

142144

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RUH SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ŞİZOFRENİ HASTALARINDA SEROTONİN
TAŞIYICI GEN POLİMORFİZMİ

Dr. Fatma ÇOKER

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI:
Prof.Dr. Orhan DOĞAN

SİVAS

2004

C. Ü. TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

**İşbu çalışma, jürimiz tarafından Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda
TIPTA UZMANLIK TEZİ OLARAK kabul edilmiştir.**

BAŞKAN : Prof. Dr. Orhan DOĞAN

ÜYE : Prof. Dr. Saniye TOPÇU

ÜYE : Doç. Dr. Aytekin AKYÜZ

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Gamze AKYÜZ

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Nesim KUĞU

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

28 / 05 / 2004

DEKAN

Prof. Dr. Reyhan EĞİLMEZ



Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun 05.05.2004 tarih ve 2004/1 sayılı kararı ve Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü'nün 28.03.2002 tarih ve 463 sayılı yazısı ile uygun görülen “ Tez Yazım Kılavuzu'na”göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel gelişmemde en büyük paya sahip, her türlü konuda yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Orhan DOĞAN’a teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Gamze AKYÜZ ve Yrd.Doç.Dr. Nesim KUĞU’ya uzmanlık eğitimim boyunca yaptıkları akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan Sayın Doç.Dr. Öztürk ÖZDEMİR ve CÜTFAM çalışanlarına, tezin yapım aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof.Dr. M. Emin ERDAL ve Mersin Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına, çalışmam sırasında fikirleri ve her türlü destekleriyle katkıda bulunan Uzm.Dr. E. Erdal ERŞAN, hasta ve kontrol grubunun kan örneklerinin toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı anabilim dalımızda görevli mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da beni sürekli manevi açıdan destekleyen aileme sonsuz teşekkürler.

ÖZET

ŞİZOFRENİ HASTALARINDA SEROTONİN TAŞIYICI GEN POLİMORFİZMİ

Şizofreni genetik temeli olan, genellikle ergenlik çağında başlayan, yaşam boyu yaygınlığı %1 olan, kronik seyirli, sanrı ve varsanılarla karakterize olan bir bozukluktur. Aile, ikiz ve evlat edinme çalışmaları hastalığın genetik etiyolojisini desteklemektedir.

Nörotransmitterlerin monoaminerjik grubu, bunların reseptörleri, geri alım genleri şizofreni patogeneğinde rol oynamaktadır.

Serotonin davranışlar, uyku, mizaç, varsanı ve depresyon gibi durumlardan sorumlu bir nörotransmitterdir. Serotonin taşıyıcı gen polimorfik yapıda olup, serotonin taşınmasındaki rolü nedeniyle psikiyatrik bozuklukların etiyolojisinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir.

Bu çalışmada şizofreni hastalarında serotonin taşıyıcı genin transkripsiyonel kontrol bölgesindeki“değişken sayıda ardışık tekrar” (Variable Number of Tandem Repeats:VNTR) ve 5-HTT Gene-linked Polimorphic Region (5-HTTLPR) varyantlarının polimorfizmi araştırıldı. Çalışmaya DSM-IV tanı kriterlerine göre tanısı konmuş 55 şizofreni hastası ve 32 sağlıklı gönüllü kontrol alındı. Hasta ve kontrol bireylerinden alınan kanlardan tuz çöktürme yöntemine göre DNA’lar elde edildi. Serotonin taşıyıcı geni polimorfizminin alelleri polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle belirlendi. Serotonin taşıyıcı geni intron 2 VNTR polimorfizmine göre 12/12, 12/10, 10/10, 12/9 genotiplerinin hastalardaki dağılımı sırası ile %47.3, %47.3, %3.6, %1.8; kontrol bireylerinde ise %46.9, %46.9, %6.3 olarak belirlendi. 5-HTTLPR polimorfizmine göre L/L, L/S ve S/S genotiplerinin hastalardaki dağılımı sırası ile %30.9, %41.8, %27.3; kontrol gruplarındaki dağılımı ise %28.1, %50.0, %21.9 olarak belirlendi. SERT geni polimorfizmine ait genotip dağılımı hasta ve kontrol bireyleri arasında kısmen farklılık göstermesine karşın, bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, şizofreni hastalığının etiyolojisinde rol alabilecek çeşitli risk etkenleri ve diğer genlerle birlikte yapılacak bir çalışma ile sağlıklı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca örnek sayısı artırılarak serotonin taşıyıcı gen polimorfizmi ile diğer nörotransmitter genlerine ait polimorfizmlerin şizofreni üzerine etkileri araştırılmalıdır.

Anahtar sözcükler: Şizofreni, serotonin taşıyıcı gen, VNTR, HTTLPR, polimorfizm.

ABSTRACT

SEROTONIN TRANSPORTER GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIC DISORDERS

Schizophrenia is common disorder with proven genetic basis but complex mode of inheritance. Onset is generally during adolescence with a lifetime morbid risk being approximately 1% in the general population. A constellation of features including hallucinations and delusions characterize. Twin and adoption studies as well as familial clustering have supported a genetic etiology of this illness.

The monoaminergic group of neurotransmitters, their receptors and the genes involved in their uptake may all play an important role in the pathogenesis of schizophrenia.

Serotonin is important neurotransmitter that governs some of the behavioural aspects like sleep, moods, hallucinations and depression. The serotonin transporter gene plays an important role in the serotonin uptake in to neurons and this gene is considered to be promising candidate for genetic involvement in psychiatric disorders owing to its role in the regulation of serotonergic neurotransmission. This gene shows genetic polymorphism.

In this study the relationship between the frequency of the different alleles of the 5-HTTLPR and VNTR variant of the 5-HTT gene was investigated. We studied the 5-HTTLPR and VNTR variant of the 5-HTT gene in 87 subjects whom 55 were unrelated and strictly met DSM-IV criteria for schizophrenia and 32 were healthy and unrelated controls. Blood samples were isolated following the precipitation in the presence of salts. SERT gene alleles were determined using polymerase chain reaction method. Based on the intron 2 VNTR polymorphism of SERT gene, the distribution of 12/12, 12/10, 10/10 and 12/9 genotypes were found as, 47.3%, 47.3%, 3.6% and 1.8% in patients whereas this genotype distribution in control group was 46.9%, 46.9% and 6.3% respectively. According to 5-HTTLPR polymorphism, the distribution of L/L, L/S and S/S genotypes were found as 30.9%, 41.8%, 27.3% in patients whereas this genotype distribution in control group was 28.1%, 50.0%, 21.9% respectively. Despite the fact that the genotype distribution of SERT gene polymorphism in patients and control group seemed to be different from each other, this difference was not found to be statistically significant.

In conclusion, a genetic study involving various risk factor and genes playing important role in the etiology of schizophrenia may lead to statistically significant data. Furthermore, the synergistic effect of SERT polymorphism and the polymorphism of other neurotransmitter genes must be investigated increasing the number of the samples.

Key words: schizophrenia, serotonin transporter gene, VNTR, HTTLPR, polymorphism.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER VE FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xiv
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. ŞİZOFRENİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER	3
II.1.1. Şizofreninin Tarihçesi	3
II.1.2. Epidemiyoloji.....	4
II.1.3. Etiyoloji	4
II.1.3.1. Stres-diatez modeli	4
II.1.3.2. Genetik etkenler	5
II.1.3.3. Biyolojik etkenler	6
II.1.3.3.1. Dopamin varsayımı	6
II.1.3.3.2. Noradrenalin varsayımı	7
II.1.3.3.3. Gamma Amino Bütirik Asit (GABA) varsayımı.....	7

II.1.3.3.4. Serotonin varsayımı.....	7
II.1.3.4. Nöropatoloji ve beyin görüntüleme yöntemleri	8
II.1.3.5. Elektrofizyolojik çalışmalar.....	8
II.1.3.6. Psikososyal nedenler.....	8
II.1.3.6.1. Psikodinamik görüşler.....	9
II.1.3.6.2. Ailesel nedenler	9
II.1.4. Şizofreninin Klinik Belirti ve Bulguları.....	9
II.2. SEROTONİN VE SEROTONERJİK RESEPTÖRLER.....	10
II.2.1. Serotonin Taşıyıcı Protein ve Moleküler Yapısı.....	11
II.2.2. SERT Geni ve Polimorfik Özellikleri.....	12
II.2.3. SERT Gen Ekspresyonunu Etkileyen Etkenler.....	14
II.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ.....	14
II.3.1. PCR Amplifikasyonunun Uygulama Alanları.....	16
II.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri.....	16
II.3.2.1. Enzim.....	17
II.3.2.2. Deoksiribonükleotid trifosfatlar.....	17
II.3.2.3. Magnezyum Değişimi.....	17
II.3.2.4. PCR tampon içeriği.....	17
II.3.2.5. Oligonükleotidler (Primer).....	17
II.3.2.6. Hedef diziler.....	18
II.4. ELEKTROFOREZ.....	18

II.5. GENETİK POLİMORFİZM.....	18
II.5.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	18
II.5.2. Basit Dizi Tekrarları (SSR).....	19
II.5.3. Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmleri (VNTR)	19
III. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
III.1. Hasta ve Kontrol Grubu.....	20
III.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	21
III.2.1. Kullanılan cihazlar.....	21
III.2.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	21
III.2.3. Kullanılan tampon çözeltiler.....	22
III. 2.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	22
III.2.3.2. Elektroforez için kullanılan solüsyonlar.....	23
III.3. DNA İzolasyonu.....	24
III.3.1. İzolasyonun yapılışı.....	24
III.4. Moleküler Analiz.....	25
III.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması	25
III.4.2. Elektroforez İşlemi	27
III.4.3. Genotiplendirme	28
III.5. İstatistiksel Analiz	28
IV. BULGULAR.....	29
IV.1. SERT geni intron 2 VNTR Polimorfizminin Alel ve Genotipleri	29

IV.2. 5-HTTLPR Polimorfizminin Alel ve Genotipleri	32
V. TARTIŞMA	35
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
VII. KAYNAKLAR	41
VIII. EKLER	50



SİMGELER VE KISALTMALAR

APA: Amerikan Psikiyatri Birliği

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

bp: Baz çifti

GC: Guanin-Sitozin

DAT: Dopamin Taşıyıcı Protein

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleotidtrifosfat

DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

ECA: Epidemiologic Catchment Area

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

EtBr: Etidium Bromide

GABA: Gabaaminobutirik asit

5-HIAA: 5-Hidroksiindolasetik asit

5-HTT: 5-Hidroksitriptamin

5-HTTLPR: 5-HTT Gene-linked Polimorphic Region

HVA: Homovanilik asit

ICD: International Classification of Diseases

kb: kilo baz

Long (L): Uzun

MAO: Monoaminooksidaz

MHPG: 3-Metoksi-4-Hidroksifenilglükol

mRNA: Messanger (haberci) Ribonükleik asit

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

NaCl: Sodyum Klorür

NA: Noradrenalin

NAT: Noradrenalin Taşıyıcı Protein

PCR: Polymerase Chain Reaction

rpm: Dakikadaki devir sayısı

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Short (S): Kısa

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SERT: Serotonin Taşıyıcı Proteini

STG in.2: Serotonin Taşıyıcı Gen intron 2

STG in. 2.12: Serotonin taşıyıcı gen intron 2 VNTR 12

SLC6A4: Solite Carrier Family 6 Member 4

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

SSR: Simple Sequence Repeats

SSRI: Spesific Serotonin Reuptake Inhibitors

TBE: Tris-Borat-Etilendiamintetraasetik asit

TE: Tris-Etilendiamintetraasetik asit

UV: Ultraviyole

VMA: Vanilmandelikasit

VNTR:Değişken sayıda ardışık tekrar (Variable Number of Tandem Repeats)

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo II.1. Özgöl popölasyonlarda şizofreni yaygınlığı.....	6
Tablo IV.1. Hasta ve kontrol grubunda aile öyküsü dağılımı.....	30
Tablo IV.2. SERT geni VNTR polimorfizminin alel frekansları	31
Tablo IV.3. SERT geni VNTR polimorfizminin genotip frekansları	32
Tablo IV.4. SERT geni 5-HTTLPR polimorfizminin alel frekansları.....	33
Tablo IV.5. SERT geni 5-HTTLPR polimorfizmi genotip frekansları.....	34



ŞEKİLLER ve FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Şekil II.1. Serotonin taşıyıcı proteininin yapısı.....	12
Şekil II.2. SERT geni ve Polimorfizm Bölgeleri.....	13
Şekil II.3. PCR aşamalarının şematik gösterimi.....	15
Fotoğraf IV.1. SERT geni intron 2 VNTR elektroforez sonu fotoğrafı.....	30
Fotoğraf IV.2. SERT geni 5- HTTLPR elektroforez sonu fotoğrafı.....	33



I. GİRİŞ VE AMAÇ

Şizofreni bir çok davranış ve düşünce bozukluğuna neden olan, beynin yapısı, fizyolojisi ve kimyasında önemli değişikliklerin olduğu psikiyatrik bozukluklardan biridir.

Birçok toplumsal ve biyolojik etkenin şizofreni ile ilişkisi araştırılmış, etiyolojisi konusunda kuramlar öne sürülmüştür. Şizofreniden etkilenen ailelerde hastalanma riski belirlenmiş, hastaların akrabaları ile kontrol grubu genel popülasyonla karşılaştırılmış, yakınlarının genel popülasyona göre daha yüksek bir duyarlılığa sahip oldukları bulunmuştur.

Mendelian geçiş olmasa da, şizofrenide aile, evlat edinme ve ikiz çalışmalarının bulgularına göre, genetik olarak hastalığa yatkınlığın geçtiği düşünülmüştür.

Nörobiyolojik bağlantı çalışmalarında da şizofreninin dopamin ve serotonin reseptörleri ile ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Prefrontal kortekste serotonin reseptör yoğunluğu kontrollere göre düşük, tedavi edilmemiş olgularda ise kanda ve trombositlerde yüksek oranda olduğu bulunmuştur.

Serotonin, davranış kontrolü, anksiyete, agresyon, gastrointestinal sistem motilitesi ve vasküler rezistansın düzenlenmesinde önemlidir. Serotoninin sinaptik aralıktan presinaptik aralığa geri alınmasında rol oynayan serotonin taşıyıcı genin de psikiyatrik bozuklukların etiyolojisinde önemli olduğu ileri sürülmüştür.

Serotonin taşıyıcı geninin “değişken sayıda ardışık tekrar” (Variable Number of Tandem Repeats: VNTR) ve 5-HTT Gene-linked Polimorphic Region (5-HTTLPR)’yi içeren polimorfizminin majör depresyon, bipolar affektif bozukluk, anksiyete ve otizm gibi ruhsal bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Serotonin taşıyıcı geni ile ilgili olarak şizofreni hastalarında yapılan polimorfizm çalışmalarında ise, bazı popülasyonlarda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle Sivas bölgesinde yaşayan şizofreni hastalarında serotonin

taşıyıcı geni polimorfizmi ile şizofreni arasında ilişki olup olmadığının araştırılması düşünülmüştür.

Bu çalışmanın amaçları şunlardır:

1. Sivas bölgesinde yaşayan şizofreni hastalarında serotonin taşıyıcı geninin şizofreni ile ilişkisinin olup olmadığını araştırmak,
2. Serotonin taşıyıcı geninin polimorfizmi ile şizofreniye yatkınlık olup olmadığını araştırmak,
3. Olası gen mutasyon analizini belirlemektir.



II. GENEL BİLGİLER

II.1. ŞİZOFRENİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Şizofreni, işlevselliğin önemli derecede bozulduğu, duygu, düşünce ve davranış bozukluklarının görüldüğü psikotik belirtilerle belirli, nedenleri bilinmeyen bir bozukluktur. Bu durum kroniktir ve genellikle prodromal dönem, sanrı veya varsanılar ya da her ikisinin olduğu aktif dönem ve bozukluğun remisyonda olduğu rezidüel dönemleri vardır (1).

II.1.1. Şizofreninin Tarihçesi

Eski çağ Sanskrit yazılarında ve Hipokrat okuluna bağlı eski Yunan hekimlerinin yazılarında şizofreni belirtilerine benzer belirtiler gösteren ruh hastalıklarının tanımlandığı bildirilmektedir (2).

Şizofrenide belirtilerin bilimsel olarak ele alınışı 19. yüzyıl ortalarında başlar. 1860'da Morel bu hastalığa "démence précoce" (erken bunama) adını vermiş, ergenlik döneminde başladığını ve yıkıma neden olduğunu vurgulamıştır. 1871'de Hecker "hebefreni"yi, 1874'de Kahlbaum "katatoni"yi tanımladıktan sonra, 1896'da Krapelin bu iki hastalık tipine paranoid ve basit tipleri ekleyerek hepsini "démantia praecox" tanısı altında toplayarak ilerleyici zihinsel yıkımı vurgulamak istemiştir. Eugen Bleuler 1911'de yayınladığı "Démantia Praecox veya Şizofreniler Grubu" adlı kitabı ile bu hastalık için zihnin yarılmaması anlamına gelen "şizofreni" teriminin kullanılmasını önermiştir. Kurt Schneider ise, "birinci sıra belirtileri" kavramını öne sürmüş ve bu belirtilerin şizofreni için kesin tanı koydurucu olduğunu savunmuştur (2-6).

Şizofreni kavramına ilişkin tarihi tartışmalar 1980'lerdeki epidemiyolojik çalışmalara kadar sürmüştür. Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) tarafından 1980'de Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)-III, resmi sınıflandırma sistemi yayınlanmış ve Kurt Schneider'in görüşlerinden büyük ölçüde etkilenmiştir (3,4).

Sonuç olarak, DSM-III ile tanı ölçütleri dışına itilen Bleuler'ci kavramlar, daha sonra ayrıntılı tanımlamalarla araştırma ölçeklerine dönüştürülerek tekrar klinik değerlendirme sürecine alınmış, 1994 yılında yayımlanan DSM-IV şizofreni tanı ölçütleri arasında negatif belirtilere de yer verilerek bu dönüş resmileştirilmiştir (3).

II.1.2. Epidemiyoloji

Şizofreni her toplumda sık görülen ruhsal bozukluklardandır. Fakat gerçek sıklığı ve yaygınlığı üzerine veriler oldukça değişiktir. Çalışmalarda temel sorun tanı ölçütleri ile ilgilidir (2,4,7).

Sıklık oranının %0.04-%0.7 arasında değiştiği kabul edilir. On beş yaşından büyüklerde sıklık oranı %0.03-%0.012 arasında bildirilmiştir. ABD'de yapılmış olan çalışmada bir yıllık sıklık oranları %0.011-%0.70 arasında bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün çeşitli ülkelerle yaptığı ortak çalışmada şizofreninin yıllık sıklık oranının endüstrileşmiş toplumlarda %0.016-%0.28 arasında değiştiği bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre Avrupa ve Asya'da sıklık oranı %0.085'tir (2,7).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan Epidemiyolojik Alan Tarama Çalışmasında (ECA) yaşam boyu yaygınlık oranı %1.3 bulunmuştur. Kendler ve Walsh yaşam boyu yaygınlık oranını erkeklerde %0.54, kadınlarda %0.28, Doğan ve arkadaşları Sivas'ta bu oranı %0.5 olarak bulmuştur. Herhangi bir yılda tüm popülasyonun %0.025-%0.05'i şizofreni tedavisi görmektedir (7,8).

II.1.3. Etiyoloji

Şizofreninin belirti ve sonlanma biçimlerindeki çeşitlilikten dolayı, tek bir etkenin şizofreni hastalığını ortaya çıkardığını söyleyebilmek olası değildir (8).

II.1.3.1. Stres-diatez modeli

Stres-diatez modeli biyolojik, psikososyal ve çevresel etkenlerin şizofreni belirtilerinin gelişmesine yol açtığını savunmaktadır (4,8,9).

II.1.3.2. Genetik etkenler

Şizofreni etiyolojisinde genetiğin rolü ve bunun ailesel bir yatkınlık yaratıp yaratmadığı üzerinde durulmuştur. Genetik araştırmalarında ısrarlı olan Kallmann, şizofreninin dünyanın her yerinde aynı sıklıkta olacağını, genetik bir faktörün bu hastalıkta önemli olduğunu iddia etmiştir (10).

Aile çalışmaları güçlü bir ailesel kümelenme göstermekle birlikte, çevresel etkenlerin bu genetik yapının ortaya çıkışını etkilediği düşünülmektedir (11).

Şizofreni hastalarında ilk sistematik aile çalışması, Münih Emil Kreapelin Psikiyatri Enstitüsü'nde 1916 yılında Ernst Rudin tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada şizofreni hastalarının akrabalarında hem şizofreni, hem de diğer psikotik bozuklukların genel popülasyona göre daha yüksek oranlarda bulunduğu gösterilmiştir. Gottesman (1991) şizofreninin ailesel temelini destekleyen kanıtları toplamış ve yaşam boyu riskin genel popülasyonda %1'den biraz daha düşük olduğunu göstermiştir (10,12).

Genetik çalışmalarına göre, şizofreninin bir çok gene bağlı, çok etkenli bir geçiş gösterdiği düşünülmektedir (poligenik-multifaktöriyel). Bu yöndeki araştırmalar aile, ikiz, evlat edinme ve moleküler genetik araştırmalar alanlarında toplanmaktadır. Bu çalışmalarla tek yumurta ikizlerinin çift yumurta ikizlerine göre daha fazla risk taşıdıkları, öz anne-babası şizofreni hastası olan ve başka bir aile tarafından yetiştirilmiş kişilerde, şizofreni riskinin öz anne-babası sağlıklı olanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tek başına aile ortamındaki bozukluğun kalıtsal yatkınlık olmadan şizofreni geliştirmeye yeterli olmadığı düşünülmektedir. Genel yaygınlığı %1 olarak düşünülen şizofrenide kardeşler arasındaki yaygınlığın %8, dizigot ikizlerde %12, monozigot ikizlerde %47 olduğu bildirilmektedir (Tablo II.1) (8,9).

Şizofreni tipleri ele alındığında genetik etkiler farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, sadece hebefrenik veya katatonik olguların çocuklarında hastalığın görülme sıklığı aynı evde büyütülmüşse %27, evlat edinilmişse %17 olarak verilmektedir. Şizofreni aynı zamanda şizoaffektif bozukluk, şizotipal bozukluk ve affektif olmayan

Tablo II.1. Özgül popülasyonlarda şizofreni hastalığı yaygınlığı

Popülasyon	Yaygınlık (%)
Genel popülasyon	1
Şizofreni hastasının ikiz olmayan kardeşi	8
Anne ya da babası şizofreni hastası olan çocuk	12
Şizofreni hastasının dizigot ikizi	12
Anne ve babası şizofreni hastası olan çocuk	40
Şizofreni hastasının monozigot ikizi	47

diğer psikoz olgularının akrabalarında da sık olarak görülmektedir (9).

Genetik hastalıkların en iyi bilinen nedenleri ya genin kodlama bölgesinde mutasyon, ya da transkripsiyonun başlama hızını etkileyebilecek biçimde genin mutasyonuna bağlı olarak anormal protein ekspresyonunun olmasıdır (12,13).

Kromozomların yarısından fazlası şizofreni ile ilişkilendirilmişse de, en sık bildirilenler 5., 11., 18. kromozomların uzun kolları, 19. kromozomun kısa kolu ve X kromozomudur (5,8,9).

II.1.3.3. Biyolojik etkenler

Beyinde şizofreniye özgü biyokimyasal bir bozukluğun olup olmadığıyla ilgili olarak yapılan çalışmalardan çok önemli bulgular elde edilmiş, ancak öne sürülen varsayımların çoğu tam olarak doğrulanamamıştır (8).

II.1.3.3.1. Dopamin varsayımı

Şizofreni belirtileri aşırı duyarlı dopamin reseptörlerine ya da artmış dopamin aktivitesine bağlanmaktadır. Şizofreni tedavisinde kullanılan antipsikotik ilaçlar dopamin tip 2 reseptörlerine (D2) bağlanarak dopaminerjik etkinliği azaltmaktadır.

Dopamini artıran maddeler (amfetamin ve kokain gibi) psikoza kötüleştirmekte ya da tetiklemektedir. Dopaminin metaboliti olan homovalinik asit (HVA) ile ilgili çalışmalarda plazma ve beyin omirilik sıvısında (BOS) artıştan söz edilmektedir. Dopaminerjik etkinlikteki değişikliklerin dopaminin fazla salınımı, reseptörlerdeki değişiklikler ya da bunların birlikteliği ile olduğu düşünülmektedir. Dopaminerjik yollardan mezokortikal ve mezolimbik yollar şizofreniyle en çok ilişkilendirilenlerdir. Mezolimbik yolaktaki etkinliğin artışı ile pozitif belirtilerin oluştuğu, mezokortikal yolaktaki etkinliğin azalmasıyla da negatif belirtilerin oluştuğu düşünülmektedir (8,12,14).

II.1.3.3.2. Noradrenalin varsayımı

Dopaminerjik ve noradrenerjik aktivite arasında kesin bir ilişki olmamasına rağmen, bazı şizofreni hastalarının beyinde ve beyin omirilik sıvısında (BOS) noradrenalin artışının dopaminerjik etkinliği arttırdığı ve noradrenalin etkinliğinin uyarıcı girişinde duyarlılığa neden olduğu ileri sürülmüştür (1,2,8).

II.1.3.3.3. Gamma Amino Bütirik Asit (GABA) varsayımı

Azalmış GABA etkinliği dopaminerjik ve noradrenerjik nöronlarda hiperaktiviteye neden olur. Bir eksitator aminoasit nörotansmitter olan glutamatin şizofreninin biyolojik temeliyle de ilişkisi bildirilmiştir (8,15).

II.1.3.3.4. Serotonin varsayımı

Klozapinin ve diğer yeni antipsikotiklerin ortaya çıkışı dikkatleri şizofreninin etiyolojisinde serotoninin rolüne çekmiştir. Antipsikotiklerin tümü olmasa da, çoğu D2 antagonisti oldukları gibi aynı zamanda serotonin reseptör tip 2 (5HT₂) antagonistleridir. 5HT₂ geninin değişik alelleri ile klozapine yanıt arasında önceden bir ilişki olduğu bildirilmesine rağmen, daha sonra bu gösterilememiştir (12,13,16,17).

Bazı hastalarda serotonin düzeyinde azalma görülürken, bazılarında artma saptanmıştır. Özgül olarak 5HT₂ reseptörlerinin bloke edilmesinin, psikotik belirtilerin azalmasında ve D2 baskılanmasına bağlı hareket bozukluklarının azaltılmasında önemli rol oynadıkları ileri sürülmüştür (1).

II.1.3.4. Nöropatoloji ve beyin görüntüleme yöntemleri

Şizofreninin patofizyolojisine yönelik olarak yapılan epidemiyolojik, postmortem, nörolojik görüntüleme ve moleküler biyoloji çalışmalarında, beyin gelişimini ve korteksin olgunlaşmasını olumsuz etkileyen bir prenatal hasar olabileceği gösterilmiştir (3,12).

Postmortem incelemelerde şizofreni hastalarının piramidal hücre yoğunluklarında normalden sapmalar olduğu ve bu durumun hücre göçü sırasında meydana geldiği ileri sürülmüştür. Bir başka varsayım ise, hücrelerin ve sinapsların değişimleri sırasında ortaya çıkan anormalliklerin şizofreniye yatkınlığa neden olduğudur (3,13).

Çalışmalar şizofreni hastalarının doğum özelliklerinin risk etkeni olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Nörogelişimsel etkenlerle ilgili çalışmaların bir bölümü, şizofreni hastalarının beyin gelişiminde gecikme olduğunu göstermiştir. Şizofreni hastalarında lateralizasyonla ilgili çalışmalar bir hemisferde başatlık kurmada gecikme ile sol ellilik ve lateralizasyonun yatkınlık oluşturmada risk etkeni olabileceğini öne sürmektedir (7).

II.1.3.5. Elektrofizyolojik çalışmalar

Şizofreni hastalarının elektroensefalografik (EEG) çalışmaları, aktivasyon işlemlerine artmış duyarlılık, azalmış alfa aktivitesi, artmış teta ve delta aktivitesi, normalden yüksek epileptiform aktivite ve sol taraf anormalliği göstermektedir (8,18).

II.1.3.6. Psikososyal nedenler

Genellikle kabul edilen görüş, organik nedenlerin yanı sıra, erken çocukluk dönemindeki yaşantıların ve aile ortamının da şizofreniye yatkın bir zihinsel yapının oluşumunda rol oynayabileceği şeklindedir (3).

II.1.3.6.1. Psikodinamik görüşler

Psikoanalitik görüşe göre, şizofrenide ruhsal ya da biyolojik nedenlerle libido gelişmesi narsisistik bir düzeyde saplanmıştır. Yaşamın sonraki dönemlerinde, değişik stresler ile benlik bu ilkel düzeye geriler (regresyon) ve libido nesnelerden çekilerek benliğin kendisine yatırılır (ikincil narsisizm). Bu nedenle şizofrenide genellikle doğuştan yapısal bir yatkınlığın, bir benlik zayıflığının ve birincil narsistik duruma kolayca gerileyebilme eğiliminin olduğu kabul edilir (2,5,8).

II.1.3.6.2. Ailesel nedenler

Bu görüşe göre, şizofreni hastalarının aileleriyle yapılan çalışmalar sonucunda bazı ailelerde önemli yarılma ve bozulma olduğu, şizofreni hastası olan çocuklara annelerince özel bir önem verildiği, şizofreni etiyolojisinde “ikili çıkmaz”ın önemli bir rol oynadığı, çocuğun giderek bu mesajlara aldırmamayı öğrenerek kendine özgü garip bir anlayış ve iletişim biçimi oluşturduğu, duygu dışavurumu (expressed emotion-EE) fazla olan ailelerde yaşayan hastaların diğer hastalara oranla hastalıklarının daha yüksek yineleme riski olduğu ileri sürülmüştür (8,18).

II.1.4. Şizofreninin Klinik Belirti ve Bulguları

Diğer tıbbi durumların aksine, hiçbir işaret ya da belirti şizofreni için tanı koydurucu değildir. Bu nedenle hastanın tıbbi ve psikiyatrik öyküsü, aile ve sosyal geçmişi hakkında kapsamlı bilgi toplamak son derece önemlidir. Şizofreninin seyri ile ilgili kuramsal yaklaşımlar, premorbid belirti ve bulguların hastalığın prodromal evresinden önce ortaya çıktığı şeklindedir. Şizofreni hastaları hastalık öncesinde genellikle içe-dönük, sessiz, arkadaşı az, yalnızlığı yeğleyen, garip, ilgileri sınırlı, güvensiz kişilerdir. Şizoid, şizotipal, paranoid ve sınır kişilik yapısı gösterebilirler; bununla birlikte şizofreniye özgü bir kişilik yapısı yoktur (2,5,8).

Şizofreninin klinik belirtilerini bugün de yeterli sayılacak biçimde tanımlayanlar Krapelin, daha sonra Bleuler olmuştur. Son yıllarda hem DSM-III, DSM-III-R, DSM-IV, hem de Classification of Mental and Behavioral Disorders 10 (ICD-10) şizofreni tanısı koyabilmek için belirli tanımlamalar ve ölçütler getirmiştir. DSM-IV seyir belirleyicileri klinisyene daha fazla seçenek sunar (2,19).

II.2. SEROTONİN VE SEROTONERJİK RESEPTÖRLER

Serotonin ilk kez 1948 yılında Rapaport ve arkadaşları tarafından kanda trombositlerde ve daha sonra da santral sinir sisteminde izole edilmiştir. Serotonin sistemi şizofreni, duygudurum bozuklukları, anksiyete bozuklukları, obsesif kompulsif bozukluk, gelişimsel bozukluklar, yeme ve uyku bozuklukları, ağrı bozuklukları gibi bir çok hastalıkta sorumlu tutulmuştur. Bu psikiyatrik bozuklukların yanı sıra inmeler, hipertansiyon, trombosit işlevi, vasküler bozukluklar, gastrointestinal sistem motilitesi, karsinoid tümör salgısı, migren, fibromyalji gibi bozuklukların oluşumunda da rol oynadığı düşünülmektedir (5,13,15,20-31).

Serotoninin şizofrenide bozulmuş algılama, dikkat, duygu durumu, saldırganlık, cinsel işlev ve iştah bozuklukları, motor davranış, uyku, bellek bozuklukları ve somatik işlevlere katkısı bulunmaktadır (32).

Serotoninin üretilmesi için esansiyel bir aminoasit olan triptofana ihtiyaç vardır. Serotonerjik nöronda triptofan için özel bir aktif taşıma pompası, serotonin için özel bir geri-alım pompası, enzimler ve üretilen nörotransmitterlerin depolanması için veziküller vardır. Üretilen serotonin salınmaya hazır durumda veziküllerde depolanır. Serotonin hücre içinde metabolize edilir. Serotonin bir sinir uyarısı ile sinaptik aralığa salınır ve presinaptik ve postsinaptik zarlarda bulunan alıcılara bağlanarak normal işlevini yerine getirir. Sinaps öncesi serotonin terminallerinin üzerinde kendilerine özel taşıyıcı madde ile bağlantılı geri alım pompaları vardır. Bu pompaların işlevi, sinaptik aralığa boşalan kimyasal taşıyıcının (serotoninin) bir kısmını işlevini gördükten sonra tekrar kendine özel sinaps öncesi terminale geri emilmesini sağlamaktır. Bu geri alınmadan sonra yıkım, monoaminoksidaz enzim sistemi ile etkileşim sonucu gerçekleşir. Serotonin yıkımında monoaminoksidaz (MAO), aldehit dehidrogenaz enzimleri görev alır. Serotoninin MAO-A enzimi ile etkileşmesinin sonucu olarak 5-hidroksiindolasetikasit'e (5-HIAA) dönüşüp önce BOS'a, sonra kan ve idrara geçerek atılır. Hücreye geri alınan moleküllerin bir kısmı bu yolla metabolize olmalarına rağmen tümü aynı anda yıkıma uğramaz. Diğer nörotransmitterlerde olduğu gibi kalan serotonin de veziküllerde depolanır ve bir sonraki uyaran ile tekrar kullanılmak üzere bekletilir (9,13,15,33).

Serotonerjik nöral taşımayı serotonin reseptörleri düzenler. Serotonin (5-HT) reseptör sistemleri, diğer birçok nörotransmitter sistemleri ile etkileşirler ve bazı nöronlarda başka nörotransmitterle birlikte bulunurlar. Serotonin reseptörleri merkezi veya periferik olarak yerleşmiş olmalarına, nöronlar veya başka hücreler (örn., lenfositler) üzerinde olmalarına, presinaptik veya postsinaptik olarak yerleşmiş olmalarına göre birbirlerinden farklılaşırlar (15,32).

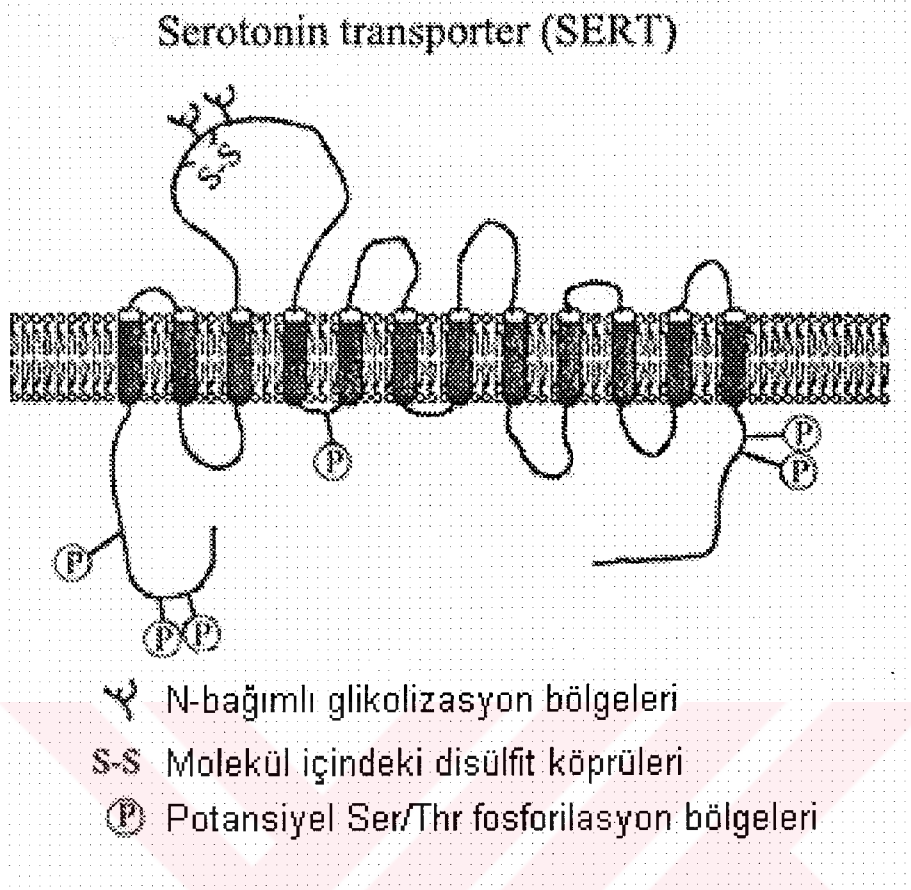
Serotonin reseptörlerinin alt tipleri genetik, farmakolojik ve ikinci mesajcı eşleşmeleri gibi birkaç ölçüte dayanılarak yapılır. Şu anda bilinen 14 farklı serotonin alt tipi vardır: 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1C, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5A, 5-HT5B, 5-HT6, 5-HT7. Bu reseptör alt tiplerinin ancak sadece bir kısmı beynin fizyolojik olaylarında rol oynamaktadır (15).

Şizofrenide serotoninle ilgili çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmuş ve bu durumun hastalığın heterojen doğasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Merkezi sinir sisteminin erken gelişiminde hücre çoğalması, göçü ve farklılaşmasında bir düzenleyici olan serotoninin beyindeki homeostazisinde serotonin taşıyıcı geni temel rol oynar. Şizofreniye yatkınlık ve tedaviye yanıtın serotonin reseptör genlerindeki alelik değişikliklerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (32).

II.2.1. Serotonin Taşıyıcı Protein ve Moleküler Yapısı

Serotonin de dahil olmak üzere pek çok monoaminerjik nörotransmitterin sinaptik etkisi bu moleküllere bağlanan taşıyıcı proteinleri tarafından sonlandırılır. Serotonin sinapslara salındıktan sonra, presinaptik nöronal membranlarda lokalize olmuş Na^+ ve Cl^- iyonlarına bağımlı yüksek affiniteli serotonin taşıyıcı (5-hidroksitriptamin transporter, 5-HTT, SERT, SLC6A4) adı verilen bir protein aracılığıyla sinaptik boşluktan etkin biçimde temizlenir (34,35).

Serotonin taşıyıcı protein 630 aminoasitten meydana gelmiştir. 68.000 dalton ağırlığında olup ilk olarak rat beyninden klonlanmıştır. Serotonerjik hücreler ve beyinde raphe nükleide bulunmasının yanı sıra, akciğer, plasenta ve plateletler gibi bazı periferik dokularda da tespit edilmiştir (32,36).



Şekil II.1. Serotonin taşıyıcı proteininin yapısı

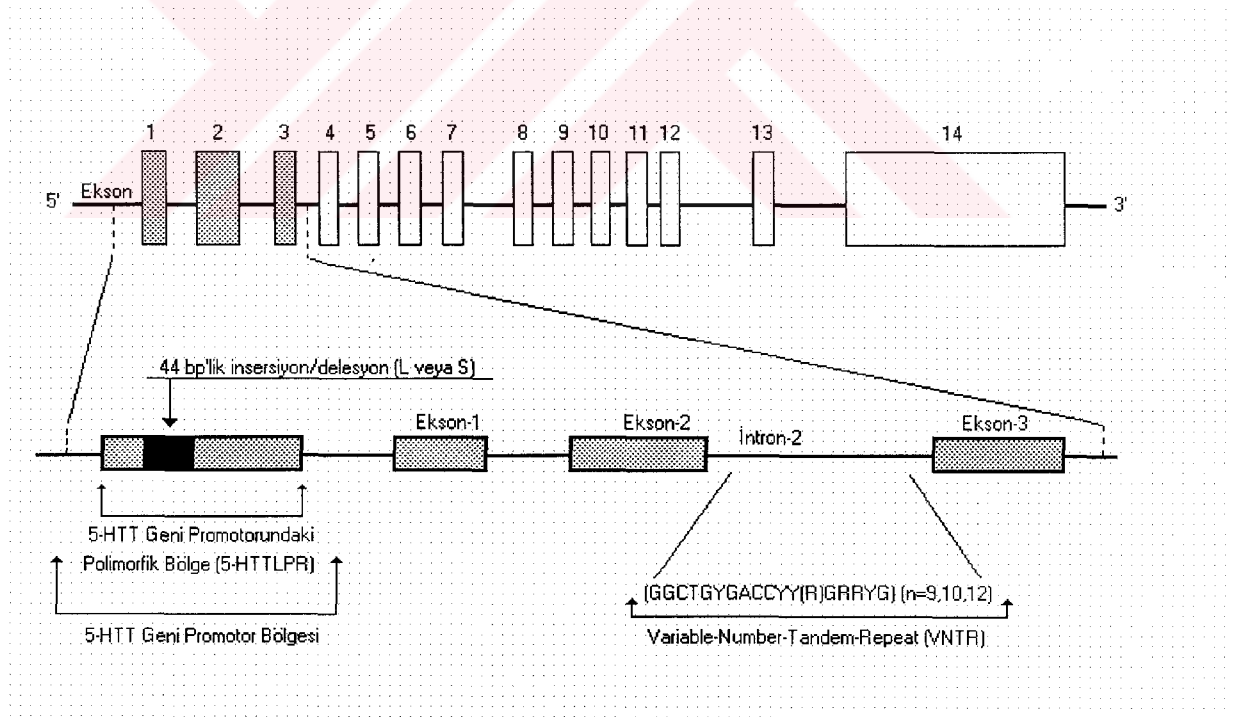
Serotonin taşıyıcı protein, nöradrenalin taşıyıcı (NT) ve dopamin taşıyıcı (DT) protein ile %50'ye yaklaşan bir benzerlik gösterir (37,38).

II.2.2. Serotonin Taşıyıcı Geni ve Polimorfik Özellikleri

Serotonin taşıyıcı geni, SLC6A4 (Solute Carrier Family 6 Member 4) gen koduyla, kromozom 17q11.1-q12'ye haritalanmıştır. 5HTT geni 31 kb uzunluğunda ve 14 ekson içermektedir (39-41).

Bu gen için iki temel polimorfizm tanımlanmış ve bu polimorfizmlerin serotonin ile ilgili davranışların düzenlenmesinde, özellikle anksiyete, depresyon, intihar, şizofreni, otizm, bipolar bozukluk, hiperaktivite ve mevsimsel affektif bozukluğu içeren bazı psikiyatrik bozukluklarda; fibromiyalji ve migren gibi psikosomatik bozukluklarda; temporomandibular eklem ağrısı ve işlev bozukluğunda, irritabl barsak sendromunda ayrıca ani bebek ölümlerinde etkili olabileceği bildirilmektedir (35,40-54).

Serotonin taşıyıcı geni ile ilgili olarak iki polimorfizmden birincisi, genin ikinci intronunda 15-18 bp'lik bir bölgenin 7 (~315 bp), 9 (~345 bp), 10 (~360 bp) veya 12 (~390 bp) defa tekrar etmesine bağlı “değişken sayıda ardışık tekrar” (Variable Number of Tandem Repeats: VNTR) polimorfizmidir. Bu polimorfizme göre genotipler 12/12, 12/10, 10/10, 12/9, 10/9, 9/9, 12/7, 10/7, 9/7 ve 7/7 olarak değerlendirilmektedir. Fakat 7 ve 9 alelinin sıklığı çok az olduğundan bazı popülasyonlarda rastlanmayabilir. İkinci polimorfizm ise, 5-HTT geninin transkripsiyonel kontrol bölgesinde (5-HTT gene-linked polymorphic region 5-HTTLPR) 20-22 bp'lik ikili tekrardan oluşan 44 bp'lik Guanin, Sitozin (GC) zengin bir dizinin farklı sayıda insersiyon/delesyon tekrarına bağlı olarak tanımlanan polimorfizmdir. 44 bp'lik tekrar dizisinin insersiyonu sonucu 16 tekrardan oluşan 528 bp'lik uzun (Long:L) form; delesyonun da ise 14 tekrardan oluşan 484 bp'lik kısa (Short:S) form olarak adlandırılan aleller meydana gelir (Şekil II.2). Bu polimorfizme göre genotipler L/L, L/S ve S/S olarak değerlendirilmektedir (31).



Şekil II.2. Serotonin taşıyıcı geni ve çalışılan polimorfizm bölgeleri

Bu polimorfizme göre genotipler L/L, L/S ve S/S olarak değerlendirilmektedir. Bu polimorfizmin de ender görülen ve bazı popülasyonlarda rastlanmayan alelleri

tanımlanmıştır. Bu aleller ilk önceleri LJ, XL, XXL olarak adlandırılmıştır. Ancak daha sonra yapılan detaylı incelemelerde, bu polimorfizmin 14 farklı alel tipi ortaya koyabileceği gösterilmiştir. Japon ve Kafkas kökenli bireylerde yapılan incelemede, 5-HTTLPR'nin tekrar dizisinin 14, 16, 19, 20 ve 22 kez tekrar edebileceği gösterilmiştir. Ayrıca özellikle 14 ve 16 tekrar gösteren alellerin, tekrar dizilerinin de kendi aralarında farklılıklar gösterebileceği tespit edilmiştir (40,41,55-57).

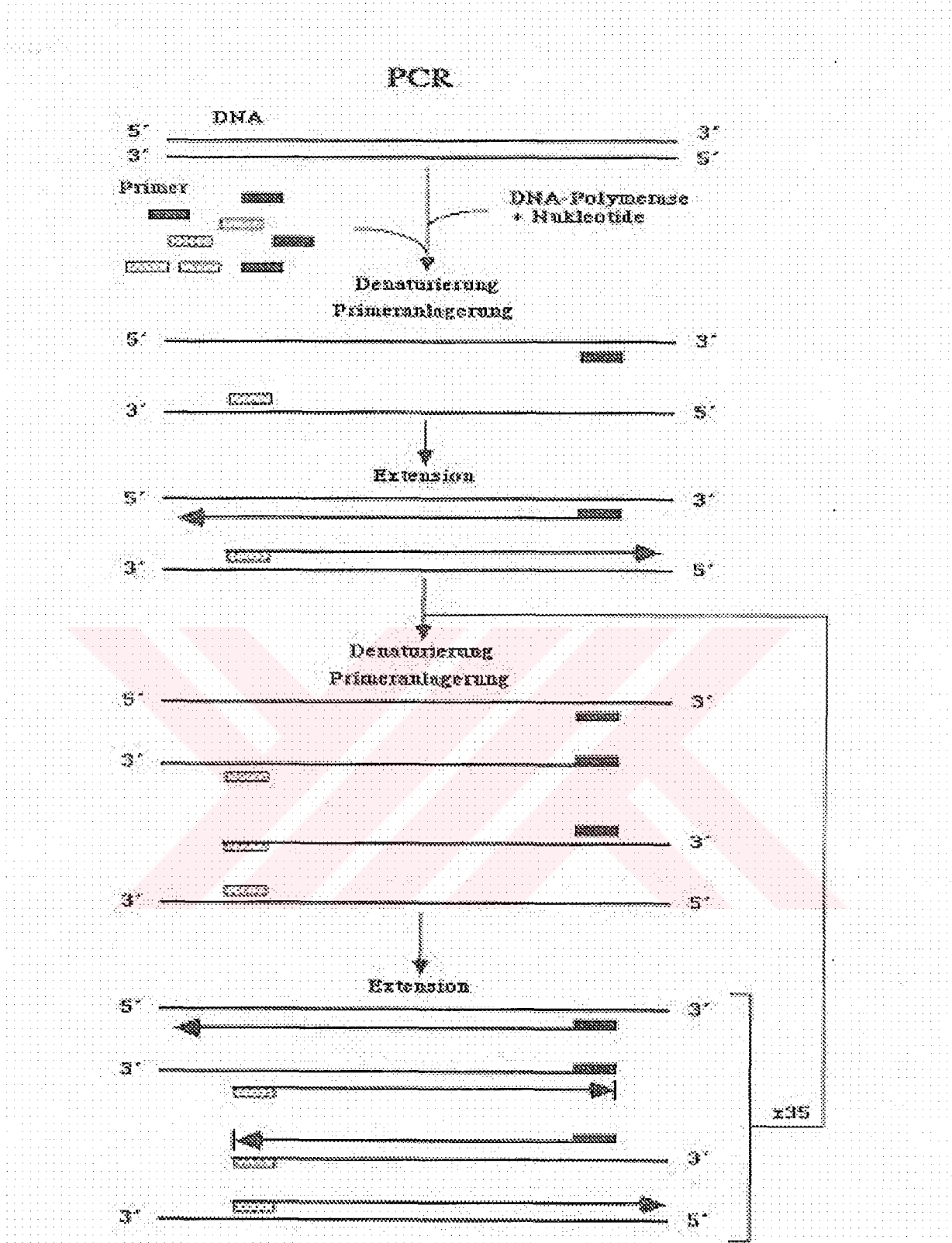
Bu çalışmada, 5-HTTLPR'nin sadece 14 veya 16 defa tekrar etmesine göre değerlendirilme yapılmıştır. 5-HTTLPR'nin uzun (L) ve kısa (S) varyantlarının farklı transkripsiyonel etki gösterdikleri çeşitli çalışmalarla tespit edilmiştir (41,58).

II.2.3. Serotonin Taşıyıcı Gen Ekspresyonunu Etkileyen Etkenler

Depresyon gibi serotonin geri alım mekanizmasındaki patolojiden kaynaklanan bazı bozukluklarda, hastalığın temelinde serotonin taşıyıcı gen ekspresyonunun rolünün olabileceği düşünülerek bu genin ekspresyonunu etkileyen etkenlerle ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar genelde çeşitli ilaçlar, bakteriyel ve kimyasal nörotoksinler, cinsiyet hormonları ve stres gibi bazı çevresel etkenler üzerinde yoğunlaşmıştır (15,33,59,60).

II.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction:PCR), dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan bir DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki oligonükleotid, bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Kalıp DNA önce iki oligonükleotidin ve dört deoksiribonükleotid trifosfatın (dNTP) varlığında ısıtılarak denatüre edilir. Tepkime karışımı, daha sonra kalıp dizilerine oligonükleotid primerlerinin yapışmasına olanak veren bir sıcaklığa dönüştürülür. Yapışmış primerler uygun bir sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılır. Denatürasyon, annealing (yapışma) ve DNA sentezi döngüsü sonradan birçok kez tekrarlanır (Şekil II.3). Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri sonraki döngü için kalıp işlevi gördüğünden her bir başarılı döngü, temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar (61,62).



Şekil II.3. PCR aşamalarının şematik gösterimi. Otuz beş döngü sonunda yaklaşık 10^6 kat ürün elde edilir.

II.3.1. PCR Amplifikasyonunun Uygulama Alanları

PCR amplifikasyonu genetik bozuklukların tanısında, klinik örneklerdeki patojenik organizmaların nükleik asit dizilerinin belirlenmesinde, adli tıp örneklerinin genetik tanımlanmasında ve etkinleşmiş onkogenlerin mutasyonlarının analizinde yoğun uygulama alanı bulmuştur. Ek olarak, PCR amplifikasyonları aşağıda sıralananları da kapsayan moleküler klonlama ve DNA analizindeki çeşitli uygulamalar için kullanılmaya başlanmıştır (36,61).

- Prob olarak kullanım için, klonlanmış çift zincir DNA'nın özgül dizilerinin oluşturulması.
- cDNA'nın belirli parçalarının seçici amplifikasyon ile klonlanmış genler için proba özgül dizilerin oluşturulması.
- Küçük miktar mRNA'dan cDNA kütüphanelerinin oluşturulması.
- Dizi analizi için büyük miktar DNA'ların oluşturulması.
- Mutasyon analizleri.

II.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri

Polimeraz zincir reaksiyonunun kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı, çoğaltılacak bölgenin uzunluğu ve primerlerin dizisi tarafından belirlenir; etkisizleşmesi ve hazırlanmış kalıbın tam olmayan uzaması gibi durumlar oluşturur. Bu nedenle en uygun koşullar aşağıda sıralanmış PCR bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır (63).

- Enzim (Taq DNA polimeraz)
- Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP)
- Magnezyum Derişi
- PCR Tampon İçeriği
- Oligonükleotidler (primer)
- Hedef Diziler
- Isılar ve Döngü Sayısı

II.3.2.1. Enzim

DNA polimeraz enzimleri, kalıp zincire komplementer bir DNA zinciri meydana getirmek üzere, orijinal kalıp zincirdeki baz bilgisini kullanarak, dNTP'lerden uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. PCR'in en elverişli olduğu koşullarda 0.5-5 ünite/100 µl arasında değişen enzim derişimlerinin denenmesi ve jel elektroforezi yardımıyla sonuçların değerlendirilmesi önerilmektedir. Enzim derişimi çok yüksek ise, özgül olmayan arka plan ürünler görülebilmektedir. Ayrıca, enzim derişimi çok düşük olduğunda da, istenilen ürünün miktarında azalma görülmektedir (36,61).

II.3.2.2. Deoksiribonükleotid trifosfatlar

Deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTPs = dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 20-200 µM arasındaki derişimi verim, özgüllük ve doğruluk arasındaki en iyi denge ile sonuçlanmaktadır (36).

II.3.2.3. Magnezyum Derişimi

Magnezyum iyonları hazır olarak satılan $MgCl_2$ 'ün PCR ortamına eklenmesiyle sağlanır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar ve polimeraz aktivitesini uyarırlar. Ayrıca primer yapışmasını, hem kalıp hem de PCR ürününün zincir ayrışma sıcaklıklarını, ürün özgüllüğünü, primer-primer kalıntılarının oluşumu ile enzim etkinliğini ve doğruluğunu etkilemektedir (36).

II.3.2.4. PCR tampon içeriği

PCR için en çok önerilen tampon, 10 mM Tris-HCL ve 50 mM KCL içeren tampondur. KCl'nin 50 mM'a kadar olan derişimi primer yapışmasını kolaylaştırdığı için tepkime karışımına eklenebilmektedir (61).

II.3.2.5. Oligonükleotidler (Primer)

Tüm DNA polimeraz enzimleri kalıp DNA üzerinde polimerizasyon reaksiyonunu başlatabilmek için çoğaltılacak aralığın iki ucundaki dizilere komplementer olan primerlere ihtiyaç duyar. Genel olarak kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır.

Primerin 0.1 ile 0.5 μM arasındaki derişimi genellikle en elverişli olanıdır. Daha yüksek primer derişimleri hatalı dizilimlemeye neden olabilmektedir. Ayrıca, özgül olmayan ürünün birikmesi primer-primer olarak adlandırılan bir kalıptan bağımsız kalıntının oluşma olasılığını artırabilir. Özgül olmayan ürünler ve primer-primer kalıntılar, kendi kendilerine PCR için substrat işlevi görürler. Bu ürünler; enzim, dNTP'ler ve primerler için istenilen ürün ile yarışarak istenilen ürünün veriminin düşmesine neden olurlar (62).

II.3.2.6. Hedef diziler

DNA polimerazın, polimerizasyon reaksiyonunu gerçekleştirebilmesi için ihtiyaç duyduğu yapılardan biri de kalıp DNA'dır. DNA polimeraz, kalıp DNA'ya bağlanarak hedef dizilerin iki ucunda yer alan bölgede polimerizasyon reaksiyonunu gerçekleştirir (36).

II.4. ELEKTROFOREZ

Sulu bir çözelti içinde çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik akımının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez (elektrikle göç) denir. Bu olay belirli bir yük dağılımı olan tampon içerisinde gerçekleştiğinden ve elektrik akımı kullanıldığından kısaca elektroforez adı verilmiştir (63).

II.5. GENETİK POLİMORFİZM

İnsan genomunun bütün bölgeleri boyunca DNA yapısında zararsız kalıtsal varyasyonlar vardır. Yani bir bireyin genomu her 100-200 nükleotid de 1-2 baz değişimi içermekte fakat bu durum kişilerde önemli bir hastalığa yol açmamaktadır. Bireyler arasındaki nükleotid baz dizilerindeki bu değişiklik "polimorfizm" olarak adlandırılır. İnsan genomunda yer alan DNA polimorfizm örnekleri genel olarak 3 grupta değerlendirilebilir (36,64):

II.5.1. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)

DNA sarmalı özgül Restriksiyon Enzimi (RE) ile kesildiği zaman farklı uzunlukta fragmentler oluşur ve jel elektroforezinde gözlenir. Bu fragmentler RFLP olarak adlandırılır. RFLP'ler birçok hastalıkta kalıtsal marker olarak kullanılır. Eğer

belirlenemeyen bir proteine ilişkin bir genin kalıtımı incelenmek isteniyor ve bu gene bağlı olan RFLP'ler bulunuyorsa, ailede bu genin kalıtımını belirlemek için bu markerlerden yararlanılır (61,64).

II.5.2.Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats:SSR)

SSR belirleyicileri VNTR' lere benzer, çünkü değişken sayıda nükleotidler birbiri ardına tekrarlanmıştır. DNA molekülünde yer alan bu basit dizi tekrarları çok küçük diziler olduğundan yalnızca PCR analizi ile tanımlanabilir (16,63,64).

II.5.3. Değişken Sayıda Ardışık Dizi Polimorfizmleri (Variable Number of Tandem Repeats:VNTR)

VNTR lokuslarının en önemli özellikleri ardışık tekrar sayılarının ve tekrar birimlerindeki nükleotid dizilerinin değişim göstermesidir. Bu nedenle büyük oranda alelik varyasyon gösterirler. Bu varyasyonların eşit olmayan çapraz geçişler veya replikasyon kayması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. VNTR lokuslarının analizleri ile ardışık tekrar kopyalarının sayısının çok değişken olduğu, birden yüzlerce keze kadar değişebileceği saptanmıştır. Bir lokusta çok sayıda farklı değişken dizilerin varlığı sonucu toplumda çok sayıda alel (hiperalelizm) oluşur ve çok sayıda birey heterozigot olur. VNTR lokuslarında heterozigotluk %100'lere kadar varmaktadır. VNTR lokusları yüksek polimorfik özellikleri nedeniyle önemli genetik belirleyiciler olarak kabul edilirler. Bu nedenle çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadırlar (62,63).

VNTR'ın başlıca uygulama alanları:

- Gen haritalanması
- Kimliklendirme
- Paternite testleri
- Adli tıp
- Prenatal tanı
- Çeşitli hastalıklar ile ilgili odakların belirlenmesi.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 2003-2004 tarihleri arasında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 01/04/2003 tarihli 4 numaralı onay alınmıştır.

Bu çalışmada şizofreni tanısı konmuş 55 birey ve 32 sağlıklı bireyden alınan kanlar 1 ml EDTA içeren tüplerde biriktirildi. Bireylere ait DNA'lar tuz çöktürme yöntemine göre elde edildi. Daha sonra her iki polimorfizme ait gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılıp elektroforezde yürütüldükten sonra istatistiksel olarak değerlendirildi.

III.1. HASTA VE KONTROL GRUBU

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı'nda şizofreni hastalığı tanısı konmuş, yaşları 18-72 arasında değişen ve yaş ortalamaları 35.67 ± 13.25 olan 55 birey hasta grubunu oluşturmuştur. Şizofreni tanısı DSM-IV tanı ölçütlerine göre konmuştur. Tüm hastalara sosyodemografik bilgi formu verilmiştir. Sosyodemografik bilgi formunda hastanın yaşı, cinsiyeti, eğitim düzeyi, medeni durumu, çalışma durumu, anne-baba arasında akrabalığın olup olmadığı, akrabalık varsa derecesi, aile üyelerinde bir psikiyatrik bozukluğun olup olmadığı, aile üyelerinde doğuştan anomali olup olmadığı soruları yer almıştır.

Kontrol grubu öykü ve psikiyatrik muayene ile herhangi bir ruhsal bozukluğu olmayan, yaş ve cinsiyet yönünden hasta grubuna benzer, yaşları 18-77 arasında değişen ve yaş ortalamaları 34.75 ± 11.33 olan sağlıklı 32 birey oluşturmuştur. Kafa travması öyküsü, oral kontraseptif kullanımı ve konjenital anomali öyküsü olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Çalışmaya alınan hastalardan 1 (%1.78)'i çalışmaya katılmayı kabul etmemiştir.

Hasta ve kontrol bireylerinden 7-8'er ml alınan kan, 1 ml EDTA (%2) içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konulmuştur. Daha sonra izolasyon aşamasına kadar biriktirilmek üzere -20°C'lik buzdolabında saklanmıştır.

III.2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

III.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Termal cycler (Techne Progene, Cambridge, UK)
- Elektroforez güç kaynağı (EC 135-90)
- Elektroforez tankı (Midicell EC-350)
- Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Santrifüj (Nüve NF 800)
- Mikrodalga fırın (Alaska)
- Derin dondurucu (Arçelik-2031 D)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Hassas terazi (AND)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- Vorteks (VELP)
- Mikropipet seti (Eppendorf)
- Elektromagnetik karıştırıcı (Nüve MK-418)

III.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-hidroklorid (Sigma T-7149)
- Sodyum klorür (Riedel-de Haen)
- EDTA (Sigma E-5134)
- Sodyum perklorat (Sigma S-3546)
- Sodyum dodesil sülfat (Sigma L-5750)
- Trizma base (Sigma T-6066)
- Borik Asit (Carlo Erba 302177)

- Ethidium bromide (Sigma E-1510)
- Orange G (Sigma O-3756)
- Gliserol (Merck 4091)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Agarose (LE Prona Basica 051342PR)
- Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)
- Bidistile su (Sigma W-3500)
- 10X PCR buffer with (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas #B33)
- 2 mM dNTP Mix (MBI Fermentas #R0241)
- 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas)
- GC-RICH PCR SYSTEM (Roche Molecular Biochemicals 2 140 306)
- Proteinaz-K (Sigma P-2308)
- 100 bp marker (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas Vilnius, Lithuania)
- Primerler

(5-HTT VNTR Polimorfizmi İçin)

Forward 5'-TGG ATT TCC TTC TCT CAG TGA TTGG-3'

Reverse 5'-TCA TGT TCC TAG TCT TAC GCC AGTG-3'

(5-HTTLPR Polimorfizmi İçin)

Forward 5'-GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC-3'

Reverse 5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACC AC-3'

III.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

III.2.3.1. DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar

Nüklei Lizis Buffer

- Tris-HCl.....1,576 g
- NaCl.....23,4 g
- Na₂ EDTA.....0,7 g
- 1 lt distile suya tamamlanıp çözdükten sonra, otoklavda sterillendi ve +

4°C'de saklandı.

5 M Sodyum Perklorat Solüsyonu

- 61.2 g Sodyum Perklorat Solüsyonu (NaClO_4) 1 lt distile suya tamamlanıp çözdükten sonra, otoklavda sterillendi ve + 4 °C’de saklandı.

% 10 SDS Solüsyonu

- 10 g SDS 100 ml distile suda çözüldü.

6 M NaCl Solüsyonu

- 35,5 g NaCl 100 ml distile suda çözüldü.

TE Buffer

- Tris-HCl.....0.394 g
- Na_2EDTA0,093 g
- 250 ml distile suya tamamlanıp çözdükten sonra, otoklavda sterillendi ve + 4 °C’de saklandı.

Proteinaz K

Hazır olarak alınan liyofilize 100 mg Proteinaz-K, 10 ml steril distile su ile çözümlenerek 10 mg/ml’lik konsantrasyona getirildi ve -20°C’de saklandı.

III.2.3.2. Elektroforez için kullanılan solüsyonlar

10X TBE (Tris-Borat-EDTA)

- Tris Base.....108 g
- Borik Asit.....54.8 g
- Na_2EDTA5.44 g
- Distile su ile 1lt’ye tamamlanarak çözüldü.

Elektroforez Yürütme Tamponu

- 10X TBE Bufferden distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE içerisine 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde ethidium bromide (EtBr) konularak karıştırıldı.

% 1,5 Agarose Jel Solüsyonu

- 140 ml 1X TBE Buffer içerisinde 2,1 g agaroz (Agarose Basica LE Prona) mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr katıldı.

Orange G Solüsyonu

- Na₂ EDTA.....2,232 g
- Orange G..... 200 mg
- 60 ml Gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solusyon içerisinde çözüldü

III.3. DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu tuz çöktürme yöntemine göre elde edilmiştir (104). Yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile çöktürülmesi ve üstte kalan sıvı kısımda bulunan genomik DNA'nın, etil alkol yardımı ile yoğunlaşması sağlanarak izole edilmesidir.

III.3.1. İzolasyonun yapılışı

Kanların bulunduğu tüpler soğuk steril distile su ile 14 ml'ye tamamlanıp kuvvetlice 1-1.5 dakika çalkalandıktan sonra 15 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Tüplerde çökelmelerin başladığı bölgenin yakınına kadar olan süpernatant kısmı, pastör pipetiyle alınıp atıldı. Çökeltinin üstüne steril soğuk distile su konularak hacmi tekrar 14 ml'ye tamamlandı. Tüm tüplerde bu işlem yapıldıktan sonra 10 dakika 2000 rpm de santrifüj edildi. Tekrar süpernatant atılarak çökelti üzerine steril soğuk distile su eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. Çalkalama işlemi yapılırken tüpün dibinde çökelti kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra tekrar su eklenerek 14 ml'ye tamamlandı ve santrifüj edildi. Bu işlemler süpernatantın rengi sarımtırak şeffaf bir renge gelinceye kadar devam etti. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra tüplere pipetle 3'er ml nuklei lizis buffer konulup çalkalandıktan sonra tüplerin herbirine %10'luk 200 µl SDS, 5 M'lık 500 µl Sodyum Perklorat ve 10 mg/ml'lik 25 µl Proteinaz-K konuldu. Kapaklar sıkıca kapatılıp tüplerin ağzı parafilm ile sarıldıktan sonra bir gece bekletilmek üzere 37°C'lik etüv içerisine konulmuştur.

İkinci gün tüpler 37°C'lik etüvden çıkarılıp, çalkalanarak 55°C'lik inkübatöre kondu. Bir saat geçtikten sonra her bir tüpe 2'şer ml 6 M'lık NaCl çözeltisi kondu. Kapaklar kapatılıp tüpler hızlıca çalkalandıktan sonra 10 dakika bekletildi. Daha sonra 15 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra tüplerde bulunan süpernatantlar, aynı numaralı boş santrifüj tüplerine alındı. Üzerine soğuk, absolu (%99.8) etanol eklenerek çözünmüş haldeki DNA yoğunlaştırıldı. Yoğunlaşan DNA'lar her birinde yeni pipet uçları kullanılarak içerisinde 500 µl TE buffer bulunan ependorf tüplerine alındı. Ependorf tüpleri DNA'ların TE buffer içerisinde çözünüp homojen hale gelmesi için de 37°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

III.4. MOLEKÜLER ANALİZ

III.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması

PCR tek bir molekül DNA'yı bile çoğaltabileceğinden, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu kontaminasyon, daha önceki PCR reaksiyonu, egzojen DNA ya da diğer hücrel materyallere bağlı olabilir. Bu nedenle, kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi. Ayrıca PCR reaksiyonunda, ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNAase ve RNAase enzimlerinden arındırılmış steril 0.5 ml'lik PCR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes), reaksiyonun gerçekleştirilmesi için Thermal Cycler cihazı ve 0.5-10 µl'lik, 2-20 µl'lik ve 10-100 µl'lik otomatik pipetler kullanıldı.

Serotonin taşıyıcı geni ile ilgili olarak iki polimorfizmden birincisi olan VNTR polimorfizminin için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

Thermal cycler cihazı 20 örnek kapasitesinde olduğundan, DNA dışındaki, PCR ortamı her yirmi örnek için ayrı bir 500 µl'lik ependorf tüpünde topluca hazırlanmıştır. Her yirmi örnek için oluşturulan PCR ortamında kullanılan malzemeler ve miktarları şu şekildedir:

Bidistile Su.....	340 µl
10X PCR Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	50 µl
2 mM dNTP Mix.....	50 µl
Primer (Forward).....	10 µl
Primer (Reverse)	10 µl
25 mM MgCl ₂	30 µl
Taq DNA Polimeraz.....	4 µl

Oluşturulan bu karışımdan, vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0.5 ml'lik PCR tüplerine 25'er µl konulmuştur. Daha sonra 1µl DNA konulup cihaza sırayla yerleştirilmiştir. Thermal cyclers cihazında PCR koşulları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

95°C	2 dakika.....	1 döngü.....	(İlk denatürasyon)
95°C	1 dakika		(Denatürasyon)
57°C	1 dakika.....	35 döngü	(Primer bağlanma – Annealing)
72°C	2 dakika.....		(Sentez – Extension)
72°C	7 dakika.....	1 döngü.....	(Son sentez – Final extension)

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforezde yürütülmek üzere +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

Serotonin taşıyıcı geninin 5-HTTLPR polimorfizmi için de aynı cihaz ve aletlerle, GC-RICH PCR SYSTEM (Roche Molecular Biochemicals 2 140 306) kiti aşağıdaki prosedürle uygulandı. Bu polimorfizm için PCR ortamı, iki ayrı 500 µl'lik ependorf tüpü kullanıldı. Her yirmi örnek için ortamın hazırlanacağı iki tüpten birine A, diğerine B harfleri yazılmış ve içerikleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Madde I. TÜP A

Bidistile Su.....	180 µl
2 mM dNTP Mix.....	50 µl
5 M GC-RICH Resolution solution.....	100 µl
Primer F.....	10 µl
PrimerR.....	10 µl

TÜP B

Bidistile Su.....180 µl

5X GC-RICH PCR Reaction Buffer.....100 µl

GC-RICH Enzyme Mix.....4 µl (5 U/µl)

A ve B tüpleri hazırlandıktan sonra, A tüpü içeriği B tüpüne aktarılıp vortekslendi. Daha sonra üzerlerine örneklerin numaraları yazılı herbir PCR tüpüne 25 µl karışımdan ve 1 µl örneklerin DNA'sından konulup PCR cihazına yerleştirildi. Thermal cycler cihazında, PCR koşulları aşağıdaki şekilde uygulandı.

96°C	3 dakika.....1 Döngü.....(İlk denatürasyon)
96°C	1 dakika(Denatürasyon)
59°C	1 dakika.....35 Döngü(Primer bağlanma – Annealing)
72°C	1 dakika.....(Sentez – Extension)
72°C	7 dakika.....1 Döngü.....(Son sentez – Final extension)

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforezde yürütülmek üzere + 4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

III.4.2. Elektroforez İşlemi

PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100-1000 bp) DNA fragmentleri içeren marker ile kıyaslanarak saptandı.

Bir beherde 2.1 gr agaroz 140 ml 1X TBE solusyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Isıtma işleminden sonra karıştırıcıda yaklaşık 200 dev/dak, 10-15 dakika tarakların erimeyeceği sıcaklığa düşene kadar karıştırıldı. Karıştırma esnasında, 10 mg/ml'lik EtBr'den 14 µl eklendi. Erimiş haldeki jel uygun sıcaklığa düşünce tarakların yerleştirildiği jel tepsisine döküldü. Yaklaşık 1 saat soğumaya bırakılan jel, elektroforez tankına yerleştirilerek PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Daha önceden PCR işlemi yapılmış olan örnekler alınıp üzerlerine 10 µl Orange-G katıldıktan sonra birkaç saniye mikro santrifüjde yaklaşık 3500 rpm de

çevrilerek, PCR ürünleri ile Orange-G'nin birbirlerine karışmaları sağlandı. Daha sonra örnekler bir otomatik pipet yardımıyla elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla bırakıldı. Kullanılan jel 20 adet örnek ve bir adet marker alabilecek sayıda kuyucuğa sahip olup 11. kuyucuğa marker bırakılmıştır. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağından 120 Volt potansiyel gerilimi oluşturacak şekilde elektrik akımı geçmesi sağlanarak örneklerin 40-50 dakika yürütüldü. Bu süre sonunda Orange-G'nin, jelin alt ucuna kadar geldiği görüldü.

III.4.3. Genotiplendirme

Tüm değerlendirmelerde 100 bp'lik marker kullanıldı. Gözlenen bantların moleküler uzunlukları, marker ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bp). Örnekler, jel görüntüleme sistemine konulup 260 nm dalga boyunda UV ışık altında değerlendirildi.

Serotonin taşıyıcı geninin VNTR polimorfizmi için yapılan işlemler sonunda görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslama yapıldığında örneklerin 360 bp veya 390 bp oldukları gözlemlendi. Bunlar sırasıyla 10 ve 12 alelleridir. Örneklerle ait 390 bp hizasında tek bir bant olduğunda 12/12, 360 bp hizasında tek bir bant varsa 10/10, her iki bant da varsa 10/12 olarak genotiplendirme yapılarak kaydedildi.

Serotonin taşıyıcı gen 5-HTTLPR polimorfizmi örnekleri gözlenirken 500 bp'lik marker bant seviyesinin hemen altında ve üstünde yer alan bantlar gözlenmiştir. Yaklaşık olarak 520-530 bp hizasındaki bantlar 528 bp'lik L aleli, yaklaşık 480 bp hizasında bulunan bantlar ise 484 bp'lik S aleli olarak değerlendirilmiştir. 528 bp hizasında tek bir bant olduğunda L/L, 484 bp hizasında tek bir bant olduğunda ise S/S olarak genotiplendirme yapıldı. Hem 528 bp hem de 484 bp hizasında olmak üzere iki adet bant gözlemlendiğinde de L/S olarak genotiplendirme yapıldı.

III.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Serotonin taşıyıcı geninin intron 2 (STG.in.2) VNTR ve 5-HTTLPR polimorfizmleriyle şizofreni arasındaki ilişki genotip ve alel açısından ki-kare analizi ile SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 10.0) paket programı kullanılarak değerlendirildi. Her iki polimorfizmin genotip frekanslarının Hardy Weinberg dengesinde olup olmadığı ki-kare testiyle belirlenmiştir.

IV. BULGULAR

Bu çalışmada, şizofreni hastalığı ile serotonin taşıyıcı genine ait polimorfizmler arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla 55 şizofreni hastası (hasta grubu) ile 32 sağlıklı bireye (kontrol grubu) ait DNA'lardan PCR yöntemi ile serotonin transporter geninin VNTR ve 5-HTTLPR polimorfizmlerinin alel ve genotipleri saptanmıştır.

Hasta grubundaki 55 bireyin yaşları 35.67 ± 13.25 , kontrol grubundaki 32 bireyin yaşları 34.75 ± 11.33 olarak bulunmuştur. Yaş yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel yönden önemsiz bulunmuştur ($t=0.32$; $p>0.05$).

Hasta grubundaki bireylerin 32'si (%58.2) erkek, 23'ü (%41.8) kadın; kontrol grubundaki 32 bireyin 12'si (%37.5) erkek, 20'si (%62.5) kadındır. Cinsiyet yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($\chi^2=3.46$, $p>0.05$).

Her iki gruptaki bireyler şizofreni aile öyküsü yönünden karşılaştırıldığında aradaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Hasta grubundaki bireylerin 16'sında (%29.1) şizofreni aile öyküsü varken, kontrol grubunda hiç yoktur. Aile öyküsünde herhangi bir psikiyatrik hastalık olan bireylerin şizofreniye yakalanma riski olmayanlara göre 0.71 kez daha fazladır (Odds=0.71, CI %95 0.59; 0.84). Bu oran istatistiksel olarak önemlidir (Tablo IV.1).

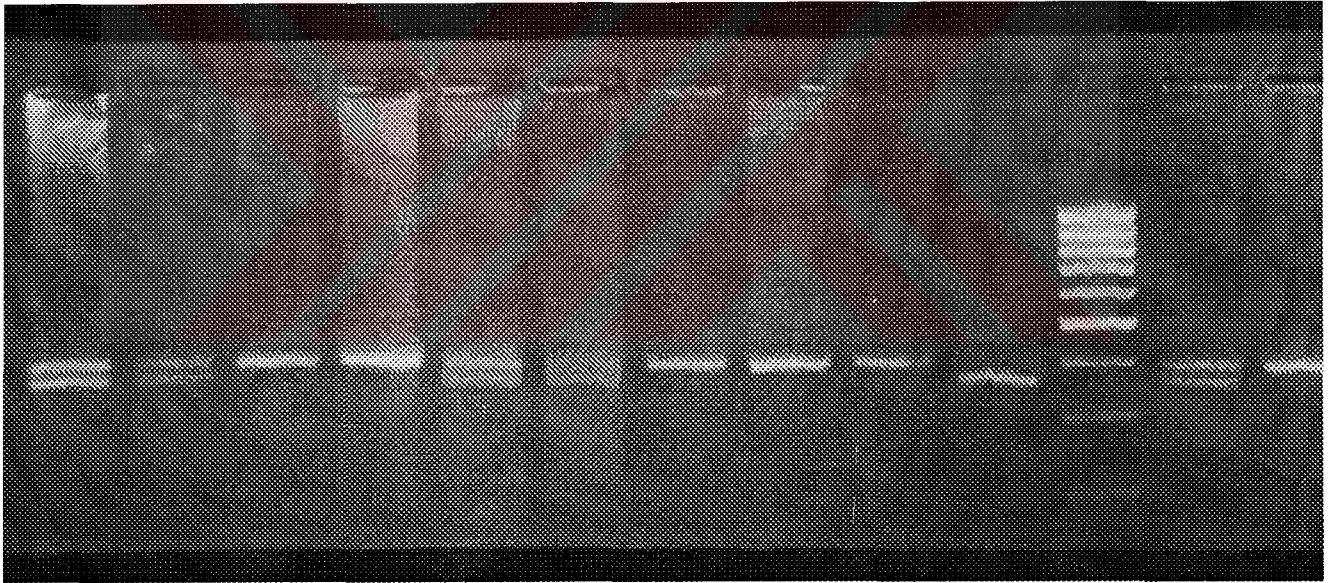
IV.1. SEROTONİN TAŞIYICI GEN VNTR POLİMORFİZMİNİN ALEL VE GENOTİPLERİ

Serotonin taşıyıcı geninin VNTR polimorfizmi için görüntüleme sisteminde marker ile kıyaslama yapıldığında 360 bp hizasında olan örnekler 10, 390 bp hizasında olan örnekler ise 12 alleli olarak değerlendirildi. 360 bp hizasında tek bir bant olduğunda 10/10, 390 bp hizasında tek bir bant olduğunda da 12/12, her iki bant da olduğunda ise 10/12 olarak genotiplendirme yapılarak kaydedildi (Fotoğraf IV.1).

Tablo IV.1. Hasta ve kontrol grubunda şizofreni aile öyküsü dağılımı

Gruplar	Ailede şizofreni öyküsü				Toplam	
	Var		Yok			
	n	%	n	%	n	%
Hasta	16	29.1	39	70.9	55	100.0
Kontrol	0	0	32	100.0	32	100.0
Toplam	16	18.4	71	81.6	87	100.0

($\chi^2=11.40$, $p=0.001$)



Fotoğraf IV.1. SERT VNTR polimorfizmine ait alellerin elektroforez sonu fotoğrafı. 3, 4, 7, 8, 9 ve 12 nolu örneklerle ait bantlar bireylerin, yalnız 12 alellerine ve 12/12 genotipine sahip olduklarını; 1, 2, 5, 6 ve 11 nolu örneklerle ait bantlar bireylerin hem 12, hem de 10 alellerine sahip olduklarını (12/10 genotipinde olduklarını); 10 nolu örneğe ait bant ise, bireyin 10 aleli ve 10/10 genotipine sahip olduğunu; M ise markerı göstermektedir.

Deneyler sonunda, 55 şizofreni hastasından oluşan grupta serotonin taşıyıcı gen VNTR polimorfizmi açısından 79 adet 12 (%71.8), 30 adet 10 (%27.3) ve bir adet 9 (%0.9) aleli saptandı. Kontrol grubunda ise 45 adet 12 (%70.3) ve 19 adet 10 aleli (%29.7) saptandı (Tablo IV.2). Bu polimorfizmin, alel frekanslarının gruplarla olan ilişkisi ki-kare analizi ile değerlendirildi ve alel frekansında anlamlı bir değişimin olmadığı görüldü ($p=0.712$).

Tablo IV.2. Serotonin taşıyıcı geni VNTR polimorfizminin alel frekansları

Gruplar	Aleller						Toplam	
	12		10		9			
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hasta	79	71.8	30	27.3	1	0.9	110	100.0
Kontrol	45	70.3	19	29.7	0	0	64	100.0
Toplam	124	71.3	49	28.2	1	0.6	174	100.0

$$(\chi^2=0.67, p=0.712)$$

Bu polimorfizm genotipik açıdan incelendiğinde, 55 bireyden oluşan hasta grubunda 26 birey 12/12 (%47.3), 26 birey 12/10 (%47.3), 2 birey 10/10 (%3.6) ve 1 birey de 12/9 (%1.8) genotipinde bulundu. Otuz iki kişilik kontrol grubunda ise 15 birey 12/12 (%46.9), 15 birey 12/10 (%46.9) ve 2 birey 10/10 (%6.3) genotipinde bulundu (Tablo IV.3).

Hasta olan bireylerin serotonin taşıyıcı gen VNTR polimorfizmin kontrol grubundaki bireylere göre farklı olma riski (odds)=1.13 kez daha fazladır. Fakat bu oran istatistiksel olarak önemsizdir. (CI % 95 0.49; 2.63)

Yine 12 aleline sahip bireyler 10 aleline sahip bireylere oranla 1.07 kat daha fazla risk taşımasına karşılık, bu risk istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (CI %95 0.54; 2.12, $p=0.832$).

Tablo IV.3. Serotonin taşıyıcı geni VNTR polimorfizminin genotip frekansları

Gruplar	Genotipler								Toplam	
	12/12		12/10		10/10		12/9			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hasta	26	47.3	26	47.3	2	3.6	1	1.8	55	100.0
Kontrol	15	46.9	15	46.9	2	6.3	0	0	32	100.0
Toplam	41	47.1	41	47.1	4	4.6	1	1.1	87	100.0

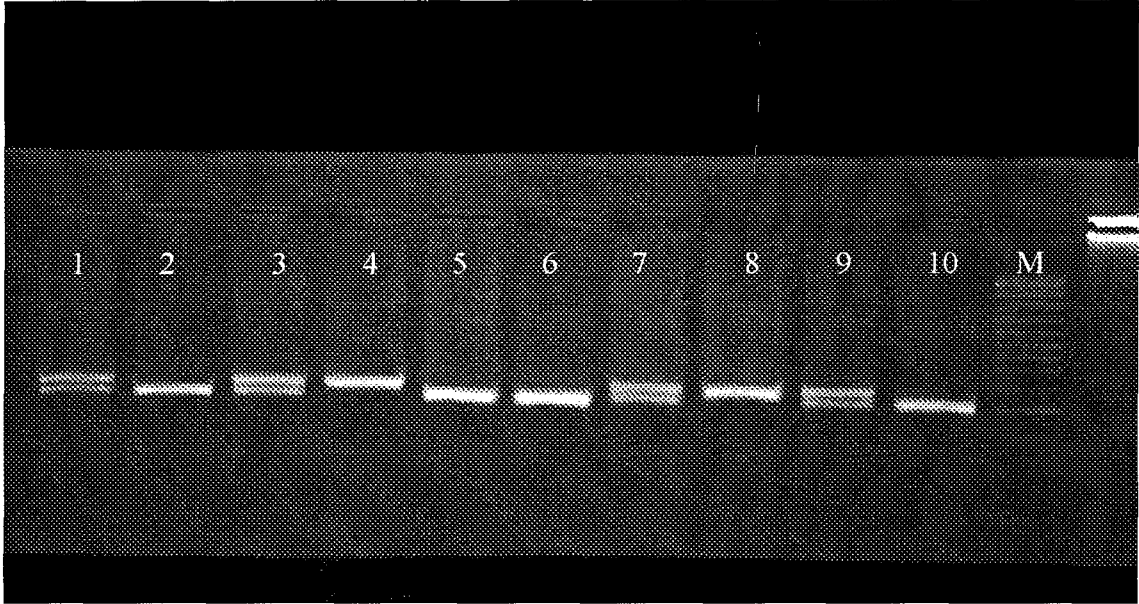
$$(\chi^2=0.88, p=0.829)$$

IV.2. SEROTONİN TAŞIYICI GEN 5-HTTLPR POLİMORFİZMİNİN ALEL VE GENOTİPLERİ

Serotonin taşıyıcı gen 5-HTTLPR polimorfizminde ise, 528 bp hizasında bulunan örnekler L aleli, 484 bp hizasında bulunan örnekler ise S aleli olarak değerlendirildi. 484 bp hizasında tek bir bant olduğunda S/S, 528 bp hizasında tek bir bant olduğunda ise L/L olarak genotiplendirme yapılmıştır. Hem 528 bp, hem de 484 bp hizasında olmak üzere iki adet bant gözleendiğinde de L/S olarak genotiplendirme yapılmıştır.

Deneyler sonunda, 55 şizofreni hastasının 5-HTTLPR polimorfizmi açısından 57 adet L aleli (%51.8) ve 53 adet de S aleli (%48.2) saptandı. Otuz iki bireyden oluşan kontrol grubunda ise 34 adet L aleli (%53.1) ve 30 adet de S aleli (%46.9) olduğu görüldü (Tablo IV.4).

Serotonin taşıyıcı geni 5-HTTLPR polimorfizmlerine ait L ve S alellerinin görülme sıklığı ile hastalık arasında istatistiksel yönden anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0.868$).



Fotoğraf IV.2. SERT 5-HTTLPR polimorfizmine ait alellerin elektroforez sonu fotoğrafı. 4 ve 8 nolu örnekler yalnız L alelini (L/L genotipini); 2, 5, 6 ve 10 nolu örnekler S alelini (S/S genotipini) göstermektedir. 1, 3, 7 ve 9 nolu örnekler ise bireylerin hem L, hem de S alellerine (L/S genotipinde) sahip olduklarını, M ise markerı göstermektedir.

Tablo IV.4. Serotonin taşıyıcı gen 5-HTTLPR polimorfizminin alel frekansları

Gruplar	Aleller					
	L		S		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Hasta	57	51.8	53	48.2	110	100.0
Kontrol	34	53.1	30	46.9	64	100.0
Toplam	91	52.3	83	47.7	174	100.0

$$(\chi^2=0.03, p=0.868)$$

Serotonin taşıyıcı geni 5-HTTLPR polimorfizmine göre 55 bireyden oluşan şizofreni grubunda 17 birey (%30.9) L/L genotipinde, 23 birey (%41.8) L/S genotipinde ve 15 birey (%27.3) de S/S genotipinde bulundu. Otuz iki kişiden oluşan kontrol grubunda 9 birey (%28.1) LL genotipinde, 16 birey (%50.0) L/S genotipinde ve 7 birey (%21.9) S/S genotipinde bulundu (Tablo IV.5).

Tablo IV.5. Serotonin taşıyıcı gen 5-HTTLPR polimorfizmi genotip frekansları

Gruplar	Genotipler							
	L/L		L/S		S/S		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hasta	17	30.9	23	41.8	15	27.3	55	100.0
Kontrol	9	28.1	16	50.0	7	21.9	32	100.0
Toplam	26	29.9	39	44.8	22	25.3	87	100.0

$$(\chi^2=0.58, p=0.745)$$

Hasta olan bireylerin 5-HTTLPR polimorfizminin kontrol grubundaki bireylere göre farklı olma riski (odds) 0.083 kez daha fazla bulunmuş, bu oran istatistiksel yönden önemli bulunmamıştır (CI %95 0.48; 1.78, $p=0.745$)

L aleline sahip bireyler S aleline sahip bireylere oranla 0.94 kat daha fazla risk grubunda bulunmalarına karşılık, bu riskin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (CI %95 0.51; 1.75, $p=0.868$).

Serotonin taşıyıcı geni, intron 2 VNTR ve 5-HTTLPR polimorfizmleri genotipleri bakımından hem hasta grubu, hem de kontrol grubu Hardy Weinberg dengesindedir. Buna göre şizofreni, serotonin taşıyıcı genine ait polimorfizmlerin genotip dağılımında herhangi bir farklılığa neden olmamıştır.

V. TARTIŞMA

Bu çalışmada şizofreni ile serotonin taşıyıcı genine ait VNTR ve 5-HTTLPR polimorfizmleri arasında ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla hasta ve kontrol gruplarının bireylerinden elde edilen DNA'larda serotonin taşıyıcı geninin polimorfizmlerine bakılarak her iki grup arasında alel ve genotip dağılımı açısından farklılık olup olmadığı incelenmiştir.

Deneyler sonucunda, hasta grubunda serotonin taşıyıcı gen intron 2 (STG in.2) VNTR polimorfizmi %71.8 oranında 12 alelli, %27.3 oranında 10 alelli, %0.9 oranında 9 alelli dağılımı saptandı. Kontrol grubunda ise 12 aleli %70.3, 10 aleli ise %29.7 oranında bulundu.

Bu polimorfizm açısından hasta grubunun %47.3'ü 12/12, %47.3'ü 12/10, %3.6'sı 10/10, %1.8'i ise 12/9 genotipine sahiptir. Kontrol grubundaki bireylerin %46.9'u 12/12, %46.9'u 12/10 ve %6.3'ü 10/10 genotipinde bulundu.

Hasta olan bireylerin STG in.2 VNTR polimorfizmi kontrol grubuna göre 1.13 kat fazla olmasına karşılık bu fazlalığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (CI %95 0.49; 2.63).

Serotonin taşıyıcı gen intron 2 geninin 12 (STG in.2.12) aleline sahip bireylerin 10 aleline sahip bireylere oranla 1.07 kat daha fazla risk taşıdığı, ancak bu riskin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (CI %95 0.54; 2.12 p=0.832).

Farklı popülasyonlarda STG in.2 VNTR polimorfizmi sağlıklı bireylerde çalışılmıştır. Almanya'da gen frekansları 12 aleli için %54.1, 10 aleli için %44.5 ve 9 aleli için %1.4 olarak; İspanya'da 12 aleli için %66.05, 10 aleli için %32.1 ve 9 aleli için %1.85; Avrupa kökenli Amerikalılarda 12 aleli için %63, 10 aleli için %34 ve 9 aleli için %3; Afrika kökenli Amerikalılarda 12 aleli için %75, 10 aleli için %24 ve 9 aleli için %1 olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızdaki kontrol gruplarına ait VNTR polimorfizmi alellerinin dağılımı (%70.3 oranında 12 aleli ve %29.7 oranında 10 aleli) İspanyol sağlıklı bireylerdeki dağılımla benzerlik göstermektedir (38,47,51,65,66).

Alman popülasyonunda şizofreni ile STG in.2 VNTR polimorfizminin arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak üzere yapılan bir çalışmada; hasta grubunda

%60.0 oranında 12 aleli, %40.0 oranında 10 ve 9 aleli dağılımı saptanmıştır. Kontrol grubunda ise %55.0 oranında 12 aleli, %45.0 oranında 10 ve 9 aleli dağılımı saptanmıştır. Genotip yönünden hasta grubunda %37.0 oranında 12/12, %46.0 oranında 12/10, %16.0 oranında 10/10, %2.5 oranında 12/9 dağılımı saptanmıştır. Kontrol grubunda genotip yönünden %32.0 oranında 12/12, %41.0 oranında 12/10, %23.0 oranında 10/10, %4.0 oranında 12/9 dağılımı elde edilmiştir (67).

Bizim yaptığımız çalışmadaki 12 alelinin frekansı bu çalışmadaki değerden düşük çıkmıştır. Ayrıca 12/12 genotipine sahip hastaların oranı Alman popülasyonundaki 12/12 genotipine sahip hastaların oranından düşük çıkmıştır. Bu farklılığın popülasyonların farklı olmasından kaynaklandığı ileri sürülebilir.

Almanya'da multipleks (hastalıktan etkilenen en az iki kardeş ve anne-baba) ve simpleks (etkilenen bir çocuk ve anne-baba) ailelerle yapılan çalışmada; multipleks ailelerde STG in.2.12 transmisyonunun, 9 ve 10'un transmisyonundan önemli farklılık gösterdiği görülmüştür.(68).Bizim çalışmamızda aileler açısından karşılaştırma yapılmamıştır.

Kore popülasyonunda genin transkripsiyon başlangıç bölgesinde bir delesyon/insersiyon polimorfizminin şizofreninin şiddeti ile bir ilişkisinin olabileceği sonucuna varılmıştır (69).

Normandiya kökenli beyaz Kazaklarda yapılan iki çalışmada da STG in.2.12 polimorfizminin hiçbir aleli ya da genotipi arasında ilişki bulunamamış, sonuçta bu genin şizofreni etiyolojisinde önemli bir rol oynamadığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç bizim sonuçlarımızla benzerdir. Buna karşılık Taiwan'da Kafkas popülasyonunda yapılan STG in.2.12' nin yaygın olduğu ve şizofreni etiyolojisinde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (45,46,70).

Berlin'de şizoparanoid hastaların diğer şizofreni tipleri ve kontrol gruplarına göre STG.in.2.12 aleli için daha sık homozigotluk gösterdiği, STG in.2.9 alelinin şizofreninin rezidüel alt tipi için risk taşıdığı sonucuna varılmıştır. Pozitif ve negatif belirti ölçeğiyle yapılan ölçümlerde polimorfizm ve tedaviye yanıt arasında ilişki bulunmamıştır. Sonuç olarak 44 bp polimorfizminin şizoaffektif ve 17bp VNTR polimorfizminin şizofreninin rezidüel alt tipi ile ilişkisinin olabileceği kanısına varılmıştır (71).

Gaziantep'te serotonin taşıyıcı gen VNTR polimorfizmi ile şizofreniye yatkınlık ve hastalığın klinik alt tipleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (40,41).

Bizim çalışmamızda alel ve genotip sıklığına bakılmış olup çalışmaya aldığımız hasta sayısı az olduğu için şizofreninin alt tipleri açısından değerlendirme yapılmamıştır. Şizofreni ile STG in.2 VNTR polimorfizmi arasında ilişki bulunmaması Gaziantep'te yapılan çalışmanın sonuçlarıyla benzer bulunmuştur.

Serotonin taşıyıcı geni 5-HTTLPR polimorfizminde hastalar %51.8 oranında L, %48.2 oranında S alel dağılımı göstermiştir. Kontrol grubundaki dağılım ise %53.1 L, %46.9 S olarak saptanmıştır. Hasta ve kontrol grubunda saptanan L ve S alellerinin kısmen benzer oranlarda olduğu görüldü, iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı.

Hastaların %30.9'u L/L, %41.8'i L/S ve %27.3'ü S/S genotipinde, kontrol grubunda da %28.1'i L/L, %50'si L/S ve %21.9'u da S/S genotipinde bulundu.

Hasta grubunda 5-HTTLPR polimorfizmi kontrol grubuna göre 0.83 kat fazla olmasına karşılık bu fazlalığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (CI %95 0.48; 1.78).

L aleline sahip bireyler S aleline sahip bireylere göre 0.94 kat daha fazla risk grubunda bulunmalarına karşılık bu riskin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (CI %95 0.51; 1.75 p=0.868).

Serotonin taşıyıcı geni 5-HTTLPR polimorfizmi de farklı popülasyonlarda çalışılmış olup elde edilen gen frekansları Almanya'da L aleli için %60, S aleli için %40; İtalya'da L aleli için %57.2, S aleli için %42.7; İngiltere'de L aleli için %55, S aleli için %45; Avrupa kökenli Amerikalılarda L aleli için %53, S aleli için %47; Fransa'da L aleli için %61, S aleli için 39; Libya'da L aleli için %52, S aleli için %46; Tunus'da L aleli için %53, S aleli için %46; Fas'ta L aleli için %51, S aleli için %49 olarak ve İsrail'de L aleli için %44, S aleli için %56 olarak saptandığı belirtilmiştir (47,65,66,72).

Bu çalışmada yapılan 5-HTTLPR polimorfizminin alellerinin kontrol grubundaki dağılımı, özellikle Avrupa kökenli Amerikalılar ve Tunus'taki sağlıklı bireylerin alellerinin dağılımı ile benzerlik göstermektedir.

Bizim çalışmamızda, özellikle 5-HTTLPR olmak üzere her iki polimorfizme ait alel ve genotiplerin hasta ve kontrol gruplarında farklı oranlarda dağılıma sahip olmaları beklenmiştir.

Serotonin taşıyıcı geni 5-HTTLPR polimorfizminde L aleline sahip hücrelerin S/S genotipine sahip hücrelerden iki kattan daha fazla promotor aktivitesi göstererek, L/L genotipine sahip hücrelerin L/S genotipine sahip hücrelerden 1.4 kat, S/S genotipine sahip hücrelerden ise 1.7 kat daha fazla stabil konsantrasyonda serotonin taşıyıcı geni mRNA'sı sentezlendiği ileri sürülmüştür. Bu özellikler dikkate alınarak yapılan pek çok nörolojik ve psikiyatrik çalışmaların bazılarında oldukça anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (35,39,47,48,57).

Gaziantep'te yapılan çalışmada kontrol grubunun %29.8'i L/L, %38.8'i S/L, %31.4'ünün S/S; şizofreni hastalarının %23'ünün L/L, %50'sinin S/L, %27'sinin S/S genotipinde olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla benzerdir (40,41).

Taiwan'da yapılan çalışmada 5-HTTLPR varyantlarının şizofreninin klinik belirtilerinin ortaya çıkmasında ve klozapine yanıtta önemli rol oynamadığı, Çin'de yapılan çalışmada 5-HTTLPR şizofreni polimorfizmi ile şizofreni arasındaki ilişki çalışmasında şiddet davranışıyla ilişkili ancak intiharın kendisi ve şizofreni ile ilişkisiz olduğu bulunmuştur (73,74).

Almanya'da affektif ya da şizoaffektif bozukluğu olan hastalar kontrollerle karşılaştırıldığında promotor gen varyantı ile ilişkisiz, şizofreninin dezorganize alt tipinin serotonin taşıyıcı gen promotorunun homozigot uzun formu (L) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Brezilya'da alel sıklığı ve genotipleri açısından yapılan çalışmada 5-HTTLPR polimorfizminin önemli rol oynamadığı sonucuna varılmıştır (75,76).

Fransa Kafkaslarında yapılan çalışmada, şiddet davranışıyla 5-HTTLPR polimorfizminin ilişkili, ancak intiharla ilişkisiz olduğu bulunmuştur (77).

İtalya’da 5-HTTLPR polimorfizminin şizofreni psikopatolojisiyle ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, 5-HTTLPR polimorfizminin manik, depresif, sanrısız ya da dezorganize belirtilerle ilişkisinin olduğu bulunmuş, ancak şizofreninin psikopatolojisiyle ilişkili bulunmamıştır. İtalya’da yapılan bir başka çalışmada da 5-HTTLPR polimorfizminin bipolar affektif bozukluk ve şizofreni ile ilişkisi bulunamamıştır (78,79). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde serotonin taşıyıcı geni 5-HTTLPR ile şizofreni psikopatolojisi arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

5-HTTLPR açısından intihar edenlerin alellerine bakıldığında, S alelinin L aleline göre oldukça yüksek oranda bulunduğunu bildiren bir araştırma grubu, bu alelin klinik değerlendirmelerde etkili olabileceğini ileri sürmüştür (80).

Parkinson hastalığının ileri dönemlerinde ortaya çıkan depresyon ile 5-HTTLPR polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran bir grup tarafından, S alelinin istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir biçimde fazla olduğu bildirilmiştir (81).

Otizm ile ilgili olarak yapılan çalışmada ise hasta grubundaki 5-HTTLPR polimorfizmi değerlendirildiğinde, L aleli S alelinden oldukça fazla bulunmuştur. Ancak VNTR polimorfizmi açısından incelendiğinde alellerin dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunamadığı rapor edilmiştir (66,82,83).

Bu bilgiler serotonin taşıyıcı geni aktivitesinin belki transkripsiyonun oranıyla da etkileşebileceği ve klinik olarak değerlendirilebilecek değişimlere neden olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Belki de serotonin taşıyıcı geninin polimorfik özellikleri çevresel etkenlerle beraber etkileşime girerek şizofreni etiyolojisinde rol oynuyor olabilir. Bu çalışmada olduğu gibi, tek başına şizofreni ile ilişkili bulunamayan serotonin taşıyıcı geni diğer nörotransmitter sistemlerine ait polimorfik özelliklerle de beraber kombine bir şekilde çalışıldığında daha sağlıklı sonuçlar elde edilebilir.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genetik yatkınlığın şizofrenide önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Ancak bu durum, şizofreni tanısı konan tüm olguların kromozomlarında söz konusu yatkınlığı taşıdıkları anlamına gelmez.

Şizofrenin genetik yönleriyle ilgili olarak farklı alanlarda çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmada, en önemli nörotransmitterlerden biri olan serotoninin, taşıyıcı geninin genetik polimorfizmi ile şizofreni arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, serotonin taşıyıcı genine ait polimorfizmlerin şizofreni ile ilişkili olabileceği yönünde bir sonuca varılamamıştır.

Sonuç olarak, şizofreni etiyolojisinde rol oynadığı düşünülen çeşitli risk etkenleri ve genlerle yapılacak çalışmalar anlamlı sonuçlar verebilir. Ayrıca örnek sayısı artırılarak serotonin taşıyıcı geni polimorfizmleri ile diğer nörotransmitter genlerine ait polimorfizmler şizofreni etiyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

VII. KAYNAKLAR

1. Kaplan HI, Sadock BJ: Klinik Psikiyatri El Kitabı. Abay E (eds.) 2. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 1999, s.74-82.
2. Öztürk O: Ruh Sağlığı ve Bozuklukları. 9. baskı, Ankara, Hekimler Yayın Birliği, 2002, s.217-274.
3. Kültür S, Mete L: Şizofreni. Güleç C, Köroğlu E (eds.): Psikiyatri Temel Kitabı'nda, 1. baskı, cilt 1, Ankara, Hekimler Yayın Birliği, 1997, s.321-352
4. Yüksel N: Ruhsal Hastalıklar. Yenilenmiş 2. baskı, Ankara, Çizgi Tıp Yayınevi, 2001, s.256-302.
5. Meltzer HY, Fatemi H: Şizofreni. Birsöz S, Karaman T (eds.): Current Psikiyatri Tanı ve Tedavi'de, Ankara, Güneş Kitabevi, 2003, s.261-270.
6. Ceylan ME: Şizofreni: Yeni gelişmeler. Ege Psikiyatri Sürekli Yayınları 1996; 1(4):493-518.
7. Doğan O: Psikiyatrik Epidemiyoloji. İzmir, Ege Psikiyatri Yayınları, 2002, s.15-28.
8. Kaplan HI, Sadock BJ: Klinik Psikiyatri. Abay E (çev. eds.) İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2004, s.121-138.
9. Yüksel N, Öncüoğlu HE: Şizofreninin genetiği. Dilbaz N, Bayam G (eds.): Şizofrenide Yeni Ufuklar'da, Ankara, Som Ofset Matbaacılık, 1997, s.13-20.
10. Yüksel N: Şizofreni Tarihçesi.Şizofreni Dizisi 1998; 1:5-16.
11. Kendler KS, Gruenberg AM, Mc Guire M: Roscommon family study: methods, diagnosis of probands and risk of schizophrenia in relatives. Arch Gen Psychiatry 1993; 50:527.
12. Reveley MA, Deakin JFW: Şizofreninin Psikofarmakolojisi. İstanbul, Yelkovan Yayıncılık, 2002, s.75-85.

13. Yüksel N: Psikofarmakoloji. 2. baskı, Ankara, Çizgi Tıp Yayınevi, 2003, s.56-58.
14. Yüksel N: Psikofarmakoloji. 1. baskı, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998, s.49-60.
15. Tamam L, Zeren T: Depresyonda Serotonerjik Düzenekler.Klinik Psikiyatri Dergisi 2002;5(Ek Sayı 4):11-18.
16. Aranz M, Collier D, Sodhi M: Association between clozapine response and alelik variation in 5-HT2A reseptor genes. Lancet, 1995;346:281-282.
17. Malhotra AK, Goldman D, Ozaki D: Lack of association between polymorphizm in the 5-HT2A reseptor gene and antipsychotic response to clozapine. Am J Psychiatry 1996; 145:1092-1094.
18. Işık E: Şizofreni. Genişletilmiş 2. baskı, Ankara, Kent Matbaacılık, 1997, s.27-62.
19. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. IV. Press, Washington, The American Psychiatric Association, 1994.
20. Lesch K-P, Bengel D, Heils A, Sobol SZ, Greenberg B, Petri S: Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. Science 1996; 274:1527-1531.
21. Ohara K, Suzuki Y, Ochiani M, Tsukomato T, Tani K: A variable-number tandem repeat of the serotonin transporter gene and anxiety disorder. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1999; 23:55-65.
22. Yılmaz M, Erdal ME, Herken H, Çataloluk O, Barlas Ö, Bayazıt Y: Significance of the serotonin transporter gene polymorphism in migraine. J Neurol Sci 2001; 186:27-30.

23. Ogilvie A, Battersby S, Bubb V, Fink G, Harmar A, Goodwin G: Polymorphism of serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 1996; 347:731-733.
24. Kunugi H, Hattori M, Kato T, Tatsumi M, Sakai T, Sasaki T: Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic, difference and possible association with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 1997; 2:457-62.
25. Hoehe MR, Wendel B, Grunewald I, Chiarani P, Levy N, Morris-Rosendahl D: Serotonin transporter gene polymorphism are not associated with susceptibility to mood disorders. *Am J Med Genet* 1998; 7:1-3.
26. Joao R, Mendes de Oliveira JR, Paulo AO, Homero V, Valeria L, Helio E: Analysis of a novel functional polymorphism within the promotor region of the serotonin transporter gene (5HTT) in Brazilian patients affected by bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet* 1998; 81:225-227.
27. Cook EH, Courchesne R, Lard C, Cox NJ, Yan S, Lincoln A: Evidence of linkage between the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia. *Hum Genet* 1998; 103:319-322.
28. Offenbacher M, Bondy B, de Jonge S, Glatzeder K, Krüger M, Scoeps P: Possible association of fibromyalgia with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Arthritis&Rheumatism* 1999; 42:2482-2488.
29. Ogilvie AD, Russel MB, Dhall P, Battersby S, Ulrich V, Smith CA: Altered allelic distribution of the serotonin transporter gene in migraine without aura and migraine with aura. *Cephalalgia* 1998; 18:23-26.
30. Collier DA, Sham PC: The unusual suspects: tyrosine hydroxylase and the serotonin transporter in affective disorders. *Mol Psychiatry* 1998; 3:103-105.

31. Herken H, Erdal ME, Mutlu N, Barlas Ö, Cataloluk O, Oz F: Possible association of temporomandibular joint pain and dysfunction with a polymorphism in the serotonin transporter gene. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; 120:308-313.
32. Yüksel N: Serotonin ve şizofreni. *Şizofreni Dizisi* 1999; 2:58-67.
33. Abay E, Ateş İ: Psikiyatrik bozuklukların tedavisinde farmokogenomik. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2002; 12:31-36.
34. Stahl SM: *Essential Psychopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications*. United Kingdom.Cambridge University Press, 1996, s.69-130.
- 35.Catalano M: 'Psychiatric genetics' 99. The challenges of psychopharmacogenetics. *Am J Hum Genet* 1999; 65:606-610.
- 36.Özkaya M: Parkinson Hastalarında Serotonin Transporter Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması. *Yayımlanmamış Uzmanlık Tezi*, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2003.
37. Melikian HE, Moore KR, Qian Y, Kimmel HL, Taylor SB, Gereau RW: Structure and function of plasma membrane serotonin transporters. *Soc Neurosci* 1993; 19:206.
38. Buck KJ, Amara SG: Dopamine/norepinefrine transporter chimeras: delination of structural domains involved in substrate and inhibitor selectivity. *Soc Neurosci* 1993; 19:12-40
39. Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL: Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Trans* 1994; 95:157-162.
40. Herken H, Erdal ME, Aynacıoğlu AS, Barlas O, Cataloluk O, Esgi K: Frequency of the 17-bp variable number of tandem repeat polymorphism in Turkish schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2002; 58:99-100.

41. Herken H, Erdal ME, Esgi K, Barlas Ö, Erdal N, Ayancıoğlu Ş: Şizofrenili Hastalarda Serotonin Taşıyıcı Gen Polimorfizmi. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 2001; 11:4.
42. Rosental NE, Mazzanti CM, Barnett RL, Hardin TA, Turner EH, Lam GK: Role of the serotonin transporter repeat Length polymorphism (5HTTLPR) in seasonality and seasonal affective disorder. Mol Psychiatry 1998; 3:175-177.
43. Furlong RA, Ho L, Walsch C, Rubinsztein JS, Jain S, Paykel ES: Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphism in bipolar and unipolar affective disorders. Am J Med Genet (Neuropsychiatr Gen) 1998; 81:58-63.
44. Rees M, Norton N, Jones L, Mc Candless F, Scourfield J, Holmans P: Association studies of bipolar disorders at the human serotonin transporter gene. Mol Psychiatry 1997; 2:398-402.
45. Bonnet-Brilhaut F, Laurent C, Thibaut F, Campion D, Chavand O, Samolyk D: Serotonin transporter gene polymorphism and schizophrenia: an association study. Biol Psychiatry 1997; 42:634-636.
46. Bonnet-Brilhaut F, Laurent C, Thibaut F, Campion D, Martinez M, Petit M: Serotonin transporter gene polymorphism and schizophrenia: an association study. Schizophr Res 1998; 29:128.
47. Gelertner J, Kranzler H, Coccaro E: Serotonin transporter protein gene polymorphism and personality measures in African American and European American Subjects. Am J Psychiatry, 1998; 155:1332-1338.
48. Benedetti F, Seretti A, Colombo C: Influence of functional polymorphism within the promoter of serotonin transporter gene on the effects of total sleep deprivation in bipolar depression. Am J Psychiatry 1999; 156:1450-1452.
49. Vincent JB, Masellis M, Lawrence J, Choi V, Gurling H, Parikh VS: Genetic Association Analysis of Serotonin System Genes in Bipolar Affective Disorder. Am J Psychiatry 1999; 156:136-138.

50. Mann JJ, Huang Y, Underwood MD, Kassir SA, Oppenheim S, Kelly TM: A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57:729-738.
51. Gutierrez B, Pintor L, Gasto C: Variability in the serotonin transporter gene and increased risk for major depression with melancholia. *Human Genet* 1998; 103:319-322.
52. Courtet P, Buresi C, Abbar M, Baud P, Boulenger JP, Castelnau D: No association between non-violent suicidal behavior and the serotonin transporter promoter polymorphism. *Am J Med Genet* 2003; 116B:72–76.
53. Lenzinger E, Neumaster A, Praschak-Reader N: Behavioral effects of tryptophan depletion in seasonal affective disorder associated with the serotonin transporter gene. *Psychiatry Res* 1999; 22:241-246.
54. Gursoy S, Erdal ME, Herken H, Madenci E, Alasehirli B: Absence of association of the serotonin transporter gene polymorphism with the mental healthy subset of fibromyalgia syndrome. *Clin Rheumatology* 2002; 21:194-197.
55. Michaelovsky E, Frisch A, Rockah R: A novel allele in the promoter region of the human serotonin transporter gene. *Mol Psychiatry* 1999; 4:97-99.
56. Heils A, Teufel A, Petri S: Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 1996; 66:2621-2624.
57. Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H: The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry* 2000; 5:32-38.
58. Blakely RD, Felice LJ, Hartzell HC: Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol* 1994; 196:263-281.

59. Lesch KP, Aulakh CS, Wolozin BL, Tolliver TJ, Hill JL, Murphy DL: Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. *Mol Brain Res* 1993; 17:31-35.
60. Mitchell R, Hollist S, Rothwell C, Robertson WR: Age related changes in the pituitary-teticular axis in normal men; lower serum testosterone results from decreased bioactive LH drive. *Clin Endocrinol* 1995; 42:501-507.
61. Başaran N: Tıbbi Genetik Ders Kitabı. 7. baskı, Ankara, Güneş ve Nobel Tıp Kitabevleri, 1999, s.120-131.
62. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. İkinci baskı, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
63. Akar N: *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*. Birinci baskı, Ankara, A.Ü. Tıp Fakültesi Bilimsel Yayınlar Serisi, 2000, s.95-135.
64. Yüksel N: Şizofreninin Genetiği. *Şizofreni Dizisi* 1999; 3:94-101.
65. Hammoumi S, Payen A, Favre JD: Does the short variant of the serotonin transporter linked polymorphic region constitute a marker of alcohol dependence? *Alcohol* 1999; 17:107-112.
66. Klauck SM, Pautska F, Benzer A: Serotonin transporter (5-HTT) gene variants associated with autism. *Hum Mol Genet* 1997; 6:2233-2235.
67. Stöber G, Jatzke S, Heils A, Junkunz G, Fuchs E, Knapp M: Susceptibility for schizophrenia is not influenced by a functional insertion/deletion variant in the promotor of serotonin transporter gene. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1998; 248:82-86.
68. Schwab SG, Hranilovic D, Eckstein G, Jernej B, Knapp M, Lerer B : Evidence for association/disequilibrium of the intronic VNTR-17 of the serotonin transporter gene with schizophrenia. *Schizophr Res* 2000; 41:93.

69. Paik IH, Lee C, Kim JJ, Lee SJ, Lee CU, Jung KI: Analysis of a functional serotonin transporter gene polymorphism of normal control and patients with schizophrenia in Korean population. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002; 12:263.
70. Tsai S-J, Ouyang W-C, Hong C-J: Association for serotonin transporter gene variable number tandem repeat polymorphism and schizophrenic disorders. *Neuropsychobiology* 2002; 45:131-133
71. Kaiser R, Tremblay P-B, Schmider J, Henneken M, Dettling M, Müller-Oerlinghausen B: Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparanoïd and residual subtypes of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001; 6:179-185.
72. Collier DA, Stober G, Li T: A novel functional polymorphism with in the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol Psychiatry* 1996; 1:453-460.
73. Tsai SJ, Hong CJ, Yu YW-Y, Lin C-H, Song H-L, Lai H-C: Association study of a functional serotonin transporter gene polymorphism with schizophrenia, psychopathology and clozapine response. *Schizophr Res* 2000; 44:177-181.
74. Chong S-A, Lee W-L, Tan C-H, Tay AH-N, Chan AO-M, Tan E-C: Attempted suicide and polymorphism of the serotonin transporter gene in Chinese patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2000; 97:101-106 .
75. Mendes de Oliveira JR, Otto PA, Vallada H, Lauriano V, Elkis H, Lafer B: Analysis of a novel functional polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene (5-HTT) in Brazilian patients affected by bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genetics)* 1998; 81:225-227.
76. Eichhammer P, Putzhammer A, Angermueller L, Sator H, Klein HE, Schoeler A: Serotonin transporter promoter gene variants in affective, schizoaffective and schizophrenic disorders. *Schizophr Res* 2000; 41:93.

77. Bayle FJ, Leroy S, Gourion D, Millet B, Olie JP, Poirier MF: 5-HTTLPR polymorphism in schizophrenic patients: further support for association with violent suicide attempts. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 2003; 119B:13-17.
78. Serreti A, Catalona M, Smeraldi E: Serotonin transporter gene is not associated with symptomatology of schizophrenia. *Schizophr Res* 1999; 35:33-39.
79. Serretti A, Lilli R, Lorenzi C, Lattuada E, Cusin C, Smeraldi E: Serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and major psychoses. *Mol Psychiatry* 2002; 7:95-99.
80. Bondy B, Erfurth A, Jonge S, Krüger M, Meyer H: Possible association of the short allele of the serotonin transporter promoter gene polymorphism (5-HTTLPR) with violent suicide. *Mol Psychiatry* 2000; 5:193-195.
81. Mossner R, Henneberf A, Schmitt A, Syagailo YV, Grassla M, Hennig T: Allelic variation of serotonin expression is associated with depression in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 2001; 6:350-352.
82. Ball D, Hill L, Freeman B, Eley TC, Strelau J, Riemann R: The serotonin transporter gene and peer-rated neuroticism. *Neuroreport* 1997; 8:1301-1304.
83. Flory JD, Manuck SB, Ferrell RE: Neuroticism is not associated with the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism. *Mol Psychiatry* 1999; 4:93-96.

VIII. EKLER**PSİKİYATRİ-GENETİK ÇALIŞMA FORMU**

HASTALIK GRUBU:

SIRA NO:

ADI SOYADI:

CİNSİYETİ:

YAŞI:

MESLEĞİ:

HASTALIK TANISI:

HASTALIK SÜRESİ:

AKRABA EVLİLİĞİ:

VAR()

YOK()

AKRABA EVLİLİK DERECEŚİ:

AİLEDE BENZER HASTALIK ÖYKÜSÜ: VAR()

YOK()

AİLEDE BAŞKA HASTALIK ÖYKÜSÜ: VAR()

YOK()

KONJENİTAL ANOMALİ ÖYKÜSÜ:

DSM-IV TANI ÖLÇÜTLERİ

A. Karakteristik semptomlar: Bir aylık bir dönem boyunca (başarı ile tedavi edilmişse daha kısa bir süre), bu sürenin önemli bir kesiminde aşağıdakilerden ikisinin (ya da daha fazlasının) bulunması:

- (1) hezeyanlar (sanrılar)
- (2) hallüsinasyonlar (varsanılar)
- (3) dezorganize (karmakarışık) konuşma (örn. çağrışımlarda dağınıklık, sık sık konu dışı sapmalar gösterme ya da enkoherans)
- (4) ileri derecede dezorganize ya da katatonik davranış
- (5) negatif semptomlar, yani affektif donukluk (tekdüzelik), aloji (konuşamazlık) ya da avolisyon

Not: Hezeyanlar bizar ise ya da hallüsinasyonlar kişinin davranış ya da düşünceleri üzerine sürekli yorum yapmakta olan seslerden ya da iki ya da daha fazla sesin birbiriyle/birbirleriyle konuşmasından oluşuyorsa A Tanı Ölçütünden sadece bir semptomun bulunması yeterlidir.

B. Toplumsal/mesleki işlev bozukluğu: İş, kişilerarası ilişkiler ya da kendine bakım gibi önemli işlevsellik alanlarından bir ya da birden fazlası, bu bozukluğun başlangıcından önce erişilen düzeyin belirgin olarak altında kalmıştır (başlangıcı çocukluk ya da ergenlik dönemine uzanıyorsa, kişilerarası 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 daha kısa bir süre) A Tanı Ölçütünü karşılayan semptomları kapsamalıdır; prodromal ya da rezidüel semptomların bulunduğu dönemleri kapsayabilir. Bu bozukluğun belirtileri, prodromal ya da rezidüel dönemlerde, sadece negatif semptomlarla ya da A Tanı Ölçütünü karşılayan semptomları kapsamalıdır; prodromal ya da rezidüel semptomların bulunduğu dönemleri kapsayabilir. Bu bozukluğun belirtileri, prodromal ya da rezidüel dönemlerde, sadece negatif semptomlarla ya da A Tanı

Ölçütünde sıralanan iki ya da daha fazla semptomun daha hafif biçimleriyle (örn. acayip inanışlar, olağandışı algısal yaşantılar) kendilerini gösterebilir.

D.Şizoaffektif Bozukluğun ve Duygudurum Bozukluğunun dışlanması:Şizoaffektif Bozukluk ve Psikotik Özellikler Gösteren Duygudurum Bozukluğu dışlanmıştır, çünkü ya (1) aktif-evre semptomları ile birlikte aynı zamanda Majör Depresif, Manik ya da Mikst Epizodlar ortaya çıkmamıştır ya da (2) aktif-evre semptomları sırasında duygudurum epizodları ortaya çıkmışsa bile bunların toplam süresi aktif ve rezidüel dönemlerin süresine göre daha kısa olmuştur.

E.Madde kullanımının/genel tıbbi durumun dışlanması: Bu bozukluk bir maddenin (örn. kötüye kullanılabilen bir ilaç, tedavi için kullanılan bir ilaç) doğrudan fizyolojik etkilerine ya da genel tıbbi bir duruma bağlı olarak ortaya çıkmamıştır

F.Bir Yaygın Gelişimsel Bozuklukla olan ilişkisi: Otistik Bozukluk ya da diğer bir Yaygın Gelişimsel Bozukluk öyküsü varsa, ancak en az bir ay süreyle (başarıyla tedavi edilmişse daha kısa bir süre) belirgin hezeyan ya da hallüsinasyonlar da varsa Şizofreni ek tanısı konabilir.



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

SAYI : B.30.2.CUM.0.1H.00.00/

KONU :

01 / 04 / 2003

Karar No :

Etik Kurul Kararı : 2003 / 4

“Şizofreni Hastalarında Serotonin Taşıyıcı Gen EcoRI Polimorfizmi”adlı Araştırma Görevlisi Dr.Fatma ÇOKER’e ait Tıpta Uzmanlık Tezinin Yerel Etik Kurul Kararında uygun olduğuna ;

Karar Verilmiştir.

Prof.Dr.A.Oktay İSİK

Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ

Prof.Dr.Fahrettin GÖZE

Prof.Dr.Öge ÇETİNKAYA

Doç.Dr.Tijen KAYA

Doç.Dr.Okay BULUT

Doç.Dr.Serdar SOYDAN