

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GLUTATYON PEROKSİDAZ 1 GENİNDEKİ PRO197LEU POLİMORFİZMİNİN**  
**ŞİZOFRENİ ETYOPATOGENEZİNDEKİ ROLÜ VE TÜRK POPULASYONUNDAKİ**  
**ALLEL DAĞILIMI**

**DR. İBRAHİM TEKEDERELİ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**YRD. DOÇ. DR. HÜSEYİN YÜCE**

**BU ÇALIŞMA FÜBAP TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.**

**(PROJE NO: 1233)**

**ELAZIĞ-2007**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. ....  
**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_

.....

..... **Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....  
**Danışman**

### Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

*Yeni Doğan Kızıma*

## TEŐEKKÖR

Araştırma görevlisi olarak çalıştığım sürede eğitimime olan katkıları ve tez hazırlığı sırasında yardımları nedeniyle danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE'ye, yönlendirmeleri için ana bilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Halit ELYAS'a, kritik değerlendirmeleri ve değerli destekleri için Sayın Prof. Dr. Ömer AKYOL'a, Sayın Doç. Dr. Halit CANATAN'a, laboratuvar çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Dr. Süleyman OKTAR ve Sayın Araş. Gör. Dr. Murat KARA'ya, çalışmalarımız için fiziki ortamı her an hazır hale getiren bölüm çalışanlarımıza, ayrıca çalışmamızı destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Birimi'ne (FUBAP proje no: 1233) teŐekkr etmeyi bir borç biliyorum.

## 5. İÇİNDEKİLER

KONU	SAYFA NO
1. Özet .....	1
2. Abstract .....	2
3. Giriş .....	3
3.1. Şizofreni.....	3
3.1.1. Şizofreninin Tanımı.....	3
3.1.2. Şizofreni Kliniği.....	3
3.1.3. Şizofreni Alt Tipleri.....	4
3.1.4. Etyopatogenez İncelemesi.....	4
3.1.4.1. Şizofreni Etyopatogenezinde Rol Oynadığı İleri Sürülen Modeller.....	6
3.1.4.1.1. Stres Yatkınlık Modeli.....	6
3.1.4.1.2. Nörobiyolojik Modeller.....	6
3.1.4.1.3. Dopamin Hipotezi.....	6
3.1.4.1.4. Serotonin Hipotezi.....	6
3.1.4.1.5. Glutamat Hipotezi.....	7
3.1.4.1.6. Nöropatolojik Modeller.....	7
3.2. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler.....	7
3.2.1. İnsan vücudunda serbest radikal kaynakları.....	8
3.2.2. Serbest radikalleri nötralize eden sistemler.....	9
3.2.3. Antioksidan enzimler.....	9
3.2.3.1. Glutatyon peroksidaz enziminin biyolojik fonksiyonu ve alt tipleri.....	10
3.2.3.2. Glutatyon peroksidaz 1 enziminin özellikleri.....	11

3.2.3.3.	Glutatyon peroksidaz 1 geninin kromozomal lokalizasyonu.....	11
3.2.3.4.	Glutatyon peroksidaz 1 geninin yapısı.....	12
3.3.	Etyolojisinde serbest radikallerin suçlandığı nöropsikiyatrik hastalık ve süreçler.....	12
3.4.	Şizofreni, serbest radikaller ve antioksidanlar.....	15
3.5.	Şizofreni Genetiği.....	16
3.5.1.	Klinik Genetik Açından Şizofreni.....	16
3.5.2.	Şizofrenide Sitogenetik Çalışmalar.....	17
3.5.3.	Şizofrenide moleküler çalışmalar.....	18
3.6.	Polimorfizm .....	19
3.6.1.	Şizofreni etyopatogenezinde bugüne kadar çalışılan genetik polimorfizmler.....	19
3.7.	Çalışmanın Amacı.....	20
4.	Gereç ve Yöntem .....	22
4.1.	Hastaların Seçimi	22
4.2.	Örneklerin alınması, saklanması ve analizlere hazırlanması.....	23
4.3.	Kimyasallar maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar.....	23
4.4.	Kandan DNA izolasyonu.....	24
4.5.	Oligonükleotidler (primerler).....	26
4.6.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	27
4.6.1.	PCR optimizasyonu.....	27
4.7.	Restriksiyon enzimi ve PCR ürünün sindirimi.....	28

4.8.	Kullanılan DNA marker'i.....	29
4.9.	Agaroz jel elektroforezi.....	29
4.10.	İstatistiksel analizler.....	30
5.	Bulgular .....	31
6.	Tartışma .....	36
7.	Kaynaklar .....	40
8.	Özgeçmiş .....	48

## 6. TABLO LİSTESİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1	: DSM- IV'e göre Şizofreni tanı ölçütleri.....	5
Tablo 2	: İnsan GPX1 enzimi amino asit dizisi.....	11
Tablo 3	: İnsan GPX1 geninin toplam nükleotid dizisi.....	13
Tablo 4	: Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri.....	22
Tablo 5	: GPX1 genine ait primer dizileri.....	26
Tablo 6	: Hastalar ve kontrollerdeki Pro197Leu polimorfizminin genotipi ve allel sıklıkları.....	34
Tablo 7	: Hasta grubunda cinsiyet farklılıklarına göre Pro197Leu polimorfizminin genotipi ve allel sıklıkları.....	35



## 7. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	: Şizofreni hastası bir bireyin akrabalarında Şizofreni ortaya çıkma riskleri.....	17
Şekil 2	: GPX1 geninin PCR reaksiyonunda çoğaltılan bölgesi ve restriksiyon enzimi hedef noktası.....	28
Şekil 3	: Farklı bağlanma dereceleriyle yapılan PCR optimizasyonuna ait agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 4	: Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe etkisi.....	32
Şekil 5	: <i>Dde I</i> ile kesilen PCR rnlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	32

## 8. KISALTMALAR LİSTESİ

DSM-IV	:	Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı IV
5-HT	:	Serotonin (5 Hidroksi Triptamin)
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
O <sub>2</sub>	:	Moleküler Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	Süperoksit Anyonu
OH <sup>·</sup>	:	Hidroksil Radikali
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen Peroksit
Fe <sup>+2</sup>	:	+2 Değerlikli Demir
Fe <sup>+3</sup>	:	+3 Değerlikli Demir
CAT	:	Katalaz
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
Mn-SOD	:	Mangan Süperoksit Dismutaz
Cu,Zn-SOD	:	Bakır, Çinko Süperoksit Dismutaz
EC-SOD	:	Hücre Dışı Süperoksit Dismutaz
GSSG	:	Okside Glutasyon
GSH	:	Redükte Glutasyon
GST	:	Glutasyon S- Transferaz
GPX	:	Glutasyon Peroksidaz
GPX1	:	Glutasyon Peroksidaz 1
GPX2	:	Glutasyon Peroksidaz 2
GPX3	:	Glutasyon Peroksidaz 3
GPX4	:	Glutasyon Peroksidaz 4
cDNA	:	Komplementer DNA

PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MIM	:	Insanda Mendelyen Kalıtım (Veritabanı)
AH	:	Alzheimer hastalığı
PH	:	Parkinson Hastalığı
UTR	:	Proteine Dönüşmeyen Bölge
COMT	:	Katekol-O-Metil Transferaz
VNTR	:	Farklı Sayıdaki Tandem Tekrarları
SNP	:	Tek Nükleotid Polimorfizmi

## 1. ÖZET

Şizofreni; psikoz, kognitif disfonksiyon ve negatif semptomlarla karakterize kompleks bir hastalıktır. Genellikle 25 yaşından önce başlamakta ve yaşam boyu devam etmektedir. Vakaların çoğunda etyoloji bilinmemektedir. Genetik ve çevresel yatkınlık faktörlerinin birbirleriyle etkileşimi etyopatogenezden sorumlu tutulmaktadır. Vücutta oluşan serbest radikaller ve antioksidan sistem bir denge içindedir. Şizofreni hastalarında gelişen oksidatif strese bağlı olarak denge oksidanlar lehine bozulmakta ve bilinen veya henüz keşfedilemeyen mekanizmalarla şizofreniye neden olmaktadır. Bu çalışmada vücuttaki antioksidan enzimlerden biri olan glutatyon peroksidaz'ın en önemli alt ünitesi olan glutatyon peroksidaz 1 (GPX1) genine ait pro197leu polimorfizminin şizofreni etyopatogenezindeki rolünün aydınlatılması hedeflenmiştir.

Çalışmaya 100 şizofreni hastası (54 erkek ve 46 kadın) ve 100 sağlıklı gönüllü birey (66 erkek ve 34 kadın) dahil edildi. Çalışma PCR\RFLP yoluyla yapıldı.

Hasta grubunda Pro\Pro genotipi % 48, Pro\Leu genotipi % 43 ve Leu\Leu % 9 oranında tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise Pro\Pro % 57, Pro\Leu % 34 ve Leu\Leu % 9 olarak tespit edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubundaki bireyler arasında GPX1 genotipleri, allel frekansları açısından kadın ve erkek hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Sonuç olarak, çalışma verilerimize göre GPX1 geninin pro197leu polimorfizmi en azından bizim toplumumuz için şizofreniye yatkınlık oluşturmamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Şizofreni, Glutatyon Peroksidaz 1, Polimorfizm.

## 2. ABSTRACT

### THE ROLE OF PRO197LEU POLYMORPHISM OF THE GLUTATHIONE PEROXIDASE 1 GENE IN THE ETIOPATHOGENESIS OF SCHIZOPHRENIA AND THE ALLELE DISTRIBUTION IN THE TURKISH POPULATION

Schizophrenia is a complex disease and characterized with psychosis, cognitive disfunction and negative symptoms. It generally begins before the age of 25 and continues through the life. The etiology is unknown in most cases. The interaction of genetic and environmental factors is responsible from the etiopathogenesis of the disease. Free radicals and antioxidant system are in balance in the body. The balance shifts to oxidants resulted from oxidative stress and leads to schizophrenia with some suspected and unknown mechanisms. In this study, we aimed to elucidate the role of the pro197leu polymorphism of glutathione peroxidase 1 enzyme, the major subunit of glutathione peroxidase, in the etiopathogenesis of schizophrenia.

The study composed of 100 patients (54 males and 46 females) and 100 healthy volunteers (66 males and 34 females). The study was conducted with the PCR\RFLP method. In patient group, the rates of Pro\Pro, Pro\Leu, and Leu\Leu genotypes were found as 48 %, 43 %, 9 % , respectively. In control group, they were found as 57 %, 34 %, 9 %, respectively.

There were no statistically significant differences between the patient and control groups with regard to genotypes and between males and females in the patient group with regard to allele frequencies.

In conclusion, the Pro197Leu polymorphism of GPX1 gene does not constitute any susceptibility for our population.

**Key Words:** Schizophrenia, Glutathione Peroxidase 1, Polymorphism.

## 3. GİRİŞ

### 3.1. Şizofreni

#### 3.1.1. Şizofreninin Tanımı

Şizofreni; psikoz, kognitif disfonksiyon ve negatif semptomlarla karakterize kompleks bir hastalıktır (1). Genellikle 25 yaşından önce başlamakta ve yaşam boyu devam etmektedir. Bütün sosyal sınıflardaki insanlarda görülebilen yaygın psikotik bozukluklardan biridir. Populasyonun yaklaşık % 1'ini etkileyen şizofreninin (2), yıllık insidansı 100.000' de 10-15 kadardır (3). Dünyanın her yerinde prevalansı aşağı yukarı eşittir (2). Hastalık her iki cinsiyette eşit yaygınlıktadır. Ancak hastalığın başlama yaşı ve gidişatı her iki cinste farklılık arz etmektedir (4). Erkeklerde daha erken başlayan şizofrenin tedavisi kadınlarda daha iyi bir gidiş göstermektedir (2).

#### 3.1.2. Şizofreni Kliniği

Şizofreni semptomları gürültülü bir şekilde akut başlangıçlı olabileceği gibi sessiz bir süreçte izleyebilmektedir. Semptomlar, şizofreni alt tiplerine göre farklı şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Ancak psikoz, kognitif disfonksiyon ve negatif semptomlar olmak üzere üç temel semptom tipi mevcuttur (1). Psikoz; delüzyonlar, halüsinasyonlar ve bizar davranışları içermektedir. Delüzyonlar, dîni veya kültürel bir grup tarafından paylaşılmayan garip inanışları kapsamaktadır. Halüsinasyonlar, başkaları tarafından paylaşılmayan algılardır. Sadece görsel algıları değil beş duyu organı ile ilgili algılar bu gruba girmektedir.

Kognitif disfonksiyon; dikkat, öğrenme, hafıza, konsantrasyon, soyut düşünme ve problem çözme gibi konularda zorlukları kapsamaktadır. Negatif semptomlar; genel populasyonda var olan davranış ve tecrübelerin olmayışı nedeniyle bu isimle adlandırılmıştır. Kişinin sürekli uyku halinde olması veya çevreye ilgisizliği, aloji, anhedoni, küntleşmiş beden dili veya aktivitenin azalması negatif semptomlardandır (1). Şizofreni tanısı için herhangi bir

laboratuvar testi bulunmamakla birlikte tanı, klinik olarak konmaktadır. Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından şizofreni ve diğer psikiyatrik hastalıklara konulan tanıları netleştirmek ve bu konuda bir standart oluşturmak amacıyla ‘Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV, DSM-IV) yayımlamaktadır. Şizofreni tanısı, halen kullanımda olan DSM-IV-TR’e göre konmaktadır (Tablo 1).

### **3.1.3. Şizofreni Alt Tipleri**

Şizofreninin farklı klinik spektrumlarının varlığı, tanı ve tedavide kolaylık sağlanması açısından alt tiplendirmenin zorunluluğunu ortaya koymuştur. 20. yüzyılın başlarında Bleuler (1911) tarafından latent ve basit tipler olarak iki alt grup tanımlanırken 1919 yılında Karaepelin tarafından hebefrenik, katatonik ve paranoid olmak üzere 3 alt tip tanımlanmıştır (5). Amerikan Psikiyatri Birliği yayımladığı ve günümüzde en yaygın kullanılan tanı kriterlerinin son üç versiyonunda - DSM III (1980), DSM III-R (1994) ve DSM IV (1994) - genel olarak Karaepelin’in sınıflandırmasını temel alarak şizofreninin 5 alt tipini tanımlamıştır. Bu tanımlamada paranoid, katatonik, dezorganize, farklılaşmamış ve residüel şizofreni alt tipleri belirlenmiş ve tanı kriterleri ortaya konmuştur (5).

### **3.1.4. Etyopatogenez İncelemesi**

Vakaların çoğunda etyoloji bilinmemektedir (6). Genetik ve çevresel yatkınlık faktörlerinin birbirleriyle etkileşimi etyopatogenezden sorumlu tutulmaktadır (1). Çevresel etkenler olarak coğrafi yaşam bölgeleri (7), ırk farklılıkları (8), enfeksiyon ajanları (9), doğum tarihi (10), gebelik komplikasyonları (11), kültürel (12) ve ekonomik sorunlar (13) gibi bir çok etken araştırılmıştır. Ancak bu etkenlerden hiç biri bugün için şizofreni hastalığının etyolojisinde kesin bir etken olarak kanıtlanamamıştır. Bununla birlikte kültürel ve çevre faktörlerinden ziyade genetik faktörlerin daha etkin olduğu yapılan aile, ikiz ve evlat edinme çalışmaları sonucunda gösterilmiştir (14). Son zamanlarda şizofreni etyolojisinde tek bir

etkeni suçlamak yerine birden çok ajanın birlikte etkin olduğunu öne süren modeller üzerinde durulmaktadır.

**Tablo 1:** DSM- IV'e göre Şizofreni tanı ölçütleri (2).

- 
- A. **Karakteristik belirtiler:** Bir aylık bir dönem boyuca (başarıyla tedavi edilmişse daha kısa bir süre), bu sürenin önemli bir kesiminde aşağıdakilerden ikisinin (veya daha fazlasının) bulunması:
- Hezeyanlar
  - Halüsinasyonlar
  - Dezorganize konuşma
  - İleri derecede dezorganize yada katatonik davranış
  - Negatif belirtiler (affektif donukluk, aloji yada avolasyon)

Not: hezeyanlar bizar ise yada halüsinasyonlar kişinin davranış yada düşünceleri üzerine sürekli yorum yapmakta olan seslerden ya da iki veya daha fazla sesin birbirleriyle konuşmasından oluşuyorsa A tanı ölçütünden sadece bir belirtinin bulunması yeterlidir.

- B. **Toplumsal\Mesleki işlev bozukluğu:** İş, kişiler arası ilişkiler yada kendine bakım gibi önemli işlevsellik alanlarında bir yada daha fazlasını, bu bozukluğun başlangıcından beri geçen sürenin önemli bir kesiminde, bu bozukluğun başlangıcından önce erişilen düzeyin belirgin olarak altında kalmıştır (başlangıcı çocukluk ve ergenlik dönemine uzanıyorsa, kişiler arası ilişkilerde, eğitimle ilgili ya da mesleki başarıda beklenen düzeye erişilememiştir).
- C. **Süre:** Bu bozukluğun süregiden belirtileri en az 6 ay süreyle kalıcı olur.  
Bu 6 aylık süre, en az bir ay süreyle (başarıyla tedavi edilmişse tedavi edilmişse daha kısa bir süre) A tanı ölçütünü karşılayan belirtileri kapsmalıdır. Bu bozukluğun belirtileri, prodromal yada rezidüel dönemlerde, sadece negatif belirtilerle yada A tanı ölçütünde sıralanan iki yada daha fazla belirtinin daha hafif biçimleriyle kendini gösterebilir.
- D. **Şizoaffektif bozukluğun ve duygudurum bozukluğunun dışlanması:** Şizoaftif bozukluk ve psikotik özellikler gösteren duygudurum bozukluğu dışlanmıştır, çünkü ya (1) aktif evre belirtileri ile birlikte aynı zamanda major depresif, manik yada mikst epizotlar ortaya çıkmamıştır yada (2) aktif evre belirtileri sırasında duygudurum epizotları ortaya çıkmışsa bile bunların toplam süresi aktif ve rezidüel dönemlerin süresine göre daha kısa olmuştur.
- E. **Madde bağımlılığının\genel tıbbi durumun dışlanması:** Bu bozukluk bir maddenin doğrudan fizyolojik etkilerine yada genel tıbbi duruma bağlı olarak ortaya çıkmamıştır.
- F. **Bir yaygın gelişimsel bozuklukla ilişkisi:** Otistik bozukluk yada diğer bir yaygın gelişimsel bozukluk öyküsü varsa, ancak en az bir ay süreyle (başarıyla tedavi edilmişse tedavi edilmişse daha kısa bir süre) belirgin hezeyan yada halüsinasyonlar da varsa şizofreni ek tanısı konabilir.
-



### **3.1.4.1. Şizofreni Etyopatogenezinde Rol Oynadığı İleri Sürülen Modeller**

#### **3.1.4.1.1. Stres Yatkınlık Modeli**

Biyolojik, psikososyal ve çevresel etkenlerin karşılıklı etkileşiminin anlatımı olan stres-yatkınlık modeline göre, özel bir yatkınlığı olan bir kişi stresli bir durumla karşılaşınca şizofreni belirtileri gelişmektedir (2).

#### **3.1.4.1.2. Nörobiyolojik Modeller**

Son yıllarda artan çalışmalarda limbik sistem, frontal korteks, sebellum ve bazal gangliayı içeren belirli beyin bölgelerindeki patofizyolojik olaylar üzerinde durulmaktadır.

#### **3.1.4.1.3. Dopamin Hipotezi**

Şizofreni etyolojisine ve antipsikotik ilaçların etkilerine dair hipotezlerden en yaygın kabul göreni Dopamin hipotezidir. Dopaminerjik nöronlar ortabeyindeki iki çekirdekten köken almaktadır: 1- Nigrostriatal yolak, substansia nigra'dan başlayarak striatum'da sonlanmakta; motor davranışı, bilişimi ve algıya ilişkin kapı-kontrol mekanizmasını düzenlemektedir. 2- Mezolimbik ve mezokortikal yolaklar, ventral tegmental alandan köken alarak sırasıyla limbik ve kortikal yapılarda sonlanmaktadır. Bu yolaklar bilişim istenç ve ödül sistemleriyle ilişkilidir. D1 ve D5 reseptörlerini içeren dopamin 1 (D1) reseptör ailesi, korteks ve striatumda yüksek yoğunlukta bulunmaktadır. D2, D3 ve D4 reseptörlerini içeren dopamin 2 (D2) reseptör ailesi ise limbik ve striatal bölgelerde yoğunlaşmaktadır (15). Dopamin geri emilimini engelleyen ve salınımını artıran D-Amfetamin'in kronik kullanımında paranoid şizofreni benzeri bir psikoz tablosuna yol açması, şizofreni tedavisinde kullanılan antipsikotiklerin dopamin aktivitesini azaltması gibi bulgulardan yola çıkılarak bu hipotez öne sürülmüştür (15).

#### **3.1.4.1.4. Serotonin Hipotezi**

Serotonin (5-HT) nöronları, orta beyinde dorsal ve medyan raphe nukleuslarından köken alarak korteks, striatum, hipokampus ve diğer limbik alanlara uzanırlar. En az 15 tip 5-

HT reseptörü bulunmaktadır. Bunlardan şizofreni ile en yakın ilişkili olanlar 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub> reseptörleridir. Şizofreninin, beyin serotonerjik sisteminin aşırı aktivitesinden kaynaklandığını ileri süren bu hipotez daha iyi kurgulanmış çalışmalarla desteklenememiştir (15).

#### **3.1.4.1.5. Glutamat Hipotezi**

Öne sürülen glutamat hipotezinde glutamatın hipoaktivitesi, hiperaktivitesi ve glutamatın yol açtığı nörotoksisite üzerinde durulmaktadır. Yine glutamat antagonisti olan fenilsiklidinin akut alınması ile şizofreniye benzer bir sendromun ortaya çıkmasından dolayı şizofreni etyolojisinde glutamatın da etkisi olduğu ileri sürülmektedir (2).

#### **3.1.4.1.6. Nöropatolojik Modeller**

Şizofrenik beyinlerde, beyin fonksiyonlarına aracılık eden akson, dendrit ve sinapsların yoğunluğundaki azalmanın sonucu olarak gelişen beyin hacmi azalmaları yaygın olarak bildirilmiştir. Bu yoğunluk 1 yaşında en yüksek düzeyde iken erken ergenlik döneminde yavaş yavaş erişkin düzeylerine gerilemektedir. Şizofrenisinde sıklıkla ergenlik döneminde geliştiği düşünüldüğünde, sinaptik yoğunluktaki azalmanın şizofreninin nedeni olduğu düşünülmüştür (2).

### **3.2. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler**

Bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan molekül veya atomlara serbest radikaller denilmektedir (16). Diğer maddelerden elektron almaya olan yatkınlıkları onları oldukça reaktif hale getirmektedir. İnsan vücudunda çok çeşitli tipte serbest radikaller vardır. Bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılan molekül olma özelliğine sahip olan madde moleküler oksijendir (O<sub>2</sub>). Sıkça kullanılan reaktif oksijen türleri (ROS) (17) terimi aynı zamanda moleküler oksijeni ifade etmektedir (18). En yaygın ROS türleri, süperoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'tir.

### 3.2.1 İnsan vücudunda serbest radikal kaynakları

Vücutta bir çok mekanizma ile bir çok yolda serbest radikaller oluşmaktadır. Hücrel ROS'un kaynakları arasında, mitokondrial elektron transport zinciri, mikrozomal elektron transport zinciri, ksantin oksidaz, siklooksijenaz gibi oksidan enzimler, fagositler,  $Fe^{+2}$  ve epinefrinin hücrel oto-oksidasyonu (19) ve prostoglandin sentez yolağı (20) sayılabilir.

Mitokondrial elektron transport zinciri: Mitokondride normalde elektron akışı esnasında son ürün olarak su oluşmaktadır. Ancak transport esnasında kaçan elektronların oksijen ile reaksiyona girerek oksijeni bir elektronla indirgemekte ve sonucunda süperoksit radikali oluşmaktadır (21).

Mikrozomal elektron transport zinciri: Özellikle endoplazmik retikulumda bazı metabolizma faaliyetleri sırasında serbest radikal oluşmaktadır.

Prostaglandin sentezi: Araşidonik asitten prostaglandin sentezlenmesi aşamalarında gerek siklooksijenaz ve gerekse lipoksijenaz yollarında çeşitli kademelerde serbest radikaller üretilmektedir (20).

Karışık fonksiyonlu oksidazlar: Ksantin oksidaz, amino asit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidazlar bu grubun en önemli üyeleridir. Pürin katabolizmasında önemli roller üstlenen ksantin oksidaz bazı özel durumlarda fazla miktarda  $O_2^-$  üretmektedir (22).

Solunum patlaması: Fagositozda, nötrofiller stoplazma ve membranında bulunan enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hemde aşırı okside edici ajanları üreterek vücut savunmasında etkin rol almaktadır.

Bunlardan başka; kişinin aldığı ilaçlar, maruz kaldığı bazı ajanlar da ROS miktarını artırmaktadır.

### 3.2.2. Serbest radikalleri nötrale eden sistemler

Serbest radikaller vücutta bazı etkili enzim sistemleri ve bazı diğer antioksidan maddeler tarafından nötrale edilmektedir. Vücuttaki antioksidan enzimlere glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon s-transferaz örnek olarak verilebilirken dışarıdan alınan besin kaynaklı antioksidanlara vitamin E, vitamin C, karotenler, flavonoidler, ürik asit ve taurin örnek olarak verilebilmektedir (23).

### 3.2.3 Antioksidan enzimler

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6); karaciğer, böbrek ve eritrositte aktivitesinin çok yüksek, beyin, kalp, iskelet kası ve destek dokusunda ise daha düşük olduğu saptanan katalaz, dört adet alt üniteden oluşmuş glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Prostetik grup olarak her bir alt ünitenin aktif merkezinde hem grubuna bağlı bir  $Fe^{+3}$  atomu taşımaktadır. Özellikle peroksizomlarda ve mitokondride, daha az olarak sitoplazma ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. Özellikle  $H_2O_2$  miktarının aşırı arttığı durumlarda devreye girerek bu molekülü suya çevirmektedir (16).

Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1); süperoksit radikallerini direkt olarak hidrojen peroksite ve moleküler oksijene çevirmektedir (16). Ökaryotlarda SOD enziminin 3 adet izoenzimi bulunmaktadır ve bunlar taşıdıkları prostetik grup olan metallere ve lokalizasyonlarına göre; Cu,Zn-SOD, Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) şeklinde sınıflara ayrılmaktadırlar (24).

Glutatyon redüktaz (EC 1.6.4.2); pentoz fosfat yolunda oluşan okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyon (GSH) dönüştürerek direkt değil de dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Bu katalizi gerçekleştirirken koenzim olarak NADPH kullanmaktadır (16).

Glutasyon s- transferaz (25) (EC 2.5.1.18); bir elektrofilik karbon, azot veya kükürt atomu içeren non-polar bileşiklerin konjugasyonunu redükte glutatyona katalizlemekte (26) ve selenyumdan bağımsız işlev görmektedir.

### **3.2.3.1. Glutasyon peroksidaz enziminin biyolojik fonksiyonu ve alt tipleri**

Glutasyon peroksidaz enzimi, dört protein alt ünitesinden oluşmaktadır. Bu tetramerik yapıların herbiri aktif bölgelerinde selenyum elementi taşımakta ve aktif katalizde bu element prostetik grup olarak önemli bir fonksiyon görmektedir. Vücudun bütün doku ve hücrelerinde bulunmakla birlikte organlara göre farklılıklar göstermektedir. Karaciğerde en yüksek aktivitede, akciğer, kalp ve beyinde daha az aktivitede, kasta ise en az aktivitede olduğu saptanmıştır. Hücre içinde sitoplazmada ve mitokondride daha yoğun olarak bulunmaktadır. İlk kez memeli eritrositlerinde, daha sonra da hayvan dokularında varlığı gösterilmiştir. Vücutta hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) detoksifikasyonunda ve ayrıca lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda görev almaktadır (27). Koenzim olarak glutasyonu (GSH) kullanmaktadır (28) ve 4 tipi bulunmaktadır. Bunlar;

1. Glutasyon peroksidaz 1 (GPX1): Selenyum içeren GPX1 herbiri birbirinin aynı olan 4 alt ünite içeren bir selenosistein rezidüsünden oluşmaktadır. Enzim vücutta her yerde üretilirken eritrosit, karaciğer ve böbrekte özellikle bol miktarda bulunmaktadır (29).
2. Glutasyon peroksidaz 2 (GPX2): Selenyum bağımlı sitozolik GPX olarak bilinmekte ve primer olarak gastrointestinal dokularda eksprese edilmektedir. Memelileri, oral olarak alınan lipid peroksitlere karşı korumada önemli bir rol oynamaktadır. Enzimi kodlayan gen 14q24.1'de yerleşiktir ve 2 ekzonu bulunmaktadır (29).
3. Glutasyon peroksidaz 3 (GPX3): Ekstraselüler GPX olarak adlandırılan GPX3 başlıca plazmada bulunmaktadır. Fakat böbrek, akciğer, kalp ve plasentada da eksprese edilmektedir. Enzim GPX4'ten daha az etkin olarak fosfatidilkolin gibi

kompleks lipidlerin hidroperoksitlerini indirgemektedir. Enzimi kodlayan gen 5q32-q33.1'de yerleşiktir ve 5 ekzondan oluşmaktadır (29).

4. Glutasyon peroksidaz 4 (GPX4): Fosfolipid hidroperoksit GPX olarak isimlendirilmektedir. Çoğu dokuda bulunduğu ve hem sitosol hemde membranlarla ilişkili olduğu saptanmıştır. Diğer GPX'ların aksine monomer halinde bulunmaktadır. Küçük boyutu ve hidrofobik yüzeyi nedeniyle membrandaki peroksidize olmuş fosfolipidleri ve kolesterolleri indirgemektedir. Enzimi kodlayan gen 19p13.3'te yerleşiktir ve 7 ekzon içermektedir (29).

### 3.2.3.2. Glutasyon peroksidaz 1 enziminin özellikleri

HücreSEL veya klasik glutasyon peroksidaz olarak bilinen GPX1 aynı zamanda memelilerde keşfedilen ilk selenoproteindir (30). GPX1, her biri 23 kDa ağırlığında bir selenyum atomu içeren 88 kDa ağırlığında bir homotetramer yapıya sahiptir (31). Memelilerde ise, 47. pozisyonda bir selenosistein rezidüsü içeren ve 201 amino asitten (Tablo 2) oluşan bir enzimdir (32). Aktivitesinin çoğunu (yaklaşık %75) sitozolde gösterirken geri kalan aktivitesini ise mitokondride göstermektedir. Rodentlerle yapılan çalışmalarda hemen tüm dokularda aktivite gösterdiği saptanmasına rağmen en yüksek aktivitesini karaciğer ve böbreklerde gösterdiği saptanmıştır (33,34).

**Tablo 2.** İnsan GPX1 enzimi amino asit dizisi. Tablo GenBank'tan alıntılanmıştır GenBank erişim numarası: Y00483.

---

```
MCAARLAAAA AQSVAFSAR PLAGGEPVSL GSLRGKLLI ENVASLCGTT VRDVTQMNEL 60
QRRLGPRGLV VLGFPNCFG HQENAKNEEI LNSLKYVRPG GGFEPNFMLF EKCEVNGAGA 120
HPLFAFLREA LPAPSDDATA LMTDPKLITW SPVCRNDVAW NFEKFLVGPD GVPLRRYSRR 180
FQTIDIEPDI EALLSQGPSC A 201
```

---

### 3.2.3.3. Glutasyon peroksidaz 1 geninin kromozomal lokalizasyonu

1978 yılında ilk kez yapılan araştırmalar sonucunda GPX1 geninin 3 nolu kromozomda yerleştiği tespit edilmiş ancak tam olarak lokalizasyon belirlenememiştir (35). Bir yıl sonra yapılan bir lokalizasyon çalışması sonucunda genin, 3. kromozomun p kolunda yerleşik

olduğu belirlenmiştir (36). cDNA problemlerinin kullanıldığı in situ hibridizasyon yöntemi ile 3p13-q12 bölgeleri genin yeni yerleşim alanı olarak tespit edilmiştir (37). 1997 yılında bir araştırma grubu in situ hibridizasyon ve PCR tekniklerini kullanarak yaptıkları çalışmada, daha önceki araştırmacıların 3p13-q12 bölgelerinden aldıkları sinyallerin bir psödogen'den kaynaklandığını ve GPX1 geninin tam lokalizasyonunun ise 3p21.3 olduğunu tespit etmişlerdir (38).

#### **3.2.3.4. Glutasyon peroksidaz 1 geninin yapısı**

GPX1 geni, farede 5.2 kb uzunluğunda, 2 ekzon ve 1 introndan oluşurken (39) insanda ise (MIM# 138320 ve GenBank# Y00483) 1733 nükleotitten (Tablo 3) oluşan 2 ekzonlu bir yapıya sahiptir (40). Forsberg ve arkadaşları GPX1 geninde amino asit değişimleri ile sonuçlanan 3 farklı polimorfizm bildirmişlerdir (41). 1; Glutamik asitten arjinine amino asit değişimiyle (G116R) sonuçlanan 349. pozisyondaki guanin'in sitozinle yer değiştirmesi (349G\C), 2; prolinden lösine değişime (P121L) neden olan 365. pozisyondaki sitozinin timinle değişimi (365C\T), 3; prolinden lösine değişime (P197L) neden olan 593. pozisyondaki sitozinin timinle değişimi (593C\T) (41). Hamanishi ve arkadaşları bu polimorfizmlere ek olarak -602. pozisyonda adeninden guanine değişim (-602A\G), +2. pozisyonda sitozinden timine değişim (+2C\T) ve 7-11. kodonlarda 5 veya 6 tekrarlı polialanin polimorfizmi (Ala<sup>5</sup>/Ala<sup>6</sup>) olmak üzere 3 farklı polimorfizm daha bildirmişlerdir (42).

### **3.3. Etyolojisinde serbest radikallerin suçlandığı nöropsikiyatrik hastalık ve süreçler**

Proteinler, membran lipidleri ve nükleik asitler serbest radikallerin hedefleri konumundadır. Triptofan, tirozin ve fenilalanin gibi aromatik amino asitler (43) ve sülfür içeren sistin ve sistein gibi amino asitler, yapılarındaki doymamış bağ, sülfidril grupları ve disülfid bağları nedeniyle serbest radikallerin etkilerine açıktırlar. Membran kolesterol ve yağ

asitleri doymamış yağ içermeleri nedeniyle serbest radikal saldırılarına hassas olup sonrasında kolayca peroksidasyona uğrayabilmektedirler (44). Oluşan her bir lipid peroksit aynı zamanda bir serbest radikal olma özelliği taşıdığından bu kaskat bir kez başlayınca her bir lipid peroksit komşu yağ asidine saldırarak ortama bir yeni serbest radikal daha kazandırmış olmaktadır (44).

**Tablo 3.** İnsan GPX1 geninin toplam nükleotid dizisi. Tablo GenBank'tan alıntılanmıştır. (Gen bankası nükleotid sekansı erişim numarası: Y00483)

1	aacctagatc	cctctgctgt	cccctgcact	gccggtaaca	tggcacagca	gagcagggtt
61	gtttgtgcac	gggcagctcc	tgcagctgct	gccgtcgccc	accagcctcc	tatgccaaac
121	cccacatcct	aactcaggaa	cctctgagaa	aaaacggagc	cctcgagggg	cccagccttg
181	gaagggtaac	tggaccgctg	ccgcctgggt	gcctgggcca	gaccagacat	gcctgctgct
241	ccttccggct	taggaggagc	acgcgtcccg	ctcgcgcgca	ctctccagcc	ttttcctggc
301	tgaggagggg	ccgagcctcc	ggtagggcgg	gggccggatg	aggcgggacc	tcaggcccgg
361	aaaactgcct	gtgccacgtg	acccgccgcc	ggccagttaa	aaggaggcgc	ctgctggcct
421	ccccttacag	tgcttgcttc	gggcgctccg	ctggcttctt	ggacaattgc	gccatgtgtg
481	ctgctcggct	agcggcggcg	gcggcccagt	cgggtgatgc	cttctcggcg	cgcccgttgg
541	cggcggggga	gcctgtgagc	ctgggctccc	tgcggggcaa	ggtactactt	atcgagaatg
601	tggcgtccct	ctgagggacc	acgggtccggg	actacaccca	gatgaacgag	ctgcagcggc
661	gcctcggacc	ccggggcctg	gtgggtgctcg	gcttcccgtg	caaccagttt	gggcatcagg
721	tgcgccgggc	ggagcgggac	gggacggggg	cggacgtgca	gtagtggctg	ggggcgccgg
781	cgggtgtggtg	gtgggtgctg	cggctccatg	cgccggagagt	ctggctactc	tctcgtttcc
841	tttctggttc	tcgtagctgc	tgaattcctt	ctccgccttt	gggattgcgc	atggagggaa
901	aaatcccggg	gactcataga	aaatctcccc	tgtttgtggt	tagaacgttt	ctctcctoct
961	cttgaccocg	ggttctagct	gcccttctct	cctgtaggag	aacgccaaga	acgaagagat
1021	tctgaattcc	ctcaagtacg	tccggcctgg	tgggtgggttc	gagcccaact	tcatgctctt
1081	cgagaagtgc	gaggtgaacg	gtgcgggggc	gcaccctctc	ttcgccttcc	tgccggaggc
1141	cctgccagct	cccagcgcag	acgccaccgc	gcttatgacc	gacccaagc	tcatcacctg
1201	gtctccggtg	tgtcgcaacg	atggtgctcg	gaactttgag	aagtctcctg	tggggcctga
1261	cgggtgtgcc	ctacgcaggt	acagccgcgg	cttccagacc	attgacatcg	agcctgacat
1321	cgaagccctg	ctgtctcaag	ggcccagctg	tgcctagggc	gcccctccta	ccccggctgc
1381	ttggcagttg	cagtgtgctg	gtctcggggg	ggttttcatc	tatgagggtg	tttctcttaa
1441	acctacgagg	gaggaacacc	ttgatcttac	agaaaatacc	acctcgagat	gggtgctggt
1501	cctggtgatc	ccagtctctg	ccagaccaag	gctagtttcc	ccactaataa	agtgccgggt
1561	gtcagcagac	tgtgtgtatg	tctctgtgtca	ttgtcatttg	ggaattcttt	ttcttttctt
1621	tttttttttt	tttttttgag	acggagtttt	ttgctctatt	gcccaggctt	gagtgcagtg
1681	gcgcaatcta	ggctcactgc	aagctccgcc	tcccgggttc	agcatttctg	cta

Beyin dokusu vücuda alınan tüm oksijenin yaklaşık 1\5'ini tüketmesi, serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi ve yüksek oranda doymamış yağ içermesi nedeniyle serbest radikal aracılı hasara açık bir hedef konumundadır. Ayrıca beyin total antioksidan kapasitesi nispeten daha düşüktür (44). Membran lipid peroksidasyonuna neden olan demir, beyinde bazı bölgelerde, askorbat ise beyin genelinde yüksek oranda bulunmaktadır (45). Tüm bu



bilgiler ışığında, beyinde gelişen patolojik süreçlere antioksidan sistemin katkısı çeşitli çalışmalarla ortaya konmaya çalışılmıştır.

- Yaşlanma; beyinde oksidize olmuş proteinlerin ve lipofuskin miktarının artması yaşlanmanın en belirgin özelliklerindedir (44,46). Bununla birlikte bir başka teori de, normal hücrel metabolizma sırasında oluşan serbest radikallerin DNA ve diğer makromolekülleri hasarlandırmasıdır (44). Oluşan bu serbest radikaller ateroskleroz, karaciğer sirozu ve katarakt oluşumu gibi daha çok yaşlanmayla ortaya çıkan bazı ciddi problemlerin de etyolojisinde yer almaktadır. Lipofuskin yaşla birlikte artarak hücrelerin işlevlerini bozmaktadır. Yapılan çalışmalarda oksijeni azaltılmış ortamlarda, oksidatif stress durumlarında ve redoks-aktif demirin (oksidatif reaksiyonların katalizörü) yoğun olduğu ortamlarda lipofuskin oluşumu artarken (47), demir bağlayan ilaçlar (desferrioksamin), değişik antioksidanlar (vitamin E, selenyum, glutatyon vb.) ve oksidatif süreçleri azalttığı bilinen kalori kısıtlamaları lipofuskin oluşumunu azaltmaktadır (48).
- Alzheimer hastalığı (AH); Oksidatif stresin, AH'nin etyolojisindeki etkisi kesin olarak gösterilememiştir. Ancak yaşla birlikte azalan mental fonksiyonlar, yaşlanma ve buna bağlı olarak artan oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla oksidatif stres sonucu artan serbest radikallerin etkisiyle oluşan beyin hasarının AH'nin ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir (44). Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif stresin, AH'deki en önemli nöropatolojik olayların öncülü olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda oksidatif değişikliklerin AH'nin erken dönemlerinde en göze çarpan bulgular oldukları da bildirilmiştir (49).
- Parkinson Hastalığı (PH); etyolojisi tam olarak açıklanamayan PH için oksidatif stresin bir etyolojik ajan olduğu tezi şu gözleme dayanmaktadır. Dopaminin oksidasyonunun toksik semikinonlara neden olması ve monoamin oksidaz B ile dopaminin hızlanmış metabolizmasının hidrojen peroksit, süperoksit anyonları ve hidroksil radikallerinin aşırı

üretimini indüklemesidir (50). Ayrıca mitokondrial transport zincirini bozan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin gibi ajanların substansiya nigra'ya olan selektif toksisitesi de (51) bu hipotezin ortaya atılmasına neden olmuştur.

- Bu hastalıkların yanı sıra down sendromu (52), bipolar bozukluk (53), obsesif kompulsif bozukluk (54) gibi nöropsikiyatrik hastalıkların etyolojisinde de oksidatif stres suçlanmaktadır.

### **3.4. Şizofreni, serbest radikaller ve antioksidanlar**

Vücutta oluşan serbest radikaller antioksidan sistemlerle nötralize edilmektedir. Bir diğer ifade ile oksidan ve antioksidan sistem bir denge içindedir. Bu dengenin bozulması yani oksidan ürünlerin artması ile proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve nükleik asitler gibi vücudun temel yapı taşlarında değişimler meydana gelmektedir. Vücudun tamamında meydana gelebilecek bu değişimler beyinde daha dramatik sonuçlara neden olmaktadır. Bu değişimlerin beyinde ortaya çıkardığı sonuçlar şöyle sıralanabilir; membranlarda lipid peroksidasyonu oluşması, membran bütünlüğünün bozulması; lipidlerin içine gömülü şekilde duran reseptörlerin ve Na/K-ATPaz gibi membran proteinlerinin fonksiyonlarının değişmesi, mitokondrial ve nükleer DNA'da baz oksidasyonları ve zincir kırılmaları başta olmak üzere değişik hasarların oluşması, proteaz, fosfolipaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz, elastaz, ksantin oksidaz gibi birçok litik enzimin aktifleşmesi, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun yavaşlaması, inflamasyon ve lökosit kemotaksisi artması, hücre içinde bulunan yapısal proteinler ve fonksiyonel enzimlerin hasara uğraması, kapiller permeabilitenin artması ve antiproteolitik enzimler hasara uğraması (28). Oksidan\antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasıyla beyin hücrelerinin membranlarında bulunan fosfatidiletanolamin içeriğinin normalden saptığı ve esansiyel yağ asidlerinin kan seviyelerinde değişmeler olduğu saptanmıştır (55). Sinaptik membranın esansiyel yağ asiti içeriğinin değişmesi ile nöron fonksiyonları değişmekte ve en az iki farklı mekanizma ile klinik etkiler farklılaşmaktadır.

Bunlardan birincisi, membrandaki esansiyel yağ asidi içeriğinin değişmesiyle mikroçevre farklılaşması ve bu nedenle membran reseptörlerinin, iyon kanallarının ve enzimlerin yapı ve fonksiyonunda değişimler olmasıdır. İkinci mekanizma ise ikinci habercilerin öncül molekülleri için kaynak görevi gören esansiyel yağ asitleri hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminde değişmeler olmasıdır. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda bu tür membran değişikliklerinin şizofreniye özgü olmadığı bunun yanı sıra depresyon, alkolizm, hareket bozuklukları, retinitis pigmentosa ve yaygın peroksizomal bozukluklarda da görülebileceği bildirilmiştir (56). Serbest radikal kaynaklarından bir tanesi de prostoglandin sentez yolağıdır. Bu yolda gliserolden lizofosfolipidlerin oluşma basamağını katalizleyen fosfolipaz A2 enziminin aktivitesinin şizofreni hastalarında arttığı saptamıştır (57). Fosfolipaz A2 aktivitesinin artışı prostoglandin sentezindeki artışa işaret etmekte ve dolayısıyla bu yoldaki serbest radikallerinin oluşumundaki artışın bir göstergesi olarak kabul edilebilmektedir. Sonuç olarak şizofreni hastalarında gelişen oksidatif strese bağlı olarak denge oksidanlar lehine bozulmakta ve bilinen veya henüz keşfedilemeyen mekanizmalarla şizofreniye neden olmaktadır.

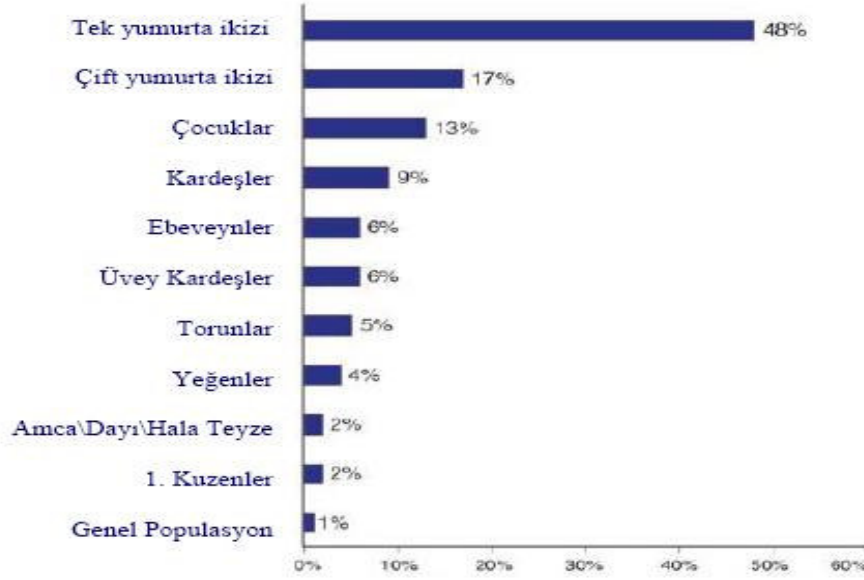
### **3.5. Şizofreni Genetiği**

Aile, ikiz ve evlat edinme çalışmalarından elde edilen sonuçlarla şizofreni etyopatogenezinde hem çevrenin hemde genetik faktörlerin önemli olduğu ve aynı zamanda kalıtılabilir bir hastalık olduğu ortaya çıkarılmıştır.

#### **3.5.1. Klinik Genetik Açından Şizofreni**

Şizofreni multifaktoryel kalıtım gösteren kompleks bir hastalıktır. Şizofreni tanısı alan kişiler için en büyük risk faktörünün pozitif aile hikayesi olduğu bilinmektedir (58). Şizofreni için kalıtılabilirlik önemli olsa da, fenotiplerdeki farklılıkları açıklamak için çevresel faktörler hesaba katılmalıdır. Ayrıca şizofreninin kalıtılabilirliğinin tahmini olarak % 60-80 kadar

olduğu bildirilmiştir (58). Bireylerin şizofreni hastasına olan yakınlıklarına göre taşıdıkları risk oranları şekil 1’de gösterilmiştir.



**Şekil 1:** Şizofreni hastası bir bireyin akrabalarında şizofreni ortaya çıkma riskleri (59)

### 3.5.2. Şizofrenide Sitogenetik Çalışmalar

Şizofreni hastalığına veya yatkınlığına neden olabilecek bir lokus belirleyebilmek amacıyla çeşitli araştırmacılar tarafından karyotip çalışmaları yapılmıştır. Kunugi ve arkadaşları Japonya’da 250 şizofreni hastasının karyotipini çıkardıkları çalışmalarında, X kromozomu anöplidilerinin ve 9. kromozomun perisentrik inversiyonunun bu hasta grubunda normal popülasyona göre artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca 9 numaralı kromozomun kırılma bölgelerinde veya X kromozomunda bir lokusun hastalığa yatkınlık oluşturabileceğini ileri sürmüşlerdir (60). Ancak Japonya’da yapılan diğer bir çalışmada hasta ve normal bireyler arasında farklılık bulunamamıştır (61). 1994 yılında yayınlanan bir derlemede çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlardan X kromozomunun bir yatkınlık lokusu taşıdığı ileri sürülmüştür (62). 2003 yılında Türkiye’de yapılan bir çalışmada inv(9) oranı yüksek bulunmuş ve kırık bölgelerinin yatkınlık lokusu olabileceği ileri sürülmüştür (63). 22q bölgesinde interstisyel delesyonla ortaya çıkan ve kendini çeşitli dismorfik

görünümle ortaya çıkan velo-kardiyo-fasiyal sendromla birlikte, şizofreni başta olmak üzere çeşitli psikoz tablolarının görülmesi araştırmacıların dikkatini bu bölgeye çekmiştir. Yapılan linkaj çalışmaları sonucunda bu bölge yatkınlık lokusu olarak tanımlanmıştır (64). Ancak geniş bir araştırmacı grubunun çok merkezin katılımı ile yaptıkları bir linkaj çalışması ile bu sonuç doğrulanamamıştır (65). Yapılan tüm araştırmalara rağmen tutarlı bir yatkınlık lokusu henüz tespit edilememiştir.

### **3.5.3. Şizofrenide moleküler çalışmalar**

Şizofreni heterojen bir hastalıktır. Bugüne kadar çok sayıda lokus ve gen ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaları 3 ana başlık altında toplamak mümkündür.

Asosiyasyon (ilişki) çalışmaları; bu çalışma türünde aday gen veya genler için hasta bireyler ve sağlıklı kontrol bireyleri arasında allel sıklıkları arasında fark olup olmadığı araştırılmaktadır. Bütün genomu asosiyasyon için taramak mümkün olmadığından, bu çalışmalar için spesifik genler ve lokuslar seçilmektedir. Asosiyasyon çalışması için en uygun genler, hastalıkla ilişkisi olduğu bilinen bir biyolojik süreçte görev alan genlerdir. Günümüzde ise mikroarray yöntemleri ile aynı anda çok sayıda geni taramak mümkün hale gelmiştir.

Linkaj (bağlantı) çalışmaları; herhangi bir hastalığa neden olan genlerin saptanması için atılacak ilk adımdır. Bu çalışmaların amacı, yatkınlık lokusunun daha önceden lokalizasyonu bilinen bir DNA dizisine (genetik marker) göre kabaca uzaklığının belirlenmesidir. Bu yöntemle elde edilen sonuçlardan bir çok yatkınlık lokusu belirlenmiştir. Bunlar arasında 1q21-q22, 5q21-q33, 6p24-p22, 6q21-q25, 8p22-p21, 10p15-p11, 10q25-q26, 13q32-q34, 22q11-q13 (65), 15q13-q14 sayılabilir (66).

Aday gen çalışmaları; çalışılacak genler, etyopatogeneizde suçlanan yollara ait spesifik reseptörler, enzimler veya fonksiyon gösteren diğer molekülleri hedefleyen farmakolojik, nörokimyasal ve klinik bulgular temel alınarak belirlenmektedir. Antipsikotik ajanlara oldukça yüksek afinite gösteren dopamin ve serotonin reseptörlerini kodlayan genler buna iki önemli örnektir (28). Bunlara ek olarak NRG1, disbindin, PRODH2, G72, DAAO, COMT gibi genler de aday olarak

çalışılmıştır (66). Bu araştırmalardan bir kısmından ümit verici sonuçlar alınırken diğer bir kısmının sonucunda ise genler aday olmaktan çıkarılmıştır.

### **3.6. Polimorfizm**

Polimorfizm, bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürülemeyecek oranlarda var olan, nadir sıklıktaki, devamlılık göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğin bir arada olması olarak tanımlanabilmektedir. Eğer toplumun % 2 veya daha fazlası nadir bir alleli taşıyorsa bu durum polimorfiktir (67). Polimorfik durumun oluşması için gereken allel frekansı farklı yayınlarda % 1 olarakta gösterilmektedir (68).

İnsan DNA dizisindeki değişikliklerin % 90 kadarı tek baz değişimleridir (69) ve bu değişimleri içeren allellerin frekansı toplumda % 1'i geçtiğinde tek baz polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism=SNP) adını almaktadır. Küçük boyutlu insersiyon ve delesyonlarda SNP kapsamı içerisinde değerlendirilmektedir. SNP'lerinin yaklaşık 2/3'si sitozinden timine değişim şeklinde olmaktadır. SNP'ler ekzonlarda olabileceği gibi intronlarda ve 5' ve 3' ifade edilmeyen bölgelerde de (5' and 3' Untranslated Regions=UTR) olmaktadır. Bu bölgelerdeki SNP'ler, RNA splicing ve stabilitesini etkilemektedir. SNP veritabanlarında 4 milyonun üzerinde SNP bildirimiştir. Bu SNP'ler kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diabet, mental bozukluklar ve otoimmün hastalıklar gibi bazı yaygın majör rahatsızlıklarda risk tayini için genetik belirteçler olarak kullanılabilir (68). Yine bu polimorfik durumlar tedavi edici ilaç seçimi ve ilaca cevapta kişiler arasındaki farklılıkları açıklamak ve kişiye özgü tedavi seçenekleri geliştirmek için de kullanılmaktadır. Bu polimorfizmlerin mutasyona olan nispi stabiliteyi onların bağlantı eşitsizliği durumlarında kullanılmasına olanak sağlamaktadır (70).

#### **3.6.1. Şizofreni etyopatogenezinde bugüne kadar çalışılan genetik polimorfizmler**

Bugüne kadar şizofreni hastalığı etyopatogenezini aydınlatmak amacıyla birçok genin polimorfizmleri araştırılmış ve bir kısmından önemli bulgular elde edilmiştir.

Katekol-O-metil transferaz (COMT) polimorfizmi; şizofrenide prefrontal korteks fonksiyonlarının bozulması önemli bir bulgudur. Bu bölgede nörotransmitter olarak görev yapan dopaminin metabolizmasında önemli bir yer tutan COMT enzimini kodlayan gendeki Val108/158Met polimorfizmi ile şizofreni arasındaki ilişki araştırılmış ve hasta bireylerde kontrol grubuna göre allel sıklığında artma tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak prefrontal kortekste dopamin katabolizması arttığında prefrontal fizyoloji ve bilişsel fonksiyonların bozulabileceği, bu bozulmanın şizofreni riskini artıracığı anlamı çıkarılmıştır (71).

5HT2A reseptör gen polimorfizmi; şizofreninin beyin serotonerjik sisteminin aşırı aktivitesinden kaynaklandığını ileri süren hipotezlere dayanılarak yapılan araştırmada 5HT2A reseptör geninde, kodlayıcı bölgenin 102. pozisyonundaki (T102C) polimorfizmi ile şizofreni hastalığı arasında bir ilişki saptanmıştır (72).

Dopamin D4 reseptör (DRD4) geni polimorfizmi; bir çalışmada DRD4 genine ait tandem tekrarları (VNTR) polimorfizmi ve -521C>T tek nükleotid polimorfizmi (SNP) araştırılmış ve VNTR polimorfizminin şizofreni ile ilişkili olduğu saptanırken SNP'nin ilişkisi bulunamamıştır (73).

Bu genlerden başka birçok gen ile ilgili polimorfizm çalışmaları yapılmıştır. Bunların bir kısmı ile şizofreni veya şizofreninin bazı semptomları arasında ilişki belirlenebilmiş, bir kısmı ile ise hiçbir ilişki kurulamamıştır (74).

### **3.7 Çalışmanın Amacı**

Şizofreni popülasyonun yaklaşık % 1'ini etkileyen, hastayı yıkıma götüren ve hasta kişinin ailesine çok ağır sorumluluklar yükleyen çok ciddi bir toplumsal sorundur. Bir çok genetik ve çevresel faktör etyopatogenezde suçlansa da henüz sebebi net olarak bilinmeyen ve çeşitli tedavi metotlarına rağmen tam remisyon sağlanamayan bu psikiyatrik hastalığın etyopatogenezinin aydınlatılması kişileri ve devletleri büyük mali yüklerden kurtaracaktır.

Her ne kadar üzerinde çalışılan bazı modeller olsa da şizofreni için tam bir hayvansal model oluşturulamadığından bu alandaki önemli çalışmalar insanlarda yapılan klinik çalışmalar ile sınırlı kalmıştır. Son yıllarda birçok nörodejeneratif hastalıkta olduğu gibi şizofrenide de serbest radikallerin, oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengesizliklerin bu hastalığın etyopatogenezinde rol aldığına dair iddialar ortaya atılmaktadır. Yapılan bir çok çalışmada glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve düzeyleri araştırılmış ve çoğunun normalin dışına çıktığı saptanmıştır. Akciğer (75) ve meme kanseri (25) riski, mesane kanseri tekrarlama riski (17) ile ilişkili bulunan glutatyon peroksidaz 1 genine ait pro197leu polimorfizminin, şizofreni etyopatogenezine olan muhtemel katkısının araştırılması önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada, GPX1 polimorfizminin şizofreni ile olan ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.



## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Hastaların Seçimi

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunca onaylanan çalışmada, Elazığ Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi'nde şizofreni tanısıyla takip ve tedavileri yapılan hastalardan; kendilerinin, birinci derece yakınlarının veya hastane otoriteleri ve hekimlerinin rızası ile kan örnekleri alındı. Epilepsi, mental retardasyon, madde bağımlılığı olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubunu ise, psikiyatrik hastalıklar başta olmak üzere organik ve kronik hastalığı olmayan, yaş dağılımı hastaların yaş dağılımına uygun sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubunun benzer coğrafi bölgelerden olmasına dikkat edildi.

Çalışmanın başlangıcında 111 adet şizofreni hastası ve 120 adet sağlıklı kontrol bireyi vardı. Her iki gruptan bazı bireyler değişik sebeplerle, örneğin DNA izolasyonunun verimli olmaması, klinik sınıflandırmanın tam yapılamaması, bireyin demografik verilerinin tam olarak elde edilememesi gibi sebeplerle çalışma dışı bırakıldı. Son olarak üzerinde istatistiksel analizlerin yapıldığı hasta ve kontrol bireylerinin sayısı her bir grup için 100 olarak belirlendi. Şizofreni hastalarının cinsiyet dağılımı 54 erkek ve 46 kadın olarak, kontrol grubunun cinsiyet dağılımı ise 66 erkek ve 34 kadın olarak belirlendi. Hasta ve kontrol grubundaki bireylere ait demografik veriler Tablo 4'te özet olarak sunulmuştur.

**Tablo 4.** Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri (Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir).

	Şizofreni	Kontrol
N	100	100
Yaş	38.96 $\pm$ 10.8	38.46 $\pm$ 11.71
Cinsiyet	54E / 46K	66E / 34 K

## **4.2. Örneklerin alınması, saklanması ve analizlere hazırlanması**

Kanlar sabah aç karnına, dinlenmiş hastaların antekübital veninden daha önceden hazırlanmış EDTA'lı tüplere 2 cc olarak alındı.

Kanlar, kan alınma işlemleri bittikten sonra DNA saflaştırması yapılmaya kadar ortalama olarak 1 hafta -20 C°'de bekletildi. Kanlar birkaç defa alt-üst edilerek homojen hale getirilip 8'erli gruplar oluşturularak çalışıldı.

## **4.3. Kimyasallar maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar**

Mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157.MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany), Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan), pH metre (Hanna Instruments HI8521 pHmeter, Italy), UV/visible spektrofotometre (LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 UV/visible spectrophotometer, Cambridge, England), hız ayarlı vorteks (Labinco L46, The Netherlands), su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany), Elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium), Electrophoresis box (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium), Eppendorf Mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 22331 Hamburg, Germany), UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), amonyum asetat, amonyum klorür, potasyum hidrojen karbonat, sodyum dodesil sülfat (SDS), isopropanol, %70'lik etanol, borik asit, EDTA, bromphenol blue, xylene cyanole, ficoll, agaroz, yüksek rezolüsyonlu agaroz, ethidium bromide, TRIS baz, potasyum asetat, magnesium asetat, TRIS-asetat, DTT (dithiotreitol), deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), Magnezyum Klorür, 100 bp DNA ve 50 bp DNA step marker'leri (Promega, Madison, WI).

#### 4.4. Kandan DNA izolasyonu

DNA saflaştırılması Promega firmasından alınan ticari “Wizard Genomic DNA Purification Kit”i ile gerçekleştirildi (Kat. No.: A1125, Madison, WI, USA). Bu kit 300 µL kandan DNA izolasyonu için dizayn edilmiştir. Çalışma esnasında kitin genel kurallarına uymak koşuluyla bazı modifikasyonlar yapıldı. Gerçekleştirilen deney aşamaları aşağıda sıralandığı gibidir:

- 1.5 ml lik tüplere 900 µL “cell lysis” (hücre parçalama) solusyonu konuldu.
- Alt-üst edilmiş kandan 300 µL alınarak hücre parçalama solusyonunun üzerine ilave edildi, 5-6 defa alt-üst edildi, 10 dak. oda ısısında bekletildi.
- 15.000 x g de 20 saniye oda ısısında santrifüjlendi.
- Alttaki beyaz kısma zarar vermeden mümkün olduğu ölçüde fazla süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı. Altta hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 10-20 µL sıvı bırakıldı.
- Hücre parçalama solusyonundan 300 µL alınarak çok hafifçe vortekslenmiş hücre çöküntüsünün üzerine eklendi ve 5-6 kez alt-üst edildi. 2-4. basamaklar tekrar edildi. Beyaz hücrelerin arasında hala bazı kırmızı hücreler görülüyorsa bu durumda tekrar hücre parçalama solusyonu eklenerek yukarıdaki deneyler tekrarlandı.
- Beyaz hücreler şiddetle vortekslenerek iyice karışması sağlandı (10-15 saniye).
- Vortekslenmiş hücrelerin üzerine 350 µL “Nuclei lysis” (çekirdek parçalama) solusyonu eklendi. Beyaz hücrelerin parçalanması için solusyon 5-6 kez pastör pipeti ile pipetlendi ve bırakıldı. Solusyon visköz bir yapı kazandı. Karıştırıldıktan sonra hala hücre kümeleri görünüyorsa 37°C’de inkübe edildi ve kümelerin bozulması beklendi. Kümeler 1 saat sonra hala varsa 100 µL çekirdek parçalama solusyonu eklenerek inkübasyon tekrarlandı.

- Oda ısısına getirilmiş Nükleer lizatın üzerine 120 µL “protein precipitation” (protein çöktürme) solusyonu eklendi. 10-20 saniye şiddetle vortekslendikten sonra küçük, değişik kahverengi tonlarında protein kümeleri görüldü. Numuneler tam oda ısısına gelmeden protein çöktürme solusyonu eklendiğinde yeterli bir protein çöküntüsü elde edilemeyeceğinden hareketle iyi bir çöktürme için bu ayrıntıya dikkat edildi.
- Oda sıcaklığında 15.000 x g’de 3 dakika santifüjlendi. Eppendorf tüpün dibinde koyu kahverengi bir protein çöküntüsü görüldü.
- Süpernatant 300 µL izopropanol içeren 1.5 ml’lik santifüj tüpüne transfer edildi.
- Sürekli alt-üst edilerek ve ters çevrilerek karıştırıldı. Beyaz iplik görünümündeki DNA, görülebilen bir kitle oluncaya kadar bu çevirme işlemine devam edildi. Bazı numunelerde görülebilen kümeler oluşurken diğer bazılarında çok küçük miktarda iplikçik görüldü.
- 1 dakika oda sıcaklığında 15.000 x g’de santrifüjlendi. DNA, örnekteki lökosit miktarının az veya fazla olmasına göre miktarı değişebilen beyaz bir çöküntü olarak görüldü.
- Süpernatant dökülerek dipte kalan DNA’nın üzerine 300 µL oda sıcaklığındaki %70’lik etanol eklendi. Alt-üst yapılarak DNA pelleti ve tüpün kenarları yıkandı. Yukarıdaki santrifüjleme işlemi tekrarlandı.
- Etanol dikkatlice aspire edildi. Bu aşamada DNA çok gevşektir. Yanlışlıkla pipetlenebileceğinden dikkatli olmak gerekir. Tüpler temiz kurutma kağıtlarının üzerine ağızları alta gelecek şekilde yerleştirildi, böylece fazla etanol alınmış oldu. Sonra 5-10 dakika normal havada kurumaya bırakıldı.
- Kurumuş tüpe 100 µL DNA rehidratasyon solusyonu eklendi. DNA’yı rehidre etmek için 65°C’de 1 saat inkübe edildi. Tüp ara ara çalkalandı.
- DNA 0.5 mL’lik eppendorf tüplere aktarılarak 2-8°C’de saklandı.

Bu işlemler bittikten sonra eppendorf tüplerde bulunan DNA'nın tahmini miktarını hesaplamak için şu işlem gerçekleştirildi: UV/visible spektrofotometre 260 ve 280nm'de çift dalga boyu aralığında okuma yapacak şekilde ayarlandı. DNA örneğinden 4 µL alınarak mikro küvette bulunan 746 µL saf suyun üzerine konuldu ve alt-üst yapıldı. Okuma gerçekleştirildi. Daha sonra  $\text{ng}/\mu\text{l DNA} = A_{260} \times \text{dilasyon faktörü} \times 50$  formülünden hareketle örneklerdeki DNA'nın yaklaşık miktarı hesaplandı.

#### 4.5. Oligonükleotidler (primerler)

Çalışmada kullanılacak olan Primer (Oligonükleotid) Biobasic firmasına (BioBasic, Ontario, Canada) sentezlettirildi. PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerin nükleotid sekansı tablo 5'te belirtilmiştir:

**Tablo 5:** GPX1 genine ait primer dizileri

---

Sense primer: 5'- GCCTGGTGGTGGGTTTCGAGCC-3'

Antisense primer: 5'-GACAGCAGCACTGCAACTGCC-3'

---

PCR işleminde kullanılacak olan primer konsantrasyonunun 20 pmol, PCR son hacminin de 50 µl olması planlandı. Ön denemelerde 5 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 30 pmol, 40 pmol, 50 pmol primer serileri diğer bütün değişkenler sabit kalmak üzere eşit miktarda DNA kullanılarak denendi. Bunlardan en iyi sonuç verenin 20 pmol olduğu gözlemlendi. Bu denemelere ait teknik detaylar ve elde edilen bulgular tezin bu bölümünün ilerleyen kısımlarında ve bulgular bölümünde verilecektir. Stok ve çalışma primer serileri 5 mM pH 7.5 Tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanarak eşit kısımlar halinde (20'şer µL hacimlerde) derin dondurucuda saklandı.

#### 4.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Hasta ve kontrollerden elde edilen DNA örnekleri PCR (76) ile çoğaltıldı. PCR koşulları Forsberg ve arkadaşlarınca tariflenen protokole göre belirlendi (70). PCR optimizasyonundan sonra protokol laboratuvar şartlarımıza göre yeniden oluşturuldu. Buna göre; PCR işleminin birinci aşaması çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 5 dakika 95°C’de gerçekleştirildi. PCR işleminin ikinci aşaması 94°C’de 45 saniye denatürasyon (melting), 66°C’de 45 saniye bağlanma (annealing) ve 72°C’de 1 dakika uzatma (extention) olmak üzere 27 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Bu tür çalışmalar için yapılan bütün PCR analizleri kalitatif amaçlı olarak yapıldığında ikinci segmentin siklus sayısı rutin olarak 27 olarak belirlendi. Üçüncü aşama olan en son siklustaki uzatma periyodu 72°C’de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C’ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR amplikonları agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Genel olarak total PCR ürününün % 40’ı agaroz jel elektroforezine koşuldu. Agaroz jelin yüzdesi DNA fragmentlerinin beklenen hacimlerine göre belirlendi. PCR ürünleri daha ileri analizler veya tekrarlar için -20°C’de saklandı.

Çoğaltılan 359 bp’lik GPX1 gen bölgesine ait detaylı bilgiler Şekil 2’de verilmiştir. *Taq* polimerazın bulunduğu ortamda her bir primerden 20 pmol kullanıldı. Sense ve antisense primerler, 1.25 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 2 mM dNTP (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl ve 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu (10X buffer) içeren master miks solusyonu (30 µL), 20 µL su içinde 50 ng DNA içeren 0.2 mL’lik tüplere eklendi (reaksiyon hacmi 50:1 olarak belirlendi).

##### 4.6.1. PCR optimizasyonu

Bu metotla yapılan PCR denemelerinde en uygun sonuç alınamayınca bağlanma ısısında bazı değişiklikler yapılarak en uygun ürün elde edildi. İlgili çalışmada önerilen 57 °C’de yapılan PCR’da elde edilen ürünlerin % 2’lik agaroz jelde yürütülmesi sonucunda non-

spesifik bantların oluşumu görüldü. 58, 60, 62, 64 ve 66 °C bağlanma ısılarında 5 ayrı PCR kurularak en uygun bağlanma derecesi 66 °C olarak tespit edildi. Primer kullanımında en iyi sonucu alabilmek için 5, 10, 20 ve 50 pmol oranlarında primer kullanıldı. En uygun sonucun 20 pmol olduğu belirlendi.

---

```
.....TTCC CTCAAGTACG TCCG[GCCTGG TGGTGGGTTT GAGCCCAACT TCATGCTCTT
CGAGAAGTGC GAGGTGAACG GTGCGGGGGC GCACCCTCTC TTCGCCTTCC TGCGGGAGGC
CCTGCCAGCT CCCAGCGACG ACGCCACCGC GCTTATGACC GACCCCAAGC TCATCACCTG
GTCTCCGGTG TGTCGCAACG ATGTTGCCTG GAACTTTGAG AAGTTCCTGG TGGGCCCTGA
CGGTGTGCC CTACGCAGGT ACAGCCGCCG CTTCCAGACC ATTGACATCG AGCCTGACAT
CGAAGCCCTG CTGTCTCAAG GGCCCAGCTG TGCCTAGGGC GCCCCTCCTA CCCC GGCTGC
T
TTGGCAGTTG CAGTGCTGCT GTC]TCGGGG GGTTCATC TATGAGGGTG TT.....
```

---

**Şekil 2:** GPX1 geninin PCR reaksiyonunda üretilen 359 bp'lik bölgesi ile bu bölgenin üretilmesini sağlayan primerler, restriksiyon enzimi *Dde I* in tanıma sekansı, bu enzimin kesim noktası ile 593. baz çiftinde meydana gelebilecek C-T konversiyonunun kesime etkisinin şematik olarak gösterimi. Köşeli parantezlerin arasında normal yazı stili ile yazılan kısım PCR ile çoğaltılan 359 bp'lik bölgeyi belirtmektedir, köşeli parantezin dışında kalan italik yazı stili ile gösterilen bölge ise ilgili bölgenin öncesinde ve sonrasında devam eden nükleotid dizisinin bir kısmını göstermektedir. Gri renk ile taralı alan forward ve reverse primerleri, altı çizili bölge restriksiyon enzimi olan *Dde I* in tanıma sekansını (bu bölgenin ikinci nükleotidi olan C (yıldız ile işaretlenmiş) polimorfik nükleotidi göstermektedir.

#### 4.7. Restriksiyon enzimi ve PCR ürünün sindirimi

GPX1 enzimini kodlayan genin PCR ile çoğaltılmasıyla elde edilen ürününün ilgili bölgesinin kesimi için *Desulfovibrio desulfuricans* bakterisinden elde edilen *DdeI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. Bu enzimin kesme sekansı aşağıda gösterildiği gibidir:

5' ...C<sup>^</sup>TNAG... 3'

3' ...GANT<sup>^</sup>C... 5'

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarının DNA'ları *Dde I* restriksiyon enzimi ile sindirildi. Genel kural olarak her µg DNA için 1 ünite enzim kullanıldı. *Dde I*

enziminin ünite tarifi, 37 °C'de 1 saatte 50 µL hacmindeki deney ortamında 1 µg DNA'yı tamamen sindirmek için gerekli olan enzim miktarı şeklindedir. Enzim ve gerekli tamponlar Fermentas firmasından (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) sağlandı. İnkübasyon sıcaklığı üretici firmanın önerisi göz önüne alınarak 37 °C, inkübasyon zamanı ise 8 saat olarak belirlendi. Üretici firmanın önerisiyle 10 µl PCR ürünü üzerine 1.2 µl *Dde I* restriksiyon enzimi ve enzimle birlikte verilen 10X tampondan 2 µl eklenerek belirlenen inkübasyon süresince 37 °C'deki benmaride bekletildi. Hazırlanan % 2'lik agaroz jelde yürütülen kesim ürünleri UV ışık altında görüntülendi.

#### **4.8. Kullanılan DNA marker'i**

Deneylerde Bio Basic Inc. (Ontario, Kanada) firmasından alınan 100 bp DNA markeri kullanıldı. Bu marker 100 bp'den başlayarak 11 adet bant içermektedir. Agaroz jel elektroforezinde kullanılmak üzere marker DNA'dan 5 µl alınıp üzerine 75 µl distile su, 10 µl yükleme tamponu eklendikten sonra 65 °C'de 5 dakika bekletildi ve buz içinde aniden soğutulularak kullanıldı. Jele yüklenirken 5 µl olarak yüklendi.

#### **4.9. Agaroz jel elektroforezi**

Restriksiyon enzimi ile sindirilen PCR ürünleri hazırlanan % 2'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz, Prona firmasından satın alındı (Prona, İspanya). Yürütme tamponu olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu (0.5X) kullanıldı. Bu tamponun stok şekli olan 5X tampon şu şekilde hazırlandı: 54 g TRIS-base, 27.5 gr borik asit, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8) bir miktar distile su içinde çözülerek 1 L'ye tamamlandı. Jel elektroforezini yapmak için Horizontal tipte jel elektroforez sistemi kullanıldı (Electrophoresis box, Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium). UV ışığında DNA fragmanlarını görmek için Ethidium bromide (EtBr) floresan boyası kullanıldı. Her 100 mL 0.5X TBE tamponu için, 5 µL hacimde, konsantrasyonu 10 mg/mL olan EtBr ilave edildi (Jeldeki ve koşma tamponundaki final EtBr konsantrasyonu 0.5 µg/ml olarak belirlendi). Jel üzerindeki



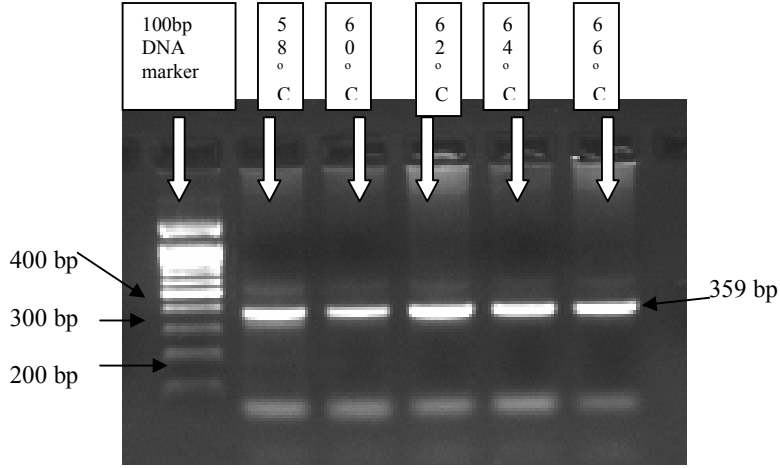
kuyucuklara DNA'nın aplikasyonu için yükleme tamponu kullanıldı (%15 ficoll, %0.25 BPB [brom phenol blue], %0.25 XC [xylene cyanole] bir miktar distile su içinde çözülerek 100 ml'ye tamamlandı, 3'er ml'lik hacimlere ayrılarak deneylerde kullanıldı). Bu yükleme tamponunun oranı, jele yüklenecek PCR ürününün % 10'unu geçmeyecek şekilde ayarlandı. Bunun için sindirim yapılmış DNA ürününe (total 25 µL) 2.5 µL boyalı tampon ilave edildi. DNA'lar jellere yüklenirken, beklenen bantların boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla aynı jel üzerine Promega firmasından (Madison, WI, USA) alınan 100 bp DNA marker'i de yüklendi. Jeller, oda sıcaklığında 60 V ve 25 mA sabit akımda yürütüldü. 2 saatlik yürütmeden sonra jeller UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı.

#### **4.10. İstatistiksel analizler**

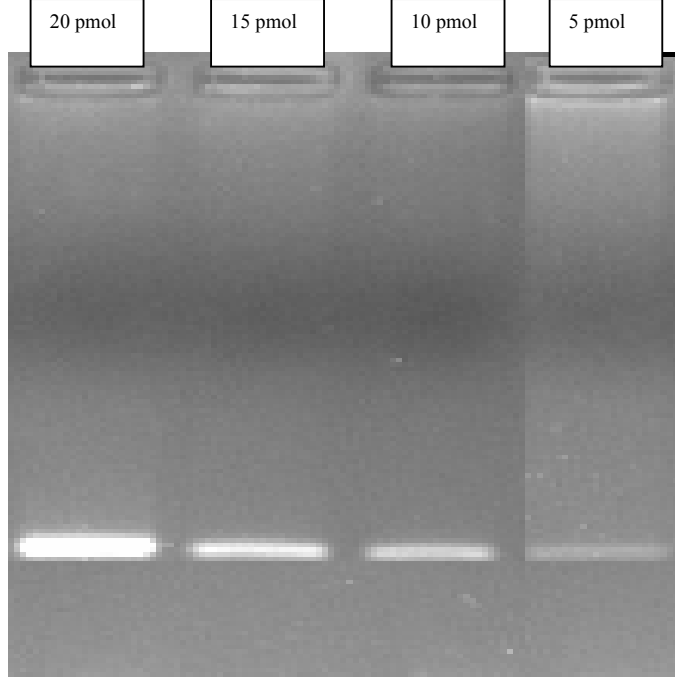
Genetik dağılımın Hardy-Weinberg dengesine uyumu  $X^2$  goodness-of-fit testi ile analiz edildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları Ki-kare veya Fisher's exact test ile değerlendirildi. Kontrol ve hastalar arasındaki allelik dağılım farklılıkları Fisher's exact test ile değerlendirildi. Hastaların demografik özelliklerindeki farklılıklar (yaş, cinsiyet) her 3 GPX1 genotipi göz önüne alınarak tek yönlü varyans analizi (one-way analysis of variance (ANOVA)) ile belirlendi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Bütün istatistiksel testler "SPSS® for Windows computing program, Version 11.0" ile gerçekleştirildi.

## 5. BULGULAR

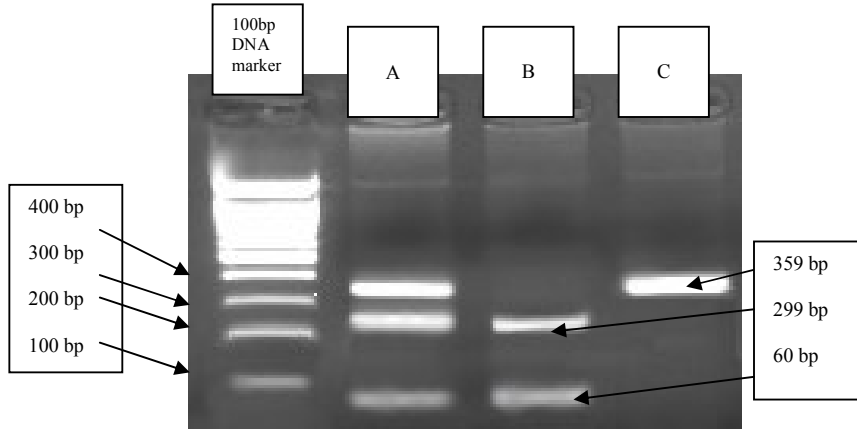
En iyi PCR şartlarını belirlemek için 58, 60, 62, 64, 66 °C bağlanma derecesi ile yapılan deneyler sonucunda 66 °C'nin en uygun bağlanma sıcaklığı olduğu saptandı (Şekil 3). 66 °C'nin yeterli bant kalitesine sahip olması ve sıcaklık yükseldikçe bant kalitesinin giderek düşmesi nedeniyle daha yüksek sıcaklıklar denenmedi. En uygun primer miktarının 20 pmol olduğu belirlendi (Şekil 4). Polimorfik nükleotidin (şekil 2) Sitozin (C) olması halinde, *Dde I* enziminin kesecek bir bölgesi bulunmadığından agaroz jel elektroforezinin görüntülenmesi ile 359 bp uzunluğunda tek bir bant, Timin (T) olması durumunda *Dde I* ile kesim gerçekleştiğinden 299 bp ve 60 bp uzunluğunda iki bant görüldü (şekil 5).



**Şekil 3:** Farklı bağlanma dereceleriyle yapılan PCR optimizasyonuna ait agaroz jel görüntüsü. Beklenen bantlar dışında herhangi bir bantın bulunmaması, en iyi bağlanmanın 66°C'de olduğunu gösterdi.



**Şekil 4:** Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe etkisi.



**Şekil 5:** *Dde I* ile kesilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. Birey A, CT genotipi, Birey B, TT ve Birey C ise CC genotipini göstermektedir.

Hasta ve kontrol grubundaki bireylere ait GPX1 genlerindeki 593. pozisyondaki C\T değişimi ile ortaya çıkan pro197leu polimorfizminin değerleri Tablo 6'da belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta grubunda Pro\Pro veya C\C genotipi 48 bireyde (%48), Pro\Leu veya C\T genotipi 43 bireyde (%43) ve Leu\Leu veya T\T genotipi 9 bireyde (%9) tespit edilmiştir. Kontrol grubu genotipler açısından incelendiğinde; Pro\Pro veya C\C genotipi 57 bireyde (%57), Pro\Leu veya C\T genotipi 34 bireyde (%34) ve Leu\Leu veya T\T genotipi 9 bireyde (%9) olarak tespit edilmiştir. Her bir genotip, hasta ve kontrol arasında karşılaştırıldığında farklılığın anlamlı olmadığı tespit edildi ( $X^2= 1.823$ ,  $p>0.05$ ). Ayrıca allel sıklıkları incelendiğinde; pro197 allelinin frekansı hasta grubunda 0.695 ve kontrol grubunda 0.740 olarak, leu197 allelinin frekansı ise hasta grubunda 0.305 ve kontrol grubunda 0.260 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları arasında allel sıklıkları açısından herhangi bir anlamlı farklılık tespit edilemedi (Tablo 6).

Şizofreni hastalığına sahip bireylerin oluşturduğu grupta kadınlar ve erkekler arasında genotipler ve allel frekansları açısından anlamlı bir farklılık saptanamadı ( $X^2= 1.588$ ,  $p>0.05$ ) (Tablo 7). Hasta kadınlar için genotip frekansları şu şekilde saptanmıştır. Pro\Pro veya C\C genotipi 19 bireyde (%41), Pro\Leu veya C\T genotipi 22 bireyde (%48) ve Leu\Leu veya T\T genotipi 5 bireyde (%11) tespit edilmiştir. Hasta erkekler genotipler açısından incelendiğinde ise; Pro\Pro veya C\C genotipi 29 bireyde (%54), Pro\Leu veya C\T genotipi 21 bireyde (%39) ve Leu\Leu veya T\T genotipi 4 bireyde (%7) olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 6.** Hastalar ve kontrollerdeki Pro197Leu polimorfizminin genotipi ve allel sıklıkları

Gruplar	GPXI genotipi [n (f)] <sup>a</sup>			GPXI allel frekansları <sup>b</sup>			
	n	Pro/Pro	Pro/Leu	Leu/Leu	n	Pro197	Leu197
Sizofreni Hasta	100	48 (0.48)	43 (0.43)	9 (0.09)	200	0.695	0.305
95% GA <sup>c</sup>		(0.382- 0.578)	(0.333-0.527)	(0.034- 0.146)		(0.631-0.759)	(0.241-0.369)
H-W eş. <sup>d</sup>		0.483	0.424	0.093			
Kontrol	100	57 (0.57)	34 (0.34)	9 (0.09)	200	0.740	0.260
95% GA		(0.473- 0.667)	(0.247-0.433)	(0.034- 0.146)		(0.679-0.801)	(0.199-0.321)
H-W eş.		0.548	0.385	0.068			

<sup>a</sup> hasta ve kontrol arasında genotip farklılıkları anlamlı olarak saptanamadı. ( $X^2 = 1.823$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.402$ ).

<sup>b</sup> hasta ve kontrol bireyleri arasında allel frekansları açısından farklılık saptanamadı. ( $X^2 = 0.999$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.318$ ).

<sup>c</sup> %95 güvenlik aralığı

<sup>d</sup> Hardy- Weinberg eşitliği. Kontrol ve hastaların genotipik dağılımları Hardy Weinberg dengesi içindedir.

**Tablo 7.** Hasta grubunda cinsiyet farklılıklarına göre Pro197Leu polimorfizminin genotipi ve allel sıklıkları

Cinsiyet	GPXI genotipi [n (f)] <sup>a</sup>			GPXI allel frekansları <sup>b</sup>			
	n	Pro/Pro	Pro/Leu	Leu/Leu	n	Pro197	Leu197
Erkek	54	29 (0.537)	21 (0.389)	4 (0.074)	108	0.731	0.269
95%GA <sup>c</sup>		(0.404- 0.670)	(0.259-0.519)	(0.004- 0.144)		(0.648-0.815)	(0.185-0.352)
H-W eş. <sup>d</sup>		0.535	0.393	0.072			
Kadın	46	19 (0.413)	22 (0.478)	5 (0.109)	92	0.652	0.348
95% GA		(0.271- 0.555)	(0.334-0.623)	(0.019- 0.199)		(0.555-0.749)	(0.251-0.445)
H-W eş.		0.425	0.454	0.121			

<sup>a</sup>Erkek ve kadınlar arasında anlamlı genotip farklılıkları saptanamadı. ( $X^2 = 1.588$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.452$ ).

<sup>b</sup>Erkek ve kadınlar arasında allel frekansları açısından farklılık saptanamadı. ( $X^2 = 1.474$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.225$ ).

<sup>c</sup>%95 güvenlik aralığı

<sup>d</sup>Erkek ve kadınların genotipik dağılımları Hardy Weinberg dengesi içindedir.

## 6. TARTIŞMA

Şizofreni hastalığı toplumda diğer birçok nöropsikiyatrik hastalık ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek sıklıkta görülen bir hastalık olmakla birlikte etyopatolojisi henüz tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. Bu konu ile ilgili olarak nörotransmitterlerin sentezlenip salgılanmasındaki anormallikler başta olmak üzere birçok kimyasal, fizyolojik, farmakolojik ve genetik hipotez öne sürülmüştür. Genetik hipotezler, monoamin metabolizmasına ait enzimler ile ilgili hipotezler, noradrenerjik disfonksiyona dair hipotezler, serotonerjik disfonksiyona ait hipotezler, aminoasitler, prostaglandinler, büyüme hormonu ve viral-immün hipotezler başta olmak üzere birçok hipotez ileri sürülmüş ve bunlara ait oldukça fazla sayıda araştırma yapılmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi bunların hiçbiri hastalığın etyopatogenetik sebebi olarak tek başına sorumlu tutulamamış, kombine olarak düşünülen mekanizmalar bile tam anlamıyla güvenli bir şekilde ortaya konulamamıştır (28). Bilinen mekanizmaların bir kısmı ise tamamen tedavide kullanılan ilaçların etkinliğine bağlı olarak ortaya atılmıştır. Ancak şizofreni hastalarında oksidan\antioksidan sistemde meydana gelen dengesizliklerin şizofreni etyopatogenezinde önemli rol oynadıkları hipotezi bu çalışmanın ana fikri olmuştur.

Bu çalışmanın planlanmasında göz önüne alınan teori ve hipotez tamamen şizofreni hastalarında oksidatif stresin artması üzerine kurulmuştur. Yapılan birçok klinik çalışmada daha önce de belirtildiği gibi şizofreni hastalarının kan, eritrosit, beyin dokusu, BOS gibi biyolojik materyallerinde bir taraftan oksidatif stresin arttığı bulunurken diğer taraftan antioksidan savunma sisteminin azaldığı bulunmuştur (77). Oksidan/antioksidan sistemlerdeki bu düzensizlikler yalnız başına düşünüldüklerinde herhangi bir anlamı olmayabilir ama merkezi sinir sisteminde sebep olacakları ikincil değişiklikler bazı psikiyatrik semptomların ortaya çıkışını izah edebilir.

Bu çalışmada şizofreni hastalarında vücuttaki en önemli antioksidan enzimlerden biri olan GPX1 enziminin Pro197Leu polimorfizmi, sağlıklı kontrol bireyleri ile karşılaştırılmalı olarak

araştırıldı. Elde edilen verilere göre, 100 bireyden oluşan hasta grubunda Pro\Pro genotipi 48 bireyde, Pro\Leu genotipi 43 bireyde ve Leu\Leu 9 bireyde tespit edilmiştir. Yine 100 kişiden oluşan kontrol grubunda ise Pro\Pro genotipi 57 bireyde, Pro\Leu genotipi 34 bireyde ve Leu\Leu genotipi 9 bireyde olarak tespit edilmiştir. Bu verilerle, hasta ve kontroller arasında genotipler karşılaştırıldığında farklılığın anlamlı olmadığı saptandı. Hasta ve kontrol grubundaki bireylere ait genotip frekanları Hardy-Weinberg eşitliği içinde saptanmıştır. Allel sıklıkları incelendiğinde; pro197 allelinin frekansı hasta grubunda 0.695 ve kontrol grubunda 0.740 olarak, leu197 allelinin frekansı ise hasta grubunda 0.305 ve kontrol grubunda 0.260 olarak bulundu. Allel sıklıkları açısından hasta ve kontrol grubu bireyleri arasında rakamsal olarak farklılıklar saptansa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamsızdı. Hasta grubu 54 erkek ve 46 kadın bireyden oluşmuştur. 54 erkek hastadan 29'u Pro\Pro, 21'i Pro\Leu ve 4'ünün Leu\Leu genotipini taşıdığı saptandı. 46 kadın hastanın ise 19'u Pro\Pro, 22'si Pro\Leu ve 5'inin Leu\Leu genotipini taşıdığı saptandı. Allel sıklıklarında ise pro197 allelinin frekansı erkeklerde 0.731, kadınlarda 0.652 ve leu197 allelinin frekansı erkeklerde 0.269 kadınlarda ise 0.348 olarak tespit edildi. Erkek ve kadınlarda GPX1 allel sıklıkları açısından ortaya çıkan farklılıklarda istatistiksel anlamlılık saptanamadı. Şizofreni hastalığının başlangıç yaşı, klinik belirtiler, kişiler üzerindeki negatif etkiler açısından cinsiyetler arasında farklılıklar gösterdiği bilinmektedir (4). Bu farklılıklara GPX1 allelinin katkısının bulunmadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, GPX1 pro197leu polimorfizminin şizofreni etyopatogenezinde herhangi bir rol oynamadığını göstermektedir. Ancak şizofreni etyopatogenezinde oksidatif stresle oluşan membran hasarının önemli rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif stres kimi zaman daha önce belirtildiği şekilde oksidan maddelerin artmasıyla ortaya çıkarken kimi zaman da, içinde glutasyon peroksidazın da bulunduğu bazı antioksidan sistem üyelerinin seviyesinde azalmalarla ortaya çıkmaktadır (53).



İnsan GPX1 geninde bildirilen pro197leu polimorfizminin enzim aktivitesiyle ilişkili olmadığı, nadir allellerinde normal enzim aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (70). Ancak bu polimorfik durumların fonksiyonel ve yapısal önemleri tam olarak gün ışığına çıkarılamamıştır. Bu polimorfizmin neden olduğu fonksiyonel ve yapısal sonuçlar tam olarak bilinemese de yapılan çalışmalar sonucunda akciğer (75) ve meme kanserinde risk artışı (25), mesane kanseri tekrarlama riskinin artışı (17) ile ilişkili bulunmuştur. Bu ilişkinin muhtemel nedeni olarak bir imino asit olan prolinin lösin amino asidiyle yer değiştirmesinin, GPX1 proteininin ikincil ve üçüncül yapılarında değişikliğe neden olması gösterilmiştir (78). Çünkü  $\alpha$  karbonunda eşlenmemiş serbest amino grubu olmayan tek amino asit prolindir ve bu özelliği nedeniyle peptitlerin ikincil yapısında bükülme oluşturabilen tek amino asittir (78).

Bir başka antioksidan sistem üyesi olan Mn-SOD genindeki ala-9val polimorfizminin şizofreni etyopatogenezinde rol aldığı bildirilmiştir (79). Ancak diğer antioksidan enzimleri kodlayan genlere ait polimorfizmler henüz çalışılmamıştır. Bu çalışmanın planlandığı dönemde henüz yapılmamış olan fakat 2004 yılında japon şizofreni hastalarıyla yapılan bir araştırmada (80) GPX1 gen polimorfizmi ile şizofreni arasında bir ilişki saptanamamıştır. Bizim çalışmamız da bu sonucu doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, çalışma verilerimize göre GPX1 geninin pro197leu polimorfizmi en azından bizim toplumumuz için şizofreniye yatkınlık oluşturmamaktadır. Akyol ve arkadaşlarının (79) yaptıkları Mn-SOD enzimi ile ilgili polimorfizmin şizofreni ile ilişkili olması, biyokimyasal çalışmalarda şizofreni hasta ve kontrol grupları arasında enzim düzeyleri açısından farklılıklar olması, antioksidan sisteminin diğer üyeleri olan CAT, glutatyon redüktaz ve diğer SOD izoenzimleri olan Cu,Zn-SOD ve EC-SOD gibi enzimlerin de polimorfik durumlar açısından araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. GPX1 geniyle yapılan bu çalışmanın sonucunda olumlu bir sonuca ulaşılmamış olması GPX ve diğer antioksidan sistem enzimlerle ilgili olarak yapılacak çalışmaları etkilememelidir. Ayrıca bu çalışma, araştırmacılar tarafından

hasta ve kontrol grubu bireylerinin sayıları artırılarak ve bunun yanına enzim aktivite ölçümleri de eklenerek yeniden çalışılmalıdır. Çünkü toplumda yaygın olan, ülkeye maddi ve manevi yönden büyük yükler getiren bu hastalığın sağaltılmasına yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi ve etyopatogenezinin tam olarak aydınlatılabilmesi açısından genetik polimorfizm çalışmaları oldukça büyük önem arz etmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Austin J. Schizophrenia: an update and review. *J Genet Couns* 2005;14(5):329-40.
2. Sadock BJ, Sadock VA. *Klinik Psikiyatri*. 2. ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 2005.
3. Turner T. ABC of mental health. Schizophrenia. *Bmj* 1997;315(7100):108-11.
4. Leung A, Chue P. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 2000;401:3-38.
5. Beratis S, Gabriel J, Hoidas S. Gender differences in the frequency of schizophrenic subtypes in unselected hospitalized patients. *Schizophr Res* 1997;23(3):239-44.
6. Stevens JR. Schizophrenia: reproductive hormones and the brain. *Am J Psychiatry* 2002;159(5):713-9.
7. Brown JS, Jr. Geographic correlation of schizophrenia to ticks and tick-borne encephalitis. *Schizophr Bull* 1994;20(4):755-75.
8. Adebimpe VR, Chu CC, Klein HE, Lange MH. Racial and geographic differences in the psychopathology of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1982;139(7):888-91.
9. Yolken R. Viruses and schizophrenia: a focus on herpes simplex virus. *Herpes* 2004;11 Suppl 2:83A-88A.
10. Jordaan E, Niehaus DJ, Koen L, Sellar C, Mbanga I, Emsley RA. Season of birth, age and negative symptoms in a Xhosa schizophrenia sample from the Southern Hemisphere. *Aust N Z J Psychiatry* 2006;40(8):698-703.
11. Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry* 2002;159(7):1080-92.
12. Barrio C. Culture and schizophrenia: a cross-ethnic growth curve analysis. *J Nerv Ment Dis* 2001;189(10):676-84.

13. Dickerson FB, Tenhula WN, Green-Paden LD. The token economy for schizophrenia: review of the literature and recommendations for future research. *Schizophr Res* 2005;75(2-3):405-16.
14. Berry N, Jobanputra V, Pal H. Molecular genetics of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci* 2003;28(6):415-29.
15. Ebert MH, Loosen PT, Nurcombe B. *Current Psikiyatri*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003.
16. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 25 ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
17. Zhao H, Liang D, Grossman HB, Wu X. Glutathione peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology* 2005;66(4):769-74.
18. Irmak MK, Fadillioglu E, Gulec M, Erdogan H, Yagmurca M, Akyol O. Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochem Funct* 2002;20(4):279-83.
19. Greene EL, Paller MS. Oxygen free radicals in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1991;17(2):124-32.
20. Chung HY, Kim HJ, Shim KH, Kim KW. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev* 1999;111(2-3):97-106.
21. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552(Pt 2):335-44.
22. Mahadik SP, Scheffer RE. Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55(1-2):45-54.
23. Sardesai VM. Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract* 1995;10(1):19-25.

24. Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 2005;126(3):365-79.
25. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis* 2006;27(4):820-5.
26. Oakley AJ. Glutathione transferases: new functions. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15(6):716-23.
27. Awasthi YC, Dao DD, Lal AK, Srivastava SK. Purification and properties of glutathione peroxidase from human placenta. *Biochem J* 1979;177(2):471-6.
28. Akyol O. Şizofreni Hastalarında Mn-SOD polimorfizminin araştırılması. Doktora Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi; 2003.
29. Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* 2001;389(1):84-93.
30. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Hoekstra WG. Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. *J Nutr* 1972;102(5):689-96.
31. Flohe L, Loschen G, Gunzler WA, Eichele E. Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1972;353(6):987-99.
32. Sunde RA, Evenson JK. Serine incorporation into the selenocysteine moiety of glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1987;262(2):933-7.
33. Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, et al. Selenoprotein gene expression during selenium-repletion of selenium-deficient rats. *Biol Trace Elem Res* 1996;51(3):211-23.

34. Cheng WH, Combs GF, Jr., Lei XG. Knockout of cellular glutathione peroxidase affects selenium-dependent parameters similarly in mice fed adequate and excessive dietary selenium. *Biofactors* 1998;7(4):311-21.
35. Wijnen LM, Monteba-van Heuvel M, Pearson PL, Meera Khan P. Assignment of a gene for glutathione peroxidase (GPX1) to human chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 1978;22(1-6):232-5.
36. Johannsmann R, Hellkuhl B, Grzeschik KH. Regional mapping of human chromosome 3. Assignment of a glutathione peroxidase-1 gene to 3p13 leads to 3q12. *Hum Genet* 1981;56(3):361-3.
37. McBride OW, Mitchell A, Lee BJ, Mullenbach G, Hatfield D. Gene for selenium-dependent glutathione peroxidase maps to human chromosomes 3, 21 and X. *Biofactors* 1988;1(4):285-92.
38. Kiss C, Li J, Szeles A, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Lushnikova T, et al. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79(3-4):228-30.
39. Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *Embo J* 1986;5(6):1221-7.
40. Ishida K, Morino T, Takagi K, Sukenaga Y. Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res* 1987;15(23):10051.
41. Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Low yield of polymorphisms from EST blast searching: analysis of genes related to oxidative stress and verification of the P197L polymorphism in GPX1. *Hum Mutat* 1999;13(4):294-300.
42. Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-

media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2004;53(9):2455-60.

43. Kleinveld HA, Swaak AJ, Hack CE, Koster JF. Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. *Scand J Rheumatol* 1989;18(6):341-52.

44. Choi BH. Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. *Yonsei Med J* 1993;34(1):1-10.

45. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222(3):236-45.

46. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257(5074):1220-4.

47. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 2002;33(5):611-9.

48. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *Apmis* 1998;106(2):265-76.

49. Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(7):631-41.

50. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827(1):65-75.

51. Hattori N, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991;30(4):563-71.

52. Kedziora J, Bartosz G. Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 1988;4(5):317-30.

53. Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 2002;20(2):171-5.
54. Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Tunckol H, Ustundag B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 2002;46(1):27-32.
55. Horrobin DF, Manku MS, Hillman H, Iain A, Glen M. Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. *Biol Psychiatry* 1991;30(8):795-805.
56. Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000;47(1):8-21.
57. Gattaz WF, Schmitt A, Maras A. Increased platelet phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Schizophr Res* 1995;16(1):1-6.
58. Merikangas KR, Risch N. Will the genomics revolution revolutionize psychiatry? *Am J Psychiatry* 2003;160(4):625-35.
59. Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ. Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest* 2005;115(6):1440-8.
60. Kunugi H, Lee KB, Nanko S. Cytogenetic findings in 250 schizophrenics: evidence confirming an excess of the X chromosome aneuploidies and pericentric inversion of chromosome 9. *Schizophr Res* 1999;40(1):43-7.
61. Toyota T, Shimizu H, Yamada K, Yoshitsugu K, Meerabux J, Hattori E, et al. Karyotype analysis of 161 unrelated schizophrenics: no increased rates of X chromosome mosaicism or inv(9), using ethnically matched and age-stratified controls. *Schizophr Res* 2001;52(3):171-9.
62. DeLisi LE, Friedrich U, Wahlstrom J, Boccio-Smith A, Forsman A, Eklund K, et al. Schizophrenia and sex chromosome anomalies. *Schizophr Bull* 1994;20(3):495-505.



63. Demirhan O, Tastemir D. Chromosome aberrations in a schizophrenia population. *Schizophr Res* 2003;65(1):1-7.
64. Li T, Ball D, Zhao J, Murray RM, Liu X, Sham PC, et al. Family-based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. *Mol Psychiatry* 2000;5(1):77-84.
65. Mowry BJ, Holmans PA, Pulver AE, Gejman PV, Riley B, Williams NM, et al. Multicenter linkage study of schizophrenia loci on chromosome 22q. *Mol Psychiatry* 2004;9(8):784-95.
66. Levinson DF. Molecular genetics of schizophrenia: a review of the recent literature. *Curr Opin Psychiatry* 2003;16:157-170.
67. Akin H. Tıbbi genetik terimleri sözlüğü. *Sendrom III* 2003;1(1):17.
68. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234(2):177-86.
69. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998;8(12):1229-31.
70. Forsberg L, de Faire U, Marklun SL, Andersson PM, Stegmayr B, Morgenstern R. Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. *Blood cells mol dis* 2000;26(5):423-426.
71. Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(12):6917-22.
72. Vaquero Lorenzo C, Baca-Garcia E, Diaz-Hernandez M, Botillo-Martin C, Perez-Rodriguez MM, Fernandez-Ramos C, et al. Association between the T102C polymorphism of the serotonin-2A receptor gene and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30(6):1136-8.

73. Lung FW, Chen N, Shu BC. Dopamine D4 receptor gene and the -521C>T polymorphism of the upstream region of the dopamine D4 receptor gene in schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2006;16(4):139-43.
74. Prasad S, Semwal P, Deshpande S, Bhatia T, Nimgaonkar VL, Thelma BK. Molecular genetics of schizophrenia: past, present and future. *J Biosci* 2002;27(1 Suppl 1):35-52.
75. Raaschou-Nielsen O, Sorensen M, Hansen RD, Frederiksen K, Tjonneland A, Overvad K, et al. GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Lett* 2006.
76. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
77. Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26(5):995-1005.
78. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* 2000;60(22):6381-3.
79. Akyol O, Yanik M, Elyas H, Namli M, Canatan H, Akin H, et al. Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(1):123-31.
80. Shinkai T, De Luca V, Zai G, Shaikh S, Matsumoto C, Arnold PD, et al. No association between the Pro197Leu polymorphism in the glutathione peroxidase (GPX1) gene and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2004;14(3):177-80.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

29.10.1976 tarihinde Malatya'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Malatya'da tamamladım. 1993 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi (İngilizce)'ni kazandım. 2000 yılında aynı fakülteden mezun oldum. Aynı yıl SSK Malatya Bölge Hastanesi'nde pratisyen hekimlik görevine başladım. 2002 eylül TUS sınavında Tıbbi Genetik uzmanlığını kazanarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda asistanlık görevine başladım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi kadrosuyla çalışmaktayım. İngilizce bilmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.