T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OBSESİF KOMPULSİF BOZUKLUKTA SLC1A1 VE DLGAP1 GENLERİNİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ

EFRUZ İREM AKKUŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. MÜJGAN CENGİZ

II. DANIŞMAN
DOÇ. DR. BURCU BAYOĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her daim desteğini, ilgisini ve sevgisini hissettiğim, deneyim ve tecrübeleriyle yol gösterici, kendisi ile birlikte çalışabilme fırsatı yakaladığım için mutluluk duyduğum ve üzerimdeki emeklerine minnettar olduğum çok kıymetli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Müjgan CENGİZ'e, yüksek lisansım boyunca her konuda ilgisini ve desteğini gördüğüm, ihtiyacım olduğunda yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle eğitimime pek çok katkısı olan ikinci danışmanım değerli Sn. Doç. Dr. Burcu BAYOĞLU'na ve tez çalışmalarım boyunca her zaman desteğini ve ilgisini gösteren Anabilim Dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e;

Bu tez çalışmasını mümkün kılan, çalışmalarım boyunca her türlü ilgi ve bilgisini benimle paylaşan, örnek materyallerinin toplanmasında ve değerlendirilmesinde emeğini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı öğretim üyesi çok kıymetli Sn. Prof. Dr. Neşe KOCABAŞOĞLU'na, ayrıca materyallerin toplanması süresince bana her anlamda yardımcı olan ve dostluklarını esirgemeyen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı poliklinik çalışanlarına;

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizlerini ve değerlendirmelerini yapmam konusunda bana yardımcı olan Sn. Prof. Dr. Ahmet DİRİCAN'a;

Yüksek lisans eğitimimde ve çalışmalarımda bana destek olan ve değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşmayı esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki tüm kıymetli hocalarıma;

Tez çalışmalarımda her zaman yanımda olan ve destek veren sevgili dostum Jansed Berfin YILDIZ başta olmak üzere, beni her zaman destekleyen, moral veren, en zor zamanlarımda da yanımda olacaklarından emin olduğum çok sevdiğim dostlarıma;

Son olarak, eğitim hayatım boyunca her daim yanımda olan, desteklerini ve sevgilerini mütemadiyen hissettiğim sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33857

İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ÖZET X
ABSTRACT ..... Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Obsesif Kompulsif Bozukluk 4
2.1.1. Tarihçe 4
2.1.2. OKB'nin Klinik Özellikleri 5
2.1.3. Epidemiyoloji 5
2.1.4. Etiyoloji 6
2.1.4.1. Obsesif Kompulsif Bozuklukta Biyolojik Modeller 6
2.2. Obsesif Kompulsif Bozukluk'ta Genetik Sistemler 9
2.2.1. Serotonerjik Sistem 9
2.2.2. Dopaminerjik Sistem 10
2.2.3. GABAerjik Sistem 10
2.2.4. Glutamaterjik Sistem 10
2.2.4.1. SLC1A1 Geni ve Polimorfizmleri 15
2.2.4.2. DLGAP1 Geni ve Polimorfizmleri 17
2.3. Moleküler Teknikler 18
2.3.1. Genomik DNA Eldesi 18
2.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 18
2.3.3. ELISA 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. Deney Gruplarının Seçimi 21
3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması ve Analiz Yöntemleri 21
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 22

3.4. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler 22
3.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 23
3.6. Moleküler Teknikler 23
3.6.1. Venöz Kanlardan DNA İzolasyonu 23
3.6.1.1. DNA Miktarının Ölçümü ve Saflık Tayini 25
3.6.2. Gerçek Zamanlı PZR Analizleri 25
3.6.2.1. SLC1A1 rs587777696 ve DLGAP1 rs11081062 Polimorfizmlerinin Belirlenmesi 27
3.6.3. SLC1A1 Proteini için ELISA Tayini 28
3.7. İstatiksel Analizler 30
4. BULGULAR 31
5. TARTIŞMA 36
KAYNAKLAR 40
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 53

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Gerçek Zamanlı PZR analizi LightCycler 1.5® Programı 26
Tablo 3-2: Gerçek Zamanlı PZR tepkimesi için hazırlanan solüsyon içeriği 27
Tablo 3-3: rs587777696 ve rs11081062 SNP'leri allellerinin Tm değerleri 28
Tablo 4-1: Deney gruplarındaki yaş verilerinin değerlendirilmesi 31
Tablo 4-2: Deney gruplarında cinsiyet dağılımı 31
Tablo 4-3: Hasta grubuna ait genel veriler 32
Tablo 4-4: Hasta grubundaki Y-BOCS değerlerinin dağılımı 32
Tablo 4-5: SLC1A1 rs587777696 (C/T) polimorfizminde allel dağılımları 33
Tablo 4-6: DLGAP rs11081062 (C/T) polimorfizminde allel dağılımları 33
Tablo 4-7: SLC1A1 proteininin ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi 35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: OKB etiyolojisinde orbitofrontal-subkortikal model 7

Şekil 2-2: Kortiko-striatal-talamo-kortikal devresi 8

Şekil 2-3: Glutamat taşıyıcısı EAAC1 transkripsiyonunu düzenleyen sinyal yolakları 11

Şekil 2-4: Glutamat nörotransmisyonu 13

Şekil 2-5: Glutamatın glutamin ve GABA'ya dönüşümü 14

Şekil 4-1: Hasta ve kontrol gruplarında SLC1A1 rs587777696 polimorfizminde CC allelinin Tm değerlerinin (°C) şematik gösterimi 33

Şekil 4-2: Hasta grubunda DLGAP1 rs11081062 polimorfizminde CC ve CT allellerinin Tm değerlerinin (°C) şematik gösterimi 34

Şekil 4-3: Hasta grubunda DLGAP1 rs11081062 polimorfizminde TT allelinin Tm değerinin (°C) şematik gösterimi 34

Şekil 4-4: Hasta ve kontrol gruplarında DLGAP1 rs11081062 polimorfizminde CC, CT ve TT allellerinin Tm değerlerinin (°C) gösterimi 35

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-HTTLPR	SLC6A4 geninin promotör bölgesindeki varyant
ACC	Anterior singulat korteks
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPA	Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
BOS	Beyin omurilik sıvısı
C	Sitozin
COMT	Katekol-O-metiltransferaz
CSCT	Kortiko-striatal-talamo-kortikal devre
Cys	Sistin
dk.	Dakika
DLGAP1	DLG ilişkili protein 1
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DRD4-3	Dopamin reseptör D4-3
DSM	Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
EAAC1	Glutamat taşıyıcısı 1 (SLC1A1)
EAAT1-5	Uyarıcı aminoasit taşıyıcısı 1-5
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi
GABA	Gama aminobütirik asit
GABBR1	GABA tip B reseptör 1
GAD	Glutamik asit dekarboksilaz
GAT	Glutamik asit taşıyıcısı
GKAP	Guanilat kinaz ilişkili proteini
Gln	Glutamin
Glx	Glutamat konsantrasyonu
Gly	Glisin
GlyT	Glisin taşıyıcısı
GPe	Globus pallidus eksterna
GPi/SNr	Globus pallidus interna/substantia nigra pars retikulata kompleksi

GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HCl	Hidroklorik asit
HRP	Horseradish (yaban turpu) peroksidazı
LTP	Nöronal etkileşimin uzun vadeli potensiyasyonu
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
mGluR	Metabotropik glutamat reseptörleri
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	Mesajcı ribo nükleik asit
MRS	Manyetik rezonans spektroskopisi
MSS	Merkezi sinir sistemi
NMDA	İyonotropik N metil-D-aspartat
OFC	Orbitofrontal korteks
OKB	Obsesif Kompulsif Bozukluk
PSD	Postsinaptik yoğunluk
PSD95	Postsinaptik yoğunluk proteini 95
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SAPAP1	SAP90/PSD95 ilişkili protein 1 (DLGAP1)
SHANK	SH3 ve çoklu ankirin tekrar alanı proteini
SLC1A1	Solut taşıyıcı aile 1 üye 1
SLC6A3	Solut taşıyıcı aile 6 üye 3
SLC6A4	Solut taşıyıcı aile 6 üye 4
sn.	Saniye
SNARE	Çözünür N-etilmaleimide duyarlı füzyon proteini
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
SRI	Serotonin geri alım inhibitörü
T	Timin
TCA	Trikarboksilik asit
Tm	Erime sıcaklığı
vGluT1-3	Veziküler glutamat taşıyıcıları 1-3
VNTR	Değişken sayıda tandem tekrar mutasyonu
XC-	Sistin-glutamat antiportu
Y-BOCS	Yale-Brown Obsesif Kompulsif Ölçeği

ÖZET

Akkuş, E.İ. (2021). Obsesif Kompulsif Bozuklukta SLC1A1 ve DLGAP1 Genlerinin Rolünün İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Obsesif kompulsif bozukluk (OKB), hastada tekrar eden takıntılı düşüncelerin (obsesyonlar) ve zorlantılı davranışların (kompulsiyonlar) meydana geldiği nöropsikiyatrik bir hastalıktır. Glutamat, beynin bilişsel ve fizyolojik süreçlerinde oldukça önemli rol oynayan bir nörotransmitterdir. Glutamat reseptörleri, alışkanlıklar dahil beyindeki çoğu öğrenme biçimi için kritik öneme sahiptir. Yapılan çalışmalar, glutamaterjik sistem genetiğine ait SLC1A1 ve DLGAP1 genlerinin, OKB oluşumunda etkili olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle çalışmamızda, SLC1A1 ve DLGAP1 genlerinin OKB oluşumundaki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilerin, glutamat nörotransmisyonunun OKB etiyolojisindeki öneminin belirlenmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, OKB ile ilişkili aday genler arasında yer alan SLC1A1 (rs587777696) ve DLGAP1 (rs11081062) genlerinde Gerçek Zamanlı PZR tekniği kullanılarak tek nükleotid polimorfizmi (SNP) analizi yapılmıştır. Ayrıca SLC1A1 geninin protein miktarlarının belirlenmesi için ELISA yapılmıştır. Çalışma grupları, OKB tanısı konmuş 70 hastadan ve 70 sağlıklı kontrolden oluşmaktadır. Hasta grubunda hastalığın şiddeti Yale-Brown Obsesif Kompulsif Ölçeği (Y-BOCS) ile belirlenmiştir. Elde edilen verilerin analizi sonucunda, SLC1A1 rs587777696 (C/T) SNP'si hasta ve kontroller arasında karşılaştırılmış ve allel frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. DLGAP1 rs11081062 (C/T) SNP'sinin allel frekanslarının gruplardaki dağılımı arasında anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,0004). SLC1A1 geni ELISA sonuçları hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,005). Çalışmamız, Türk popülasyonunda SLC1A1 ve DLGAP1 genlerindeki polimorfizmlerinin incelendiği ilk çalışmadır. Araştırmamız sonucunda DLGAP1 rs11081062 polimorfizminin OKB ile ilişkili olduğu ve SLC1A1 geni protein miktarlarının, OKB hastalarında daha düşük

konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır. Sonuç olarak glutamat nörotransmisyonunun OKB'nin etiyolojisinde etkisi olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: OKB, SLC1A1, DLGAP1, polimorfizm, ELISA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33857

ABSTRACT

Akkus, E.I. (2021). Investigation of the Role of SLC1A1 and DLGAP1 Genes in Obsessive Compulsive Disorder. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Masters Thesis. Istanbul.

Obsessive compulsive disorder (OCD) is a neuropsychiatric disease in with obsessive thoughts and compulsive behaviors. Studies have shown that SLC1A1 and DLGAP1 genes belonging to glutamatergic system genetics may be effective in the formation of OCD symptoms. For this reason, our study aimed to investigate the effect of SLC1A1 and DLGAP1 genes on OCD formation. It is believed that the data obtained as a result of the study will contribute to determining the importance of glutamate neurotransmission in OCD. In this thesis, single nucleotide polymorphisms (SNP) were analyzed by qPCR in SLC1A1 (rs587777696) and DLGAP1 (rs11081062) genes. The protein amount of SLC1A1 gene was determined by ELISA. The study groups consisted of 70 patients and 70 controls. The severity of the disease in the patient group was determined by the Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale. As a result of the analysis of the data obtained, SLC1A1 rs587777696 SNP was compared between patients and controls, and no significant difference was found between allele frequencies. A significant difference was found between allele frequencies of DLGAP1 rs11081062 SNP in groups ($p=0.0004$). ELISA results of the SLC1A1 gene were compared in patients and control groups and a significant difference was found ($p=0.005$). Our study is the first study investigating polymorphisms in SLC1A1 and DLGAP1 genes in Turkish population. rs11081062 polymorphism was found to be associated with OCD and SLC1A1 gene protein amounts were found in lower concentrations in OCD patients. As a result, it has been seen that glutamate neurotransmission may be effective in OCD etiology.

Keywords: OCD, SLC1A1, DLGAP1, polymorphism, ELISA

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No: TYL-2019-33857

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Obsesif kompulsif bozukluk (OKB), Amerikan Psikiyatri Birliği'nin hazırladığı Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı'na (DSM-V) göre, kişinin sosyal veya mesleki işleyişinde aksamalara neden olan, ısrarcı ve müdahaleci takıntılı düşünceler (obsesyonlar) ve tekrarlayan, zorlantılı davranışlar (kompulsiyonlar) ile karakterize edilen psikiyatrik bir durumdur (1). Yapılan çalışmalar, OKB gelişiminin, genetik ve çevresel faktörler de dahil olmak üzere biyolojik ve sosyolojik faktörlerin etkileşiminden kaynaklandığını ortaya koymaktadır (2). OKB'nin biyolojik temelleri, yapılan genetik çalışmalar ile açıklanmaya devam etmektedir (3, 4). Parkinson hastalığı, Tourette bozukluğu, şizofreni, epilepsi, travma veya iskemi gibi birçok tıbbi durumda obsesyonların ve kompulsiyonların yaygın olarak görülmesi, OKB'nin gen düzeyindeki bozukluklar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (5). Ayrıca OKB'li hastaların obsesyonları ve kompulsiyonları tetikleyen belirli uyaranlara maruz bırakılması sonucu belirli beyin bölgelerindeki metabolik aktivite değişiminin fonksiyonel görüntüleme çalışmalarıyla ortaya çıkarılması, OKB'nin biyolojik temellerine ışık tutmaktadır (3).

OKB'nin etiyolojisi, bilimsel ve klinik çalışmalar sonucu elde edilen sonuçlar ile aydınlatılmaya devam edilmektedir (2, 3). Moleküler genetik çalışmalarıyla, belirli genlerin OKB patogenezinde rol alabileceğine dair bulgular literatüre geçmiştir (4). Elde edilen bulgular, OKB'de obsesif ve kompulsif semptomlarının gelişme riskinin çok sayıda genin iş birliği ile şekillendiğini göstermektedir (2, 4).

Nöronal genetik sistemlerdeki bozuklukların araştırılması ile OKB'nin de nörobiyolojisi belirginleşmeye başlamıştır (5). Bugüne kadar, OKB'nin altında yatan mekanizmalarla ilgili yapılan araştırmalarda bulunan en yaygın bulgular serotonin sisteminde meydana gelen fonksiyonel bozukluklar ile ilgilidir (6). OKB hastalarının çoğunun serotonin geri alım inhibitörlerinin (SRI) tedavisine olumlu yanıt vermesinden dolayı OKB patogenezinde rol oynayan ana nörotransmitter olarak serotonine odaklanılmıştır (7). Bununla birlikte, OKB hastalarının yaklaşık %50'si SRI'lara yetersiz bir yanıt göstermektedir ve serotonin sisteminin fonksiyonel anormalliği OKB hastalarında her zaman gözlenmemektedir (8, 9). Bu nedenle OKB'nin oluşum mekanizmasının altında yatabilecek diğer genetik sistemler üzerine çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Yapılan araştırmalar, glutamat nörotransmisyonundaki değişikliklerin OKB patofizyolojisiyle ilgili olduğunu göstermiştir (10, 11). Pediatrik OKB hastalarında

yürütülen bir nörogörüntüleme çalışması, hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anterior singulatta glutamaterjik seviyelerin daha düşük ve kaudatta daha yüksek olduğunu ve SRI ile tedaviyi takiben kaudattaki glutamaterjik seviyelerinin kontrol seviyelerine düştüğünü bildirmiştir (11). Böylelikle OKB patogenezinde rol alan diğer bir nörotransmitterin glutamat olabileceği görülmüş ve yapılan çalışmalarda glutamaterjik sistem genlerine odaklanılmaya başlanmıştır.

Glutamaterjik sistemi genleri arasında bulunan glutamat taşıyıcı geni SLC1A1 ve nöronal postsinaptik yoğunluk kompleksinin bir üyesi olan DLGAP1, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ve meta analiz araştırmaları sonucunda, OKB ile ilişkili aday genler olarak bildirilmiştir (2, 12).

SLC1A1, postsinaptik glutamat taşıyıcısıdır ve OKB patogenezinde rol alabileceğine dair araştırmalar yapılmıştır (12, 13). Bugüne kadar, çeşitli hastalıklarda ve OKB'de SLC1A1 tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) araştırılmış ve oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir (14, 15). OKB üzerine yürütülen GWAS ve bağlantı analizleri sonucunda, erken başlangıçlı OKB'de, SLC1A1'in bulunduğu 9p24 kromozom bölgesinin OKB için bir duyarlılık geni içerebileceğine dair sonuçlar bulunmuştur (12, 15). Birçok OKB çalışmasında SLC1A1 genindeki SNP'ler araştırılmış ve SLC1A1 ve OKB arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (16-18).

Glutamaterjik sisteme ait diğer bir gen olan DLGAP1'in de glutamat fonksiyonunu etkilediği bilinmektedir (19). Kromozom 18p11.31 üzerinde bulunan DLGAP1, postsinaptik yoğunluk proteini 95 (PSD-95) ile etkileşime giren bir postsinaptik iskele proteinini kodlamaktadır (20). Bu etkileşimin OKB'deki sinaptik plastisite ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (20). Yapılan genetik çalışmalarda, DLGAP1 geninde meydana gelen SNP'lerin, OKB ile ilişkili olduğu bulunmuştur (12, 21). DLGAP1 geninin OKB için güçlü bir aday gen olabileceğinin bildirilmiş olmasına karşın bu konuda yeterli araştırma bulunmamaktadır.

SLC1A1 ve DLGAP1 genleri üzerine yürütülen çalışmalar OKB'deki glutamaterjik sistem genetiğinin alt yapısının aydınlatılmasında yetersiz kalmakta ve daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Obsesif Kompulsif Bozukluk ile ilişkili aday genler arasında yer alan SLC1A1 ve DLGAP1 genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin, popülasyonumuzda incelenmesi ve bu genlerin hastalık açısından risk değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmaktadır. Ayrıca SLC1A1 geni protein miktarlarının belirlenerek OKB ile ilişkisinin açıklanması

hedeflenmektedir. Bunun için 70 kişilik hasta ve 70 kişilik sağlıklı kontrol grupları oluşturulmuştur. Gruplara gönüllü katılım sağlayan bireylerden venöz kan örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinden izole edilen DNA'lar ile Gerçek Zamanlı PZR tekniği kullanılarak SLC1A1 (rs587777696) ve DLGAP1 (rs11081062) genlerinde polimorfizm analizi yapılmıştır. SLC1A1 geni protein miktar tayini, alınan kanlardan elde edilen plazma örneklerinden ELISA yöntemi ile yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, popülasyonumuzdaki OKB olgularında, SLC1A1 ve DLGAP1 genlerinin OKB oluşumundaki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmalarımız sonucu elde ettiğimiz verilerin, OKB etiyolojisinde glutamaterjik sistem genetiğinin rolünün aydınlatılmasına ve OKB oluşumuna neden olabilecek biyobelirteçlerin tanımlanmasına katkıda bulunarak klinik düzeyde yararlar sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obsesif Kompulsif Bozukluk

Obsesif kompulsif bozukluk (OKB), hastada tekrar eden takıntılı düşünceler (obsesyonlar) ve bu düşüncelerin neden olduğu zorlantılı davranışlar (kompulsiyonlar) ile kendini gösteren kronik nöropsikiyatrik bir hastalıktır (22). OKB, Amerikan Psikiyatri Birliği'nin hazırladığı DSM-IV sınıflandırma sisteminde anksiyete bozuklukları grubuna dahil edilmiştir (23). Obsesyonlar ve kompulsiyonlar, DSM-IV'e göre OKB'nin tanımlayıcı özellikleridir (23). Obsesyonlar, istenmeyen, kişiye rahatsızlık vererek sıkıştıran düşünceler veya içgüdülerdir (22). Kompulsiyonlar, kişinin obsesyonlarına tepki olarak geliştirdiği, direnme arzusuyla beraber gerçekleştirmeye mecbur hissettiği tekrarlayan fiziksel veya bilişsel davranışlardır (22). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, OKB, dünya çapında en engelli on tıbbi durumdan biridir ve en sık görülen zihinsel bozukluklar arasında beşinci sırada yer almaktadır (24).

2.1.1. Tarihçe

1850'lere kadar, obsesif-kompulsif davranışlar diğer ruhsal ve mental bozukluklardan ayırt edilememiştir (25). 19. yüzyılda yaşamış Fransız klinisyenleri, OKB vakalarında şüphe duymanın ve kararsızlığın merkezi bir rolü olduğunu vurgulamışlardır (25). Benedict Morel, obsesyon terimini ilk kez 1860 yılında kullanarak psikiyatri literatürüne kazandırmıştır. (26). OKB hastalığına ilişkin en eski tanımlamalar bugün "titizlik" olarak adlandırılan olguya karşılık gelmektedir (27). 1877 yılında Almanya'da, takıntıları sanrılardan ayıran ilk kişi Westfalen olmuştur (28). Freud, 1894'te "obsesyonel nevroz" terimini tanıtarak yine takıntıların sanrılardan farklı bir durum olduğunu belirtmiştir (29). Daha sonra 1902'de Pierre Janet ve çalışma arkadaşları, obsesif-kompulsif semptomların oluşumunun altında irade kaybının ve düşük zihinsel enerjinin (psikasteni) yattığını savunmuşlardır (25). 20. yüzyılın başlarında ise OKB'nin altında yatan nedenler hakkında psikanalitik teoriler üzerinde durulmuştur (30). Psikanalitik teori, kişide oluşan saplantılı düşüncelerin temelinde, psikoseksüel gelişimin erken evrelerinde meydana gelen algısal problemlerin sonuca ulaşmaması ve bireyin bu problemlere karşı gösterdiği iç çatışmaların olduğunu vurgulamaktadır (31). Psikanalitik tedavi, OKB'de çocukluk döneminde meydana gelen travmaların açığa çıkarılması ve çözümlenmesine odaklanmıştır (31). Davranışsal ve farmakolojik tedavi yöntemlerinin

geliştirilmesi ile 20. yüzyılın son çeyreğinde psikanalitik tedavi yöntemi etkisini kaybetmiştir (32).

2.1.2. OKB'nin Klinik Özellikleri

DSM-V tanı kriterlerinde belirtildiği üzere OKB tanısının koyulabilmesi için semptomların kişiye rahatsızlık vermesi, obsesyonların ve kompulsiyonların gün içerisinde bir saatten fazla zaman alması ve bunların bireyin sosyal ve mesleki işleyişini bozması gerekmektedir (1).

Obsesyonlar, bireyde müdahaleci düşünceler olarak deneyimlenir ve onları başka düşüncelerle veya eylemlerle yok saymak, bastırmak, etkisiz hale getirmek için bazı girişimlerde bulunulur (31). Kompulsiyonlar, kişinin bir takıntıya tepki olarak geliştirdiği, yaşadığı sıkıntıyı önlemek veya azaltmak için kendince tasarladığı ve yapmak zorunda hissettiği tekrarlayan davranışlardır (22). Çoğu zaman kompulsiyonlar gözlemlenebilir olmamaktadır ve kişinin zihinsel olarak gerçekleştirdiği rutinler olarak ortaya çıkabilmektedir (33). En yaygın görülen obsesyon türleri bulaşma (kontaminasyon), kuşku, saldırganlık, cinsellik, dini ve simetri-düzen obsesyonlarıdır (31). En yaygın görülen kompulsiyon türleri ise yıkama-temizleme, kontrol etme, düzenleme, sayma ve istifleme kompulsiyonlarıdır (31).

2.1.3. Epidemiyoloji

Epidemiyolojik çalışmalar OKB'nin yaşam boyu yaygınlığının %1,9 ile %3 arasında olduğunu göstermektedir (31). OKB'nin tipik başlangıç dönemi genellikle erken yetişkinlik döneminde olup, vakaların yaklaşık %50'si çocukluk veya ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır (34). Erkekler, kadınlara göre daha erken bir başlangıç yaşına sahip olma eğilimindedir, ancak yetişkinlikte, kadınlar küçük bir farkla erkekleri geride bırakmaktadır (35, 36).

Yirminci yüzyılın başlarından beri, klinisyenler kalıtımın OKB duyarlılığında önemli bir rol oynadığından şüphelenmektedirler (12). Bunu destekleyici türden bir aile çalışmasında, kontrol gruplarının akrabalarına (%2,7) kıyasla, vaka probandlarının birinci derece akrabalarında (%11,7) OKB prevalansının arttığı tespit edilmiştir (37). Aynı çalışma, erken başlangıçlı probandların kardeşlerinde OKB prevalans değerinin %17,9 olduğunu göstermiştir (37).

Çocuk ve ergen OKB araştırmaları ile ilgili bir aile çalışması, birinci derece akrabalarda %7 ila %15 yaygınlık oranlarını bildirmektedir ve bu probandların %20-30'unda OKB'si olan bir veya daha fazla birinci derece akraba varlığından söz etmektedir (38).

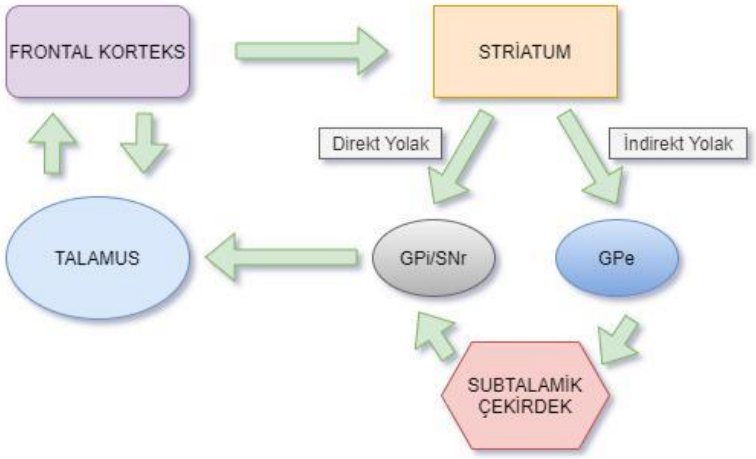
Tedavi edilmezse, OKB genellikle kroniktir (39). OKB hastalarının sadece %5 ila %10'unda kendiliğinden iyileşme görülmekte, yine %5 ila %10 oranında hastada semptomlar giderek kötüleşmektedir (34, 36). Çocukluktaki bazı vakalar epizodik bir seyir izleyebilmektedir (39).

2.1.4. Etiyoloji

OKB'nin biyolojik temelini açıklığa kavuşturmak için tek gen çalışmaları ve çeşitli meta analizler yapılmaktadır ancak bu çalışmalar bozukluğun etiyolojisine genel bir bakış sunamamaktadır (2). Çünkü diğer mental bozukluklar gibi OKB de çok faktörlü bir bozukluktur (22). Son yirmi yılda gelişen gen dizilemeleri araştırmaları, mutasyon çalışmaları, gen-gen, gen-çevre ve gen-ilaç etkileşimleri üzerine yapılan çalışmalar OKB ile ilişkili yüzlerce genin keşfedilmesine katkıda bulunmuştur (40). OKB gelişimi, serotonerjik, dopaminerjik, glutamaterjik ve GABAerjik gibi nörotransmitter sistemlerine ait birçok gende meydana gelen bozulmalar sonucu oluşabilmektedir (2, 11, 29). OKB'de yapılan iki farklı genom düzeyinde bağlantı analizi sonucunda, 9p24 ve 1p36 kromozom bölgelerinde, OKB gelişme riski ile ilgili önemli bağlantılar bulunmuştur (15, 21, 41, 42). Ayrıca başka bir genetik çalışmada, 3q27-28, 6q, 7p, 1q ve 15q kromozom bölgelerinde OKB ile ilişkili genetik bağlantıların bulunduğu belirtilmiştir (12). Kalıtım oranının çocuklarda %45-65 ve yetişkinlerde %27-45 kadar yüksek olduğu bildirilmektedir (43).

2.1.4.1. Obsesif Kompulsif Bozuklukta Biyolojik Modeller

OKB'nin önde gelen biyolojik modellerinden biri, prefrontal korteksi, striatum ve globus pallidus gibi bazal gangliyon bölgelerini ve talamusu içeren, OKB'de beyin devrelerinin anormal modülasyonunun rolünü vurgulayan orbitofrontal-subkortikal modeldir. Anormal modülasyon, bu devrede görev alan nörotransmitterlerdeki (serotonin, glutamat, dopamin veya GABA) yapısal anormallikler veya düzensizlikler nedeniyle oluşabilmektedir (43).

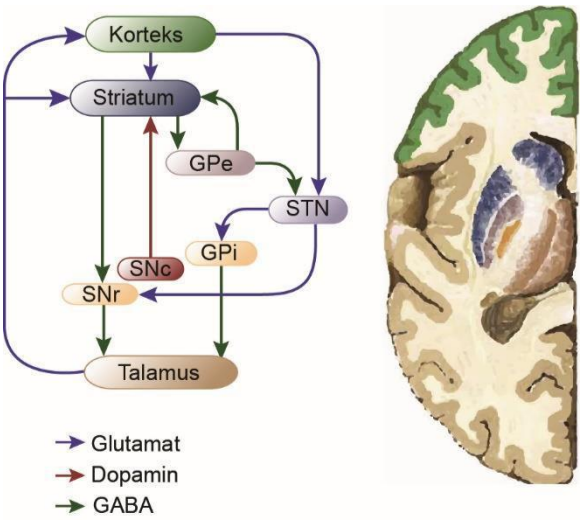


Şekil 2-1: OKB etiyolojisinde orbitofrontal-subkortikal model (44)

Orbitorontal-subkortikal devre, striatuma uzantı yapan frontal korteksten köken almaktadır (45). Fonksiyonel nörogörüntüleme çalışmaları sonucunda, OKB'nin patofizyolojisi için orbitofrontal-subkortikal devrede işlev bozukluğuna işaret eden bu model, her ikisi de frontal korteksten kaynaklanan ve striatuma uzanan bir doğrudan ve bir dolaylı yolaktan oluşmaktadır (Şekil 2-1) (44, 45). Doğrudan yolak, striatumdan globus pallidus interna/substantia nigra pars retikulata (GPi/SNr) kompleksine uzanır (bazal gangliyonun birincil çıkış konumu), bu uzantılar daha sonra kortikal bölgeyle karşılıklı uyarıcı uzantıları olan talamusa çıkıntı yapar ve oradan da kortekse geri döner (44). Bu yolak, talamik sistemi aktive ederek karmaşık motor fonksiyonlarını kolaylaştırmaktadır (45). Dolaylı yolak da frontal korteksten kaynaklanır ve striatuma uzanır, ancak talamusa dönmeden önce globus pallidus eksternaya (GPe), sonra subtalamik çekirdeğe, ardından GPi/SNr'ye uzanır ve son olarak frontal kortekse geri döner (44). Bu yolak ise talamusun aktivasyonunu inhibe ederek karmaşık motor programlarını baskılamaktadır (45). Bu yolaklar sağlıklı bireylerde birbirini dengelemektedir, ancak OKB hastalarında doğrudan yolağın aktivitesinde bir artış gözlenmektedir (44). Ayrıca bu yolaklardaki iletim bozukluklarının orbitofrontal korteks, ventromedial kaudat ve medial dorsal talamusta aktivite artışına yol açtığı ve bunun sonucunda da obsesyonların ve kompulsiyonların meydana geldiği bildirilmiştir (44).

OKB'nin etiyolojisinde en çok kabul gören patogenez modeli, glutamat ve gama aminobütirik asit (GABA) tarafından sıkı bir şekilde düzenlenen kortiko-striatal-talamo-kortikal (CSTC) devreleridir (46). Morfolojik ve fonksiyonel nörogörüntüleme çalışmalarıyla, kortiko-striatal-talamo-kortikal döngüsünde meydana gelen fonksiyon kaybının, yapısal, kimyasal ve işlevsel anormalliklerin, OKB semptomlarının oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir (47, 48).

OKB gelişiminde rol oynayan iki CSTC devresi tanımlanmıştır (49). Bu CSTC devrelerinden biri orbitofrontal korteksi (OFC), diğeri ise anterior singulat korteksi (ACC) içermektedir (50, 51). Yapısal manyetik rezonans görüntüleme (MRI) çalışmaları, CSTC döngüsünün yapısında (OFC, ACC, talamus ve striatumda) OKB vakaları ve kontroller arasında hacimsel farklılıklar ortaya çıkarmıştır (11, 52).



Şekil 2-2: Kortiko-striatal-talamo-kortikal devresi (54, 75)

CSTC döngüsü, striatal alt çekirdekler üzerine uzanan glutamaterjik piramidal kortikal nöronlardan oluşur (53, 54). Buradan glutamaterjik ve GABAerjik nöronlar hem doğrudan hem de dolaylı yoldan bazal gangliyona ve talamusa uzanır yapar (Şekil 2-2) (54). Daha sonra talamus, tekrarlayan nöronal uyarımı sırasıyla kortikal alanlara geri gönderir (Şekil 2-2) (54). Alışılmış ve hedefe yönelik davranışları düzenlemek için CSTC döngüsünün işlevini normal bir şekilde yerine getirmesi gereklidir (53). Bu devrelerde uyarıcı (korteks, talamus) ve inhibe edici (bazal gangliya) bölgeler arasında homeostazın olması asemptomatik iken, devrede meydana gelen aşırı aktivite OKB semptomlarını meydana getirmektedir (55). Bir görüntüleme çalışmasında, OKB'de tedavi yanıtı ile

OFC aşırı aktivitesinin normalleştiği bildirilmiştir (56). Yapılan bir hayvan çalışması, OFC ve ACC'nin iki bağımsız karar verme ağını desteklediğini, özellikle ödül temelli davranışlara ne kadar çaba sarf edildiğini (ACC) ve ödül temelli davranışta bulunmak için ne kadar beklendiğini (OFC) ortaya çıkarmıştır (57). Bu devrede meydana gelecek bir eksikliğin, OKB'de şüphe duyma ve karar verme mekanizmasını etkileyebileceği bildirilmiştir (57, 58).

Glutamat, CSTC devresindeki birincil nörotransmitterdir ve striatumdaki akson terminallerinin çoğunluğu glutamaterjiktir (59). Kortiko-striatal-talamo-kortikal devrede glutamaterjik iletimin bozulması, OKB patogenezinde rol oynayabilmektedir (10, 60). Glutamaterjik sinyalleme, OFC, ACC ve striatal yapılar (kaudat, putamen) arasındaki nörotransmisyonu düzenler (46). CSTC devrelerinde glutamat ve diğer ilgili moleküllerin düzeylerini araştırmak için manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) kullanılmış ve OKB'li hastalarda glutamat düzensizliğine dair bazı bulgular bildirilmiştir (11). Rosenberg ve arkadaşları, CSTC döngüsündeki doğrudan yolun aşırı aktivitesi ile ilişkili olan glutamaterjik hiperaktivitenin, OKB gelişiminin altında yatabileceğini öne sürmüşlerdir (11). OKB hastalarında yapılan bu çalışmada, ilaç durumundan bağımsız olarak kaudatta daha yüksek glutamaterjik konsantrasyonları (Glx) ve ACC'de daha düşük Glx konsantrasyonlarını ortaya çıkarmıştır (11).

2.2. Obsesif Kompulsif Bozukluk'ta Genetik Sistemler

OKB üzerine yürütülen aday gen çalışmaları sonucunda, bugüne dek dört farklı nörotransmitter sistemi OKB ile ilişkilendirilmiştir (2). Bu nörotransmitterler serotonin, dopamin, GABA ve glutamattır. Aşağıda serotonerjik, dopaminerjik, GABAerjik ve glutamaterjik sistemlerinin genlerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmlerinin, OKB duyarlılığı açısından incelendiği çalışmaların bulgularına değinilmiştir.

2.2.1. Serotonerjik Sistem

OKB patogenezinde önemli bir rol alan serotonerjik sistem üyelerinden en çok dikkat çeken gen, serotonin taşıyıcı proteini kodlayan SLC6A4 geni olmuştur (61). OKB üzerine yürütülen bir araştırmada, SLC6A4 geninin ikinci intronunda değişken sayıda tandem tekrar (VNTR) polimorfizmi ile bir ilişki tespit edilmiştir (62). SLC6A4 genindeki SNP rs16965628 GG/GC'nin genotiplerinin araştırılması sonucu, bu

polimorfizmin OKB gelişimi için risk faktörü olduğu bulunmuştur (63). OKB'de en sık incelenen bir diğer varyant, 5-HTTLPR olarak bilinen SLC6A4 geninin promotör bölgesindeki varyasyondur (64). Bu bölge, tekrar elementlerinin sayısına bağlı olarak kısa (S) veya uzun (L) allel olarak bulunmaktadır ve L alleli içinde A'dan G'ye tek nükleotid polimorfizminin, OKB'de duyarlılık taşıdığı bildirilmiştir (64).

2.2.2. Dopaminerjik Sistem

Genetik çalışmaların diğer bir kısmı dopaminerjik sistem genlerinin önemini vurgulamaktadır. OKB ile ilişkilendirilmiş DRD4 genindeki 2R allelinin, OKB'de simetri semptomuna neden olduğu bulunmuştur (65, 66). SLC6A3 ve DRD3 genleri üzerine yapılan çalışmalar, bu genlerin erken başlangıçlı OKB ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (67). OKB'de özellikle erkek probandlarında COMT (katekol-O-metiltransferaz) enzimi ve geni için ilişkili varyantlar tespit edilmiştir (68). Cinsel ve dini takıntıların BDNF (beyin-türevli nörotrofik faktör) V66M66 varyantı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (69).

2.2.3. GABAerjik Sistem

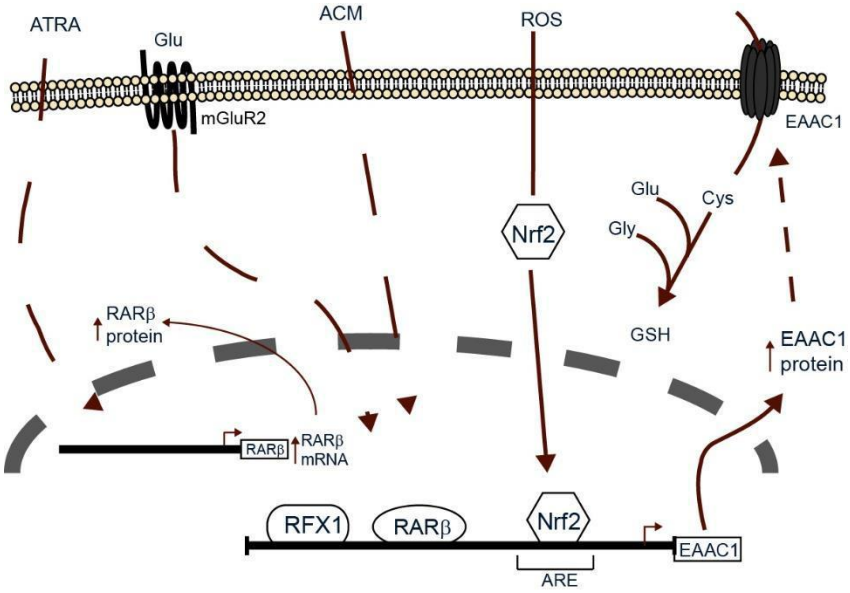
OKB ile ilişkisi açısından GABAerjik genetik sistemi genlerine, diğer nörotransmitterlere kıyasla daha az odaklanıldığını söylemek mümkündür. Buna rağmen çalışılan genlerde önemli bir ilişki gözlenmektedir. GABA tip B reseptör 1 (GABBR1) geninin A-7265G polimorfizminde OKB açısından pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (70). GABBR1 geninin, normal işleyen bir CSTC devresinde, frontal korteksten gelen glutamaterjik sinyallerinin alınarak striatumda uyarıma yol açılmasını sağladığı ve globus pallidus interna (GPi) ve substantia nigra (SNr) için inhibe edici GABA sinyallerini arttırdığı bilinmektedir (71).

2.2.4. Glutamaterjik Sistem

Glutamat, beyindeki en önemli uyarıcı nörotransmitterlerden biridir (7). Glutamat aynı zamanda glutamin, antioksidan molekülü glutatyon ve beyindeki başlıca inhibe edici nörotransmitter olan gama aminobütirik asit (GABA) için bir öncül moleküldür (72). Glutamat merkezi sinir sisteminde (MSS) ve beyin omurilik sıvısında (BOS) yüksek konsantrasyonlarda (yaklaşık 8-10 mmol/kg) bulunmaktadır (73). Glutamaterjik sistem

nöronları, MSS'de yer alan intrakortikal bağlantılar, kortikal-subkortikal bağlantılar ve bazal gangliya, serebellum, talamus ve beyin sapı devreleri gibi pek çok devrede görev almaktadır (74).

Glutamat reseptörleri, iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki tiptedir. İyonotropik glutamat reseptörleri (AMPA, kainat ve NMDA), glutamatın bağlanmasıyla açılan böylece postsinaptik hücreyi elektriksel olarak uyaran katyon kanallarıdır (Şekil 2-3) (46). Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR), doğrudan iyon kanallarını açmak yerine, nöronal işlevi düzenleyen çeşitli hücre içi sinyal yolaklarına bağlanmaktadırlar (Şekil 2-3) (75). Glutamat hem iyonotropik reseptörlere hem de metabotropik reseptörlere postsinaptik, ekstrasinaptik ve presinaptik olarak bağlanmaktadır (75).



Şekil 2-3: Glutamat taşıyıcısı EAAC1 transkripsiyonunu düzenleyen sinyal yolakları (46, 75)

Birçok postsinaptik glutamat reseptörü, OKB'nin hayvan modellerinde çalışılmış olan postsinaptik yoğunluk (PSD) olarak bilinen yapısal proteinlerin matriksine gömülü bir şekilde bulunmaktadır (19). Glutamat reseptör aktivitesi, fosforilasyon gibi postsinaptik modifikasyonlarla düzenlenebilmektedir (75, 76).

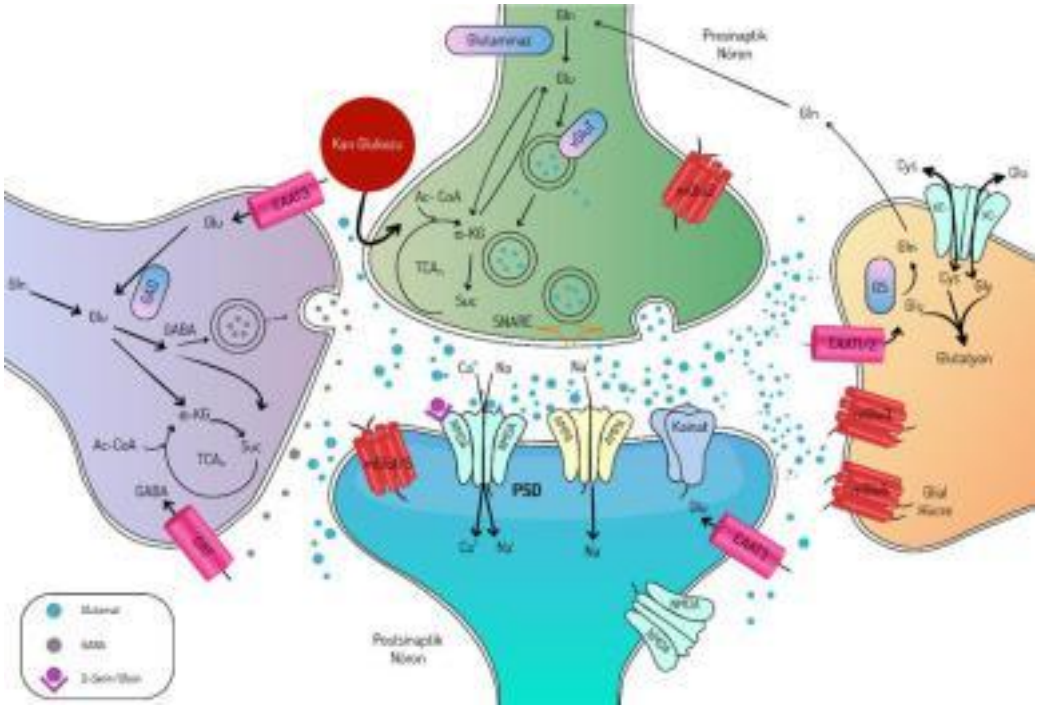
Glutamat, biliş, hafıza ve öğrenme gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır (46). Glutamat reseptörleri, alışkanlıklar dahil olmak üzere beyindeki hemen hemen her öğrenme biçimi için kritik öneme sahip sinaptik plastisite formu olan, nöronal etkileşimin uzun vadeli potensiyasyonu (LTP) sürecinde görev almaktadır (77).

Glutamat ayrıca bir immünomodülatördür ve yüzey mGluR-1 reseptörleri aracılığıyla T hücre fonksiyonunun önemli bir düzenleyicisidir (52). Rotge ve arkadaşları T hücrelerinin spesifik antijenler tarafından aktivasyonunun OKB'de sitokin üretimini artırabileceğine dair bulgularını bildirmişlerdir (52).

İyonotropik N metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünün NR2B alt birimindeki polimorfizmler ile OKB oluşma riski arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür (75). Bu heterotetramerik reseptörün aktivasyonu için glutamatın reseptöre bağlanması ve reseptörün bulunduğu postsinaptik hücrenin eşzamanlı depolarizasyonunun sağlanması gereklidir (75). Yalnızca presinaptik ve postsinaptik nöronlar eşzamanlı olarak etkinleştirildiğinde NMDA reseptörü aktive edilmektedir (78). Postsinaptik NMDA reseptörlerinin aktivasyonu bilginin sinaptik aktarımını ve sinaptik plastisiteyi sağlarken, ekstrasinaptik NMDA reseptörlerinin aktivasyonu bu süreçleri engellemekte ve eksitotoksisiteye (nöronal hasara ve ölümüne) yol açabilmektedir (78). Gerçekten de aşırı miktarlardaki glutamatın, eksitotoksisite olarak bilinen nöron ölümüne yol açtığı bilinmektedir (79). Bu nedenle glutamat konsantrasyonu, nöronlara ek olarak astrositler ve diğer glial hücreler üzerindeki glutamat taşıyıcıları aracılığıyla sıkı bir şekilde düzenlenir (73). Ana düzenleme, glutamatı perisinaptik ve ekstrasinaptik boşluklardan verimli bir şekilde uzaklaştıran yüksek afiniteli glutamat taşıyıcıları yoluyla yapılmaktadır (73). Uyarıcı amino asit taşıyıcıları (EAAT), glutamat konsantrasyonun ve dönüşümünün sıkı bir şekilde düzenlenmesinden sorumludur (75). Bu taşıyıcıları kodlayan EAAT3/EAAC1 (SLC1A1) geninde meydana gelen polimorfizmler OKB ile ilişkilendirilmiştir (19, 75).

Glutamat taşıyıcıları, beyinde uyarıcı glutamat nörotransmisyonunun sonlandırılmasında, ekstrasinaptik glutamat seviyelerinin düzenlenmesinde, ekstrasinaptik nörotransmitter reseptörlerinin aktivasyonunda ve eksitotoksisitenin sınırlandırılmasında kritik bir rol oynamaktadır (73). Na^+ bağımlı glutamat taşıyıcıları (EAAT 1-5) ve veziküler glutamat taşıyıcıları (vGluT 1-3), glutamatın glial ve nöronal hücrelere geri alımına aracılık ederek sinaptik yarıktaki etkisinin sonlandırılmasında görev almaktadırlar (80). EAAT1 ve EAAT2, birincil astrosit glutamat taşıyıcılarıdır, EAAT3 ise birincil nöronal glutamat taşıyıcısıdır (81). Glutamaterjik nöronların sinaptik uçları vGluT tarafından akson terminallerinde veziküller halinde paketlenmiştir (Şekil 2-
4) ve aksonları MSS içindeki uzak bölgelere uzanabilmektedir (74). Glutamaterjik nöronlar, hücre yüzeyinde aksiyon potansiyeli oluşturduğunda, glutamat içeren veziküller

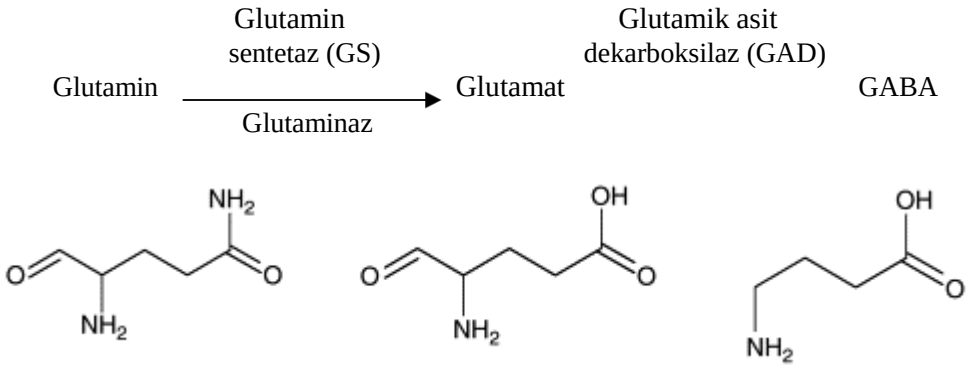
presinaptik membran ile birleşerek içeriklerini sinaptik yarığa bırakır ve glutamat, postsinaptik reseptörlere bağlanacağı sinaptik yarık boyunca hızla yayılır (74). Bu nöronlar aynı zamanda, daha fazla glutamat salınımını sınırlandırmak için negatif geri bildirim sağlayabilen presinaptik reseptörlere bağlanır (74).



Şekil 2-4: Glutamat nörotransmisyonu (75)

Akson terminalinde aksiyon potansiyelinin başlatılması üzerine vezikül füzyonu ve glutamat salınımı, SNARE proteinleri aracılığıyla kalsiyuma bağlı bir mekanizma yoluyla gerçekleştirilir (Şekil 2-4) (75). Sinaptik yarığa salınan glutamat, hem postsinaptik reseptörlere (NMDA) hem de presinaptik reseptörlere bağlanır ve EAAT glutamat taşıyıcıları tarafından hücre içine alınır (75).

Glial hücreler, esas olarak astrositler, glutamatın sinaptik sinyalini sonlandırmada ve glutamat geri alımında önemli bir rol oynamaktadırlar (75). Glutamat, glial hücrelere EAAT1 ve EAAT2 taşıyıcıları aracılığıyla ve sistin/glutamat antiportundan (XC−) girer (Şekil 2-4) (76). Hücre içine alınan glutamatın bir kısmı beynin temel antioksidanı olan glutatyona dönüştürülür. Bu dönüşüm glutamat homeostazı ve redoks durumu arasındaki denge için önemlidir (76). Glutatyon biyosentezi için ayrıca sistin (Cys) ve glisin (Gly) gereklidir. Glisin seviyeleri, glisin taşıyıcısı (GlyT) tarafından düzenlenir (76).



Şekil 2-5: Glutamatın glutamin ve GABA'ya dönüşümü (83)

Glial hücreler tarafından alınan glutamatın büyük çoğunluğu ise glutamine (Gln) dönüştürülür (Şekil 2-5) (75). Astrositler, glutamatı glutamine dönüştürmede ve serbest bırakmada görev almaktadırlar (81). Nöronlara alınan Gln ise glutaminaz enzimi tarafından tekrar glutamata dönüştürülür (Şekil 2-5) (81). Astrositler üzerindeki sistin/glutamat antiportu, ekstrasinaptik glutamat salınımı karşılığında eş zamanlı olarak sistinin hücresel alımına aracılık eder (82). EAAT3, bu süreçte kantitatif bir rol oynar (75). Kararlı durumdaki ekstrasinaptik glutamat seviyeleri glial XC− tarafından düzenlenir (75). Sistin/glutamat taşıyıcısının aşırı aktivitesi, çeşitli patolojik durumlarda glutamaterjik eksitotoksisite ile ilişkilendirilmiştir (82).

Glutamat ayrıca inhibitör GABAerjik nöronlara girmekte ve burada glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi tarafından nörotransmitter GABA'ya dönüştürülmektedir (Şekil 2-5) (83). GABA, nöronlardan sinaptik boşluğa salınmakta, ardından postsinaptik ve presinaptik inhibe edici reseptörlere bağlanmaktadır (75). Sinaptik GABA, hücre içine taşıyıcı GAT tarafından alınmaktadır (75). Son olarak glutamat, tüm hücrelerde temel enerji metabolizmasına ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılmaktadır (Şekil 2-4) (75).

OKB patofizyolojisinde anahtar bir beyin bölgesi olan striatum, CSTC devresinin bir parçası olarak, bilişsel ve motor eylemleri planlamaktan sorumludur (84, 85). Striatum, prefrontal korteksten nöronal uzantı alan bazal ganglionlardaki en büyük nöron alıcısıdır (84). Striatum içindeki hücre göçü, glutamat tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir ve glutamaterjik nöronlar striatumda en bol bulunan nöron türüdür (85). Glutamat, striatumun pramidal hücrelerinde kortikal nöronal göçü yönlendirmede ve kortikal nöronal olgunlaşmasında görev almaktadır (46). Glutamat miktarlarının yetersizliğinin

veya aşırı dozda olmasının, NMDA ve AMPA reseptörlerine etki ederek, kortikal göçü olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (86). Çok az sayıdaki NMDA reseptörü göç hızını düşürürken, suprafizyolojik seviyelerin ise kortikal nöronal göçü tamamen durdurduğu bilinmektedir (86). Striatumdaki önemli rolü göz önüne alındığında, glutamatın OKB'nin patogenezinde anahtar rol oynaması muhtemeldir (46).

OKB'de, tedavi edilmeyen hastaların beyin omurilik sıvısında artmış glutamat içeriği ve anterior singulat kortekste kompulsif davranış ve glutamat konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişki ve glutamaterjik nörotransmisyonunda değişiklikler bildirilmiştir (87, 88). CSTC döngüsünün farklı bölgelerindeki glutamat seviyelerindeki değişiklikler, anormal nöronal devre aktivitesine yol açan fonksiyonel değişikliklere yol açabilmektedir (89). Son zamanlarda geliştirilen OKB hayvan modellerinde, kortiko-striatal sinapslarda glutamaterjik değişikliklerin sergilendiği gözlenmiştir (19, 90).

Birçok çalışma, OKB'de glutamatı hedefleyen ve NMDA reseptörlerine etki eden memantin, ketamin ve rapastinel gibi ilaçların kullanılması ile semptomların azaldığını bildirmiştir (91, 92). Presinaptik ve glial glutamat taşıyıcılarını etkileyerek glutamat sinaptik seviyelerini azaltan bir ilaç olan riluzolün, SRI ile birlikte verilmesi durumunda hastaların yaklaşık %50'sinde OKB semptomlarının iyileştiği gösterilmiştir (93). Glutamatın OKB'deki rolüne ilişkin bu bulgular, glutamaterjik bileşikleri olan riluzol ve memantini içeren yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açmıştır (75). Riluzole, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) tedavisi için onaylanmış bir ajandır ve voltaja bağlı sodyum kanallarının inhibisyonunu ve akson terminalindeki P/Q-tipi kalsiyum kanallarının inhibisyonunu gerçekleştirerek glutamaterjik nörotransmisyonunu azalttığı ve böylece sinaptik glutamat salınımını inhibe ettiği ve astrositler tarafından glutamat alımını uyardığı bildirilmiştir (94-96). Hem yetişkin hem de pediatrik OKB hastaları için riluzol güçlendirme tedavisi üzerine bazı çalışmalar yapılmış ve riluzolün OKB semptomlarını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir (93, 97).

2.2.4.1. SLC1A1 Geni ve Polimorfizmleri

Nöronal glutamat taşıyıcısı olan EAAC1'i (eksitatör amino asit taşıyıcı 1) kodlayan SLC1A1 (solut taşıyıcı, aile 1 üye 1, ayrıca EAAT3 olarak da bilinir) geni, OKB için aday genler arasında yer almaktadır (73). SLC1A1, postsinaptik bölgede nöronal ve epitelyal yüksek afiniteli bir glutamat taşıyıcısı olan çok geçişli bir membran proteinini

kodlamaktadır (55). EAAC1/EAAT3, beyin gelişiminin erken dönemlerinde ifade edilir ve ağırlıklı olarak hipokampus, serebral korteks, talamus, süperior kollikulus ve olfaktör bulbusta (koku alma soğanı) bulunur (98, 99). Bu glutamat taşıyıcısının, memeli beynindeki postsinaptik membrandaki sinapsların %30-40'ında ifade edildiği tahmin edilmektedir (98).

SLC1A1'in işlevi, glutamatı sinaptik yarıktan çıkarmak, geri dönüşüm kaskadını başlatmak ve sinaptik veziküller halinde salınan glutamatı hücreye geri kazandırmaktır (73). Hücre dışı boşluktan glutamat geri kazanımı, hücre zarında glutamat taşıyıcısının varlığını gerektirmektedir ancak orantısız miktarda SLC1A1 proteininin hücre içinde de bulunduğu bilinmektedir (98). Bu hücre içi SLC1A1'in, glutatyon üretimini düzenlemede ve dolayısıyla nöronları oksidatif hasardan korumada anahtar bir rol oynadığı varsayılmaktadır (98). SLC1A1'in yokluğunda, glutatyon azalmakta ve oksidatif hasar sonucunda nöron kaybı meydana gelmekte böylece OKB oluşumuna yol açmaktadır (100).

Pediatrik bir OKB probandı olan yedi ailede 56 kişiyi inceleyen OKB üzerine yürütülen ilk GWAS sonucunda, kromozom 9p24 üzerinde anlamlı bağlantılar bulunmuştur ve SLC1A1'in glutamat nörotransmisyonu açısından OKB için pozitif bir aday gen olduğu bildirilmiştir (15). Bu bulgu, OKB'li 50 soy ağacında yalnızca kromozom 9p24 bölgesine odaklanan başka bir bağlantı çalışmasıyla bağımsız olarak tekrarlanmıştır (41). Bu bölgedeki genlerden birkaçı MSS'de ifade edilir ve glutamat ile etkileşen proteinleri kodlayan SLC1A1 geni de bu bölgede yer almaktadır (14). SLC1A1, OKB etiyolojisinde önemli olduğu bilinen CSTC modelinde yer alan serebral korteks, striatum ve talamusta yüksek oranda ifade edilmektedir (99).

Birçok aile temelli aday gen ilişkilendirme çalışması SLC1A1'in OKB ile ilişkisini araştırmıştır. Bu çalışmaların ilki Arnold ve arkadaşları tarafından yürütülen ve SLC1A1 için 9 SNP'yi kapsayan bir genotiplendirme çalışmasıdır (16). Çalışmanın sonucunda tek bir haplotip bloğunda yer alan iki varyant (rs301434 ve rs301435) OKB ile ilişkili bulunmuştur (16). Stewart ve arkadaşları ise OKB ile SLC1A1'in ilişkisini, inceledikleri üç SNP ile literatüre geçirmişlerdir. rs12682807, rs2072657 ve rs301430 haplotiplerindeki allel değişimleri her iki cinsiyette de OKB ile ilişkili bulunmuştur (18). Samuels ve arkadaşlarının yürüttüğü aile temelli ilişkilendirme çalışması sonucu, SLC1A1'in 8,8 kb yukarısında yer alan rs4740788 SNP'si OKB ile ilişkilendirilmiştir

(14). Aynı çalışmada incelenen rs301443 polimorfizmi ise hiçbir ailede OKB ile bağlantılı bulunamamıştır (14).

Erken başlangıçlı bir OKB çalışmasında, SNP analizi sonucunda rs10491734 polimorfizmi OKB ile ilişkili bulunmuştur (101). Bir vaka kontrol çalışmasındaysa üç SNP incelenmiş, sonuç olarak iki SNP'nin ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiş ve rs3087879, rs301430 ve rs7858819 haplotipleri OKB ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir (102).

2.2.4.2. DLGAP1 Geni ve Polimorfizmleri

Guanilat kinaz ilişkili proteinini (GKAP) kodlayan, SAP90/PSD95 ile ilişkili protein (SAPAP1) olarak da bilinen DLG ilişkili protein 1 (DLGAP1), OKB patofizyolojisiyle ilişkilendirilmiş aday genler arasındadır (12, 21). Nöronal postsinaptik yoğunluk kompleksinin bir üyesini kodlayan DLGAP1, 18p11.31 kromozom pozisyonunda bulunmaktadır (103). İskele proteini DLGAP1, glutamaterjik nöronların PSD bölgesinde lokalizedir ve PSD95 proteini ile etkileşime girerek normal beyin fonksiyonlarının ve gelişiminin sürdürülmesinde ayrıca sinaps oluşumunda ve regülasyonunda rol oynar (104, 105). Postsinaptik sinaps ilişkili protein 90/postsinaptik yoğunluk 95 ilişkili proteinler (SAPAP'lar), N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörü ile ilişkili postsinaptik yoğunluk proteinlerinin bir parçasını oluşturur (106). DLGAP1, NMDA reseptörlerini, iyon kanallarını ve sinyal proteinlerini içeren, 1,5 MDa süper komplekslerinin bir bileşenidir (107). Bu süper kompleks proteinlerinde meydana mutasyonlar, sinapsların nöronal aktiviteleri saptama ve bunlara yanıt verme yeteneğini, doğuştan gelen veya öğrenilmiş davranışları modüle etme kapasitesini, kısa ve uzun vadeli sinaptik kuvvetin kontrolünü değiştirebilmektedir (108).

DLG (Disk-büyük Drosophila proteini) ailesindeki iskele proteinlerinin, (PSD95/Dlg4, PSD93/Dlg2, SAP102/Dlg3, SAP97/Dlg1), postsinaptik komplekslerinin oluşumu için gerekli olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (109, 110). DLGAP1, DLG ailesi iskele proteinlerini, SHANK (SH3 ve çoklu ankirin tekrar alanı proteinleri) aile proteinlerine (SHANK1-3) bağlamaktadır ve bu iskele protein komplekslerinin miktarlarının, çeşitli psikiyatrik ve diğer karmaşık beyin bozukluklarında arttığı gözlenmiştir (111). Bu nedenle, DLGAP1 geninde meydana gelen mutasyonlar, bu iskele protein ailelerini ayırarak PSD'nin organizasyonunu bozabilmektedir (112). Ayrıca

DLGAP1, OKB semptomlarıyla ilişkili beyin bölgeleri olan neokorteks, hipokampus ve serebellum içinde en yüksek oranda ifade edilir (113).

Stewart ve arkadaşları yürüttükleri GWAS sonucunda, DLGAP1 geninin intronik bölgesinde bulunan rs11081062 ve rs11663827 polimorfizmlerini OKB ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir (12). Li ve arkadaşları tarafından incelenen rs11081062 SNP'sinin ise OKB'li vakalar ve kontroller arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (20). Wu ve arkadaşları tarafından, pediatrik OKB vakalarında DLGAP1'deki rs1116345 ve rs342484 varyantları toplam ACC hacmiyle karşılaştırmış ve aralarında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur (114).

2.3. Moleküler Teknikler

2.3.1. Genomik DNA Eldesi

Genetik araştırmalarda, genomik DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesi, ilerleyen daha gelişmiş moleküler tekniklerin uygulanması için gereken başlıca adımdır. DNA izolasyonu, hücre zarının parçalanması, proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması ve son olarak DNA'nın çöktürülmesi şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır. Çalışmamızda saf DNA eldesi High Pure PCR Template Preparation Kit for Genomic DNA (ROCHE) ticari kiti kullanılarak yapılmıştır. Total kandan çalışılan bu yöntem, spin-kolon metoduna dayanmaktadır. Kan guanidin-HCl gibi kaotropik bir tuzun varlığında özel bir Lizis Tamponu ve Proteinaz K ile inkübe edilerek lizise uğratılır. Elde edilen lizat, saflaştırma için kullanılan filtreli tüpten geçirilirken nükleik asitler, filtredeki özel fiberlere seçici olarak bağlanır. Filtreye bağlanan DNA'dan diğer hücre bileşenlerinin uzaklaştırılması amacı ile birkaç aşamadan oluşan yıkama ve santrifüjleme işlemi gerçekleştirilir ve DNA'nın filtrede saf bir şekilde kalması sağlanır. Son aşamada düşük tuz konsantrasyonu ile DNA filtreden serbest bırakılır ve santrifüjlenerek saf bir şekilde elde edilir (115).

2.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kantitatif PZR), nükleotid polimerleşmesini temel PZR ilkelerine bağlı olarak yürütmesinin yanında, hedef DNA bölgesinin miktarı veya mRNA ekspresyonunu ölçmek için kullanılan önemli bir moleküler tekniktir (116). Gerçek Zamanlı PZR'de algılama ve raporlama, tepkime ilerledikçe gerçekleştirilir, böylece ürünün üssel artışına ilişkin "gerçek zamanlı" bilgi

sağlanır (117). Bu teknik, teşhis ve gen ekspresyon uygulamaları için PZR analizlerine kıyasla birçok avantaj sunar (118).

Gerçek Zamanlı PZR, ilk defa 1980 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilmiştir (119). Gerçek Zamanlı PZR tekniğinde, bir örnekteki belirli bir hedef dizi çoğaltılır ve ardından floresan teknolojisi kullanılarak bir monitörden bu süreç eş zamanlı olarak izlenir (119). Amplifikasyon sırasında, floresan sinyalinin eşik seviyesine ne kadar hızda ulaştığı, hedef sekans miktarı ile ilişkilidir. Bu ilişki hedef bölgenin miktarını nicelendirmeyi sağlar (119). Amplifikasyon miktarlarını algılamak için genellikle diziye özel olarak tasarlanmış, oligonükleotidlere terminal olarak bağlanan floresan molekülleri (floroforlar) kullanılır (116). Floresan boyalar, primerlere veya tepkime sırasında PZR ürünü ile hibridize olan problara bağlanırlar (116).

Genel tespit prensibi, daha kısa dalga boylu ışık (<495 nm) tarafından uyarılan floroforların emiliminden sonra daha uzun dalga boylu ışık (500–800 nm) salınımının gerçekleşmesine dayanır (120). Bu emisyon, PZR döngüsü başına optik saptama birimleri tarafından okunur ve floresan yoğunluğu değerlendirilir (120).

Gerçek Zamanlı PZR'da kullanılan prob sistemleri, özgül floresan işaretli problar ve özgül olmayan floresan işaretli problar olmak üzere iki sınıfa ayrılır. TaqMan, FRET, moleküler Beaconlar ve Scorpion primerleri özgül floresan işaretli problardır. SYBR Green I ve etidyum bromid ise özgül olmayan floresan işaretli problardır.

TaqMan sistemi, Taq DNA polimerazın 5′-3′ eksonükleaz aktivitesine dayanmaktadır. 5' ve 3' oligonükleotidlere ek olarak, 5' ucunda florofor ve 3' ucunda bir söndürücü molekülü olan çift etiketli bir prob kullanılır (120). DNA kalıbının denatürasyonundan ve diziye özgü oligonükleotidlerin eklenmesinden sonra, hem 5'- hem de 3'- oligonükleotid, Taq DNA polimeraz tarafından uzatılır, enzim, floresan olarak işaretlenmiş 5' ucuna çarpar ve bağlanma 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile bozulur (120). Florofor böylece söndürücü molekülden ayrılır ve uyarıldığında, optik detektörlerle ölçülebilen dalga boyunda ışık yayar (121). Bu sistemde floresans yoğunluğu 60 °C'de ölçülür (121).

FRET sisteminde PZR primerlerine ek olarak reaksiyon karışımına iki farklı floresan işaretli boyalarla (verici ve alıcı) etiketlenmiş, hedef diziye özgü hazırlanmış iki farklı oligonükleotid probları eklenir. Birinci prob, 3' ucunda (verici) florofora sahiptir ve 5' ucuna yönlendirilmiştir. İkinci prob ise 5' ucunda (alıcı) florofora sahiptir ve 3' ucuna yönlendirilmiştir (122). Bu problar, çoğalma fazı sırasında, denatüre olan DNA

parçası üzerindeki hedef diziler ile hibridize olur, reaksiyon devam ettikçe iki florofor birbirine yaklaşır. Verici florofor, ışık kaynağı tarafından uyarılır ve verici florofor tarafından yayılan enerji, ikinci proba bağlı alıcı floroforu uyarır ve ardından farklı bir dalga boyunda floresan ışık yayar. Bu sistem, "Floresans Rezonans Enerji Transferi" (FRET) sistemi olarak adlandırılır. Enerji yayılımı sonucu oluşan floresans miktarı, PZR işlemi sırasında üretilen hedef DNA miktarı ile doğru orantılıdır (123).

SYBR Green I sisteminde kullanılan floresan boya SYBRGreen, dsDNA'nın (çift zincirli DNA) spesifik tespiti için oluşturulmuştur (124). Floresan boya yalnızca dsDNA'ya bağlandığı için çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar (124). Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar (124). Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır, ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve ölçüm alınır (124).

2.3.3. ELISA

ELISA (Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi), çeşitli antijen dizilerini tanımlamak ve ölçmek için antikor özgüllüğünü ve ilgisini kullanan moleküler bir tekniktir (125). ELISA, ilk olarak 1960 yılında Rosalyn Yalow ve Solomon Berson tarafından geliştirilen ve bir antijen veya antikoru etiketlemek için bir radyoaktif izotop kullanılan radyoimmün test (radioimmunoassay) prosedürüne dayanmaktadır (126). ELISA tekniğinde, bir antikor veya antijen, katı bir faza eklenir ve ardından tamamlayıcı bir antijen veya antikora bağlanır (127). Bu bağlanma, proteinlerin immünolojik özelliklerini değiştirmeyen polivinilklorür veya polistren gibi çeşitli matrikslerin adsorpsiyon kapasitesinin kullanılması ile gerçekleşir (127). Reaktantlar genellikle 96 veya 384 kuyucuklu bir polistiren mikroplakanın oyuklarına adsorbe edilir (127). İnkübasyon ve yıkamadan sonra, spesifik antikorlar bağlanır ve oluşan renk değişikliği sayesinde analit miktarı spektrofotometrik olarak kaydedilebilir (128). Enzim aktivitesi, numunedeki analit düzeyi ile ilişkili olan orantılı bir miktarda katalitik ürün verir (127). ELISA için uygun olan birçok farklı enzim arasında alkalin fosfataz, yaban turpu (horseradish) peroksidazı (HRP) ve Beta-galaktosidaz en yaygın kullanılanlardır (128). Ayrıca B vitamini kompleksinin düşük moleküler ağırlıklı bir üyesi olan biotin ile konjuge edilmiş antikorlar veya antijenler kullanılabilir (129).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Gruplarının Seçimi

Bu tez çalışmasında hasta grubu, İÜ-C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniği'ne başvurmuş ve DSM-IV tanı ölçütlerine göre Obsesif Kompulsif Bozukluk tanısı konmuş yaş ortalaması 31,77±9,66 olan 39 kadın ve 31 erkek olmak üzere toplam 70 gönüllü hastadan oluşmaktadır. Hastalığın şiddeti, uzman psikiyatrist tarafından uygulanan Y-BOCS ölçeği ile belirlenmiştir. Hastaya sorular halinde uygulanan bu ölçeğin sonucunda hasta 0-40 arası bir hastalık şiddeti değerine sahip olmaktadır. Kontrol grubunu ise daha önce herhangi bir psikiyatrik bozukluk tanısı almamış olan yaş ortalaması 31,73±9,08 olan 35 kadın ve 35 erkek olmak üzere toplam 70 gönüllü sağlıklı birey oluşturmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarına dahil edilen her bireye çalışma anlatılmış ve kendilerinden çalışmaya gönüllü bir şekilde katılmayı kabul ettiklerine dair imzalı bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alınmıştır. Hasta grubundan dışlanma ölçütü, OKB tanısı almış olan bireylerin başka herhangi bir psikiyatrik hastalığının bulunması ve 18-55 yaş aralığının dışında kalmasıdır. Kontrol grubundan dışlanma ölçütü ise bireyin geçmişte veya şimdi herhangi bir psikiyatrik hastalığının bulunması ve 18-55 yaş aralığının sağlanamamasıdır.

3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması ve Analiz Yöntemleri

Deney gruplarına çalışma hakkında gerekli bilgi verildikten ve bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalı olarak teslim alındıktan sonra her bireyden 3 adet 2 ml'lik EDTA'lı tüplere venöz kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinden 1 tüp kan örneği, DNA izolasyonları yapılana dek -20 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonları ROSCHE High Pure PCR Template Preparation Kit for Genomic DNA ticari kiti kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri polimorfizm analizleri yapılıncaya kadar -20 °C dondurucuda bekletilmiştir. Polimorfizm analizleri, tüm hasta ve kontrol gruplarının tamamlanmasının ardından Gerçek Zamanlı PZR tekniğinde FRET sistemi kullanılarak yapılmıştır. Gerçek Zamanlı PZR analizleri, LightCycler FastStart DNA Master HybProbe ticari kiti kullanılarak LightCycler 1.5® cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Gönüllülerden alınan diğer 2 tüp kan örneğinden ise SLC1A1 geni proteininin miktar analizlerinin yapılması amacı ile plazma eldesi yapılmış ve toplanan plazma örnekleri, ELISA tayini yapılana dek -80 °C dondurucuda saklanmıştır. ELISA tayini Abbkine Human Excitatory Amino Acid Transporter 3 (SLC1A1) ELISA Kiti

kullanılarak yapılmıştır ve ELISA mikroplaka okuyucu (BioTek ELx50) cihazı ile sonuçlar analiz edilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

High Pure PCR Template Preparation Kit for Genomic DNA (ROCHE)

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (ROCHE)

LightSnip Assay SLC1A1 rs587777696 (TIB MOLBIOL)

LightSnip Assay DLGAP1 rs11081062 (TIB MOLBIOL)

Human SLC1A1 ELISA Kit (Abbkine)

2-propanol

Etanol

Distile su

3.4. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

EDTA'lı 2,0 ml'lik kan tüpü (BD Vacutainer)

Vacutainer aparatı

Vacutainer iğnesi

Eppendorf tüp (0,5 ml, 1 ml ve 1,5 ml, 2,5 ml, steril)

Falcon (20 ml, steril)

Cam deney tüpü

Beher (50 ml)

Pipet ucu (10 µl, 200 µl, 1000 µl steril, filtreli)

Mikropipet (10 µl, 200 µl, 1000 µl, Thermofisher, Socorex)

Filtre kâğıdı

3.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

LightCycler 1.5® (Gerçek Zamanlı PZR Cihazı, ROCHE)

Soğutmalı santrifüj (Beckman-Coulter Allegra X-22)

Etüv (Memmert)

Otoklav (Hirayama)

Su banyosu (Kotterman)

Mikro santrifüj (Hettich)

Microspin (Biosan)

Distile su cihazı (Millipore Elix 3)

Buzdolabı (+4 °C, BOSCH)

Derin dondurucu (-20 °C, BOSCH)

Derin dondurucu (-80 °C, New Brunswick Scientific, Sanyo)

Vorteks (Velp)

Nanodrop (Thermo Scientific)

ELISA Mikroplaka Okuyucu (BioTek ELx50)

ELISA Mikroplaka Yıkayıcı (BioTek ELx50)

3.6. Moleküler Teknikler

3.6.1. Venöz Kanlardan DNA İzolasyonu

Çalışmamızda, ileri analizler için kullanılacak olan genomik DNA, deney gruplarından EDTA'lı tüplere alınan 2 ml'lik kan örneklerinden ROSCHE High Pure PCR Template Preparation Kit for Genomic DNA ticari kiti kullanılarak aşağıda listelenen deney basamakları sonucu elde edilmiştir (115):

1. Deneye başlamadan önce, -20 °C'de saklanan kan örnekleri ve Proteinaz K, oda sıcaklığına gelinceye dek beklenir. İnkübasyon için kullanılacak olan su banyosunun 70 °C'ye ısınması sağlanır ve DNA izolasyonun son aşamasında kullanılacak olan elüsyon tamponu deney boyunca 70 °C'de bekletilir.

2. Her tüpten 300 µl kan örneği mikro pipet aracılığıyla 2,5 ml'lik numaralandırılmış eppendorf tüplere aktarılır.
3. Eppendorflara alınan kanların üzerine 200 µl bağlama tamponu (Binding Buffer) ve 40 µl Proteinaz K eklenir.
4. Tüpler vorteks aracılığıyla karıştırılır ve 70 °C'de 10 dakika boyunca su banyosunda bekletilir (inkübasyon).
5. İnkübasyonun ardından tüplere 100 µl izoproponol eklenir ve proteinlerin denatürasyonunun sağlanması için tüpler vorteks kullanılarak iyice (her tüp yaklaşık 20 saniye boyunca) karıştırılır.
6. Kitin içeriğinde bulunan filtreli tüpler (High Pure Filter), toplayıcı tüpler (Collection) ile birleştirilir ardından eppendorflardaki karışım pipetlenerek filtreli tüplere aktarılır.
7. Filtreli tüpler 9.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
8. Santrifüj sonunda toplayıcı tüpler atılır, filtreli tüpler yeni toplayıcı tüpler ile birleştirilir.
9. Filtreli tüplere 500 µl inhibitör tampon (Inhibitor Remover Buffer) eklenir.
10. Filtreli tüpler 9.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonunda toplayıcı tüpler tekrar atılır ve filtreli tüpler yeni toplayıcı tüpler ile birleştirilir.
12. Filtreli tüplere 500 µl yıkama solüsyonu (Wash Buffer) eklenir.
13. Filtreli tüpler 9.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
14. İhtiyaca göre 12. ve 13. aşamalar tekrarlanabilir.
15. Santrifüj sonunda toplayıcı tüpler boşaltılır ve filtreli tüpler bu defa herhangi bir solüsyon eklenmeden kuru bir şekilde 11.000 rpm'de 30 saniye boyunca döndürülür.
16. Santrifüjün ardından toplayıcı tüpler atılır ve filtreli tüpler 2,5 ml'lik numaralandırılmış eppendorflara yerleştirilir.
17. Filtreli tüplere 200 µl önceden 70 °C'de bekletilmiş elüsyon tamponu (Elution Buffer) eklenir.

18. Tüpler 9.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Elüsyon tamponu sayesinde filtreye tutunmuş ve sabitlenmiş olan DNA çözülerek elde edilir.
19. Santrifüj sonunda filtreli tüpler atılır ve eppendorf tüplerdeki DNA'lar, bir gece +4 °C'de bekletilmesinin ardından daha ileri teknikler için kullanılıncaya dek -20 °C'ye alınarak saklanır.

3.6.1.1. DNA Miktarının Ölçümü ve Saflık Tayini

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflık derecesi Nanodrop (Thermo Scientific) spektrofotometre cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Cihazın ölçme prensibi nükleik asitlerin ve proteinlerin optik dansite (A) değerine dayanmaktadır (130). DNA ve RNA, 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine sahipken, proteinlerin absorbansı 280 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Diğer hücresel moleküllerin absorbans değeri ise 230 nm'de ölçülmektedir. A260/A280 ve A260/A230 oranları DNA'nın saflık derecesini vermektedir. Bunun için DNA örneğinden 1 µl alınır ve 260, 280 ve 230 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülür. Elde edilen sonuçlara göre, A260/A280 oranının 1,8 ± 0,1 çıkması DNA'nın saf olduğu konusunda bilgi verir. Bu orandan daha düşük miktarlar proteinlerin, daha yüksek miktarlarsa RNA'ların örneği kontamine ettiğini gösterir. A260/A230 oranının 2,2'den daha büyük olması yine DNA'nın saf olduğu bilgisini vermektedir (130). DNA konsantrasyonu ise A260 x Seyreltme Faktörü x 50 formülü ile belirlenir.

3.6.2. Gerçek Zamanlı PZR Analizleri

OKB ve kontrol gruplarından elde edilen DNA örneklerinden, SLC1A1 ve DLGAP1 genlerindeki tek nükleotid polimorfizm analizleri, Gerçek Zamanlı PZR tekniği ile LightCycler FastStart DNA Master HybProbe ticari kiti kullanılarak yapılmıştır. Analiz, LightCycler 1.5® cihazında, 20 µl kapasiteye sahip cam kapiler tüpler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tepkimede kullanılan FastStart Taq DNA polimeraz, 75 °C'ye kadar aktivite göstermeyen, rekombinant Taq DNA polimerazın bir formudur ve döngü başlamadan önce tek bir ön inkübasyon adımında aktif hale getirilmektedir (131). Ayrıca tepkimenin gerçekleşmesi için gerekli olan, gene ve SNP'ye özgün olarak tasarlanmış primer ve prob karışımından oluşan LightSnip'ler kullanılmıştır. Primer-prob karışımı,

çoğaltılmış DNA parçasında hedeflenen bölgeye özgün bir şekilde bağlanan iki farklı kısa etiketli oligonükleotidten oluşmaktadır (132). Analize başlamadan önce liyofilize halde gelen primer-prob karışımına, 100 µl kit içeriğinde bulunan H_2O eklenmiş ve vorteks yardımı ile karıştırılarak kullanıma uygun hale getirilmiştir.

LightCycler 1.5® Gerçek Zamanlı PZR analizi, şu aşamalardan meydana gelmektedir:

1. Ayrılma (Denatürasyon): FastStart DNA Master enzimi aktifleşir ve DNA çift sarmal yapısı ayrılır.
2. Çoğalma (Kantifikasyon, Amplifikasyon): Hedef DNA bölgesi, primer-prob karışımı ile belirlenir ve FastStart DNA Master enzimi ile çoğaltılır.
3. Erime: Amplikon analizi yapılır ve elde edilen pikler ve erime eğrileri ile SNP tespit edilir.
4. Soğuma: Cihazın rotoru ve termal hazne soğutulur.

Tablo 3-1: Gerçek Zamanlı PZR analizi LightCycler 1.5® programı

Analiz	**Ayrılma**	**Çoğalma**			**Erime**			**Soğuma**
Döngü Sayısı	1	45			1			1
Bölüm Sayısı	1	1	2	3	1	2	3	1
Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	95	40	75	40
Süre	10 dk.	10 sn.	10 sn.	15 sn.	30 sn.	2 dk.	1 sn.	30 sn.

Çalışmamızda SLC1A1 geninde rs5877777696 SNP'si (C/T) ve DLGAP1 geninde rs11081062 SNP'si (C/T) analiz edilmiştir.

3.6.2.1. SLC1A1 rs587777696 ve DLGAP1 rs11081062 Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Polimorfizm analizleri için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR tekniğinin protokolü ve her bir örnek için hazırlanan karışım solüsyonunun miktarları Tablo 3-2'deki gibidir:

Tablo 3-2: Gerçek Zamanlı PZR tepkimesi için hazırlanan solüsyonun içeriği

H_2O	10,4 µl
Primer/Prob Karışımı	1 µl
FastStart DNA Master Enzimi	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1,6 µl
DNA (~50 ng)	5 µl
Toplam	**20 µl**

Karışım solüsyonunun hazırlanmasının ve -20 °C'de saklanan DNA'ların oda sıcaklığına getirilmesinin ardından aşağıdaki protokol izlenerek analiz gerçekleştirilmiştir:

1. H_2O, primer-prob karışımı, FastStart DNA Master enzimi ve $MgCl_2$ belirlenen miktarlarda 1,5 ml'lik eppendorf tüp içerisine eklenerek karışım haline getirilir.
2. +4 °C'de muhafaza edilen ve cam kapiler tüplerin dizilmesi için kullanılan santrifüj adaptörlerine cam kapiller tüpler yerleştirilir ve her tüpe 15 µl'lik karışım eklenir.
3. Karışımın üzerine 5 µl DNA eklenerek cam kapiler tüplerin ağızları kapatılır ve 9.000 rpm'de 5 saniye santrifüj edilir.
4. Santrifüj adaptörlerinden çıkarılan cam kapiler tüpler LightCycler 1.5® cihazına yüklenir.
5. Tepkime programlaması ayarlandıktan ve her tüp programda kodlandıktan sonra analiz başlatılır.
6. Tepkime sonunda elde edilen pikler ve erime eğrileri analiz edilerek varyantların genotiplendirilmesi yapılır.

Tablo 3-3'te floresans tepkimesi sonucunda oluşan erime eğrilerinin allellere göre Tm (erime sıcaklığı) değerleri verilmiştir:

Tablo 3-3: SLC1A1 rs587777696 ve DLGAP1 rs11081062 SNP'leri allellerinin Tm sıcaklık (°C) değerleri (133, 134)

SNP	C Alleli	T Alleli
SLC1A1 rs587777696	55,92	63,01
DLGAP1 rs11081062	51,98	57,20

3.6.3. SLC1A1 Proteini için ELISA Tayini

Deney gruplarından alınan venöz kan örneklerindeki SLC1A1 proteininin miktarını ölçmek için ELISA tayininden yararlanılmıştır. Bu tayin için öncelikle EDTA'lı tüplerdeki kanlardan plazma eldesinin yapılması gerekmektedir. Kan plazması sarı renklidir ve içeriğinde su, kan proteinleri, glikoz, elektrolitler, hormonlar ve lipitler bulunmaktadır (135). Plazma eldesi için izlenen protokol aşağıdaki gibidir:

1. 2 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri, soğutmalı santrifüj cihazı kullanılarak +4 °C'de, 2.500 rpm'de, 15 dakika boyunca santrifüj edilir.
2. Santrifüj sonunda tüplerin üst kısmında kalan sarı renkli sıvı kısım plazmadır. Bu kısım toplanarak 2,5 ml'lik eppendorflara aktarılır.
3. Plazmaların içinde bulunduğu eppendorflar, ELISA tayini için kullanılana dek -80 °C'de saklanır.

Çalışmamızda plazma örneklerindeki SLC1A1 proteinini ölçmek için sandviç ELISA tayini uygulanmıştır. Bunun için SLC1A1'e özgü bir antikor ile önceden kaplanmış mikroplaka kullanılmıştır. Kuyucuklara eklenen plazmalarda mevcut bulunan SLC1A1, bu antikorlar tarafından bağlanmaktadır. Bağlanmamış moleküllerin yıkanmasının ardından kuyucuklara HRP ile konjuge edilmiş SLC1A1 saptama antikoru eklenmektedir. Bağlanmamış HRP reaktifini uzaklaştırmak için yapılan son bir yıkamanın ardından, kuyucuklara kromojen solüsyonu eklenmekte ve ilk adımda

bağlanan SLC1A1 miktarı ile orantılı olarak renk gelişimi gözlenmektedir. Gözlenen bu rengin yoğunluğu spektrofotometre cihazında ölçülmektedir (136).

Tayin işlemi, Abbkine SLC1A1 ELISA kiti protokolüne göre aşağıda listelenen adımlar sonucunda gerçekleştirilmiştir:

1. -80 °C'de saklanan plazmalar oda sıcaklığına getirilir.
2. 64 ng/l standart solüsyonundan, 150 µl alınarak 32, 16, 8, 4 ve 2 ng/l'lik sulandırılmış standartlar hazırlanır.
3. Kör, standart ve örnek kuyucukları belirlenir.
4. Standart kuyucuklarına 50 µl sulandırılmış standartlar eklenir.
5. Kör kuyucuğu boş bırakılır veya 50 µl distile su eklenir.
6. Örnek kuyucuklarına 40 µl dilüent solüsyonu ve 10 µl örnek eklenir.
7. Mikroplakanın üzeri kapatılır ve 37 °C'de 45 dakika inkübe edilir.
8. İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklar aspire edilir.
9. Kuyucuklara 250 µl yıkama solüsyonu eklenir ve her kuyucuk 5 defa 1-3 dakika boyunca yıkanır. Yıkamanın ardından kuyucuklar aspire edilir ve mikroplaka ters çevrilerek temiz bir kâğıt havluya dökülür.
10. Kör hariç her kuyucuğa 50 µl streptavidin antikoru ile konjuge HRP enzimi eklenir.
11. Mikroplakanın üzeri kapatılır ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılır.
12. 9. Aşama tekrarlanarak her kuyucuk 5 defa yıkanır.
13. Yıkamanın ardından tüm kuyucuklara 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B eklenir. Yavaşça karıştırılır ve ışıksız ortamda 37 °C'de 15 dakika boyunca inkübe edilir.
14. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenir ve kuyucuklardaki rengin maviden sarıya değişimi gözlenir.
15. Optikal dansite değerleri, mikroplaka okuyucuda 450 nm'de 15 dakika içerisinde ölçülür.

3.7. İstatiksel Analizler

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler SPSS 23.0 programı aracılığı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Sayısal verilerin ortalaması, standart sapması, frekansı (n) ve yüzde (%) değerleri istatistiksel olarak ölçülmüştür. Deneylerimizde yer alan hasta ve kontrol grupları arasındaki allel frekanslarının dağılımı arasındaki fark, hasta gruplarında Y-BOCS değerlerinin dağılımları ve gruplar arasındaki cinsiyet dağılımları Ki-kare testinin kullanılmasıyla hesaplanmıştır. Gruplar arasında yaş ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılmasında ise t testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde $p<0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

OKB'de glutamaterjik genetik sistemine ait SLC1A1 ve DLGAP1 genleri üzerinde yaptığımız polimorfizm ve ELISA çalışmalarımız, hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki grup üzerinde yürütüldü. Hasta grubunu 18-55 yaş aralığındaki 39 kadın ve 31 erkek olmak üzere 70 hasta, kontrol grubunu 18-55 yaş aralığındaki 35 kadın ve 35 erkek olmak üzere 70 sağlıklı birey oluşturmaktadır. İÜ-C Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları polikliniklerine başvurmuş ve OKB tanısı almış hastalara, OKB'nin şiddetinin belirlenmesi için uzman psikiyatrist tarafından Y-BOCS ölçeği uygulanmıştır. Çalışma gruplarına ait yaş ve cinsiyet verilerinin değerlendirilmeleri Tablo 4-1 ve 4-2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Deney gruplarındaki yaş verilerinin değerlendirilmesi

	Hasta Grubu (n=70)	**Kontrol Grubu (n=70)**	
	Ortalama±SD	**Ortalama±SD**	**p**
Yaş	31,77±9,66	31,73±9,08	0,978

Değerlendirmenin sonucunda, hasta ve kontrol gruplarında gözlenen yaş dağılımları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (p=0,978).

Tablo 4-2: Deney gruplarında cinsiyet dağılımı

		Hasta Grubu (n=70)		**Kontrol Grubu (n=70)**		
		n	**%**	**n**	**%**	**p**
Cinsiyet	**Kadın**	39	55,7	35	50	0,498
	Erkek	31	44,3	35	50	

Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımları açısından bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 4-3: Hasta grubuna ait genel veriler

Hasta Grubu (n=70)	n	%
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	39/31	55,7/44,3
Meslek Durumu (Var/Yok)	28/42	40/60
Aile Öyküsü (Var/Yok)	23/47	32,9/67,1
İlaç Kullanımı (Var/Yok)	65/5	92,9/7,1

Hasta grubu 39 kadın ve 31 erkekten oluşmaktadır. Bu grupta herhangi bir mesleğe sahip kişi sayısı 28'dir ve bu tüm grubun %40'ını oluşturmaktadır. OKB semptomları nedeni ile çalışamadığını, çalışırken zorlandığını veya mesleğini bırakmak zorunda kaldığını söyleyenlerin sayısı 42'dir ve bu tüm grubun %60'ını oluşturmaktadır. Hastaların diğer aile fertlerinde OKB'nin görülme durumu %32,9'dur. Hasta grubuna dahil edilen bireylerin %92,9'u ilaç kullanmaktadır (En çok kullanılan ilaçlar: Anafranil, Cipralex, Lustral ve Prozac).

OKB hastalarına hastalık şiddetinin belirlenmesi için uygulanan Y-BOCS değerlerinin dağılımı Tablo 4-4'te gösterilmiştir.

Tablo 4-4: Hasta grubundaki Y-BOCS değerlerinin dağılımı

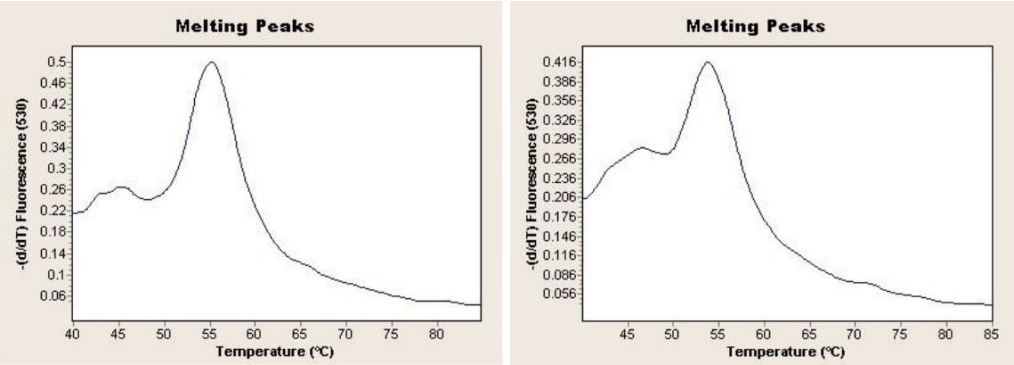
	Değer	n	%	Ortalama±SD
Y-BOCS	**0-13 (Hafif)**	9	12,9	23,06±7,28
	14-27 (Orta)	40	57,1	
	28-40 (Ağır)	21	30	

Y-BOCS ölçeği sonucunda hasta 0-40 aralığında bir şiddet değeri almaktadır. Bu değerlerin ortalaması 70 hastada 23,06 olarak bulunmuştur. OKB şiddetinin 70 hastadan %12,9'unda hafif, %57,1'inde orta, %30'unda ise ağır seyretmekte olduğu görülmüştür.

Tablo 4-5: SLC1A1 rs587777696 (C/T) polimorfizminde allel dağılımları

		Hasta Grubu		Kontrol Grubu		
	Alleller	**n**	**%**	**n**	**%**	**p**
SLC1A1 rs587777696	**CC**	70	100	70	100	-
	CT	0	0	0	0	
	TT	0	0	0	0	

OKB hastaları ve kontrol gruplarında, SLC1A1 rs587777696 polimorfizminin karşılaştırılması sonucu anlamlı bir fark saptanamamıştır (p>0,05). OKB hastalarının hiçbirinde polimorfik allel (T) gözlenmemiştir. Kontrol grubunun da tamamı normal allel (CC) genotipine sahiptir.

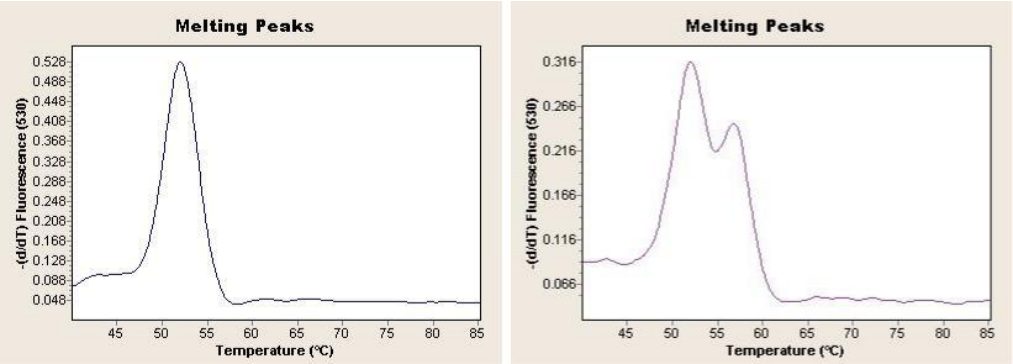


Şekil 4-1: Hasta (soldaki) ve kontrol (sağdaki) gruplarında SLC1A1 rs587777696 polimorfizminde CC allelinin Tm değerlerinin (°C) şematik gösterimi

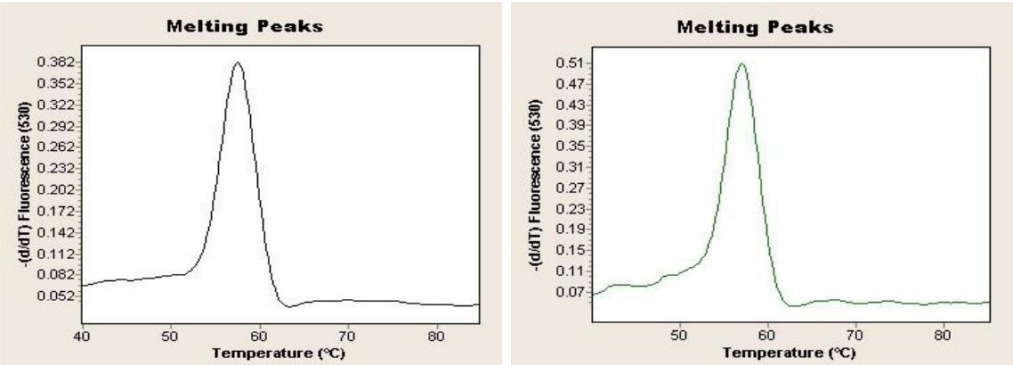
Tablo 4-6: DLGAP1 rs11081062 (C/T) polimorfizminde allel dağılımları

		Hasta Grubu		Kontrol Grubu		
	Alleller	**n**	**%**	**n**	**%**	**p**
DLGAP1 rs11081062	**CC**	38	54,3	59	84,3	0,0004
	CT	29	41,4	11	15,7	
	TT	3	4,3	0	0	

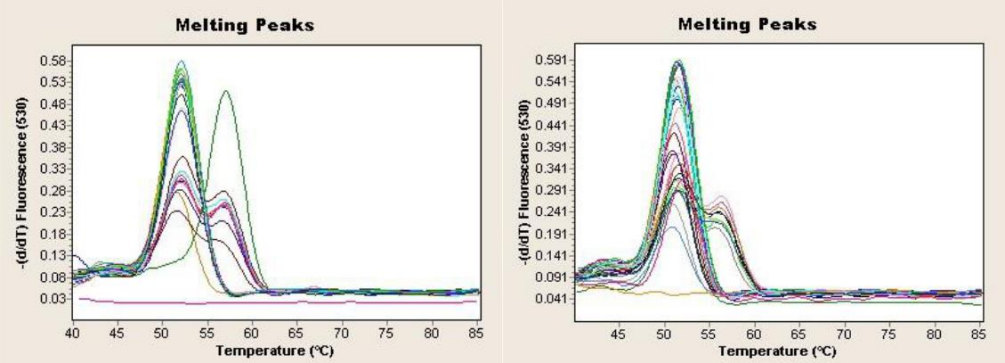
DLGAP1 rs11081062 SNP'sinde elde edilen allel frekansları hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmış ve OKB açısından allel dağılımları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (p=0,0004).



Şekil 4-2: Hasta grubunda DLGAP1 rs11081062 polimorfizminde CC (soldaki) ve CT (sağdaki) allellerinin Tm değerlerinin (°C) şematik gösterimi



Şekil 4-3: Hasta grubunda DLGAP1 rs11081062 polimorfizminde TT allelinin Tm değerinin (°C) şematik gösterimi



Şekil 4-4: Hasta (soldaki) ve kontrol (sağdaki) gruplarında DLGAP1 rs11081062 polimorfizminde CC, CT ve TT allellerinin Tm değerlerinin (°C) gösterimi

SLC1A1 geni tarafından üretilen protein miktarlarının ELISA yöntemi ile ölçülmesi sonucu nanogram (ng) cinsinden konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Konsantrasyon sonuçlarına ait verilerin değerlendirilmesi Tablo 4-7'de verilmiştir.

Tablo 4-7: SLC1A1 proteininin ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi

	Hasta Grubu (n=70)	**Kontrol Grubu (n=70)**	
	Ortalama±SD	**Ortalama±SD**	**p**
SLC1A1 ELISA	6,38±1,69	7,43±1,74	0,005

SLC1A1 proteininin ELISA sonuçlarından elde edilen konsantrasyon değerlerinin dağılımı açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (p=0,005).

5. TARTIŞMA

Obsesif Kompulsif Bozukluk, hastada rahatsızlık verici süregelen düşünceler (takıntılar) ve kişide tekrarlayan, adet haline getirilmiş davranışlar (zorlantılar) ile karakterize edilmektedir (23). OKB'nin etiyolojisi, nöronal genetik sistemlerdeki bozuklukların araştırılması ile belirginleşmeye başlamıştır (5). Yapılan moleküler genetik çalışmaları, OKB'de obsesif ve kompulsif semptomlarının oluşumunda, birden fazla genin iş birliğinin rol oynadığını göstermektedir (2, 4, 11, 29). Araştırmalar glutamaterjik sistem genlerinde meydana gelen fonksiyonel bozulmaların OKB'ye neden olabileceğini göstermiştir (4, 10, 11, 103).

Glutamat, beynin birçok bilişsel ve fizyolojik süreçlerinde rol oynayan önemli bir nörotransmitterdir (46). Glutamat reseptörleri, hafıza, öğrenme ve alışkanlıkların kazanımı için gerekli nöronal etkileşimlerde görev almaktadır (77). Glutamaterjik sistemi genleri arasında bulunan glutamat taşıyıcı geni SLC1A1 ve nöronal postsinaptik yoğunluk kompleksinin bir üyesini kodlayan DLGAP1, GWAS ve meta analiz araştırmaları sonucunda, OKB ile ilişkili aday genler olarak bildirilmiştir (2, 12).

SLC1A1 (solut taşıyıcı, aile 1 üye 1, EAAT3 olarak da bilinir), nöronal glutamat taşıyıcısı olan EAAC1'i (eksitatör amino asit taşıyıcı 1) kodlayan gendir (73). SLC1A1'in işlevi, presinaptik nöronlardan veziküller halinde salınan glutamatı sinaptik boşluktan postsinaptik nöronlara geri kazandırmaktır (73). Ayrıca SLC1A1, glutamatın postsinaptik etkisini sonlandırır ve sinaptik boşluğa salınan glutamatı uzaklaştırır (73). Böylece ekstrasinaptik reseptörlerinin aktivasyonunu kısıtlayarak glutamat seviyelerini düzenlemede ve sinaptik boşlukta ortaya çıkan eksitotoksisiteyi engellemede görev almaktadır (73). SLC1A1 geni, ilk olarak iki bağımsız genom çapında bağlantı analizi çalışmasında OKB ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (12, 15). Daha sonra aile temelli ilişkilendirme ve vaka kontrol çalışmalarıyla, OKB ile ilişkili SLC1A1 gen varyantları bulunmuştur (13, 14, 16-18, 102).

Arnold ve arkadaşlarının yaptığı SLC1A1 geni üzerinde 9 SNP'yi kapsayan bir genotiplendirme çalışması sonucunda tek bir haplotip bloğunda yer alan rs301434 ve rs301435 varyantları OKB ile ilişkili bulunmuştur (sırasıyla P=0,006 ve P=0,03) (16). Dickel ve arkadaşlarının yürüttüğü genotiplendirme çalışması sonucunda ise SLC1A1'in 3' bölgesindeki rs3780412 (P=0,04) ve rs301430 (P=0,03) SNP'lerinde OKB ile ilişki tespit edilmiştir (17). Stewart ve arkadaşları, OKB'de SLC1A1'in rs12682807,

rs2072657 ve rs301430 haplotiplerindeki dağılımlarını incelemiş, vaka ve kontroller arasında cinsiyet karşılaştırmasında anlamlı farklar bulmuşlardır (18). Shugart ve arkadaşları, SLC1A1 geni içindeki ve yakınındaki 13 tek nükleotid polimorfizmi çalışması sonucu yalnızca rs301443 üzerinde OKB ile bir ilişki saptamıştır (13).

SLC1A1 geni, glutamat taşıyıcısı olmasının yanında aspartatı da taşımaktadır (137). Bu gen üzerinde meydana gelen mutasyonları inceleyen bir çalışmada, glutamat-aspartat taşınmasını olumsuz etkilendiği ve nadir görülen bir otozomal resesif böbrek hastalığı olan dikarboksilik aminoasidüriye neden olduğu bildirilmiştir (138). Dikarboksilik aminoasidüri hastalarında yapılan bu mutasyon çalışmasında, obsesif-kompulsif semptomlarına sahip bir vakada, SLC1A1'in ekzon 12'sinde bir kodlama mutasyonu barındırdığı bildirilmiştir (138). Bu varyant, daha önceki OKB çalışmalarında tanımlanan diğer varyantlara oldukça yakın bir bölgede bulunmaktadır (17, 102). Biz de çalışmamızda OKB hastalığında SLC1A1'in 12. ekzonunda yer alan ve yanlış anlamlı (missense) bir mutasyon barındıran rs587777696 polimorfizminin (C/T), OKB ile ilişkisinin olup olmadığını araştırdık.

Bu tez çalışmasında, OKB vakalarında ve kontrollerde SLC1A1 rs587777696 SNP'si incelenmiş ve gruplar arasında anlamlı bir allel dağılımı gözlenmemiştir ($p>0,05$). Önceki çalışmalarda SLC1A1'in OKB ile ilişkisinin vurgulanmış olmasına karşın çalışmamızda anlamlı bir farkın bulunamamasının sebebinin, seçilen SNP bölgesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. rs587777696 SNP'si SLC1A1'in ekzonik bölgesinde bulunmaktadır ancak bugüne dek OKB ile ilişkilendirilmiş SLC1A1 varyantları daha çok intronik bölgede yer almaktadır (16, 102). Analiz sonucunda elde ettiğimiz bulgulara rağmen, SLC1A1'in glutamat taşınmasındaki görevi düşünüldüğünde, bu gen üzerinde meydana gelen değişimlerin, OKB oluşumunda bir etkisinin olabileceği muhtemeldir. Ayrıca örneklem sayısı, OKB alt tiplerinin çeşitliliği gibi faktörler de elde edilen sonuçları etkileyebilmektedir.

DLGAP1, nöronal postsinaptik yoğunluk kompleksindeki bir iskele proteinini kodlamaktadır (21, 103). DLGAP1, glutamaterjik nöronların postsinaptik yoğunluk bölgesinde nöronal postsinaptik yoğunluk proteini 95 (PSD-95) ile etkileşime girmektedir (105). DLGAP1 geni, normal beyin fonksiyonlarının ve gelişiminin sürdürülmesinde ayrıca sinaps oluşumunda ve regülasyonunda (sinaptik plastisite) rol oynamaktadır (104).

Wu ve arkadaşları, pediatrik OKB'de glutamat sistemi genlerinin beyindeki hacimsel değişikliklerini araştırmış ve DLGAP1'deki iki SNP'nin (rs1116345 ve

rs342484) anterior singulat korteks (ACC) hacmiyle anlamlı bir ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir (114). Stewart ve arkadaşları tarafından yürütülen GWAS sonucunda, DLGAP1'deki rs11081062 ve rs11663827 SNP'leri OKB açısından anlamlı bulunmuştur (21). Li ve arkadaşları tarafından incelenen rs11081062 SNP'sinin, OKB vakaları ve kontroller arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (20).

Çalışmamızda DLGAP1 geninde rs11081062 SNP'si analiz edilmiş ve hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması sonucunda allel dağılımları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (P=0,0004). İstatistiki sonuçlarımıza göre, rs11081062 bölgesindeki normal C allelinden polimorfik T alleline değişim, hasta grubunda %41,1 heterozigot polimorfik genotip (CT) ve %4,3 homozigot polimorfik genotip (TT) şeklinde gözlenmiştir. Bu durum kontrol grubunda %84,3 homozigot normal (CC) genotip ve %15,7 heterozigot polimorfik (CT) genotip şeklindedir. Stewart ve arkadaşları da DLGAP1 geni rs11081062 SNP'sini OKB ile ilişkili bulmuştur ($P=2,49x10^{-6}$) (21). Stewart ve arkadaşlarının bildirdiği sonuçlar, çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir. SLC1A1 rs587777696 SNP'sinde anlamlı bir fark bulamayan Li ve arkadaşlarının çalışmaları ise sonuçlarımızı desteklememektedir. Araştırma sonuçlarının farklı çıkması, toplumsal genetik farklılıklardan veya çalışılan örnek sayılarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Glutamaterjik nöronlarda bulunan postsinaptik NMDA reseptörleri (iyonotropik N metil-D-aspartat), bilginin sinaptik aktarımında ve sinaptik plastisitede etkilidir (78). NMDA reseptörleri, glutamaterjik postsinaptik nöronların PSD matriksine gömülü halde bulunmaktadır (75). DLGAP1 de burada PSD-95 ile etkileşime giren bir postsinaptik iskele proteinini kodlamaktadır (20). Bu etkileşimin, OKB'de sinaptik plastisite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (20). Çalışmamızda DLGAP1 polimorfizmi için bulunan farkın (p=0,0004), OKB'de glutamat miktarlarının dengesizliğinden kaynaklanan sinaptik plastisitenin bozulması sonucu sinapslar arası bilgi aktarımında aksaklıklara neden olabileceği düşünülmektedir.

SLC1A1, postsinaptik bölgede nöronal ve epitelyal yüksek afiniteli bir glutamat taşıyıcısı olan çok geçişli bir membran proteinini kodlamaktadır (55). Hasta ve kontrol gruplarından alınan kan plazması örneklerinden elde edilen ELISA sonuçları karşılaştırılmış ve SLC1A1 geni protein konsantrasyonları arasında anlamlı fark saptanmıştır (p=0,005). Elde edilen sonuçlara göre, OKB hasta grubundaki plazma

SLC1A1 protein miktarlarının, kontrol grubuna kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda olduğu bulunmuştur.

Glutamat, OKB oluşumunda etkili olduğu bilinen CSTC devresinde striatumdaki kortikal nöronal göçü yönlendirmede ve kortikal nöronal olgunlaşmasında görev almaktadır (46). Nöronal glutamat taşıyıcısını kodlayan SLC1A1 düzeylerinin az bulunması, glutamat taşınımını olumsuz yönde etkileyebilir ve beyine taşınan glutamat miktarları yetersiz kalabilir. Glutamat yetersizliği durumunda, NMDA ve AMPA reseptörlerinin fonksiyonunun bozulması sonucu kortikal göçün olumsuz yönde etkilendiği bildirilmiştir (86). Sonuç olarak SLC1A1 geni protein konsantrasyonlarının düşük düzeylerinin, OKB oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda OKB etiyolojisinde yer alan glutamaterjik sistem genetiğine ait aday genlerden SLC1A1 ve DLGA1 genleri incelenmiştir. Araştırmalarımız sonucunda DLGAP1 geninde rs11081062 bölgesinde meydana gelen polimorfizmlerin, OKB üzerinde etkisinin olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca SLC1A1 geni protein miktarlarının hasta grubunda daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu görülmüştür. Elde edilen verilerin, OKB'de glutamatın rolünün daha iyi anlaşılabilmesi açısından literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

OKB'nin oldukça karmaşık olan etiyolojisi, bu bozukluğa neden olan nörobiyolojik yolaklarla ilgili ek araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu ve OKB'nin belirlenmesi ve önlenmesi için biyobelirteçlerin tanımlanması gerektiğini vurgulamaktadır. SLC1A1, DLGAP1 gibi glutamaterjik sistemi genlerinin, OKB oluşumundaki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için yeterli sayıda vaka-kontrol karşılaştırılmasına dayanan moleküler genetik çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tür çalışmaların artmasının, gelecekte beyin bölgelerindeki glutamat düzeylerini regüle eden ilaçların geliştirmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. APA. *Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders.* Fifth Edition (DSM-5). Washington, ABD: American Psychiatric Association; 2013.
2. Taylor S. Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Mol Psychiatry* 2013; **18(7):** 799-805.
3. Nestadt G, Grados M, Samuels JF. Genetics of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2010; **33(1):** 141-158.
4. Browne HA, Gair SL, Scharf JM, Grice DE. Genetics of obsessive-compulsive disorder and related disorders. *Psychiatr Clin North Am* 2014; **37(3):** 319-335.
5. Stein DJ. Neurobiology of the obsessive-compulsive spectrum disorders. *Biol Psychiatry* 2000; **47(4):** 296-304.
6. Barr LC, Goodman WK, Price LH. The serotonin hypothesis of obsessive compulsive disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 1993; **8 Suppl 2:** 79-82.
7. Franklin ME, Foa EB. Treatment of obsessive compulsive disorder. *Annu Rev Clin Psychol* 2011; **7:** 229-243.
8. Foa EB, Liebowitz MR, Kozak MJ, Davies S, Campeas R, Franklin ME ve ark. Randomized, placebo-controlled trial of exposure and ritual prevention, clomipramine, and their combination in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 2005; **162(1):** 151-161.
9. Zai G, Brandl EJ, Müller DJ, Richter MA, Kennedy JL. Pharmacogenetics of antidepressant treatment in obsessive-compulsive disorder: an update and implications for clinicians [published correction appears in Pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2014; **15(8):** 1147-1157.
10. Rajendram R, Kronenberg S, Burton CL, Arnold PD. Glutamate Genetics in Obsessive-Compulsive Disorder: A Review. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 2017; **26(3):** 205-213.
11. Rosenberg DR, MacMaster FP, Keshavan MS, Fitzgerald KD, Stewart CM, Moore GJ. Decrease in caudate glutamatergic concentrations in pediatric obsessive-compulsive disorder patients taking paroxetine. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2000; **39(9):** 1096-1103.

12. Mattheisen M, Samuels JF, Wang Y, Greenberg BD, Fyer AJ, McCracken JT ve ark. Genome-wide association study in obsessive-compulsive disorder: results from the OCGAS. *Mol Psychiatry* 2015; **20(3):** 337-344.
13. Shugart YY, Wang Y, Samuels JF, Grados MA, Greenberg BD, Knowles JA ve ark. A family-based association study of the glutamate transporter gene SLC1A1 in obsessive-compulsive disorder in 378 families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; **150B(6):** 886-892.
14. Samuels J, Wang Y, Riddle MA, Greenberg BD, Fyer AJ, McCracken JT ve ark. Comprehensive family-based association study of the glutamate transporter gene SLC1A1 in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011; **156B(4):** 472-477.
15. Hanna GL, Veenstra-VanderWeele J, Cox NJ, Boehnke M, Himle JA, Curtis GC ve ark. Genome-wide linkage analysis of families with obsessive-compulsive disorder ascertained through pediatric probands. *Am J Med Genet* 2002; **114(5):** 541-552.
16. Arnold PD, Sicard T, Burroughs E, Richter MA, Kennedy JL. Glutamate transporter gene SLC1A1 associated with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2006; **63(7):** 769-776.
17. Dickel DE, Veenstra-VanderWeele J, Cox NJ Wu X, Fischer DJ, Van Etten-Lee M ve ark. Association testing of the positional and functional candidate gene SLC1A1/EAAC1 in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2006; **63(7):** 778-785.
18. Stewart SE, Fagerness JA, Platko J, Smoller JW, Scharf JM, Illmann C ve ark. Association of the SLC1A1 glutamate transporter gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; **144B(8):** 1027-1033.
19. Welch JM, Lu J, Rodriguiz RM, Peca J, Ding JD, Feliciano C ve ark. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature* 2007; **448(7156):** 894-900.
20. Li J, Cui J, Wang X, Ma J, Niu H, Ma X ve ark. An association study between DLGAP1 rs11081062 and EFNA5 rs26728 polymorphisms with obsessive-compulsive disorder in a Chinese Han population. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015; **11:** 897-905.

21. Stewart SE, Yu D, Scharf JM, Neale BM, Fagerness JA, Mathews CA ve ark. Genome-wide association study of obsessive-compulsive Disorder. *Mol Psychiatry* 2013; **18(7):** 788-798.
22. Taylor S, Jang KL, Asmundson GJ. Etiology of obsessions and compulsions: a behavioral-genetic analysis. *J Abnorm Psychol* 2010; **119(4):** 672-682.
23. APA. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* Fourth Edition (DSM-IV). Washington, ABD: American Psychiatric Association; 2000.
24. World Health Organization. *The "newly defined" burden of mental problems*. Geneva: Fact Sheets nº 217; 1999.
25. Berrios GE. Obsessive-compulsive disorder: its conceptual history in France during the 19th century. *Compr Psychiatry* 1989; **30(4):** 283-295.
26. Morel BA. *Traité des maladies mentales.* Second Ed. France: Paris, *Masson*; 1860.
27. Greenberg D, Huppert JD. Scrupulosity: a unique subtype of obsessive-compulsive disorder. *Curr Psychiatry Rep* 2010; **12(4):** 282-289.
28. May-Tolzmann U. Obsessional neurosis: a nosographic innovation by Freud. *Hist Psychiatry* 1998; **9(35):** 335-353.
29. Freud, S. *Obsessions and phobias: their psychical mechanism and their aetiology.* Standard Edition Vol. III; 1895.
30. Yılmaz B. Obsesif kompulsif bozukluk tedavisinde güncel yaklaşımlar. *LectioSc* 2018; **2(1):** 21-42.
31. Goodman WK, Grice DE, Lapidus KA, Coffey BJ. Obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2014; **37(3):** 257-267.
32. Abramowitz JS, McKay D, Taylor S. *Clinical handbook of obsessive-compulsivedisorder and related problems.* Baltimore (MD): Johns Hopkins University Press; 2008.
33. Storch EA, Larson MJ, Price LH, Rasmussen SA, Murphy TK, Goodman WK. Psychometric analysis of the Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale Second Edition Symptom Checklist. *J Anxiety Disord*. 2010; **24(6):** 650-656.
34. Rasmussen SA, Eisen JL. The epidemiology and clinical features of obsessive compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am* 1992; **15(4):** 743-758.

35. Bloch MH, Green C, Kichuk SA, Dombrowski PA, Wasylink S, Billingslea E ve ark. Long-term outcome in adults with obsessive-compulsive disorder. *Depress Anxiety* 2013; **30(8):** 716-722.
36. Eisen JL, Pinto A, Mancebo MC, Dyck IR, Orlando ME, Rasmussen SA. A 2-year prospective follow-up study of the course of obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry* 2010; **71(8):** 1033-1039.
37. Nestadt G, Samuels J, Riddle M, Bienvenu OJ 3rd, Liang KY, LaBuda M ve ark. A family study of obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2000; **57(4):** 358-363.
38. Riddle MA, Scahill L, King R, Hardin MT, Towbin KE, Ort SI ve ark. Obsessive compulsive disorder in children and adolescents: phenomenology and family history. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1990; **29(5):** 766-772.
39. Storch EA, Lack CW, Merlo LJ, Geffken GR, Jacob ML, Murphy TK ve ark. Clinical features of children and adolescents with obsessive-compulsive disorder and hoarding symptoms. *Compr Psychiatry* 2007; **48(4):** 313-318.
40. Bozorgmehr A, Ghadirivasfi M, Shahsavand Ananloo E. Obsessive-compulsive disorder, which genes? Which functions? Which pathways? An integrated holistic view regarding OCD and its complex genetic etiology. *J Neurogenet* 2017; **31(3):** 153-160.
41. Willour VL, Yao Shugart Y, Samuels J, Grados M, Cullen B, Bienvenu OJ 3rd ve ark. Replication study supports evidence for linkage to 9p24 in obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 2004; **75(3):** 508-513.
42. Mathews CA, Badner JA, Andresen JM, Sheppard B, Himle JA, Grant JE ve ark. Genome-wide linkage analysis of obsessive-compulsive disorder implicates chromosome 1p36. *Biol Psychiatry* 2012; **72(8):** 629-636.
43. Abramowitz JS, Taylor S, McKay D. Obsessive-compulsive disorder. *Lancet* 2009; **374(9688):** 491-499.
44. Saxena S, Rauch SL. Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2000; **23(3):** 563-586.
45. Bartz JA, Hollander E. Is obsessive-compulsive disorder an anxiety disorder?. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; **30(3):** 338-352.

46. Karthik S, Sharma LP, Narayanaswamy JC. Investigating the Role of Glutamate in Obsessive-Compulsive Disorder: Current Perspectives. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2020; **16:** 1003-1013.
47. Maia TV, Cooney RE, Peterson BS. The neural bases of obsessive-compulsive disorder in children and adults. *Dev Psychopathol* 2008; **20(4):** 1251-1283.
48. Menzies L, Chamberlain SR, Laird AR, Thelen SM, Sahakian BJ, Bullmore ET. Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsivedisorder:theorbitofronto-striatalmodel revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; **32(3):** 525-549.
49. Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 1986; **9:** 357-381.
50. Szeszko PR, Robinson D, Alvir JM, Bilder RM, Lencz T, Ashtari M ve ark. Orbital frontal and amygdala volume reductions in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1999; **56(10):** 913-919.
51. Gilbert AR, Moore GJ, Keshavan MS, Paulson LA, Narula V, Mac Master FP ve ark. Decrease in thalamic volumes of pediatric patients with obsessive-compulsive disorder who are taking paroxetine. *Arch Gen Psychiatry* 2000; **57(5):** 449-456.
52. Rotge JY, Aouizerate B, Tignol J, Bioulac B, Burbaud P, Guehl D. The glutamate-based genetic immune hypothesis in obsessive-compulsive disorder. An integrative approach from genes to symptoms. *Neuroscience* 2010; **165(2):** 408-417.
53. Milad MR, Rauch SL. Obsessive-compulsive disorder: beyond segregated cortico-striatal pathways. *Trends Cogn Sci* 2012; **16(1):** 43-51.
54. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 1990; **13(7):** 266-271.
55. Grados M, Wilcox HC. Genetics of obsessive-compulsive disorder: a research update. *Expert Rev Neurother* 2007; **7(8):** 967-980.
56. Swedo SE, Pietrini P, Leonard HL, Schapiro MB, Rettew DC, Goldberger EL ve ark. Cerebral glucose metabolism in childhood-onset obsessive-compulsive disorder. Revisualization during pharmacotherapy. *Arch Gen Psychiatry* 1992; **49(9):** 690-694.

57. Rudebeck PH, Walton ME, Smyth AN, Bannerman DM, Rushworth MF. Separate neural pathways process different decision costs. *Nat Neurosci* 2006; **9(9):** 1161-1168.
58. Sachdev PS, Malhi GS. Obsessive-compulsive behaviour: a disorder of decision-making. *Aust N Z J Psychiatry* 2005; **39(9):** 757-763.
59. Wu K, Hanna GL, Rosenberg DR, Arnold PD. The role of glutamate signaling in the pathogenesis and treatment of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; **100(4):** 726-735.
60. Zhu Y, Fan Q, Han X, Zhang H, Chen J, Wang Z ve ark. Decreased thalamic glutamate level in unmedicated adult obsessive-compulsive disorder patients detected by proton magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord* 2015; **178:** 193-200.
61. Purty A, Nestadt G, Samuels JF, Viswanath B. Genetics of obsessive-compulsive disorder. *Indian J Psychiatry*. 2019; **61(Suppl 1):** 37-42.
62. Gomes CKF, Vieira-Fonseca T, Melo-Felippe FB, de Salles Andrade JB, Fontenelle LF, Kohlrausch FB. Association analysis of SLC6A4 and HTR2A genes with obsessive-compulsive disorder: Influence of the STin2 polymorphism. *Compr Psychiatry* 2018; **82:** 1-6.
63. Cengiz M, Okutan SN, Bayoglu B, Sakalli Kani A, Bayar R, Kocabasoglu N. Genetic Polymorphism of the Serotonin Transporter Gene, SLC6A4 rs16965628, Is Associated with Obsessive Compulsive Disorder. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015; **19(5):** 228-234.
64. Murphy DL, Fox MA, Timpano KR, Moya PR, Ren-Patterson R, Andrews AM ve ark. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* 2008; **55(6):** 932-960.
65. Pauls DL. The genetics of obsessive-compulsive disorder: a review. *Dialogues Clin Neurosci* 2010; **12(2):** 149-163.
66. Taj M J RJ, Viswanath B, Purushottam M, Kandavel T, Janardhan Reddy YC, Jain S. DRD4 gene and obsessive compulsive disorder: do symptom dimensions have specific genetic correlates?. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013; **41:** 18-23.

67. Gassó P, Ortiz AE, Mas S, Morer A, Calvo A, Bargalló N ve ark. Association between genetic variants related to glutamatergic, dopaminergic and neurodevelopment pathways and white matter microstructure in child and adolescent patients with obsessive-compulsive disorder. *J Affect Disord* 2015; **186:** 284-292.
68. Karayiorgou M, Altemus M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J ve ark. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94(9):** 4572-4575.
69. Grados MA. The genetics of obsessive-compulsive disorder and Tourette syndrome: an epidemiological and pathway-based approach for gene discovery. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2010; **49(8):** 810-819.e8192.
70. Zai G, Arnold P, Burroughs E, Barr CL, Richter MA, Kennedy JL. Evidence for the gamma-amino-butyric acid type B receptor 1 (GABBR1) gene as a susceptibility factor in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; **134B(1):** 25-29.
71. Pauls DL, Abramovitch A, Rauch SL, Geller DA. Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat Rev Neurosci* 2014; **15(6):** 410-424.
72. Snyder SH, Ferris CD. Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am J Psychiatry* 2000; **157(11):** 1738-1751.
73. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; **65(1):** 1-105.
74. Doğan D. THE SIGNAL SYSTEM IN BRAIN. *JCS* 2019; **4(2):** 54-56.
75. Pittenger C, Bloch MH, Williams K. Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: neurobiology, pathophysiology, and treatment. *Pharmacol Ther* 2011; **132(3):** 314-332.
76. Lovinger DM. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 2010; **58(7):** 951-961.
77. Arnold PD, Macmaster FP, Richter MA, et al. Glutamate receptor gene (GRIN2B) associated with reduced anterior cingulate glutamatergic concentration in pediatric obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res* 2009; **172(2):** 136-139.

78. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2010; **11(10):** 682-696.
79. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; **164(3880):** 719-721.
80. Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; **45(3):** 250-265.
81. Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 2000;130 **(4S Suppl):** 1026-31.
82. Soria FN, Pérez-Samartín A, Martin A, Gona KB, Llop J, Szczupak B ve ark. Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage. *J Clin Invest* 2014; **124(8):** 3645-3655.
83. Underhill S, Amara S. TRANSPORTERS | Glutamate Transporters in Epilepsy. *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* 2009*;* 1398–1405.
84. Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y. Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; **41(1):** 1-12.
85. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci* 2006; **24(3):** 645–653.
86. Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci* 2015; **9:4.**
87. Chakrabarty K, Bhattacharyya S, Christopher R, Khanna S. Glutamatergic dysfunction in OCD. *Neuropsychopharmacology* 2005; **30(9):** 1735-40.
88. Naaijen J, Zwiers MP, Amiri H, Williams SCR, Durston S, Oranje B ve ark. Fronto-Striatal Glutamate in Autism Spectrum Disorder and Obsessive Compulsive Disorder. *Neuropsychopharmacology* 2017; **42(12):** 2456-2465.
89. Escobar AP, Wendland JR, Chávez AE, Moya PR. The Neuronal Glutamate Transporter EAAT3 in Obsessive-Compulsive Disorder. *Front Pharmacol* 2019; **10:** 1362.
90. Delgado-Acevedo C, Estay SF, Radke AK, Sengupta A, Escobar AP, Henríquez-Belmar F ve ark. Behavioral and synaptic alterations relevant to obsessive-

compulsive disorder in mice with increased EAAT3 expression. *Neuropsychopharmacology* 2019; **44(6):** 1163-1173.

91. Rodriguez CI, Zwerling J, Kalanthroff E, Shen H, Filippou M, Jo B ve ark. Effect of a Novel NMDA Receptor Modulator, Rapastinel (Formerly GLYX-13), in OCD: Proof of Concept. Am J Psychiatry 2016; **173(12):** 1239-1241.
92. Modarresi A, Sayyah M, Razooghi S, Eslami K, Javadi M, Kouti L. Memantine Augmentation Improves Symptoms in Serotonin Reuptake Inhibitor-Refractory Obsessive-Compulsive Disorder: A Randomized Controlled Trial. *Pharmacopsychiatry* 2018; **51(6):** 263-269.
93. Coric V, Taskiran S, Pittenger C, Wasylink S, Mathalon DH, Valentine G ve ark. Riluzole augmentation in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: an open-label trial. *Biol Psychiatry* 2005; **58(5):** 424-8.
94. Urbani A, Belluzzi O. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci* 2000; **12(10):** 3567-74.
95. Wang SJ, Wang KY, Wang WC. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 2004; **125(1):** 191-201.
96. Frizzo ME, Dall'Onder LP, Dalcin KB, Souza DO. Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol* 2004; **24(1):** 123-8.
97. Grant P, Song JY, Swedo SE. Review of the use of the glutamate antagonist riluzole in psychiatric disorders and a description of recent use in childhood obsessive-compulsive disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2010; **20(4):** 309-315
98. Nieoullon A, Canolle B, Masmejean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? *J Neurochem* 2006; **98(4):** 1007-18.
99. Kanai Y, Hediger MA. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch* 2004; **447(5):** 469-79.
100. Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y ve ark. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat Neurosci* 2006; **9(1):** 119-26.

101. Wu H, Wang X, Xiao Z, Yu S, Zhu L, Wang D ve ark. Association between SLC1A1 gene and early-onset OCD in the Han Chinese population: a case-control study. *J Mol Neurosci* 2013; **50(2):** 353-9.

102. Wendland JR, Moya PR, Timpano KR, Anavitarte AP, Kruse MR, Wheaton MG ve ark. A haplotype containing quantitative trait loci for SLC1A1 gene expression and its association with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2009; **66(4):** 408-16.

103. Grünblatt E, Hauser TU, Walitza S. Imaging genetics in obsessive-compulsive disorder: linking genetic variations to alterations in neuroimaging. *Prog Neurobiol* 2014; **121:** 114-24.

104. Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 1992; **360(6403):** 467–471.

105. Shayakul C, Kanai Y, Lee WS, Brown D, Rothstein JD, Hediger MA. Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *Am J Physiol* 1997; **273(6):** F1023-F1029.

106. Li JM, Lu CL, Cheng MC, Luu SU, Hsu SH, Chen CH. Genetic analysis of the DLGAP1 gene as a candidate gene for schizophrenia. *Psychiatry Res* 2013; **205(1-2):** 13-7.

107. Frank RAW, Zhu F, Komiyama NH, Grant SGN. Hierarchical organization and genetically separable subfamilies of PSD95 postsynaptic supercomplexes. *J Neurochem* 2017; **142(4):** 504-511.

108. MacLaren EJ, Charlesworth P, Coba MP, Grant SG. Knockdown of mental disorder susceptibility genes disrupts neuronal network physiology in vitro. *Mol Cell Neurosci* 2011; **47(2):** 93-9.

109. Whitfield DR, Vallortigara J, Alghamdi A, Howlett D, Hortobágyi T, Johnson M ve ark. Assessment of ZnT3 and PSD95 protein levels in Lewy body dementias and Alzheimer's disease: association with cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2014; **35(12):** 2836-2844.

110. Frank RA, Komiyama NH, Ryan TJ, Zhu F, O'Dell TJ, Grant SG. NMDA receptors are selectively partitioned into complexes and supercomplexes during synapse maturation. *Nat Commun* 2016; **7:** 11264.

111. Li J, Zhang W, Yang H, Howrigan DP, Wilkinson B, Souaiaia T ve ark. Spatiotemporal profile of postsynaptic interactomes integrates components of complex brain disorders. *Nat Neurosci* 2017; **20(8):** 1150-1161.
112. Welch JM, Wang D, Feng G. Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse. *J Comp Neurol* 2004; **472(1):** 24-39.
113. Kindler S, Rehbein M, Classen B, Richter D, Böckers TM. Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; **126(1):** 14-21.
114. Wu K, Hanna GL, Easter P, Kennedy JL, Rosenberg DR, Arnold PD. Glutamate system genes and brain volume alterations in pediatric obsessive-compulsive disorder: a preliminary study. *Psychiatry Res* 2013; **211(3):** 214-20.
115. https://lifescience.roche.com/en_tr/products/high-pure-pcr-template-preparation-kit.html#details
116. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002; **8(6):** 257-60.
117. Müller HJ, Prange DR. *PCR - Polymerase-Kettenreaktion.* Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2016.
118. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; **29(3):** 151-9.
119. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; **155:** 335-50.
120. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88(16):** 7276-80.
121. Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Norris MA, Symonds ML, Dohnt MF. Identification of pathogenic Leptospira by TaqMan probe in a LightCycler. *Anal Biochem* 1998; **256(1):** 132-4.
122. Caplin BE, Rasmussen R, Bernard P, Wittwer C. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *Biochemica* 1999; **1:** 5–8.

123. Ju J, Ruan C, Fuller CW, Glazer AN, Mathies RA. Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92(10):** 4347-4351.

124. Nath K, Sarosy JW, Hahn J, Di Como CJ. Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. *J Biochem Biophys Methods* 2000; **42(1-2):** 15-29.

125. Drijvers JM, Awan IM, Perugino CA, Rosenberg IM, Pillai S. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Basic Science Methods for Clinical Researchers* 2017; *119–133.*

126. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960; **39:** 1157–75.

127. Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B ve ark. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods* 1992; **150(1-2):** 77-90.

128. Paulie S, Perlmann H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2016; 1–5.

129. Ternynck T, Avrameas S. Avidin-biotin system in enzyme immunoassays.

130. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp* 2010; **(45):** 2565.

131. Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD ve ark. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 1994; **16(6):** 1134-1137.

132. https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/14db834c-99f5-e311-98a1-00215a9b0ba8

133. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs587777696

134. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11081062

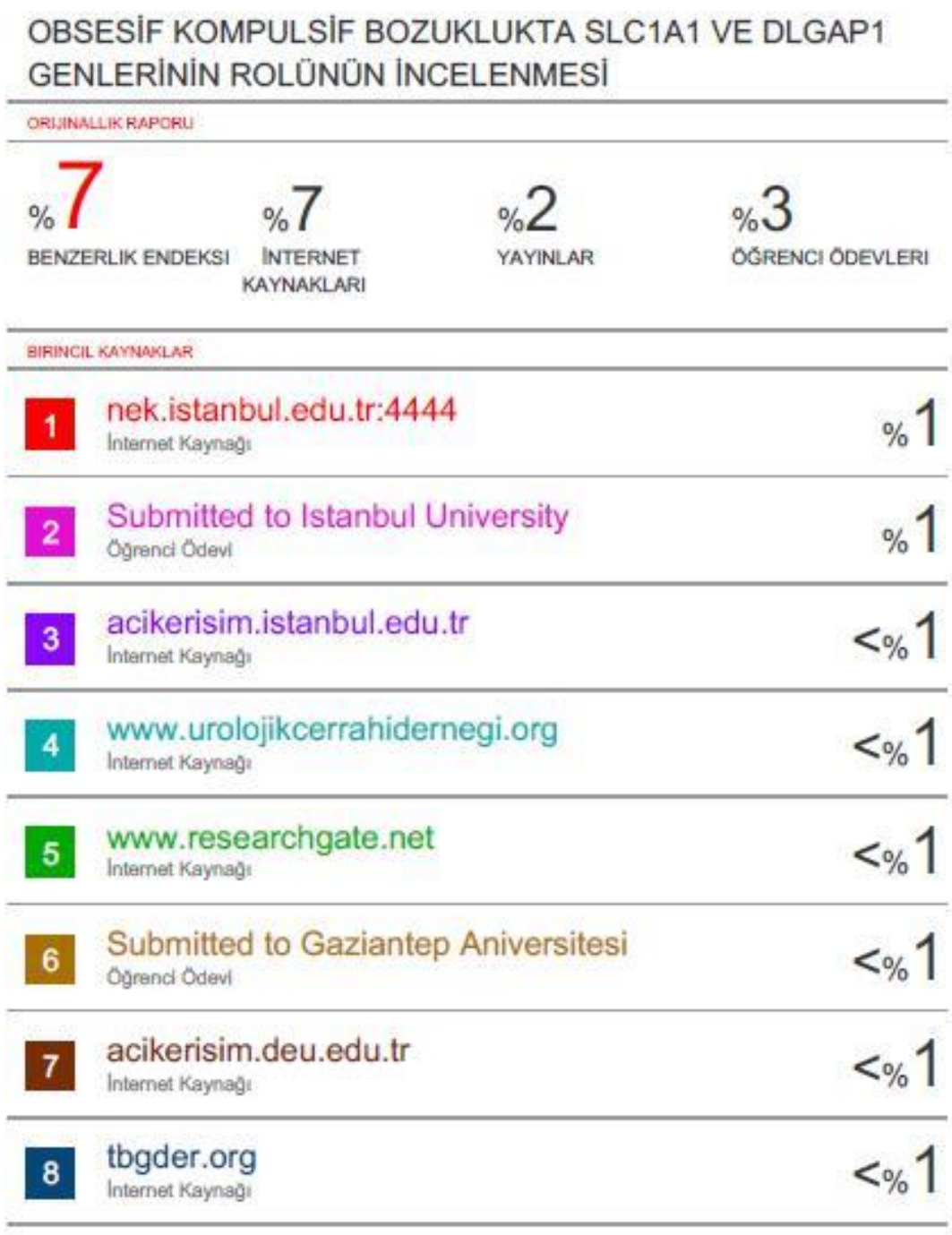
135. Krebs HA. Chemical Composition of Blood Plasma and Serum. *Annual Review of Biochemistry* 1950; **19(1):** 409–430.

136. https://www.abbkine.com/product/human-excitatory-amino-acid-transporter-3-slc1a1-elisa-kit-kte60620/

137. Peghini P, Janzen J, Stoffel W. Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J* 1997; **16(13):** 3822–3832.

138. Bailey CG, Ryan RM, Thoeng AD, Ng C, King K, Vanslambrouck JM ve ark. Loss-of-function mutations in the glutamate transporter SLC1A1 cause human dicarboxylic aminoaciduria. *J Clin Invest* 2011; **121(1):** 446-53.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



OBSESİF KOMPULSİF BOZUKLUKTA SLC1A1 VE DLGAP1 GENLERİNİN ROLÜNÜN İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%7	%7	%2	%3
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	www.urolojikcerrahidernegi.org İnternet Kaynağı	<%1
5	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	tbgder.org İnternet Kaynağı	<%1