı, hatta ilacın yan etkilerinden dolayı şikayetlerin olduğu belirtilmektedir. Yapılan bu çalışmada, MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin tedaviye verilen yanıtta bireysel farklılıklara neden olabileceği hipotezi kurulmuştur. Bu bağlamda, MTX'ın RA hastalarındaki etkinliğine ve MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin ilaç toksisite gelişimi üzerinde etkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta Grubu

Eylül 2010 ile Haziran 2014 tarihleri arasında Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi Romatoloji Servisi'nde tedavi olan 88 romatoid artrit hastası bu çalışmaya katılmıştır. Hastalar “Gönüllü Olur Formu” nu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir. Hastalar en az altı hafta MTX kullanmış ve hastalık geçmişleri iki yıldan fazladır.

Hastaların her birinden EDTA'lı tüplere 3'er ml (1 tüp) kan örneği alınmıştır. Tedavisi takip edilen her hastaya hastalık süresi, folik asit kullanımı, kullandığı ilaçlar, ilaç kullanımına bağlı olarak herhangi bir yan etki gelişimi gözlenip gözlenmediği gibi tıbbi özgeçmişleri ile ilgili sorular sorulmuş ve bilgiler kaydedilmiştir. Hastalara ait demografik ve klinik bilgiler Çizelge 3.1 ve 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge3.1. Hastalara ait demografik ve klinik bilgiler

Cinsiyet (%Kadın %Erkek)	%85.22 ; %14.28
Yaş (Ortalama±Standart Sapma)	50.96±9.48
Hastalık Süresi (Medyan) (Yıl)	12 (5-40)
Şiş Eklem Sayısı (Medyan)	0 (0-4)
Hassas Eklem Sayısı (Medyan)	3(0-25)
DAS28 (Ortalama±Standart Sapma)	3.75±1.21
RF Pozitif (%)	63.63
ESH Medyan (mm/saat)	23 (8-101)
CRP Medyan (mg/l)	0.4 (0.1-4.2)

DAS28: 28 eklem üzerinde hastalık aktivite skoru; RF: Romatoid Faktör; ESH: Eritrosit Sedimentasyon Hızı; CRP: C-Reaktif Protein.

Çizelge 3.2. Monoterapi gören (sadece MTX kullanan) romatoid artrit hastalarında görülen yan etkiler

	Sayı (%)
Genel yan etki (yorgunluk, kırgınlık)	6 (% 6.81)
Gastro intestinal kusma ve bulantı	8 (%9.09)
Karaciğer ALT ve AST'de artış	0
Hematolojik yan etkiler (lökosit sayısı ve alt gruplarda değişim)	0
Akciğer üzerine yan etki	0
Deri üzerine yan etki	0
KBB üzerine yan etki	0
Nöropsikiyatrik yan etki	0

3.1.2. Kullanılan aletler

- Sıcaklık döngü cihazı, (Techne TC5000, İngiltere)
- Mikrosantrifüj, (Sigma, Almanya)
- Otomatik pipet, (Axygen axypet, Amerika Birleşik Devletleri (ABD))
- Yatay elektroforez tankı, (Thermo, ABD)
- Yatay elektroforez tankı, (Cleaver, İngiltere)
- Dikey elektroforez tankı, (Cleaver, İngiltere)
- Güç kaynağı, (Cleaver, İngiltere)
- İnkübatör, (Incucell, Almanya)
- Soğutucu -20⁰C, (Vestel, Türkiye)
- Soğutucu +4⁰C, (Profilo, Türkiye)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı, (WiseStir MSH-20A, Kore)
- pH metre, (Hanna HI221, ABD)
- Vorteks, (WiseMix VH-10, Kore)
- Hassas terazi, (Ohaus, ABD)
- Transillüminatör, (Vilber Lourmat, Fransa)
- Otoklav, (All American, (ABD))

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

Etanol, fenol ve izoamil alkol Merck (Almanya); kloroform Carlo Erba (İtalya); 25 bp DNA belirteç, mavi/turuncu 6X yükleme boyası, dNTP ve primerler, Taq polimeraz enzimi; Mob II ve Hinf I restriksiyon enzim setleri MBI (Litvanya)'den, bunların dışında kalan diğer tüm kimyasallar Sigma (ABD)' dan satın alınmıştır.

3.1.3.1. Primerler

Gen : MTHFRC677T

MTHFR I 5'GA AGG AGA AGG TGT CTG CGG

MTHFR II 5' AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3'

Gen : MTHFR A1298C

M1298F 5' CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C'

M1298R 5' CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG 3'

3.1.3.2. Çözeltiler

DNA izolasyonu

Solüsyon 1 : 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

Solüsyon 2 : 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

0.5mM NaCl

%0.5 SDS

2 mM EDTA

TE Tamponu : 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0)

PZR

10X Reaksiyon Tamponu: 500 mM KCl

100 mM Tris-HCl (pH 9.0)

%1 Triton® X-100

10 mM dNTP: 100 mM nükleotitlerden (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) eşit miktarda karıştırıldı ve üzerine 60 µl dH₂O eklenerek hazırlandı.

Agaroz jel elektroforezi

10X TBE: 54 gr Tris baz

27 g Borik asit

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

%12'lik bisakrilamit jel elektroforezi

%30 Akrilamit-Bisakrilamit: 14.1 ml

5XTBE : 7 ml

%10 APS : 350 µl

TEMED : 35 µl

Su :13.6 ml

Mavi/Turuncu 6X Yükleme Boyası:

%10 Fikol® 400

%0.25 Bromofenol mavisi

%0.25 Ksilen siyanol

%0.4 Turuncu G

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

50 mM EDTA

PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi (RFLP)

10X RFLP Tamponu : 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl
0.1 mg/ml BSA

3.2. Yöntemler

3.2.1. Periferel kan dokusundan DNA'nın izolasyonu

EDTA'lı tüp içindeki örnekleri alınarak deneyler başlayıncaya kadar +4 °C'de saklandı. Çalışma boyunca tek kör deney protokolü uygulandı. Bu nedenle, denek ve kontrol grubunu birbirinden ayırt edici herhangi bir kodlama sistemi uygulanmadı. Çalışmaya katılan bireylerden 1/100 hacimde 0.5 mmol/L sodyum EDTA içeren tüplere 5 ml kan alındı. Daha sonra tüpün hacmi Solüsyon 1 kullanılarak 10 ml'ye tamamlandı. Hücrelerin parçalanması için ortama 120 µl nonidet P40 eklendi. Tüp birkaç defa ters yüz çevirilerek iyice karıştırıldı. Nükleer peleti elde etmek için 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelet oynatılmaksızın üst faz döküldü. Çökelti 800 µl Solüsyon 2 ile hafif bir biçimde solüsyon iyon haline getirildi ve 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne aktarıldı. 400 µl distile fenol ilave edilerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst faz temiz bir Eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 400 µl eş hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklenerek iyice karıştırıldı. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst faz temiz bir Eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 700 µl kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenerek ters yüz edilip karıştırıldı. Tekrar 12000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üst faz temiz bir Eppendorf tüpüne aktarıldı. İki hacim %100 etanol ilave edilerek tüp ters yüz edildi. (Bu aşamada DNA görünür hale gelmektedir.). Elde edilen DNA Pasteur pipetinin kapatılmış bir yüzeyi ile 1 ml %70 etanol içeren bir Eppendorf tüpüne transfer edildi. İyice yıkanması sağlandı. Tüpler 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Etanol ortamdan uzaklaştırıldı. Örnekler 37 °C'lik etüvde birkaç dakika bekletilerek kurutuldu. Ardından DNA, TE tamponda çözüldü (John ve ark. 1988).

Elde edilen DNA'nın saflığını ve derişimini belirlemek amacıyla, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri yapıldı.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) in vitro koşullarda belirli bir DNA bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan ve 1985'te uygulanmaya başlayan bir yöntemdir. Temel olarak PZR üç basamak içermektedir:

- Hedef DNA'nın termal denatürasyonu (≈ 94 °C ve civarı)
- 17-35 nükleotitten oluşan özgül sentetik oligonükleotit primerlerin hedef bölgeye bağlanması (annealing=bağlanma (Bu basamakta primerleri oluşturan bazlar esas alınarak bulunan T_m değerine göre bağlanma sıcaklığı belirlenir.)
- Sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz tarafından hedef bölgeye bağlanan primerlere uygun nükleotitlerin takılması (sentez ≈ 72 °C) (Dennis Lo 1998)

Bu üç basamağın bitiminde bir döngü tamamlanır; 35 döngü sonunda milyonlarca kopya üretilmiş olur. Reaksiyona giren primer, dNTP, $MgCl_2$ konsantrasyonu ve DNA miktarı reaksiyonun etkinliğini ve doğruluğunu doğrudan etkiler. PZR yöntemi ile MTHFR geninin C677T ve A1298C nokta mutasyonlarını içeren ilgili gen bölgelerinin amplifikasyonu amaçlandı. Bunun için PZR reaksiyon karışımları hazırlandı.

Çizelge 3.3. Her iki polimorfizm için PZR reaksiyon protokolü

PZR reaksiyonu (C677T polimorfizmi için)		PZR reaksiyonu (A1298C polimorfizmi için)	
Miktar/Tüp (μ l)	Master Mix Bileşenleri (50 μ l Hacim/Tüp)	Miktar/Tüp (μ l)	Master Mix bileşenleri (25 μ l Hacim/Tüp)
5	10X PZR tamponu	2.5	10X PZR tamponu
2.5	$MgCl_2$ (25 mM stok)	1.5	$MgCl_2$ (25 mM stok)
1	dNTP (10 mM stok)	0.5	dNTP (10 mM stok)
0.2	Taq polimeraz (5u/ μ l)	0.125	Taq polimeraz (5u/ μ l)
2	Primer MTHFR I (10 pmol/ μ l stok)	1.5	Primer M1298F (10 pmol/ μ l stok)
2	Primer MTHFR II (10 pmol/ μ l stok)	1.5	Primer M1298R (10 pmol/ μ l stok)
Değişken	Steril saf su	Değişken	Steril saf su
	DNA		DNA

Bu işlem 0.2ml'lik Eppendorf tüplerinde ve buz üzerinde gerçekleştirildi. Sıcaklık döngü cihazına yerleştirilerek belirlenen program uygulandı.

C677T polimorfizm için PZR koşulları:

Ön denatürasyon	: 94 °C, 3 dakika	
Denatürasyon	: 94 °C, 1 dakika	
Bağlanma	: 62 °C, 1 dakika	} 35 döngü
Sentez	: 72 °C, 1 dakika	
Son sentez	: 72 °C, 7 dakika	

A1298C polimorfizmi için PZR koşulları:

Ön denatürasyon	: 95 °C, 5 dakika	
Denatürasyon	: 95 °C, 30 saniye	
Bağlanma	: 52 °C, 30 saniye	} 35 döngü
Sentez	: 72 °C, 30 saniye	
Son sentez	: 72 °C, 10 dakika	

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması için standart bir yöntem olarak agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. Agaroz jel elektroforezi ile yaklaşık 60-0.1 kb uzunluğunda DNA parçaları ayrılabilir. Jeldeki DNA bantları jelin bir floresan boya olan EtBr ile boyanması ve jelin ultraviyole ışık altında direkt olarak incelenmesi ile saptanabilir. Çoğunlukla jel elektroforezinde, bilinen büyüklükteki bir belirteç DNA kullanılarak moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir (Sambrook ve ark. 1982, Cooper 1997). Agaroz jel boyunca DNA parçacıklarının elektroforetik migrasyon hızları temel olarak dört parametreye bağlıdır. Bunlar: DNA'nın moleküler büyüklüğü,

agaroz konsantrasyonu, DNA'nın konformasyonu ve uygulanan akımdır (Walker ve Gaastra 1983).

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılan ürünlerin doğruluğunun ve kalitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elde edilen 198 bç büyüklükteki ürünleri tanımlayabilmek için %2'lik jel kullanıldı. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun 40 ml'lik hacim, toz halindeki agarozun 0.5X TBE tamponunda kaynatılarak çözülmesi ile oluşturuldu. Ardından kaynamış çözelti 55-60 °C'ye soğutulurak 0.25 µg/ml EtBr ilave edildi. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra, hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak jel platformu 0.5X TBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Bu tampondan, jelin üzerini 1-2 mm geçecek kadar eklendi. Oluşan kuyulara örnekler ve belirteç DNA, tanka 6X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak yüklendi. Güç kaynağı açılarak 5-10 V/cm olacak şekilde 80 V'a ayarlandı. Yaklaşık bir saat sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel UV ışını altında incelendikten sonra fotoğrafı çekildi.

3.2.4. PZR ürünlerinin RFLP yöntemi ile kesimi

Restriksiyon enzimleri DNA'yı özgül bölgelerden kesen, doğal olarak bakterilerde bulunan ve yabancı DNA'ya karşı savunma görevi gören enzimlerdir. Bugün bilinen 100'den fazla kesim yüzeyine sahip, ticari olarak kullanılan 600'ü aşkın restriksiyon enzimi bulunmaktadır. Her biri izole edildikleri türe göre adlandırılmakta ve aynı türden izole edilen restriksiyon enzimlerinin birbirinden ayırtedilebilmesi için numaralandırılmaktadır. Tanıma yüzeyleri genellikle 4-6 bç uzunluğundadır ve kesim sonucu küt veya yapışkan uç oluşmaktadır. Restriksiyon enzimleri geleneksel olarak, N herhangi bir nükleotiti, R purinleri, Y primidinleri, A, T, C, G özgül bazları gösterecek şekilde 5' → 3' olarak yazılmaktadır (Bertina ve ark. 1994, Cooper 1997).

Yapılan bu çalışmada RFLP analizi için PZR sonrası enzim kesimi yapılmıştır. Her bir kesim için reaksiyon tüpüne;

- 10 µl PZR ürünü
- 2.5 µl 10X tampon
- 2 µl Hinf I konuldu.

Çizelge 3.4. PZR ürünlerinin (C677T ve A1298C) RFLP protokolleri

Miktar/Tüp (µl) C677T	Master Mix Bileşenleri (25µl Hacim/Tüp)	Miktar/Tüp (µl) A1298C	Master Mix Bileşenleri (25µl Hacim/Tüp)
2.5	10X tampon (BSA içeren)	2.5	10X tampon (BSA içeren)
2	Hinf I enzimi (10U/µl)	0.5	Mbo II enzimi (5U/µl)
10.3	Steril saf su	12	Steril saf su
10	PZR ürünü	10	PZR ürünü

Belirtilen oranda Hinf I enzimi konularak karışım dH₂O ile 25 µl'ye tamamlandı. Örnekler 37 °C'lik etüvde kesim için gece boyu bekletildi. 16 saat sonra örnekler - 20 °C'deki derin dondurucuya konuldu (Bertina ve ark. 1994, Ridker Paul ve ark. 1995).

Özgül primerler kullanılarak çoğaltılan MTHFR geninin 198 bç'lik bölgesi iki kesim yüzeyi içermektedir. Bu bölgede meydana gelen nokta mutasyonu sonucu bu kesim yüzeylerinden biri kaybolmaktadır. Yabancıl tip MTHFR 677 allelinde Hinf I enzimi bu bölgeyi 198 bç'lik bir bölgeye ayırırken; mutant aleli 175 ve 23 bç'lik iki bölgeye ayırmaktadır.

Mbo II ile kesim için reaksiyon tüpüne

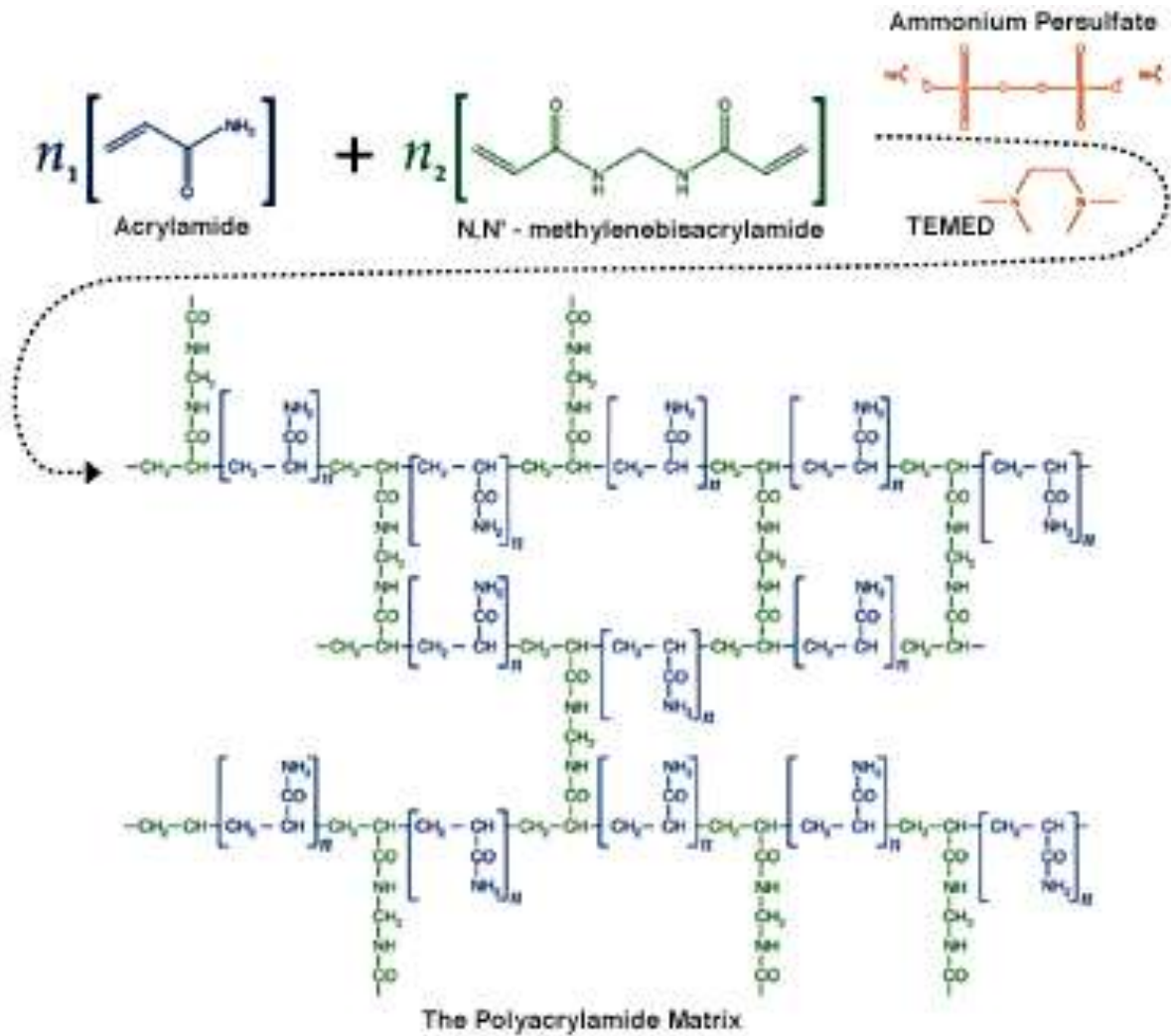
- 10 µl PZR ürünü
- 2 µl 10X tampon
- 1 µl Mbo II enzim, konularak karışım dH₂O ile 25µl'ye tamamlandı. Örnekler 37 °C'lik etüvde kesim için gece boyu bekletildi. 16 saat sonra örnekler -20 °C'ye derin dondurucuya konuldu (Bertina ve ark. 1994, Ridker Paul ve ark. 1995).

MTHFR genindeki ikinci polimorfizm çalışmaları için MTHFR geninin 163 bç'lik bölgesi Mbo II enzimi ile kesildi. Yabancıl tip MTHFR 1298 alelinde 56, 31, 30, 28 ve 18 bç'lik 5 bölge ayırt edilirken mutant tip alelde ise 84, 31, 30 ve 18 bç'lik 4 bölge ayırt edildi (Demirel ve Kınap 2010).

3.2.3.2. Akrlamit-bisakrlamit jel elektroforezi

Poliakrlamit, bir radikal oluşturucu tarafından katalizlenen akrlamit ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}$) ile N,N'-metilen bisakrlamit ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}$)' in birlikte polimerize edilmesiyle elde edilir. Katalizör olarak %0.1-0.3 (KH) β -Dimetilaminopropionitril (DMAP) ya da N,N,N',N'-Tetrametilen diamin (TEMED) ile birlikte kullanılır (Güneştutar ve Rodop 2009).

Jelin gözenek büyüklüğü, akrlamit monomerinin konsantrasyonu ve N,N'-metilen bisakrlamitin oluşturduğu çapraz bağın oranıyla belirlenir (Şekil 3.1). Uzun molekül zincirleri biçiminde polimerize olan akrlamit, bisakrlamit köprüleri üzerinden üç boyutlu bir örgü oluşturur (Wolf ve ark. 2000).



Şekil 3.1. Poliakrlamit jelin polimerleşme tepkimesi (Güneştutar ve Rodop 2009)

Akrilamit polimerlerinin uzunluğu, hazırlanan konsantrasyon değerine göre değişmektedir. Genellikle %2.5-20'lik konsantrasyonda hazırlanır. Poliakrilamit jellerin hazırlanması agaroz'a göre biraz daha zaman alıcı bir işlemdir, çünkü serbest oksijen, polimerleşme reaksiyonunu engellemektedir. Aynı zamanda akrilamit insanlar için zararlı, toksik bir kimyasaldır, bundan dolayı deney aşamalarında dikkatli olunmalıdır. İlgili işlemler yapılırken, maske ve eldiven giyilmesi zorunludur. Poliakrilamit jeller, agaroz'a göre daha az ayırıştırıcı özellik gösterir, ancak ayırıştırma güçleri (resolving power) daha yüksektir.

3.2.5. RFLP ürünlerinin poliakrilamit jelde yürütülmesi

C677T ve A1298C polimorfizmleri için PZR ürünlerinin RFLP kesim sonuçları daha iyi sonuç vermesi açısından %12'lik poliakrilamit jelde yürütüldü. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun olarak jel 35 ml'lik hacimde hazırlandı. Bunun için 13.5 ml saf su, 14.1 ml akrilamit-bisakrilamit (%30-29:1'lik), 7 ml 5X TBE, %10'luk amonyum persülfattan 350 µl ve tepkimeyi hızlandırması açısından 35 µl TEMED konuldu. Tepkimenin gerçekleşmesi için kısa bir süre beklendikten sonra, jel önceden hazırlanan cam kalıp içerisine hava kabarcığı kalmayacak şekilde enjektör yardımıyla döküldü. Sonra kalıp üzerine tarak yerleştirilerek kuyuların oluşması sağlandı. Yaklaşık 45 dk sonra jel tamamen dondu ve tarak dikkatlice çıkarıldı. Örneklerden 20 µl 6X yükleme tamponu ile kuyulara yüklendi. İlk kuyuya 25 bç'lik belirteç DNA'dan 5 µl, 1 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılarak (5:1 oranında) yüklendi. İçerisinde 0.5X TBE tamponu bulunan cihazda 200 Volt'ta 2 saat kadar örnekler yürütüldü. Sürenin sonunda içerisine 0.5X TBE tamponu bulunan boyama kabına birkaç damla EtBr ilave edilerek jel buraya dikkatlice konuldu. Birkaç dakika beklendikten sonra Jel UV ışını altında incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.2.6. İstatistiksel analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için PASW® statistics 18 programı kullanıldı. Çizelge 4.3 ve 4.4'te gösterilen verilerin frekans değişimleri normal dağılım göstermediğinden medyan (min-max) değişkenliklerinin normal dağılıma uygunluğuna Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Bununla beraber, değişkenlerin karşılaştırılmasında 3 grup (3 farklı genotip) kullanıldığından, gruplar arası karşılaştırma Kruskal-Wallis testi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. DNA Miktar Tayini

Kan örneklerinden izole edilen DNA'nın miktarının ve saflığının belirlenmesi örnek DNA'ların 260 nm (A260) ve 280 nm (A280) dalga boyunda spektrofotometrik ölçümü ile gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri ölçüm sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Ayrıca, spektrofotometrik ölçümlere ilaveten genomik DNA örnekleri %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüldü.

Çizelge 4.1. Romatoid artrit hastalarına ait kan dokularından elde edilen DNA miktarlarının kantitatif sonuçları

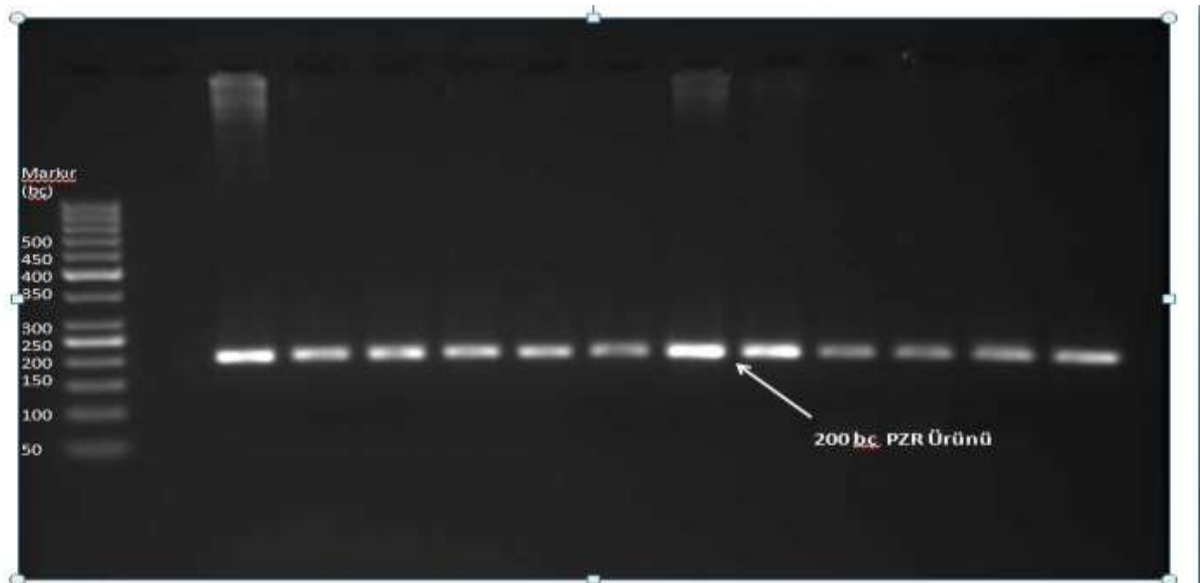
	Hasta No	A260(nm)	A280(nm)	A260/A280	DNA miktarı (µg/ml)
1	001	0,054	0,03	1,8	135
2	002	0,042	0,021	2	105
3	003	0,212	0,122	1,737704918	530
4	004	0,182	0,1	1,82	455
5	005	0,068	0,039	1,743589744	170
6	006	0,238	0,149	1,597315436	595
7	007	0,313	0,244	1,282786885	782,5
8	008	0,217	0,183	1,18579235	542,5
9	009	0,095	0,019	5	237,5
10	010	0,166	0,086	1,930232558	415
11	011	0,117	0,069	1,695652174	292,5
12	012	0,057	0,033	1,727272727	142,5
13	013	0,043	0,02	2,15	107,5
14	014	0,161	0,089	1,808988764	402,5
15	015	0,107	0,094	1,138297872	267,5
16	016	0,102	0,056	1,821428571	255
17	017	0,052	0,036	1,444444444	130
18	018	0,025	0,011	2,272727273	62,5
19	019	0,135	0,072	1,875	337,5
20	020	0,096	0,05	1,92	240
21	021	0,021	0,012	1,75	52,5
22	022	0,091	0,082	1,109756098	227,5
23	023	0,113	0,063	1,793650794	282,5
24	024	0,13	0,07	1,857142857	325
25	025	0,024	0,008	3	60
26	026	0,151	0,127	1,188976378	377,5
27	027	0,05	0,036	1,388888889	125
28	028	0,066	0,055	1,2	165
29	029	0,202	0,113	1,787610619	505

30	030	0,123	0,095	1,294736842	307,5
31	031	0,017	0,012	1,416666667	42,5
32	032	0,041	0,025	1,64	102,5
33	033	0,025	0,009	2,777777778	62,5
34	034	0,044	0,03	1,466666667	110
35	035	0,082	0,046	1,782608696	205
36	036	0,126	0,08	1,575	315
37	037	0,071	0,042	1,69047619	177,5
38	038	0,06	0,029	2,068965517	150
39	039	0,027	0,009	3	67,5
40	040	0,049	0,023	2,130434783	122,5
41	041	0,071	0,042	1,69047619	177,5
42	042	0,036	0,025	1,44	90
43	043	0,038	0,024	1,583333333	95
44	044	0,064	0,04	1,6	160
45	045	0,094	0,064	1,46875	235
46	046	0,053	0,032	1,65625	132,5
47	047	0,124	0,071	1,746478873	310
48	048	0,625	0,407	1,535626536	1562,5
49	049	0,07	0,046	1,52173913	175
50	050	0,064	0,04	1,6	160
51	051	0,086	0,052	1,653846154	215
52	052	0,237	0,138	1,717391304	592,5
53	053	0,018	0,012	1,5	45
54	054	0,111	0,065	1,707692308	277,5
55	055	0,103	0,063	1,634920635	257,5
56	056	0,114	0,066	1,727272727	285
57	057	0,236	0,137	1,722627737	590
58	058	0,05	0,028	1,785714286	125
59	059	0,047	0,025	1,88	117,5
60	060	0,021	0,01	2,1	52,5
61	061	0,041	0,022	1,863636364	102,5
62	062	0,064	0,033	1,939393939	160
63	063	0,039	0,02	1,95	97,5
64	064	0,034	0,019	1,789473684	85
65	065	0,152	0,095	1,6	380
66	066	0,162	0,101	1,603960396	405
67	067	0,328	0,19	1,726315789	820
68	068	0,386	0,226	1,707964602	965
69	069	0,288	0,169	1,704142012	720
70	070	0,279	0,16	1,74375	697,5
71	071	0,069	0,045	1,533333333	172,5
72	072	0,077	0,044	1,75	192,5
73	073	0,066	0,038	1,736842105	165
74	074	0,061	0,039	1,564102564	152,5
75	075	0,105	0,06	1,75	262,5
76	076	0,12	0,083	1,445783133	300
77	077	0,137	0,086	1,593023256	342,5

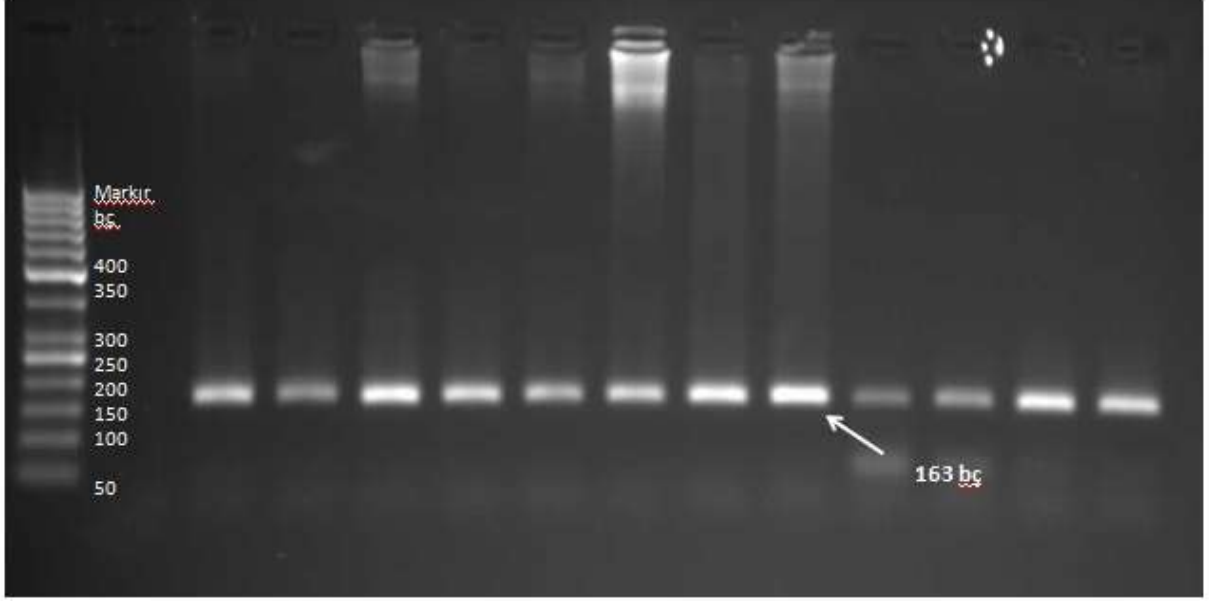
78	078	0,18	0,105	1,714285714	450
79	079	0,388	0,22	1,763636364	970
80	080	0,574	0,323	1,777089783	1435
81	081	0,108	0,103	1,048543689	270
82	082	0,216	0,134	1,611940299	540
83	083	0,173	0,101	1,712871287	432,5
84	084	0,26	0,101	2,574257426	650
85	085	0,304	0,174	1,747126437	760
86	086	0,306	0,178	1,719101124	765
87	087	0,327	0,224	1,459821429	817,5
88	088	0,228	0,131	1,740458015	570

4.2. PZR Sonuçları

Çalışmaya alınan örneklerin tümü DNA izolasyonu sonrası MTHFR geninin ilgili bölgelerinin çoğaltılması için PZR'na tabi tutuldu. MTHFR geni için her iki polimorfizm ayrı ayrı çalışıldı. 4. ekzon ve 677. baz çiftindeki sitozin\timin değişimini saptamak için MTHFR I ve MTHFR II primerleri kullanılarak istenilen gen bölgesi çoğaltıldı ve 198 bç'lik ürün elde edildi. 7. Ekzonunda 1298. baz çiftinde, enzimin C-terminal regülatör domaininde glutamatın alanine dönüşmesi ile sonuçlanan A-C polimorfizmini belirlemek için M1298F ve M1298R primerleri kullanılarak istenilen gen bölgesi çoğaltıldı ve 163 bç'lik ürün elde edildi. Elde edilen PZR ürünleri %2 agaroz jelde yürütülüp, görüntülendi (Şekil 4.1 ve 4.2).



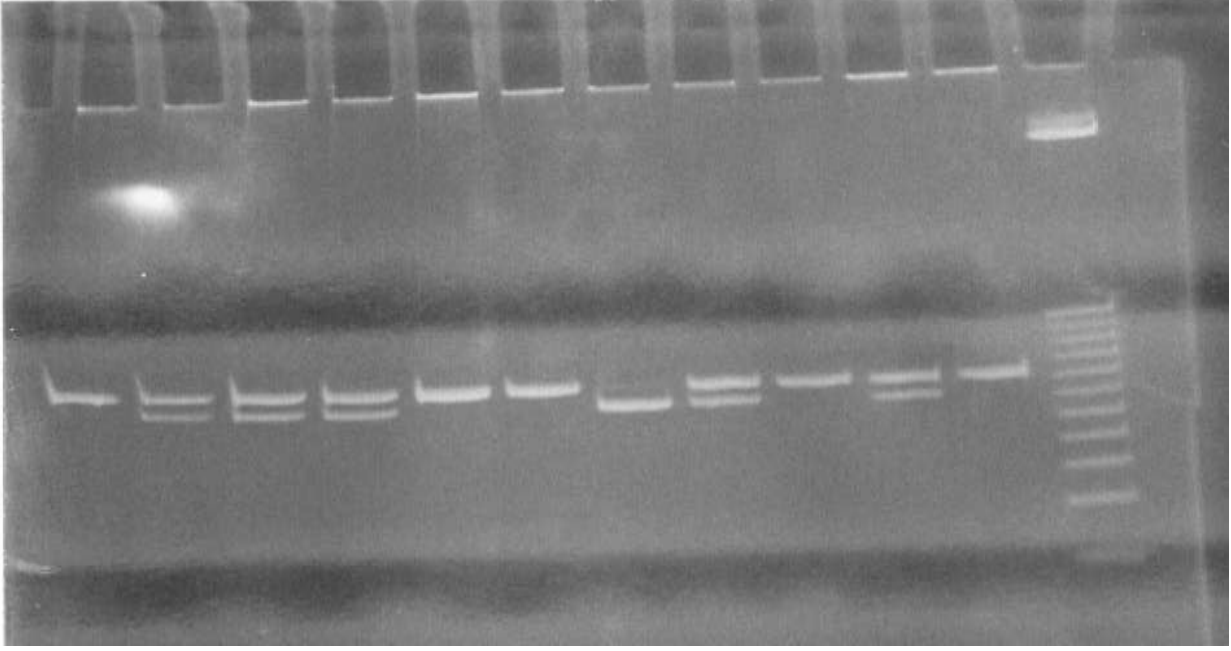
Şekil 4.1. MTHFR C677T polimorfizmini içeren gen bölgesinin çoğaltılması sonucu oluşan PZR ürünü



Şekil 4.2. MTHFR A1298C polimorfizmini içeren gen bölgesinin çoğaltılması sonucu oluşan PZR ürünü

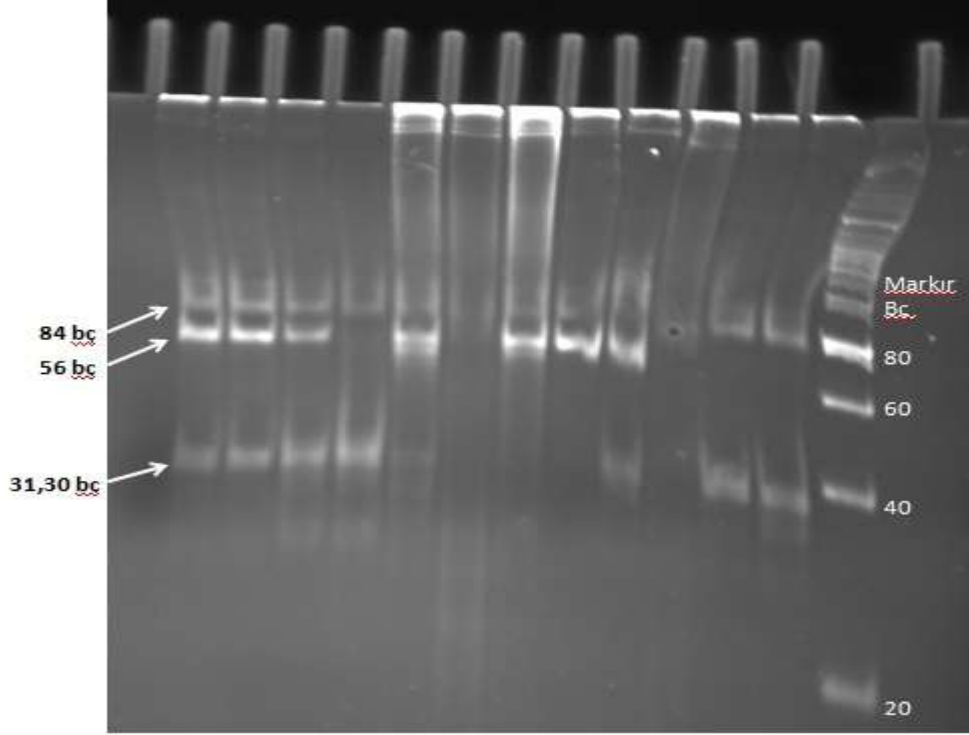
4.3. C677T ve A1298 C polimorfizmlerinin RFLP bulguları

PZR ile çoğaltılan MTHFR geninin 198 bç'lik ekzon 4 bölgesi 677. nükleotitindeki C\T yer değişimini tanıyan ve kesen Hinf I restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu restriksiyon enziminin, yabancı tip alellerde, ilgili MTHFR gen bölgesinde herhangi bir kesim yüzeyi bulunmamaktadır ve kesim sonucu 198 bç büyüklüğünde bir DNA parçası oluşmaktadır. C\T yer değişimi bulunan mutant tip alellerde ise bir kesim yüzeyi bulunmaktadır ve restriksiyon enzim kesimi sonucu 175 ve 23 bç'lik iki DNA parçası oluşmaktadır. Kesim sonrası RFLP ürünlerinin görüntülenmesi için %12'lik poliakrilamid jel hazırlandı. RFLP ürünleri poliakrilamid jelde 200V/40A' de iki saat boyunca yürütüldü ve UV translüminatörde görüntülendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MTHFR C677T RFLP kesim sonuçları. 1, 5, 6, 9 ve 11 normal bireye, 2-4, 8 ve 10 heterozigot mutant bir bireye, 7 homozigot mutant bireye ait RFLP analizi örneği. 12 belirteçtir (25 bp step ladder)

PZR yöntemiyle çoğaltılan MTHFR geni için diğer bir polimorfizm de 163 bç'lik ekzon 7 bölgesinde saptanmıştır. Bu bölgede yer alan 1298. nükleotitteki A\C yer değişimini tanıyan ve kesen Mbo II restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu restriksiyon enziminin, yabani tip alellerde, ilgili MTHFR gen bölgesinde dört kesim yüzeyi bulunmaktadır ve kesim sonucu 56, 31, 30, 28 ve 18 bç'lik büyüklüğünde 5 DNA parçası oluşmaktadır. A\C yer değişimi bulunan ve mutant tip alellerde ise kesim sonucu bir kesim yüzeyi kaybolmaktadır ve 84, 31, 30 ve 18 bç'lik 4 DNA parçası oluşmaktadır. Kesim sonrası RFLP ürünlerinin görüntülenmesi için %12'lik poliakrilamid jel hazırlandı. RFLP ürünleri %12'lik poliakrilamid jelde 200V/40A'de yaklaşık olarak üç saat yürütüldü ve UV translüminatörde görüntülendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. MTHFR A1298C RFLP kesim sonuçları. 4, 6, 11 ve 12 normal bireye, 1, 2, 3, 5, 8 ve 9 heterozigot mutant bir bireye, 7 homozigot mutant bireye, 10 boş kuyuya ait RFLP analizi örneği 13 belirteçtir (20 bp step ladder)

4.4. RFLP Analizi Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

MTX monoterapi alan hastalarda ilaç etkinliği ve toksisitesi ile polimorfizmler arasındaki ilişki Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'te özetlenmiştir. Çalışmaya katılan 88 hastada 677. nükleotit polimorfizmlerinin dağılımı 677CC genotipli 30 birey (%34.09), 677CT genotipli 47 birey (%53.4) ve 677TT genotipli 11 birey (%12.5) olarak saptanmıştır. İlaç toksisitesi açısından yan etki görülen hastalar yan etki görülmeyen hastalarla karşılaştırıldığında, yan etki görülen toplam 11 hastanın 3'ünde (%27.27) 677TT genotipi saptanırken, bu genotip yan etki görülmeyen toplam 77 hastanın 8'inde (%10.39) tespit edilmiştir. Dolayısıyla MTHFR 677TT genotipi ile ilaç etkinliği arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p=0.526$). Bununla beraber, diğer polimorfizm olan 1298. nükleotitteki dağılım 1298AA genotipli 46 birey (%52.27), 1298AC genotipli 35 birey (%39.77) ve 1298CC genotipli 7 birey (%7.95) olarak bulunmuştur. Yine ilaç toksisitesi açısından yan etki görülen hastalar yan etki görülmeyen hastalarla karşılaştırıldığında, yan etki görülen toplam 11 hastanın 1'inde (%9.10) MTHFR 1298CC genotipi saptanırken, ilaç yan etkisi görülmeyen bireylerin 6'sında (%7.79) MTHFR 1298CC genotipi saptanmıştır.

Çizelge4.2. MTX toksisitesi ile MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri arasındaki ilişki

Genotipler	Yan Etki Görülmeyen Hastalar (n=77)	Yan Etki Görülen Hastalar (n=11)	P değeri
677CC	26 (%33.77)	4 (%36.36)	0.235
677CT	43 (%55.84)	4 (%36.36)	0.283
677TT	8 (%10.39)	3 (%27.27)	0.526
1298AA	41(%53.24)	5 (%45.45)	0.906
1298AC	30 (%38.96)	5 (%45.45)	0.906
1298CC	6 (%7.79)	1 (%9.10)	0.686

Çizelge 4.3. Romatoid artrit hastalarında, hastalık aktivite parametrelerinin MTHFR C677T polimorfizmine göre dağılımları

	CC (n=30)	CT (n=47)	TT (n=11)	P değeri
HAQ (Medyan)	0.63 (0-3)	0.25 (0-2.13)	1 (0-2.75)	0.121
DAS28 (Medyan)	3.80 (1.75-6.36)	3.58 (1.5-6.86)	3.80 (3.1-7.59)	0.258
ESR (Medyan)	21 (6-75)	25 (5-80)	31 (17-101)	0.131
CRP (Medyan)	0.3 (0.1-4.2)	0.42 (0-4)	0.5 (0.1-1.92)	0.434

Dolayısıyla MTHFR 1298CC genotipi ile ilaç toksisitesi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Hastalık aktivite parametreleri değerlerinin MTHFR 677 ve 1298 genotiplerine göre dağılımları birbiri arasında karşılaştırıldığında, ilaç etkinliği açısından bilimsel veri elde edilmesi mümkündür. Bu nedenle hastalık aktivite parametreleri HAQ, DAS28, ESR ve CRP değerlerinin MTHFR 677 ve 1298 genotiplerine göre dağılımları birbiri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve herhangi bir anlamlı sonuç bulunamamıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.3 ve 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Romatoid artrit hastalarında, hastalık aktivite parametrelerinin MTHFR A1298C polimorfizmine göre dağılımları

	AA (n=46)	AC (n=35)	CC (n=7)	P değeri
HAQ (Medyan)	0.63 (0-2.13)	0.25 (0-2.75)	0.29 (0-3)	0.787
DAS28 (Medyan)	3.64 (1.99-6.86)	3.45 (1.50-7,59)	3.77 (2.04-5.54)	0.963
ESR (Medyan)	25 (9-80)	22 (5-101)	22 (10-75)	0.896
CRP (Medyan)	0.4 (0-3)	0.4 (0-4)	0.14 (0.1-4.2)	0.554

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Eklem tutulmalarıyla başlayan, uzun süren ve tedavisine erken başlanması gereken bir immün hastalık olan RA, son yıllarda yaygın olarak hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlardan biri olan MTX ile tedavi edilmeye başlanmıştır (Demirel ve Kınap 2010). MTX, haftalık doz uyarlamaları yapılarak yıllarca kullanılabilmesi açısından da önemlidir (Tetik 2006). Hastalık süresi, haftalık ilaç dozu, cinsiyet, yaş, obezite, folik asit kullanımı, vücut kütle indeksi ve son yıllarda farmakogenetik çalışmalarla MTX' in metabolik yolağında yer alan enzimlerde meydana gelebilecek genetik farklılıklar gibi etmenlerin MTX kullanımına bağlı olarak gelişebilen hepatotoksisite ve gastrointestinal komplikasyonların oluşmasında risk faktörleri arasında olduğu rapor edilmiştir (Haagsma ve ark. 1999, Urano ve ark. 2002, Tetik 2006, Taniguchi ve ark. 2007, Ranganathan 2008). Bu belirtilen risk faktörleri arasında üzerinde en çok durulan faktör, bireyler arasındaki tek nükleotit polimorfizmi (SNP) ile ortaya çıkan genetik farklılıklardır.

RA tedavisi için mevcut olan çok sayıda DMARD arasında, metotreksat (MTX) şu anda en çok kullanılan ilaçlardan birisidir. 1951 yılında Gubner ve Ginsburg ilk aminopter'in analogu olan MTX RA'li altı hastada sinovite bastırmakta başarılı olduğunu, bildirilmiştir (Swierkot ve Szechinski, 2006). O zamandan beri, birçok çalışma MTX'in RA'te yararlı etkilerini göstermiştir. 1980'li yıllardan günümüze kadar MTX ile tedavi olan RA hastalarının sayısı oldukça yükselmiştir (Lynden ve ark 2006). Bunun başlıca sebebi, MTX'in monoterapide hastalık aktivitesini ve eklem erozyonlarının oranını azaltacak şekilde etkinlik göstermesidir.

Sitostatik etkileri olması nedeniyle kanser tedavisinde kullanılan ilaç daha sonraları RA hastalarında da düşük doz olacak şekilde tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Oral, intramuskular, intravenöz ve subkutan kullanım şekilleri mevcuttur. Yeterli serum düzeyine ulaşması için 2 saat gereklidir ve ilacın yarılanma ömrü 6-8 saat arasında kişiye bağlı olarak değişmektedir. Karaciğerde metabolize olur ve hem kendisi hemde metabolitlerinin büyük bir kısmı (%80) böbreklerle atıldığı için böbrek yetmezliği çekenlerde etkisi artmaktadır. Gastrointestinal sistem, akciğer, karaciğer ve kemik iliğinde yan etkileri olduğundan aralıklı olarak hastalar kontrolden geçirilmeli ve gerekli tetkikler yapılmalıdır. Ülkemizde 2.5 mg'lık tabletleri, 5 ve 50 mg'lık ampul formları satılmaktadır. RA'te kullanım dozu genellikle

haftada bir gün 7.5-15 mg'dır. Gerektiği durumlarda yüksek dozlara (20 mg) çıkılır (McCune ve ark. 1994, Weinblatt 1994, Conagan ve Brooks 1995, Yurdakul 2002).

Günümüzde MTX kullanımını sınırlayan bazı etmenler vardır. Bunlardan en önemlisi hastalarda olumlu etki göstermemesiyle birlikte toksisiteye neden olmasıdır (Ranganathan ve ark. 2003). Yapılan klinik araştırmalar monoterapi tedavisi olan RA hastalarının yaklaşık %10-30'luk bir kısmında toksisite gelişmesi nedeniyle MTX tedavisine devam edilmediğini göstermiştir (Ranganathan ve McLeod 2006). Bununla beraber son yıllarda yapılan ilaç araştırmalarıyla ilaca verilen bireysel yanıtta çevre, beslenme, yaş, kilo ve ilaç etkileşimlerinin yanı sıra genetik faktörlerin de önemli olduğu ortaya konulmuştur.

Farmakogenetik, bireylerin genetik yapılarındaki değişkenliğe bağlı olarak ilaç metabolizmalarına karşı verdikleri yanıt ile birey üzerinde oluşabilecek farklı etkileri inceleyen bir bilim dalıdır (Bertina ve ark. 1994). Farmakogenetik araştırmalarla ilk olarak hastalıklarla ilişkilendirilen özgül gen ve gen ürünlerinin tanımlanması, ikinci olarak ilaca verilen yanıtı etkileyen genlerin ve alelik varyantlarının tanımlanması ve son olarak bu tanımlamalardan elde edilen bilgilerle en uygun ilaç ve doz seçiminin yapılması ve bireye özgü tedavilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir (Demirel ve Kırnap 2010).

MTHFR geni ile yapılan ilk çalışma C677T polimorfizmini araştıran Frosst ve arkadaşları (1995) tarafından yapılmıştır. 677. nükleotitteki baz çiftindeki sitozin\timin değişimi MTHFR enziminin yapısında valin/alanin amino asit değişikliğine neden olmaktadır. Bu durum enzim aktivitesinde yaklaşık olarak %60 oranında azalma meydana getirmektedir (Skibola ve ark. 1999). MTHFR geni ile ikinci en sık yapılan polimorfizm araştırması ise 1298. nükleotitteki adenin/sitozin değişimidir. Bu polimorfizm enzim yapısında bulunan glutamatın alanin ile yer değiştirmesine neden olmaktadır. Bu polimorfizm ile yapılan ilk çalışma Viel ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Enzim yapısında meydana gelen bu değişiklik enzim aktivitesinde %60 dolayında azalmaya neden olmaktadır (Boccia ve ark. 2009).

MTX tedavi sonucu ile ilgili yapılan en iyi çalışma, folat yolağındaki anahtar enzimi kodlayan MTHFR geni yapısında meydana gelen C677T ve A1298C polimorfizmlerin araştırılmasıdır (Kumagai ve ark. 2003, Weisman ve ark. 2006, Wessels ve ark. 2007). Bu enzim çeşitli metabolik reaksiyonlarla homosisteinden metiyonine dönüşümü kataliz eder

(Berkun ve ark. 2004). Bu konuyla ilgili yapılan bazı çalışmalar, bu iki mutasyonun MTHFR enziminde aktivite azalması sonucu ortaya çıkan homosisteinemiye neden olacağını ortaya koymuştur (Kumagai ve ark. 2003). MTX monoterapi olan RA hastalarında gerçekte enzim eksikliği homosisteinemiye neden olur ve toksik etki yapması söz konusudur. Bu durum sindirim sistemini etkileyebilir (Kumagai ve ark. 2003). Bu nedenle MTHFR C677T ve A1298C ile yapılan birçok çalışmada toksisite rapor edilmiştir.

Taşbaş ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada Türk popülasyonunda A1298C ve C677T gen polimorfizmleri görünme sıklığının RA hastalarında ve kontrol grubunda birbirine yakın olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları araştırmalara göre C677T homozigot frekansının normalden düşük olduğunu ve bu durumun etnik farklılıklardan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Yapmış oldukları çalışma sonucunda MTHFR genindeki polimorfizmlerin folat takviyesi alan RA hastalarında MTX toksisitesini etkilemediğini tespit etmişlerdir. Buna karşın, Caliz (2012) yaptığı çalışmada İspanyol RA popülasyonunda C677T polimorfizminin MTX ile tedavi olan hastalarda toksisiteye neden olduğuna dair ilişki saptamıştır.

Tetik (2006) yaptığı çalışmada RA'li hasta grupları MTHFR C677T ve A1298C gen polimorfizmleri açısından karşılaştırdığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Bu çalışmada, C677T polimorfizmi için çalışma grubundaki 50 olgunun 7'sinde (%17) homozigot genotip (TT) belirlenirken, bunlardan yalnızca 2 olguda yan etki gelişimi gözlenmiştir. A1298C polimorfizmi için ise 50 olgunun 4'ünde (%8) homozigot genotip (CC) saptanırken, sadece 1 olguda yan etki gelişimi gözlenmiştir. Yan etki gözlenen ve gözlenmeyen hasta grupları arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri araştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Biz de bu çalışmamızda, MTX tedavisi gören RA'li hastalara uygulanan ilaç tedavisi sonucu oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesine ve etkin bir tedavinin sağlanmasına katkıda bulunmak amacıyla yan etki gelişimi üzerinde güçlü bir aday olduğu belirtilen, MTHFR enziminde meydana gelen C677T ve A1298C gen polimorfizmlerinin analizlerini gerçekleştirdik.

Yapılan çalışmada 677TT homozigot mutant bireylerin çalışmaya katılan hastalar içinde yaklaşık olarak %10'a karşılık geldiği ve bunlardan sadece 3'ünde yan etki görüldüğü

tespit edildi. Aynı şekilde 1298CC homozigot mutant bireyler yaklaşık olarak %8'e karşılık gelmektedir ve bunlardan sadece 1'inde yan etkiler görülmüştür.

Daha büyük hasta toplulukları üzerinde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin ilaç toksisitesi üzerinde etkili olup olmadığının belirlenebilmesi için, 88 kişilik olan hasta grubunun genişletilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle araştırmanın devam edilmesine ve hasta grubunun büyütülmesine karar verilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Anonim 1 (2010)

http://www.eular.org/myUploadData/files/RA%20Class%20Slides%20ACR_Web.pdf (erişim tarihi, 21.05.13).

Anonim 2 <http://www.ctf.edu.tr/farma/tfd/mbabaoglu.pdf> (erişim tarihi, 15.04.13)

Anonim 3 (2013) <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/mthfr.jpeg>(erişim tarihi, 25.07.13).

Bagley PJ, Jacob S (1998). A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Med Sci*, 95: 13217-13220.

Bailey LB, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GP, Quinlivan EP, Davis SR, Cuadras A, Hutson AD, Gregory JF (2002). Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *J Nutr*, 132:24665-24709.

Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capioux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino JR (2002). Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1587:164–173.

Beckman, DR, Hoganson, G, Berlow S, Gilbert EF (1987). Pathological findings in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Birth Defects Orig, Art, Ser*, 23: 47-64.

Berkun Y, Levartovsky D, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader, Abou Atta I, Mevorach D, Friedman G, Ben-Yehuda A (2004). Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63:1227-1231.

Bertina R.M, Koelaman B.P.C, Koster T, Rosendal F.R, Dirven, R, J. Ronde H, van der Valden P.A, Reitsma P.H (1994). Mutation In Blood Coagulation Factor V Associated With Resistance To Activated Protein C. *Nature*, 369:64-67

Boccia S, Boffetta P, Brennan P, Ricciardi G, Gianfagna F, Matsuo K, Duijn C, Hung R, (2009). Meta-analyses of The Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C Polymorphisms and Risk of Head and Neck and Lung Cancer, *Cancer Letters* 273:55–61.

Bohanec Grabar P, Logar D, Lestan B, Dolzan V (2008). Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol*; 64(11): 1057-1068.

Bononi A, Gusella M, Stievano L, Ferrazzi E, Pasini F (2008). Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphisms in Elderly Colorectal Cancer Patients Treated with Capecitabine, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 68;42-43.

- Boris M, Goldblatt A, Galanko J, James J (2004). Association of MTHFR Gene Variants with Autism, *Journal of American Physicians and Surgeons*, 9(4):106-109.
- Botto LD, Yang Q (2000). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies. *Am J Epidemiol*, 151:862-877.
- Buch M, Emery P (2002). The etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Hospital Pharmacist*, 9:5-10.
- Cáliz R, del Amo J, Balsa A, Blanco F, Silva L, Sanmarti R, Martínez FG, Collado MD, Ramirez Mdel C, Tejedor D, Artieda M, Pascual-Salcedo D, Oreiro N, Andreu JL, Graell E, Simon L, Martínez A, Mulero J (2012). The C677T polymorphism in the MTHFR gene is associated with the toxicity of methotrexate in a Spanish rheumatoid arthritis population. *Scand J Rheumatol*, 41(1):10-14.
- Chan ESL, Cronstein BN (2002). Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases *Arthritis Research*, 4: 266-273.
- Chatzikiyriakidou A, Georgiou I, Voulgari PV, Papadopoulos CG, Tzavaras T, Drosos AA. (2007). Transcription regulatory polymorphism -43T>C in the 5'-flanking region of SLC19A1 gene could affect rheumatoid arthritis patient response to methotrexate therapy. *Rheumatol Int*, 27(11):1057-1061.
- Chen Z, Liu Y, Zhang D, Liu Z, Wang P, Zhou D, Zhao T, Wang T, Xu H, Li S, Feng G, He L, Yu L (2009). C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms in Bipolar Disorder: An Association Study in the Chinese Population and a Meta-Analysis of Genetic Association Studies. *Neuroscience Letters*, 449:48–51.
- Conagan PG, Brooks P (1995). Disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate, gold, antimalarials and d-penicillamine. *Curr OpinRheumatol*, 7: 167-173.
- Connor F, Smith-Ferguson, M (1997). *Essential Medical Genetics*. Blackwell Science.
- Cooper G.M (1997). *The Cell: A molecular Approach.*, ASM Press, Washington, D.C.
- Cronstein BN (1997). The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am*, 23: 739–55.
- Cronstein BN (2005) Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatmentof rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev*, 57(2):163-172.
- Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriolo B, Straub RH (2001). Antiinflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 60(8): 729-735.
- DalyS F, Molloy A M, Mills J L, Lee Y J, Conley M, KirkeP N, WeirD G, Scott J M (1999). The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue. *Brit J Obstet Gynaec*,106:1214-1218.
- Daniel A, Tuhina N, Alan J. Silman (2010). *Arthritis & Rheumatism*, American College of Rheumatology. Vol. 62 (9): 2569–2581.

- Demirel A, Kırnap M (2010). Romatoid Artrit Hastalarında Geleneksel ve Güncel Yaklaşım. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 19(1): 74-84.
- Dennis Lo Y.M (1998) Clinical Applications of PCR. s. 3-10, Humana Press Inc.
- Dervieux T, Furst D, Lein DO (2004). Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 50: 2766–2774.
- Dervieux T, Greenstein N, Kremer J.(2006). Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(10): 3095-3103.
- Diaz-Arrastia R (2000). Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol*, 57: 1422-1428.
- Drozdik M, Rudas T, Pawlik A, Kurzawski M, Czerny B, Gornik W (2006). The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs. *Eur J Clin Pharmacol*, 62(11):933-937.
- Ergin S. (2000). Romatoid Artrit ve Sjögren Sendromu. Beyazova M, Gökçe-Kutsal Y (eds). Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Cilt 2. Güneş Kitabevi Ltd.Şti, Ankara, 1549-1576.
- Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G (2000). Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol* 13(1):20-33.
- Fresko I. (1999). Romatizmal Hastalıklarda Tedavi İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatizmal Hastalıklar Sempozyumu 25, İstanbul, 45-54.
- Gaffney L.A. Y. N, Scott D. G. I. (2005). Methotrexate-induced pancytopenia: serious and under-reported, Our experience of 25 cases in 5 years. *Rheumatology*, 44:1051-1055
- Galpin AJ, Schuetz JD, Masson (1997). Differences in folylpolyglutamate synthetase and dihydrofolate reductase expression in human B-lineage versus T-lineage leukemic lymphoblasts: mechanisms for lineage differences in methotrexate polyglutamylation and cytotoxicity. *Mol Pharmacol*, 52: 155–163.
- Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP (2000). Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*, 47:247–257.
- Giovannucci E (2002), Epidemiologic Studies of Folate and Colorectal Neoplasia: A Review. *J. Nutr*, 132(8):2350–2355.
- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R (1994). Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet*. 7:195-200
- Goyette P, Pai A, Milos R (1998). Gene structure of human mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*, 9:652-656.
- Goyette P, Rozen R (2000). The thermolabile variant 677CT can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat*, 16:132-138.

- Göksoy T (2002). Romatizmal Hastalıkların Tedavisi. ISBN: 975-411-263-0. 421-450.
- Götze T, Röcken C, Röhl F, Wex T, Hofmann J, Westphal S, Maltferheiner P, Ebert M, Dierkes J, (2007). Gene Polymorphisms of Folate Metabolizing Enzymes and the Risk of Gastric Cancer, *Cancer Letters*, 251:228–236.
- Güneştutar L Y, Rodop MC, (2009) Elektroforezde yeni yaklaşımlar. *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, Sigma 27: 151-160.
- Gümüşdiş G, Doğanavşargil E. (1999). Klinik Romatoloji. ISBN:975-483-397-4. 269-278.
- Gümüşdiş G (2003). Bağ Dokusu Hastalıkları: Romatoid Artrit. Gümüşdiş G,Doğanavşargil E (eds). Klinik Romatoloji El Kitabı, Güven Matbaası, sf: 209-227, İzmir.
- Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van de Putte LB. (1999). Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 58(2): 79-84
- Hajeer AH, Dababneh A, Makki RF, Thomson W, Poulton K, Gay MA, Garcia Porrua C, Matthey DL, Ollier WE (2000). Different gene loci within the HLA-DR and TNF regions are independently associated with susceptibility and severity in Spanish rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens*, 55: 319-325.
- Hamuryudan V (2003). Romatoid artrit. İ.Ü. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi No: 34, s. 19-29. <http://194.27.141.99/dosya-depo/stek/pdfs/55/5506.pdf>
- Hamuryudan V (2007). Romatoid Artrit. İ.U. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Romatolojik Hastalıklar Sempozyum Dizisi, No:55: 69-86.
- Hider S L, Bruce I N, Thomson W. (2007). The pharmacogenetics of Methotrexate. *Rheumatology*, 46: 1520–1524
- Homberger G, Linnebank M, Winter C, (2000). Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet*, 8:725-729.
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, (1999). Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res*, 59(11): 2532-2535.
- Hughes LB, Beasley TM, Patel H, Tiwari HK, Morgan SL, Baggott JE, (2006). Racial or ethnic differences in allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and their influence on response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65(9): 1213-1218.
- Hyland K, Smith I, Bottiglieri T, Perry J, Wendel U, Clayton P T, Leonard J V (1988). Demyelination and decreased S-adenosylmethioninein 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Neurology*, 38: 459-462.
- Ingelman-Sundberg (2001). Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *M, J Intern Med*, 250: 186-200.

- Jencks D A, Mathews R G (1987). Allosteric Inhibition of Methylene tetrahydrofolate reductase by Adenosyl methionine. Effects of adenosyl methionine and NADPH on the Equilibrium Between Active and Inactive Forms of the Enzyme and on the Kinetics of Approach to Equilibrium. *Biol. Chem*, 262 (6); 2485–2493.
- John S W M, Weitzner G, Rozen R, Scriver C R (1988). A Rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. *Nucleic Acid Research*, 19(2): 408.
- Johnson JA, Lima JJ. (2003). Drug receptor/effector polymorphisms and pharmacogenetics: current status and challenges. *Pharmacogenetics*, 13(9): 525-534.
- Judith A. M. Wessels, Jeska K. de Vries-Bouwstra, Bas T. Heijmans, P.Eline Slagboom, Yvonne P. M. Goekoop-Ruiterman, Cornelia F. Allaart, Pit J.S. M. Kerstens, Derkjen van Zeben, Ferdinand C. Breedveld, Ben A. C. Dijkmans, Tom W. J. Huizinga, Henk-Jan Guchelaar (2006). Efficacy and Toxicity of Methotrexate in Early Rheumatoid Arthritis Are Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in Genes Coding for Folate Pathway Enzymes. *Arthritis & Rheumatism*. 54(4): 1087-1095.
- Kim D H, Ahn Y O, Lee B H, Tsuji E, Kiyohara C, Kono S, (2004). Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Alcohol Intake, and Risks of Colon and Rectal Cancers in Korea, *Cancer Letters*, 216: 199–205.
- Kim Y (2000). Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev*, 58: 205-217.
- Kinder AJ, Hassell AB, Brand J, Brownfield A, Grove M, Shadforth MF (2005). The treatment of inflammatory arthritis with methotrexate in clinical practice: treatment duration and incidence of adverse drug reactions. *Rheumatology*, 44: 61–66.
- Kluijtmans L A J, Wendel U, Stevens E M B, van den Heuvel L PW J, Trijbels F J M, Blom H. J. (1998). Identification of four novel mutations in severe methylene tetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Hum. Genet*, 6: 257-265.
- Kooloos WM, T.W.J. Huizinga, H.-J. Guchelaar J.A.M. Wessels, (2010). Pharmacogenetics in Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Current Pharmaceutical Design*, 16: 164-175
- Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. (2003). Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylene tetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med*, 11(5): 593-600.
- Kurzawski M, Pawlik A, Safranow K, Herczynska M, Drozdziak M (2007). C677T and A1298C MTHFR polymorphisms affect methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*, 8: 1551–1559.
- Langevin S M, Lin D, Matsuo K, Gao C M, Takezaki T, Stolzenberg-Solomon R Z, Vasavi M, Hasan Q, Taioli E, (2009). Review and Pooled Analysis of Studies on MTHFR C677T Polymorphism and Esophageal Cancer. *Toxicology Letters*, 184 (2): 73-80.
- Lee D M, Weinblatt ME (2001). Rheumatoid arthritis. *Lancet*; 358:903-911.
- Leopardi P, Marcon F, Caiola S, Cafolla A, Siniscalchi E, Zijno A, Crebelli R, (2006). Effects of Folic Acid Deficiency and MTHFR C677T Polymorphism on Spontaneous and Radiation-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes. *Mutagenesis*, 21(5): 327-333.

- Lucock M, Yates Z,(2006). Folic acid, B vitamin and panacea or genetic time bomb, *Nature Reviews Genetics*, 6: 235-240.
- Lynden J R, Leslie G C, Ranjeny T, Ssanna M P (2006). Early combination disease modifying antirheumatic drug treatment for rheumatoid arthritis. *MJA*,184(3): 122-125.
- Martinez C. V(2006). The Effect of the Interaction Folate MTHFR C677T Mutation on DNA Integrity and Gene Expression, Ph. Thesis, Friedman School of Nutrition Science and Policy, Tufts University.
- McCune W, Vallance DK, Lynch JP (1994). Immunosuppressive drug therapy. *Curr Opin Rheumatol*, 7: 262-272.
- Mevorach D, Paget SA (2000). Rheumatoid Arthritis. Paget SA, Gibofsky A, BearyJF III (eds) . *Manuel of Rheumatology and Outpatient Orthopedic Disorders*. Lippincott Williams & Wilkins, Fourth Edition, 192-229.
- Montesinos MC, Yap JS, Desai A, Posadas I, McCrary CT, Cronstein BN (2000). Reversal of the antiinflammatory effects of Methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists the ophylline and caffeine: evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*, 43(3):656-663.
- Norris MD, De GD, Haber M, Kavallaris M, Madafiglio J, GilbertJ, (1996). Involvement of MDR1 P-glycoprotein in multifactorial resistance to methotrexate. *Int J Cancer*, 65(5): 613-619.
- Öncel S, Peker Ö, Göğüş F. (2002). Romatoid Artritte Etiyopatogenez, Klinik ve Laboratuar Bulgular. Göksoy T (ed). *Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi*. Yüce Reklam/Yayım/Dağıtım A.Ş. İstanbul,422-431,436-449.
- Paget SA (1997). Rheumatoid Arthritis: Treatment. In Kippel JH (ed): *Primer on the Rheumatic Diseases*. Atlanta, Arthritis Foundation.
- Peng F, Labelle LA, Rainey B, (2001). Single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are common in US Caucasian and Hispanic American populations. *Int J Mol Med*,8: 509-511.
- Radstake TR, Fransen J, Toonen EJ, Coenen MJ, Eijsbouts AE, Donn R, (2007). Macrophage migration inhibitory factor polymorphisms do not predict therapeutic response to glucocorticoids or to tumour necrosis factor alpha-neutralising treatments in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66(11): 1525-1530.
- Rady PL, Tying SK, Hundnall SD, (1999). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): Theincidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet*, 86: 380-384.
- Ranganathan P, Eisen S, Yokoyama W M, McLeod H. L. (2003). Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity andefficacy in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62: 4-9.

- Ranganathan P, McLeod H L (2006). Methotrexate Pharmacogenetics The First Step Toward Individualized Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54(5): 1366-1377
- Ranganathan P, Culverhouse R, Marsh S, Mody A, Scott-Horton TJ, Brasington R, (2008). Methotrexate (MTX) pathway gene polymorphisms and their effects on MTX toxicity in Caucasian and African American patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*; 35(4): 572-579.
- Ridker P M, Hennekens C H, Lindpainter K, Stampfer M J, Eisenberg P R, Miletich J (1995). Mutation In The Gene Coding for Coagulation Factor V and Risk of Myocardial Infarction, Stroke, and Venous Thrombosis In Apparently Healthy Men. *N. Engl. J. Med*, 332: 912-917.
- Rosenblatt DS (2001). Metylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med*, 24:56-59.
- Rozen R (1998). Metylenetetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer. IV. Reunion, Methionine metabolism, molecular mechanisms and clinical implications. Index no 6, March University of Navarra and Granada, Spain. <http://www.boehringer-ingenelheim.es/workshopmethionina/anglesa/cap6.htm>. (12.05.2013)
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (1982). *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Seitz M (1999). Molecular and cellular effects of methotrexate. *Current Opinion in Rheumatology*, 11: 226-232.
- Selzer R R, Rosenblatt D S, Laxova R, Hogan K (2003). Adverse effect of nitrous oxide in a child with 5,10-metylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *New Eng. J. Med*. 349: 45-50.
- Shelnutt K P, Kauwell G P A, Gregory J F, Maneval D R, Quinlivan E P, Theriaque D W, George N, Henderson G N, Bailey L B, (2004). Effect of the Metylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on Polate Status and DNA Methylation Response in Young Woman. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(9): 554-560.
- Sırmalı R, Koca Y, Erden G, Aydın Y, Berker D, Güler S (2008). Tip 2 Diyabetli Bireylerde MTHFR C677T ve A1298C Gen Polimorfizmleri ile Diyabetik Retinopati Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, *Türk Biyokimya Dergisi*, 33(2): 71–76.
- Sibani S, Christensen B, O'ferrall E, (2000). Characterization of six novel mutations in the MTHFR gene in patients with homocystinuria. *Hum Mutat*, 15: 280-287.
- Skibola C, Smith M, Kane E, Roma Ne, Rollinson S, Cartwright A R, Morgan G, (1999). Polymorphisms in The Metylenetetrahydrofolate Reductase Gene are Associated with Susceptibility to Acute Leukemia in Adults. *PNAS*, 96(22): 12810–12815.
- Slattery M L, Potter J D, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M (1999). Metylenetetrahydrofolate Reductase, Diet, and Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiology*, 8: 513-518.

- Stuppia L, Gatta A R, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, Palka G, (2002). C677T Mutation in the 5,10-MTHFR Gene and Risk of Down Syndrome in Ital, *European Journal of Human Genetics*, 10: 388-390.
- Swierkot J, Szechinski J (2006). Methotrexate in rheumatoid arthritis, *pharmacological Reports*, 58: 473-492
- Takatori R, Takahashi KA, Tokunaga D, Hojo T, Fujioka M, Asano T, (2006). ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*, 24(5): 546-554.
- Taniguchi A, Urano W, Tanaka E, Furihata S, Kamitsuji S, Inoue E, (2007). Validation of the associations between single nucleotide polymorphisms or haplotypes and responses to disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: a proposal for prospective pharmacogenomic study in clinical practice. *Pharmacogenetics*, 17(6): 383-90.
- Taşbaş O, Borman P, Gürhan Karabulut H, Tükün A, Yorgancıoğlu R (2011). The Frequency of A1298C and C677T Polymorphisms of the Methylene tetrahydrofolate Gene in Turkish Patients with Rheumatoid Arthritis: Relationship with Methotrexate Toxicity, 5: 30-35.
- Taşçıoğlu N (2005). Gastrointestinal Sistem Kanserlerinde Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni 677 C\T, 1298 A\C ve Metiyonin Sentetaz Geni 2756 A\G Polimorfizmlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Tetik A. (2006) Methotrexate Tedavisi Gören Romatoid Artritli Hastalarda Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmlerinin İlaç Toksisitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Tonetti C, Burtscher A, Bories D, Tulliez M, Zittoun J (2000). Methylene tetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: a clinical, biochemical, and molecular study of the family. *Am J Med Genet*, 91:363-367.
- Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, Akama H, Kitamura Y, Kamatani N. (2002). Polymorphisms in the methylene tetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics*, 12(3):183-190.
- Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, (2001). The C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene: a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, 44(11): 2525-2530.
- Van Ede A E, Laan R F J M, Blom H J, Boers G H J, Haagsma CJ, Thomas C M G, de Boo T M, van de Putte L B A (2002). Homocysteine and folate status in methotrexate-treated patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 41: 658-665
- Walker J M, Gaastra W, (1983) *Techniques in Molecular Biology*, Coom Helm Ltd, Provident House.

- Weinblatt ME, Kaplan H, Germain BF (1994). Methotrexate in rheumatoid arthritis. A five-year prospective multicenter study. *Arthritis Rheum*, 37: 1492-1498.
- Weinblatt ME, Koopman WJ, McCartyDJ(1997). Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Allied Conditions*. Williams and WilkinsCompany 58: 1131-1145.
- Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, (2006). Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(2): 607-612.
- Wendel U, Bremer H J (1984). Betaine in the treatment of homocystinuria due to 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Europ. J. Pediat.* 142: 147-150.
- Wessels JA, Kooloos WM, De Jonge R (2006). Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 54: 2830–2839.
- Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S., Kievit W, Barerra P, Allaart CF, (2007). A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 56(6): 1765-1775.
- Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S (2005). The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res*; 65: 4425–4430.
- Wolf C R, Smith G. Smith R L (2000). Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics *BMJ*, 320;987-990.
- Wu X, Liang Z, Zou T, Wang X, (2009). Effects of Folic Acid Deficiency and MTHFR C677T Polymorphisms on Cytotoxicity in Human Peripheral Blood Lymphocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(3): 732-737.
- Yazıcı Y, Erkan D (2003). Romatoid Artrit: Tanı ve Tedavisi. Karaaslan Y, Oksef (eds). *Romatizmal Hastalıklar Tedavi El Kitabı*, MD Yayıncılık, sf: 53-64, Ankara.
- Yazıcı Y, Soka T, Kautiainen H, Swearingen C, Kumlan I, Pincus T. (2005). Long term safety of methotrexate in routine clinical care: discontinuation is unusual and rarely the result of laboratory abnormalities. *Ann Rheum Dis*, 64; 207-211.
- Yurdakul S (2002). Uzun Etkili İlaçlar. Hamuryudan V. (ed). *Romatoid Artrit*, MD Yayıncılık, 80-87, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Sinan DÜNDAR 01.12.1986 tarihinde Merkez/SİİRT'te doğdu. İlköğrenimini Alparslan İlköğretim Okulunda, lise eğitimini Ahmet Rasim Lisesi Fatih/İSTANBUL' da tamamladı. Lisans eğitimini Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde 2008 yılında tamamladı. 2010 yılından günümüze Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. Aynı zamanda Okan Üniversitesi SHMYO Patoloji Laboratuvarı Teknikleri Programında öğretim görevlisi olarak akademik hayatına devam etmektedir.