

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

137834

**ŞİZOFRENİ HASTALARINDA MANGAN SÜPEROKSİT
DİSMUTAZ (Mn-SOD) GEN POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

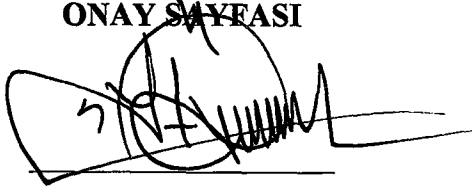
DOKTORA TEZİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÖMER AKYOL

ELAZIĞ, 2003

ONAY SAYFASI



Prof.Dr. Halis ÖCAK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof.Dr. Halit Elyas

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Halit ELYAS



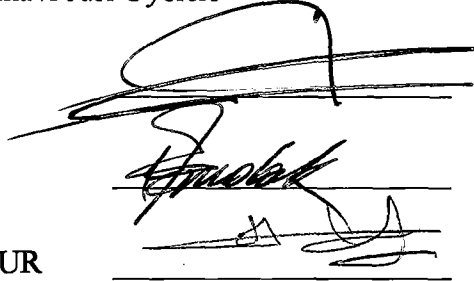
Doç.Dr. Halit CANATAN



Danışmanlar

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halit ELYAS

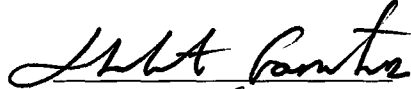


Prof. Dr. Turgay BUDAK



Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Doç. Dr. Halit CANATAN



Yrd. Doç. Dr. Haluk AKIN



TEŐEKKÖR

Bu tezin planlanıp yapılması ve yazılması esnasında her türlü desteğini gördüğüm ve aynı zamanda tez danışmanlarım olan Prof. Dr. Halit ELYAS ve Doç. Dr. Halit CANATAN'a; yanlarına her gittiğimde yoğun işleri arasında bana vakit ayırarak eksik olduğum konuları ikmal etmek için gayret sarfeden hocalarım Yrd. Doç. Dr. Haluk AKIN ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YÜCE'ye; bu çalışmanın başlangıcında konuya zemin teşkil eden fikirlerin olgunlaşması konusunda gayret sarfeden ve bazen benimle birlikte çalışan Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakóltesi Psikiyatri Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Hamdi TUTKUN, Doç. Dr. Hasan Herken ve Yrd. Doç. Dr. S. Salih ZOROğLU'na; biyolojik materyallerin toplanması ve hastaların tanı ve subtiplerinin belirlenmesinde yoğun çaba sarfeden Dr. Medaim YANIK ve Dr. Mustafa N. NAMLI'ya teşekkür ederim. Doktoraya başladığım andan itibaren yoğun işlerim arasında benim için bir çok sıkıntı ve zorluğa katlanarak maddi ve manevi fedakarlık gösteren, biricik kızlarımın annesi, değerli eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Şizofreni	5
3.1.1. Şizofreninin tanımı	5
3.1.2. Şizofreninin alt tipleri	5
3.1.3. Şizofreni hastalığının etyopatogenezi ile ilgili ileri sürülen teoriler	6
3.2. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler	10
3.2.1. Vücutta serbest radikal kaynakları	10
3.2.2. Serbest radikalleri yok edici enzimatik sistemler	13
3.2.3. Süperoksit dismutaz enziminin biyolojik fonksiyonu ve alt tipleri	15
3.2.4. Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) enziminin özellikleri	16
3.2.4.1. Enzim proteininin özellikleri	16
3.2.4.2. Mn-SOD geninin yapısı	18
3.2.4.3. Mn-SOD geninin kromozomal lokalizasyonu	20
3.2.4.4. Mn-SOD'un transkripsiyonel regülasyonu	20
3.3. Polimorfizm	23
3.3.1. Polimorfizmin tanımı	23
3.3.2. Polimorfizm çeşitleri ve tıpta kullanım alanları	23
3.4. Etyopatogenezinde serbest radikallerin rol aldığı iddia edilen bazı nöropsikiyatrik hastalıklar	24
3.5. Şizofreni etyopatogenezinde serbest radikal mekanizmaları ve antioksidan sistemler	26
3.5.1. Şizofrenide antioksidan sistemde meydana gelen değişiklikler	28
3.5.2. Şizofrenide hücre membranı ve fosfolipid metabolizmasındaki anormallikler	30

3.6.	Şizofrenide ailesel geçiş	32
3.7.	Şizofrenide riskli genleri tanımlamak için kullanılan yöntemler	33
3.7.1.	Şizofrenide sitogenetik anormallik alışmaları	34
3.7.2.	Şizofrenide moleküler genetik alışmaları	34
3.7.2.1.	Şizofrenide bağlantı alışmaları	34
3.7.2.2.	Şizofrenide asosiyasyon alışmaları	35
3.7.2.3.	Şizofreniden sorumlu aday gen alışmaları	37
3.7.3.	Şizofrenide günümüze kadar çalışılmış gen polimorfizmleri	38
3.8.	Bu tez çalışmasının amacı	38
4.	GEREÇ VE YÖNTEM	42
4.1.	Hastaların seçimi ve kan örneklerinin toplanması	42
4.2.	Örneklerin saklanması ve analizlere hazırlanması	43
4.3.	Deneylerde kullanılan kimyasallar maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar	43
4.4.	Kandan DNA izolasyonu	44
4.5.	Oligonükleotidler (primerler)	47
4.6.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	47
4.7.	Restriksiyon ve modifikasyon enzimleri	49
4.8.	Restriksiyon enzimi ile DNA'nın sindirim analizi	50
4.9.	Agaroz jel elektroforezi	51
4.10.	Deneylerde kullanılan marker DNA'ların hazırlanması	52
4.11.	Hasta ve kontrol numuneleri çalışılmadan önce yapılan ön hazırlık alışmaları	52
4.11.1.	DNA konsantrasyonunun PCR ürününün kalitesi üzerine olan etkisinin araştırılması	52
4.11.2.	Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisinin araştırılması	54
4.11.3.	Restriksiyon endonükleaz aktivitesinin sindirim üzerine ve bant keskinliği üzerine etkisinin araştırılması	55
4.11.4.	İnkübasyon süresinin elde edilen bant kalitesine etkisinin araştırılması	57
4.12.	İstatistiksel analizler	58

5. BULGULAR	60
5.1. DNA konsantrasyonunun PCR ürününün kalitesi üzerine olan etkisi	62
5.2. Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisi	63
5.3. Restriksiyon endonükleaz aktivitesinin sindirim üzerine ve bant keskinliği üzerine etkisi	63
5.4. İnkübasyon süresinin elde edilen bant kalitesine etkisi	64
6. TARTIŞMA	80
7. KAYNAKLAR	98
8. ÖZGEÇMİŞ	110



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.	a) 52 no'lu şizofreni hastasının (Ş-52) DNA'sı kullanılarak yapılan PCR reaksiyonunda master miks katılmadan önce PCR tüpüne konulan total 20 µl'lik hacmi oluşturan bileşenler.	53
	b) DNA konsantrasyonunun PCR ürününe etkisinin araştırılması amacı ile yapılan PCR reaksiyon deneyinde oluşturulan master miksin bileşenlerinin toplu olarak gösterilmesi.	53
Tablo 2.	a) 28 no'lu şizofreni hastasından elde edilen DNA ile (konsantrasyonu 45 ng/µl) yapılan PCR deneylerinde master miks konulmadan önce PCR tüpüne pipetlenen bileşenlerin miktarı ve oranları.	54
	b) 121 no'lu kontrol bireyinden elde edilen DNA ile (konsantrasyonu 112 ng/µl) yapılan PCR deneylerinde master miks konulmadan önce PCR tüpüne pipetlenen bileşenlerin miktarı ve oranları.	55
	c) Primer konsantrasyonunun PCR ürününe ve restriksiyon enzim kesim kalitesine etkisinin araştırıldığı çalışmada primersiz olarak hazırlanan master miks solusyonu ve bileşenlerinin birbirine oranları.	55
Tablo 3.	a) Restriksiyon endonükleaz enziminin (<i>NgoM IV</i>) değişik konsantrasyonlarının bant keskinliği ve allel sindirimi üzerine etkisinin araştırılması amacı ile yapılan PCR deneyi için hazırlanan master miks solusyonunun bileşenleri ve oranları.	56
	b) Bant keskinliğine ve kalitesine restriksiyon enziminin (<i>NgoM IV</i>) ünitesinin etkisinin araştırılması amacı ile tüplere eklenen birbirinden farklı konsantrasyonlardaki enzim, bovin serum albumin ve 10X tamponun birbirine olan oranları ve deney ortamının oluşturulması.	57

Tablo 4.	PCR ürünlerinin sindirimi için restriksiyon enzimi ile yapılan inkübasyon işleminde (37°C) sürenin bant keskinliği ve kalitesine etkisinin araştırıldığı çalışmada tüplere eklenen bileşenler ve inkübasyon süreleri.	58
Tablo 5.	Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri.	60
Tablo 6.	Şizofreni hastalarının, hastalık alt tiplere göre ayrılması ve bu alt tipleri oluşturan hastaların özellikleri.	61
Tablo 7.	Şizofreni hastalarının tardiv diskinezi (TD) olup olmamasına göre sınıflandırılması ve bu sınıflamaya göre hastaların özellikleri.	62
Tablo 8.	Hastalar ve kontrollerdeki Ala-9Val polimorfizminin genotipi ve allel sıklıkları.	75
Tablo 9.	Hastalığın klinik alt tipi ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki.	76
Tablo 10.	Hastaların cinsiyeti ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki	77
Tablo 11.	Kontrol grubunun cinsiyeti ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki	77
Tablo 12.	Hastaların kullandığı antipsikotiklerin klorpromazin eşdeğerlikleri ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki.	78
Tablo 13.	TD olan ve olmayan hastalarda genotipler ve Ala-9Val polimorfizminin allel sıklıkları.	79

ŞEKİL LİSTESİ

	<i>Sayfa</i>
Şekil 1. Vücuttaki oksidan sistemlerin işleyişi ve buna karşı antioksidan sistemin etkileri.	11
Şekil 2. Süperoksit dismutaz (SOD) gen ailesinin şu ana kadar bilinen ve araştırılan vertebralılara ait değişim ağacı ve aralarındaki ilişki.	17
Şekil 3. İnsan Mn-SOD proteininin amino asit sırası (Gen bankası erişim numarası X07834).	17
Şekil 4. Mn-SOD geninin genomik organizasyonu.	19
Şekil 5. İnsan Mn-SOD geninin toplam nükleotid dizisi.	19
Şekil 6. Mn-SOD geninin ilk 150 nükleotidlik kısmında PCR reaksiyonunda üretilen 107 baz çiftlik bölgesi ile bu bölgenin üretilmesini sağlayan primerler, restriksiyon enzimi <i>NgoM</i> IV'ün tanıma sekansı, bu enzimin kesim noktası ile 27. baz çiftinde meydana gelebilecek T-C konversiyonunun kesime etkisinin şematik olarak gösterimi.	48
Şekil 7. İnsan MnSOD'unun mitokondrial hedef dizisinin iki polimorfik varyantında Chou-Fasman algoritmeleri ile yapılan tahmini analizin şematik gösterimi.	90

RESİM LİSTESİ

	<i>Sayfa</i>
Resim 1. a) Kullanılan DNA konsantrasyonunun elde edilen bant keskinliği ve kalitesine etkisi.	66
Resim 2. a) Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisi (Ş-28).	67
b) Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisi (K-121).	68
Resim 3. Restriksiyon endonükleaz aktivitesinin sindirim üzerine ve bant keskinliği üzerine etkisi.	69
Resim 4. İnkübasyon süresinin agaroz jelinde elde edilen DNAbant kalitesine etkisi.	70
Resim 5. Kontrol grubu bireylere ait örnek agaroz jel elektroforezi paterni (1)	71
Resim 6. Kontrol grubu bireylere ait örnek agaroz jel elektroforezi paterni (2)	72
Resim 7. Hastalara ait örnek Mn-SOD geninin agaroz jel elektroforezindeki DNA bantları (1)	73
Resim 8. Hastalara ait örnek Mn-SOD geninin agaroz jel elektroforezindeki DNA bantları (2)	74

KISALTMALAR LİSTESİ

Amino asitler

<u>Amino asit</u>	<u>Tek harfli kod</u>	<u>Üç harfli kod</u>
Alanin	A	Ala
Arjinin	R	Arg
Asparajin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Sistein	C	Cys
Glutamat	E	Glu
Glutamin	Q	Gln
Glisin	G	Gly
Histidin	H	His
İzolösin	I	Ile
Lösin	L	Leu
Lizin	K	Lys
Metiyonin	M	Met
Fenilalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Treonin	T	Thr
Triptofan	W	Trp
Tirozin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Bazlar

A	Adenin
C	Sitozin
T	Timin
G	Guanin

Nükleik asitler

DNA	deoksiribonükleik asit
mRNA	haberci RNA
RNA	ribonükleik asit
rRNA	ribozomal RNA
tRNA	transfer RNA

Süperoksit dismutaz (SOD) türleri

Cu,Zn-SOD	bakır, çinko SOD
EC-SOD	ekstrasellüler (hücre dışı) SOD
Fe-SOD	demir SOD
Mn-SOD	mangan SOD

Diğer

A	absorbans
---	-----------

AIMS	Abnormal Involuntary Movement Scale
bç	baz çifti (base pair)
BOS	beyin omurilik sıvısı
BPB	brom phenol blue
BSA	sığır (bovin) serum album
BT	bilgisayarlı tomografi
CAT	katalaz
Cu	bakır
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksisitidin trifosfat
dGTP	deoksiguanozin trifosfat
dTTP	deoksitimidin trifosfat
DNaz	deoksiribonükleaz
dNTP	deoksinükleotid trifosfat
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTT	dithiotreitol
EC	Enzyme Classification
EDTA	etilen diamin tetraasetik asit
EtBr	etidyum bromür
Fe ⁺²	ferroz demir
g	gravite
GABA	gama amino bütirik asit
5-HIAA	5-hidroksi indol asetik asit
GSH	indirgenmiş glutatyon
GSH-Px	glutatyon peroksidaz
GSH-Red	glutatyon redüktaz
GSSG	yükseltgenmiş glutatyon
H ⁺	hidrojen iyonu, proton
H ₂ O	su
H ₂ O ₂	hidrojen peroksit
HOCl	hipoklorat
HVA	homovalinik asit
kbp	kilobaz çifti
kDa	kilodalton
M	molar
MDA	malondialdehit
mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
Mn	mangan
MTS	mitokondrial hedefleme dizisi (mitochondrial targeting sequence)
NADP ⁺	yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH+H ⁺	indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	N-metil D-aspartat
NO [•]	nitrik oksit radikali
NO ₂ ⁻	nitrit
nt	nükleotid
O ₂ ⁻	superoksit radikali

O ₂	moleküler oksijen
OD	optik dansite
OH ⁻	hidroksil iyonu
·OH	hidroksil radikali
ONOO ⁻	peroksinitrit
PBS	tamponlanmış fosfat salin solusyonu
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PUFA	çoklu doymamış yağ asidi
RNaz	ribonükleaz
ROS	reaktif oksijen türleri
SNP	tek nükleotid polimorfizmleri (single nucleotide polymorphisms)
TBE	Tris-borat-EDTA
TD	tardive diskinezi
TNF	tumor necrosis factor
tNOS	total nitrik oksit sentaz
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
XC	xylene cyanole
XO	ksantin oksidaz
VBR	ventrikül-beyin oranı
Zn	çinko

ÖZET

Son yıllarda şizofreninin patofizyolojisinde serbest oksijen radikallerinin çok önemli fonksiyonu olduğuna dair bir hayli delil bulunmuştur. Bu bulgulardan hareketle bu çalışma vücutta antioksidan sistemin önemli bir üyesi olan mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) geninin polimorfizmi (Ala-9Val) ile şizofreni arasında bir ilişki olup-olmadığını araştırmak amacıyla yapıldı. Çalışmaya DSM-IV tanı kriterlerine göre şizofreni tanısı alan 153 hasta ve 196 sağlıklı gönüllü alındı. Hasta ve kontrol grubu cinsiyet ve yaş bakımından benzerdi. Çalışmada Mn-SOD geninin fonksiyonel polimorfizmi olan Ala-9Val polimorfizmi çalışıldı. Hastalar şizofrenin klinik alt tiplerine göre 3 alt gruba [paranoid şizofreni (n=81), disorganize şizofreni (n=32) ve rezidüel şizofreni (n=35)], tardiv diskinezi taşıyıp (n=23) taşıyamamasına (n=130) göre iki alt gruba, kullandıkları antipsikotik ajanların klorpromazin eşdeğerliğine göre iki alt gruba (300 mg/gün altı ve üstü, ayrıca 400 mg/gün altı ve üstü) ve ayrıca cinsiyetlerine göre de iki alt gruba ayrıldı.

Şizofreni ve kontrol grupları arasında allelik veya genotipik dağılım açısından önemli farklılıklar tespit edildi. Şizofrenide genomik dağılımlar [Ala/Ala 14 (%9.2), Ala/Val 106 (%69.3) ve Val/Val 33 (%21.6)] kontrol grubuna göre [sırasıyla 46 (%23.5), 83 (%42.3) ve 67 (%34.2)] anlamlı şekilde farklı idi ($p<0.0001$) (rakamlar hasta sayısını göstermektedir). Ayrıca tardiv diskinezi olan hastalarda Ala alleli düşük sıklıkta bulundu. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Bulgularımıza göre toplumumuz için Ala/Val genotipini taşımanın şizofreniye yatkınlık oluşturduğu söylenebilir. Ayrıca sonuçlarımız –9Ala Mn-SOD allelinin vücudun oksidatif strese karşı korunmasında ve aynı zamanda şizofrenik bireylerin tardiv diskineziden korunmasında yardımcı bir faktör olabileceğini göstermektedir. Mn-SOD gen polimorfizmi şizofreninin semptomatolojisini (kliniğini) etkileyebileceği için daha geniş bir hasta popülasyonunda tardiv diskinezi ile ilişkisinin araştırılmasına gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Mangan süperoksit dismutaz, gen polimorfizmi, şizofreni.

ABSTRACT

There are great evidences in recent years that free oxygen radicals play an important role in the pathophysiology of schizophrenia. The present study was performed to assess whether there is genetic association between a functional polymorphism (Ala-9Val) in the human manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) gene in schizophrenic patients (n=153) and healthy controls (n=196). The patients and controls were divided into two groups according to their gender to investigate the genomic polymorphism of Mn-SOD. Patients were also divided into two groups according to their symptoms having tardive dyskinesia (n=23) or not (n=130); three groups according to the subtypes of schizophrenia as paranoid schizophrenia (n=81), disorganized schizophrenia (n=32), and residual schizophrenia (n=35); two groups according to their antipsychotic drug doses as chlorpromazine equivalent (more and less than 300 mg/day, more and less than 400 mg/day).

Significant differences in the allelic or genotypic distribution between schizophrenics and controls were observed. Ala/Ala 14 (%9.2), Ala/Val 106 (%69.3), and Val/Val 33 (%21.6) genomic distrubition in schizophrenia was different from those of controls (46 [%23.5], 83 [%42.3], and 67 [%34.2], respectively) ($p<0.0001$) (digits represent the number of patients). Decreased Ala allele was found among patients with tardive dyskinesia showing no statistically significant differences ($p>0.05$).

These results suggest that -9Ala Mn-SOD allele may play a role in protecting the body against oxidative stress in schizophrenia and susceptibility to

schizophrenia. According to our findings, it can be suggested that Ala/Val genotype can make our population more vulnerable to schizophrenia. On the other hand, -9Ala Mn-SOD allele seems to be a important factor to be protecting of the body from oxidative stress and protecting of schizophrenic patients from tardive dyskinesia. Since Mn-SOD gene polymorphism may affect the symptomatology (clinic) of schizophrenia, the relationship between this polymorphism and tardive dyskinesia needs to be studied in a larger cohort.

Key words: Manganese superoxide dismutase, gene polymorphism, schizophrenia.



3. GİRİŞ

3.1. Şizofreni

3.1.1. Şizofreninin tanımı

Şizofreni, varsanı ve sanrılara eşlik eden davranış bozukluklarının görüldüğü, kişinin kendine özgü bir içe-kapanım dünyasına çekildiği ruhsal bir bozukluktur. Erken yaşlarda başlayarak hayat boyu devam eden, kötü seyirli ve kişilik yıkılması ile kendini gösteren bir hastalıktır (98). Semptomları bakımından heterojen özellikler gösterir ve yaşam boyu yaygınlığı yaklaşık %1'dir (158). Çok uzun zamandır şizofreninin ailesel geçiş gösterdiği bilinmekteydi. Ancak kalıtsal faktörlerin önemi yapılan ikiz, evlat edinme çalışmalarından elde edilen bilgiler ile anlaşılmıştır. Aile, ikiz, evlat edinme çalışmaları şizofreninin etiolojisinde genetik faktörlerin varlığını göstermektedir; fakat yapılan analizler bu geçişin Mendelian modelini göstermekte yetersiz kalmaktadır. Bir diğer deyişle, kalıtım şekli kompleks ve non-mendeliyandır. Şizofreninin ailesel yüküllüğünün bir gene mi, birkaç gene mi, yoksa çok daha fazla sayıda gene mi bağlı olduğu sorusunun yanıtı da halen çok açık değildir.

3.1.2. Şizofreninin alt tipleri

Şizofreninin alt tiplerine yönelik ilk çalışmalar çok eski tarihlerde yapılmıştır. Kraepelin's kitabının 1899 baskısında hebefreni, katatoni ve paranoid demans olmak üzere 3 tipte hastalık tarif edilmiştir: (147). Klasik tip şizofreninin sınıflandırılması için zamanla hastalığa birbirinden farklı bakış açıları içeren özellikler ortaya atılmıştır. Bir grup araştırmacı şizofrenleri negatif ve pozitif semptom göstermelerine göre iki sınıfa ayırırken daha başka araştırmacılar

patofizyolojisine göre Tip I ve Tip II şeklinde sınıflandırmışlardır (31). Bu şekilde bir sınıflamadan sonra asıl olarak akut ve kronik şizofreni sınıflamasında hastalığın başlangıç şekli ve klinik gidişatı dikkate alınarak sınıflandırmalara gidilmiştir. Yukarıda bahsedilen, semptomların özelliklerine göre yapılan sınıflama zamanla yerini psikopatoloji, kişilik özellikleri, sosyal fonksiyonlardaki ölçütler ve bozukluklara göre yapılan sınıflamaya bırakmıştır. Akut bir başlangıca sahip şizofreni hastalığının seyri öncül bulgularla başlayana göre daha hafif seyretmektedir. Hastanın yaşı, cinsiyeti, baskın semptomların niteliği, ailede başka hastanın olup-olmaması ve sosyal desteğinin bulunup-bulunmaması hastalığın seyrini etkilemektedir. Şizofreninin başlangıcı her zaman gürültülü belirtilerle olmayabilir, sinsi başlangıçlı da olabilir. Bu tip hastaların tanınması nispeten daha zor olabilmektedir. Hastalığın belirti yelpazesi çok geniştir. Bir belirtinin kümелendiği hastaların seyri ile başka belirtilerin kümелendiği hastaların tanısı aynı olmakla birlikte seyri farklı olabilir. Örnek olarak paranoid alttip disorganize alttipe göre daha iyi bir prognoza sahiptir. Amerikan Psikiyatri Birliğinin tanı sınıflamasına göre, (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV) (DSM-IV) şizofreninin 5 klinik alttipi bulunmaktadır: paranoid, disorganize, rezidüel, farklılaşmamış ve katatonik tip şizofreni (76).

3.1.3. Şizofreni hastalığının etyopatogenezi ile ilgili ileri sürülen teoriler

Şizofreni için günümüze kadar birbirinden farklı birçok patofizyolojik teori ortaya atılmıştır, halen de yeni teoriler üretilmektedir. Merkezi nörotransmitter sistemlerinde ve nöropeptidlerde değişiklikler, viral enfeksiyonlar, otoimmün fonksiyon bozuklukları, anormal prostaglandin sentezi ve daha birçok

teori ileri sürülmüştür. Bunların içinde en çok çalışılan ve aşama olarak belli bir düzeye gelinmiş olan hipotez “dopamin hipotezi”dir. Yukarıda sayılan hipotezlerin hiçbiri şizofreninin etyolojisini ve ortaya çıkan bulguları tam olarak izah edememektedir. Bunun da sebebi hastalığın etyopatogenezindeki heterojenliktir (97). Daha da önemlisi şizofreni hakkında bugüne kadar yapılan nörokimyasal ve nöroendokrin çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde çok büyük bir veri havuzunun oluştuğu ama bunların sentezi yapıldığında derli toplu herhangi bir teori ortaya çıkmadığı görülmektedir.

Literatürde tedavi edilmemiş şizofreni hastalarının beyinde monoamin metabolizmasının bozulduğuna dair bazı bulgular vardır (32,91,118). Bu hastaların beyin dokusunda dopaminerjik iletinin değiştiği ileri sürüldüğünden özellikle prefrontal kortekste yoğunluk gösteren dopamin nöronlarının şizofreni patogenezinde fonksiyon görebileceği belirtilmiştir. Dopamin, tirozin aminoasitinden elde edilen bir katekolamin olduğundan bu konudaki deneysel çalışmalar beyin tirozin düzeylerindeki değişmelerin prefrontal korteksten idare edilen bazı fonksiyonları etkilediğini göstermektedir (149). Şizofreni hastalarının beyin-omurilik sıvısında (BOS) dopaminin metaboliti olan homovalinik asitin (HVA) miktarı ölçülmüş ve sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında azaldığı bulunmuştur (160). Buna karşılık yapılan araştırmalarda plazma HVA düzeyinin şizofreni hastalarında kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (148). Beyin omurilik sıvısındaki HVA’nın beyinden kaynaklandığı gözönüne alındığında akla gelecek ilk olasılık merkezi dopamin metabolizmasında azalma (dolayısıyla miktarında artma) olduğudur. Diğer bir deyişle bu hastalarda dopaminerjik hiperaktivite sözkonusudur. Geleneksel antipsikotiklerin dopamin

reseptörlerinin blokajı üzerinden etki ettiği uzun zamandan beri bilinmektedir. Ayrıca D2 reseptör blokajı ile ilaç etkinliği arasında bir ilişki bulunduğunun ortaya konması ile şizofrenide dopamin teorisi kuvvet kazanmıştır. D2 reseptör blokajı daima prolaktin sekresyonunun stimülasyonu anlamı taşıdığından bu defa da şizofrenide prolaktin eksikliği teorisi ortaya atılmıştır. Günümüze kadar hiçbir araştırmacı prolaktinin antipsikotik etkinliğe katkı yaptığı şeklindeki bir ihtimali ekarte edememiştir (55). Diğer taraftan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri kullanılan şizofreni hastalarında psikotik semptomların alevlenmesi, şizofrenide glutamaterjik sinir iletilisinde hipofonksiyon olduğu hipotezinin ortaya atılmasına sebep olmuştur (68). Buna ilave olarak ayrıca şizofreni hastalarının hipokampusünde glutamat reseptör alt tiplerinin ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir (96). Bu bağlamda en son olarak ileri sürülen teorilerden biri, şizofreni hastalarının hipokampusünde glutamaterjik nöronlarda herhangi bir kayıp değil de fonksiyonel bir adaptasyon olduğu yönündedir (48). Şizofrenide serotonerjik sistemde bozukluk olduğunu göstermek için öne sürülen bulgular şöyle sıralanabilir:

- a) Kronik şizofrenlerde, kanda ve trombositlerde serotonin miktarlarında, BOS'ta da 5- hidroksi indol asetik asit (5-HIAA) değerlerinde artış görülür. Akut ve paranoid hastaların BOS 5-HIAA değerlerinde ise düşme görülür.
- b) Bilgisayarlı tomografide (BT) kortikal atrofi ve artmış ventrikül beyin oranı (VBR) gösteren hastalarla ajitasyon halinde bulunan hastalar düşük BOS 5-HIAA değerlerine sahiptir.
- c) Şizofreni hastalarında ve akrabaları şizofreni hastası olup kendileri normal olan kişilerde, BOS 5-HIAA değerleri ya yüksek ya da düşük bulunmaktadır (24).

Ayrıca şizofrenide noradrenerjik sistem ile GABAerjik sistem de etyolojide suçlanmaktadır.

Mitokondride sentez edilen ve henüz fonksiyonu tam olarak bilinmeyen ve günümüzde nöronal patolojilerde miktarının değiştiği tesbit edilmiş olan N-asetil aspartatın düzeyi şizofreni hastalarında düşük bulunmuştur. Bunun şizofreni ile bağlantısı bulunan prefrontal fonksiyon anormallikleri ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (157). Son yıllarda şizofrenide membran anormallikleri ile ilgili birçok hipotez ortaya atılmış olup, bunlarla ilgili ilk ayrıntılı derleme Horrobin ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (56). Buna göre membran fosfolipidlerinde azalma, fosfolipid yapılarında bozulma ve bunların sonucu olarak membran fonksiyonlarında normale göre önemli değişimler meydana gelmektedir. Membran yapılarında yapısal ve özellikle de fonksiyonel proteinlerin çoğu lipidlerin içinde gömülü durumda olduğundan lipidlerle ilgili her türlü bozukluk bu proteinlerin fonksiyonunu yerine getirememesine neden olmaktadır (56).

Beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzının da diğer birçok hastalık gibi şizofreniye yatkınlık oluşturabileceği, en azından şizofreni hastalığının seyrinde önemli etkileri olabileceği savunulmaktadır (88). Farklı kültürlerden gelen ve farklı sosyo-ekonomik duruma sahip olan hastaların hastalık seyrinin ve sonuçlarının birbirinden farklı olması, diyet alışkanlıklarının bu hastalığa etki ettiği teorisini kuvvetle desteklemektedir. Özellikle esansiyel çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) ve antioksidanların az alınması muhtemelen hastalık seyrini ve tedavi sonuçlarını negatif yönde etkilemektedir (87). Bu konu özellikle son yıllarda şizofreni tedavisinde antioksidan vitaminlerin kullanılması gerçeğini gündeme getirmiştir.

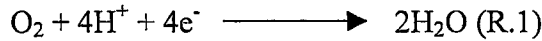
3.2. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler

Ortaklanmamış elektron taşıyan ve diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan atom veya moleküllere serbest radikal adı verilmektedir. İnsan vücudunda bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküler oksijen (O_2), yapısı itibarıyla radikal olmaya çok uygun olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir tabirle reaktif oksijen türleri (ROS) akla gelmektedir (60).

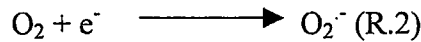
3.2.1. Vücutta serbest radikal kaynakları

İnsan vücudunda serbest radikallerin fizyolojik koşullarda oluşturulduğu birçok mekanizma ve metabolik yol vardır (Şekil 1). Bunlar kısaca özetlenecek olursa;

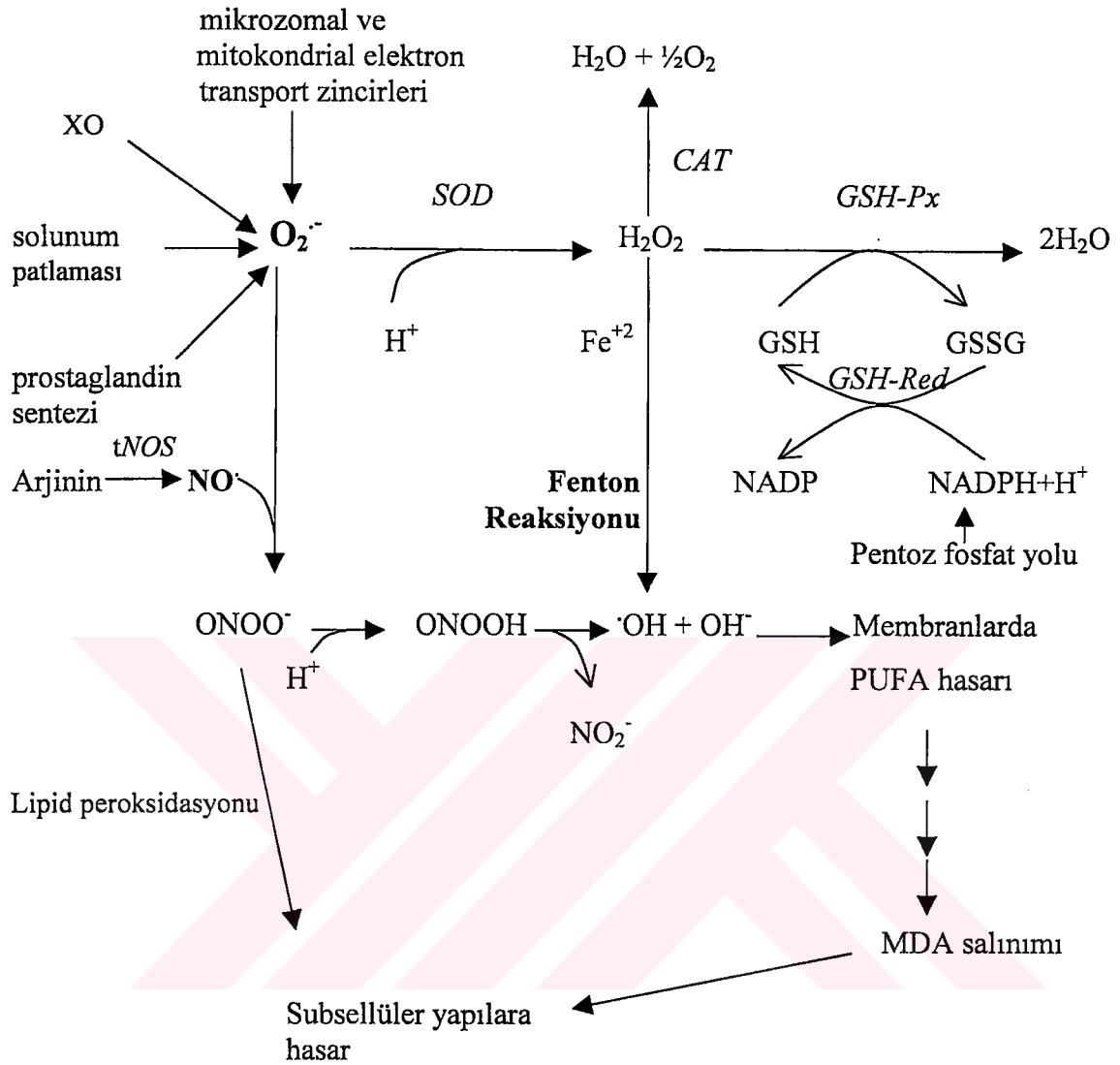
a) Mitokondrial elektron transport zinciri (103): Normal elektron akışı esnasında en son oluşan ürün su'dur (Reaksiyon 1, R.1).



Halbuki elektronların elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijenle direkt olarak reaksiyona girmesi süperoksit radikalini oluşturur (R. 2).



Mitokondrial solunum zincirinde akan elektronların yaklaşık olarak %1-2'si bu şekilde toksik bir ürünü oluşturmak üzere sızıntıya uğrar (18). Süperoksit radikallerinin üretimi ve salınımı iç mitokondri membranından sitozolik tarafa doğru olur. Bununla beraber, mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) aktivitesinin oldukça yüksek olmasına bağlı olarak mitokondrideki süperoksit düzeyi denge halinde tutulur ve yalnızca hidrojen peroksit, mitokondri membranını geçerek



Şekil 1. Vücuttaki oksidan sistemlerin işleyişi ve buna karşı antioksidan sistemin etkileri
 $O_2^{\bullet-}$: superoksit radikali, O_2 : moleküler oksijen, H^+ :hidrojen iyonu, proton, H_2O : su, SOD: süperoksit dismutaz, CAT: katalaz, H_2O_2 : hidrojen peroksit, GSH-Px: glutatyon peroksidaz, GSH: indirgenmiş glutatyon, GSSG: yükseltgenmiş glutatyon, GSH-Red: glutatyon redüktaz, NADPH+ H^+ : indirgenmiş nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, NADP $^+$: yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, Fe^{+2} : ferröz demir, OH^- : hidroksil iyonu, $\bullet OH$: hidroksil radikali (vücutta bulunan en toksik serbest oksijen radikali), tNOS: total nitrik oksit sentaz (neural NOS, endotelial NOS ve indüklenebilir NOS), NO: nitrik oksit radikali, $ONOO^-$: peroksinitrit, MDA: malondialdehit (membran fosfolipidlerinin peroksidasyonundan sonra elde edilen en son ürün), NO_2^- : nitrit, PUFA: çoklu doymamış yağ asidi, XO: ksantin oksidaz. (Akyol Ö. ve ark., Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry 2002; 26:995-1005 makalesinden alınarak adapte edilmiştir).

sitoplazmaya ulaşabilir (25).

b) Mikrozomal elektron transport zinciri: Endoplazmik retikulumda özellikle ksenobiyotiklerin metabolizmaları esnasında ve diğer endojen maddelerin metabolizması esnasında yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. Burada elektronların kaçak yaptığı en önemli yapı NADPH sitokrom P450 redüktaz enzimidir (129).

c) Miks fonksiyonlu oksidazlar: amino asit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidazlar, ksantin oksidaz (89) en önemlileridir. Bunlardan özellikle ksantin oksidaz pürin katabolizmasının en son iki reaksiyonunu katalizleyen enzim olarak bazı özel durumlarda fazla miktarda O_2^- üretir.

d) Solunum patlaması: Nötrofiller fagositoz esnasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdıkları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virus, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem ana hem de ara ürün olarak çok fazla miktarda ROS oluşur.

e) Prostaglandinlerin sentezi: Prostaglandinlerin sentez edildiği hem lipooksijenaz hem de siklooksijenaz ana metabolik yollarında farklı basamaklarda ROS üretilir.

Bunların dışında ayrıca bazı küçük moleküllerin oto-oksidasyonu (tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, antibiyotikler gibi) ROS oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Son olarak kişilerin maruz kaldığı bazı eksojen ajanlar da vücutta ROS oluşumuna sebep olmaktadır. Bunlar (stres, radyasyon,

İ.C. YILMAZ İSTANBUL KURULU
RADYASYON MERKEZİ

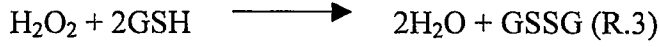
antineoplastik ajanlar, ksenobiyotikler, bağışıklık yapan bazı maddeler, hiperoksi, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, anestezi maddeler, sigara dumanı vb.) serbest radikallerin eksojen kaynakları olarak da adlandırılmaktadır (111).

İnsan vücudunda fizyolojik olarak veya maruz kalınan anormal koşullara bağlı olarak patolojik bir şekilde üretilen bu serbest radikalleri her seviyede engelleyebilecek antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu antioksidanlar etki etme tiplerine göre; baskılayıcı antioksidanlar (vitaminler, flavonoidler, mannitol, trimetazidin), yok edici antioksidanlar (mitokondri, sitoplazma ve hücre dışı alanda görev yapan antioksidan enzimlerin hepsi), zincir kırıcı antioksidanlar (fenoller ve aromatik aminler) ve tamir etkisine sahip antioksidanlar olmak üzere sınıflandırılabilir. Genel olarak bakıldığında endojen ve eksojen kaynaklı enzim olmayan antioksidanlardan bazıları şunlardır: glutatyon (β -alanil sisteinil glisin), A, C ve E vitaminleri, bilirubin, ürik asit, çift bağ ve redoks potansiyeline sahip grup taşıyan amino asitler, seruloplazmin, laktoferrin, transferrin, albumin, hemoglobin, taurin, pirüvat, glukoz, melatonin, oksipurinol, ve son olarak demir şelatörleri olan karnozin ve homokarnozin.

3.2.2. Serbest radikalleri yok edici enzimatik sistemler

Glutatyon peroksidaz (EC 1.11.1.9): Dört protein alt ünitesinden oluşan bir antioksidan enzimdir. Bu tetramerik yapıların herbiri aktif bölgelerinde selenyum elementi taşır ve aktif katalizde bu element prostetik grup olarak önemli fonksiyon görür. Vücudun bütün doku ve hücrelerinde bulunmakla birlikte organlara göre farklılıklar mevcuttur: karaciğerde en yüksek aktivitede, akciğer, kalp ve beyinde daha az aktivitede, kasta ise en az aktivitede olduğu saptanmıştır. Hücre içinde sitoplazmada ve mitokondride daha yoğun olarak bulunur. İlk kez

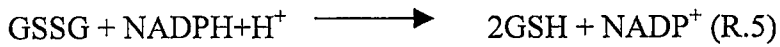
memeli eritrositlerinde, daha sonra da hayvan dokularında varlığı gösterilmiştir (140). Vücutta hidrojen peroksitin (H_2O_2) detoksifikasyonunda (R.3) ve ayrıca lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda görev alır. Koenzim olarak glutasyonu (GSH) kullanır.



Katalaz (EC 1.11.1.6): Dört adet alt üniteden oluşmuş glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Prostetik grup olarak her bir alt ünitenin aktif merkezinde heme grubuna bağlı bir Fe^{+3} atomu taşır. Karaciğer, böbrek ve eritrositte çok yüksek aktivitede, beyin, kalp, iskelet kası ve destek dokusunda daha az aktivitede olduğu tespit edilmiştir. Hücrenin özellikle peroksizom partikülleri ve mitokondrilerinde, daha az yoğunlukta ise sitoplazma ve endoplazmik retikulumunda bulunur. Özellikle H_2O_2 miktarının aşırı arttığı durumlarda devreye girerek büyük bir spesifikle bu molekülü suya çevirir (7) (R.4). Sıçanların sinir hücreleri ile yapılan *in vitro* deneylerde katalaz aktivitesinin sinir büyüme faktörü ile indüklendiği bulunmuştur (61).



Glutasyon redüktaz (EC 1.6.4.2): Glutasyon peroksidazın reaksiyonu esnasında oluşan okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatona (GSH) dönüştürerek direkt değil de dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Bu katalizi gerçekleştirirken koenzim olarak NADPH kullanır (R.5).

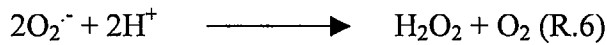


Glutasyon-S transferaz (EC 2.5.1.18): Ksenobiyotiklerin değişime uğratılarak vücuttan uzaklaştırılmasında, membrandan aminoasitlerin transferinde

ve enzimatik antioksidan sistemde önemli fonksiyonlar görür. Selenyum içermeyen ve lipid peroksitlere karşı antioksidan etkinlik gösteren bir enzimdir.

3.2.3. Süperoksit dismutaz enziminin biyolojik fonksiyonu ve alt tipleri

İlk kez 1939 yılında sığır eritrositlerinden mavi renkli bir bakır proteini izole edilerek buna “hemoküprein” adı verildi. Daha sonra insan eritrositlerinden benzer bir protein izole edilerek buna da “eritroküprein” adı verildi. Başlangıçta bunların enzimatik bir aktivite gösterdiği tespit edilemedi. Daha sonra yapılan bazı araştırmalarda beyin, karaciğer gibi dokulardan da aynı protein izole edildi. En son 1969 yılında keşfedilen bu ilginç proteinlerin aslında süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e çeviren ve oldukça yüksek aktivite gösteren bir enzim olduğu bulundu ve katalizlediği reaksiyona ithafen (süperoksitleri dismutasyona uğrattığı için) süperoksit dismutaz adı verildi (94). SOD, süperoksit radikallerini direkt olarak hidrojen peroksit'e ve moleküler oksijene çevirmektedir (R.6).



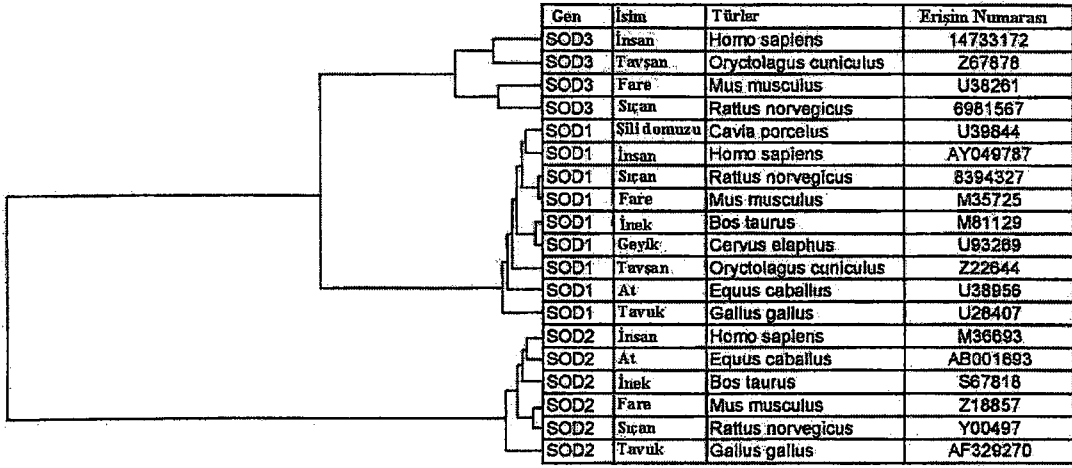
Ökaryotlarda SOD enziminin 3 adet izoenzimi vardır. Bunlar taşıdıkları prostetik grup olan metallere ve lokalizasyonlarına göre; Cu,Zn-SOD, Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) şeklinde sınıflara ayrılırlar. Bunların dışında ökaryotlarda bulunmayıp prokaryotlarda bulunan Fe-SOD mevcuttur. Fe-SOD ve Mn-SOD enzimleri amino asit sıra ve sayısı ve ayrıca üç boyutlu yapısı bakımından birbirine çok benzer, diğer SOD izoenzimleri yapısal olarak farklıdır (113,114). Örneğin *P. Shermanii*'nin içerdiği SOD'un bir monomeri 22.6 kDa olup 201 amino asitten oluşmaktadır ve demir ile mangan formu birbirinin

tamamen aynısıdır (132). Cu,Zn-SOD izoenzimi genellikle hücrenin sitoplazmasında bulunur ve bazı araştırmacılar tarafından SOD1 olarak da adlandırılmaktadır. Ayrıca lizozomlarda, mitokondrinin membranlar arası boşluğunda ve nükleusta da bulunur. Molekül kütlesi 32 kDa olan Cu,Zn-SOD'un iki alt ünitesi ve bunların her birinin aktif merkezinde katalizi gerçekleştirmek üzere birer adet Cu ve Zn atomları vardır. Bu enzimin geni insanlarda 21. kromozomda (21q22 bölgesinde) lokalizedir (23). Siyanür ile inhibe olabilir, ısıya karşı nisbeten daha dayanıklıdır. EC-SOD temel olarak hücre dışı sıvıda süperoksit temizleyici olarak görev yapan bir enzimdir (3). Bu enzim bazı kaynaklarda SOD3 olarak adlandırılmakta olup insanlarda 4. kromozom üzerinde (4p-q21 bölgesinde) lokalizedir. Bazı omurgalılarda bulunan SOD izoenzimlerinin birbirine yakınlık ve uzaklıklarına göre oluşturulmuş soy ağacı Şekil 2'de görülmektedir. Bu şekle göre, her üç izoenzimin ve bu izoenzimlerin bulunduğu türlerin yakınlık ve uzaklıkları bir hayli farklılıklar arz etmektedir. Anaerobik mikroorganizmalardaki SOD genellikle Fe-SOD izoenzimidir. Bu enzim azid ile inhibe edilmekte fakat H₂O₂ ile aktive olmaktadır (19).

3.2.4. Mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) enziminin özellikleri

3.2.4.1. Enzim proteininin özellikleri

Bazı araştırmacılar tarafından SOD2 olarak da adlandırılan insan Mn-SOD enzimi homotetramerik bir molekül olup her bir alt ünitesi 222 amino asitten oluşmaktadır (Şekil 3). Önce sitoplazmada sinyal sekansı içeren prekürsör bir molekül olarak sentezlenmekte, daha sonra mitokondri içine girerek bu sinyal sekansını kaybetmektedir (162).



Şekil 2. Süperoksit dismutaz (SOD) gen ailesinin şu ana kadar bilinen ve araştırılan vertebralılara ait değişim ağacı ve aralarındaki ilişki. Ağaç, özel bir analiz türü ile oluşturulmuştur. Bir sekansı diğerine bağlayan horizontal çizgilerin uzunluğu sekanslar arasında tahmin edilen genetik mesafenin orantısal gösterimidir. (Zelko IN ve ark. Free Radic Biol Med 2002; 33:337-349 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır.)

M L S R A V C G T S R Q L P P V L G Y L G S R Q K H S L P D L P Y D Y G A L E P H I N A Q I M Q L H S K H H A A Y V N 60
 N L N V T E E K Y Q E A L A K G D V T A Q I A L Q P A L K F N G G G H I N H S I F W T N L S P N G G G E P K G E L L E A 120
 I K L D F G S F D K F K E L T A A S V G V Q G S G W L G F N K E R G H L Q I A A C P N O D P L Q G T T G L I P L L 180
 G I D V W E H A Y Y L Q Y K N V R P D Y L K A I W N V I N W E N V T E R Y M A C K K 222

Şekil 3. İnsan Mn-SOD proteininin amino asit sırası (Gen bankası erişim numarası X07834). Her satırdaki aminoasit sırası şeklin sağ tarafındaki rakamlarla belirlenmiştir. Koyu renge boyanmış kısımlar *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *aspergillus fumigatus*, *Ganoderma microsporum*, *Onchocerca volvulus* gibi bazı prokaryot, mantar ve parazitlerden elde edilen Mn-SOD proteininde aynı pozisyonda aynı amino asitin olduğunu göstermektedir. Ok işareti sol taraftaki sinyal dizisini içeren amino asit sekansını göstermektedir. Sinyal sekansı sadece ökaryotlara özgü bir dizidir, prokaryotlarda bulunmamaktadır. Proteinin metal bağlama yerleri amino asitlerin üst kısmına konan bir yıldızla gösterilmiştir (sırasıyla H, H, D ve H amino asitleri). Türlerin hepsi bir arada düşünüldüğünde aralarında çok az benzerlik bulunsa da ikili karşılaştırmalarda benzerlik yüzdesi oldukça artmaktadır. (Bu şekil Diez B ve ark. Curr Genet 1998;33:387-394 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır).

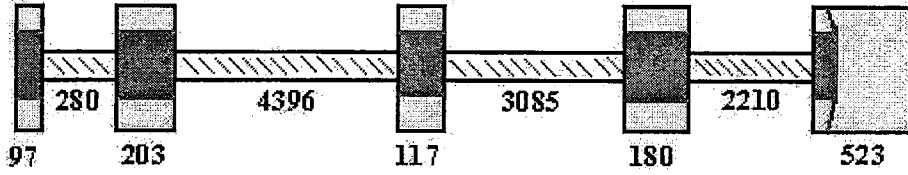
Mn-SOD'un sinyal peptidinin uzunluğu 24 aminoasit uzunluğunda olup mitokondri içinde olgun enzim haline dönüşmektedir. Sinyal dizisi ayrıldıktan

sonra geriye kalan olgun aktif enzimin aminoasit sayısı 198'e düşmektedir. Genetik polimorfizm çalışmaları; bu sinyal peptidin -9 pozisyonunda bulunan üçlü kodonun T nükleotidinin C ile yer değiştirmesi sonucu mitokondrial hedef dizisi (MTS) olarak da adlandırılan sinyal dizisinde yer alan valin amino asitinin (GTT, Val) yerine alanin (GCT, Ala) amino asitinin geçtiğini göstermektedir. Bu Ala/Val polimorfizmi sağlıklı Japon bireylerinde çalışılmış olup bireylerin %85'inin valin alleleline sahip olduğu gösterilmiştir (52,138). Bu değişiklik proteinin ikincil yapısını değiştirebilir ve bu proteinin mitokondriye transportunun azalmasına yol açabilir. Thr58 ile şeklinde amino asit değişikliği gösteren diğer bir varyasyon tanımlanmış olup bu değişikliğin de Mn-SOD'ın *in vitro* aktivitesini değiştirebileceği ileri sürülmüştür (172). Ayrıca yine bu değişikliğin Mn-SOD'un tetramerik yapısının stabilitesini bozabileceği, bunun da enzim aktivitesini düşürebileceği, diğer bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülen görüşlerden biridir (17).

3.2.4.2. Mn-SOD geninin yapısı

İnsanlarda, sıçanda ve farede Mn-SOD geninin yapısı tamamen ortaya konulmuştur (28,174). Her bir türde yapıca ve sıracı belirgin bir korunma görülmektedir. Mn-SOD geninin fiziksel yapısı 5 ekson ve 4 intron içermektedir (Şekil 4). İnsan Mn-SOD geninin amino asit dizisi ile beraber nükleotid dizisi de tam olarak aydınlatılmış olup toplam olarak 1026 baz çiftinden oluşan nükleotid dizisi Şekil 5'te gösterilmiştir. Genomik Southern blotting teknikleri insan (155), murin ve sığır türlerinde bir adet Mn-SOD geninin bulunduğunu gösterse de bu sayı sıçanlarda her bir haploid genom için ikidir. Bütün türlerde promoter bölge aynı özellikleri paylaşır. Tanımlanmış upstream TATA veya CAAT kutuları

yoktur. Bununla beraber GC nükleotidlerinden zengin bölgeler bu 4 türün hepsinde bulunmaktadır. Bu tip genler tipik olarak “housekeeping” genler olabilir. Yine her 4 türün hepsinde promoter bölgede Sp-1 ve AP-2 konsensus sekanslarının multipl kopyaları bulunmaktadır.



Şekil 4. Mn-SOD geninin genomik organizasyonu. Bu enzimin mevcut aminoasit yapısı diğer SOD izoenzimleri ile önemli bir homoloji göstermemektedir. Her bir ekson ve intronun çapı alt kısımlarda yazılan rakamlar ile gösterilmiştir (rakamlar nükleotid baz çiftlerini belirlemektedir). Şekildeki kutular eksonları, yan çizgi ile belirtilmiş kısımlar ise intronları temsil etmektedir. İntronların arasında koyu renk ile gösterilen bölgeler ise enzim proteinini kodlayan nükleotid dizilerini temsil etmektedir. (Ho YS ve ark. Am J Respir Cell Mol Biol 1991; 4:278–286 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır).

1	CAGCATGTTG	AGCCGGGCAG	TGTGCGGCAC	CAGCAGGCAG	CTGCCTCCGG	TTTTGGGGTA	TCTGGGCTCC
71	AGGCAGAAGC	ACAGCCTCCC	CGACCTGCCC	TACGACTACG	GCGCCCTGGA	ACCTCACATC	AACGCGCAGA
141	TCATGCAGCT	GCACCACAGC	AAGCACCACG	CGGCCTACGT	GAACAACCTG	AACGTCACCG	AGGAGAAGTA
211	CCAGGAGGCG	TTGGCCAAGG	GAGATGTTAC	AGCCCAGATA	GCTCTTCAGC	CTGCACTGAA	GTTCAATGGT
281	GGTGGTCATA	TCAATCATAG	CATTTTCTGG	ACAAACCTCA	GCCCTAACGG	TGGTGGAGAA	CCCAAAGGGG
351	AGTTGCTGGA	AGCCATCAAA	CTGGACTTTG	GTTCTTTTGA	CAAGTTTAAG	GAGAAGCTGA	CGGCTGCATC
421	TGTTGGTGTC	CAAGGCTCAG	GTTGGGGTTG	GCTTGGTTTC	AATAAGGAAC	GGGGACACTT	ACAAATTGCT
491	GCTTGTCCTAA	ATCAGGATCC	ACTGCAAGGA	ACAACAGGCC	TTATTCCACT	GCTGGGGATT	GATGTGTGGG
561	AGCACGCTTA	CTACCTTCAG	TATAAAATG	TCAGGCCTGA	TTATCTAAAA	GCTATTTGGA	ATGTAATCAA
631	CTGGGAGAAT	GTAAGTGAAG	GATACATGGC	TTGCAAAAAG	TAAACCACGA	TCGTTATGCT	GAGTATGTTA
701	AGCTCTTTAT	GACTGTTTTT	GTAGTGGTAT	AGAGTACTGC	AGAATACAGT	AAGCTGCTCT	ATTGTAGCAT
771	TTCTTGATGT	TGCTTAGTCA	CTTATTTTCA	AAACAACCTA	ATGTTCTGAA	TAATTTCTTA	CTAAACATTT
841	TGTTATTGGG	CAAGTGATTG	AAAATAGTAA	ATGCTTTGTG	TGATTGAATC	TGATTGGACA	TTTTCTTCAG
911	AGAGCTAAAT	TACAATTGTC	ATTTATAAAA	CCATCAAAAA	TATTCCATCC	ATATACTTTG	GGGACTTGTA
981	GGGATGCCTT	TCTAGTCCTA	TTCTATTGCA	GTTATAGAAA	ATCTAG		

Şekil 5. İnsan Mn-SOD geninin toplam nükleotid dizisi. C: sitozin, A: adenin, G: guanin, T: timin. Gen toplam olarak 1026 adet baz çifti ihtiva etmektedir. (Gen bankası nükleotid sekansı erişim numarası: X07834).

3.2.4.3. Mn-SOD geninin kromozomal lokalizasyonu

Başlangıçta insan/fare hibritleriyle yapılan genetik analizlerde Mn-SOD geninin 6. kromozomda lokalize olduğu bulundu (30), daha sonra floresan in situ hibridizasyon ve somatik hücre hibrit haritalaması kullanılarak genin 6q25 sublokalizasyonuna sahip olduğu belirlendi (28). İnsanlarda bu kromozomal lokalizasyon aynı zamanda şizofreni için aday gen bölgesi olarak bildirilmektedir (100). Mn-SOD geninin canlı için ne kadar önemli olduğu, genin bütünlüğünün bozulması ile farelerin nörodejenerasyona ve kalp hasarına bağlı olarak ölmesi sonucunda anlaşılmıştır (77).

3.2.4.4. Mn-SOD'un transkripsiyonel regülasyonu

Mn-SOD enzimi birçok hücre ve dokularda diğer enzimler ile kıyaslandığında hem nisbi olarak daha fazla sentez edilmekte hem de hücresel ve çevresel faktörlerle sıkı bir şekilde regüle edilmektedir. Bilgisayar analizleri ve foot-printing ölçümleri ile, insan Mn-SOD geninin proksimal promotor bölgesinde birçok Sp1 ve AP2 transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesi bulunduğu ortaya konulmuştur. Bu iki transkripsiyon faktör proteini Mn-SOD ekspresyonu için zıt etkilere sahiptir: Sp1 elementi transkripsiyonu pozitif olarak etkilerken AP2 proteinleri promoter aktiviteyi önemli ölçüde baskılamaktadır (176).

- Mn-SOD ekspresyonunu arttıran (upregulation) stimuluslar: interlekin-1, -4, -6, TNF- α , lipopolisakkaritler ve interferon- γ farklı doku ve hücrelerde Mn-SOD'un potent aktivatörleridirler. Sitokin ile uyarılabilen ekspresyonu arttırıcı eleman (enhancer), insan Mn-SOD geninin 2. intronunun içinde 236 bç dizisi şeklinde yer almaktadır (123). Bu bölge NF- κ B, C/EBP ve NF-1 transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri içerir. TPA gibi protein kinaz C'yi stimüle eden

ajanlar Mn-SOD ekspresyonunu CREB-1/ATF-1 gibi faktörlerin aktivasyonu üzerinden arttırırlar (69). İlginç olarak vinblastin, taxol ve vincristin gibi mikrotübül üzerinden aktivite gösteren antikanser ilaçlar protein kinaz C'yi aktive ederek Mn-SOD ekspresyonunu arttırırlar (34). Ayrıca yüksek konsantrasyonda hücreler için bir hayli toksik olan Mn iyonlarının insan meme kanserinde Mn-SOD ekspresyonunu indüklediği bulunmuştur (150).

- Mn-SOD ekspresyonunu azaltan (downregulation) stimuluslar: Birçok kanser türünde Mn-SOD ekspresyonu intron bölgelerinin belli sekanslarının metilasyonu yolu ile (59) ve Mn-SOD geninin 5' flanking sekansı ile etkileşime giren AP2 transkripsiyon faktörünün arttırılması yolu ile azaltılabilir (176).

- Mn-SOD enziminin transkripsiyon sonrası (posttranskripsiyonel) regulasyonu: Mn-SOD ekspresyonu sadece transkripsiyon aşamasında değil, diğer birçok proteinde olduğu gibi RNA-bağlayıcı protein tarafından translasyon esnasında da kontrol edilir. Mn-SOD mRNA'sının 3' ucunda translasyona uğramayan bölgede 41bç'lik bir kısım translasyon etkinliğini etkileyen spesifik bir protein bağlama kapasitesine sahiptir (27). Bu cis-element kloromfenikol asetiltransferazın kodlama bölgesinden sonraki bölgeye yerleştirildiğinde rapörtör genin translasyon etkinliğini ve enzimatik aktivitesini önemli ölçüde arttırmaktadır (71).

Pinkham ve arkadaşları bir mantar türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'de SOD2 transkripsiyonunun aktivasyonu ve represyonu üzerine Heme'in regüle edici etkisi hakkındaki araştırmalarında bu enzim geni üzerinde ilginç bazı bulgular elde etmişlerdir. *SOD2-lacZ* füzyonu kullanıldığında elde edilen verilere göre Mn-SOD ekspresyonunun mitokondrideki respiratuvar enzimler ve heme-

bağlayıcı proteinler tarafından ve Hap1p ile Hap2-3-4-5 kompleksi üzerinden gerçekleştirildiği görülmektedir. *SOD2*'nin transkripsiyonel aktivasyonu heme'in kullanılabilirliği ile bire-bir ilişkilidir. Bu sıkı bağlantı heme-sensitif bir represyon mekanizmasını akla getirmektedir (116). Glukoz bulunan ortamda *SOD2* transkripsiyonunun bazal düzeyinin yarısı AP aktivatör fonksiyonundan bağımsızdır ve sadece heme'in yokluğunda represyona uğrar. Bu da fermentasyon esnasında oksidatif fosforilasyonun düşük seviyede seyretmesi açısından Mn-SOD'un fizyolojik önemini gösterir.

Ökaryotlarda bulunan Mn-SOD enziminin paraquat, X-ışını, hiperoksi, dinitrofenol ve tümör nekrozis faktör (TNF) gibi oksidatif stresi arttıran durumlarda indüklenmesi bu enzimin oksidatif strese karşı önemli bir koruyuculuğu olduğunu göstermektedir (36,58,73,105,164). Yapılan bazı çalışmalarda ise *Mn-SOD* geninin indüklenebilir ve ROS ile direkt regüle edilebilir olduğu gösterilmiştir (117,156). Bunun dışında yine Mn-SOD ekspresyonu olmayan hayvan modellerinde radyasyona karşı artmış bir sensitivite olduğu gösterilmiştir (40). Radyasyonun vücutta oluşturduğu oksidatif stresin büyüklüğü göz önüne alındığında Mn-SOD'un fonksiyonu daha iyi anlaşılmaktadır. Mitokondrial Mn-SOD enziminin aşırı eksprese edilmesinin; birçok insan tümöründe tümörün malignitesini baskıladığı (175), radyasyonun oluşturduğu neoplastik transformasyonu inhibe ettiği ve birçok toksik ajana karşı toleransı arttırdığı bulunmuştur (143).

3.3. Polimorfizm

3.3.1. Polimorfizmin tanımı

Bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürüleemeycek oranlarda varolan, nadir sıklıktaki, devamlılık göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğın birlikte oluşumu durumudur. Eğer toplumun %2 veya daha fazlası nadir bir alleli taşıyorsa, bu durum polimorfiktir. Polimorfizm tanımına uygun bir allel sıklığına ulaşmaya, seleksiyon neden olabilir. İnsanda polimorfik olan genetik özelliklere örnek olarak, Y kromozomu sentromerik heterokromatin boyutu, kan grupları, HLA, RFLP ve VNTR verilebilir (8). Aynı genin değişik formları aleller olarak adlandırılır. Aralarındaki varyasyon spesifik gene ve diğer birçok faktöre bağılı olarak açık bir fenotipik etkiye sahip değildir veya major bir olayla sonuçlanmaz. Eğer bir varyant minimal bir fenotipik etkiye sahipse buna polimorfizm denir. Enzim ve protein değişkenlikleri ile ilgili araştırmalar, insanda yapısal gen loküslerinin en az %30'unun polimorfik olduğunu göstermiştir.

3.3.2. Polimorfizm çeşitleri ve tıpta kullanım alanları (74,136)

Dengeli (balanced) ve geçici (transient) polimorfizmler arasındaki ayrımın yapılması önemli bir konudur. Dengeli polimorfizmde iki veya daha fazla farklı allelik formlar “heterozigot üstünlüğü” ve “etkilenmiş homozigotun uyumunun azalması” arasında bir dengede korunur. Malaryanın endemik olduğu bölgelerde orak hücre anemisi allel insidansının yüksek olması dengeli polimorfizme iyi bir örnektir. Böylece malaryaya maruz kalmayan topluluklarda orak hücre anemisi allelinin insidansı azalmaya meyil gösterir. Bu gibi durumlarda ise polimorfizm “geçici” olarak adlandırılır. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) genomda spesifik bir bölgedeki tek bir bazda meydana gelen değişikliktir. Çoğunlukla her

iki allelde de meydana gelir. İnsanlarda her 1000 bazda bir görölme sıklığı vardır. Bugüne kadar insan genomunda milyonlarca SNPs bulunmuş olması, hem doğal hem de hastalık fonotiplerine katkıda bulunan genetik faktörlerin tanımlanması açısından çok önemlidir.

Polimorfizmler insan genetik araştırmalarında anahtar bir fonksiyon üstlenmiştir. Bir genin farklı kalıtım kalıplarının öngörülebilmesi veya genomun farklı segmentlerinin birbirinden ayırdedilebilmesi önemli bir konudur. Bu açıdan şu anda DNA polimorfizm çalışmalarında ve bulunan polimorfizm sayısında bir patlama yaşanmaktadır. Polimorfizm bu açıdan bir genetik marker gibi görev yapmaktadır. Böylece polimorfizmler şu alanlarda kullanıma girmiştir: ebeveynlik testi, suçluların tanımlanması, organ transplantasyonları için doku tipleme, yetişkin bireylerin diyabet ve kanser gibi, toplumda sık görülen hatalıklara yatkınlıklarının düşük veya yüksek risk tarzında belirlenmesi, genetik hastalıklarının heterozigot taşıyıcılarının tespiti, bir kromozomun özel bir bölgesindeki bir genin bağlantı analizi ile haritalanması.

3.4. Etyopatogenezinde serbest radikallerin rol aldığı iddia edilen bazı nöropsikiyatrik hastalıklar

Parkinson hastalığı: Nigrostriatal dopaminerjik nöronların selektif ve ilerleyici hasarı ile karakterize bir hastalıktır. Bu hasara sebep olan mekanizmalardan biri de ROS aracılı mekanizmadır (4). Burada aracı mekanizma olarak da dopaminin oksidatif metabolizmasına bağlı olarak gelişen H_2O_2 ve bir nörotoksin olan 6-hidroksidopamin birikimi gösterilmektedir. Ayrıca substansia nigra GSH konsantrasyonunun diğer beyin bölgelerine göre azalmış olarak

bulunması parkinson hastalığında ROS'un muhtemel rolünü kuvvetlendirmektedir.

Down sendromu: Cu,Zn-SOD enzim geninin 21 no'lu kromozom üzerinde lokalize olması ve trizomi 21'li kişilerin eritrositlerinde SOD aktivitesi ve ekspresyonunun artmış bulunması, bu hastalığın patogenezinde ROS'un bulunabileceğini akla getirmektedir (66). Down sendromlu hastaların bazılarında 4. dekattan sonra tipik olarak Alzheimer demansının görülmesi, ROS'un Alzheimer hastalığında oynadığı olası rolü anlamak için kullanılabilecek önemli bir genetik model oluşturmuştur.

Alzheimer hastalığı: Bu hastalığın tanı koydurucu bir bulgusu olan ekstrasellüler senil plaklarda amiloid depoları ve nöronlarda filamentlerin görülmesi, ROS ile bir ilişkinin olabileceğini akla getirmektedir (154). Alzheimerli hastalarda beyin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesinin ve membran lipid peroksidasyonunun artması ve ayrıca antioksidan vitaminler olan A ve E vitaminlerinin plazma düzeyinin düşük bulunması (171), bu hastalığa oksidatif stresin direkt veya indirekt katkısının olabileceğini göstermektedir.

İkiuçlu (Bipolar) Duygulanım Bozukluğu: Hem bir nörotransmitter hem de serbest oksijen radikali olarak bilinen nitrik oksit (NO) düzeyi bipolar hastaların plazmalarında yüksek bulunmuş, bu bileşiğin süperoksit radikali ile verdiği peroksinitrit ürününün oldukça potent bir oksidan ajan olduğu ve membran yapılarını etkileyerek nöron fonksiyonlarında bozukluk yapabileceği bildirilmiştir (130). Bir başka çalışmada yine depresyonda antioksidan savunma sisteminin azaldığı bulunmuştur (75).

3.5. Şizofreni etyopatogenezinde serbest radikal mekanizmaları ve antioksidan sistemler

Vücutta serbest oksijen radikallerinin, daha genel bir ifade ile ROS'un üretilmesi ve yok edilmesi kontrol altındadır. Diğer bir ifade ile oksidan ve antioksidan sistemler denge içindedirler. Oksidan stresin artması ve/veya antioksidan sistemdeki bir aksama kendisini patolojik bir bulgu olarak gösterir. Hücrelerde, hücreler arası sıvıda ve damar içinde görev alan antioksidan karakterli enzimler ve organik-inorganik analitlerin miktar ve aktivitelerindeki bir azalma oksidatif stresin artmasına yol açabilir. Bu sebeple psikiyatrik hastalıklarda ve özellikle de şizofrenide yapılan çalışmaların çoğu savunma sistemindeki olası bir zayıflamayı göstermek üzere planlanmaktadır. Bunun da odak noktasını esas olarak antioksidan enzimler oluşturmaktadır. Genel olarak vücutta, özel olarak da merkezi sinir sisteminde ROS miktarının direkt veya dolaylı olarak artması, ROS'un etkilemesi muhtemel olan bütün hücresel ve hücreler arası sıvıdaki yapıları etkilemesi anlamını taşır. Bu konuda son yıllarda bazı deliller bulunmuştur, örneğin şizofreni hastalarının eritrositlerinde bir serbest radikal olarak kabul edilen ve ikincil ürünleri hayli toksik olan NO (Şekil 1) miktarı normal bireylerle karşılaştırıldığında 2-3 kat artmış olarak bulunmuştur (50). Proteinler, lipidler, karbohidratlar, amino asitler, nükleik asitler gibi temel olarak hücre ve dokuları oluşturan bütün yapılar bu anormal koşullarda değişime uğrayabilir (121). Merkezi sinir sistemi fizyolojik, biyokimyasal, anatomik ve diğer birçok sebeple ROS hasarına vücudun diğer dokularından daha yatkındır. Bu yatkınlığın sebepleri şu şekilde sıralanabilir (41):

- Oksidatif metabolik aktivitenin hızının çok yüksek olması.

- Membran lipidlerinden olan PUFA gibi kolayca okside olabilen bazı substratların beyinde oldukça yüksek konsantrasyonda olması.

- CAT ve GSH-Px gibi bazı koruyucu antioksidan enzimlerin, spesifik aktivite olarak düşünıldüğünde diğer organ ve dokulara kıyasla daha düşük düzeylerde olması.

- Dopamin oksidasyonu gibi bazı spesifik nörokimyasal reaksiyonlarla aşırı endojen ROS üretilmesi.

- Nöronların membran alanının sitoplazmik hacime oranının yüksek olması. Beyni oluşturan fonksiyonel hücrelerin membran yüzeyleri sitoplazmik hacime oranlandığında diğer doku hücrelerine göre hayli yüksek bir rakam ortaya çıkmaktadır.

-Aksonların morfolojisinin periferel hasara oldukça yatkın olması.

-Nöron hücrelerinin doğušta son bölünmelerini tamamlamış olması ve daha sonraki dönemlerde çoğalamaması nedeni ile hasar gören hücrelerin kendini yenileyememesi.

- İnsan beyninin bazı bölgelerinin (globus pallidus ve substantia nigra) demir elementinden zengin olması, beyaz ve gri cevherde ise askorbik asit konsantrasyonunun oldukça yüksek olması (47).

Beyinde ROS üretimi arttığında ve/veya antioksidan sistem azaldığında, olayın büyüklüğüne göre şu hasarlar meydana gelir (110): hücre membranlarında lipid peroksidasyonu oluşur, membran bütünlüğü bozulur; lipidlerin içine gömüldü şeklinde duran reseptörler ve Na/K-ATPaz gibi membran proteinlerinin fonksiyonları değişir; mitokondrial ve nükleer DNA'da baz oksidasyonları ve iplik kırılmaları başta olmak üzere birçok hasar oluşur; proteaz, fosfolipaz,

lipooksijenaz, siklooksijenaz, elastaz, ksantin oksidaz gibi birçok litik enzim aktifleşir; mitokondriyal oksidatif fosforilasyon yavaşlar; enflamasyon ve lökosit kemotaksisi gerçekleşir; hücre içinde bulunan yapısal proteinler ve fonksiyonel birçok enzim hasara uğrar; kapiller permeabilite artar; antiproteolitik enzimler hasara uğrar.

3.5.1. Şizofrenide antioksidan sistemde meydana gelen değişiklikler

Uzun zamandan beri serbest radikalleri metabolize edici en önemli enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px'in plazma, eritrosit, BOS, beyin dokusu gibi biyolojik örneklerde aktiviteleri ölçülerek şizofrenideki antioksidan durum hakkında fikir sahibi olunmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla şizofrenide antioksidan sistemin bozulduğuna dair bazı kanıtlar elde edilmiştir. Beyin proteom analizlerinde konu ile ilgili genlerden Mn-SOD ekspresyonunun anormal olduğuna dair bazı bulgular elde edilmiş ve şizofrenik bireylerin hipokampusünde antioksidan sistemin bozulduğu ileri sürülmüştür (37). Yao ve arkadaşları ilaç alınmayan periyotta yaptıkları analizlerde şizofreni hastalarında GSH-Px aktivitesinde herhangi bir değişiklik saptamazken SOD aktivitesinde önemli bir artış tespit etmişlerdir (167). Aynı araştırmacılar tedavi alınan periyotta aynı enzimlerin aktivitelerini ölçtüklerinde SOD ve GSH-Px aktivitesinde azalma bulurken, CAT aktivitesinde herhangi bir değişiklik izleyememişlerdir. Diğer bir çalışmada ise şizofreninin değişik alt gruplarında eritrositte lipid peroksidasyon ürünlerinin düzeyleri ve SOD aktivitesinde artış ile beraber GSH-Px aktivitesi ve GSH düzeylerinde azalma tespit edilmiştir (11). Yamada ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada tardiv diskinezisi (TD) olan ve olmayan şizofreni hastalarını ve eksik semptomlara sahip hastaları

karşılaştırdıklarında TD'li hastaların eritrosit SOD aktivitelerinin olmayan hastalara ve şüphelilere göre daha düşük olduğunu bulmuşlardır (165). Bir başka çalışmada şizofreni hastalarının eritrositlerinde SOD aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı, CAT ve GSHPx aktivitelerinin ise değişmediği bulunmuştur (101). Bununla beraber yukarıdaki çalışmalar ve daha başkaları karşılaştırıldığında birbiri ile çelişen bazı sonuçları görmek mümkündür. Örneğin şizofreni hastalarının aynı biyolojik materyalini (eritrosit) analiz amacı ile kullanan üç ayrı araştırmada SOD aktivitesi kontrol grubuna göre artmış (152), değişmemiş (51) ve azalmış (101) olarak bulunmuştur. Bazı araştırmacılar ise şizofreni hastalarında gözlenen bu antioksidan enzim aktivitesindeki değişikliklere farklı bir açıdan yaklaşarak değişimin hastalığın bir sebebi veya sonucu olmayıp tamamen verilen nöroleptik tedaviye bağlı olduğunu savunmuşlardır (2,167). Nöroleptiklerden haloperidolün mitokondriyal ROS üretiminde 6 katlık bir artışa sebep olduğu, katekolamin ve monoamin oksidazlardan kaynaklanan ROS miktarında herhangi bir değişiklik oluşturmadığı bulunmuştur (125). Buradan hareketle artan ROS'un SOD aktivitesini ve diğer bazı antioksidan enzimlerin aktivitesini etkileyebileceği ileri sürülmüştür. Bir başka araştırmada yine bir nöroleptik olan flupentiksolum oksijen ile yarışarak elektronları alabildiği ve böylece superoksit üretimini azaltıp sitokrom b5 redüktaz aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (158). Bu araştırmanın diğer bir bulgusu ise bu nöroleptik ajanın direkt olarak süperoksit anyonu ile reaksiyona girebildiğidir. Süperoksit, SOD enziminin hem *in vitro* hem de *in vivo* substratı olduğundan nöroleptiklere bağlı olarak azalmış olan süperoksit sebebiyle SOD ekspresyonu kompensatuvar olarak azalmış olabilir. Her ne kadar bazı araştırmacılar tedavi alan hastalarda plazma SOD aktivitesinin azaldığını bulsalar da

bunu nöroleptik tedaviden daha ziyade hastalığın altında yatan bir patogenetik faktör olarak yorumlamışlar (10), buna delil olarak da nöroleptiklerin psikotiklerin postmortem beyin dokularında Mn-SOD aktivitesini azaltmadığı, tam tersine arttırdığı şeklindeki bir başka araştırma bulgusunu göstermişlerdir (86).

3.5.2. Şizofrenide hücre membranı ve fosfolipid metabolizmasındaki anormallikler

Şizofreni hastalarının eritrositlerinde (67) ve postmortem olarak alınarak hazırlanmış beyin homojenatlarında (57) hücre membranlarına ait fosfolipidler ve PUFA miktarı azalmış olarak bulunmuştur. Bir grup araştırmacı kronik şizofreni hastalarının eritrosit ve trombosit membran yapı ve fonksiyonunda bazı değişiklikler tesbit ettikten sonra (168,169,170) bunun hangi sebeplere bağlı olabileceğini araştırmak üzere, bu tür hastaların postmortem beyin dokularında yaptıkları çalışmalar sonucunda fosfatidil kolin ve fosfatidil etanolamin gibi bazı membran fosfolipidlerinin azaldığını bulmuşlardır (166). Membranlarda meydana gelen bu lipid değişiklikleri hakkında çok geniş bir derleme yapılmış olup bu derlemede konu her yönüyle tartışılmış ve araştırmacılar bu tür yağ asidi anormalliklerinin sadece şizofreniye spesifik olmayıp depresyon, alkolizm, hareket bozuklukları ve genel peroksizomal hastalıkların hepsinde rastlanabileceğini belirtmişlerdir (42). Membranlarda bulunan PUFA, diğer lipidlerle ve doymuş yağ asitleri ile karşılaştırıldığında ROS'un etkilerine daha çok açıktır ve bu etkileşimin sonucunda derhal lipid peroksidasyonu meydana gelir. Şizofreni hastalarının eritrosit membranlarında lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan tiyobarbiturik asit ile etkileşebilen madde (TBARS) düzeylerinin arttığı bulunmuştur (51,57,67). Yukarıda bahsedilen membran fosfolipid

anormallikleri ile en son bahsedilen TBARS oluşumu arasında bire-bir ilişki olduğu kabul edilmektedir. Her ne kadar fosfolipid azalmalarının kaynağında daha başka faktörlerin rol oynayabileceği ifade edilse de lipid peroksidasyonunun belirgin bir rol oynadığı açıktır. Lipid peroksidasyonunun temel kaynağı hücrede anormal derecede artmış ROS olduğundan membran fosfolipid anormallikleri ile antioksidan savunma sisteminin bozulması arasında direkt bir ilişki bulunduğunu söylemek akla uzak bir yorum sayılmaz. Hücre membranlarında ana ROS üretim kaynaklarında biri de hiç şüphesiz prostaglandin sentezidir. Fosfolipaz A2 enzimi, membranlarda fosfolipidlerin metabolizmaları esnasında ilk olarak temel yapı olan gliserolden ikinci karbon atomuna bağlı olan yağ asitinin ayrılmasını sağlayarak lizofosfolipidleri oluşturan bir enzimdir. Plazma (43), serum (104) ve trombosit (44) fosfolipaz A2 aktivitelerinin şizofreni hastalarında sağlıklı kontrol gruplarına göre oldukça arttığı bulunmuştur. Fosfolipaz A2 aktivitesindeki bu artışın, şizofreni hastalarında sitozolik enzimin geninin promoter bölgesine yakın bir genetik varyasyondan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (15). Prostaglandin sentezinde bu enzimatik basamaktan sonraki diğer enzimatik yollar siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim sistemleri ile devam etmektedir. Bu yolların her ikisinde de yan ürün olarak ROS üretilmektedir. Şizofreni hastalarının beyin omurilik sıvısında (92) ve plazmalarında (64) prostaglandinlerin artmış olması bu hastalıkta hem prostaglandin sentezinin hem de ROS üretiminin arttığına delil olabilir. Yukarıda bahsedilen mekanizmalardan biri veya tümü şizofreni hastalarının hücre membranlarında görülen fosfolipid anormalliklerinin sebebi olabilir. Fosfolipid anormallikleri, yapı değişiklikleri nedeni ile lipid matriksinin içinde gömülü halde bulunan ve reseptör, taşıyıcı molekül, pompa, yapısal eleman

olarak görev yapan proteinlerin üç boyutlu yapısını değiştirebileceğinden, hücresel bütün metabolizmalara etki etmesi ihtimal dahilindedir. Bu hücrelerin beyni oluşturan nöron ve diğer destek hücreler olduğu düşünüldüğünde bu biyolojik değişikliklerin psikiyatrik bozuklukları ortaya çıkarması ihtimal dahilindedir. İşte şizofrenide ortaya konulmaya çalışılan “membran anormallikleri” hipotezinin temelinde bu teoriler yatmaktadır (9). Bu moleküler genetik çalışma da membran lipid anormalliklerine neden olan muhtemel mekanizmalardan birini, yani antioksidan enzimlerin bir üyesi olan SOD’un genetik varyasyonlarını aydınlatmayı amaç edinmektedir.

3.6. Şizofrenide ailesel geçiş

Son yıllarda yapılan ikiz çalışmaları, şizofreni hastalarının birinci derece yakınlarında aynı hastalığa yakalanma riskinin (%1-16) genel popülasyondaki kontrol probantlarının akrabalarındaki hastalığa yakalanma riskinden (%0-2) daha yüksek olduğunu göstermiştir (29,90). Aile çalışmaları ailesel hastalık tekrarlarının genetik ve genetik olmayan kaynaklarını ayıramadığından monozigot ve dizigot ikizlerin şizofreni için yatkınlıklarının karşılaştırılması (%45-75 oranına karşı %4-15) ailesel geçiş hakkında fikir verebilir (108). Şizofrenide klinik özelliklerin aileselliğini araştıran az sayıda araştırma mevcuttur (159). Ailesellik ölçütleri, kullanılan tanı kriterlerine göre değişebildiğinden DSM-III-R tanı kılavuzuna göre yapılan değerlendirmelerde ailesellik yüksek çıkmaktadır. Bazı ailesel kümelenmeler (aggregasyon) diğer ailelerden daha kuvvetli ve daha homojen olsa idi o zaman şizofreni için riskli genleri araştırmada şizofreninin bazı klinik alt tipleri oldukça kolaylık sağlardı. Maalesef klasik olarak birbirinden ayrılmış alt gruplardan hiçbiri (paranoid, katatonik, disorganize, ayrılaşmamış

veya rezidüel) aile içinde homojenlik göstermez; bir alt grubun probandındaki ailesel risk diğer herhangi birine göre daha yüksek olabilir. Ayrıca bir çok girişim ailesel, genetik, sporadik, hatta çevresel etmenlere bağlı şizofreni formları arasında herhangi bir klinik farklılık ortaya çıkaramamıştır. Çalışmalar sonunda, yüksek ailesel şizofreni riski taşıyan vakaları tanımlamada faydalı olabilecek ve geniş bir klinik farklılık gösteren bir sınıflama ortaya çıkarılmıştır: negatif ve pozitif semptomlar. Kalıcı negatif semptomlar gösteren (sosyal içe-kapanma, garip davranışlar, biçimsel düşünce bozukluğu) ve önceki yaşantılarında bazı pozitif semptomlar gösteren vakalar psikiyatrik hastalıklar bakımından yüksek ailesellik gösterirken yalnızca baskın delüsyonlar ve halusinasyonlar gösterenlerle sadece negatif semptomlar gösterenler (basit şizofreni) daha az ailesellik göstermektedir (153).

3.7. Şizofrenide riskli genleri tanımlamak için kullanılan yöntemler

Günümüze kadar şizofreninin genetik yönünü tam olarak ortaya koyabilmek için birbirinden farklı birçok yol izlenmiş ve bu konuda oldukça ileri mesafeler katedilmiştir. Özellikle son yıllarda moleküler genetik analizlerin çok komplike olanlarının kolayca yapılabilir hale gelmesi ile birçok hastalıkta olduğu gibi şizofrenide de etyopatogeneze yönelik hayli fazla sayıda genetik teori ortaya atılmıştır. Şizofrenide moleküler genetik risk faktörlerini araştırmak üzere birbirini tamamlayıcı özelliğe sahip olan iki çalışma stratejisi izlenmiştir: linkage (bağlantı) ve asosiyasyon çalışmaları (81). Her ne kadar şizofreni spektrumunda tanısal karışıklıklar gün geçtikçe artsa da bağlantı ve asosiyasyon çalışmaları probantların diyagnostik durumlarının kesin bir şekilde 2 temel kategoriye

indirgenmesini gerektirir: etkilenmiş bireyler ve etkilenmemiş bireyler. Bu da hayli zorluk çekilen konulardan biridir.

3.7.1. Şizofrenide sitogenetik anormallik çalışmaları

Translokasyonlar ve delesyonlar gibi kromozomal yeniden düzenlemeler ile şizofreni arasında bir ilişkinin olduğu ileri sürülmektedir. Velo-kardiyo-fasiyal sendromlu bireylerde daha fazla oranda şizofreni görüldüğü rapor edilmiştir (102). Bu sendromda kromozom 22q11'de küçük interstisyel delesyonlar (2-3Mb uzunluğunda) olduğu tespit edilmiştir. Bu bölge aynı zamanda bir şizofreni popülasyonunda SNP markerleri kullanılarak yapılan aile temelli bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) haritalamasında da gösterilmiştir (80). Bu bağlamda geniş bir İskoçya'lı ailede dengeli bir resiprokal translokasyonun t(1;11) kalıtıldığı bulunmuştur (142). Görüldüğü gibi bu translokasyon 1 no'lu kromozom üzerinde bulunan ve fonksiyonu bilinmeyen iki geni bölerek direkt olarak etkilemektedir.

3.7.2. Şizofrenide moleküler genetik çalışmaları

3.7.2.1 Şizofrenide bağlantı çalışmaları

Bağlantı çalışmalarında amaç; kromozomal lokasyonu belli olan bir DNA markeri taşıyan birkaç etkilenmiş bireye sahip ailelerde bu hastalığın birlikte geçiş (co-transmisyon) kalıbını çıkarmaktır. Başlangıçta şizofreni ile ilgili bağlantı çalışmalarının büyük bölümü etkilenmiş bireylerden üremiş geniş ailelerde yapılmıştır. Bu tip soyağaçlarına sahip ailelerin en azından bir kısmında alellerin yeterli güçte birbirinden ayrılması ve bulguların tekrar edilmesi ümit edilirdi fakat bu gerçekleştirilemedi. Büyük ailelerde tespit edilen bulgular başlangıçta pozitif

sonuçlar vermiş ancak daha sonra bunların tekrarı gösterilememiştir (137). Birbiri ardına yapılan birçok çalışma bağlantının sarih ve tekrarlanabilir olduğunu gösterememiştir. Büyük uluslar arası kollaboratif çalışmalarda 22q11, 6p24-22, 8p22-21 ve 6q kromozomlarında bazı bulgular elde edildi (79,131). Yine bazı bölgelerde 13q14.1-q32 (21), 5q21-q31 ve 10p15-p11 kromozomlarında (146) uluslar arası konsorsiyumlar tarafından yeterli bulunmayan diğer bazı bağlantı bulguları elde edildi. Bunların dışında kollaboratif çalışmalarla şu anda halen incelenmekte olan kromozomlar 1q21-q22 ile 18p22-p21 loksleridir (20,133).

3.7.2.2. şizofrenide asosiyasyon alışmaları

Genetik asosiyasyon çalışmaları bir grup hasta ve sağlıklı kontrol bireylerde aday genlerin allelik sıklıklarının karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Diğer bir deyişle asosiyasyon çalışmaları küçük etkili genleri kuvvetli bir şekilde tanımlamaya verilen addır. Bütün genomu asosiyasyon ile taramak günümüzde mümkün olmayacağı için araştırmacılar test etmek üzere spesifik genleri ve loksleri seçmek zorundadırlar. Bir gen ya fonksiyonel olarak adaydır (yani ilgili hastalıkla ilişkisi olduğu bilinen bir biyolojik süreçte görev alır) ya da pozisyonel olarak adaydır (yani bu genyle bir yerde lokalize olmakta veya haritalanmaktadır ki bağlantı ile ilişkilendirilmektedir), veya her ikisinin kombinasyonu sözkonusudur (63). şizofrenideki bağlantı bulgularının sıhhatinden emin olunamadığı için günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu fonksiyonel aday genler üzerinde yoğunlaşmıştır. Fakat asosiyasyon çalışmaları bazı potansiyel problemleri beraberinde taşımaktadır. Etyolojisi bilinmeyen şizofreni hastalığı ve benzeri bozukluklar için potansiyel aday genlerin, insan genomunda bulunan yaklaşık 30-35 bin gen arasında aranması zorunluluğu nedeniyle bu

asosiyasyon çalışmaları sınırlı bir etkinliğe sahip olmaktadır. Her bir genin şizofrenide rol alması açısından dşşk bir öncelik ihtimaline sahip olması nedeniyle bu çalışmalardan pozitif sonuç almak bir hayli güçtür (109). Diğer bir problem de, birçok araştırıcının, çalışma için seçilen vakaların ve kontrol gruplarının genetik yapılarındaki bilinmeyen farklılıklara bağlı olarak yanlış pozitif sonuçlara ulaşılabileceği ihtimalini ekarte edememesidir. Bu tür problemler aile-temelli çalışma metodlarında ön plandadır fakat bütün aile üyelerinden alınacak yeterli sayıda rneği toplamak bir hayli güçtür (106). Son iki problem ise; pozitif bulguların tekrarlanabilirlik yorumlarıyla ilişkilidir. İlk alışma eğer yanlış pozitif (false positive) ise tekrarlanabilirlik problemlili hale gelir. Bununla beraber, daha sonraki çalışmalar yanlış negatif olabilir (false negative). Bu açılardan bakıldığında günümüze kadar yapılan şizofreni asosiyasyon çalışmaları, küçük genetik etkileri güvenilir bir şekilde ortaya koyabilmekten uzaktır. Buna rağmen son teknolojik gelişmelerle çalışmalara ayrılan zamanın bir hayli kısaltılması, genom çapında tarama yapabilmeyi mümkün hale getirmektedir. Bu teknolojik gelişmelerden bir tanesi DNA mikroarray sistemleridir ki bunlar bir deneyde binlerce SNPs'in genotipini ortaya koymak için spesifik olarak dizayn edilmiş sistemlerdir. Asosiyasyon çalışmalarında en çok kullanılan testlerden birisi ise geçiş dengesizliği (transmission disequilibrium) testidir. Bu test özellikle vaka-kontrol çalışmalarında eskiden kullanılan testlerle karşılaştırıldığında daha güvenilir sonuçlar vermektedir (65).

3.7.2.3. Şizofreniden sorumlu aday gen çalışmaları

Genetik asosiyasyon çalışmaları için aday genler; şizofreninin etyopatogenezinde rol aldığı kabul edilen spesifik reseptörler, enzimler veya fonksiyon gösteren diğer molekülleri hedefleyen farmakolojik, nörokimyasal ve klinik bulgular temel alınarak belirlenir. Antipsikotik ajanlara oldukça yüksek afinite gösteren dopamin ve serotonin reseptörlerini kodlayan genler buna iki önemli örnektir. Bu reseptörlere ait birçok varyasyon çalışılmıştır ancak bunların sonuçları birbiri ile çelişmektedir. Örneğin şizofrenide dopamin D2 reseptöründe iddia edilen Ser311Cys varyasyonu sonuçsuz kalmıştır (128). Dopamin D3 reseptör genindeki Ser9Gly varyasyonunun ise şizofrenide çok küçük bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (141). Uluslar arası bir çalışma grubu tarafından yüzlerce şizofreni hastası ve yüzlerce kontrol hastasından elde edilen materyallerle serotonin 2A reseptörünün T102C varyasyonunun rolü hakkında araştırma yapılmış, sonuçta çok önemli bir istatistiksel anlamlılık yakalanmış ancak eşitsizlik oranları (odds ratio) 1.2 civarında olduğu için bu polimorfizmin hastalığın etyopatogenezindeki rolünün çok az olduğu sonucuna varılmıştır (161). Bunlardan ayrı olarak aday genler ayrıca hastalığın klinik özelliği temel alınarak da seçilebilir ki buna “genetik öngörü” adı verilir. Genetik öngörü fenomenine göre ileri jenerasyonlarda hastalığın başlama yaşı azalır ve/veya fenotip daha belirgin hale gelir. Genetik öngörü birçok nöropsikiyatrik hastalıkta yapılmıştır: frajil-x sendromları, myotonik distoni, spinoserebellar ataksiler ve diğerleri. Genetik öngörü, genlerin kodlayıcı sekanslarının içinde veya dışındaki trinükleotid tekrarlarının (CAG, CCG gibi) uzunluğunun büyüklüğü ile oluşturulur. Bazı şizofrenili ailelerde genetik öngörü rapor edilmiştir (115). Bu

trinukleotid tekrarlarını göstermek amacıyla birçok teknik kullanılmaktadır, elde edilen sonuçlar ise maalesef çelişkilidir.

3.7.3. Şizofrenide günümüze kadar çalışılmış gen polimorfizmleri

Günümüze kadar şizofrenide birçok genin polimorfik tipleri araştırılmış ve bazılarında önemli bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmaların çoğu şizofeni hastalığının henüz karanlık olan etyopatogenezi araştırmaya yönelik araştırmalardır. Bu çalışmaların hepsini incelemek çok uzun zaman ve yer alacağından önemli olduğuna inanılan bazıları aşağıda sıralanmıştır:

1. Katekol-O-metil transferaz (COMT) polimorfizmi: Çalışmalarda hastalarda polimorfizm gösteren bölgenin kodladığı amino asit olan Val alleli sıklığı kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş, buradan hareketle prefrontal kortekste dopamin katabolizması arttığında prefrontal fizyoloji ve bilişsel fonksiyonların bozulabileceği, bunun da şizofreni riskinin artması anlamını taşıyabileceği belirtilmiştir (38).

2. Fosfolipaz A2 (PLA2) gen polimorfizmi: PLA2 geni insanlarda 1q25 kromozomu üzerinde haritalanmıştır. Bu konu Ramchand ve arkadaşları tarafından detaylı bir şekilde bir derleme yazısında ele alınmıştır (119). Bu derlemedeki bilgilere göre şizofreni hastalarında A2/A2 homozigotik genotip kontrollerle karşılaştırıldığında hayli yüksektir. Buradan hareketle PLA2'nin ilk intronunda bulunan Ban I polimorfik bölgesinin şizofreniden sorumlu olan loküsle bağlantı dengesizliği halinde olabileceği savunulmaktadır.

3. 5-hidroksi triptamin (5-HT) [Sub 2A] reseptör gen polimorfizmi: Serotonin nörotransmitterinin etkinliğinde önemli fonksiyona sahip olan bu reseptörün geninin kodlayıcı bölgesinin 102. pozisyonundaki (T102C)

polimorfizm ile şizofreni hastalığı arasında genetik bir asosiyasyon bulunmuştur (72). Bu T102C varyantının gen promoterindeki polimorfizm ile sıkı ilişki içinde olduğu bilinmektedir. Bu da hücre tipine göre reseptörün ekspresyonunun değişebileceği veya spesifik regülatör sinyallere cevabın değişebileceği anlamına gelebilir.

4. Dopamin D3 reseptör geni polimorfizmi: Bu gen ile ve dopamin D2 reseptör geni ile ilgili birçok araştırma mevcut olup bunlardan bir tanesinde bu gendeki (DRD3) Ser9Gly polimorfizminin şizofreni hastalarında TD'ye yatkınlıkla ilişkisi olduğu savunulmuştur (134).

Bunların dışında transkripsiyon faktör aktivatör protein 2 (AP-2) geni, monoamin oksidaz A geni, hipofizer adenil siklaz aktive edici peptid geni (PACAP), tirozin hidroksilaz geni, haptoglobin geni, kolesistokinin A reseptör geni (CCKAR), östrojen reseptör- α geni, metabotropik glutamat reseptör mGluR4 (GRM4) geni, dopamin reseptör D4 geni, sitokrom P450 1A2 geni, interlökin-1 β geni, triptofan hidroksilaz geni, sinaptik vezikül monoamin transporter (SVMT) geni, anjiotensin konverting enzim geni ve daha birçok gen ile ilgili polimorfizm çalışmaları yapılmış, bunların bir kısmı ile şizofreni veya şizofreninin bir semptomu arasında ilişki kurulabilmiş, bir kısmı ile ise hiçbir ilişki kurulamamıştır.

3.8. Bu tez çalışmasının amacı

Şizofreni, yaşam boyu yaygınlığı yaklaşık %1'lik bir oranla önemli bir halk sağlık sorunu olarak karşımızda durmaktadır. Birçok fizyolojik, çevresel, biyokimyasal, sosyal ve genetik faktörler etyopatogenezinin sorumlu tutulmakla birlikte henüz kesin olarak ortaya konulabilmiş bir sebebi yoktur. Bu açıdan

araştırılması gereken önemli bir konu olma özelliğini korumaktadır. Son yıllarda birçok hastalıkta olduğu gibi şizofrenide de serbest radikal metabolizmasının, oksidan ve antioksidan sistem arasındaki dengesizliklerin bu hastalığın etyopatogenezinde rol aldığına dair iddialar ileri sürülmektedir. Her ne kadar üzerinde çalışılan bazı modeller olsa da şizofreni için herhangi bir hayvansal model tam olarak oluşturulamadığından bu sahadaki önemli çalışmalar insanlarda yapılan klinik çalışmalar ile sınırlıdır.

Şizofreni hastalarının postmortem beyin dokularında, eritrositlerinde, lökosit, plazma ve serumlarında yapılan araştırmalarda hem oksidan hem de antioksidan sistem incelenmiş, aralarında bazı dengesizliklerin olduğu gösterilmiştir. Bu dengesizliklerden en önemlisi şüphesiz antioksidan sistemin önemli bir ögesi olan antioksidan enzimlerin durumudur. Değişik biyolojik örneklerde GSH-Px, CAT, SOD, glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivite ve düzeyleri araştırılmış, çoğunun normalden sapma gösterdiği bulunmuştur.

Bazı şizofreni hastalarının tedaviye diğerlerine nazaran daha iyi cevap vermesi, bir kısmında ilaç kullanımına bağlı TD gelişip diğerlerinde gelişmemesi, bu hastalığın klasik alt grup sınıflandırmasının dışında genetik bazı varyantlarının bulunabileceği fikrini vermektedir.

SOD enziminin insanda üç adet izoenzimi tariflenmiştir. Bunlardan mitokondrial izoenzim olan Mn-SOD indüklenebilir olma özelliğinden dolayı ayrı bir öneme sahiptir. Süperoksit üretiminin artması ile enzimin transkripsiyon yoluyla üretimi de artmaktadır. Şizofrenide serbest radikallerin rol aldığı bulgularının literatürde yer almasından sonra bu sistemin önemli bir ögesi olan

Mn-SOD enziminin geninin polimorfizminin çalışılması önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle şizofreninin alt tipleri, bu hastalarda TD'nin gelişip gelişmemesi, bazı hastaların düşük, bazılarının ise yüksek dozda antipsikotiklere cevap vermesi gibi konular ile, herhangi bir genetik varyasyonun bulunup-bulunmaması arasındaki muhtemel ilişkiler aydınlatılması gereken konulardır.

Mn-SOD enzim proteininin sentez edildikten sonra MTS kısmına denk gelen –9. aminoasit olan Val yerine gendeki bir nükleotid değişimi sonucu Ala amino asiti gelebilmekte, bu da enzimin mitokondriye girişini ve dolayısıyla fonksiyon görmesini etkileyebilmektedir. Bu açıdan oksidatif stresin varlığı kesin olarak gösterilmiş şizofreni hastalarında psikiyatrik herhangi bir hastalık taşımayan kontrol grubu bireylere göre Mn-SOD geninde polimorfizm olup olmaması önem kazanmaktadır. şizofreni hastalarında ilgili genin allellerinin tercihli formlarından herhangi birinin kontrol grubundan farklı çıkması mitokondri gibi ROS oluşumunun çok yoğun olduğu bir organelde ve dolayısıyla hücrenin tümünde bazı anormalliklerle sonuçlanacaktır. Bu çalışmada amacımız Mn-SOD allelinin şizofreni ile olan genetik ilişkisini ortaya koymaktır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Hastaların seçimi ve kan örneklerinin toplanması

Çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Kliniği ile Elazığ Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi'nde takip ve tedavileri yapılan şizofreni hastalarından; kendilerinin, birinci derece yakınlarının veya hastane otoriteleri ve hekimlerinin rızası ile kan örnekleri alındı. Epilepsi, mental retardasyon, madde bağımlılığı olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Şizofreni hastaları birbirinden farklı dört psikiyatristin (bir grup hasta için H. Tutkun, H. Herken, diğer bir grup hasta için M.N. Namlı, M. Yanık) değerlendirmelerine göre alt sınıflara ayrıldığında DSM IV sınıflamasına göre 3 farklı alt tip belirlendi: Paranoid, disorganize ve rezidüel şizofreni. Hastalar ayrıca kullandıkları nöroleptik ilaçların klorpromazin eşdeğerliklerine göre düşük ve yüksek doz olarak iki sınıfa ayrıldı.

Kontrol grubunu ise, psikiyatrik hastalıklar başta olmak üzere organik ve kronik hastalığı olmayan, yaş dağılımı hastaların yaş dağılımına uygun sağlıklı bireyler oluşturdu. Hasta ve kontrol grubunun benzer coğrafi bölgelerden olmasına dikkat edildi. Kanlar sabah aç karnına dinlenmiş hastaların antekübital veninden daha önceden hazırlanmış EDTA'lı tüplere alındı. Ortalama olarak alınan kan miktarı 5cc idi. Normal EDTA'lı tüpler 2cc kan alınması için yetecek kadar EDTA içerdiğinden tüplere 5cc kan alındığında pıhtılaşma olmaması için %7.5'luk K₃EDTA'dan her tüpe ortalama olarak 60µL ilave edildi. Kan alma işlemi bitinceye kadar daha önce alınan kanlar buzdolabının rafında saklandı.

4.2. Örneklerin saklanması ve analizlere hazırlanması

Kanların alınma işlemi bittikten sonra DNA saflaştırması yapılıncaya kadar ortalama olarak 1 hafta +4C°'ye ayarlı buzdolabı rafında bekletildi. DNA analizi için tüplerden 300µL kan alınmadan önce kanlar birkaç defa alt-üst edilerek homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Kanlar mikrosantrifüjün bir defada alabileceği maksimum tüp miktarına göre, 12'şerli gruplar oluşturularak çalışıldı.

4.3. Deneylerde kullanılan kimyasallar maddeler, sarf malzemeleri ve cihazlar

Mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157.MP, Germany ve Eppendorf microcentrifuge type 5415C, Germany), Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan), pH metre (Hanna Instruments HI8521 pHmeter, Italy), UV/visible spektrofotometre (LKB Biochrom Ultraspec Plus 4054 UV/visible spectrophotometer, Cambridge, England), hız ayarlı vorteks (Labinco L46, The Netherlands), 37°C ye ve 65°C'ye (bu sıcaklık hızlı DNA rehidratasyonu yapabilmek için gereklidir) ayarlanabilecek su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany), Elektroforez aparatı 1200V-500mA E815 (Belgium), Electrophoresis box (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium), Eppendorf Mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 22331 Hamburg, Germany), UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), steril 1.5 ml, 0.5 ml ve 0.2 ml'lik Eppendorf santrifüj tüpleri, isopropanol, %70'lik etanol, borik asit, EDTA, bromphenol blue, xylene cyanole, ficoll, agaroz, yüksek rezolüsyonlu agaroz, ethidium bromide, TRIS baz, potasyum asetat, magnesium asetat, TRIS-asetat,

DTT (dithiotreitol), genomik DNA pürifikasyon kiti, deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), sığır serum albumini (BSA-acetilated), ϕ (phi)-X174DNA/*Hae*III ve ϕ (phi)-X174DNA/*Hinf* I DNA marker'leri.

4.4. Kandan DNA izolasyonu

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

- 1.5 ml lik tüplere 900 μ L “cell lysis” (hücre parçalama) solusyonu konuldu.
- Alt-üst edilmiş kandan 300 μ L alınarak hücre parçalama solusyununun üzerine ilave edildi, 5-6 defa alt-üst edildi, 10 dak. oda ısısında bekletildi (bu aşamada eritrositler parçalanmaktadır).
- 15.000 x g de 20 saniye oda ısısında santrifüjlendi.
- Alttaki beyaz kısma zarar vermeden mümkün olduğu ölçüde fazla süpernatant uzaklaştırıldı ve atıldı. Altta hücrelerin üzerinde yaklaşık olarak 10-20 μ L sıvı bırakıldı.
- Hücre parçalama solusyonundan 300 μ L alınarak çok hafifçe vortekslenmiş hücre çöküntüsünün üzerine eklendi ve 5-6 kez alt-üst edildi. 2-4. basamaklar tekrar edildi. Beyaz hücrelerin arasında hala bazı kırmızı hücreler görülüyorsa bu durumda tekrar hücre parçalama solusyonu eklenerek yukarıdaki deneyler tekrarlandı.

- Beyaz hücreler şiddetle vortekslenerek iyice karışması sağlandı (10-15 saniye).

- Vortekslenmiş hücrelerin üzerine 350 μL “Nuclei lysis” (çekirdek parçalama) solusyonu eklendi. Beyaz hücrelerin parçalanması için solusyon 5-6 kez pastör pipeti ile pipetlendi ve bırakıldı. Solusyon visköz bir yapı kazandı. Karıştırıldıktan sonra hala hücre kümeleri görünüyorsa 37°C’de inkübe edildi ve kümelerin bozulması beklendi. Kümeler 1 saat sonra hala varsa 100 μL çekirdek parçalama solusyonu eklenerek inkübasyon tekrarlandı.

- Oda ısısına getirilmiş Nükleer lizatın üzerine 120 μL “protein precipitation” (protein çöktürme) solusyonu eklendi. 10-20 saniye şiddetle vortekslendikten sonra küçük, değişik kahverengi tonlarında protein kümeleri görüldü. Numuneler tam oda ısısına gelmeden protein çöktürme solusyonu eklendiğinde yeterli bir protein çöküntüsü elde edilemeyeceğinden hareketle iyi bir çöktürme için bu ayrıntıya dikkat edildi.

- Oda sıcaklığında 15.000 x g’de 3 dakika santifüjlendi. Eppendorf tüpün dibinde koyu kahverengi bir protein çöküntüsü görüldü.

- Süpernatant 300 μL izopropanol (oda ısısında) içeren 1.5 ml’lik santifüj tüpüne transfer edildi.

- Sürekli alt-üst edilerek ve ters çevrilerek karıştırıldı. Beyaz iplik görünümündeki DNA, görülebilen bir kitle oluncaya kadar bu çevirme işlemine devam edildi. Bazı numunelerde görülebilen kümeler oluşurken diğer bazılarında çok küçük miktarda iplikçik görüldü.

- 1 dakika oda sıcaklığında $15.000 \times g$ 'de santrifüjlendi. DNA, örnekteki lökosit miktarının az veya fazla olmasına göre miktarı değişebilen beyaz bir çöküntü olarak görüldü.

- Süpernatant dökülerek dipte kalan DNA'nın üzerine 300 μL oda sıcaklığındaki %70'lik etanol eklendi. Alt-üst yapılarak DNA pelleti ve tüpün kenarları yıkandı. Yukarıdaki santrifüjleme işlemi tekrarlandı.

- Etanol dikkatlice aspire edildi. Bu aşamada DNA çok gevşektir. Yanlışlıkla pipetlenebileceğinden dikkatli olmak gerekir. Tüpler temiz kurutma kağıtlarının üzerine ağızları alta gelecek şekilde yerleştirildi, böylece fazla etanol alınmış oldu. Sonra 5-10 dakika normal havada kurumaya bırakıldı.

- Kurumuş tüpe 100 μL DNA rehidratasyon solusyonu eklendi. DNA'yı rehidre etmek için 65°C 'de 1 saat inkübe edildi. Tüp ara ara çalkalandı (Alternatif olarak DNA 1 gece boyunca oda ısısında veya $+4^\circ\text{C}$ 'de rehidre edilebilir, aynı sonuç elde edilir).

- DNA 0.5 mL'lik eppendorf tüplere aktararak $2-8^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

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

4.5. Oligonükleotidler (primerler)

Çalışmada kullanılacak olan Primer (Oligonükleotid) IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.) firmasına sentezletirildi (Coralville, IA, USA). PCR deneylerinde kullanılacak olan oligonükleotidler, insan DNA'sı üzerindeki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanıldı. Satın alınan primerin nükleotid sekansı ve orijini aşağıda belirtilmiştir:

Sense 5' **ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG** 3' (SOD A1)

Antisense 5' **GCGTTGATGTGAGGTTCCAG** 3' (SOD S1) (99).

Ön denemelerden sonra PCR işleminde kullanılacak olan primer konsantrasyonunun 50 µl PCR son hacmi için 20 pmol olması planlandı. Ön denemelerde 5 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 30 pmol, 40 pmol, 50 pmol, 75 pmol ve 100 pmol primer serileri diğer bütün değişkenler sabit kalmak üzere eşit miktarda DNA kullanılarak denendi. Bunlardan en güzel sonuç alınanının 20 pmol olduğu gözlemlendi (Resim 2a ve 2b). Bu denemelere ait teknik detaylar ve elde edilen bulgular tezin bu bölümünün ilerleyen kısımlarında ve Bulgular bölümünde verilecektir. Bu miktar, literatürde Mn-SOD enziminin polimorfizminin çalışıldığı bazı makalelerde kullanılan primer konsantrasyonu ile aynı (139), bazılarında ise farklıdır (12,45,173). Stok ve çalışma primer serileri 5 mM pH 7.5 Tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanarak eşit kısımlar halinde (20'şer µL hacimlerde) derin dondurucuda saklandı.

4.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Hasta ve kontrollerden elde edilen DNA örnekleri PCR ile çoğaltıldı (126). Çoğaltılan 107 baz çiftlik DNA nükleotid dizisine ait detaylı bilgiler Şekil 6'da verilmiştir. *Taq* polimerazın bulunduğu ortamda her bir primerden 20 pmol

kullanıldı. Sense ve antisense primerler, 1.25 U *Taq* DNA polimeraz (Perkin-Elmer), 2 mM dNTP, 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl ve 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) tamponu (10X buffer) içeren master miks solusyonu (30 µL), 20 µL su içinde 50 ng DNA içeren 0.5 mL'lik tüplere eklendi (reaksiyon hacmi 50:1 olarak belirlendi). PCR koşulları *NgoM* IV enziminin kullanılarak Mn-SOD geninin MTS kısmının çoğaltıldığı araştırmalara göre belirlendi (12,53,99).

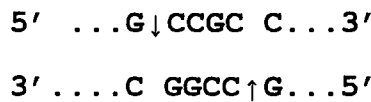
Met	Leu	Ser	Arg	Ala	Val	Cys	Gly	Thr		
CAGC.	ATG.TTG.	AGC.CGG.	GCA.G	TG.TGC.	GGC.	AC				30
Ser	Arg	Gly	Leu	Pro	Pro	Val	Leu	Gly	Tyr	
C.AGC.	AGG.CAG.	CTG.GC	G↓CCG.G	T	T.TTG.	GGG.TA				60
Leu	Gly	Ser	Arg	Gln	Lys	His	Ser	Leu	Pro	
T.CTG.	GGC.TCC.	AGG.CAG.	AAAG.C	AC.AGC.	CTC.CC					90
Asp	Leu	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Ala	Leu	Glu	
C.GAC.	CTG.CCC.	TAC.GAC.	TAC.G	GC.GCC.	CTG.GA					120
Pro	His	Ile	Asn		Gln	Ile	Met	Gln		
A.CCT.	CAC.ATC.	AAC.GC	G.CAG.	A	TC.ATG.	CAG.CT...	3'			150

Şekil 6. Mn-SOD geninin ilk 150 nükleotidlik kısmında PCR reaksiyonunda üretilen 107 baz çiftlik bölgesi ile bu bölgenin üretilmesini sağlayan primerler, restriksiyon enzimi *NgoM* IV'ün tanıma sekansı, bu enzimin kesim noktası ile 27. baz çiftinde meydana gelebilecek T-C konversiyonunun kesime etkisinin şematik olarak gösterimi. Köşeli parantezlerin arası sinyal dizisini belirtmektedir, köşeli parantez kapatıldıktan sonra Mn-SOD geninin yapısal bölgesi başlamaktadır. Normal yazı stili ile yazılan bölge PCR reaksiyonunda ürettiğimiz 107 baz çiftlik bölgeyi, alttaki italik yazı stili ile gösterilen bölge ise tüm Mn-SOD geninin devam eden nükleotid dizisinin bir kısmını göstermektedir. Nokta işaretleri her bir kodonu belirlemek için kullanılmış olup, ilk amino asit olan metionini (Met) kodlayan kodon ilk sırada yer almıştır. Kodonların denk geldiği amino asitler nükleotid baz dizisinin üst kısmında üç harfli sembollerle gösterilmiştir. Gri renk ile taralı alan sense ve antisense primerleri (ilki Mn-SOD primer A1, ikincisi Mn-SOD primer S1), çevçeye içine alınmış bölge restriksiyon enzimi olan *NgoM* IV'ün tanıma sekansını (bu bölgenin son nükleotidi olan T, eğer C haline dönerse enzim bu bölgeyi tanımakta ve dolayısıyla kesme işlemi gerçekleşmekte, eğer T olarak kalırsa enzim bu sekansı tanıyamadığından kesim işlemi gerçekleşmemektedir. İlk durumda yani kesilme işleminin olduğu durumda GCT üçlü kodonunun kodladığı amino asit Ala olmakta, ikinci durumda yani kesilmenin olmadığı durumda GTT üçlü kodonu Val amino asitini kodlamaktadır.), ok işareti bu enzimin kestiği noktayı göstermektedir.

PCR profilinin birinci aşaması çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 5 dakika 95°C’de gerçekleştirildi. PCR profilinin ikinci aşaması 95°C’de 1 dakika denatürasyon (melting), 61°C’de 1 dakika yapışma (annealing) ve 72°C’de 2 dakika uzatma (extention) olmak üzere 35 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Bu tür çalışmalar için yapılan bütün PCR analizleri kalitatif amaçlı olarak yapıldığında ikinci segmentin siklus sayısı rutin olarak 35 olarak belirlendi. Bu sayıdaki sikluslar ilgi duyulan genin transkriptlerini çoğaltmak için genellikle yeterlidir. Üçüncü aşama olan en son siklustaki uzatma periyodu 72°C’de 7 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve örnekler 4°C’ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PCR amplikonları agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Genellikle total PCR ürününün %40’ı agaroz jel elektroforezine koşuldu. Agaroz jelin yüzdesi DNA fragmentlerinin beklenen hacimlerine göre belirlendi. PCR ürünleri daha ileri analizler için veya tekrarlar için -20°C’de saklandı.

4.7. Restriksiyon ve modifikasyon enzimleri

Mn-SOD enzim geninin PCR ürününün ilgili bölgesinin kesimi için kullanılan ve *Neisseria gonorrhoeae* bakterisinden elde edilen NgoM IV restriksiyon endonükleaz enzimi Promega’den satın alındı (Promega, Madison, WI, USA) (Total 500 U, 10 U/μl). Bu enzimin kesme sekansı aşağıda gösterildiği gibidir:



Taq DNA polimeraz enzimi Promega firmasından satın alındı (Madison, WI, USA) (Total 500 U, 5 U/μl). Deneylerde 30 μL master miks soluyonunun

içinde kullanılacak olan 10X buffer (50mM KCl, 10mM Tris-Hcl (pH 9), %0.1 tritonX-100) ve MgCl₂ (25 mM MgCl₂) çözeltileri enzimin ticari kutusunun içinde mevcuttu.

4.8. Restriksiyon enzimi ile DNA'nın sindirim analizi

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarının DNA'ları *NgoM* IV restriksiyon enzimi ile sindirildi. Bu işlemler için gerekli olan temel kurallar iki ayrı araştırmadan elde edildi (13,127). Sindirim için gerekli olan stok tamponlar (10X) enzimlerle birlikte hazırlandı. Sindirim tamponunun içeriği şu şekilde idi: 25 mM Tris-acetate (pH 7.8); 100 mM potassium acetate, 10 mM Mg acetate; 1 mM DTT. Genel kural olarak her µg DNA için 1 ünite enzim kullanıldı.

Tamponların ve enzimlerin hacimleri en son hacimin %10'unun altında tutulmaya çalışıldı (örneğin final hacim olarak 20 µL olan sindirim karışımının içinde maksimum 2 µL enzim ve 2 µL tampon vardır). İnkübasyon sıcaklığı restriksiyon enziminin satın alındığı firmanın önerisine göre ayarlandı, 37°C olarak belirlendi. İnkübasyon zamanı 16 saat olarak belirlendi. Halihazırdaki bilinen sekans verileri ile belirlenen ve beklenen bantların hacimleri, bu çalışmadan elde edilen bantların genişliği ile karşılaştırıldı. Beklenen fragmentler 89 bç, 18 bç (Ala alleli) ve 107 bç (Val alleli) uzunluğunda fragmentlerdir. *NgoM* IV enziminin kesecek bir bölgesi varsa ilk iki uzunluğa sahip fragmentler elde edilmekte, kesecek bölge yoksa 107 bç olarak bütün şekilde kalmaktadır.

NgoM IV enziminin ünite tarifi: 37 °C'de 1 saatte 50 µL hacmindeki deney ortamında 1 µg DNA'yı tamamen sindirmek için gerekli olan enzim miktarıdır.

4.9. Agaroz jel elektroforezi

DNA jel elektroforezi Aaij ve arkadaşlarının metoduna göre (1) daha önce uygulandığı gibi yapıldı (22). Agaroz, Sigma firmasından satın alındı (Sigma, Germany). Koşma tamponu olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu (0.5X) kullanıldı. Bu tamponun stok şekli olan 5X tampon şu şekilde hazırlandı: 54 g TRIS-base, 27.5 gr borik asit, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8) 1 L distile ve deiyonize suda çözüldü. Jel elektroforezini yapmak için Horizontal tipte jel elektroforez sistemi kullanıldı (Electrophoresis box, Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium). Elde edilecek bantların netliği ve keskinliği için ön çalışma olarak PCR ürünleri ile değişik konsantrasyonlarda agaroz jeli kullanılarak elektroforez yapıldı (%0.8, %1, %1.5, %2, %2.5, %3). Sonunda kullanılan jelin konsantrasyonu, mevcut analiz edilecek DNA'nın miktarına bağlı olmak üzere %3 olarak belirlendi. UV ışığında DNA fragmanlarını görmek için Ethidium bromide floresan boyası kullanıldı (135). Her 100 mL 0.5X TBE tamponu için, 5 µL hacimde, konsantrasyonu 10 mg/mL olan EtBr ilave edildi (Jeldeki ve koşma tamponundaki final EtBr konsantrasyonu 0.5 µg/ml'dir). Jel üzerindeki kuyucuklara DNA'nın aplikasyonu için yükleme tamponu kullanıldı (%15 ficoll, %0.25 BPB [brom phenol blue], %0.25 XC [xylene cyanole] 100 ml su içerisinde çözüldü, 3'er ml'lik hacimlere [aliquot] ayrılarak deneylerde kullanıldı). Bu aplikasyon tamponunun oranı, mevcut applike edilecek PCR ürününün %10'unu geçmeyecek şekilde ayarlandı. Bunun için sindirim yapılmış DNA ürününe (total 25 µL) 2.5 µL boyalı tampon ilave edildi. Jeller oda sıcaklığında 100V ve 40 mAmp (cihazda maksimum 100mA ayarı yapıldı ama hiçbir zaman 50mA'i

geçmedi) sabit akımda koşturuldu. Uzun süreli koşturmalar için 30 V sabit voltajı uygulandı.

4.10. Deneylerde kullanılan marker DNA'ların hazırlanması

Deneyler boyunca iki farklı DNA markeri kullanıldı. Bunlar ϕ (phi)-X174DNA/*Hae* III ve ϕ (phi)-X174DNA/*Hinf* I DNA markerleri. Bunlardan ilki 72 ile 1353 baz çiftlik DNA parçalarının tanınmasına imkan sağlarken ikincisi 24 ile 726 baz çiftlik DNA oligonükleotidlerinin tanınmasına yardımcı olabilmektedir. Agaroz jel elektroforezinde marker olarak kullanılmak üzere hazırlanan bir marker DNA şeması aşağıda verilmiştir:

	Alınan hacim (μ l)
DNA marker	5
Su	75
5X TBE tamponu	10
Yükleme tamponu	10
Toplam hacim	100

Bu pipetleme işlemleri tamamlandıktan sonra eppendorf tüp termocycler içinde 65°C'de 5 dakika bekletildi ve buz içinde aniden soğutularak kullanıldı. Ticari marker kitlerinin konsantrasyonunun 1 μ g/ μ l olduğu gözönüne alındığında hazırlanan tüpte elde edilen toplam marker DNA konsantrasyonu 5 μ g/100 μ l = 50 ng'dır. Her bir deneyde pipetlenen DNA marker miktarı 10 μ l olduğundan kuyucuklara uygulanan toplam DNA miktarı (50 ng x 10=) 500 ng'dır.

4.11. Hasta ve kontrol numuneleri çalışılmadan önce yapılan ön hazırlık çalışmaları

4.11.1. DNA konsantrasyonunun PCR ürününün kalitesi üzerine olan etkisinin araştırılması.

52 no'lu hastanın DNA'sı (saflaştırma yapıldıktan sonra 260nm'de yapılan okuma ve hesaba göre DNA konsantrasyonu 400 ng/ μ L olarak bulunmuştur) 6

adet PCR tüpüne 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng, 200 ng ve 400 ng son konsantrasyonda olacak şekilde paylaştırıldı ve yukarıda bahsedilen PCR şartları oluşturularak 35 siklus olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 1a ve 1b). Elde edilen üründen 20 µL alınıp üzerine 2 µL yükleme tamponu eklendikten sonra %3'lük etidyum bromürlü agaroz jele 20 µL olarak yüklendi. 100V'luk elektriksel alanda 2 saatlik koşturma işleminden sonra bantlar UV ışığı altında fotoğraflandı.

Tablo 1. a) 52 no'lu şizofreni hastasının (Ş-52) DNA'sı kullanılarak yapılan PCR reaksiyonunda master miks katılmadan önce PCR tüpüne konulan total 20 µl'lik hacmi oluşturan bileşenler. Normal konsantrasyonu 400 ng/µl olan DNA örneği ilk olarak 8 kat seyreltilerek 50 ng/µl DNA elde edilmiştir.

Ş-52 no'lu hastanın DNA'sı (50 ng/µl)			
	DNA (µl)	H ₂ O (µl)	Total (µl)
25 ng	0.50	19.50	20
50 ng	1.00	19.00	20
75 ng	1.50	18.50	20
100 ng	2.00	18.00	20
200 ng	4.00	16.00	20
400 ng	8.00	12.00	20

Tablo 1. b) DNA konsantrasyonunun PCR ürününe etkisinin araştırılması amacı ile yapılan PCR reaksiyon deneyinde oluşturulan master miks bileşenlerinin toplu olarak gösterilmesi.

MASTER MIKS		
	1X (µl)	10X (µl)
H ₂ O	18.75	187.5
dNTP (mix, 2 mM)	4.00	40
Primer A1 (20 pmol/final)	1.00	10
Primer S1 (20 pmol/final)	1.00	10
MgCl ₂ (1 mM)	2.00	20
10X buffer (magnezyumsuz)	5.00	50
Taq polimeraz (5 U/µL)	0.25	2.5
Total	30.00	300

4.11.2. Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisinin araştırılması

Bu konu ile ilgili olarak yapılmış çalışmalarda değişik primerlerden değişik konsantrasyonlarda kullanıldığından, deneyleri optimize etmek ve tasarruf sağlamak açılarından en uygun primer konsantrasyonunu bulmak için aşağıdaki deneyler gerçekleştirildi. Hem A1 hem de S1 (sense ve antisense) primerlerinden PCR tüpünde 5 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 30 pmol, 40 pmol, 50 pmol, 75 pmol ve 100 pmol son konsantrasyon olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 2a, 2b ve 2c). Bunun için hastalar ve kontroller arasından iki DNA numunesi seçildi: 28 no'lu şizofreni (Ş-28) hastası ve 121 no'lu kontrol bireyi (K-121).

Tablo 2. a) 28 no'lu şizofreni hastasından elde edilen DNA ile (konsantrasyonu 45 ng/μl) yapılan PCR deneylerinde master miks konulmadan önce PCR tüpüne pipetlenen bileşenlerin miktarları ve oranları. Bu deneyde 8 farklı primer konsantrasyonunda 8 ayrı PCR deneyi gerçekleştirilmiştir.

Ş-28 (45 ng/μL DNA)					
	DNA (μL)	Primer A1 (20 pmol/μL) (μL)	Primer S1 (20 pmol/μL) (μL)	Su (μL)	Total (μL)
5 pmol	1.10	0.25	0.25	18.45	20
10 pmol	1.10	0.50	0.50	17.90	20
20 pmol	1.10	1.00	1.00	16.90	20
30 pmol	1.10	1.50	1.50	15.90	20
40 pmol	1.10	2.00	2.00	14.90	20
50 pmol	1.10	2.50	2.50	13.90	20
75 pmol	1.10	3.75	3.75	11.40	20
100 pmol	1.10	5.00	5.00	8.90	20

Tablo 2. b) 121 no'lu kontrol bireyinden elde edilen DNA ile (konsantrasyonu 112 ng/μl) yapılan PCR deneylerinde master miks konulmadan önce PCR tüpüne pipetlenen bileşenlerin miktarları ve oranları. Bu deneyde 8 farklı primer konsantrasyonunda 8 ayrı PCR deneyi gerçekleştirilmiştir.

K-121 (112 ng/μL DNA)					
	DNA (μL)	Primer A1 (20 pmol/μL) (μL)	Primer S1 (20 pmol/μL) (μL)	Su (μL)	Total (μL)
5 pmol	0.60	0.25	0.25	18.90	20
10 pmol	0.60	0.50	0.50	18.40	20
20 pmol	0.60	1.00	1.00	17.40	20
30 pmol	0.60	1.50	1.50	16.40	20
40 pmol	0.60	2.00	2.00	15.40	20
50 pmol	0.60	2.50	2.50	14.40	20
75 pmol	0.60	3.75	3.75	11.90	20
100 pmol	0.60	5.00	5.00	9.40	20

Tablo 2. c) Primer konsantrasyonunun PCR ürününe ve restriksiyon enzim kesim kalitesine etkisinin araştırıldığı çalışmada primersiz olarak hazırlanan master miks solusyonu ve bileşenlerinin birbirine oranları.

MASTER MIKS		
	1X (μL)	20X (μL)
H ₂ O	18.75	375
dNTP (mix, 2 mM)	4.00	80
MgCl ₂ (1 mM)	2.00	40
10X buffer (magnezyumsuz)	5.00	100
Taq polimeraz (5 U/μL)	0.25	5
Total	30.00	600

4.11.3. Restriksiyon endonükleaz aktivitesinin sindirim üzerine ve bant keskinliği üzerine etkisinin araştırılması.

Mn-SOD geninin polimorfizminin araştırıldığı çalışmalarda Cac8, BsaW1 ve NgoM IV gibi birbirinden farklı restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Dikkat çeken nokta ise bütün çalışmalarda birbirinden farklı enzim ünite birimlerinin kullanılması idi. Satın alınan NgoM IV enziminin prospektüsünde herhangi bir ünite birimi önerilmemekte idi ancak verilen örnek bir çalışma şemasında 10 U/μl konsantrasyonunda olan enzimden 0.5 μl kullanılmakta idi. Enzim kitinin içinde

bulunan 10X tamponun miktarına bakıldığında her bir deneyde 5 U kullanıldığı takdirde yetecek kadar tamponun mevcut olduğu tespit edildi. Kitin prospektüsünde 1 Ünite *NgoM IV* enzimi “1 saatte 37°C’de 50µl deney hacmi içinde 1µg DNA’yı tamamen sindirmek için gerekli enzim miktarı” olarak tarif edilmekte idi. Bu bilgiye göre tarafımızdan gerçekleştirilecek PCR reaksiyonundan elde edilen muhtemel ampikon miktarı için 1 U enzimin yeteceği hesap edildi. Kullanılacak optimum enzim ünitesini tespit etmek amacıyla K-121 no’lu numuneden her tüpte 50 ng/final olacak şekilde iki PCR deneyi yapıldı (100µl total hacim) (Tablo 3a). 35 siklus sonunda elde edilen PCR ürününden 5 ayrı eppendorf tüpe, her bir tüpte 15 µl olacak şekilde dağıtıldı. Üzerine *NgoM IV*, BSA, 10X tampon eklenerek 16 saatlik inkübasyona bırakıldı (Tablo 3b). Inkübasyon sonunda her bir tüpe 2.5 µl yükleme tampon eklendi, bu karışımdan 20 µl alınarak %3’lük etidyum bromür içeren agaroz jeline uygulandı. 100 V elektriksel alanda 2 saat koşturma işleminden sonra fotoğraflama işlemi yapıldı.

Tablo 3. a) Restriksiyon endonükleaz enziminin (*NgoM IV*) değişik konsantrasyonlarının bant keskinliği ve allel sindirimi üzerine etkisinin araştırılması amacı ile yapılan PCR deneyi için hazırlanan master miks solusyonunun bileşenleri ve oranları. PCR deneyi 35 siklus olarak 100 µl final hacimde gerçekleştirilmiştir.

MASTER MIKS		
	2X (µl)	20X (µl)
H ₂ O	37.50	375
dNTP (mix, 2 mM)	8.00	80
Primer A1 (20 pmol/final)	2.00	20
Primer S1 (20 pmol/final)	2.00	20
MgCl ₂ (1 mM)	4.00	40
10X buffer (magnezyumsuz)	10.00	100
<i>Taq</i> polimeraz (5 U/µL)	0.50	5
Total	60.00	600

Tablo 3. b) Bant keskinliğine ve kalitesine restriksiyon enziminin (NcoM IV) ünitesinin etkisinin araştırılması amacı ile tüplere eklenen birbirinden farklı konsantrasyonlardaki enzim, bovin serum albumin (BSA) ve 10X tamponun birbirine olan oranları ve deney ortamının oluşturulması.

	NcoM IV (1 U/ μ l)	BSA (0.1 mg/ml)	NcoM IV için 10X tamponu (μ l)	Amplikon (μ l)	Total (μ l)
K-121	1.0	4.0	5.0	15	25
	2.0	3.0	5.0	15	25
	3.0	2.0	5.0	15	25
	4.0	1.0	5.0	15	25
	5.0	-	5.0	15	25
K-121	1.0	4.0	5.0	15	25
	2.0	3.0	5.0	15	25
	3.0	2.0	5.0	15	25
	4.0	1.0	5.0	15	25
	5.0	-	5.0	15	25

4.11.4. İnkübasyon süresinin elde edilen bant kalitesine etkisinin araştırılması.

Her ne kadar 60 dak. veya 90 dak.'lık inkübasyonlar enzim ünitesi tarifine göre PCR ürünü amplikonun sindirimi için yeterli olsa da elde edilen bantların keskinliği ve kalitesi için inkübasyon süresinin uzun tutulması yararlı gibi gözükmemektedir. Nitekim NcoM IV enziminin prospektüsünde 16 saatlik inkübasyonun bant keskinliğini ve kalitesini arttıracak belirtilmektedir. Bununla birlikte, iki Ş-28 no'lu numuneden 100'er μ l içinde gerçekleştirilen 35 siklus PCR reaksiyonundan sonra elde edilen amplikonlar 6'şar tüpe 15 μ l olarak dağıtıldı. Üzerine 1U NcoM IV ve 10X restriksiyon endonükleaz tamponu eklendikten sonra eppendorf tüpler sırası ile 37°C'de 60 dak., 90 dak., 3 saat, 5 saat, 10 saat ve 16 saat olmak üzere inkübasyona tabi tutuldu (Tablo 4). İlk çıkarılanlar +4°C'de bekletildi. Son inkübasyon süreleri de tamamlandıktan sonra oda ısısına getirilen tüplerin üzerine 2 μ l yükleme tamponu eklenerek karıştırıldı.

ve toplam olarak 20 µl numune %3'lük etidyum bromürlü agaroz jeline applike edildi. 100 V elektriksel alanda 2 saat elektroforez işlemi gerçekleştirildikten sonra UV ışığı altında bantların fotoğrafı çekildi.

Tablo 4. PCR ürünlerinin sindirimi için restriksiyon enzimi ile yapılan inkübasyon işleminde (37°C) sürenin bant keskinliği ve kalitesine etkisinin araştırıldığı çalışmada tüplere eklenen bileşenler ve inkübasyon süreleri.

		Amplikon (µl)	NgoM IV (1U/2.5µl) (µl)	NgoM IV için 10X tamponu (µL)	Total (µl)
	60 dak.	15	2.5	2.5	20
	90 dak.	15	2.5	2.5	20
Ş-28	3 saat	15	2.5	2.5	20
	5 saat	15	2.5	2.5	20
	10 saat	15	2.5	2.5	20
	16 saat	15	2.5	2.5	20
	60 dak.	15	2.5	2.5	20
	90 dak.	15	2.5	2.5	20
Ş-28	3 saat	15	2.5	2.5	20
	5 saat	15	2.5	2.5	20
	10 saat	15	2.5	2.5	20
	16 saat	15	2.5	2.5	20

4.12. İstatistiksel analizler

Genetik dağılımın Hardy-Weinberg dengesine uyumu X^2 goodness-of-fit testi ile analiz edildi. Hastalar ve kontroller arasındaki genotipik dağılımların farklılıkları ve aynı zamanda TD olan ve olmayan hastalar, cinsiyetler, şizofreni alt grupları ve kullanılan nöroleptiklerin klorpromazin eşdeğerliği açısından düşük ve yüksek doz ilaç alanlar olarak iki sınıfa ayrılan hastalar arasındaki farklılıklar gözlenen ve beklenen değerler açısından Ki-kare veya Fisher's exact test ile değerlendirildi. Kontrol ve hastalar arasındaki ve aynı zamanda TD olan ve olmayan hastalar arasındaki allelik dağılım farklılıkları Fisher's exact test ile değerlendirildi. Hastaların demografik özelliklerindeki farklılıklar (yaş, nöroleptik

tedavi süresi, mevcut nöroleptik dozu) her 3 Mn-SOD genotipi göz önüne alınarak one-way analysis of variance (ANOVA) ile belirlendi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Bütün istatistiksel testler “SPSS® for Windows computing program, Version 9.0” ile gerçekleştirildi.



5. BULGULAR

Çalışmanın başlangıcında 173 adet şizofreni hastası ve 200 adet sağlıklı kontrol bireyi vardı. Her iki gruptan bazı bireyler değişik sebeplerle, örneğin DNA izolasyonunun verimli olmaması, klinik sınıflandırmanın tam yapılamaması, bireyin demografik verilerinin tam olarak elde edilememesi gibi sebeplerle çalışma dışı bırakıldı. Son olarak üzerinde istatistiksel analizlerin yapıldığı hasta ve kontrol bireylerinin sayısı sırasıyla 153 ve 196 olarak belirlendi. Şizofreni hastalarının cinsiyet dağılımı 94 erkek ve 59 kadın olarak, kontrol grubunun cinsiyet dağılımı ise 102 erkek ve 94 kadın olarak belirlendi. Hastaların kullandığı nöroleptik veya antipsikotik ilaçların dozunu sağlıklı olarak bir başlık altında verebilmek ve gerekli karşılaştırmaları sağlıklı olarak yapabilmek için her bir antipsikotik ilacın dozu klorpromazine eşdeğer katsayısı ile çarpılarak klorpromazin eşdeğeri mg/gün değerleri hesaplandı [largaktil (klorpromazin) eşdeğerliği = 16.7 x nörodol (haloperidol); 1 x melleril (tiyoridazin); 50 x risperdal (risperidon); 50 x zyprexa (olanzapin); 20 x stilizan (flufenazin); 2 x clopixon (zucklopentixol)]. Yukarıda bahsedilen hastalar ve kontrollerle ilgili demografik bilgilerin tümü özet olarak Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 5. Hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin demografik verileri (Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir).

	Şizofreni	Kontrol
n	153	196
Yaş	37.6 $\pm$ 10.8	35.6 $\pm$ 14.8
Cinsiyet	94E / 59K	102E / 94 K
Mevcut nöroleptik dozu (Klorpromazin eşdeğerliği) (mg/gün)	394 $\pm$ 175	-

Şizofreni hastaları birbirinden farklı dört psikiyatristin (bir grup hasta için H. Tutkun ve H. Herken, diğer bir grup hasta için M.N. Namlı ve M. Yanık) değerlendirmelerine göre alt sınıflara ayrıldığında DSM IV sınıflamasına göre 3 farklı alt tip belirlendi. Bunların sayıları şu şekilde idi: Paranoid şizofreni 81 hasta, disorganize şizofreni 32 hasta ve rezidüel şizofreni 35 hasta (Tablo 6). Hastalardan 5 tanesinin klinik alt tipi tanımlanamadı. İlgili tabloda ayrıca bu alt grupların yaş ortalamaları ile kullandıkları nöroleptik ilaçların klorpromazin eşdeğerlikleri de verilmiştir.

Tablo 6. Şizofreni hastalarının, hastalık alt tiplere göre ayrılması ve bu alt tipleri oluşturan hastaların özellikleri (Sonuçlar ortalama $\pm$ standard sapma olarak verilmiştir).

	Paranoid	Disorganize	Rezidüel
n	81	32	35
Yaş	35.5 $\pm$ 10.4	37.9 $\pm$ 10.1	42.1 $\pm$ 11.3
Nöroleptik dozu (Klorpromazin eşdeğerliği) (mg/gün)	421.8 $\pm$ 190.4	377.0 $\pm$ 194.0	395.8 $\pm$ 176.5

Şizofreni hastalarının bir kısmında hayatlarının ileri dönemlerinde istemsiz hareketlerle karakterize olan bazı bozukluklar gelişmektedir. Tardive diskinezi olarak özetlenen bu klinik semptomların kullanılan nöroleptik tedavisine bağlı olarak geliştiği savunulmaktadır. Bu çalışmaya dahil edilen toplam 153 hastadan 23'ünde TD pozitif, 130'unda ise TD negatif olarak belirlenmiştir. Çalışmamız ağırlıklı olarak klinik bir çalışma olarak kabul edilmediğinden ve mevcut hastalar ile kontrol grubunun genetik polimorfizmleri araştırıldığından TD'nin şiddeti skorlanmamış olup sadece olup olmadığı esas alınmıştır (DSM-IV kriterlerine göre TD tanısı konuldu). Tablo 7'de TD'si olan ve olmayan hastaların yaş

ortalamları ile kullanmakta oldukları antipsikotik ilaçların klorpromazin eşdeğerliği yönünden ortalamları verilmiştir.

Tablo 7. Şizofreni hastalarının tardiv diskinezi (TD) olup olmamasına göre sınıflandırılması ve bu sınıflamaya göre hastaların özellikleri (sonuçlar ortalama $\pm$ standard sapma olarak verilmiştir).

	TD (+)	TD (-)
n	23	130
Yaş	39.8 $\pm$ 11.5	37.3 $\pm$ 10.7
Mevcut nöroleptik dozu (Klorpromazin eşdeğerliği) (mg/gün)	362.7 $\pm$ 113.9	399.4 $\pm$ 184.4

Bu çalışmanın sadece Anabilim Dalımız ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde değil aynı zamanda Türkiye'de de ilk defa yapılıyor olması nedeni ile önce PCR metodu oluşturuldu. Bu amaçla farklı DNA konsantrasyonları, farklı primer konsantrasyonları, farklı NgoM IV enzim konsantrasyonları ve farklı kesim inkübasyon zamanlarına göre deneyler yapılmış, elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

5.1. DNA konsantrasyonunun PCR ürününün kalitesi üzerine olan etkisi

DNA marker olarak PhiX174 DNA *Hinf* I'in kullanıldığı bu çalışmada elde edilen PCR ürün bantları Resim 1'de gösterilmiştir. Başta PCR tüpüne eklenen DNA miktarı arttıkça görüldüğü gibi elde edilen ürünün miktarı da artmıştır. En parlak ve kalın bant 400 ng DNA'nın kullanıldığı son tüpte elde edilmiştir. Bu deneme esas alınarak bütün çalışmalarımız esnasında PCR tüplerine 50 ng DNA pipetlenmiştir. Bu çalışmada DNA izolasyonu esnasında RNaz kullanılmamıştır. Bu nedenle 260 nm'de yaptığımız ölçümlerde (OD_{260}) muhtemelen bulmamız gerekenden daha fazla miktarda DNA tespit edildi. Bunun

da nedeni RNA'nın aynı okuma aralığında (OD₂₆₀) maksimum pik vermesidir. Buradan hareketle yaptığımız PCR ölçümleri esnasında ölçülenden daha az miktarda DNA pipetlemiş olduğumuzu söyleyebiliriz. Bu ön çalışmada da soldan ikinci bant olarak görülen bantta elde edilen ürün 50 ng değil daha az miktardaki bir başlangıç DNA'sı ile elde edilmiştir.

5.2. Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisi

Bu ön çalışmada iki farklı kişiden elde edilen DNA örnekleri (Ş-28 ve K-121) kullanıldı. Primer konsantrasyonu hariç diğer bütün materyal ve test koşullarının aynı olduğu bu çalışmalar esnasında deneylerde kullanılması en uygun olan primer konsantrasyonu 20 pmol/test tüpü olarak tespit edildi (Resim 2a ve 2b). Hem PCR ürünlerinde hem de restriksiyon endonükleaz sindirim ürünlerinde 20 pmol konsantrasyonundan daha düşük ve daha yüksek konsantrasyon denemelerinde elde edilen bantların keskinliği ve parlaklığı, 20 pmol konsantrasyondan elde edilenden daha zayıf idi. K-121 no'lu hastanın DNA'sı ile yapılan deneyde 75 pmol primer konsantrasyonundan elde edilen bantlar da en az 20 pmol konsantrasyondan elde edilen kadar keskin ve parlak idi. Ancak ülkemiz koşullarında en yüksek tasarrufu sağlamak amacıyla, yaptığımız çalışmalarda en az materyal ve masraf ile en iyi sonucu almak ana hedefimiz olduğundan, bütün deneylerde 20 pmol konsantrasyonunda primer kullanılması kararlaştırılmıştır.

5.3. Restriksiyon endonükleaz aktivitesinin sindirim üzerine ve bant keskinliği üzerine etkisi

1-5 U arasında 5 farklı enzim ünite birimi ile aynı DNA örneğinde yapılan iki farklı PCR deneyinden elde edilen ürünlerin agaroz jel bantları arasında

herhangi bir farklılık olmadığı tespit edildi (Resim 3). Bu nedenle bütün hasta ve kontrol deneylerinde sindirim için 1U *NgoM* IV enziminin kullanılması kararlaştırıldı. Bu ön çalışmadan amacımız da bir önceki bölümde olduğu gibi deneylerde maksimum tasarrufu sağlamaktır. Her bir deneyde 5U kullanılması esasına göre kitte mevcut bulunan 10X tamponunun deneylerin 1/5'i gerçekleştirildikten sonra erkenden bitmesi üzerine kitin prospektüsünde belirtildiği şekilde laboratuvarımızda yeniden 10X tamponu hazırlandı (25 mM Tris asetat [pH 7.8], 100 mM potasyum asetat, 10 mM magnezyum asetat, 1 mM DTT). Diğer deneyler bu tamponun içinde gerçekleştirildi.

5.4. İnkübasyon süresinin agaroz jelde elde edilen bant kalitesine etkisi

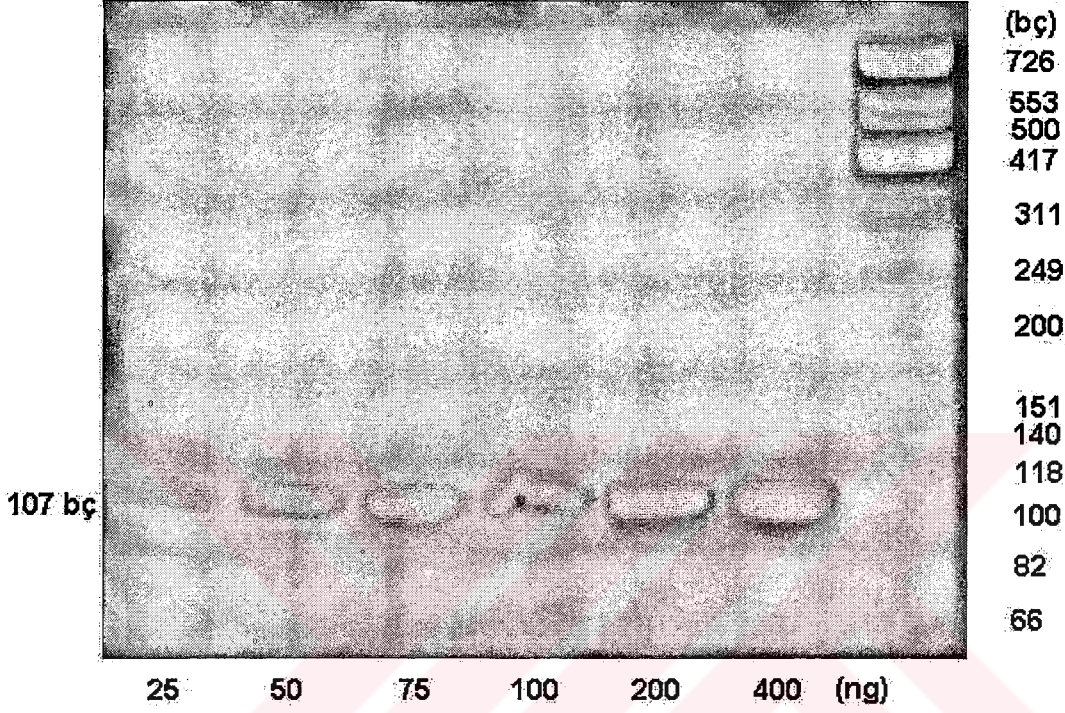
Ş-28 no'lu hastanın numunesinden gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünleri ile yapılan 60 dak., 90 dak., 3 saat, 5 saat, 10 saat ve 16 saatlik restriksiyon enzim inkübasyonundan elde edilen bantlar Resim 4'te görülmektedir. Buna göre kısa süreli ve uzun süreli inkübasyonlarda enzimin etkinliği ve dolayısıyla elde edilen agaroz jel bantlarının kalitesi hemen hemen aynı görünmektedir. Bundan hareketle bütün deneyler standart olarak uzun süreli inkübasyon (16 saat) ile gerçekleştirilmiştir. Kısa ve uzun süreli inkübasyonlar arasında çok önemli farklılık olmamasına rağmen uzun inkübasyonu seçmemizin nedeni, 350'nin üzerindeki hasta ve kontrol DNA'larının uzun süren çalışmaları esnasında kullanılan *NgoM* IV'ün -20 °C'ye ayarlı derin dondurucuya defalarca konulup çıkarılmasının zamanla enzim aktivitesini azaltabileceği ve son zamanlara doğru kısa süreli inkübasyonların yeterli gelemeyeceği ihtimali idi. Uzun

inkübasyonlarda enzim aktivitesi azalsa bile enzim-substrat birlikteliğinin uzun olması dolayısıyla zaman içinde bütün sindirim rahatlıkla gerçekleşebilmektedir.

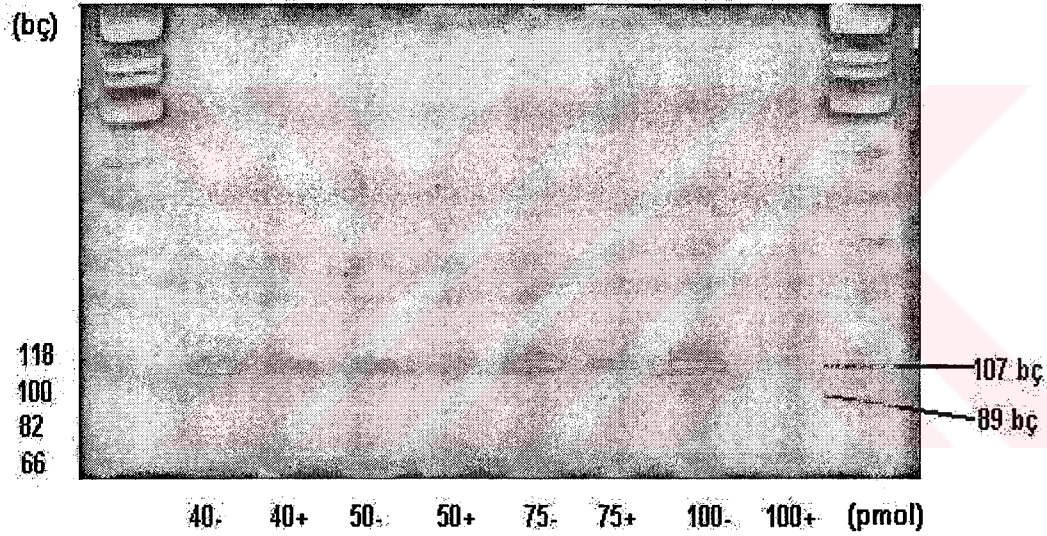
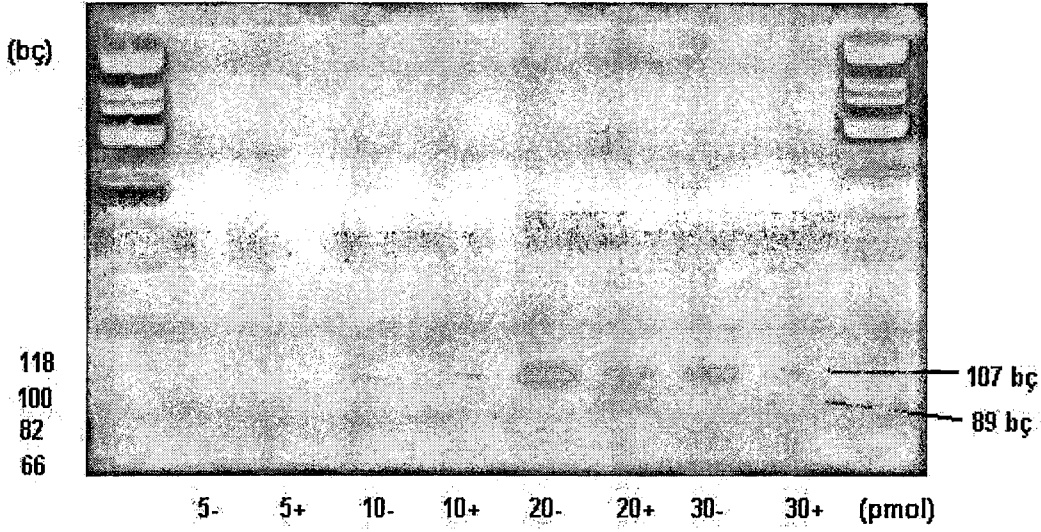
Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu bireylerinden elde edilen PCR ürünleri ile bu ürünlerin restriksiyon enzimleri ile inkübasyonundan elde edilen kesim ürünleri %3'lük agaroz jelinde yaklaşık olarak 2 saat yürütüldükten sonra elde edilen bantlar ve bunların marker DNA ile kıyaslanması Resim 5'te gösterilmiştir.

Farklı bir çalışma grubu için elde edilen agaroz jel elektroforez sonucu ise Resim 6'da gösterilmiştir. Bu resime ve bir önceki resime bakıldığında, PCR ürününde elde edilen amplikon DNA miktarının oldukça yeterli olduğu anlaşılmaktadır. Bütün deneylerde aynı miktarda DNA elde edilmemiş olup bunun, hasta ve kontrol grubu bireylerden DNA izolasyonu esnasında, kan hücrelerinin sayısı, deney protokolunda meydana gelen pipetaj hataları gibi sebeplerden kaynaklanması muhtemeldir. Resim 5'te 82. ve 83. numuneler ile Resim 6'da 91., 95. ve 96. numunelerde allelerin her ikisinin de kesildiği, buna karşılık olarak Resim 5'teki 84. ve 85. numuneler ile Resim 6'daki 90, 93, 94, 97 ve 98 no'lu numunelerde kesim gerçekleşmediği anlaşılmaktadır. Bunların dışında kalan numunelerde allelerin biri kesilirken diğer allel kesilmemiş ve iki adet bant paterni oluşmuştur.

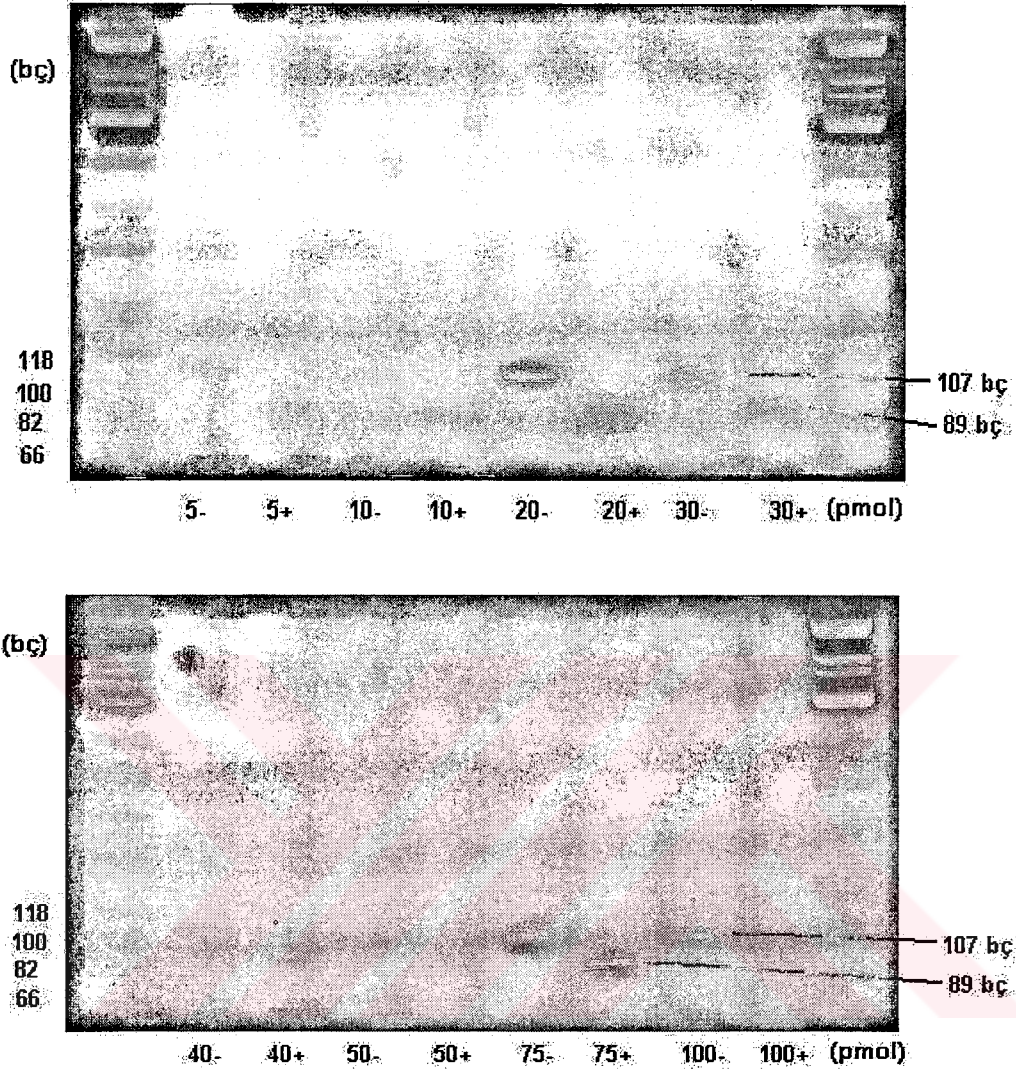
Farklı hastaların amplikonları ile gerçekleştirilen yukarıdaki deneylere benzer deneylerden elde edilen 107 ve 89 baz çifti bantlarının detayları Resim 7 ve Resim 8'de gösterilmiştir.



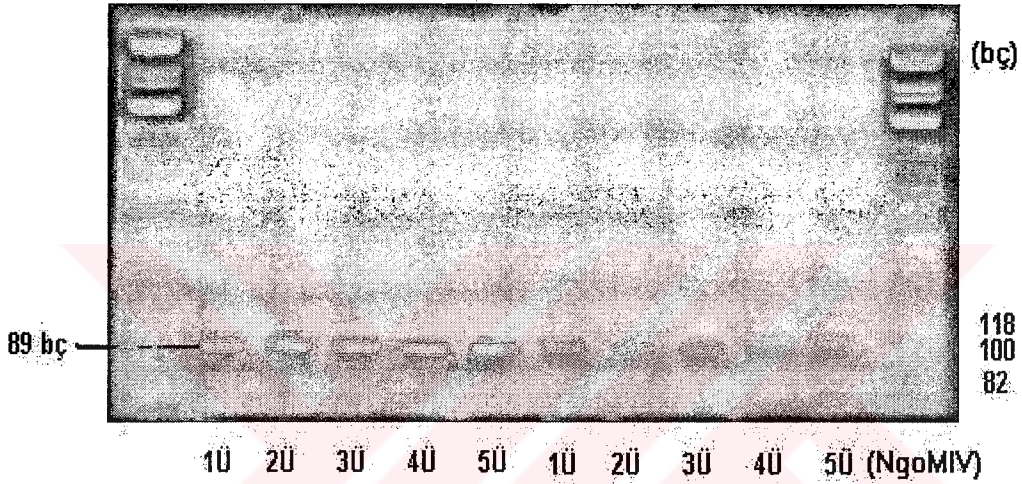
Resim 1. Kullanılan DNA konsantrasyonunun elde edilen bant keskilği ve kalitesine etkisi. Altı farklı tüpte 25, 50, 75, 100, 200 ve 400 ng DNA kullanılarak PCR yapıldı. Deneylerde Ş-52 nolu hastanın DNA'sı kullanıldı (normal DNA konsantrasyonu: 400 ng/μl). Gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun koşulları: Toplam reaksiyon hacmi 50μl. 1.25 U *Taq* polimeraz, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 20 pmol sense (A1) ve antisense (S1) primerler. Başlangıç denatürasyon: 95°C 5 dakika; döngü sayısı: 35 (1 dak. 95°C, 1 dak. 61°C, 2 dak. 72°C), son uzatma 72°C 7 dakika. Kullanılan DNA marker: 500 ng φ(phi)-X174DNA/*Hinf* I. DNA'nın yürütüldüğü ortam: içinde 0.5μg/ml etidyum bromür bulunan %3'lük agaroz jeli. Kuyucuklara aplike edilen DNA miktarı marker için 10 mikrolitre, diğerleri için ise 20 mikrolitredir. Elektroforez kabında, ml'sinde aynı miktarda etidyum bromür içeren 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu (pH 8) kullanıldı. Elektroforez koşulları: 100V, 40mA, 2 saat.



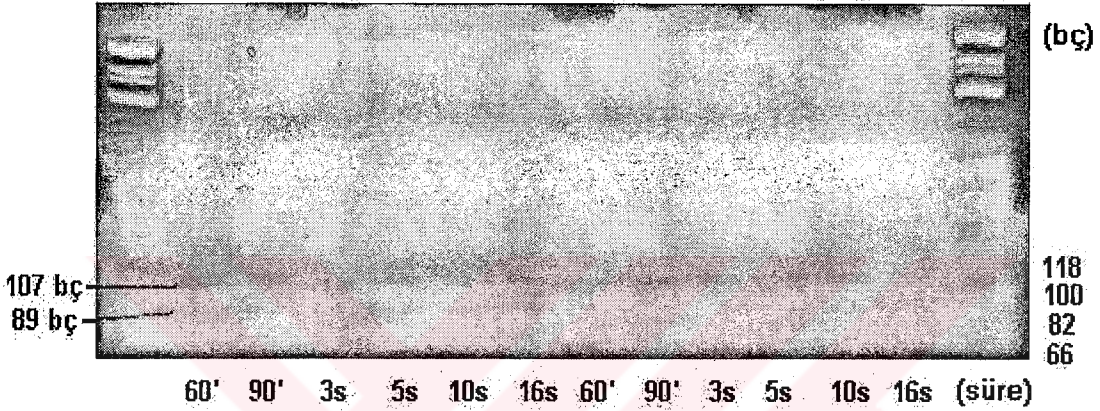
Resim 2. a) Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisi. Deneylerde A/V allel yapısına sahip Ş-28 nolu hastanın DNA'sı kullanıldı (normal DNA konsantrasyonu: 45 ng/μl, tüplere ilave edilen DNA kons. 50 ng/μl). Gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun koşulları: Toplam reaksiyon hacmi 50 μl. 1.25 U *Taq* polimeraz, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP. Başlangıç denatürasyon: 95°C 5 dakika; döngü sayısı: 35 (1 dak. 95°C, 1 dak. 61°C, 2 dak. 72°C), son uzatma 72°C 7 dakika. Kullanılan DNA marker: 500 ng φ(phi)-X174DNA/*Hinf* I. Primerler dışında bütün reaksiyon tüplerinde koşullar aynıdır. *Ngo*M IV ile sindirim koşulları; enzim miktarı: 1 U, inkübasyon sıcaklığı: 37°C, inkübasyon süresi: 16 saat. DNA'nın yürütüldüğü ortam: İçinde 0.5 μg/ml etidyum bromür bulunan %3'lük agaroz jeli. Kuyucuklara applike edilen DNA miktarı marker için 10 mikrolitre, diğerleri için ise 20 mikrolitredir. Elektroforez kabında, ml'sinde aynı miktarda etidyum bromür içeren 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu (pH 8) kullanıldı. Elektroforez koşulları: 100 V, 40 mA, 2 saat. Resimlerin altında sıralanan rakamlar kullanılan primerlerin konsantrasyonunu göstermektedir (pmol= pikomol). (-): PCR ürününün (amplikon) elektroforezi, (+): restriksiyon endonükleaz enziminin sindirim ürününün elektroforezi.



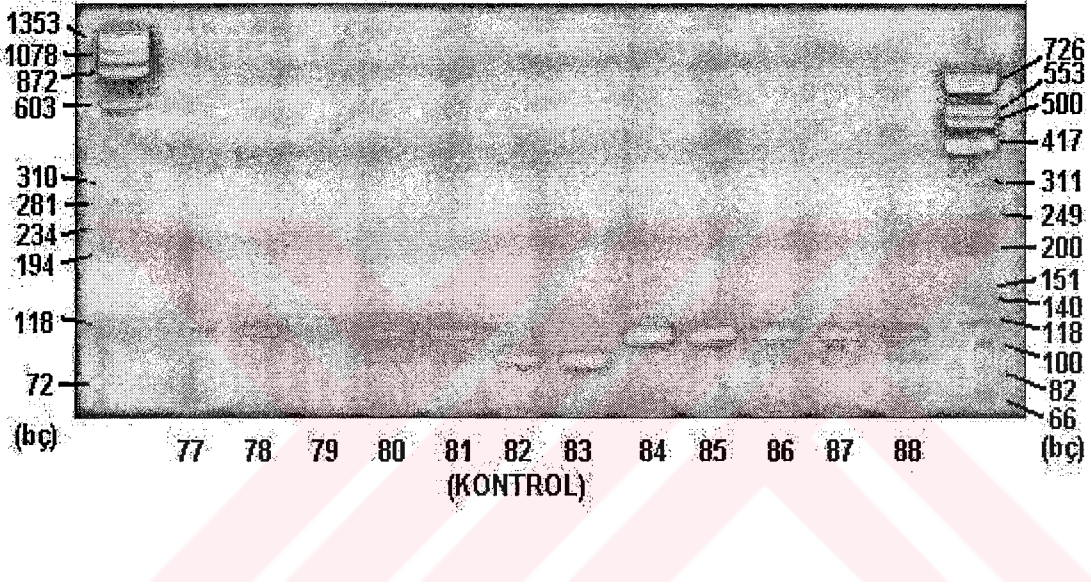
Resim 2. b) Primer konsantrasyonunun elde edilen PCR ürününe ve restriksiyon endonükleaz ile gerçekleştirilen sindirim ürünlerine etkisi. Deneylerde A allel yapısına sahip K-121 nolu hastanın DNA'sı kullanıldı (normal DNA konsantrasyonu: 110 ng/μl, tüplere ilave edilen DNA kons. 50 ng/μl). Gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun koşulları: Toplam reaksiyon hacmi 50 μl. 1.25 U *Taq* polimeraz, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP. Başlangıç denatürasyon: 95°C 5 dakika; döngü sayısı: 35 (1 dak. 95°C, 1 dak. 61°C, 2 dak. 72°C), son uzatma 72°C 7 dakika. Kullanılan DNA marker: 500 ng φ(phi)-X174DNA/*Hinf* I. Primerler dışında bütün reaksiyon tüplerinde koşullar aynıdır. *Ngo*M IV ile sindirim koşulları; enzim miktarı: 1 U, inkübasyon sıcaklığı: 37°C, inkübasyon süresi: 16 saat. DNA'nın yürütüldüğü ortam: İçinde 0.5μg/ml etidyum bromür bulunan %3'lük agaroz jeli. Kuyucuklara applike edilen DNA miktarı marker için 10 mikrolitre, diğerleri için ise 20 mikrolitredir. Elektroforez kabında, ml'sinde aynı miktarda etidyum bromür içeren 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu (pH 8) kullanıldı. Elektroforez koşulları: 100 V, 40 mA, 2 saat. Resimlerin altında sıralanan rakamlar kullanılan primerlerin konsantrasyonunu göstermektedir (pmol= pikomol). (-): PCR ürününün (amplikon) elektroforezi, (+): restriksiyon endonükleaz enziminin sindirim ürününün elektroforezi.



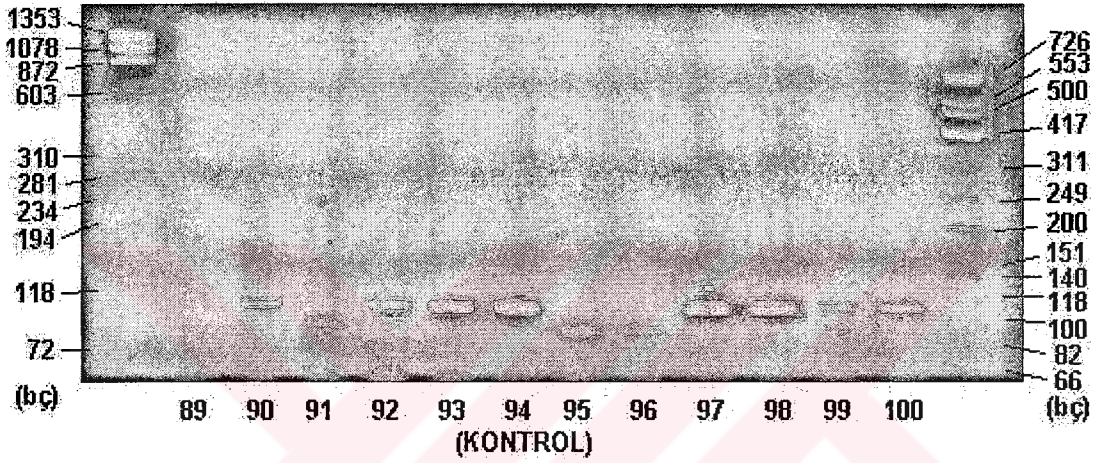
Resim 3. Restriksiyon endonükleaz aktivitesinin sindirim üzerine ve bant keskinliği üzerine etkisi. Deneylerde A allel yapısına sahip K-121 nolu hastanın DNA'sı kullanıldı (normal DNA konsantrasyonu: 110 ng/μl, tüplere ilave edilen DNA kons. 50 ng/μl). Gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun koşulları: Toplam reaksiyon hacmi 100 μl. 1.25 U *Taq* polimeraz, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, SOD A1 ve SOD S1 primerlerinin herbirinden 20 pmol. Başlangıç denatürasyon: 95°C 5 dakika; döngü sayısı: 35 (1 dak. 95°C, 1 dak. 61°C, 2 dak. 72°C), son uzatma 72°C 7 dakika. *NgoM IV* ile sindirim koşulları; enzim miktarı: 1 Ü, 2 Ü, 3 Ü, 4 Ü ve 5 Ü olmak üzere toplam iki grup deney, inkübasyon sıcaklığı: 37 °C, inkübasyon süresi: 16 saat. Kullanılan DNA marker: 500 ng φ(phi)-X174DNA/*Hinf I*. DNA'nın yürütüldüğü ortam: İçinde 0.5 μg/ml etidyum bromür bulunan %3'lük agaroz jeli. Kuyucuklara aplike edilen DNA miktarı marker için 10 mikrolitre, diğerleri için ise 20 mikrolitredir. Elektroforez kabında, ml'sinde aynı miktarda etidyum bromür içeren 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu (pH 8) kullanıldı. Elektroforez koşulları: 100 V, 40 mA, 2 saat.



Resim 4. İnkübasyon süresinin agaroz jelinde elde edilen DNA bant kalitesine etkisi. Deneylerde A/V allel yapısına sahip Ş-28 no'lu hastanın DNA'sı kullanıldı (normal DNA konsantrasyonu: 45 ng/μl, tüplere ilave edilen DNA kons. 50 ng/μl). Gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun koşulları: Toplam reaksiyon hacmi 100 μl. 1.25 U *Taq* polimeraz, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, SOD A1 ve SOD S1 primerlerinin herbirinden 20 pmol. Başlangıç denatürasyon: 95°C 5 dakika; döngü sayısı: 35 (1 dak. 95°C, 1 dak. 61°C, 2 dak. 72°C), son uzatma 72°C 7 dakika. *NgoM* IV ile sindirim koşulları; enzim miktarı: 1 U, inkübasyon sıcaklığı: 37°C, inkübasyon süresi: sırasıyla 60 dak, 90 dak, 3 saat, 5 saat, 10 saat ve 16 saat olmak üzere 2 grup deney gerçekleştirildi. Kullanılan DNA marker: 500 ng φ(phi)-X174DNA/*Hinf* I. DNA'nın yürütüldüğü ortam: İçinde 0.5μg/ml etidyum bromür bulunan %3'lük agaroz jeli. Kuyucuklara aplike edilen DNA miktarı marker için 10 mikrolitre, diğerleri için ise 20 mikrolitredir. Elektroforez kabında, ml'sinde aynı miktarda etidyum bromür içeren 0.5X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu (pH 8) kullanıldı. Elektroforez koşulları: 100 V, 40 mA, 2 saat.



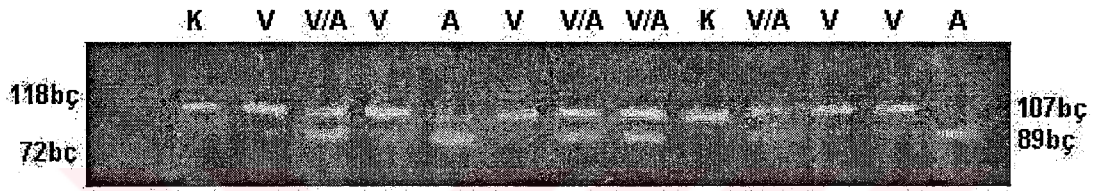
Resim 5. Kontrol grubu bireylere ait örnek agaroz jel elektroforezi paterni (1). Altteki rakamlar kontrol bireylerine tarafımızdan verilen sıra numaralarını göstermektedir. Solda ϕ (phi)-X174DNA/*Hae* III DNA markerine ait bantlar, sağda ise ϕ (phi)-X174DNA/*Hinf* I DNA markerine ait olan bantlar görülmektedir. Kuyucuklara aplice edilen DNA miktarı markerler için 10 mikrolitre, kontrol grubu bireyleri için ise 20 mikrolitredir. Bireylere ait bantlar soldaki marker DNA'nın 118 bç ve 72 bç bantları arasında ve sağdaki marker DNA'nın 118 bç, 100 bç ve 82 bç bantları arasında yer almakta olup pozisyonları 107 bç ve 89 bç olarak belirlenmiştir. 18 bç uzunluğunda olan bant çok küçük olması nedeni ile gözlenememekte, muhtemelen daha aşağıda primer dimerlerinin arasında yer almaktadır. bç: baz çifti.



Resim 6. Kontrol grubu bireylere ait örnek agaroz jel elektroforezi paterni (2). Altındaki rakamlar kontrol bireylerine tarafımızdan verilen sıra numaralarını göstermektedir. Solda ϕ (phi)-X174DNA/*Hae* III DNA markerine ait bantlar, sağda ise ϕ (phi)-X174DNA/*Hinf* I DNA markerine ait olan bantlar görülmektedir. Kuyucuklara aplike edilen DNA miktarı markerler için 10 mikrolitre, kontrol grubu bireyleri için ise 20 mikrolitredir. Bireylere ait bantlar soldaki marker DNA'nın 118 bç ve 72 bç bantları arasında ve sağdaki marker DNA'nın 118 bç, 100 bç ve 82 bç bantları arasında yer almakta olup pozisyonları 107 bç ve 89 bç olarak belirlenmiştir. 18 bç uzunluğunda olan bant çok küçük olması nedeni ile gözlenememekte, muhtemelen primer dimerlerinin arasında yer almaktadır. bç: baz çifti



Resim 7. Hastalara ait örnek Mn-SOD geninin agaroz jel elektroforezindeki DNA bantları (1). Sol başta ϕ (phi)-X174DNA/Hae III DNA markerine ait bantlar görülmektedir (118 ve 72 baz çifti uzunluğunda iki adet bant). Buna karşılık hastalarda elde edilen bantlar 108 ve 89 baz çifti uzunluğundadır. K: kontrol olarak alınan restriksiyon endonükleaz sindirimine tabi tutulmamış hasta DNA'larına (amplikon) ait bant, V/A: restriksiyon endonükleaz sindiriminden sonra elde edilen bir allele ait kesilmiş ve diğer allele ait kesilmemiş DNA ürünlerine ait bantlar (107 ve 89 bç), V: restriksiyon endonükleaz sindiriminden sonra elde edilen her iki allele ait kesilmemiş DNA ürününe ait bant (107 bç), A: restriksiyon endonükleaz sindiriminden sonra elde edilen her iki allele ait kesilmiş DNA ürününe ait bant (89 bç). A: alanin, V: valin, bç: baz çifti.



Resim 8. Hastalara ait örnek Mn-SOD geninin agaroz jel elektroforezindeki DNA bantları (2). Sol başta ϕ (phi)-X174DNA/*Hae* III DNA markerine ait bantlar görülmektedir (118 ve 72 baz çifti uzunluğunda iki adet bant). Buna karşılık hastalarda elde edilen bantlar 108 ve 89 baz çifti uzunluğundadır. K: kontrol olarak alınan restriksiyon endonükleaz sindirimine tabi tutulmamış hasta DNA'larına ait bant, V/A: restriksiyon endonükleaz sindiriminden sonra elde edilen bir allele ait kesilmiş ve diğer allele ait kesilmemiş DNA ürünlerine ait bantlar (107 ve 89 bç), V: restriksiyon endonükleaz sindiriminden sonra elde edilen her iki allele ait kesilmemiş DNA ürününe ait bant (107 bç), A: restriksiyon endonükleaz sindiriminden sonra elde edilen her iki allele ait kesilmiş DNA ürününe ait bant (89 bç). A: alanin, V: valin, bç: baz çifti.

Hasta ve kontrollerin Mn-SOD genlerinin mitokondrial hedefleme dizisinde varolan polimorfizmlerinin bizim çalışma grubumuzdaki değerleri Tablo 8’ de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta grubunda Ala/Ala genotipi 14 bireyde (%9.2), Ala/Val genotipi 106 bireyde (%69.3) ve Val/Val genotipi 33 bireyde (%21.6) tespit edilmiştir. Kontrol grubu genotipler açısından incelendiğinde; Ala/Ala genotipi 46 bireyde (%23.5), Ala/Val genotipi 83 bireyde (%42.3) ve Val/Val genotipi 67 bireyde (%34.2) olarak tespit edilmiştir. Her bir genotip, hasta ve kontrol arasında karşılaştırıldığında farklılığın anlamlı olduğu tespit edildi ($X^2= 26.53$, $p<0.0001$). Ayrıca allel sıklıkları incelendiğinde; -9Ala allelinin frekansı hasta grubunda 0.46 ve kontrol grubunda 0.44 olarak, -9Val allelinin frekansı ise hasta grubunda 0.54 ve kontrol grubunda 0.56 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları arasında allel sıklıkları açısından herhangi bir anlamlı farklılık tespit edilemedi (Tablo 8).

Tablo 8. Hastalar ve kontrollerdeki Ala-9Val polimorfizminin genotipi ve allel sıklıkları.

	GENOTİPLER ^a			ALLEL SIKLIKLARI ^b	
	Ala/Ala n (%)	Ala/Val n (%)	Val/Val n (%)	-9Ala	-9Val
Hasta (153)	14 (9.2)	106 (69.3)	33 (21.6)	0.46	0.54
Kontrol (196)	46 (23.5)	83 (42.3)	67 (34.2)	0.44	0.56

^ahasta ve kontrol arasında genotipler anlamlı olarak birbirinden farklı ($X^2= 26.53$, $df= 2$, $p= 0.0001$). Kontrol ve hastaların genotipik dağılımları Hardy Weinberg dengesi içindedir.

^bhasta ve kontrol arasında farklılık yok.

Hastaların şizofreni alttıplerine göre sınıflandırılması sonucunda genotiplerde ve allel sıklıklarında elde edilen değerler Tablo 9’da gösterilmiştir. Bu tabloya göre Paranoid ve Rezidüel alttıplerde allel sıklıkları birbirine eşit iken (-9Ala:

0.44, -9Val: 0.56) Disorganize alttipinde değişmektedir (-9Ala: 0.36, -9Val: 0.64). Val/Val genotipi bütün hastalık altgruplarında yaklaşık olarak aynı yüzdede bulunurken Ala/Ala ve Ala/Val genotiplerinin yüzdesinde farklılıklar mevcuttu ($\chi^2= 11.35$, $p= 0.023$).

Tablo 9. Hastalığın klinik alttipi ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki.

	GENOTİPLER ^a			ALLEL SIKLIKLARI	
	Ala/Ala n (%)	Ala/Val n (%)	Val/Val n (%)	-9Ala	-9Val
Paranoid	4 (4.9)	64 (79)	13 (16)	0.44	0.56
Disorganize	1 (3.1)	21 (65.6)	10 (31.3)	0.36	0.64
Rezidüel	6 (17.1)	19 (54.3)	10 (28.6)	0.44	0.56

^a $\chi^2= 11.35$, $df= 4$, $p= 0.023$

Hastalar ve kontrol grubu, cinsiyetlerine göre iki sınıfa ayrılarak yapılan istatistiksel analizlerde elde edilen veriler sırasıyla Tablo 10 ve Tablo 11’de gösterilmiştir. Buna göre hem hasta hem de kontrol gruplarında allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık mevcut değildi. Hem hasta hem de kontrol grubunda cinsiyetler arasında genotipler açısından anlamlı farklılıklar mevcuttu. Erkek şizofrenik bireylerde Ala/Ala ve Val/Val genotipi daha yüksek oranda gözlenirken bayanlarda Ala/Val genotipi daha fazla idi ($\chi^2= 8.98$, $p=0.011$). Aynı şekilde kontrol grubu incelendiğinde erkeklerde Ala/Ala ve Val/Val genotipi belirgin şekilde daha fazla görülürken bayanlarda Ala/Val genotipi ön planda idi ($\chi^2= 16.53$, $p=0.0001$).

Şizofreni hastalarında önemli konulardan biri de hangi ilaç dozu ile hastanın semptomlarının kontrol altına alınabildiğidir. Bazı hastaların hastalık semptomları daha düşük nöroleptik dozu ile kontrol altına alınabilirken bazı hastalarda daha

yüksek dozda antipsikotik verilmesi gerekebilir. Bu açıdan bu çalışmaya dahil edilen hastaların kullandıkları antipsikotik ilaç dozuna göre genotiplerinin ve allel sıklıklarının araştırılması planlandı.

Tablo 10. Hastaların cinsiyeti ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki.

	GENOTİPLER ^a			ALLEL SIKLIKLARI	
	Ala/Ala n (%)	Ala/Val n (%)	Val/Val n (%)	-9Ala	-9Val
Erkek (94)	22 (23.4)	36 (38.3)	36 (38.3)	0.43	0.57
Bayan (59)	10 (16.9)	37 (62.7)	12 (20.3)	0.48	0.52

^a $\chi^2 = 8.98$, $df = 2$, $p = 0.011$

Tablo 11. Kontrol grubunun cinsiyeti ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki.

	GENOTİPLER ^a			ALLEL SIKLIKLARI	
	Ala/Ala n (%)	Ala/Val n (%)	Val/Val n (%)	-9Ala	-9Val
Erkek (102)	24 (23.5)	47 (46.1)	31 (30.4)	0.47	0.53
Bayan (94)	5 (5.3)	66 (70.2)	23 (24.5)	0.40	0.60

^a $\chi^2 = 16.53$, $df = 2$, $p = 0.0001$

Kullanılan her iki doz protokolüne (300 mg/gün ve altı ile 300 mg/gün üzeri; 400 mg/gün ve altı ile 400 mg/gün üzeri) göre de hastalar arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edildi (Tablo 12). Her iki doz protokolünde de yüksek ve düşük doz nöroleptik kullanan hastalar arasında Ala/Val genotipi açısından bir farklılık yoktu. Her iki doz protokolünde de düşük dozda ilaç alan hastalar anlamlı şekilde Ala/Ala genotipine sahipti. Yine her iki doz protokolünde de yüksek dozda ilaç alan hastalar Val/Val genotipine sahip idi (sırasıyla $\chi^2 = 6.92$, $p = 0.031$; $\chi^2 = 9.22$, $p = 0.010$).

Düşük dozda ilaç alan hastaların allel sıklıklarında önemli bir fark bulunmazken yüksek dozda ilaç alanlarda allel sıklıkları açısından önemli farklılık mevcuttu. 300 mg protokolünde -9Ala sıklığı 0.40, -9Val sıklığı ise 0.60 idi. 400 mg protokolünde bu oran çok benzer idi; -9Ala sıklığı 0.37 ve -9Val sıklığı 0.63 idi. Bu oranlardan da anlaşılabacağı üzere yüksek dozda ilaç alan hastalarda -9Val alleli sıklığı, -9Ala alleleline göre daha fazladır (Tablo 12).

Tablo 12. Hastaların kullandığı antipsikotiklerin klorpromazin eşderğerlikleri ile Ala-9Val polimorfizminin genotipi arasındaki ilişki. Karşılaştırma için iki farklı doz protokolu kullanılmıştır: 1) 300mg/gün ve altı ile 300 mg/gün üzeri, 400 mg/gün ve altı ile 400 mg/gün üzeri.

	Klorpromazin dozu (mg/gün)	GENOTİPLER ^a			ALLEL SIKLIKLARI	
		Ala/Ala (%)	Ala/Val (%)	Val/Val (%)	-9Ala	-9Val
300 mg/gün ve altı (42)	223 ± 66	8 (19)	28 (66.7)	6 (14.3)	0.52	0.48
300 mg/gün üzeri (111)	458 ± 154	7 (6.3)	75 (67.6)	29 (26.1)	0.40	0.60
400 mg/gün ve altı (88)	289 ± 80	14 (15.9)	57 (64.8)	17 (19.3)	0.48	0.52
400 mg/gün üzeri (65)	535 ± 161	1 (1.5)	46 (70.8)	18 (27.7)	0.37	0.63
300 mg protokolu için $X^2 = 6.92$, $df = 2$, $p = 0.031$						
400 mg protokolu için $X^2 = 9.22$, $df = 2$, $p = 0.010$						

Hastalar TD olup olmamasına göre sınıflandırılıp genotipleri ve allel sıklıkları araştırıldığında şu bulgular elde edildi (Tablo 13): Tardive diskinezili hastalarda Ala/Ala genotipi 2 hastada (%8.7). Ala/Val alleli 8 hastada (%52.2) ve Val/Val genotipi de 9 hastada (%39.1) tespit edildi. Tardive diskinezisi olmayan hastalarda genotiplerin dağılımı ise şu şekilde idi: Ala/Ala genotipi 12 hastada (%9.2), Val/ Ala genotipi 94 hastada (%72.3) ve Val/Val alleli 24 hastada (%18.5). Tabloda da görüldüğü gibi (Tablo 13) tardive diskinezisi olan ve

olmayan hastaların genotipleri istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir. Buna karşılık kontrol grubunun genotipleri her iki hastalık alt grubu ile karşılaştırıldığında farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

Tablo 13. TD olan ve olmayan hastalarda genotipler ve Ala -9Val polimorfizminin allel sıklıkları.

	GENOTİPLER ^a			ALLEL SIKLIKLARI ^b	
	Ala/Ala n (%)	Ala/Val n (%)	Val/Val n (%)	-9Ala	-9Val
TD + (n=23)	2 (8.7)	12 (52.2)	9 (39.1)	0.45	0.54
TD - (n=130)	12 (9.2)	94 (72.3)	24 (18.5)	0.45	0.55
Kontrol (196)	46 (23.5)	83 (42.3)	67 (34.2)	0.43	0.57

^aTD olan ve olmayan hastalar ile kontrol grubu arasında genotip sıklıklarında anlamlı farklılık olmakla birlikte ($X^2=30.91$, $df=4$, $p=0.0001$) tardiv diskinezi olan ve olmayan hastalarda önemli bir farklılık mevcut değildir ($X^2=5.02$, $df=2$, $p=0.081$).

Son olarak; şizofreni hastalığı daha çok gençlerde başladığından ve 40 yaşın üzerinde yakalanma riskinin çok az olması ihtimalinden hareketle kontrol grubu 40 yaş altı ve üzeri olarak iki gruba ayrılarak genotipler karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar; 40 yaşın altında Ala/Ala genotipi 33 bireyde (%24.8). Ala/Val genotipi 53 bireyde (%39.8) ve Val/Val genotipi de 47 bireyde (%25.3) tespit edildi. 40 yaşın üzerinde Ala/Ala genotipi 13 bireyde (%21.0). Ala/Val genotipi 29 bireyde (%46.8) ve Val/Val genotipi de 21 bireyde (%32.3) tespit edildi. Her iki yaş grubu, şizofreni hastalarındaki genotiplerle karşılaştırıldığında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($X^2= 27.89$, $df= 4$, $p=0.0001$). Dolayısıyla, kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin 40 yaşın üzerinde veya altında olması, şizofreni hastaları ile genotip açısından karşılaştırıldığında Tablo 8'de elde edilen istatistiksel anlamlılığı değiştirmemektedir.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada değişik hastalık alt gruplarına ait şizofreni hastalarında vücudun en önemli antioksidan enzimlerinden biri olan Mn-SOD enziminin Ala-9Val polimorfizmi, sağlıklı kontrol bireyleri ile karşılaştırılmalı olarak araştırıldı. Polimorfizmlerin etkilerini açıklayan net bir biyolojik mekanizma henüz ortaya konulamamış olmakla birlikte bu tür bir hastalıkta, hastalığın herhangi bir alt tipinde veya TD gibi uzun süre tedavi gören hastaların bir kısmında ortaya çıkan etkilerde SOD enziminin polimorfik yapısının etkili olabileceği düşünülmektedir. Mevcut çalışmanın verilerine göre, şizofreni hastaları ve kontrol bireyleri arasında genotipler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar mevcuttur. Hardy Weinberg dağılımı hem hasta hem de kontrol grubunda normal olarak bulunmasına rağmen Ala/Val genotipinin kontrol grubunda düşük ve Ala/Ala genotipinin anlamlı derecede yüksek bulunması; Ala/Val genotipini taşımanın bizim toplumumuz açısından şizofreniye yatkınlaştırıcı, Ala/Ala genotip yapısına sahip olmanın ise hastalığa karşı koruyucu etki yaptığı yönünde fikir vermektedir. Daha önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında bulgularımız farklılık göstermektedir. Hori ve arkadaşlarının Japon şizofreni hastalarında ve kontrol bireylerinde yaptıkları Mn-SOD geni polimorfizm araştırmasında kontrol ile hasta grubu arasında gen polimorfizmi açısından herhangi bir farklılık bulunamazken hastalar TD olan ve olmayan olarak iki gruba ayrıldıklarında bunlar arasında genotipik dağılım istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (54).

Zhang ve arkadaşları TD'si olan ve olmayan şizofreni hastalarında yaptıkları Mn-SOD polimorfizm çalışmasında, genetik analizlerle beraber ilgili

enzimin aktivitesini de ölçmüşler ve polimorfizm ile enzim aktivitesi arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır (173). Mn-SOD enzim aktivitesi TD'si olan hastalarda TD'si olmayan hastalar ve kontrollere göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Adı geçen çalışmada TD olup olmamasına göre herhangi bir ayırım yapılmaksızın enzim aktivitesi ile genotipler karşılaştırıldığında Val/Val genotipine sahip hastaların Mn-SOD aktivitesi Ala/Val genotipine sahip hastalara göre daha yüksek bulunmuş ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Aynı farklılık TD'si olan hastaların kendi içinde de mevcuttur. Val/Val genotipine sahip TD'li hastaların Mn-SOD aktivitesi Ala/Val genotipine sahip olan TD'li hastalara göre daha yüksek bulunmuştur. Her ne kadar şizofreni ve kontrol grubu arasında anlamlı bir polimorfizm bulunmasa da adı geçen çalışmada ölçülen enzim aktivitelerinin genotipler arasındaki dağılımı çalışmamıza ışık tutucu mahiyettedir. Bizim çalışmamızda, bazı teknik zorluklar nedeni ile enzim aktiviteleri, genetik polimorfizm çalışması ile aynı anda ölçülemedi. Farklı zaman dilimlerinde alınan kan örneklerinde ayrı ayrı yapılan aktivite ölçümleri sıhhatli olamayacağından, diğer taraftan genetik analizler için alınan kanların +4°C'de bekletilmesi gerektiğinden bu süre sonunda enzim aktivitelerinin azalacağı göz önüne alınarak bu çalışmada aktivite ölçümü yapılamadı. Ancak Zhang ve arkadaşlarının enzim aktiviteleri ile genotipler arasındaki ilişkilerini konu alan incelemeleri, bizim çalışmamıza ışık tutucu mahiyettedir. Çalışmamızda Val/Val ve Ala/Ala genotipinin kontrol grubunda daha fazla olması, buna karşılık Ala/Val genotipinin şizofreni hastalarında anlamlı şekilde yüksek olması, adı geçen araştırmadaki Mn-SOD aktiviteleri ile paralellik arz etmektedir. İki çalışma bir arada düşünüldüğünde bizim kontrol grubu bireylerimizde Mn-SOD aktivitesinin

daha yüksek bulunması gerekir. Çünkü adı geçen çalışmada Val/Val genotipinde enzim aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Literatürdeki enzim aktivitelerinin ölçüldüğü çalışmalar gözönüne alındığında, bazı çalışmalarda şizofreni hastalarının biyolojik materyallerinde SOD aktivitesi daha düşük bulunmuştur (10,101). Fakat bu çalışmalarda total SOD aktivitesi ölçülmüş olduğundan ve bu aktivitenin içinde Mn-SOD enziminden başka Cu,Zn-SOD ve EC-SOD enzim aktiviteleri de bulunduğundan kesin bir yorum yapmak zor olabilir. Kontrol grubunda Val/Val ve Ala/Ala genotiplerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olması, kontrol grubunda Mn-SOD aktivitesinin fazla, buna karşılık şizofreni hastalarında düşük olmasını izah edebilir. Şizofreni alttipleri gözönüne alındığında, rezidüel şizofrenide Ala/Ala genotipinin diğer alttiplere göre daha yüksek olduğunu görüyoruz. Bu alttipte nisbi olarak diğer alttiplere oranla daha yüksek SOD aktivitesi beklenebilir. Bunun yanısıra alttiplemede özellikle Ala/Ala genotipine düşen hasta sayısı oldukça az olduğundan istatistiksel veriler kısmen daha az güvenilir. Ala/Ala genotipi daha önceki bir çalışmada yüksek enzim aktivitesi ile ilişkilendirilmiş ve TD'den koruyucu olarak nitelendirilmiştir (54). Bu açıdan bakıldığında çalışmamıza dahil edilen şizofreni hastaları kontrollere göre daha düşük bir yüzdede Ala/Ala genotipi taşıdığından düşük Mn-SOD aktivitesine sahip olmaları muhtemeldir. Aynı yorum şizofreni alttipleri karşılaştırılmasında da geçerlidir. Araştırmacılar yukarıda bahsi geçen çalışmalarında (54) -9Val allelini TD'li hastalarda daha yüksek olarak bulmuşlar, bunun hastaların TD'ye yakalanmalarında bir risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir. Bunun tek başına Mn-SOD geninde tespit edilen polimorfizmle sınırlı kalmayıp bununla bağlantı dengesizliği gösterebilecek başka

polimorfizmler ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Diğer bir yorum da -9Ala genotipinin TD'den koruyucu olabileceğine ait olası yaklaşımdır. Buna göre -9Val genotipi TD'de diğer allel tiplerine göre daha fazla görülmektedir. Dolayısıyla bu koruyucu genotipin (-9Ala) eksik olmasından dolayı hastalar TD'ye daha kolaylıkla yakalanmaktadırlar. Araştırmacılar bu hipotezlerini Val/Val genotipinde total AIMS (Abnormal Involuntary Movement Scale) skorunun daha fazla olması ile de desteklemektedirler. AIMS skoru TD'nin şiddetini gösteren bir ölçek olduğu için Val/Val genotipi arttıkça semptom şiddeti artmakta, buna ters olarak Ala/Ala genotipi arttıkça da semptom şiddeti azalmaktadır. Biz çalışmamızda TD'nin rakamsal bir ifadesi olan AIMS skorlarını bazı nedenlerle hesap edemedik. Ancak bütün genotipler içinde şizofreni grubunda Ala/Val genotipi en fazla ve Ala/Ala genotipi en az olarak tespit edildi. Bulgularımıza göre homozigot Ala/Ala TD'den koruyucu ve/veya homozigot Val/Val TD'ye yatkınlaştırıcı olarak değerlendirilebilir. Çünkü TD'li hastalarda Ala/Ala genotipi daha düşük ve Val/Val genotipi ise daha yüksek olarak bulunmuştur. Ancak yukarıda da belirtildiği gibi çalışmamıza dahil ettiğimiz 153 hastanın sadece 23 tanesinde TD bulunması, her bir genotipik alt gruba dahil olan hasta sayısının çok az olmasına sebep olmuştur. Bu bakımdan bu kadar az sayıda TD'li hasta ile ilgili yapılacak kesin ifadeli yorumlar hatalı olabilir. Bu hipotezimizin daha güvenilir hale gelmesi için bu bulgularımızı destekleyen yeni ve daha geniş hasta popülasyonu ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Şizofreni hastalığı toplumda diğer birçok nöropsikiyatrik hastalık ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir sıklıkta görülme olasılığı olan bir hastalık olmakla birlikte etyopatolojisi henüz tam olarak açığa kavuşturulamamıştır. Bu

konu ile ilgili olarak nörotransmitterlerin sentezlenip salgılanmasındaki anormallikler başta olmak üzere birçok kimyasal, fizyolojik, farmakolojik ve genetik hipotez öne sürülmüştür. Genetik hipotezler, monoamin metabolizmasına ait enzimler ile ilgili hipotezler, noradrenerjik disfonksiyona dair hipotezler, serotonerjik disfonksiyona ait hipotezler, aminoasitler, prostaglandinler, büyüme hormonu ve viral-immün hipotezler başta olmak üzere birçok hipotez ileri sürülmüş ve bunlara ait oldukça fazla sayıda araştırma yapılmıştır (24). Daha önce de belirtildiği gibi bunların hiçbirisi hastalığın etyopatogenetik sebebi olarak tek başına sorumlu tutulamamış, kombine olarak düşünülen mekanizmalar bile tam anlamıyla güvenli bir şekilde ortaya konulamamıştır. Bilinen mekanizmaların bir kısmı ise tamamen tedavi temelli olarak ortaya atılmıştır. Yani verilen bir ilacın şizofrenik bir hastanın semptomlarını azaltması, bu ilacın muhtemel etki mekanizmaları üzerinden hareketle ters yönden şizofreninin etyopatogeneziine değişik bir yaklaşıma kapı açmaktadır. Bu çalışmanın planlanmasında öne çıkan teori ve hipotez tamamen şizofreni hastalarında oksidatif stresin artması üzerine kurulmuştur. Yapılan birçok klinik çalışmada daha önce de belirtildiği gibi şizofreni hastalarının kan, eritrosit, beyin dokusu, BOS gibi biyolojik materyallerinde bir taraftan oksidatif stresin arttığı bulunurken diğer taraftan antioksidan savunma sisteminin azaldığı bulunmuştur. Oksidan/antioksidan sistemlerdeki bu düzensizlikler salt olarak düşünüldüğünde herhangi bir anlamı olmayabilir ama merkezi sinir sisteminde sebep olacakları ikincil değişiklikler bazı psikiyatrik semptomların ortaya çıkışını izah edebilir.

Şizofreni hastalığının etyopatogenezi ile ilgili olarak ileri sürülen hipotezlerden en önemlilerinden biri hiç şüphesiz genetik hipotezlerdir. Eğer bu

hastalıkta genetik geçiş söz konusu ise bunun ne şekilde kalıtıldığı ve kalıtım kalıbının ne olduğu konusu önem kazanmaktadır. Eğer genetik geçiş basitçe Mendel yasalarına göre gerçekleşiyorsa ve “dominant” bir kalıp söz konusu ise şizofrenik bir anne veya babanın çocuklarının %50’sinde şizofreni hastalığı görülmeli, hiçbir kuşakta taşıyıcı (genotipi hasta fenotipi normal) bulunmamalı, ya da hastalığın görülmediğı herhangi bir kuşak olmamalıdır. Eğer “resesif” bir kalıtım kalıbı söz konusu ise şizofreni hastalığının tek kuşakta görülmesi, propozitusun kardeş ve çocuklarının dışındaki akrabalarının normal olması, dolayısıyla kalıtımın yatay tipte olması gerekirdi. Bu durumda propozitusun anne ve babası genelde normal olurdu (14). Halbuki şizofreni hastalarında bugüne kadar yapılan çalışmalarda böyle bir durum ortaya konulamamıştır (24). Hastalık tek genli geçebileceğı gibi çok genli veya heterojen (multiple) geçişli de olabilir. Dolayısıyla konu, ailelerde geçiş “şu kalıba göre söz konusudur” denilemeyecek kadar komplekstir. Fakat hastalığın karakteri ve yapılan aile-ikiz çalışmaları şizofreninin en çok multifaktöriyel geçiş kalıbına uyduğunu göstermektedir. Bu geçiş tipinde basitçe fenotip; genotip ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkmaktadır. Şizofreni gibi diğerk bütün multifaktöriyel hastalıkların oluşması ve ilerlemesinde evre önemli bir yer tutmaktadır. Oksidatif strese genom dışında çevresel bir faktör olarak bakıldığında multifaktöriyel kalıtım kalıbı şizofreniye oldukça uymaktadır. Bu nedenle bazı kitaplarda şizofreni hastalığı, multifaktöriyel kalıtımın anlatıldığı yerlerde örnek olarak gösterilmektedir (14).

Sinir hücrelerinin diğerk vücut hücrelerinden farklı olarak ROS hasarına daha yatkın oldukları bildirilmiştir (120). Bu açıdan oksidan/antioksidan sistemlerdeki dengesizliklerin bu dokuya etkisinin daha büyük olması

beklenebilir. Oksidan mekanizmalardaki veya diğerk bir ifade ile ROS sentezindeki artış ve/veya antioksidan savunma sistemindeki azalma beyindeki nörön hücrelerinin membranları başta olmak üzere birçok organeline bozucu etkilerde bulunabilir. Bizim bu çalışmada üzerinde durduğumuz ve göstermeye çalıştığımız mekanizma yukarıda bahsedilen ihtimallerden ikincisi yani antioksidan sistemde, bunun da önemli bir üyesi olan Mn-SOD enzimindeki farklılıklardır. Ön kabule göre, hücrelerde SOD enziminin ve asıl olarak bunun önemli bir izoenzimi olan Mn-SOD enziminin daha az çalışan polimorfik bir tipinin sentezlenmesi membranlar başta olmak üzere hücrenin bütün kesimlerini etkileyebilecek olayların başlamasına sebep olabilir. Bilindiğı gibi hücrelerin sentez ettiğı enerjinin büyük bir kısmı hücre membranlarının bütünlüğünün korunması ve içeriye ve dışarıya yapılacak madde transferlerinin gerçekleştirilmesi için harcanmaktadır. Mn-SOD enziminin daha az efektif çalışması sonucunda dolaylı olarak ROS'un artması ile membranlarda lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları şeklinde başlar ve membran fonksiyonlarını bozacak şekilde ilerleyebilir. Membranlarda lokalize olan birçok yapısal ve fonksiyonel protein bu olaylar zincirinden etkilenir. Özellikle taşıma ve pompa görevi yapan proteinler, lipid peroksidasyonuna bağılı değışikliklerden etkilenerek üç boyutlu değışime uğrarlar. Ayrıca üç boyutlu yapısı değışen membran enzimlerinin aktivitesi de bu değışikliklerden etkilenir. Bütün bu değışiklikler, membran fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması anlamını taşır. Bu şekilde olayların meydana geldiğı beyin bölgelerine göre hastalarda bilişsel, fonksiyonel, motor ve psikosomatik bulgular ortaya çıkabilir (56). Bu ihtimaller gözönünde bulundurularak bazı antioksidan vitaminlerin hastalara verilmesi ile semptomların nasıl etkilendiğı

takip edilmiş, şizofreni hastalarının bazı pozitif veya negatif semptomlarının azaldığı veya ortadan kaybolduğu bulunmuştur (83,84). Fakat konunun daha iyi anlaşılması, tedavi protokollerinin yeniden gözden geçirilmesi ve muhtemel etyopatogenetik ihtimallerin ortaya konabilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

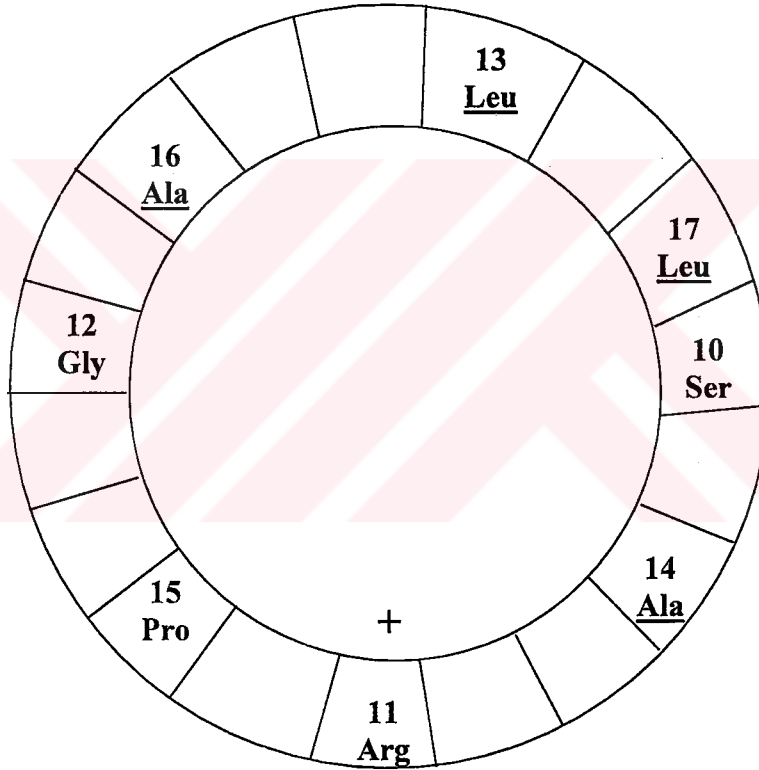
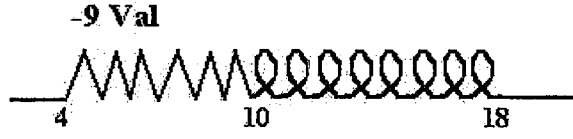
Aşırı bir oksidatif yükü karşı karşıya olan mitokondrinin en önemli savunma enzimi Mn-SOD'un sinyal sekansı üzerindeki polimorfizmi ilk defa Rosenblum ve arkadaşları araştırmışlardır (124). Hayat için önemli olan bu enzimin birden fazla sinyal sekansının olması; hedefleme, membran translokasyonu ve/veya Mn-SOD'un birbiri üzerine katlanmasıyla sinyal sekansının kırılması gibi olayların hızını belirleyen birbirini tamamlayıcı mekanizmalarına işaret etmektedir. Ayrıca sinyal sekanslarında polimorfizmlerin olması, proteinlerin daha sonra yanlış üç boyutlu yapıya kavuşmalarına ve hücre içinde yanlış yönlendirilmelerine yol açabileceğinden bazı patolojilere ve hastalıklara sebep olması kuvvetle muhtemeldir. Adı geçen çalışma esnasında araştırmacılar 47. nükleotitte bir değişiklik farketmişlerdir. GTT olması gereken kodon GCT olarak tespit edilmiş, bunların aminoasit olarak karşılığının ise Valin ve Alanin olduğu belirtilmiştir. Bu Ala/Val polimorfizmi 24 amino asit bakiyeye sahip olan mitokondrial sinyal sekansı (MTS)'nın karboksi ucuna doğru 16. amino asitte ortaya çıkmıştır. Mitokondrial bir enzimde bu şekilde bir polimorfizmin ortaya çıkması, oksidatif yükün artacağı anlamına gelebilir. Nitekim sıçan karaciğeri ile yapılan bir çalışmada mitokondrial DNA'nın nükleer DNA'ya göre 10 kat daha fazla oksidatif hasara maruz kaldığı gösterilmiştir (122). Sinyal hipotezine göre, sinyal dizileri nükleer DNA'da kodlanan proteinleri

hücrenin spesifik bir organelindeki spesifik yerine götürmek üzere görevlendirilmiştir (16). Sinyal dizisi mitokondrinin dış membranı geçtikten sonra iç membrandaki benzer reseptörlerce tanınır ve içeri kısıma girdikten sonra matriks-işleyici peptidaz tarafından koparılarak olgun enzim haline getirilmiş olur. Bir çalışmada sinyal sekansı içermeyen Mn-SOD enziminin hücreleri iyonize radyasyona karşı koruyamadığı, buna karşılık normalde sitoplazmada bulunan Cu,Zn-SOD enziminin bir sinyal dizisiyle mitokondriye yönlendirilmesiyle hücrelerin radyasyondan korunduğu gösterilmiştir (163). Sonuç olarak Mn-SOD enziminin yetersiz bir şekilde mitokondriye yönlendirilmesi ile mitokondrinin ROS toksisitesine karşı defansı kırılmış olur, bu da mevcut proteinlerin denatürasyonuna sebep olabileceği gibi mitokondrial DNA'da oksidasyon yapıp mutasyon gelişmesine de sebep olabilir (124).

İnsanda birbirinden farklı sistemlere ait çeşitli hastalıklarda Mn-SOD genindeki polimorfizmin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birçoğu nöropsikiyatrik hastalıkların dışında bazı hastalıklarda yapılmıştır. Bunlar; 1) meme kanserinde kansere yakalanma riski ile antioksidanlar ve Mn-SOD polimorfizmi arasındaki ilişki ile (12,99) yine meme kanserinde radyoterapi komplikasyonlarında Mn-SOD'un polimorfizminin önemi (46), 2) Hispanikler arasında Mn-SOD polimorfizmi ile kolorektal karsinoma arasındaki ilişki (145), 3) Eksudatif, yaş ile ilişkili makular dejenerasyon ile Mn-SOD geni arasındaki asosiyasyon (70), 4) Asbestoz ile ilişkili akciğer hastalıkları ile Mn-SOD genotipinin birbiri ile bağlantısı (53), 5) Servikal karsinoma hücrelerinde fotodinamik tedavi ile apoptozisin indüksiyonu ve Mn-SOD geninin ilişkisi (33) konulu çalışmalardır. Bunlardan bir kısmında gerçekten Mn-SOD polimorfizmi

ile hastalık arasında ilişki bulunmuş, bir kısmında zayıf bir ilişki tespit edilmiş, bir kısmında ise anlamlı bir ilişkiye rastlanmamıştır.

Shimoda-Matsubayashi ve arkadaşları Japon sağlıklı bireylerde ve Parkinson hastalarında yaptıkları bir polimorfizm çalışmasında genin kodlayıcı sekansında yapısal bir T→C yer değiştirmesi tesbit etmişler, bunun da sinyal peptidin -9 pozisyonunda bulunan valin aminoasitini (GTT) alanin amino asitine (GCT) dönüştüreceğini belirlemişlerdir (139). Araştırmacılar Chou ve Fasmanın algoritmini kullandıklarında (26) Ala allelini taşıyan sinyal peptidin alfa heliks yapısına kavuşamayacağını görmüşlerdir (Şekil 7). Bu alfa heliks daha sonra bir beta tabaka yapısı göstermektedir. Edmundson'un helikal daire analizi kullanıldığında ise alfa heliks yapısı gösteren kısımda hidrofobik aminoasit bakiyeleri dairenin bir tarafında, hidrofilik bakiyeler ise (pozitif olarak yüklü arjinin aminoasiti dahil) heliksin diğer tarafında yer almakta idi (Şekil 7). Aynı analizler valin bakiyesi taşıyan allele uygulandığında ise -9 pozisyonunda alfa heliksin sonlandığını, bunun yerine bu amino asitten itibaren β-sekonder yapısının oluştuğunu izlemişlerdir (Şekil 7). MTS'nin bu amfifilik heliks yapısının, Mn-SOD enziminin mitokondriye girişi için mutlaka gerekli olduğu belirtilmiştir (49,78). Ancak Ala ve Val allellere ait Mn-SOD enziminin mitokondriye hangi hızlarla ve kapasite ile girdiğinin anlaşılması başka bir *in vitro* çalışma ile açığa çıkacaktır. Parkinsonlu hastalar ve kontrol grubu ile yapılan yukarıda adı geçen çalışmada, kontrol grubunda MTS'nin -9 pozisyonunda bulunan Ala rezidüsünün allel sıklığı %12.1 bulunurken valin rezidüsünün sıklığı %89.9 bulunmuştur (139).



Şekil 7. İnsan Mn-SOD'unun mitokondrial hedef dizisinin iki polimorfik varyantında Chou-Fasman algoritmeleri ile yapılan tahmini analizin şematik gösterimi. Aminoasit bakiyelerinin numaralanmasına sinyal peptidin N-terminal bakiyesinden başlanmıştır. Polimorfik bölgenin -9 pozisyonu 16. bakiyeye karşılık gelmektedir. Amino asit bakiyeleri karşılık gelen yapısal durumlarına göre gösterilmiştir: helikal kısım (Ω) şeklinde, β -tabakalı kısım (W) şeklinde ve tesadüfi kıvrımların olduğu kısım ($-$) şeklinde gösterilmiştir. Yapısal olarak önemli olan bakiyeler bakiye numarası ile belirtilmiştir. Her bir helikal loop tek bir helikal bakiyeye karşılık gelmektedir. -9 Ala tipinde olması muhtemel helikal segmentlerin (10-17. bakiyeler) helikal daireysel analizi de gösterilmiştir. Hidrofobik bakiyeler altı çizili olarak gösterilmiştir, pozitif yüklü amino asit ise + işareti ile gösterilmiştir (Shimoda-Matsubayashi S ve ark. Biochem Biophys Res Commun 1996; 226:561-565 makalesinden modifiye edilerek alınmıştır).

Halbuki Parkinson hastalığında bu oranlar sırası ile %19.3 ve %80.7 olarak bulunmuştur (139). Görüldüğü gibi -9Ala sıklığı Parkinson hastalarında daha fazladır. Aynı araştırmacılar Mn-SOD'un nigral nöronların korunmasında açığa H_2O_2 ve OH radikallerini çıkarma potansiyeline sahip olduğu için negatif bir rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Ile58Thr aminoasit değişimi Mn-SOD'un tetramerik şeklini ve stabilitesini etkiler ve enzim aktivitesini azaltır (17). Bununla birlikte MTS'nin -9 pozisyonundaki Ala/Val değişimi sadece enzim molekülünün mitokondri için giriş trafiğini ve hedefe doğru bir şekilde varışını etkiler (138). Bununla beraber asıl hedefine ulaşamayan Mn-SOD enziminin ilgili organelde aktivitesinin azalacağı da bir diğer gerçektir. Bu izoenzimin asıl görevi sitoplazmada veya hücreler arası sıvıda oluşan ROS ile mücadele etmek değil, mitokondride oluşan süperoksit radikalleri ile mücadele etmektir. Her ne kadar mitokondriye girişin engellenmesi total hücresel savunma sisteminde önemli bir değişiklik yapmasa da mitokondri açısından düşünüldüğünde, ciddi bir oksidatif maruziyetten bahsetmek akla uzak bir yorum değildir. Son olarak mitokondriye etkin bir şekilde giremeyen veya hiç giremeyen Mn-SOD enziminin sinyal peptidinin peptidaz aktivitesi ile sitoplazmada kopartılması ve enzimin aktif hale gelmesi tartışılabilir bir konudur. Dolayısıyla sinyal peptidin kopartılmasındaki bir problem, yapısal gen bölgesinde bir polimorfizm varmış gibi enzim aktivitesini etkileyebilir. Alman Parkinsonlu ve kontrol bireylerinde yapılan başka bir Mn-SOD polimorfizm çalışmasında hastaların hiçbirinde Ile58Thr sekansında ve diğer 3. eksonu ilgilendiren bir sekansta herhangi bir varyant tespit edilememiştir (45). Aynı araştırmacılar aynı hastaların 4. ve 5. eksonlarını da araştırmışlar ancak herhangi bir

mutasyon veya kontrollerle karşılaştırdıklarında herhangi bir polimorfizme rastlamamışlardır. Yine benzer bir polimorfizm çalışmasında Japon nonfamilial idiopatik dilate kardiyomyopati hastalarında Mn-SOD polimorfizmi araştırılmış, kontrollerle karşılaştırıldığında lider peptidin 16. amino asitinde Valine karşı Alanin polimorfizmi tespit edilmiş ve Valin allelinin yüksek bir oranda homozigotluk gösterdiği görülmüştür (52).

Tardiv diskinezi, şizofreni hastalarının bir kısmında uzun süre antipsikotik kullanımını takiben ortaya çıkan, istemsiz hareketlerle karakterize bir ilaç yan etkisidir. Her ne kadar bu klinik fenomenin uzun süredir kullanılan nöroleptiklerin yan etkisi olduğu savunulsa da bazı araştırmacılara göre hastalığın seyrinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Etiyolojisi henüz tam olarak ortaya konulamamış olan bu ilaç yan etkisinin son yıllarda antioksidan sistemde herhangi bir zayıflama ile ilişkisinin olabileceği ileri sürülmüştür (82). Bazı araştırmacılar uzun süreli nöroleptik tedavisinin dopamin döngüsünü artırarak özellikle süperoksit radikalleri başta olmak üzere diğer oksijen radikallerini de arttırdığını göstermişlerdir (93). Fenotiazin alan hastalarının BOS'unda lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı tesbit edilirken (112) TD'li şizofreni hastalarının BOS'unda da benzer şekilde lipid peroksidasyon son ürünlerinin arttığı tesbit edilmiştir (85). TD tedavisi için birçok tedavi protokolleri uygulansa da elde edilen sonuçlar ümit verici olmamıştır (62). Yukarıda kısmen anlatılan serbest radikallerle TD arasındaki ilişkilerle ilgili teorilerin ışığında antioksidan bir vitamin olan E vitamininin TD tedavisinde etkinliğini araştırmak üzere çift kör plasebo kontrollü birçok çalışma yapılmıştır (6,39). Bu çalışmalardan birçoğu TD semptomlarının iyileşmesinde E vitamini gibi antioksidan vitaminlerin önemli fonksiyonları

olduğunu göstermektedir (5,35). Bazı araştırmacılar ise E vitamininin herhangi bir etkinliğinin olmadığını savunmaktadırlar (95).

SOD enzimi süperoksit radikallerinin yok edilmesinden sorumlu olduğundan dolayı bu enzimin aktivitesi ile TD arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığı önemli bir konu olarak ele alınmış ve birçok araştırmacı bu konuyu araştırmıştır. Bir grup araştırmacı TD'li hastaların SOD aktivitelerini düşük bularak bunun hem şizofrenide hem de TD gelişiminde bir risk faktörü olabileceğini ileri sürmüş (151,165), diğer grup araştırmacı ise TD olan ve olmayan hastaların eritrositlerinde SOD aktivitesi açısından herhangi bir farklılık olmadığını göstermişlerdir (51), diğer taraftan bir diğer çalışmada ise nöroleptik kullanan ve kullanmayan şizofreni hastalarının kan SOD aktivitelerinde bir farklılık tesbit edilememiştir (167). Bütün bunlar göstermektedir ki TD ile oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemi arasındaki ilişki halen tartışılmakta olan, herhangi bir sonuca ulaşamamış konulardan biridir. Hori ve arkadaşları yaptıkları polimorfizm çalışmasında Mn-SOD geninin şizofreni ve TD ile ilişkisini incelemişler, şizofreni ile herhangi bir polimorfizm ilişkisi ortaya koyamamışlar ama TD ile ilişki göstermişlerdir (54). Adı geçen çalışmada Mn-SOD genotipi, cinsiyet, yaş, hastalık süresi ve nöroleptik dozu bağımsız değişkenler şeklinde regresyon modellerine uygulandığında TD ile Ala-9Val genotipi ve yaş arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır. Yine TD'li hastaların istemsiz hareketlerinin şiddetinin sayısal ifadesi olan total AIMS skoru ile yaş ve hastalık süresi arasında anlamlı bir ilişki, Ala-9Val genotipi ile ise hafif fakat anlamsız ($p<0.08$) bir ilişki tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da TD olan ve olmayan hastalar arasında Ala ve Val allelleri açısından anlamlı olmasa da yakın bir farklılıktan söz etmek

mümkündür ($\chi^2=5.02$, $p=0.081$). -9Val alleli TD'li hastalarda olmayanlara göre daha sık olarak bulunmuştur. Dolayısıyla -9Val alleli TD için bir risk faktörü olarak kabul edilebilir. Aynı bir bakış açısıyla -9Val allelinin yabancı tip allel, -9Ala allelinin ise mutant bir allel olduğu düşünülebilir. Yapılan çalışmalarda -9Val allelinin sıklığının daha fazla olduğu (0.89), -9Ala allelinin ise az sıklıkta (0.12) olduğu bildirilmiştir (54). Bu bilgilerin ışığında şu iki yorum yapılmıştır: i) Mn-SOD geninde bulunan Ala-9Val polimorfizmi bilinmeyen diğer bir polimorfizm ile bağlantı dengesizliği gösterebilir ve bu da TD'ye bir yatkınlık oluşturabilir. Çok nadir olmakla birlikte Mn-SOD geninin 3. eksonunda gösterilmiş olan diğer bir fonksiyonel polimorfizm olan Ile58Thr polimorfizmi (17) bu açıdan değerlendirilmesi gereken diğer bir polimorfizmdir. Sonuç olarak asosiyasyon çalışmalarında kullanılabilecek daha uygun fonksiyonel polimorfizmlerin bulunması için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. ii) Diğer yorum -9Ala allelinin kişileri TD'den koruyabilecek bir allel olduğu hakkındadır. TD'li hastalarda bu allel tipinin az sıklıkta olması korumanın kalkması anlamına gelebileceği için önemli bir yorum olarak kabul edilebilir. Bu yorumu kuvvetlendirecek diğer bir bulgu ise Val/Val genotipine sahip olan TD'li hastaların daha yüksek bir AIMS skoru göstermeleridir. Yukarıda bahsedilen TD'li hastalarda oksidatif stresin arttığı, buna karşılık da SOD aktivitesinin azaldığı şeklindeki bulgular ile bu son ileri sürülen teori birbiri ile uyum göstermektedir. Uzun süre nöroleptik kullanan hastalarda TD gelişiminin genetik yatkınlıkla ilişkisinin bulunduğu daha önceden bazı araştırmalarla gösterilmiştir. Dopamin D3 reseptör geni (144) ve debrisoquine 4-hidroksilaz (CYP2D6) genindeki (107) polimorfik yapıların TD'ye yatkınlıkla ilişkisi olduğu ileri

sürülmüştür. Dolayısıyla TD’de SOD başta olmak üzere bazı enzimlerin polimorfizmlerinin TD etyopatogenizi ile ilişkisinin olabileceği ön şart olarak kabul edilip araştırmalar yapılabilir. Bizim çalışmamızda da TD’li ve TD’siz şizofreni hastalarının Mn-SOD geninin polimorfizminin araştırılması sonucunda Ala/Ala ve Val/Val homozigot genotiplerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da önemli farklılıklar olduğu sonucuna ulaşılmıştır. İstatistiksel veriler açısından çalışmamızdaki en önemli kısıtlayıcı faktör TD’li hasta sayısının az olmasından dolayı; hastaların daha fazla sayıda olduğu geniş popülasyonlu yeni araştırmalar yapılması konuya daha fazla ışık tutucu olacaktır.

Hastalar kullanıkları antipsikotik ilaçların klorpromazin eşdeğerliklerine göre yüksek ve düşük doz protokolü olarak ikiye ayrıldıklarında elde edilen veriler genotiplerin ilaç dozu ile bir ilişkisinin olabileceği konusunda fikir vermektedir. Yüksek ve düşük doz nöroleptik kullanan hastalar arasında Ala/Val genotipi açısından bir farklılık yoktu. Her iki doz protokolünde de düşük dozda ilaç alan hastalarda Ala/Ala genotipi daha belirgin iken yüksek dozda ilaç alan hastalarda Val/Val genotipi daha yüksek bir yüzdede idi (sırasıyla $\chi^2= 6.92$, $p= 0.031$; $\chi^2= 9.22$, $p= 0.010$). Ala allelinin yüksek enzim aktivitesi ile bağdaştırıldığı araştırmalar gözönüne alındığında bu hastaların daha az nöroleptik dozu ile tedavisinin sağlanması, kanaatimizce şizofreni hastalığının kaynağında oksidatif stresin bulunabileceği konusunda delil olarak gösterilebilecek önemli bir bulgudur.

Diğer taraftan erkek ve kadın şizofrenler arasında hastalığın seyri bakımından farklılık bulunmaktadır. Hastalık kadınlarda daha az gürültülü erkeklerde ise daha kötü ve gürültülü seyretmektedir (76). Cinsiyet farklılığı ve

bahsi geçen polimorfizm arası bir ilişkinin bulunması cinsiyetler arası klinik belirti ve seyir farklılığının nedenleri arasında Mn-SOD gen polimorfizminin etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, çalışma verilerimize göre Mn-SOD geninin heterozigot Ala/Val genotipine sahip olma en azından bizim toplumumuz için şizofreniye yatkınlık oluşturmaktadır ve hastalığın klinik alttipleri ile bahsi geçen genin polimorfizmi arasında ilişki bulunmaktadır. Mn-SOD enzimi ile ilgili polimorfizmin tespit edilmesi vücudun antioksidan sisteminin diğer üyeleri olan GSH-Px, CAT, glutatyon redüktaz ve hatta diğer SOD izoenzimleri olan Cu,Zn-SOD ve EC-SOD gibi enzimlerin de bu bağlamda polimorfizm açısından araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Çünkü bunlar birbirini tamamlayıcı nitelikte aktivite gösteren enzimlerdir. Mn-SOD ile ilgili hipotezimizi destekleyebilecek olumlu bir sonuca ulaşılması diğer enzimlerle ilgili farklılıklar olacağı veya olmayacağı konusunda fikir vermeyebilir. Bu tür aynı hastalıkta aynı anda bir'den fazla enzimin gen polimorfizmlerinin çalışıldığı bir çalışmaya örnek gösterilebilecek bazı çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür. Örneğin Rus popülasyonunda Tip I diabetes mellitusta gelişen diabetik nefropati ile Mn-SOD ve EC-SOD polimorfizmlerinin herhangi bir ilişkisinin olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada, Mn-SOD geninin Ala-9Val ve Ile58Thr polimorfizmleri ile EC-SOD geninin Arg213Gly polimorfizmleri araştırılmış, bunlardan Mn-SOD polimorfizmi diabetik nöropatili hastalarda kontrol grubundan farklı bulunurken EC-SOD için anlamlı bir sonuca ulaşılammıştır (46). Bu tezin giriş kısmında da detaylı olarak tartışıldığı gibi şizofrenide hem hücresel düzeyde hem de hücre dışı düzeyde (BOS, plazma gibi vücut sıvılarında)

bir oksidatif stres mevcuttur. Bu açıdan SOD enziminin sitoplazmik izoenzimi olan Cu-Zn-SOD ve ekstrasellüler izoenzimi olan EC-SOD enziminin genlerinin de Mn-SOD ile beraber polimorfizm açısından değerlendirilmesi, şizofreni hastalarında varlığı kesine yakın bir gerçeklikle bilinen oksidatif stresin kaynağının aydınlatılması açısından önemlidir. Ayrıca antioksidan vitaminlerin şizofreni tedavisinde ek olarak kullanılması konusundaki tartışmalara biraz daha açıklık kazandırmak için, antioksidan enzimlerin tümüne ait ilgili genetik polimorfizm çalışmaları önem kazanmaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Aaij C, Borst P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269: 192-200.
2. Abdalla DSP, Manteino HP, Oliveira JAC, Bechara EJH. (1986). Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic depressive patients. *Clin Chem* 32: 805-807.
3. Adachi T, Wang XL. (1998). Association of extracellular-superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism. *FEBS Lett* 433: 166-168.
4. Adams JD, Odunze IN. (1991). Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 10: 161-169.
5. Adler LA, Edson R, Lavori P, Peselow E, Duncan E, Rosenthal M, Rotrosen J. (1998). Long-term treatment effects of vitamin E for tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry* 43: 868-872.
6. Adler LA, Peselow E, Rotrosen J, Duncan E, Lee M, Rosenthal M, Angrist B. (1993). Vitamin E treatment of tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 150: 1405-1407.
7. Agar NS, Sadrzadeh SM, Hallaway PE, Eaton JW. (1986). Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *J Clin Invest* 77: 319-321.
8. Akın H. (2003). Tıbbi Genetik Terimleri Sözlüğü. "Tıp Terimleri Sözlüğü", Sendrom III, Logos Tıp Yayınları 1: 1-24.
9. Akyol Ö. (2002). Increased lipid peroxidation in schizophrenia: a marker of membrane breakdown. *Eur Psychiatry (Supplement 1)* 17: 75S.
10. Akyol Ö, Herken H, Uz E, Fadilloğlu E, Ünal S, Söğüt S, Özyurt H, Savaş HA. (2002). The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients: the possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 995-1005.
11. Altuntaş İ, Aksoy H, Coşkun İ, Çayköylü A, Akçay F. (2000). Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients. *Clin Chem Lab Med* 38: 1277-1281.
12. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG. (1999). Manganase superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 59: 602-606.
13. Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds) (1989). "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York.
14. Başaran N. (1996). "Tıbbi Genetik Ders Kitabı". Yenilenmiş ve genişletilmiş 6. baskı, Bilim ve Teknik Yayınevi, Eskişehir,
15. Bennett CN, Horrobin DF. (2000). Gene targets related to phospholipid and fatty acid metabolism in schizophrenia and other psychiatric disorders: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 63: 47-59.
16. Blobel G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1496-1500.

17. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA. (1996). Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry* 35: 4287-4297.
18. Boveris A, Chance B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716.
19. Brioukhanov A, Netrusov A, Sordel M, Thauer RK, Shima S. (2000). Protection of *Methanosarcina barkeri* against oxidative stress: identification and characterization of an iron superoxide dismutase. *Arch Microbiol* 174: 213-216.
20. Brzustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, Honer WG, Bassett AS. (2000). Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 288: 678-682.
21. Brzustowicz LM, Honer WG, Chow EW, Little D, Hogan J, Hodgkinson K, Bassett AS. (1999). Linkage of familial schizophrenia to chromosome 13q32. *Am J Hum Genet* 65: 1096-1103.
22. Canatan H. (1997). Molecular analysis of keratinocyte growth factor (KGF) involvement in prostatic cell growth: paracrine role of KGF in canine prostate model. Doktora tezi, The Ohio State University.
23. Ceballos I, Delabar JM, Nicole A, Lynch RE, Halliwell RA, Kamoun P, Sinet PM. (1988). Expression of transfected human CuZnSOD gene in mouse L cells and NS20Y neuroblastoma cells induces enhancement of glutathione peroxidase activity. *Biochim Biophys Acta* 949: 58-64.
24. Ceylan ME. (1993). "Araştırma ve Klinik Uygulamada Biyolojik Psikiyatri". 1. Cilt: Şizofreni, Birinci Baskı, İstanbul.
25. Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
26. Chou PY, Fasman GD. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13: 222-245.
27. Chung DJ, Wright AE, Clerch LB. (1998). The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry* 37: 16298-16306.
28. Church SL, Grant JW, Meese ER, Trent JM. (1992). Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics* 14: 823-825.
29. Coryell W, Zimmerman M. (1988). The heritability of schizophrenia and schizoaffective disorder. *Arch Gen Psychiatr* 45: 323-327.
30. Creagan R, Tischfield J, Ricciuti F, Ruddle FH. (1973). Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids: mitochondrial superoxide dismutase (indophenol oxidase-B, tetrameric) to chromosome 6. *Humagenetik* 20: 203-209.
31. Crow TJ. (1985). The two-syndrome concept: origins and current status. *Schizophr Bull* 11: 471-486.

32. Csernansky JG, Newcomer JW. (1994). Are there neurochemical indicators of risk for schizophrenia? *Schizophr Bull* 20: 75-88.
33. Das H, Koizumi T, Sugimoto T, Yamaguchi S, Hasegawa K, Tenjin Y, Nishimura R. (2000). Induction of apoptosis and manganese superoxide dismutase gene by photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines. *Int J Clin Oncol* 5: 97-103.
34. Das KC, Guo XL, White CW. (1998). Protein kinase C delta-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J Biol Chem* 273: 34639-34645.
35. Dorfman-Etrog P, Hermesh H, Prilipko L, Weizman A, Munitz H. (1999). The effect of vitamin E addition to acute neuroleptic treatment on the emergence of extrapyramidal side effects in schizophrenic patients: an open label study. *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 475-477.
36. Dryer SE, Dryer RL, Autor AP. (1980). Enhancement of mitochondrial, cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2,4-dinitrophenol. *J Biol Chem* 255: 1054-1057.
37. Edgar PF, Douglas JE, Cooper GJ, Dean B, Kydd R, Faull RL. (2000). Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 5: 85-90.
38. Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberg DR. (2001). Effect of COMT Val108/158Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6917-6922.
39. Egan MF, Hyde TM, Albers GW, Elkashef A, Alexander RC, Reeve A, Blum A, Saenz RE, Wyatt RJ. (1992). Treatment of tardive dyskinesia with vitamin E. *Am J Psychiatry* 149: 773-777.
40. Epperly MW, Bray JA, Krager S, Berry LM, Gooding W, Engelhardt JF, Zwacka R, Travis EL, Greenberger JS. (1999). Intratracheal injection of adenovirus containing the human MnSOD transgene protects athymic nude mice from irradiation-induced organizing alveolitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43: 169-181.
41. Evans PH. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *Brit Med Bull* 49: 577-587.
42. Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. (2000). Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 47: 8-21.
43. Gattaz WF, Kollish M, Thuren T, Virtanen JA, Kunnunen PKJ. (1987). Increased plasma phospholipase-A2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic treatment. *Biol Psychiatry* 22: 421-426.
44. Gattaz WF, Schmitt A, Maras A. (1995). Increased platelet phospholipase A2 activity in schizophrenia. *Schizophr Res* 16: 1-6.
45. Grasbon-Frold EM, Kosel S, Riess O, Muller U, Mehraein P, Graeber MB. (1999). Analysis of mitochondrial targeting sequence and coding region polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene in German Parkinson disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 749-752.

46. Green H, Ross G, Peacock J, Owen R, Yarnold J, Houlston R. (2002). Variation in the manganese superoxide dismutase gene (SOD2) is not a major cause of radiotherapy complications in breast cancer patients. *Radiother Oncol* 63: 213-216.
47. Halliwell B. (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol Scand* 126: 23-33.
48. Heckers S, Konradi C. (2002). Hippocampal neurons in schizophrenia. *J Neural Transm* 109: 891-905
49. Hendrick JP, Hodges PE, Rosenberg LE. (1989). Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4056-4060.
50. Herken H, Uz E, Özyurt H, Akyol Ö. (2001). Red blood cell nitric oxide levels in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 52: 289-290.
51. Herken H, Uz E, Özyurt H, Söğüt S, Vırit O, Akyol Ö. (2001). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6: 66-73.
52. Hiroi, S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. (1999). Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 332-339.
53. Hirvonen A, Tuimala J, Ollikainen T, Linnainmaa K, Kinnula V. (2002). Manganese superoxide dismutase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *Cancer Lett* 178: 71-74.
54. Hori H, Ohmori O, Shinkai T, Kojima H, Okano C, Suzuki T, Nakamura J. (2000). Manganese superoxide dismutase gene polymorphism and schizophrenia: relation to tardive dyskinesia. *Neuropsychopharmacol* 23: 170-177.
55. Horrobin DF. (1999). The effects of antipsychotic drugs on membrane phospholipids: a possible novel mechanism of action of clozapine. In: Peet M, Glen I, and Horrobin DF (Eds.), "Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry" Marius Press, Lancashire, UK, pp. 113-117.
56. Horrobin DF, Glen AIM, Vaddadi K. (1994). The membrane hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Res* 13: 195-207.
57. Horrobin DF, Manku MS, Hillman S, Iain A, Glen M. (1991). Fatty acid levels in brains of schizophrenics and normal controls. *Biol Psychiatry* 30: 795-805.
58. Housset B, Junod AP (1981). Enzyme response of cultured endothelial cells to hyperoxia. *Bull Eur Physiopathol Respir* 17: 107-110.
59. Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. (1997). Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic Biol Med* 23: 314-320.
60. Irmak MK, Fadilloğlu E, Güleç M, Erdoğan H, Yağmurca M, Akyol Ö. (2002). Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell Biochem Funct* 20: 279-283.

61. Jackson GR, Apffel L, Werreback-Perez K, Perez Polo JR. (1990). Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. I. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. *J Neurosci Res* 25: 187-190.
62. Jeste DV, Lohr JB, Clark K, Wyatt RJ. (1988). Pharmacological treatments of tardive dyskinesia in the 1980s. *J Clin Psychopharmacol* 8: S38-S48.
63. Jurewicz I, Owen RJ, O'Donovan MC, Owen MJ. (2001). Searching for susceptibility genes in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 395-398.
64. Kaiye H, Uematsu M, Ofuji M, Nishida A, Takeuchi K, Nozaki M, Idaka E. (1989). Elevated plasma prostaglandin E2 levels in schizophrenia. *J Neural Transm* 77: 39-46.
65. Kato C, Petronis A, Okazaki Y, Tochigi M, Umekage T, Sasaki T. (2002). Molecular genetic studies of schizophrenia: challenges and insights. *Neurosci Res* 43: 295-304.
66. Kedziora J, Bartosz G. (1988). Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 4: 317-330.
67. Keshevan MS, Mallinger AG, Pettegrew JW, Dippold C. (1993). Erythrocyte membrane phospholipids in psychotic patients. *Psychiatry Res* 49: 89-95.
68. Kilts CD. (2001). The changing roles and targets for animal models of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50: 845-855.
69. Kim HP, Roe JH, Chock PB, Yim MB. (1999). Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J Biol Chem* 274: 37455-37460.
70. Kimura K, Isashiki Y, Sonoda S, Kakiuchi-Matsumoto T, Ohba N. (2000). Genetic association of manganese superoxide dismutase with exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 130: 769-773.
71. Knirsh L, Clerch LB. (2000). A region in the 3' UTR of MnSOD RNA enhances translation of a heterologous RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 164-178.
72. Kouzmenko AP, Hayes WL, Pereira AM, Dean B, Burnet PWJ, Harrison PJ, Rebecca L. (1997). 5-HT2A receptor polymorphism and steady state receptor expression in schizophrenia. *Lancet* 349: 1815.
73. Krall J, Bagley AC, Mullenbach GT, Hallewell RA, Lynch RE. (1988). Superoxide mediates the toxicity of paraquat for cultured mamalian cells. *J Biol Chem* 263: 1910-1914.
74. Kruglyak L. 1997. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 17: 21-24.
75. Kuloğlu M, Üstündağ B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkılınç N. (2002). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 20: 171-175.
76. Kültür S, Mete L. (1997). Şizofreni. *Psikiyatri Temel Kitabı*. Güleç C, Köroğlu E (editörler). Hekimler Yayın Birliği, Bilkent, Ankara, sayfa: 321-353.

77. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr. Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9782-9787.
78. Lemire BD, Fankhauser C, Baker A, Schatz G. (1989). The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity. *J Biol Chem* 264: 20206-20215.
79. Levinson DF, Holmans P, Straub R, Owen MJ, Wildenauer DB, Gejman PV, Pulver AE, Laurent C, Kendler KS, Walsh D, Norton N, Williamns NM, Schwab SG, Lerer B, Mowry BJ, Sanders AR, Antonarakis SE, Blouin JL, DeLeuze JF, Mallet J. (2000). Multicenter linkage study of schizophrenia candidate regions on chromosome 5q, 6q, 10p and 13q: Schizophrenia Linkage Collaborative Group III. *Am J Hum Genet* 67: 652-653.
80. Li T, Ball D, Zhao J, Murray RM, Liu X, Sham PC, Collier DA. (2000). Family based linkage disequilibrium mapping using SNP marker haplotypes: application to a potential locus for schizophrenia at chromosome 22q11. *Mol Psychiatry* 5: 77-84.
81. Lichtermann D, Karbe E, Maier W. (2000). The genetic epidemiology of schizophrenia and of schizophrenia spectrum disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 250: 304-310.
82. Lohr JB. (1991). Oxygen radicals and neuropsychiatric illness: some speculations. *Arch Gen Psychiatry* 48: 1097-1106.
83. Lohr JB, Cadet JL, Lohr MA, Larson L, Wasli E, Wade L, Hylton R, Vidoni C, Jeste DV, Wyatt RJ. (1988). Vitamin E in the treatment of tardive dyskinesia: the possible involvement of free radical mechanisms. *Schizophr Bull* 14: 291-296.
84. Lohr JB, Caligiuri MP. (1996). A double-blind placebo-controlled study of vitamin E treatment of tardive dyskinesia. *J Clin Psychiatry* 57: 167-173.
85. Lohr JB, Kuczenski R, Bracha HS, Moir M, Jeste DV. (1990). Increased indices of free radical activity in the cerebrospinal fluid of patients with tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry* 28: 535-539.
86. Loven DP, James JF, Biggs L, Little KY. (1996). Increased manganese-superoxide dismutase activity in postmortem brain from neuroleptic-treated psychotic patients. *Biol Psychiatry* 40: 230-232.
87. Mahadik SP, Evans DR. (1997). Essential fatty acids in the treatment of schizophrenia. *Drugs Today* 33: 5-17.
88. Mahadik SP, Mulchandani M, Hegde MV, Ranjekar PK. (1999). Cultural and socioeconomic differences in dietary intake of essential fatty acids and antioxidants: effects on the course and outcome of schizophrenia. In: Peet M, Glen I, and Horrobin DF (Eds.), "Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry" Marius Press, Lancashire, UK, pp. 167-179.
89. Mahadik SP, Scheffer RE. (1996). Oxidative injury and potential use of antioxidants in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55: 45-54.
90. Maier W, Lichtermann D, Minges J, Hallmayer J, Heun R, Benkert O, Levinson DF. (1993). Continuity and discontinuity of affective disorders and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatr* 50: 871-883.

91. Mallet J, Meloni R, Laurent C. (1994). Catecholamine metabolism and psychiatric or behavioral disorders. *Curr Opin Genet Dev* 4: 419-426.
92. Mathe AA, Secvall G, Wiesel FA, Nyback H. (1980). Increased content of immunoreactive prostaglandin E in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. *Lancet* 1: 16-18.
93. Matsumoto T, Uchimura H, Hirano M, Kim JS, Yokoo H, Shimomura M, Nakahara T, Inoue K, Oomagari K. (1983). Differential effects of acute and chronic administration of haloperidol on homovanillic acid levels in discrete dopaminergic areas of rat brain. *Eur J Pharmacol* 89: 27-33.
94. McCord JM, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 25: 6049-6055.
95. McCreadie RG, MacDonald E, Wiles D, Campbell G, Paterson JR. (1995). The Nithsdale Schizophrenia Surveys. XIV: Plasma lipid peroxide and serum vitamin E levels in patients with and without tardive dyskinesia, and in normal subjects. *Br J Psychiatry* 167: 610-617.
96. Meador-Woodruff JH, Healy DJ. (2000). Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 288-294.
97. Meltzler HY. (1987). Biological studies in schizophrenia. *Schizophr Bull* 13: 77-111.
98. Merikangas KR, Swendsen JD. (1997). Genetic epidemiology of psychiatric disorders. *Epidemiol Rev* 19: 144-155.
99. Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Uusitupa M, Hirvonen A. (2001). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 22: 827-829.
100. Moldin SO, Gottesman II. (1997). At issue: genes, experience, and chance in schizophrenia-positioning for the 21st century. *Schizophr Bull* 23: 547-61.
101. Mukerjee S, Mahadik SP, Scheffer R, Correnti EE, Kelkar H. (1996). Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophr Res* 19: 19-26.
102. Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. (1999). High rates of schizophrenia in adults with velocardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatr* 56: 940-945.
103. Nohl H, Breuninger V, Hegner D. (1978). Influence of mitochondrial radical formation of energy-linked respiration. *Eur J Biochem* 90: 385-390.
104. Noponen M, Sanfilippo M, Samanich K, Rye H, Ko G, Angrist B, Wolken A, Duncan E, Rotrosen J. (1993). Elevated PLA2 activity in schizophrenics and other psychiatric patients. *Biol Psychiatry* 34: 641-649.
105. Oberley LW, St Clair DK, Autor AP, Oberley TD. (1987). Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys* 254: 69-80.
106. O'Donovan MC, Owen MJ. (1999). Candidate gene association studies of schizophrenia. *Am J Hum Genet* 65: 587-592.
107. Ohmori O, Suzuki T, Kojima H, Shinkai T, Terao T, Mita T, Abe K. (1998). Tardive dyskinesia and debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) genotype in Japanese schizophrenics. *Schizophr Res* 32: 107-113.

108. Onstad S, Skre I, Torgersen S, Kringlen E. (1991). Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand* 83: 395-401.
109. Owen MJ, Holmans P, McGuffin P. (1997). Association studies in psychiatric genetics. *Mol Psychiatry* 2: 270-273.
110. Özben T. (1998). Pathophysiology of cerebral ischemia. Mechanisms involved in neuronal damage. In: "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants". Özben T., editor. Plenum Press, New York, pp. 163-187.
111. Özyurt H. (2002). Deneysel olarak bleomisin ile sıçan akciğerinde oluşturulan fibroziste serbest radikallerin rolü ve fibrozis oluşturan mekanizmalar üzerine kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) etkisi. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi.
112. Pall HS, Williams AC, Blake DR, Lunec J. (1987). Evidence of enhanced lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients taking phenothiazines. *Lancet* 11: 596-599.
113. Parker MW, Blake CC. (1988). Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Lett* 229: 377-382.
114. Parker MW, Blake CC, Barra D, Bossa F, Schinina ME, Bannister WH, Bannister JV. (1987). Structural identity between the iron- and manganese-containing superoxide dismutases. *Protein Eng* 1: 393-397.
115. Petronis A, Kennedy JL. (1995). Unstable genes-unstable mind. *Am J Psychiatr* 152: 164-172.
116. Pinkham JL, Wang Z, Alsina J. (1997). Heme regulates SOD2 transcription by activation and repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 31: 281-291.
117. Pinteaux E, Copin JC, Ledig M, Tholey G. (1996). Modulation of oxygen-radical-scavenging enzymes by oxidative stress in primary cultures of rat astroglial cells. *Dev Neurosci* 18: 397-404.
118. Pralong E, Magistretti P, Stoop R. (2002). Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. *Prog Neurobiol* 67: 173-202.
119. Ramchand CN, Wei J, Lee KH, Peet M. (1999). Phospholipase A2 gene polymorphism and associated biochemical alterations in schizophrenia. In: Peet M, Glen I, and Horrobin DF (Eds.), "Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry" Marius Press, Lancashire, UK, pp. 31-37.
120. Rao AV, Balachandran B. (2002). Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci* 5: 291-309.
121. Reddy RD, Yao JK. (1996). Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55: 33-43.
122. Richter C, Park JW, Ames BN. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6465-6467.
123. Rogers RJ, Chesrown SE, Kuo S, Monnier JM, Nick HS. (2000). Cytokine-inducible enhancer with promoter activity in both the rat and human manganese-superoxide dismutase genes. *Biochem J* 347: 233-242.

124. Rosenblum JS, Gilula N, Lerner RA. (1996). On signal sequence polymorphism and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4471-4473.
125. Sagara Y. (1998). Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. *J Neurochem* 71: 1002-1012.
126. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
127. Sambrook J, Frithsch EF, Maniatis M. (2002). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
128. Sasaki T, Macciardi FM, Badri F, Verga M, Meltzer HY, Lieberman J, Howard A, Bean G, Joffe RT, Hudson CJ, Kennedy JL. (1996). No evidence for association of dopamine D2 receptor variant (Ser311(Cys311)) with major psychosis. *Am J Med Genet* 67: 415-417.
129. Sauer H, Gunther J, Hescheler J, Wartenberg M. (2000). Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals. *Am J Pathol* 156: 151-158.
130. Savaş HA, Herken H, Yürekli M, Uz E, Tutkun H, Zoroğlu SS, Özen ME, Cengiz M, Akyol Ö. (2002). Possible role of nitric oxide and adrenomedullin in bipolar affective disorder. *Neuropsychobiology* 45: 57-61.
131. Schizophrenia Linkage Cooperative Group for Chromosomes 3, 6 and 8. (1996). Additional support for schizophrenia linkage on chromosomes 6 and 8: a multicentre study. *Am J Med Genet* 67: 580-594.
132. Schmidt M, Meier B, Parak F. (1996). X-ray structure of the cambialistic superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* active with Fe or Mn. *JBIC* 1: 532-541.
133. Schwab SG, Hallmayer J, Lerer B, Albus M, Borrmann M, Honig S, Strauss M, Segman R, Lichtermann D, Knapp M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB. (1998). Support for a chromosome 18p locus conferring susceptibility to functional psychoses in families with schizophrenia, by association and linkage analysis. *Am J Hum Genet* 63: 1139-1152.
134. Segman RH, Heresco-Levy U, Finkel B, Inbar R, Neeman T, Schlafman M, Dorevitch A, Yakir A, Lerner A, Goltser T, Shelevoy A, Lerer B. (2000). Association between the serotonin 2C receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia: additive contribution of 5-HT_{2C}ser and DRD3gly alleles to susceptibility. *Psychopharmacology* 152: 408-413.
135. Sharp PA, Sudgen B, Sambrook J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055-3063.
136. Shen P, Buchholz M, Sung R, Roxas A, Franco C, Yang WH, Jagadeesan R, Davis K, Oefner PJ. (2002). Population genetic implications from DNA polymorphism in random human genomic sequences. *Hum Mutat* 20: 209-217.
137. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rohaev EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760.

138. Shimoda-Matsubayashi S, Hattori T, Matsumine H, Shinohara A, Yoritaka A, Mori H, Kondo T, Chiba M, Mizuno Y. (1997). Mn SOD activity and protein in a patient with chromosome 6-linked autosomal recessive parkinsonism in comparison with Parkinson's disease and control. *Neurology* 49: 1257-1262.
139. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 561-565.
140. Siddons RC, Mills CF. (1981). Glutathione peroxidase activity and erythrocyte stability in calves differing in selenium and vitamin E status. *Brit J Nutr* 46: 345-355.
141. Spurlock G, Williams J, McGuffin P, Aschauer HN, Lenzinger E, Fuchs K, Sieghart WC, Meszaros K, Fathi N, Laurent C, Mallet J, Macciardi F, Pedrini S, Gill M, Hawi Z, Gibson S, Jazin EE, Yang HT, Adolfsson R, Pato CN, Dourado AM, Owen MJ. (1998). European Multicentre Association study of Schizophrenia: a study of the DRD2 Ser311Cys and DRD3 Ser9Gly polymorphisms. *Am J Med Genet* 81: 24-28.
142. St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans HJ. (1990). Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 336: 13-16.
143. St Clair DK, Wan XS, Muse KE, Oberley TD, St Clair WB. (1992). Suppression of radiation-induced neoplastic transformation by over-expression of mitochondrial superoxide dismutase. *Mol Carcinogen* 6: 238-242.
144. Steen VM, Lovlie R, MacEwan T, McCreadie RG. (1997). Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 2: 139-145.
145. Stoecklacher J, Ingles SA, Park DJ, Zhang W, Lenz HJ. (2002). The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 9: 235-238.
146. Straub RE, Maclean CJ, Martin RB, Ma Y, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Webb BT, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS. (1998). A schizophrenia locus may be located in region 10p15-p11. *Am J Med Genet* 81: 296-301.
147. Stromgren E. (1982). Subclassification of schizophrenia. In: Wing JK, Wing L (eds) *Handbook of Psychiatry*, vol. 3: Psychoses of uncertain aetiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 17-21.
148. Sumiyoshi T, Kurachi M, Kurokawa K, Yotsutsuji T, Uehara T, Itoh H, Saitoh O. (2000). Plasma homovanillic acid in the prodromal phase of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 47: 428-433.
149. Tam SY, Roth RH. (1997). Mesoprefrontal dopaminergic neurons: can tyrosine availability influence their functions? *Biochem Pharmacol* 53: 441-453.

150. Thongphasuk J, Oberley LW, Oberley TD. (1999). Induction of superoxide dismutase and cytotoxicity by manganese in human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 365: 317-327.
151. Tsai G, Goff DC, Chang RW, Flood J, Baer L, Coyle JT. (1998). Markers of glutamatergic neurotransmission and oxidative stress associated with tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 155: 1207-1213.
152. Vaiva G, Thomas P, Leroux JM, Cottencin O, Dutoit D, Erb F, Goudemand M. (1994). Erythrocyte superoxide dismutase (eSOD) determination in positive movements of psychosis. *Therapie* 49: 343-348.
153. Van Os J, Marcelis M, Sham P, Jones P, Gilvarry K, Murray R. (1997). Psychopathological syndromes and familial morbid risk of psychosis. *Br J Psychiatry* 170: 241-246.
154. Velicer L, Crino PB. (1990). Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: a hypothesis. *Neurobiol Aging* 11: 567-571.
155. Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK. (1994). Molecular structure and organisation of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 13: 1127-1136.
156. Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispe JR. (1996). Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 271: L150-L158.
157. Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE. (2001). Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50: 825-844.
158. Whatley SA, Curti D, Das Gupta F, Ferrier IN, Jones S, Taylor C, Marchbanks RM. (1998). Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome b5 reductase in brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 3: 227-237.
159. Wickham H, Walsh C, Asherson P, Gill M, Owen MJ, McGuffin P, Murray R, Sahm P. (2002). Familiality of clinical characteristics in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 36: 325-329.
160. Wieselgren IM, Lindstrom LH. (1998). CSF levels of HVA and 5-HIAA in drug-free schizophrenic patients and healthy controls: a prospective study focused on their predictive value for outcome in schizophrenia. *Psychiatry Res* 81: 101-110.
161. Williams J, Spurlock G, McGuffin P, Mallet J, Nothen MM, Gill M, Aschauer H, Nylander PO, Macciardi F, Owen MJ. (1996). Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group. *Lancet* 347: 1294-1296.
162. Wispe JR, Clarck JC, Burhans MS, Kropp KE, Korfhagen TR, Whitsett JA. (1989). Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 994: 30-36.
163. Wong GH. (1995). Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. *Biochim Biophys Acta* 1271: 205-209.
164. Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. (1989). Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58: 923-931.

165. Yamada K, Kanba S, Anamizu S, Ohnichi K, Ashikari J, Yagi G, Asai M. (1997). Low superoxide dismutase in schizophrenic patients with tardive dyskinesia. *Psychol Med* 27: 1223-1225.
166. Yao JK, Leonard S, Reddy RD. (2000). Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr Res* 42: 7-17.
167. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP. (1998). Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J Psychiat Res* 32: 385-391.
168. Yao JK, van Kammen DP. (1996). Incorporation of [3H] arachidonic acid into platelet phospholipids of patients with schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55: 21-26.
169. Yao JK, van Kammen DP, Gurklis J. (1996). Abnormal incorporation of arachidonic acid into platelets of drug-free patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 60: 11-21.
170. Yao JK, van Kammen DP, Welker JA. (1994). Red blood cell membrane dynamics in schizophrenia. II. Fatty acid composition. *Schizophr Res* 13: 217-226.
171. Zaman Z, Roche S, Fielden P, Frost PG, Niriella DC, Cayley ACD. (1992). Plasma concentrations of vitamin A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age Ageing* 21: 91-94.
172. Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW. (1999). Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res* 59: 6276-6283.
173. Zhang ZJ, Zhang XB, Hou G, Sha WW, Reynolds GP. (2002). The increased activity of plasma manganese superoxide dismutase in tardive dyskinesia is unrelated to the Ala-9Val polymorphism. *J Psychiatr Res* 26:317-324.
174. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33: 337-349.
175. Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St Clair DK. (1997). Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by over-expression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene* 14: 481-490.
176. Zhu CH, Huang Y, Oberley LW, Domann FE. (2001). A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J Biol Chem* 276: 14407-14413.

8. ÖZGEÇMİŞ

Dr. Ömer Akyol 12 Mart 1967'de Sivas'ın Suşehri ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini sırasıyla Cumhuriyet İlkokulu ve Suşehri Lisesinde tamamladı. 1983 yılında lise birincisi olarak mezun oldu ve aynı yıl girdiği ÖSYS sınavında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandı. Altı yıllık tıp eğitiminin ardından 1989 yılında tıp doktoru ünvanını alarak mezun oldu. Mecburi hizmet bağlamında 1990 yılında çektiği kur'a ile Tunceli'nin Ovacık ilçesine tayin oldu. Burada 3 ay çalıştıktan sonra geçici görev ile gittiği Tunceli Devlet Hastanesinde 7 ay çalıştı. 1990 yılı Eylül ayında girdiği TUS sınavı ile ilk tercihi olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya bölümünü kazandı. Buradaki 4 yıllık araştırma görevliliğinden sonra 1994 yılında Biyokimya uzmanı olarak mezun oldu. O yılın uzmanlık kurasına katılarak Niğde Devlet Hastanesine tayin oldu. Burada bir müddet uzman olarak çalıştı. 1997 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açtığı doktora sınavını kazanarak Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümünde doktora eğitimine başladı. Birisi TÜBİTAK NATO-B2 bursu ile olmak üzere 1997 ve 1998 yıllarında iki kez toplam 6 ay A.B.D.'ye giderek iki farklı konuda araştırmalar yaptı (Nebraska University Medical Center ve New York University Medical Center). Uluslar arası dergilerde basılmış ve basılmak üzere kabul edilmiş 60 adet, ulusal dergilerde ise 24 adet basılmış makalesi mevcuttur. Ulusal ve uluslar arası kongrelerde sözel ve poster olarak sunulmuş 80'in üzerinde bildirisi vardır.

Dr. Ömer Akyol ingilizce bilmektedir, evli ve 2 çocuk babasıdır.