

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)

Proje No : 18L0217001

Proje Yürütücüsü : Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN

Proje Başlığı : Şizofreni Hastalarında Klozapin Ve Norklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

GEREKÇESİ:

.../.../20..

Proje Yürütücüsü

Prof. H. Sinan Süzen

İmza

1946

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU**

Şizofreni Hastalarında Klozapin Ve Norklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi

Proje Yürütücüsünün İsmi

Prof.Dr. Halit Sinan Süzen

Yardımcı Araştırmacıların İsmi

Fezile Özdemir

Proje Numarası

18L0217001

Başlama Tarihi

16.05.2018

Bitiş Tarihi

16.05.2020

Rapor Tarihi

06.07.2020

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - 2020

1946

RAPOR FORMATI

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Türkçe Adı: Şizofreni Hastalarında Klozapin Ve Norklozapin Kan Plazma Düzeylerine ABCB1 3435C>T ve UGT1A4 L48V Polimorfizmlerinin Etkisi

İngilizce Adı: Determination of The Effect of ABCB1 C>T and UGT1A4 L48V Gene Polymorphisms on Clozapine and Norclozapine Blood Levels in Schizophrenic Patients

Özet: Klozapin (KLZ), tedaviye dirençli şizofreni hastalarında kullanılan atipik bir antipsikotiktir. Bu ilaç dar terapötik indekse sahip olması, çevresel ve biyolojik faktörlerin plazma ilaç düzeyine etkileri nedenleriyle kullanımda çeşitli sorunlarla karşılaşılabilir. Plazma KLZ seviyesindeki farklılıkların nedenleri arasında ilaç metabolizma enzimlerini kodlayan genlerdeki farklılıklar büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada KLZ metabolizmasında görev yapan *ABCB1* ve *UGT1A4* genlerindeki farklılıkların plazma KLZ ve ana metaboliti olan norklozapin (DKLZ) düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

Şizofren tanısı alan 105 hastada plazma KLZ ve DKLZ düzeylerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile miktar tayini yapılmıştır. Bu hastalardaki hedef gen polimorfizmleri ise polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi yöntemi ile analiz edilmiştir.

ABCB1 C3435T ve *UGT1A4* L48V polimorfizmi varyant allele frekansı sırasıyla %49 ve %13'tür. Bu çalışmada *ABCB1* CC, CT ve TT genotipine sahip olan bireylerde KLZ C/D düzeyi ortancası (\bar{x}) (Min; Maks) değerleri sırasıyla 1,18 ng/ml/mg (0,42 ng/ml/mg; 6,86 ng/ml/mg), 1,62 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) ve 1,41 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49) olarak bulunmuştur. *UGT1A4* T142G polimorfizminde TT ve TG+GG genotipine sahip bireylerde KLZ C/D \bar{x} (Min; Maks) sırasıyla 1,47 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) ve 1,33 ng/ml/mg (0,31 ng/ml/mg; 3,05 ng/ml/mg); DKLZ C/D düzeyleri \bar{x} (Min; Maks) ise sırasıyla 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,44 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 1,13 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. Ayrıca, her iki gen bölgesi kombine edildiğinde *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT genotipine sahip olan bireylerde hücresel atılımın ve eliminasyonun yavaş olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak her iki polimorfizm ve genetik kombinasyonların plazma KLZ ve DKLZ düzeylerine etkisinden elde edilen sonuçlardan, *ABCB1* ve *UGT1A4* genotiplerinin KLZ tedavisinde etkililiğinin artırılabilmesinin ve advers ilaç reaksiyonlarının minimuma indirilebilmesinin sağlanabilmesinde farmakogenetik analiz olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

Summary: Clozapine (KLZ) is an atypical antipsychotic which used in treatment-resistant schizophrenia patients. The various problems may be encountered in treatment due to KLZ has a narrow therapeutic index and the effects of environmental or biological factors on plasma drug levels. Differences in the genes encoding as a drug metabolism enzyme have major importance among the differences in plasma KLZ level. The aim of this study was to investigate the effects of *ABCB1* and *UGT1A4* genes on plasma CLZ and its main metabolite, norklozapine (DKLZ).

Plasma CLZ and DKLZ levels were quantified by high performance liquid chromatography in 105 patients with schizophrenia. Target gene polymorphisms in these patients were analyzed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method.

The variant allele frequency of *ABCB1* C3435T and *UGT1A4* L48V polymorphism is 49% and 13%, respectively. In this study, the mean values (\bar{x}) (min; max) of KLZ C/D in individuals with *ABCB1* CC, CT, TT genotypes were found 1,18 ng/ml/mg (0,42 ng/ml/mg; 6,86 ng/ml/mg), 1,62 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) and 1,41 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49). Also, KLZ C/D levels mean (\bar{x}) (min; max) were measured as 1,47 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) and 1,33 ng/ml/mg (0,31 ng/ml/mg; 3,05 ng/ml/mg); DKLZ C/D levels were found as 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) and 0,44 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 1,13 ng/ml/mg) for individuals with *UGT1A4* GG and *UGT1A4* TG+TT genotypes in *UGT1A4* T142G polymorphism. Furthermore, when both gene regions were combined, cellular excretion and elimination were found to be slow in individuals with *ABCB1* TT + *UGT1A4* TT genotype.

In conclusion, it was found that according to the effects of both polymorphisms and genetic combinations on plasma KLZ and DKLZ levels, the genetic analysis has the potential to be used to provide individual effective treatment by increasing efficacy in treatment and reducing adverse drug reactions.

II. Amaç ve Kapsam

Halüsinasyon, delüzyon, konuşma esnasında anlatılanlardan sık sık sapma veya anlatılanların tutarsız olması gibi pozitif belirtilerden en az birinin hastada gözlemlenmesi tanı koymada yol gösteren başlıca kriterlerdir. Bunların yanı sıra hastalarda gözlemlenebilecek en belirgin negatif semptomlar bireyin katatonik davranışlar sergilemesi, irade kaybı, bir aktiviteyi başlatma veya onu devam ettirip sonlandıramama sorunu, asosyal davranışlar ve duygusal ifadenin azalmasıdır [1]. Şizofreni belirtileri ve derecesi bireyler arasında farklılık gösterebilen, kalıtılabilirliği yüksek bir hastalıktır. Şizofreni

prevalansı dünya genelinde 1000'de 3- 7 arasında değişiklik göstermekte, ortalama yaşam boyu prevalansı 4/1000 olup, yaşam boyu hastalık riski 1000'de 7,2'dir [1, 2]. Türkiye'de şizofreni ilgili yayınlardan elde edilen verilerin değerlendirildiği bir çalışma sonucunda Türkiye'deki yaşam boyu şizofreni sıklığı 8,9/1000 olarak belirlenmiş olup diğer ülkelere göre prevalans yüksek bulunmuştur [3].

KLZ özellikle diğer antipsikotiklere yanıt vermeyen tedaviye dirençli hastalarda kullanılmakta olup özellikle şizofreni hastalarında intihar davranışlarını ve girişimlerini azaltması ile birlikte saldırganlık, şiddet davranışlarında da azalmaya neden olduğu için tercih edilmektedir [4, 5].

Terapötik indeksi dar olan KLZ'ne 12,5 mg/gün olarak başlanması önerilmekte ve ortalama olarak 300- 400 mg/güne kadar doz artırılabilir. Bazı hastalarda yanıt alınmadığından doz en fazla 900 mg/güne kadar artırılabilirken, bazı hastalarda ise 100- 250 mg/gün gibi düşük dozlarda etkin tedavi sağlanabilmektedir [6, 7]. KLZ dar terapötik aralığa sahip bir ilaç olup genel olarak ortalama terapötik KLZ plazma düzeyi 350- 600 ng/ml arasında değişebilmektedir. KLZ plazma düzeyinin 600-1000 ng/ml ve üzerindeki plazma KLZ düzeylerine çıktıkça advers etkilerin şiddeti ve türü değişmektedir [7, 8]. KLZ kullanımında daha çok metabolik yan etkiler gözlemlenirken, KLZ gibi ikinci jenerasyon antipsikotikler daha az ekstrapiramidal yan etkilere neden olmaktadır [9]. KLZ kullanımında ortaya çıkan bazı yan etkiler doza bağımlı olarak gelişmekteyken, hayati tehdit edici hale gelebilen agranülositoz gibi bazı yan etkiler ise doza bağımlı olmaksızın ortaya çıkabilmektedir [10].

Doza bağımlı advers etkilerin oluşumunun engellenmesi için düzenli olarak hastalarda, özellikle de ilaca yeni başlayan hastalarda plazma KLZ düzeyleri düzenli olarak kontrol edilmelidir [11, 12]. Amerika'da ilacın kullanılmasına başladıktan sonra ilk altı hafta haftalık olarak sonraki zamanlarda ise iki haftada bir olacak şekilde; İngiltere'de ise ilk on sekiz hafta düzenli olarak, sonrasında ilk bir yıl iki haftada bir ve daha sonraki zamanlarda ayda bir KLZ plazma düzeylerinin ölçülmesi önerilmektedir [11]. Kısaca, plazma KLZ seviyesi dar bir terapötik aralıkta tutulabilir ve hastalarda KLZ seviyesini düzenli olarak ölçerek olumsuz etkileri en aza indirerek etkili tedavi sağlanabilir.

KLZ oral yoldan verilir, yarılanma ömrü yaklaşık 12 saattir ve aktif metaboliti KLZ'den daha uzundur [3]. KLZ'nin biyoyararlanımı % 60- 70 civarındadır [4]. Oral olarak alınan KLZ'nin % 92 -95'i plazma proteinleri tarafından taşınır [10, 13]. KLZ ve onun aktif metaboliti DKLZ hücre içinden hücre dışına ABCB1 proteini ile taşınmaktadır [14, 15]. KLZ'nin % 50- 73'ü ilk geçiş metabolizmasından sonra sistemik dolaşıma geçerken KLZ'nin% 27- 47'si metabolik değişiklik olmadan sistemik dolaşıma girmektedir [13, 16].

KLZ'nin iki aktif metaboliti vardır. Emilen KLZ'nin % 75- 90'ı ana aktif metaboliti N-desmetil KLZ'ye (DKLZ) metabolize olurken % 10- 35'i diğer aktif metaboliti N-oksit KLZ'ne dönüştürülür [10]. KLZ esas olarak CYP3A4 tarafından N-oksit KLZ'ne oksitlenir, ancak bu reaksiyon geri dönüşümlü olduğu için N-oksit KLZ oranı oldukça düşüktür [15]. DKLZ esas olarak CYP1A2 tarafından

metabolize edilir, ayrıca CYP3A4, CYP3A3, CYP2C9, CYP2C19 ve FMO3 ile katalize edilebilir[5, 13]. Daha sonra metabolitler esas olarak daha polarize bir glukuronid konjugatı olarak UDP glukuronil transferaz (UGT) 1A4 ile elimine edilir [13].

Kısacası farmakolojik tedavi şizofreninin tedavisinde hayati önem taşımakta olup KLZ genellikle agranülositoz oluşturma riskinden dolayı daha az tercih edilse de hastaların %10- 30'u tipik antipsikotiklere yanıt vermemekte ve direnç gösteren bu hastalarda KLZ etkin tedavinin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır [9]. Dolayısıyla tedaviye direnç gösteren hasta gruplarında etkin tedavinin tek çaresi olan KLZ'nin sürekli olarak plazma düzeylerinin takibi ile KLZ'nin hücresel taşınmasında görev alan ABCB1 proteini ve atılımında görev alan UGT1A4 proteinlerinin birlikte değerlendirilmesi advers etkilerin en aza indirgenerek etkin tedavinin sağlanabilmesinde büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle araştırmamızda KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ plazma düzeyleri ölçülerek *ABCB1* gen bölgesinde yer alan C3435T ve *UGT1A4* gen bölgesinde yer alan L48V polimorfizimlerinin bu düzeylere olan etkisi araştırılması ve bu polimorfizimlerin saptanması için genotip analiz yöntemlerinin kurulması amaçlanmıştır.

Böylelikle farmakogenetik olarak KLZ kullanan ve *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4* L48V gen polimorfizimlerinden dolayı risk grubunda değerlendirilebilecek hastalar ayırt edilerek, söz konusu hastalarda güvenilir ve etkin bir tedavi sunulabileceği düşünülmektedir.

III. Materyal ve Yöntem

Çalışma Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Anabilim Dalı ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı arasında işbirliği içinde yürütülmüştür. Araştırma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, burada Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V, DSMV) ölçütlerine göre şizofreni tanısı almış ve KLZ tedavisi görmekte olan yüz beş hastada prospektif çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. Psikiyatristlerin hastalarla yaptıkları görüşmeler sonucunda klinik değerlendirmeler ve veriler elde edilmiş, ardından hastalara çalışma hakkında yeterli bilgiler verilerek bilgilendirilmiş olur formları imzalatılmıştır. Hastaların demografik bilgileri (cinsiyet, boy, kilo, yaş, ilaç dozları, sigara ve kafein tüketim miktarları) ile kan numuneleri rızaları alındıktan sonra elde edilmiştir. Çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'un 11.12.2017 tarih ve 20-1266-17 karar no' lu izni ile gerçekleştirilmiştir.

Bireylerden heparinli tüp içerisine alınan periferik 10 ml kan örneği 24 saat içerisinde 2500g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve buffy coat ayrılarak analiz süresinceye kadar -80°C'de bekletilmiştir. Plazmadan KLZ ve DKLZ'in kantitatif analizi, buffy coat'tan ise genomik DNA elde edilerek buradan genotipleme analizleri yapılmıştır.

Elde edilen buff coat'tan yüksek-tuz metodu kullanılarak genomik DNA elde edilmiştir. İzole

edilen DNA molekülleri, deney aşamasına kadar -20°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. ABCB1 ve UGT1A4 gen bölgelerinde yer alan polimorfizmleri içeren bölgeler Techne Tc512 Thermal Cycle PZR cihazı kullanılarak çoğaltılırken, ABCB1 C3435T ve UGT1A4 L48V polimorfizmlerinin belirlenmesi için restriksiyon parçası uzunluk polimorfizm (RPUP) yöntemi kullanılmıştır. Amplifikasyon ve kesim ürünleri elektroforez sistemi ile yürütülmüş Syngene jel görüntüleme cihazı ile görüntülenerek genotip aydınlatılması yapılmıştır.

KLZ ve onun aktif metaboliti DKLZ'in plazma konsantrasyonlarının belirlenmesi için plazma numuneleri sıvı-sıvı ekstrakte edildikten sonra Agilent 1100 HPLC cihazı kullanılarak Kinetix C18, 150 mm x 4.6 mm; 5 µm (Phenomenex, Torrance CA, USA) kolonlar yardımıyla ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri IBM SPSS 21.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

IV. Analiz ve Bulgular

ANALİZ

DNA Miktarı ve DNA Saflığının Tayini

İzole edilen DNA'ların kantitatif analizi için Pher biri yaklaşık 100 µl'lik numuneden 5 µl alınarak spektrofotometrede 260 nm'de ve 280 nm'de absorbans değerleri tespit edilmiştir. 260 nm'de elde edilen değerler DNA miktarını verirken, 260 nm'de elde edilen değer 280 nm'de elde edilen değere bölünmesiyle elde edilen orandan DNA saflık tayini yapılmıştır. Saflığın belirlenmesinde numunelerden elde edilen oran değerler 1,7 - 2,0 arasında bulunmuştur. Bu da DNA'ların yeterli saflıkta elde edildiğini göstermiştir. İstenilen konsantrasyon ve saflığa sahip olmayan numuneler çalışma dışı bırakılmıştır.

PZR Metodu ile ABCB1 Gen Bölgesinin Çoğaltılması

ABCB1 geni 170 kDa olup 7. kromozomda q21.12 pozisyonunda yer almaktadır ve 1280 amino asidi kodlayan 28 ekzon bölgesi içermektedir [17, 18]. ABCB1 geni üzerinde yer alan ve yaygın olarak çalışılan polimorfizmlerden biri C3435T polimorfizmidir [19, 20]. C3435T polimorfizmi ABCB1 gen bölgesinde 26. ekzonda izolösin amino asitini kodlayan 1145. kodonun üçüncü pozisyonunda sitozin (C) nükleotidinin timin (T) nükleotidine (AUCC > AUTT) dönüşmesine neden olan sessiz bir mutasyondur (rs 1045642) [19, 21].

Tüm PZR komponentleri optimizasyon çalışmaları sonucunda hedef ABCB1 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programı ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 1 ve Çizelge 2'de verilmiştir.

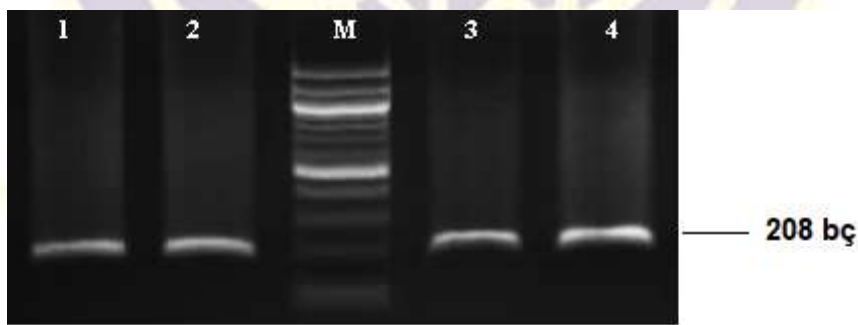
Çizelge 1. ABCB1 hedef gen bölgesinin PZR’nda kullanılan bileşikler ve konsantrasyonları

Gen Bölgesi	Bileşen	Reaksiyon hacmi (µl)	Ana stok konsantrasyonu
ABCB1	10 X Tampon	2,5	10 X Tampon Amonyum, 15 mM Mg
	Magnezyum	1	25 mM
	dNTP	3	0,125 mM
	F primer - R primer	1,25 - 1,25	10 pmol
	Taq	0,3	5 U/µl
	DNA	5	100 ng

Çizelge 2. ABCB1 geninin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği koşullar

Gen bölgesi	Forward ve Reverse Primerler	Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü	PZR ürünü baz çifti uzunluğu
ABCB1	5'-TTGATGGCAAAGAAATAAAGC-3' 5'-CTTACATTAGGCAGTGA CTGC-3'	Başlangıç denatürasyonu	94° C	5 dak	1	208 bç
		Denatürasyon	95° C	1.5 dak	35	
		Primerlerin bağlanması	55° C	1 dak		
		Uzama	72° C	1.5 dak		
		Son uzama	72° C	7 dak	1	

PZR metodu sonucunda elde edilen 208 baz çiftlik ABCB1 gen bölgesi ürünü Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. ABCB1 gen bölgesine ait 208 bç’lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 100 bç DNA ladder)

ABCB1 C3435T Polimorfizminin RPUP Analizi ile Belirlenmesi

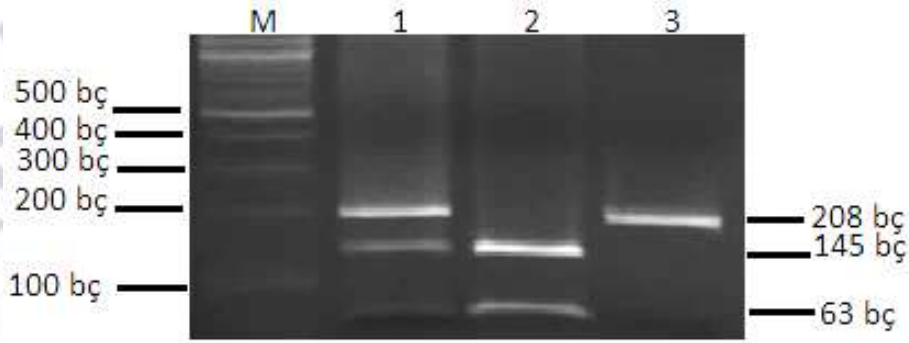
MboI restriksiyon enziminin tanıma bölgeleri 5' ↓GATC 3' ve 3' CTAG↓ 5' olup C3435T polimorfizminin ABCB1 gen bölgesi üzerinde olduğu yerde yer almaktadır. *MboI* enziminin ABCB1 gen bölgesinde bu tanıma bölgelerini ayırt etmesi durumunda bu bölgelerden kesim yaparak farklı uzunluklarda fragmentler oluşturmaktadır. Polimorfizme bağlı olarak tanıma bölgesini ayırt edememesi durumunda ise ürünler kesilmeden kalacaktır. ABCB1 geni için RPUP reaksiyon koşulları ve miktarları

Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. *ABCBI* geni için RPUP reaksiyon koşulları ve miktarları

<i>ABCBI</i> RPUP	Miktarlar	Çalışma sıcaklığı	Çalışma süresi
PZR ürünü	17 µl	37°C	Gece boyu
<i>Mbol</i> enzim	1 µl		
<i>Mbol</i> tampon	2 µl		
Toplam hacim	20 µl		

Genotip sonuçları agaroz jelde UV dedektör altında farklı uzunluklara sahip 3 banda göre belirlenmiştir. Şekil 2'de gözlemlendiği gibi 145 bç ve 63 bç uzunluğunda bantlara sahip numuneler CC, 208 bç, 145 bç ve 63 bç fragmentler gözlenen örnekler CT, 208 bç uzunluğunda bant veren numuneler ise TT olarak genotiplendirilmiştir.



Şekil 2. *ABCBI* C3435T polimorfizmi RPUP analizi jel görüntüsü (M:100bç DNA ladder, 1:CT (208+ 145+ 63 bç); 2: CC (145+ 63 bç); 3: TT (208 bç))

PZR Metodu ile *UGT1A4* Gen Bölgesinin Çoğaltılması

UGT1A gen bölgesi 200 kb olup insanlarda 2. kromozomda yer alan *UGT1A4* (UDP glukuronil transferaz 1 ailesi, polipeptit A)'ün de içerisinde yer aldığı 9 farklı geni kodlamaktadır [22, 23]. Birinci ekzonda 142. pozisyonda Timin (T) nükleotitinin Guanine (G) transversiyonu (142 T>G) sonucunda 48. amino asiti kodlayan kodonun 1. pozisyonundaki nükleotit değişimi sonucu (**T**TG > **G**TG) lösin (L) yerine valin (V) amino asiti (L48V) sentezlenmesi ile meydana gelmektedir. Tek nükleotid değişimi sonucunda oluşan bu polimorfizm *UGT1A4**3 veya *UGT1A4* L48V polimorfizmi şeklinde ifade edilmektedir (rs 2011425) [22, 24]. Lösin amino asidi yerine valin amino asidi gelmesi sonucunda *UGT1A4* enziminin substrat bağlanma bölgesinde etilen grubuna bağlı bir sterik değişiklik meydana gelmekte ve bu da enzimin substrata bağlanmasında etki edebilmektedir [25].

Tüm PZR komponentleri optimizasyon çalışmaları sonucunda hedef *UGT1A4* gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PZR programı ve amplifikasyon koşulları sırasıyla Çizelge 4 ve Çizelge 5'te verilmiştir.

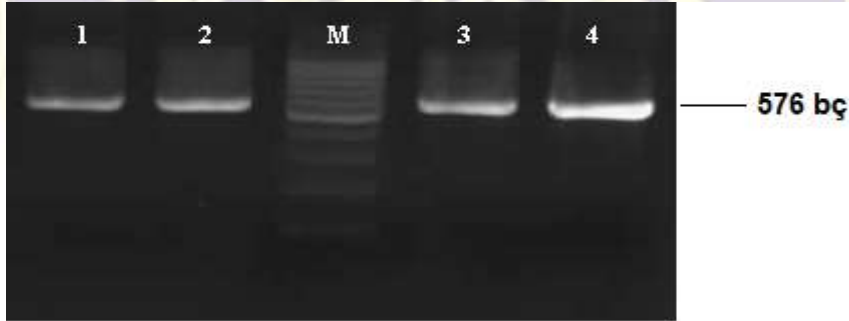
Çizelge 4. *UGT1A4* hedef gen bölgesinin PZR’nda kullanılan bileşikler ve konsantrasyonları

Gen Bölgesi	Bileşen	Reaksiyon hacmi (µl)	Reaksiyon konsantrasyonu
<i>UGT1A4</i>	10 X Tampon	2,5	10 X Tampon Amonyum, 15 mM Mg
	dNTP	3	0,125 mM
	F primer - R primer	1 - 1	10 pmol
	Taq	0,2	5 U/µl
	DNA	4	100 ng

Çizelge 5. *UGT1A4* geninin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği koşullar

<i>UGT1A4</i>	5'-GTTGGGCCATAACGAAAGGCAGTT-3' 5'-GCTCCACACAACACCTATGAAG-3'	Başlangıç denatürasyonu	94° C	2 dak	1	576 bç
		Denatürasyon	94° C	30 san	40	
		Primerlerin bağlanması	59° C	30 san		
		Uzama	72° C	45 san		
		Son uzama	72° C	7 dak	1	

PZR metodu sonucunda elde edilen 576 baz çiftlik *UGT1A4* gen bölgesi ürünü Şekil 3’te verilmiştir.



Şekil 3. *UGT1A4* gen bölgesine ait 576 bç’lik PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: 100 bç DNA ladder).

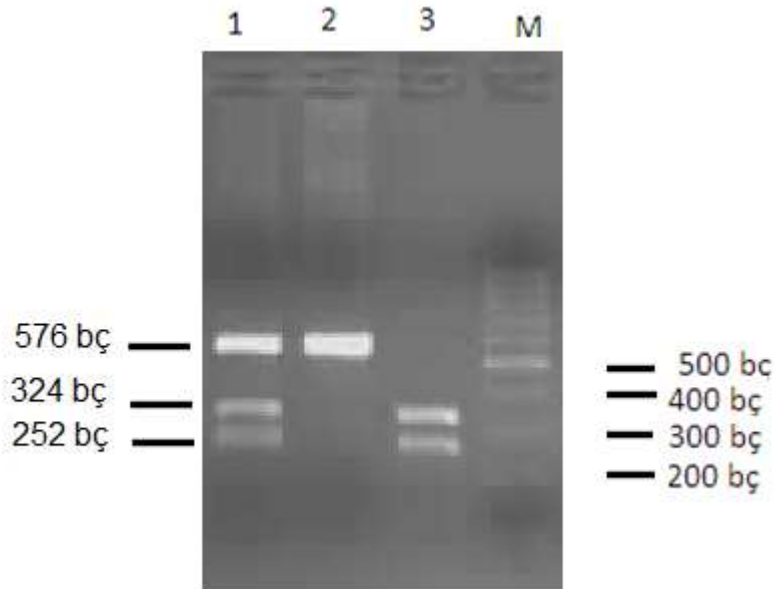
UGT1A4 L48V Polimorfizminin *Eco147I* Restriksiyon Enzimi ile Belirlenmesi

UGT1A4 gen bölgesinde yer alan T142G polimorfizmi *Eco147I* restriksiyon enzimi tanıma bölgesi olan 5' AGG↓CCT 3' ve 3' TCC↓GGA 5' bölgesinde bulunmaktadır. Kesim bölgesinde yer alan tek nükleotit değişimine bağlı olarak enzim kesim bölgesini tanıya bilmekte ve kesim gerçekleştirebilmekte, aksi durumda ise kesimi gerçekleştirememektedir. *UGT1A4* için uygun RPUP reaksiyon koşul ve miktarları Çizelge 6’ da verilmiştir.

Çizelge 6. *UGT1A4* geni için RPUP reaksiyon koşulları ve miktarları

<i>UGT1A4</i> RPUP	Miktarlar	Çalışma sıcaklığı	Çalışma süresi
PZR ürünü	15 µl	37°C	Gece boyu
<i>Eco147I</i> enzim	1 µl		
<i>Eco147I</i> tampon	2 µl		
Distile su	5 µl		
Toplam hacim	20 µl		

Şekil 4'te verildiği gibi kesim sonucunda agaroz jelde fragmentlerin uzunluklarına göre TT, TG ve GG genotipleri belirlenmiştir. Yabani (TT, Leu/Leu), heterozigot (TG, Leu/Val) ve varyant (GG, Val/ Val) genotipler için agaroz jelde gözlemlenen fragment uzunlukları sırasıyla 324+ 252 bç, 576+ 324+ 252 bç ve 576 bç'dir.



Şekil 4. *UGT1A4* L48V polimorfizmi RPUP analizi agaroz jel görüntüsü M:100bç DNA ladder, 1: TG (576+ 324+ 252 bç); 2: GG (576 bç); 3: TT (324+252 bç).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi ile Klozapin ve Norklozapinin Analizi

En uygun KLZ ve DKLZ plazma ekstraksiyonu için farklı akış hızları, pH ve mobil fazlar kullanılarak KLZ ve DKLZ'in geri kazanımının en yüksek olduğu en iyi yöntem seçilebilmesi için optimizasyon denemesi yapılmıştır. İlk olarak tampon çözeltinin pH'ı 4 olarak denenmeye başlandı, ardından denemeler sonucunda pH 3'te piklerin kuyruk oluşturmadığı ve pikler arasında aralıklar daha çok olduğu için pH 3'ün daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

Standartların hazırlanmasında ise metanol ve hareketli faz karşılaştırılmıştır. Metanol kullanıldığında ilk dakikalarda gelen piklerin hareketli faz kullanıldığında gelen piklere göre daha çok

olduğu bulunmuştur. Bu nedenle hareketli faz ile standartların hazırlanmasına karar verilmiştir.

Bunun yanı sıra Çizelge 7’de verilen sıvı- sıvı ekstraksiyon çözeltileri teker teker denenmiş; bunlardan 95: 5 (h:h) oranında n-hekzan- izoamilalkol karışımı ile kloroformla yapılan ekstraksiyon yöntemleri arasında kalınmıştır. Kloroformla ekstraksiyon sinyal görüntü oranı oldukça düşükken, n-hekzan- izoamilalkol (95: 5; h/h) karışımında ise ekstraksiyon verimi oldukça yüksekti, bu nedenle 95: 5 oranında n-hekzan- izoamilalkol karışımı ile sıvı- sıvı ekstraksiyon yapılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 7. KLZ ve DKLZ için en uygun olan sıvı - sıvı ekstraksiyonu için denenmiş olan çözeltiler

n-hekzan içeren	Kloroform içeren	Diğerleri
n-hekzan- İzoamilalkol (99: 1; h/h)	Kloroform- İzoamilalkol (95: 5; h/h)	Metil tert bütül eter
n-hekzan- İzoamilalkol (98: 2; h/h)	Kloroform- İzoamilalkol (90: 10; h/h)	Dietileter
n-hekzan- İzoamilalkol (95: 5; h/h)	Kloroform- İzopropanol (95: 5; h/h)	Diklorometan
n-hekzan- İzoamilalkol (90: 10; h/h)	Kloroform	Etilasetat
n-hekzan- İzopropanol (90: 10; h/h)		

YPSK için Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Tampon Çözeltisi: 500 ml bidisitile su içerisine % 0,1 fosforik asit ve % 0,1 trietilamin eklendi ardından 0.1 M potasyum hidroksit (KOH) ile pH 3’e ayarlandı. Çözelti içinde bulunan ve gözle görünmeyen kolona zarar verebilecek maddeleri uzaklaştırmak için selüloz asetat filtreden vakum yardımıyla süzüldü.

Hareketli Faz: Kolonda analitin hareketini sağlayan hareketli faz, 70: 30 (h:h) oranında tampon çözelti- asetonitril karışımı olacak şekilde hazırlandı. Ardından içerisindeki oksijenden kaynaklanan gaz kabarcıklarının giderilmesi için 10 dakika ağzı kapalı şekilde ultrasonik banyo içerisinde bekletilerek degaze edildi.

Durgun Faz: Kolon materyali analizdeki durgun fazdır. Çalışmada kullanılan kolon Kinetix C₁₈, 150 mm x 4.6 mm; 5 µm (Phenomenex, Torrance CA, USA)’dir.

Standart Solüsyonlarının Hazırlanması: KLZ ve DKLZ ana stokları 0,01 g KLZ ve DKLZ hassas terazide tartılarak ayrı ayrı 1 L metanol içerisinde çözülerek her bir çözelti 0,01 mg/ml (1000ng/ml= 10ppm) olacak şekilde hazırlandı. Ardından Çizelge 8 ve Çizelge 9’da verilen şekillerde sırasıyla DKLZ ve KLZ standart solüsyonları hazırlandı.

Çizelge 8. Standart DKLZ solüsyonlarının hazırlanması

Stok DKLZ alınan miktar	Mobil faz miktarı	Stok Standart DKLZ solüsyonu
2 µl	200 µl	10 ng/ml
5 µl		25 ng/ml
10 µl		50 ng/ml

20 µl		100 ng/ml
40 µl		200 ng/ml
60 µl		300 ng/ml
100 µl		500 ng/ml
200 µl		1000 ng/ml

Çizelge 9. Standart KLZ solüsyonlarının hazırlanması

Stok KLZ alınan miktar	Mobil faz miktarı	Stok Standart KLZ solüsyonu
4 µl	200 µl	20 ng/ml
10 µl		50 ng/ml
20 µl		100 ng/ml
40 µl		200 ng/ml
80 µl		400 ng/ml
120 µl		600 ng/ml
200 µl		1000 ng/ml
400 µl		2000 ng/ml

KLZ ve DKLZ Kalibrasyon Standartlarının Hazırlanması: Herhangi bir ilaç içermeyen boş 500 µl'lik plazmaya 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500 ve 1000 ng/ml DKLZ ve 20, 50, 100, 200, 400, 600, 1000, 2000 ng/ml olacak şekilde KLZ standart solüsyonları eklenerek sıvı- sıvı ekstraksiyon yapılarak cihaza verildi. Kalibrasyon standartlarına tekrardan ihtiyaç duyulması halinde kullanılmak üzere en çok 5 gün kontaminasyonu engellemek için -80°C'de saklanmıştır.

Yıkama Solüsyonu: Asetonitril- distile su (60: 40/ h:h) karışımından oluşmaktadır.

YPSK'de KLZ ve DKLZ analizinde teknik özellikler Çizelge 10'da özetlenmiştir.

Çizelge 10. KLZ ve DKLZ analizinde YPSK teknik özellikleri

Cihaz	Agilent 1100 HPLC
Kolon	Kinetix C ₁₈ , 150 mm x 4.6 mm; 5 µm (Phenomenex, Torrance CA, USA)
Enjeksiyon hacmi (µl)	10
Taşıyıcı faz akış hızı aralığı (ml/dak)	1
Kolon sıcaklığı	25°C
Dedektör/ dalga boyu (nm)	UV/ 220
DKLZ Alıkonma süresi (dak)	3,061
KLZ Alıkonma süresi (dak)	3,727

Sıvı- Sıvı Ekstraksiyon Yöntemi ile Numunelerin Hazırlanması

1. - 80°C'de muhafaza edilen plazma +4°C'ye çıkarılarak çözünmesi sağlandı.
2. 500 µl plazma 15 ml'lik falkon tüplerine alınarak üzerine 8 ml 95: 5 oranında n-hekzan:

izoamilalkol karışımı ile 200 µl 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) eklenir. Bu aşamada proteinlerin çökerek plazmada proteinlere bağlı bulunan KLZ ve DKLZ'in mobil faza geçmesi sağlanır.

3. Numunler 1 dakika vortekslenir ve 40 rpm'de rotatörde 10 dakika döndürülür. Ardından 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek peletin dibe çökmesi sağlanır.
4. Süpernatant kısmı ekstrakte edilmek üzere yeni 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılır.
5. Süpernatant üzerine 200 µl 0,1 M hidroklorik asit (HCl) eklenir.
6. Numune 1 dakika vortekslenir. 10 dakika 40 rpm'de rotatörde döndürülmesinden sonra 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
7. Bu sefer altta kalan yaklaşık 200 µl olan sulu faz mikropipetle çekilerek içerisine insert yerleştirilen viale aktarılarak cihaza yerleştirilir.

Cihazın Ölçüm için Hazırlanması ve Numunelerin Okutulması

1. Kolonun yıkanması, kolonun doygunluğa ulaşması ve sistemin dengeye gelmesi için 3 ml/dak akış hızı ile mobil faz cihaza verilir.
2. Akış hızı 1 ml/dak düşürülür. Ardından cihaza her bir KLZ ve DKLZ kalibrasyon standartları her seferinde 20 µl enjekte edilecek şekilde en az üç kez cihaza verildi ve her iki madde için ayrı ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulur.
3. Hastalara ait plazmalar sıvı- sıvı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilerek elde edilen numuneler, içerisine insert yerleştirilen viale yaklaşık 200 µl olacak şekilde aktarılarak otoörnekleyiciye yerleştirildi. Her bir numune en az üç kez okutuldu.
4. Ölçüm sonunda kolondaki materyallerin ve mobil fazın giderilmesi için 20 dakika boyunca akış hızı 3 ml/dak olacak şekilde cihaza verilerek sistemin temizlenmesi sağlanarak cihaz kapatıldı.

Validasyon Çalışmaları

Teşhis Sınırı (LOD)

Zemin gürültüsünden farklı olarak saptanan ve miktarı belirlenemeyen kantitatif sınırlar içerisinde bulunmayan en düşük analit derişimi teşhis sınırıdır (LOD- Limit of Detection). Sinyal/gürültü oranı 3 alındığında, aşağıdaki denklemden LOD değeri hesaplanarak bulunabilir.

$$LOD= 3.3 \times SD/m$$

SD: Boş ya da düşük derişimdeki analit çözeltisinin standart sapması

m: kalibrasyon eğrisinin eğim değeri ($y= mx+n$).

Tayin Alt Sınırı (LOQ)

Uygun kesinlik ve doğrulukla miktarı tespit edilebilen en küçük analit miktarı veya doğrusallığın en alt konsantrasyonunu oluşturan değer tayin alt sınırıdır (LOQ- Limit of Quantitation). Sinyal/ gürültü

oranı 10 olarak alındığında LOQ değeri şu şekilde hesaplanır;

$$LOQ= 10 \times SD/m$$

SD: Boş ya da düşük derişimdeki analit çözeltisinin standart sapması.

m: kalibrasyon eğrisinin eğim değeri ($y= mx+n$).

Özgünlük (Spesifite)

Kullanılan analitik yöntemin sadece analiz edilmesi hedeflenen maddeyi ya da maddeleri tespit edebilme kabiliyeti olup sayısal karşılığı yoktur. Yani kullanılacak olan analitik yöntem sadece analiz edilecek maddeyi tespit edebilme özelliğinde olmalıdır, diğer fiziksel ya da kimyasal özellikteki interfere edici maddelerden etkilenmemelidir.

Seçicilik (Selektivite)

Ortamda bulunan fiziksel veya kimyasal kaynaklı girişim veya engelleyicilerin (interfere edicilerin) bulunduğu durumda hedeflenen analitin doğru bir şekilde tespit edilebilmesidir. Kısacası, ortamda bulunan başka maddeler varlığında analitik metodun sadece hedeflenen maddeyi analiz edebilme yeteneğidir.

Doğruluk (Accuracy)

Analiz edilen numunenin, bağımsız laboratuvarlar tarafından onaylanan, derişimi bilinen standart referans maddelerin okutulmasıyla elde edilen doğru veya doğru olarak belirtilene yakınlığını gösterir. Bir yöntemin doğruluğunun belirlenmesinde geri kazanım ve kesinlik oldukça önemlidir.

Geri Kazanım (Recovery)

Numune içinde analiz edilecek maddenin tayin edilen miktarının, saf analit çözeltisine göre ne kadar verimle geri kazanıldığının belirlenmesidir. Geri kazanım, üç farklı derişimi bilinen standart analitin herhangi bir ilaç içermeyen boş plazmaya eklenmesi ve bunun ekstrakte edildikten sonra cihazda üçer kez tayin sonucunda elde edilen sonuçlarının bilinen miktarla karşılaştırılması sonucu % hata olarak verilen değerdir. Ölçümün sistematik hatası (bias), ölçüm sonucunda elde edilen ortalama değer ile gerçek değer arasındaki fark ($D= Cs-C_{ref}$) ile belirlenir. Sistemik hatanın da gerçeğe yakınlık yüzdesinden bağıl hata hesaplanır. Geri kazanım aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\% \text{ geri kazanım} = (C_u / C_s) \times 100$$

Cu: Analiz sonucunda elde edilen derişim

Cs: Bilinen ya da standartların okutulması sonucunda elde edilen derişim

KLZ ve NKLZ için ortalama değerlerin, % geri kazanımı, sistemik hata ile bağıl hatayı

hesaplamak için boş plazmaya her bir konsantrasyondan 3 adet olacak şekilde sırasıyla 100- 400- 1000 ng/ml KLZ ve 50- 200- 500 ng/ml DKLZ uygulanarak, sıvı- sıvı ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ardından bu numuneler üçer kez cihaza okutulmuştur. % geri kazanım, ortalama değerler, sistemik hata (bias) ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri hesaplanmıştır.

Kesinlik (Precision)

Kesinlik, ölçüm sonucunda elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Ölçüm sonucunda elde edilen değerlerin, daha sonra ölçüm aynı cihaz, aynı kimyasallar, aynı kişi ve aynı laboratuvarında 2- 3 farklı derişimin ard arda 5-6 ölçümünün aynı gün içinde (intraday) ve belirli aralıklı günlerde (interday) ölçülmesi sonucunda elde edilen değerlerin birbirine yakınlığını yani tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Elde edilen sonuçların standart sapmaları değerleri burada önemlidir.

Herhangi bir ilaç içermeyen boş plazmaya düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda olacak şekilde sırasıyla 100- 400- 1000 ng/ml KLZ ve 50- 200- 500 ng/ml DKLZ uygulanarak, sıvı- sıvı ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ardından bu numuneler gün içi tekrarlanabilirlik için sabah ve akşam ve günler arası tekrarlanabilirlik için de 3 farklı gün olacak şekilde KLZ ve DKLZ tayini yapılmıştır. KLZ ve DKLZ için ayrı ayrı standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri hesaplandı.

Doğrusallık (Linearity)

Analitin derişimine karşılık dedektör cevabının doğru orantılı olarak artmasıyla elde edilen grafikte sonraki ölçümlerin doğru üzerinde veya doğruya yakın olarak elde edilmesidir. Elde edilen eğrinin eğimi, kesişim noktaları ve korelasyon katsayısı (R^2) doğrusallığın belirlenmesinde kullanılmakta olup R^2 'nin bire yakın olmas istenir. Ayrıca konsantrasyona karşı cevap için doğrusal regresyon hattının y deklemleri ile korelasyon katsayısı ile de belirlenebilir.

LOD/ LOQ sonuçları ile tedavide KLZ ve DKLZ'in plazmada bulunabilme oranları göz önüne alınarak KLZ ve DKLZ için ölçüm aralığı sırasıyla 20- 2000 ng/ml ve 10 - 1000 ng/ml olarak belirlenmiştir. Her bir konsantrasyon enjekte edilerek X ekseninde yer alan konsantrasyon değerine karşılık gelen Y eksenindeki KLZ ve DKLZ alanları oranlanmıştır. Elde edilen plazma konsantrasyonlarının (C) hastalara verilen doza (D) oranlanmasıyla normalize edilmiş konsantrasyon değerleri (C/D) elde edilmiştir.

Çalışma Aralığı (Range)

Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük konsantrasyondaki değer ile doğrusallıkta sapmanın belirlendiği konsantrasyon arasında yer alan aralıktır.

Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Çalışma istatistiksel analizlerde SPSS 21.0 programından yararlanılmıştır. Nicel değişkenlerde ortalama (Ort)± standart sapma (SS) ve minimum (Min) ile maksimum (Maks) değerler verilirken, istatistiksel olarak normal dağılım göstermeyenler için ortanca (\tilde{x}), minimum (Min) ve maksimum (Maks) değerler verilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Her iki gen bölgesine ait genotip ve allel frekansları belirlenerek Hardy Weinberg uygunluk testi uygulandı. Elde edilen frekans verileri Türk populasyonunun da içinde yer aldığı beyaz ırktan ve diğer ırktan olan şizofreni gruplarının *ABCBI* ve *UGT1A4* genotip ve allel frekansları Fisher Exact Test ile karşılaştırıldı.

KLZ ve DKLZ plazma düzeylerinin (C), hastalara uygulanan KLZ dozuna oranlanmasıyla normalize edilmiş konsantrasyon değerleri (C/D) elde edildi. İstatistiksel analizlerde önce verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov- Smirnov Testi ile analiz edilmiştir. Her bir polimorfizm için bireyler homozigot yabancıl tip, heterozigot veya homozigot mutant genotip grupları halinde gruplara ayrıldı ve bu genotip dağılımları ile bireylere ait plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri, KLZ/ DKLZ oranları, KLZ C/D ve DKLZ C/D oranları ile gruplar ikili olduğundan Mann-Whitney U Testi ile karşılaştırılırken, grupların üçlü olması durumunda Kruskal Wallis Testleri ile karşılaştırılmıştır. Tüm analizler için anlamlılık değeri 0,05 olarak seçilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya Katılan Bireylerin Sosyodemografik Bilgileri

Çalışmaya toplamda 105 hasta katılmış ancak on bir hastaya ait numunede ilaç plazma kan düzeyleri ölçülebilir aralıkta olmadığından çalışma dışı bırakılmıştır. Böylece, çalışmamıza otuz dördü kadın altmış erkek olmak üzere 94 kişi katılmış olup bireylerin sosyodemografik bilgileri Çizelge 11'de verilmiştir. Bireylerden kan numuneleri son ilaç dozlarını aldıktan ortalama $10,68 \pm 3,29$ saat sonra kan numuneleri alınarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 11. Çalışmaya katılan bireylere ait demografik bilgiler

Özellikler		Sonuçlar
Cinsiyet		Kadın:34 (%36,2) Erkek: 60 (%63,8)
Yaş		40,19 ± 10,65 (20- 62)
Boy(cm)		170,73 ± 8,24 (155- 190)
Kilo(kg)		77,62 ± 16,92 (50-147)
BMI		26,51 ± 4,83 (17,36- 46,4)
Sigara Kullanımı	Hiç içmeyen ve Günde <7	52 (%55,3)
	Günde >7	42 (%44,7)
Kafein Kullanımı	0,4 g/gün'den az	48 (%51,1)
	0,4 g/gün'den çok	46 (%48,9)

Günlük kullanılan KLZ dozu (mg)

361,17 ± 180,82 (50- 800)

Genotip Analiz Sonuçları**ABCB1 C3435T Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları**

Genotip sonuçları agaroz jelde UV dedektör altında farklı uzunluklara sahip 3 banda göre belirlenmiştir. *MboI* restriksiyon enzimi *ABCB1* gen bölgesine ait 208 bç' lik PZR ürünlerini yabancı genotipin bulunması durumunda farklı uzunlukta fragmentlere ayırmıştır. 145 bç ve 63 bç uzunluğunda bantlara sahip numuneler CC, 208 bç, 145 bç ve 63 bç fragmentler gözlenen örnekler CT, 208 bç uzunluğunda bant veren numuneler ise TT olarak genotiplendirilmiştir.

KLZ kullanan hastalarda (n= 94), *ABCB1* C3435T polimorfizminin genotip frekansları CC, CT ve TT için sırasıyla % 25,5; % 47,9 ve % 26,6'dır. Allel frekansları ise C alleli için % 49, T alleli için ise % 51 olarak belirlenmiştir. Genotip frekanslarının gözlenen ve beklenen değerleri Çizelge 12'de verildiği gibi olup *ABCB1* C3435T polimorfizminin allel ve genotip sonuçlarının istatistiksel olarak Hardy- Weinberg dengesine uygun olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 12. ABCB1 C3435T polimorfizminin allel frekansları ile gözlenen ve beklenen genotip frekansları

Gen Bölgesi	Genotip	Gözlenen	Beklenen	Allel	χ^2	<i>p</i>
<i>ABCB1</i>	CC	24	23	C:0,49 T:0,51	0,17	0,68
	CT	45	47			
	TT	25	24			

UGT1A4 L48V Polimorfizmi Genotip Analiz Sonuçları

UGT1A4 gen bölgesinin 576 bç PZR ürünleri *T142G* polimorfizminin genotiplendirilebilmesi için *Eco 147I* restriksiyon enzimi ile 37°C'de gece boyu kesime bırakılmıştır. Kesim sonucunda agaroz jelde fragmentlerin uzunluklarına göre 324 + 252 bç yabancı (TT, Leu/ Leu), 576 + 324 + 252 bç heterozigot (TG, Leu/ Val) ve 576 bç varyant (GG, Val/ Val) olarak genotiplendirilmiştir.

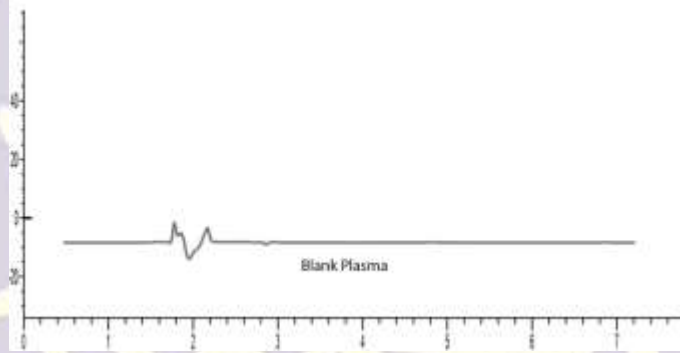
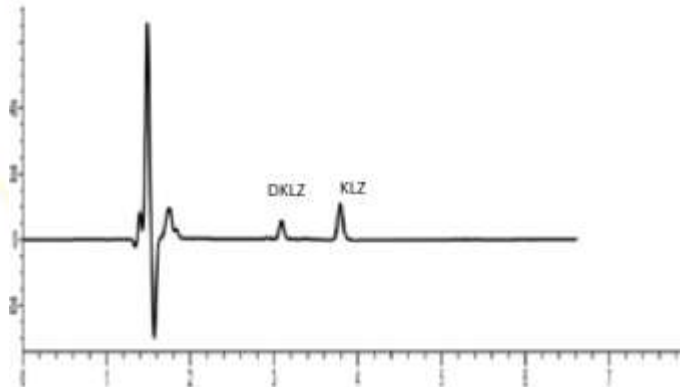
KLZ kullanan bireylere (n=94) ait *UGT1A4* geni *T142G* polimorfizmi sonucunda genotip frekansları TT %77,7; TG %19,1 ve GG %3,2 olarak belirlenirken GG genotipine sahip bireye rastlanmamıştır. T allel frekansı % 87 G allel frekansı ise %13 olarak belirlenmiştir. Genotip ve allel frekansları Hardy- Weinberg dengesi ile uyumlu bulunmuştur ($p > 0.05$). Allel frekansları ile genotip frekanslarının gözlenen ve beklenen değerleri Çizelge 13'de verilmiştir.

Çizelge 13. *UGT1A4*3* polimorfizminin allel frekansları ile gözlenen ve beklenen genotip frekansları

Gen Bölgesi	Genotip	Kodlanan Amino asit	Gözlenen	Beklenen	Allel	χ^2	<i>p</i>
<i>UGT1A4</i>	TT	Leu/ Leu	73	71,5	T:0,89	1,85	0,17
	TG	Leu/ Val	18	20,9	G:0,13		
	GG	Val/ Val	3	1,5			

Klozapin ve Desmetil Klozapin YPSK ile Tayin Sonuçları**Özgünlük ve Seçicilik**

KLZ ve DKLZ ölçümünde kullanılan yöntemin özgünlüğü ve seçiciliğinin kanıtlanması için KLZ ve DKLZ piklerinin elde edildiği kromatogram örnekleri ile boş plazma kromatogramları arasındaki farklılığın ispatlanması önemlidir. Şekil 5’te verilen kromatogram 220 nm dalga boyunda boş plazma numunesine ait, Şekil 6’da verilen kalibrasyon esnasında analiz edilen KLZ ve DKLZ eklenmiş plazmaya ait kromatogramdır.

**Şekil 5.** KLZ ve DKLZ içermeyen boş plazma numunesine ait kromatogram görüntüsü**Şekil 6.** 1 ppm KLZ ve DKLZ eklenmiş plazmaya ait kromatogram**Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Alt Sınırı (LOQ)**

KLZ ve DKLZ’nin LOD ve LOQ değerlerinin belirlenebilmesi için kalibrasyon eğrilerinde

kullanılan minimum konsantrasyon değerine sahip KLZ için 20 ng/ml, DKLZ için 10 ng/ml çözeltileri beş kez analiz edilerek elde edilen sonuçların standart sapmaları alınmıştır. KLZ için teşhis sınırı (LOD) 5,52 ng/ml, tayin alt sınırı (LOQ) ise 16,56 ng/ml olarak; DKLZ için de teşhis sınırı (LOD) 2,21 ng/ml, tayin alt sınırı (LOQ) ise 6,62 ng/ml olarak tespit edilmiştir.

Geri Kazanım (Recovery)

Uygulanan yöntemin doğruluğu geri kazanım çalışmaları ile analiz edilmiştir. KLZ ve DKLZ'nin 1 ppm'lik standartları boş plazmaya eklenerek geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 14'te verilmekte olup, elde edilen sonuçlara göre uygulanan biyoanalitik analizinin kabul edilebilir bir geri kazanım değeri vardır.

Çizelge 14. KLZ ve DKLZ geri kazanım değerleri

	KLZ	DKLZ
1 ppm	0.8699	0.8957
Geri Kazanım (%)	86.99	89.57
BIAS	13,01	10,43

* 5 enjeksiyonun ölçümü sonucunda elde edilen alan.

Kesinlik

Gün İçi Tekrarlanabilirlik (Intraday)

Gün içi tekrarlanabilirlik için gün içinde düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan solüsyonlar gün içinde beş farklı saat diliminde cihaza verilmiştir. 15'te KLZ'na ait, Çizelge 16'da DKLZ'ye gün içi tekrar sonuçları verilmiştir.

Çizelge 15. KLZ gün içi tekrarlanabilirlik

	100 ng (düşük)	400 ng (orta)	1000 (yüksek)
Zaman	Alan	Alan	Alan
10: 00	23,50	86,80	218,00
12: 00	23,70	86,40	217,90
14: 00	23,80	87,10	218,40
16: 00	24,40	87,40	217,90
18: 00	23,60	87,20	217,90
Ortalama	23,80	86,98	218,02
SS	0,35	0,39	0,22
BSS (%)	1,49	0,45	0,10

Çizelge 16. DKLZ gün içi tekrarlanabilirlik.

	50 ng (düşük)	200 ng (orta)	500 (yüksek)
Zaman	Alan	Alan	Alan
10: 00	10,50	39,30	97,60
12: 00	10,80	39,10	97,60
14: 00	10,50	39,50	97,90
16: 00	10,80	39,90	97,90
18: 00	10,50	39,40	97,50
Ortalama	10,62	39,44	97,70
SS	0,16	0,30	0,19
BSS (%)	1,55	0,75	0,19

Günler Arası Tekrarlanabilirlik (Interday)

Farklı iki günde düşük, orta ve yüksek olmak üzere her birinden beş adet olacak şekilde plazmalar hazırlanarak günler arası tekrarlanabilirlik test edilmiştir. Günler arası tekrar sonucunda elde edilen KLZ alanları Çizelge 17’de, DKLZ alanları ise Çizelge 18’de sunulmuştur.

Çizelge 17. KLZ günler arası tekrarlanabilirlik

Zaman	100 ng (düşük)			400 ng (orta)			1000 (yüksek)		
	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)
1. gün	23,64	0,86	3,63	89,18	3,69	4,13	212,78	3,89	1,83
2. gün	28,08	0,30	1,08	154,04	1,24	0,81	227,26	1,49	0,66
Ortalama	25,86	0,58	2,36	121,58	2,46	2,47	220,02	2,69	1,24

*5 enjeksiyon sonunda elde edilen alanların ortalaması.

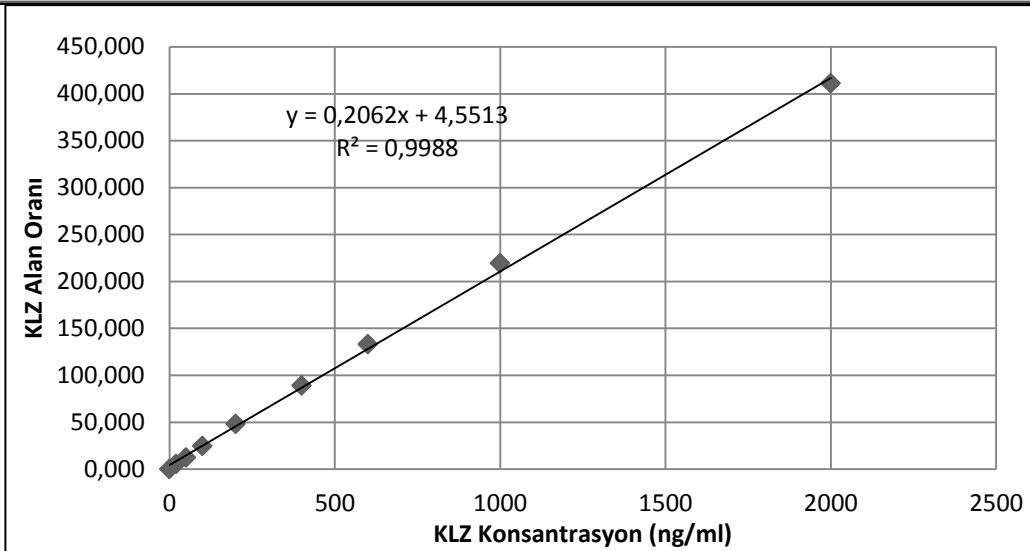
Çizelge18. DKLZ günler arası tekrarlanabilirlik

Zaman	50 ng (düşük)			200 ng (orta)			500 (yüksek)		
	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)	Ortalama Alan*	SS	BSS (%)
1. gün	11,46	0,43	3,78	41,58	1,88	4,51	98,48	2,38	2,42
2. gün	12,58	0,28	2,21	39,74	0,93	2,34	102,57	1,01	0,99
Ortalama	12,02	0,36	2,99	40,66	1,40	3,42	100,53	1,69	1,70

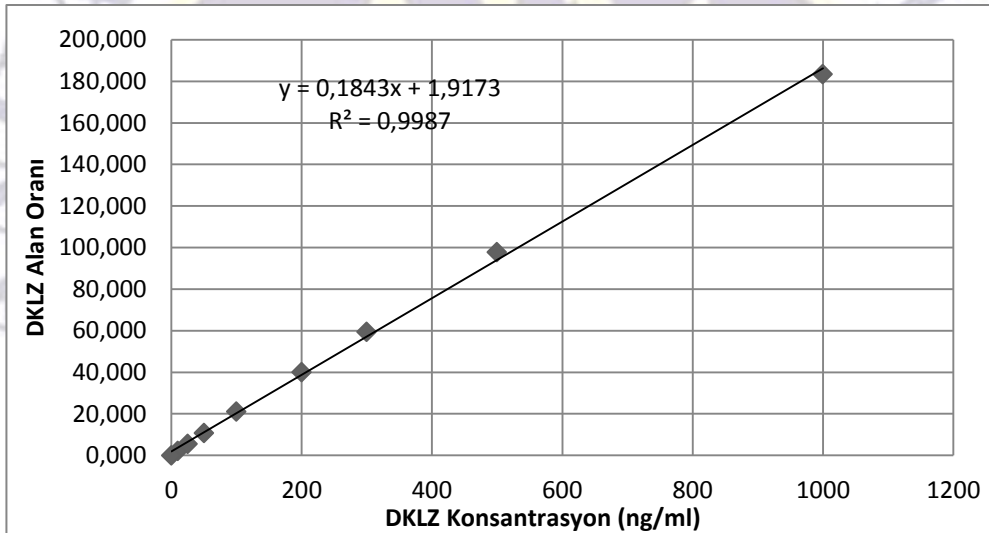
*5 enjeksiyon sonunda elde edilen alanların ortalaması.

Doğrusallık

KLZ ve DKLZ ait kalibrasyon eğrilerine ait grafikler sırası ile Şekil 7 ve Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 7. KLZ'ne ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 8. DKLZ'ye ait kalibrasyon eğrisi

Çalışma Grubunun Plazma Konsantrasyon Değerleri

Doksan dört bireye ait plazma KLZ konsantrasyon ortalaması $550,75 \pm 368,21$ ng/ml; DKLZ plazma konsantrasyon değerleri ortalaması $206,61 \pm 122,74$ ng/ml; plazma KLZ/DKLZ konsantrasyon oran ortalaması $2,78 \pm 1,65$; doz normalize KLZ C/D ortalaması $1,88 \pm 1,70$ ng/ml/mg ve DKLZ C/D plazma konsantrasyon oran değerleri ortalaması ise $0,68 \pm 0,53$ ng/ml/mg olarak bulunmuş olup minimum, maksimum ve ortanca değerler ile birlikte Çizelge 19'da verilmiştir.

Çizelge 19. Doksan dört bireye ait plazma konsantrasyon değerleri

N=94	KLZ (ng/ml)	DKLZ (ng/ml)	KLZ/DKLZ	KLZ C/D (ng/ml/mg)	DKLZ C/D (ng/ml/mg)
Ort	550,75	206,61	2,78	1,88	0,68
SS	368,21	122,74	1,65	1,70	0,53

Min	34,57	31,77	0,64	0,06	0,06
Maks	1492,96	602,90	14,04	10,49	4,12
\bar{x}	488,65	176,57	2,49	1,45	0,57

Genotip Dağılımına Göre Ortalama KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonları ile KLZ/DKLZ ve C/D Oranları

ABCB1 C3435T Polimorfizmi Genotip Dağılımına Göre

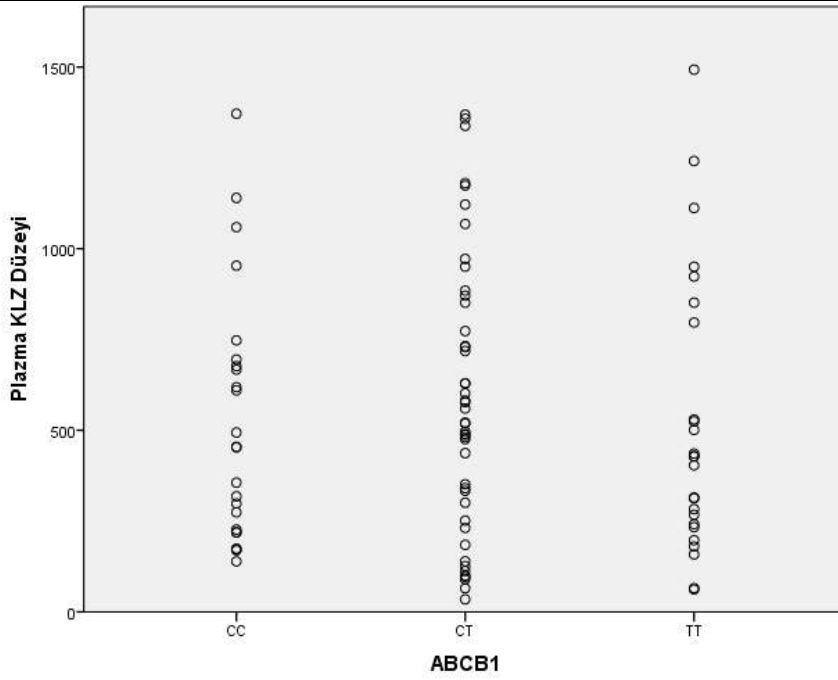
KLZ Plazma Konsantrasyonları

ABCB1 yabanıl tip (CC), heterozigot (CT), mutant (TT) gruplarındaki KLZ plazma konsantrasyon değerleri Çizelge 20'de özetlenmiş olup genotiplere göre plazma KLZ konsantrasyonlarının dağılımı Şekil 9'da verilmiştir.

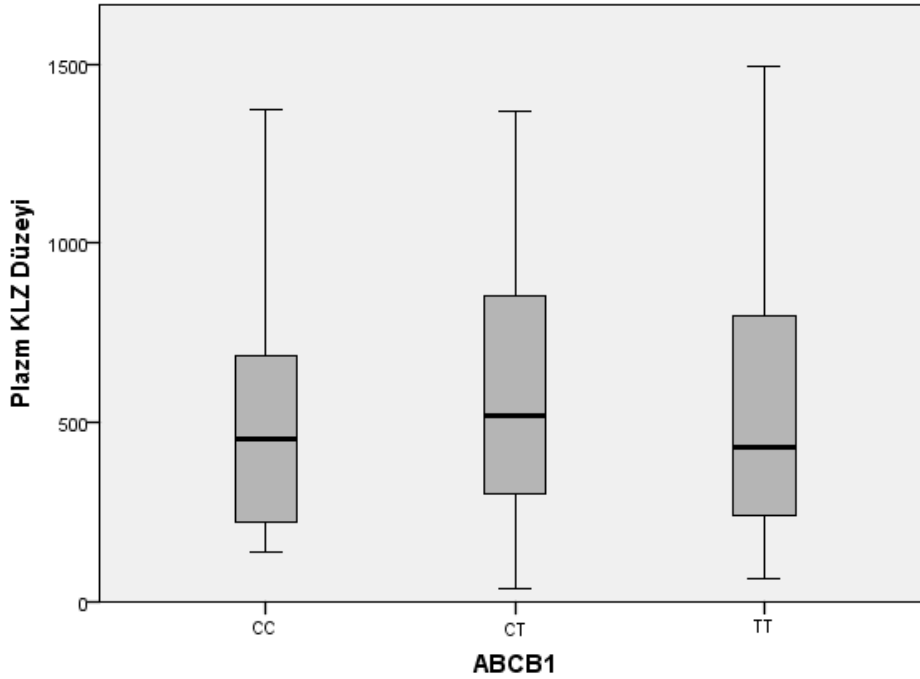
Plazma KLZ düzeyi ABCB1 genotiplerine göre normal dağılım göstermediğinden sonuçlar parametrik olmayan Kurskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. CC genotipine sahip bireylerin KLZ plazma düzeyleri ortalamaları (\pm SS) 521,05 ng/ml (\pm 342,41); CT genotipine sahip olanların 585,14 ng/ml (\pm 378,03) ve TT genotipine sahip olanların 517,36 ng/ml (\pm 383,09) olarak bulunmuştur. Yabanıl genotipe sahip olan bireylerin sıra ortalaması heterozigot genotipe sahip olanlara göre %9,56 daha azken; mutant genotipe sahip olanlardan %3,92 daha yüksektir. Ancak Kruskal Wallis testi ile sıra ortalamaları karşılaştırıldığında genotip grupları arasında plazma KLZ düzeylerinin farklılık göstermediği istatistiksel olarak gösterilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 10).

Çizelge 20. ABCB1 C3435T genotip dağılımına göre KLZ plazma konsantrasyonları

KLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
\bar{x} (ng/ml)	453,65	520,98	428,37
Min	138,81	34,57	61,6
Maks	1371,69	1368,9	1492,96
$\chi^2 = 0,941; P = 0,625$			



Şekil 9. KLZ plazma konsantrasyonlarının *ABCB1* genotiplerine göre nokta grafiği gösterimi ($p>0,05$)



Şekil 10. KLZ plazma konsantrasyonlarının *ABCB1* genotiplerine göre saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)

DKLZ Plazma Konsantrasyonları

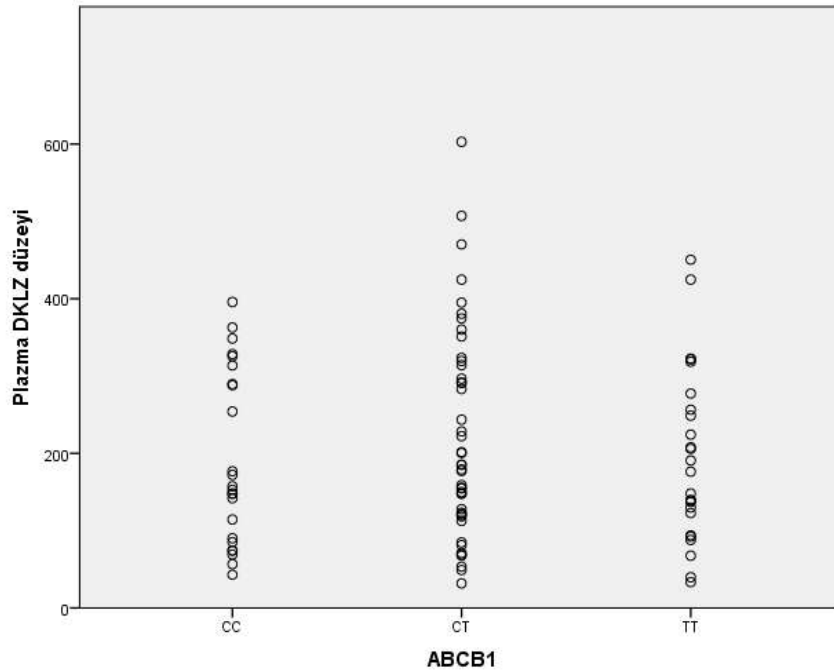
ABCB1 yabanıl tip (CC), heterozigot (CT), mutant (TT) gruplarındaki DKLZ plazma konsantrasyon değerleri Çizelge 21’de özetlenmiştir.

ABCB1 genotiplerine göre plazma DKLZ düzeylerinin dağılımı normal dağılım göstermemekte olup yabanıl, heterozigot ve mutant genotiplere sahip bireylerin DKLZ plazma sonuçları parametrik olmayan Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. Yabanıl, heterozigot ve mutant genotipe sahip

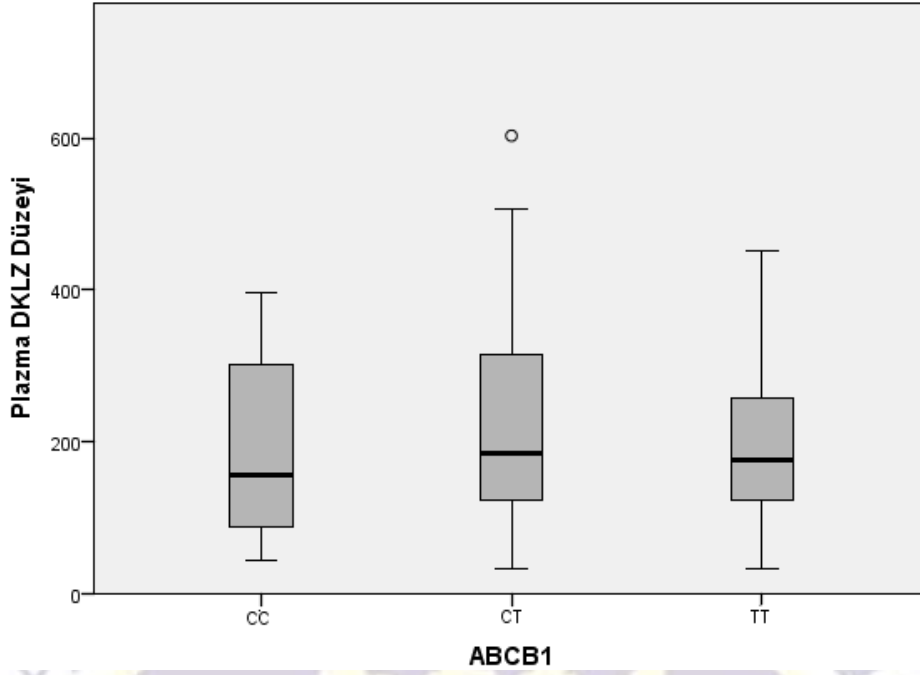
bireylerin plazma DKLZ düzey ortalamaları (\pm SS) sırasıyla 192,07 ng/ml (\pm 112,29); 585,14 ng/ml (\pm 378,02) ve 517,09 ng/ml (\pm 383,09) olarak bulunmuştur. Heterozigot genotipe sahip olanların DKLZ plazma düzeyleri yabanıl ve mutant tipinkilerden sırasıyla %10,54 ve %9,48 daha yüksektir. Ancak Kruskal Wallis Testi sonucunda üç genotip grubunun DKLZ plazma düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$). *ABCB1* genotipine göre DKLZ plazma düzeylerinin dağılımını nokta grafiği ile gösterimi Şekil 11’de; kutu grafiği ile gösterimi ise Şekil 12’de verilmiştir.

Çizelge 21. *ABCB1* C3435T genotip dağılımına göre DKLZ plazma konsantrasyonları

DKLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
\bar{x} (ng/ml)	155,03	185,19	176,3
Min	42,97	31,77	33,38
Maks	395,75	602,9	450,49
$\chi^2 = 0,795; P = 0,672$			



Şekil 11. DKLZ plazma konsantrasyonlarının *ABCB1* genotiplerine göre nokta dağılımı ($p>0,05$)



Şekil 12. ABCB1 genotiplerine göre DKLZ plazma konsantrasyon değerlerinin saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0.05$)

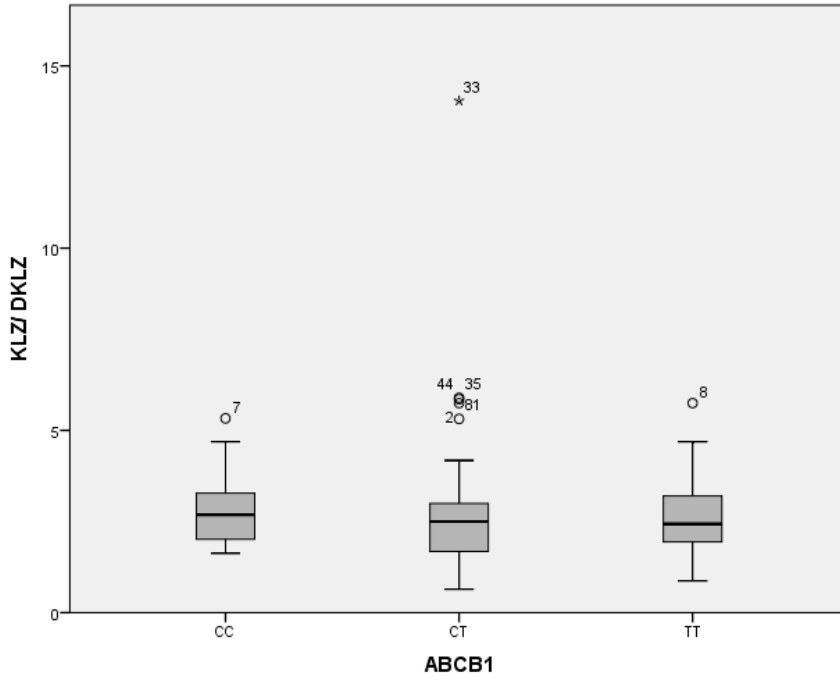
KLZ/ DKLZ Plazma Konsantrasyon Oranları

KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının ABCB1 yabanıl tip (CC), heterozigot (CT), mutant (TT) gruplarına göre dağılımları Şekil 13’de, değerleri ise Çizelge 22’de özetlenmiştir.

Yabanıl, heterozigot ve mutant tipe ait KLZ/DKLZ oranları normal dağılım göstermediğinden istatistiksel analizler Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Üç gruba ait KLZ/DKLZ oranlarının ortalamaları (\pm SS) yabanıl tipler için 2,79 (\pm 0,95), heterozigotlar için 2,83 (\pm 2,11) ve mutant genotipe sahip olanlar için 2,65 (\pm 1,19). KLZ/DKLZ oranlarının sıra ortalamaları yabanıl genotipe sahip olanlarda heterozigot ve mutant genotipe sahip olanlarınkine göre %13,62 ve %9,93 daha fazladır. Ancak istatistiksel olarak üç grup arasındaki plazma DKLZ düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 22. KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının ABCB1 genotip dağılımı

KLZ/ DKLZ	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
\bar{x}	2,69	2,49	2,43
Min	1,63	0,64	0,87
Maks	5,33	14,04	5,75
$\chi^2= 1,075; P=0,584$			



Şekil 13. *ABCB1* genotiplerine göre KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının değerlerinin saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0.05$)

KLZ C/D Oranları

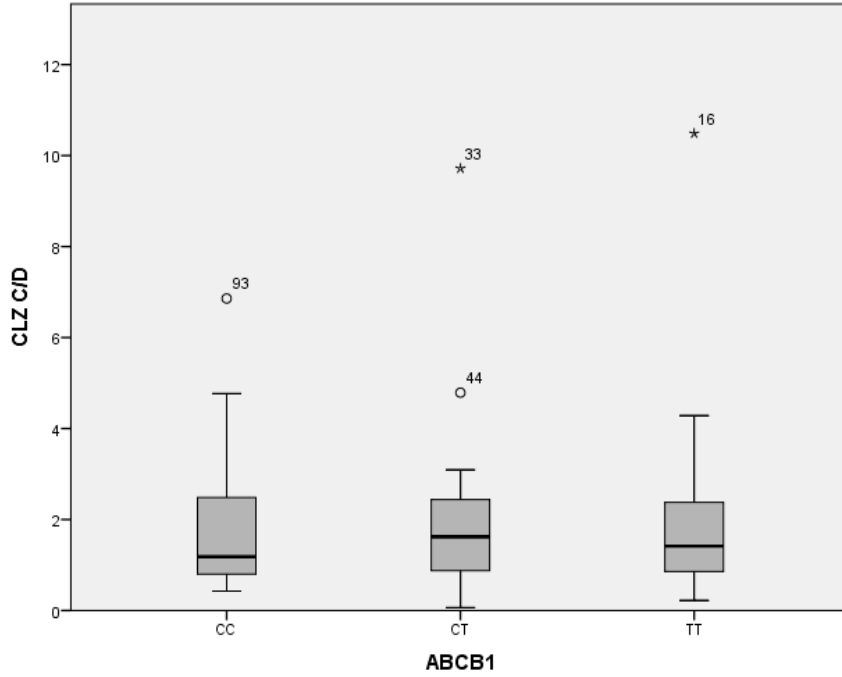
KLZ C/D oranlarının *ABCB1* yabancıl tip (CC), heterozigot (CT) ve mutant (TT), gruplarına göre değerleri ise Çizelge 23'te özetlenmiştir.

KLZ C/D değerleri normal dağılım göstermediğinden yabancıl, heterozigot ve mutant genotiplerin KLZ C/D değerleri parametrik olmayan test olan Kruskal- Wallis testi ile karşılaştırılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ($p>0.05$). Yabancıl tip, heterozigot ve mutant genotipe sahip bireylerin doz normalize KLZ düzeyleri ortalamaları (\pm SS) sırasıyla 1,84 ng/ml/mg (\pm 1,55); 1,81 ng/ml/mg (\pm 1,56) ve 2,03 ng/ml/mg (\pm 2,13)'tür. Heterozigot genotipe sahip olanların KLZ C/D sıra ortalamaları yabancıl ve mutant genotipe sahip olanlarından sırasıyla %2,54 ve %1,56 daha fazladır. Genotiplere göre KLZ C/D saplı kutu grafiği Şekil 14'te verilmiştir.

Çizelge 23. KLZ C/D oranlarının *ABCB1* genotiplerine göre dağılımı

KLZ C/D Konsantrasyonu	Yabancıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
\bar{x} (ng/ml/mg)	1,18	1,62	1,41
Min	0,42	0,06	0,22
Maks	6,86	9,72	10,49

$$\chi^2 = 0,034 \quad P = 0,983$$



Şekil 14. *ABCB1* genotiplerine göre KLZ C/D oran dağılımının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p > 0.05$)

DKLZ C/D Oranları

DKLZ C/D oranlarının *ABCB1* yabanıl tip (CC), heterozigot (CT) ve mutant (TT) gruplarına göre dağılımları Şekil 15’de, değerleri ise Çizelge 24’te özetlenmiştir.

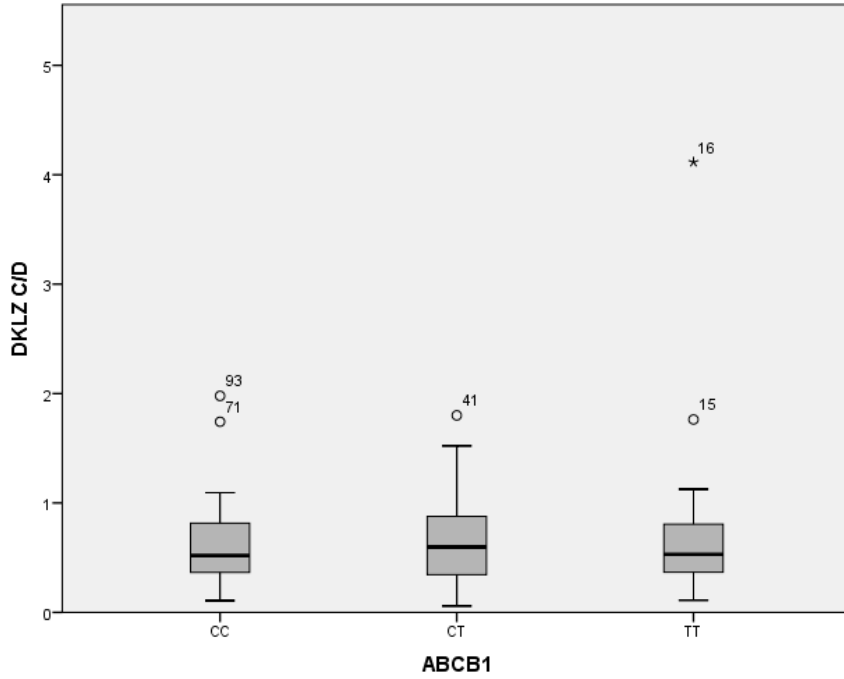
Yabanıl tip, heterozigot ve mutant genotipe sahip bireylerin doz normalize DKLZ düzeyleri ortalamaları (\pm SS) sırasıyla 0,65 ng/ml/mg (\pm 0,46); 0,66 ng/ml/mg (\pm 0,39) ve 0,75 ng/ml/mg (\pm 0,78). Heterozigot genotipe sahip olanların KLZ C/D sıra ortalamaları yabanıl ve mutant genotipe sahip olanlarından sırasıyla %7,38 ve %2,69 daha fazladır.

DKLZ C/D değerleri normal dağılım göstermediğinden DKLZ C/D değerlerinin yabanıl, heterozigot ve mutant genotiplere göre karşılaştırılması parametrik olmayan test olan Kruskal- Wallis testi ile yapılmış ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ($p > 0.05$).

Çizelge 24. DKLZ C/D oranlarının *ABCB1* genotiplerine göre dağılımı

KLZ C/D Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (CC) (Normal Taşıyıcı)	Heterozigot (CT) (Orta düzeyde taşıyıcı)	Mutant (TT) (Yavaş Taşıyıcı)
n	24	45	25
\bar{x} (ng/ml/mg)	0,52	0,59	0,53
Min	0,11	0,06	0,11

Maks	1,98	1,8	4,12
	$\chi^2= 0,273; P=0,873$		



Şekil 15. ABCB1 genotiplerine göre DKLZ C/D oran dağılımının saplı kutu grafiği ile gösterimi (p>0.05)

UGT1A4*3 Polimorfizmi Genotiplerinin KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonlarına Etkisi

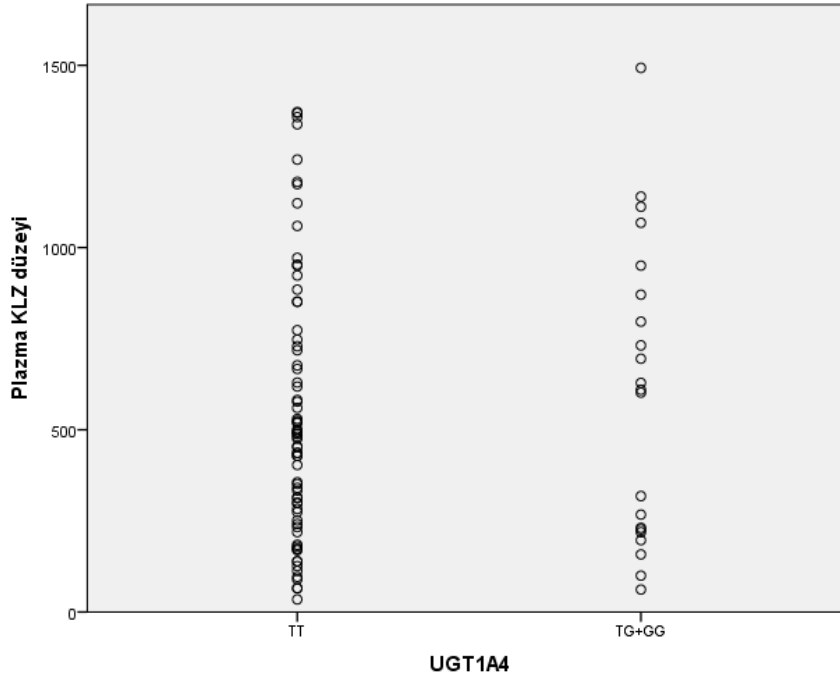
UGT1A4 geni için mutant genotipe sahip 3 birey olduğundan istatistiksel analizler yapılırken heterozigot ve mutant genotipe sahip bireyler birlikte analiz edilmiştir. UGT1A4 yabanıl tip (TT), heterozigot (TG) ve mutant (GG) gruplarına göre plazma KLZ ve DKLZ, KLZ/ DKLZ oranları ile KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri Çizelge 25’de özetlenmiş, nokta dağılımları grafiği Şekil 16’da ve Şekil 17’de ise kutu grafiği ile gösterilmiştir.

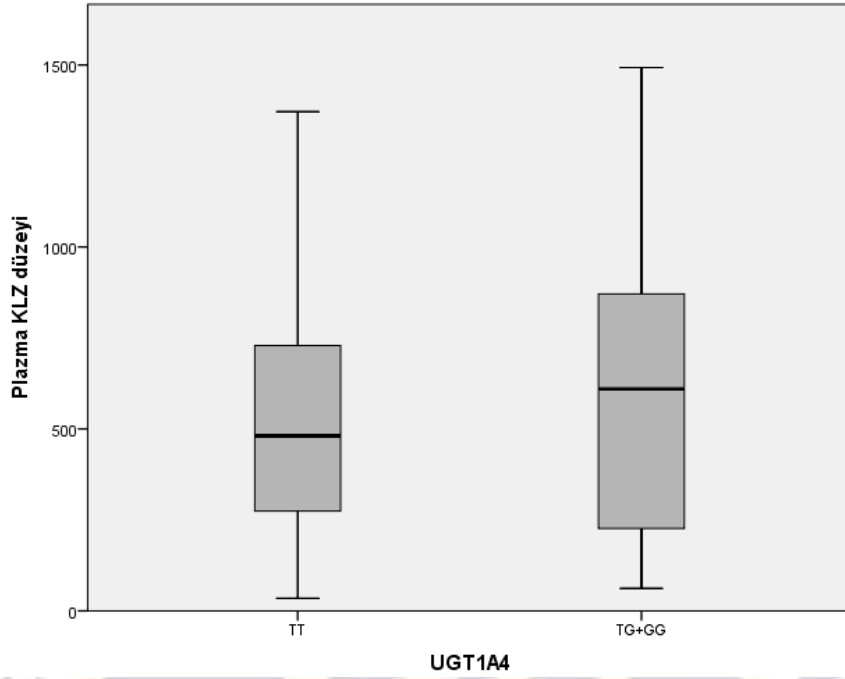
Plazma KLZ düzeyleri yabanıl tip ile heterozigot ve mutant genotip grupları arasında normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U Testi ile analiz edilmiştir. Genotipe göre plazma KLZ konsantrasyonları istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

KLZ plazma konsantrasyonları ortalaması (\pm SS) yabanıl ve heterozigot+ mutant genotip gruplarında sırasıyla 538,29 ng/ml (\pm 357,82) ve 594,07 ng/ml (\pm 408,64) olup plazma KLZ konsantrasyon sıra ortalaması heterozigot+ mutant grubunda yabanıl tipte olanlara göre %6,27 daha yüksektir.

Çizelge 25. KLZ plazma düzeylerinin *UGT1A4* genotiplerine göre dağılımı

KLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabancıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
\bar{x} (ng/ml)	481,05	609,8
Min	34,57	61,6
Maks	1371,69	1492,96
$Z=-0,463; P= 0,643$		

Şekil 16. *UGT1A4**3 genotiplerine göre KLZ plazma konsantrasyonlarının dağılımı ($p > 0,05$)



Şekil 17. *UGT1A4* genotiplerine göre KLZ plazma konsantrasyonlarının dağılımlarının saplı kutu grafiği ile gösterimi ($p>0,05$)

DKLZ Plazma Konsantrasyonları

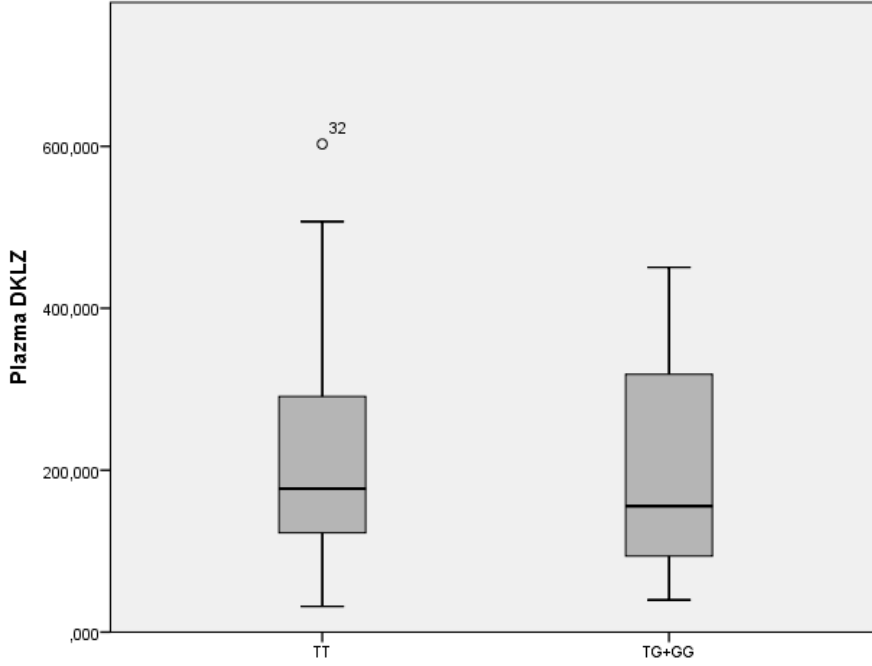
Plazma DKLZ düzeylerinin *UGT1A4* yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) ile mutant (GG) gruplarına göre dağılımları Şekil 18’de ve plazma değerleri ise Çizelge 26’da gösterilmiştir.

DKLZ plazma konsantrasyonları ortalaması (\pm SS) TT ve TG+GG genotip gruplarında sırasıyla 208,31 ng/ml (\pm 123,23) ve 200,7 ng/ml (\pm 123,86) olup plazma DKLZ konsantrasyon sıra ortalaması TT genotipine sahip olanlarda TG+GG grubunda olanlara göre %4,17 daha yüksektir.

Plazma DKLZ düzeyleri yabanıl tip ile heterozigot ve mutant genotip grupları arasında normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U Testi ile analiz edilmiştir. Genotipe göre plazma KLZ konsantrasyonları istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Çizelge 26. DKLZ plazma düzeylerinin *UGT1A4* genotiplerine göre dağılımı

DKLZ Plazma Konsantrasyonu	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
\bar{x} (ng/ml)	177,15	155,62
Min	31,77	39,8
Maks	602,9	450,49
$Z = -0,295; P = 0,768$		



Şekil 18. DKLZ plazma konsantrasyonlarının *UGT1A4**3 genotiplerine göre kutu grafiği dağılımı ($p > 0,05$)

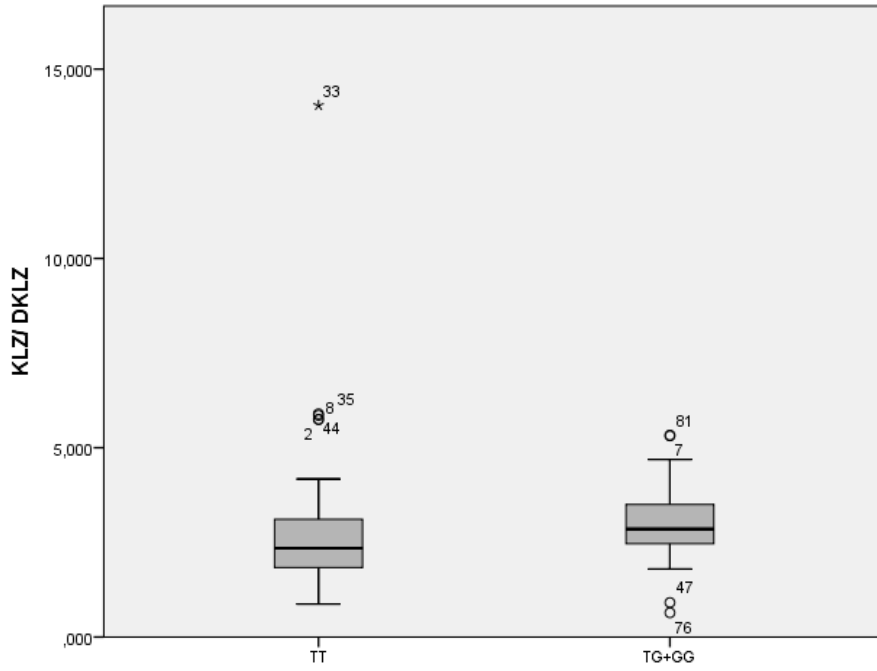
KLZ/DKLZ Plazma Konsantrasyon Oranları

UGT1A4 yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) + mutant (GG) gruplarına göre KLZ/DKLZ plazma konsantrasyon oran değerleri ise Çizelge 26’da gösterilmiştir.

KLZ/ DKLZ plazma konsantrasyon oranlarının *UGT1A4* yabanıl (TT) ve heterozigot (TG) ile mutant (GG) genotiplerine göre dağılımı normal dağılım göstermediğinden Mann-Whitney U Testi ile analiz edilmiş, ancak TG+GG grubundakilerin KLZ/ DKLZ oranlarının sıra ortalaması TT genotipine sahip olan bireylerinkine göre %19,26 daha fazla olsa da iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 19) ($p > 0,05$). KLZ/ DKLZ oranlarının ortalamaları (\pm SS) TT ve TG+GG genotip gruplarında sırasıyla 2,72 (\pm 1,74) ve 2,99 (\pm 1,27)’dur.

Çizelge 26. *UGT1A4**3 genotiplerine göre KLZ/DKLZ plazma düzey oranlarının dağılımı

KLZ/ DKLZ	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
\bar{x}	2,35	2,85
Min	0,87	0,64
Maks	14,04	5,33
$Z = -1,593; P = 0,111$		



Şekil 19. *UGT1A4* genotiplerine göre KLZ/DKLZ oran dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$)

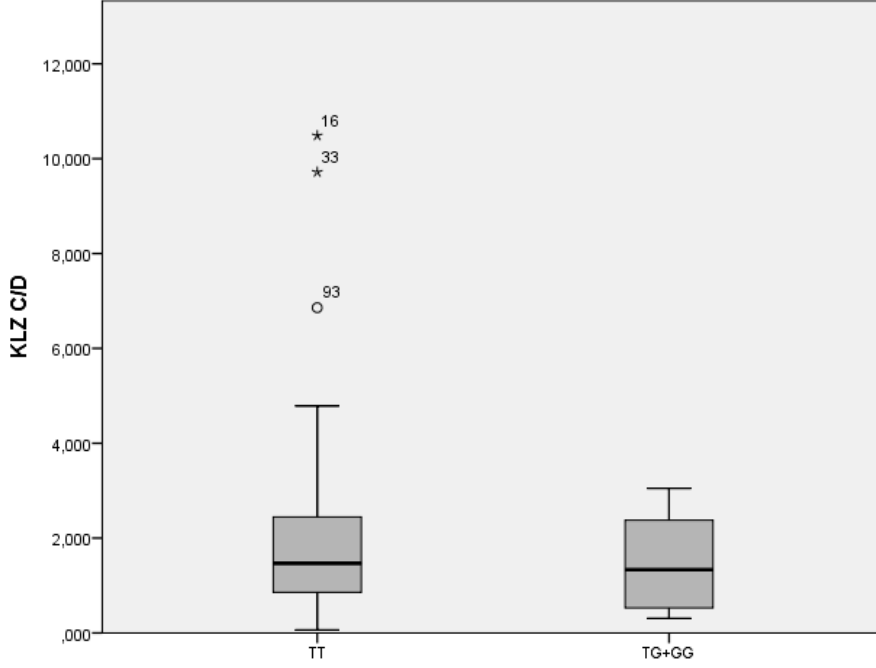
KLZ C/D Oranları

KLZ C/D düzeylerinin *UGT1A4* yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) + mutant (GG) gruplarına göre değerleri Çizelge 27’de gösterilmiştir.

KLZ C/D düzeyleri ortalamaları (\pm SS) TT ve TG+GG genotip gruplarında sırasıyla 1,97 ng/ml/mg (\pm 1,87) ve 1,55 ng/ml/mg (\pm 0,94)’dir. KLZ C/D değerleri gruplar arasında normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde TT genotipe sahip olan grubun KLZ C/D sıra ortalaması TG+GG genotipe sahip olan gruba göre %4,48 daha yüksek olsa da iki grubun KLZ C/D düzeylerinde istatistiksel açıdan bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Şekil 20).

Çizelge 27. KLZ C/D oranlarının *UGT1A4*3* genotiplerine göre dağılımı

KLZ C/D	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
\bar{x} (ng/ml/mg)	1,47	1,33
Min	0,06	0,31
Maks	10,49	3,05
$Z=-0,318; P= 0,751$		



Şekil 20. *UGT1A4* genotiplerine göre KLZ C/D düzeylerinin dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$)

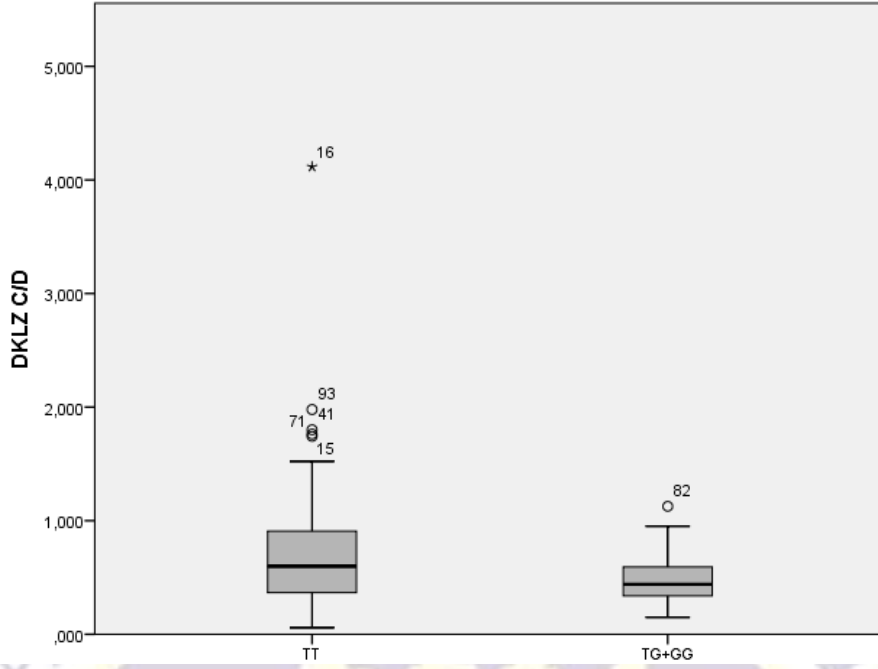
DKLZ C/D Oranları

DKLZ C/D düzeylerinin *UGT1A4* yabanıl tip (TT) ve heterozigot (TG) + mutant (GG) gruplarına göre değerleri Çizelge 28’de gösterilmiştir.

DKLZ C/D değerleri iki grup arasında (TT ve TG+GG) normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Şekil 21). DKLZ C/D sıra ortalaması TT genotipine sahip olan gruptakilerde TG+GG genotipe sahip olan gruptakilere göre %22,38 daha yüksek olsa da iki grubun DKLZ C/D düzeylerinde istatistiksel açıdan farklılık göstermemektedir. DKLZ C/D düzey ortalamaları (\pm SS) birinci (TT) ve ikinci (TG+GG) grupları için sırasıyla 0,73 ng/ml/mg (\pm 0,58) ve 0,51 ng/ml/mg (\pm 0,25)’dir.

Çizelge 28. DKLZ C/D oranlarının *UGT1A4**3 genotiplerine göre dağılımı

DKLZ C/D	Yabanıl Tip (TT) (Yavaş Konjuge Edici)	Heterozigot ve Mutant (TG+GG) (Normal Konjuge Edici)
n	73	21
\bar{x} (ng/ml/mg)	0,59	0,44
Min	0,06	0,15
Maks	4,12	1,13
$Z=-1,657; P= 0,098$		



Şekil 21. *UGT1A4* genotiplerine göre DKLZ C/D oranları dağılımına ait kutu grafiği ($p>0,05$)

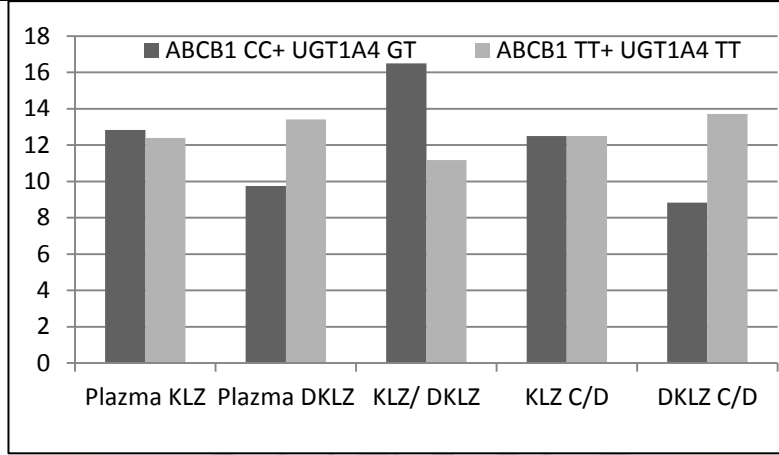
***ABCB1* ve *UGT1A4* Genotip Kombinasyonlarının KLZ ve DKLZ Plazma Konsantrasyonlarına Etkisi**

Çalışma popülasyonu içerisinde *ABCB1* yabancıl genotipi (CC) ve *UGT1A4* mutant (GG) genotipe sahip bireye rastlanmadığından, *ABCB1* yabancıl genotipi (CC) ve *UGT1A4* heterozigot (GT) genotipine sahip bireyler ve *ABCB1* mutant (TT) ile *UGT1A4* yabancıl tipe sahip (TT) bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu iki gen kombinasyonuna sahip bireylerin plazma KLZ ve DKLZ değerleri ise Çizelge 28'da ve düzeylerin sıra ortalamalarının karşılaştırılması Şekil 22'de gösterilmiştir.

İki grup arasında KLZ ve DKLZ düzeyleri normal dağılım göstermediğinden iki gen kombinasyonuna sahip bireylerdeki KLZ ve DKLZ düzeyleri arasındaki farklılık parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile incelenmiştir. KLZ C/D düzeylerinin sıra ortalaması her iki grup için eşit olup, DKLZ C/D düzeyleri sıra ortalamaları özellikle doz normalize DKLZ düzeyinin *ABCB1* TT+*UGT1A4* TT grubunda *ABCB1* CC+*UGT1A4* GT grubundakilere göre %34,65 daha yüksek olduğu KLZ/ DKLZ oranının ise tam aksine %32,3 *ABCB1* CC+*UGT1A4* GT grubundakilerde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak KLZ ve DKLZ düzeyleri kombine iki grup arasında farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Çizelge 28. ABCB1 + UGT1A4 gen kombinasyonlarına göre KLZ ve DKLZ plazma düzeyleri

Düzeyleyler	Değerler	ABCB1 CC+ UGT1A4 GT (Normal Metabolizasyon)	ABCB1 TT+ UGT1A4 TT (Yavaş Metabolizasyon)
Plazma KLZ	n	6	18
	\bar{x} (ng/ml)	463,96	428,39
	Min	218,8	65,34
	Maks	1139,7	1241,4
	<i>Z=-0,133; P=0,923</i>		
Plazma DKLZ	n	6	18
	\bar{x} (ng/ml)	131,25	183,55
	Min	74,17	33,38
	Maks	325,6	424,7
	<i>Z=-1,1; P=0,28</i>		
KLZ/DKLZ	n	6	18
	\bar{x}	3,28	2,09
	Min	1,79	0,87
	Maks	5,33	5,75
	<i>Z=-1,6; P=0,119</i>		
KLZ C/D	n	6	18
	\bar{x} (ng/ml,mg)	1,69	1,43
	Min	0,45	0,22
	Maks	3,05	10,49
	<i>Z=0; P=1</i>		
DKLZ C/D	n	6	18
	\bar{x} (ng/ml,mg)	0,47	0,69
	Min	0,15	0,11
	Maks	0,65	4,12
	<i>Z=-1,467; P=0,156</i>		



Şekil 22. *ABCB1*+ *UGT1A4* gen kombinasyonlarına KLZ ve DKLZ düzeylerinin karşılaştırılması

v. Sonuç ve Öneriler

Şizofreninin tedavisinde farmakoterapi vazgeçilmez olup bunun yanı sıra bireysel ve grup tedavileri ile bireylerin tedavi edilmesi amaçlanmaktadır. Farmakoterapide kullanılan tipik ve atipik birçok antipsikotik bulunsa da özellikle diğer antipsikotiklere direnç gösteren hastaların etkin tedavisinin sağlanmasında KLZ büyük önem taşımaktadır. Dar terapötik aralığa sahip ve agranülositoz gibi mortalite ile sonlanabilecek ciddi bir advers etkiye neden olan KLZ tedavisinde klinisyenler hasta için en uygun tedaviyi sağlamaya büyük özen göstermektedir. Bunun içinde 20. yüzyılın sonuna doğru bireyselleştirilmiş tedavi uygulamaları klinik ve bilimsel alanlarda önem kazanırken, son yıllarda da sağlık sigortası ve geri ödemeleri ile ilaç sektörü alanında da önemli hale gelmiştir.

Psikofarmakoterapide etkin tedavinin sağlanamaması veya istenmeyen yan etkilerin gözlemlenmesinde ilacın etkililiği üzerine, organizmanın metabolizması ve bu metabolik yolda görev yapan proteinleri kodlayan gen bölgelerindeki farklılıklar da etkili olabilmektedir.

ABCB1 proteini hücre içinden hücre dışına ksenobiyotiklerin taşınmasında görev alarak onların sistemik dolaşıma katılmalarında görev yapmaktadır. Böylece organizmada hücrel ksenobiyotik birikimini engelleyerek koruma mekanizması sağlamaktadırlar [26]. Çalışmamızda da *ABCB1* proteinin KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ taşınmasındaki etkisi, plazma KLZ ve plazma DKLZ düzeyleri karşılaştırılarak araştırılmıştır. *ABCB1* proteinini kodlayan gen bölgesinde meydana gelebilen tek nükleotit farklılığının proteinin aktivitesinin azalması yönünde bir değişiklik meydana getirmesi ksenobiyotiklerin hücrede birikmesine neden olabilmektedir.

Gerçekleştirilen çalışma sonucunda *ABCB1* proteinini kodlayan gen bölgesinde *C3435T* polimorfizminin varyant allel yüzdesi %51 olarak bulunmuştur. Her ırkın kendine özgü bir gen frekansı vardır ve *ABCB1 C3435T* polimorfizminin diğer şizofreni populasyonlarındaki dağılımı Çizelge 29'da verilmiştir. Fisher exact test ile gerçekleştirilen çalışmaya ait allel frekansları ile diğer populasyonlara

ait allel frekansları karşılaştırılmıştır. Elde edilen allel frekansları Türklerinde arasında yer aldığı İtalyan, İsveç, Hırvat, Sloven, Fransız, Yunan gibi beyaz ırka ait olan şizofreni hastalarındaki allel frekansları ile uyumlu olarak bulunmuştur. Bununla birlikte analiz sonucunda çalışmamızdaki allel frekansları ile Akamine ve ark.,'nın sarı ırk için Japon şizofreni hastalarında elde ettiği allel frekansları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlemlenmiş olup p değerleri 0,046 olarak bulunmuştur. Bu da ırk faktörünün genotip üzerindeki etkisi ile açıklanabilmektedir.

Çizelge 29. *ABCBI C3435T* polimorfizminin allel ve genotip frekanslarının diğer popülasyonlarda şizofreni gruplarında yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması

Populasyon	n	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Kaynak
		CC	CT	TT	C	T	
Türk	94	25,5	47,9	26,6	49	51	Mevcut çalışma
Türk	101	28,7	54,5	16,8	56	44	[27]
Hırvat	117	23,1	47,9	29	47	53	[28]
Hırvat	101	22,2	50,9	26,9	48	52	[29]
Beyaz ırk	73	24,6	54,8	20,5	52	48	[15]
İtalyan	60	25	45	35	45	55	[14]
İsveç	112	18,8	45,5	35,7	42	58	[25]
İsveç	95	34	52	15	59	41	[30]
Sloven	59	15,3	45,8	39	38	62	[31]
Hırvat	101	25,7	45,6	29,7	48	52	[32]
Fransız	26	7,7	57,7	34,6	37	63	[33]
Yunan	71	21,1	53,5	25,4	48	52	[34]
Karışık	137	n/a	n/a	n/a	62	38	[35]
Japon*	45	37,8	53,4	8,8	64	36	[36]

*Fischets exact test için $p < 0,05$.

KLZ ve metabolitlerinin glukuronidasyonunda görev alan UGT enzimi lipofilik haldeki ksenobiyotiklerin faz II reaksiyonlarını katalizleyerek onların hidroksil, karboksil, amino veya tiyol grubu üzerinden glukuronik asit eklemekte ve ksenobiyotiklerin hidrofilik hale gelmesini sağlayarak atılımlarını kolaylaştırmaktadır [22, 37, 38]. *UGT1A4* gen bölgesinde ekzon 1'de *T142G* polimorfizmi sonucunda 48. aminoasitte lösin yerine valin aminoasiti kodlanmakta (Leu48Val, L48V) ve buna bağlı olarak enzimin substrata olan ilgisi değişiklik gösterebilmekte ve ksenobiyotiklerin organizmadan atılımları değişkenlik gösterebilmektedir [22, 24, 25]. Bu polimorfizm aynı zamanda *UGT1A4*3* olarak tanımlanmaktadır.

*UGT1A4*3* polimorfizmi için çalışmamızda varyant allel frekansı %13 olarak bulunmuş olup

diğer şizofreni popülasyonlarındaki allel ve genotip frekansları Çizelge 30'da verilmiştir. Fisher exact test ile gerçekleştirilen çalışmaya ait allel frekansları ile diğer popülasyonlara ait allel frekansları karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen allel frekansları beyaz ırk içerisinde yer alan İsveçli ve Norveçli diğer şizofreni hastalarının allel frekansları ile benzerlik göstermektedir ($p>0,05$).

Çizelge 30. *UGT1A4 L48V* polimorfizminin allel ve genotip frekanslarının diğer popülasyonlarda şizofreni gruplarında yapılan çalışmalar ile karşılaştırılması

Çalışma Grubu	n	Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı		Kaynak
		TT	TG	GG	T	G	
Türk	94	77,7	19,1	3,2	87	13	Mevcut çalışma
İsveç	112	74,1	25,9	-	87	13	[25]
Norveç	558	82,1	16,1	1,8	90	10	[39]
İsveç	95	88	11	1	94	6	[30]

KLZ dar teröpatik aralığa sahip antipsikotikler arasında yer almakta ve plazma düzeyinin 350-600 ng/ml arasında olması hedeflenmektedir [7, 8]. Plazma düzeyinin 600- 1000 ng/ml arasında veya daha üzerinde olması bireylerde baş ağrısı, baş dönmesi, uyuşukluk, sedasyon, kilo alımı gibi birçok advers etkinin hastalarda gözlemlenmesine neden olabilmektedir [6, 9, 10, 40]. Advers etkilerin çoğu hastalar ile yapılan görüşmelerde alınan anamnezler ile klinisyenler tarafından belirlenebilmekte ve klinisyen aldığı yanıtlar doğrultusunda doz ayarlaması yapabilmektedir. Mortalite ile sonuçlanabilecek advers etkilerin önlenmesi için KLZ kullanan hastalarda düzenli KLZ plazma düzeyinin klinisyenler tarafından kontrol edilmesiyle advers etki riski azaltılabilmektedir [11, 12].

Gerçekleştirilen çalışmada 94 bireye ait plazma KLZ plazma konsantrasyon ortalaması (\pm SS) 550,70 ng/ml (\pm 368,21), DKLZ plazma konsantrasyon ortalaması 206,61 ng/ml (\pm 122,74), plazma KLZ/DKLZ konsantrasyon oran ortalaması 2,78 (\pm 1,65), doz normalize KLZ C/D ortalaması 1,88 ng/ml/mg (\pm 1,70) ve DKLZ C/D plazma konsantrasyon ortalaması ise 0,68 ng/ml/mg (\pm 0,53) olarak bulunmuştur.

KLZ ile tedavide hastalar aynı doz ile tedavi edilse dahi hastaların plazma KLZ düzeyleri birbirinden 5-8 kat arasında farklılık gösterebilmekte ve KLZ'nin metabolizma hızı da bireyler arasında 50 kat farklılık gösterebilmektedir [6, 16]. Çalışmamızda plazma KLZ/ DKLZ oran ortalaması 2,78 (\pm 1,65) olarak bulunmuştur. Couchman ve ark (2010) 85958 bireyde KLZ/ DKLZ oranını 0,5-3 arasında bulmuşlardır [6]. Rostami- Hodjegan ve ark. (2004), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada KLZ/ DKLZ oranını ortalama olarak 1,32 bulmuşlar ve KLZ/ DKLZ oranı için bu değer referans olarak alındığında bu orandaki her bir 0,1'lik değişimin KLZ plazma konsantrasyonunu \pm %8 etkileyebileceği sonucuna varmışlardır [41].

KLZ gibi özellikle de dar terapötik aralığa sahip ilaçlarda etkin tedavinin sağlanması, advers ve yan etkilerin en aza indirgenebilmesi için ilaç metabolizmasında görev alan enzim ve proteinlerdeki genetik farklılıkların da tanımlanarak kliniğe uyarlanması bireysel etkin tedavinin sağlanmasında büyük önem taşımaktadır.

Wang ve Sadée (2006) *in vitro* ortamda gerçekleştirdikleri deneyde 3435. pozisyonda T allelinin bulunduğu durumlarda mRNA stabilitesinin 1,5 ile 2 kat arasında azaldığını ve protein düzeyinde azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir [42]. Farelerde yapılan *in vitro* çalışmada, P-gp'nin substrat olarak DKLZ'e olan ilgisinin KLZ'e göre olan ilgisinden daha fazla olduğu ve *ABCB1* geninden yoksun olan farelerin beyinlerinde DKLZ konsantrasyonunun 8,8 kat artmış olduğu bulunmuştur [43]. Bu çalışma sonucunda da CC, CT ve TT genotipine sahip olan bireylerde KLZ C/D düzeyi ortancaları (Min; Maks) 1,18 ng/ml/mg (0,42 ng/ml/mg; 6,86 ng/ml/mg), 1,62 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 9,72 ng/ml/mg) ve 1,41 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49) olarak bulunmuştur. Bulgulara göre KLZ C/D düzeyi TT genotipe sahip olanlarda CC genotipine sahip olanlara göre daha yüksek olduğundan KLZ taşınmasının TT genotipine sahip olanlarda azalmış olabileceğini söyleyebiliriz. Çalışmamızda da *ABCB1 C3435* polimorfizminin DKLZ C/D düzeyi ile arasındaki ilişki araştırıldığında CC, CT ve TT genotipine sahip bireylerdeki DKLZ C/D düzeyi ortancaları (Min; Maks) 0,52 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 1,98 ng/ml/mg), 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,53 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. Bulgularımız sonucunda TT genotipine sahip bireylerde CC genotiplilerle karşılaştırıldığında KLZ'de olduğu gibi DKLZ taşınmasında azalma meydana geldiği görülmüştür. Hoffmeyer ve ark. (2000), gerçekleştirdikleri *in vivo* deney sonucunda *ABCB1* gen bölgesinde 3435. pozisyonda TT genotipine sahip bireylerde CC genotipine sahip olanlara göre MDR1 ekspresyonunun 2 kat daha az olduğu ve ilaç plazma düzeylerinin 4 kat daha fazla olduğunu bulmuştur [19]. Sirot ve ark. (2009), 75 İsviçreli şizofreni hastasında yapmış oldukları çalışmada 3435TT genotipine sahip olan bireylerde ortalama KLZ plazma konsantrasyonunun CC genotipine sahip olan bireylere göre 1,6 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [15].

Consoli ve ark. (2009), 60 kişilik KLZ kullanan İtalyan şizofreni hastasında *ABCB1* için CC genotipine sahip bireylerin KLZ düzeylerinin CT veya TT genotipine sahip olan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğunu bulmuşlardır. CC genotipine sahip bireylerde ilaç plazma düzeylerinin istenilen düzeye ulaşması ve ilaçtan maksimum yararlanım elde edilebilmesi için günlük KLZ dozunun diğer genotipe sahip bireylerinkine göre daha fazla olması gerektiğini önermişlerdir [14]. Akamine ve ark. (2017), ise 45 Japon hastada yaptıkları çalışmada CC genotipine sahip bireylerde doz normalize KLZ ve DKLZ'nin sırasıyla ortalamalarını 1,79 ng/ml/mg ve 0,74 ng/ml/mg olarak belirlemişler, CT genotipine sahip olduğunu bunlarda ise ortalama doz normalize KLZ ve DKLZ'nin sırasıyla 1,49 ng/ml/mg ve 0,62 ng/ml/mg olarak tespit etmişlerdir. TT genotipine sahip

bireylerde ise ortalama doz normalize KLZ'leri 1,89 ng/ml/mg ve doz normalize DKLZ ortalamaları ise 0,68 ng/ml/mg olarak bulunmuştur. Ancak çalışma sonucunda genotiplere göre bu düzeyler arasında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir [36]. Piatkov ve ark. (2017), farklı ırklardan oluşan çalışma gruplarında gerçekleştirdikleri araştırmada yirmi beş kişinin CC, otuz kişinin CT ve on üç kişinin de TT genotipine sahip olduğunu belirlemişler ve genotip ile KLZ ve DKLZ serum düzeylerinin ilişkili olmadığını göstermişlerdir [35]. Olsson ve ark. (2015) ise 95 kişilik İsveçli hasta grubunda gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda genotiplerin KLZ ve DKLZ düzeylerine etkisine rastlamamışlardır [30]. Literatürdeki verilerle elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da genotiplere göre KLZ ve DKLZ düzeyleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılık tespit edilememiştir. Ancak tüm veriler göz önüne alındığında sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlılık göstermese de literatürdeki diğer bulgular ile uyumlu olarak CC genotipine sahip olan bireylerde plazma düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Bunlarla birlikte literatürde Türk popülasyonunda *ABCB1* genotiplerinin agranülositoz ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma mevcut olup çalışmada plazma konsantrasyon tayini yapılmamıştır. Bu nedenle Türk şizofreni hastalarında plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri ölçülerek bu düzeylere *ABCB1* genotiplerinin etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine de sahiptir.

Klozapinin *UGT1A4* ile glukuronidasyonu sonucu üçüncül ve dördüncül yapıdaki glukuronit ürünleri olan klozapin-5-N- glukuroniti ve klozapin- N⁺- glukuroniti oluşurken DKLZ'i katalizlemesi sonucu da desmetilklozapin-5-N- glukuronitin (DKLZ-5-N- glukuronit) oluşmaktadır [44]. *UGT1A4**3 polimorfizmi sonucunda lösin amino asidi yerine valin amino asidi gelmesi sonucunda *UGT1A4* enziminin substrat bağlanma bölgesinde etilen grubuna bağlı bir sterik değişiklik meydana gelmekte ve bu da enzimin substrata bağlanmasında etki edebilmektedir [25]. Verilerimiz sonucunda *UGT1A4* T142G polimorfizminde TT ve TG+GG genotipine sahip bireylerde KLZ C/D ortancaları (Min; maks) sırasıyla 1,47 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 10,49 ng/ml/mg) ve 1,33 ng/ml/mg (0,31 ng/ml/mg; 3,05 ng/ml/mg); DKLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) ise 0,59 ng/ml/mg (0,06 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) ve 0,44 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 1,13 ng/ml/mg) olarak bulunmuştur. Bulgularımız göstergesinde polimorfizm sonucunda *UGT1A4**3 ile KLZ ve DKLZ'nin glukuronidasyonunun hızlandığını ve varyant bireylerde plazma düzeyinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Mori ve ark. (2005), *in vitro* ortamda gerçekleştirdikleri çalışmada varyant bireylerin yabanıl tip genotipe sahip bireylere göre KLZ'i iki kat daha etkili bir şekilde katalize ettiğini belirtmişlerdir [45]. İnsanlardan alınan karaciğer hücrelerinde gerçekleştirilen bir diğer *in vitro* çalışmada varyant bireylerde (*UGT1A4* 48Val) V_{max}/K_m değerlerinin yabanıl tip bireylere (*UGT1A4* 48Leu) göre KLZ-5-N- glukuronit, KLZ-N+- glukuronit ve DKLZ-5-N- glukuronit için sırasıyla 5,2; 2,0 ve 3,4 kat daha fazla olduğu bulunmuştur [44]. Olsson ve ark. (2015), KLZ kullanan 95 İsveçli bireyde yaptıkları çalışmada *UGT1A4*

L48V polimorfizminin KLZ ve DKLZ plazma düzeylerine etkisini araştırdıklarında farklılık tespit etmemişlerdir [30]. Bizim verilerimizde Olsson ve ark. (2015) verileri ile uyumlu olup TT genotipine sahip olanlarda daha düşük KLZ ve DKLZ görülsede istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir. Ancak KLZ ve DKLZ düzeylerinin TT genotipine sahip olan bireylerde daha düşük olmasına bağlı olarak klinisyenlerin bu genotipe sahip olan bireylerde etkin tedaviyi elde edebilmeleri ve hastanın tedaviden maksimum oranda yararlanım sağlayabilmesi için genotiplenme sonuçlarını da dozun belirlenmesinde bir biyogösterge olarak kullanılması önerilmektedir. Ayrıca çalışmamız *UGT1A4* polimorfizminin Türk şizofreni popülasyonunda araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine sahip olup bu genotiplerin plazma KLZ ve DKLZ düzeyleri üzerinde etkisinin de incelendiği ilk araştırma olma özelliği taşımaktadır.

ABCB1 ve *UGT1A4* genotipleri her iki enzim içinde hızlı çalışanlar (*ABCB1* CC+ *UGT1A4* TG) ve yavaş çalışmaya neden olanlar (*ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT) olmak üzere gen kombinasyonları yapılarak KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri karşılaştırıldığında KLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) *ABCB1* CC+ *UGT1A4* TG ve *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT grupları için sırasıyla 1,69 (0,45; 3,05) ve 1,43 (0,22; 10,49) olarak bulunmuştur. DKLZ C/D düzeyleri ortancaları (Min; Maks) *ABCB1* CC+ *UGT1A4* TG için 0,47 ng/ml/mg (0,15 ng/ml/mg; 0,65 ng/ml/mg), *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT grubu için 0,69 ng/ml/mg (0,11 ng/ml/mg; 4,12 ng/ml/mg) olarak bulunmakta olup bu da *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT genotiplerine sahip olan grupta KLZ C/D düzeyi daha düşük, DKLZ düzeyinin ise diğer gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Bulgularımız sonucunda *ABCB1*'in plazma düzeylerine olan etkisi göz önünde bulundurulabilir ancak bizim sonuçlarımıza göre yanıt veya advers etki gelişiminde bir etkisinin olabileceği klinik olarak söylenemez. Ancak *ABCB1* geninde TT genotipine sahip olanlarda hücrel atılımın azaldığını bu nedenle bu bireylerde DKLZ düzeyinin daha yüksek olduğunu; *UGT1A4* geninde TT genotipine sahip olunması durumunda DKLZ atılımının daha azaldığını ve böylece DKLZ'nin daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Sonuç olarak her iki gen bölgesinde *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT genotipine sahip olan bireylerde hücrel atılımın ve eliminasyonun yavaş olacağından bu bireylerde doz ayarlamasının diğer genotiplere sahip olan bireylere göre daha dikkatli yapılması önerilmektedir. Sonuç olarak *ABCB1*'in aksine, *UGT1A4*'ün ilacın metabolizmasında ve plazma düzeyine etkisinde klinik olarak önemli olduğunu söyleyebiliriz.

vi. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkıları

KLZ ve DKLZ'nin hücrel taşınmasında rol oynayan *ABCB1* proteinini ve her iki molekülün glukuronidasyonla eliminasyonunda görev alan *UGT1A4* enzimini kodlayan gen bölgelerinde meydana gelen polimorfizmler proteinlerin/ enzimlerin ifadesinde değişikliğe neden olarak KLZ ile tedavi gören hastalarda tedavide bireyler arasında farklılığa neden olabilmektedir. Bu çalışmada, KLZ kullanan şizofreni hastalarında KLZ ve onun aktif metaboliti olan DKLZ plazma düzeylerine *ABCB1* C3435T ve

*UGT1A4*3* gen polimorfizmlerinin etkileri incelenmiştir.

ABCB1 ve *UGT1A4* genotipleri ile KLZ ve DKLZ düzeyleri arasında istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$). Buna rağmen *ABCB1* TT genotipine sahip olanlarda KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri *ABCB1* CC genotipine sahip olanlardan daha yüksek bulunmuştur. *UGT1A4* TT genotipine sahip olanlarda da *UGT1A4* TG+ *UGT1A4* GG genotiplerine sahip olan grupla karşılaştırıldığında KLZ C/D ve DKLZ C/D düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak her iki gen için hızlı çalışmaya yol açan genotip kombinasyonu (*ABCB1* CC+ *UGT1A4* GT) ve her iki gen için yavaş çalışmaya yol açan genotip kombinasyonu (*ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT) birlikte değerlendirildiğinde, *ABCB1* TT+ *UGT1A4* TT grubundakilerde daha düşük DKLZ düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak tüm bulgularımız değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmediğinden klinik öneme sahip olamayabileceğini söyleyebiliriz. Ancak, *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4*3* polimorfizmlerinin KLZ ve DKLZ düzeyleri üzerinde etkili olabileceği bulunan sonuçlar ile gösterilmiş ve elde edilen verilerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bunun sonucunda da bireysel tedavide etkililiğin artırılması ve yan etkilerin en aza indirgenmesinde *ABCB1* C3435T ve *UGT1A4*3* polimorfizmlerinin psikofarmakoterapide farmakogenetik biyogösterge olarak kullanılma potansiyeli vardır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar için çalışma grubunun genişletilmesi önerilmektedir.

Araştırma kapsamında çalışılan proteinler/ enzimler, KLZ farmakokinetiğinde görev almaktadır. Bu genlerde yer alan polimorfizmlere bağlı olarak bu genlerin kodlamış olduğu proteinlerde polimorfizmlerin bulunduğu nokta ve oluş şekillerine göre proteinin yapısında ve fonksiyonunda değişiklik meydana gelerek KLZ toksikokinetiğini değiştirebilmektedir. Buna bağlı olarak polimorfik bireylerde diğer bireylerle aynı doz uygulansa da kan ilaç ve metabolit düzeyi normal bireylere göre daha farklı olabilecektir. Dolayısıyla bu genler açısından mutasyonlu bireylerin belirlenmesi ile polimorfik bireylerde ilaç dozunun belirlenmesi ve tedavinin etkin bir hale getirilmesi potansiyeli araştırılmıştır.

*Bu potansiyelin sonuçları bireysel etkin tedavinin sağlanarak hastanın yaşam kalitesinin artırılabilmesi, hastalıktan etkilenmenin en aza indirgenebilmesi ile yaşamını idame ettirebilmesine yardımcı olunabilecektir.

*Söz konusu araştırılan genlerin ileride farmakogenetik biyogöstergeler olarak kullanılabilmesi potansiyeli bulunmaktadır.

*Bu araştırma benzer fonksiyonları olan diğer enzim ve proteinlerin gen polimorfizmlerinin çalışılacağı diğer çalışmalara da örnek olabilecektir.

* Araştırma sonunda kurulan genotipleme yöntemlerinin ileriki yıllarda kit haline getirilerek hastanelerde kullanılabilme potansiyeli de bulunmaktadır.

* Şizofreni hastalarında etkin tedavinin görülemediği durumlarda hastalığın yan etkisi olarak bireylerde halüsinasyon ve delüzyonlara bağlı olarak intihar riskinin arttığı görülebilmektedir. Bunun nedenlerinden biri de KLZ kullanan hastalarda etkin tedavinin sağlanamamasından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, yüksek doz uygulamasına bağlı olarak tedavide advers etkiler gözlemlenebilmektedir. Elde edilen verilerimiz ile hastalarda *ABCB1* ve *UGT1A4* gibi KLZ farmakokinetiğinde rol alan genlerdeki TNP'lerinin belirlenmesi ile KLZ tedavisinde etkililik artırılarak hastaların halüsyon ve delüzyonları azaltılarak intihar risklerinin ve doza bağlı gelişebilecek toksisitenin azaltılabileceği düşünülmektedir.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Sağlanan altyapı olanakları ile başka proje gerçekleştirilmemiştir.

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Sağlanan altyapı olanakları, yapılan araştırmanın sonuçları, bilimsel kongrede sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar yayın haline dönüştürülmek üzere makale haline dönüştürülmeye başlanmıştır.

IX. Kaynaklar

1. Association, A.P., *Schizophrenia*, in *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 2013: Washington, DC. p. 99-105.
2. McGrath, J., et al., *Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality*. *Epidemiologic reviews*, 2008. **30**(1): p. 67-76.
3. BİNBAŞ, T., et al., *Türkiye'de Psikoz Epidemiyolojisi: Yaygınlık Tahminleri ve Başvuru Oranları Üzerine Sistemik Bir Gözden Geçirme*. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 2011. **22**: p. 40-52.
4. Bersani, F.S., et al., *Factors affecting interindividual differences in clozapine response: a review and case report*. *Hum Psychopharmacol*, 2011. **26**(3): p. 177-87.
5. Ellison, J.C. and R.L. Dufresne, *A review of the clinical utility of serum clozapine and norclozapine levels*. *Mental Health Clinician*, 2015. **5**(2): p. 68-73.
6. Couchman, L., et al., *Plasma clozapine, norclozapine, and the clozapine: norclozapine ratio in relation to prescribed dose and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 1993–2007*. *Therapeutic drug monitoring*, 2010. **32**(4): p. 438-447.
7. Fang, J. and K. Mosier, *Literature values of terminal half-lives of clozapine are dependent on the time of the last data point*. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2014. **17**(2): p. 187-189.
8. Hiemke, C., et al., *AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011*. *Pharmacopsychiatry*, 2011. **21**(06): p. 195-235.
9. Patel, K.R., et al., *Schizophrenia: overview and treatment options*. *Pharmacy and Therapeutics*, 2014. **39**(9): p. 638.
10. Bell, R., et al., *The clinical use of plasma clozapine levels*. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, 1998. **32**(4): p. 567-574.
11. Flanagan, R.J. and L. Dunk, *Haematological toxicity of drugs used in psychiatry*. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 2008. **23**(S1): p. S27-S41.
12. Kane, J.M., *Drug Therapy*. *The New England Journal of Medicine*, 1996. **334**: p. 34-41.
13. Krivoy, A., et al., *Gene polymorphisms potentially related to the pharmacokinetics of clozapine: a systematic review*. *International clinical psychopharmacology*, 2016. **31**(4): p. 179-184.
14. Consoli, G., et al., *ABCB1 polymorphisms are associated with clozapine plasma levels in psychotic patients*. *Pharmacogenomics*, 2009. **10**(8): p. 1267-1276.

15. Sirot, E.J., et al., *ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine*. Journal of clinical psychopharmacology, 2009. **29**(4): p. 319-326.
16. C do Carmo Borges, N., et al., *Comparative bioavailability of two oral formulations of clozapine in steady state administered in schizophrenic volunteers under individualized dose regime*. Current clinical pharmacology, 2012. **7**(4): p. 241-253.
17. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1976. **455**(1): p. 152-162.
18. Tovilla-Zárate, C.A., et al., *Association study between the MDR1 gene and clinical characteristics in schizophrenia*. Brazilian Journal of Psychiatry, 2014. **36**(3): p. 227-232.
19. Hoffmeyer, S., et al., *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(7): p. 3473-3478.
20. Sakaeda, T., *MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction?* Drug metabolism and pharmacokinetics, 2005. **20**(6): p. 391-414.
21. Fujii, T., et al., *Association between the functional polymorphism (C3435T) of the gene encoding P-glycoprotein (ABCB1) and major depressive disorder in the Japanese population*. Journal of psychiatric research, 2012. **46**(4): p. 555-559.
22. Ehmer, U., et al., *Variation of hepatic glucuronidation: novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 970-977.
23. López, M., et al., *Interethnic differences in UGT1A4 genetic polymorphisms between Mexican Mestizo and Spanish populations*. Molecular biology reports, 2013. **40**(4): p. 3187-3192.
24. Benoit-Biancamano, M.-O., et al., *A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4*. Pharmacogenetics and genomics, 2009. **19**(12): p. 945.
25. Ghotbi, R., et al., *Carriers of the UGT1A4 142T> G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure—an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients*. European journal of clinical pharmacology, 2010. **66**(5): p. 465-474.
26. Broeks, A., et al., *Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode Caenorhabditis elegans*. The EMBO journal, 1996. **15**(22): p. 6132-6143.
27. Yagcoglu, A.E.A., et al., *Agranulocytosis related to clozapine in monozygotic twins and association with allelic variants of multidrug resistance gene MDR1*. Journal of clinical psychopharmacology, 2011. **31**(2): p. 247-249.
28. Bozina, N., et al., *Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients*. Journal of psychiatric research, 2008. **42**(2): p. 89-97.
29. Kuzman, M.R., et al., *The influence of 5-HT2C and MDR1 genetic polymorphisms on antipsychotic-induced weight gain in female schizophrenic patients*. Psychiatry research, 2008. **160**(3): p. 308-315.
30. Olsson, E., et al., *Genetic and clinical factors affecting plasma clozapine concentration. The primary care companion for CNS disorders*, 2015. **17**(1).
31. Kastelic, M., et al., *MDR1 gene polymorphisms and response to acute risperidone treatment*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2010. **34**(2): p. 387-392.
32. Kuzman, M.R., et al., *Association study of MDR1 and 5-HT2C genetic polymorphisms and antipsychotic-induced metabolic disturbances in female patients with schizophrenia*. The pharmacogenomics journal, 2011. **11**(1): p. 35-44.
33. Mouaffak, F., et al., *Ultra-resistant schizophrenia is not associated with the multidrug-resistant transporter 1 (MDR1) gene rs1045642 variant*. Journal of clinical psychopharmacology, 2011. **31**(2): p. 236-238.
34. Papazisis, G., et al., *ABCB1 and CYP2D6 polymorphisms and treatment response of psychotic patients in a naturalistic setting*. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental, 2018. **33**(1): p. e2644.
35. Piatkov, I., et al., *ABCB1 and ABCC1 single-nucleotide polymorphisms in patients treated with clozapine*. Pharmacogenomics and personalized medicine, 2017. **10**: p. 235.
36. Akamine, Y., et al., *Quantification of the steady-state plasma concentrations of clozapine and N-desmethylclozapine in Japanese patients with schizophrenia using a novel HPLC method and the effects*

- of CYPs and ABC transporters polymorphisms. Annals of clinical biochemistry, 2017. **54**(6): p. 677-685.
37. RADOMINSKA-PANDYA, A., et al., *Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases*. Drug metabolism reviews, 1999. **31**(4): p. 817-899.
38. Tukey, R.H. and C.P. Strassburg, *Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2000. **40**(1): p. 581-616.
39. Haslemo, T., et al., *The effect of variable cigarette consumption on the interaction with clozapine and olanzapine*. European journal of clinical pharmacology, 2006. **62**(12): p. 1049-1053.
40. Kohlrausch, F.B., *Pharmacogenetics in schizoprenia: a review of clozapine studies*. Braz J Psychiatry, 2013. **35**(3): p. 305-17.
41. Rostami-Hodjegan, A., et al., *Influence of dose, cigarette smoking, age, sex, and metabolic activity on plasma clozapine concentrations: a predictive model and nomograms to aid clozapine dose adjustment and to assess compliance in individual patients*. Journal of Clinical Psychopharmacology, 2004. **24**(1): p. 70-78.
42. Wang, D. and W. Sadée, *Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1)*. The AAPS journal, 2006. **8**(3): p. E515-E520.
43. Schmitt, U., et al., *In vitro P-glycoprotein efflux inhibition by atypical antipsychotics is in vivo nicely reflected by pharmacodynamic but less by pharmacokinetic changes*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2012. **102**(2): p. 312-320.
44. Erickson-Ridout, K.K., D. Sun, and P. Lazarus, *Glucuronidation of the second-generation antipsychotic clozapine and its active metabolite N-desmethylclozapine. Potential importance of the UGT1A1 A (TA) 7TAA and UGT1A4 L48V polymorphisms*. Pharmacogenetics and genomics, 2012. **22**(8): p. 561.
45. Mori, A., et al., *UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation*. Drug metabolism and disposition, 2005. **33**(5): p. 672-675.

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

Projede TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI kaleminden 25.000,00 ile ihale yapılmış, genel toplamda 21.688,40 TL ile ihale sonlanmış alım gerçekleştirilmiştir.

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Yok.

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

Yok.

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) **(Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)**

Çalışmadan elde edilen KLZ ve DKLZ validasyon çalışmasının sonuçları, “ Rapid Determination of Clozapine and Main Metabolite by High Performance Liquid Chromatography” başlığı ile Antalya’da gerçekleşen 1st INTERNATIONAL CONGRESS on ANALYTICAL and BIOANALYTICAL CHEMISTRY kongresinde 27-30 Mart, 2019 tarihinde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler **(Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)**

Çalışma'dan elde edilen validasyon ve klinik sonuçların kromatografik analizler ve analitik toksikoloji konularında yayın yapan Science Citation İndeks'te indekslenen dergilerde yayınlanması için çalışmalar sürdürülmektedir. Yanı sıra elde edilen verilerin bazı bölümleri özet halinde uluslararası bir kongrede sözlü ya da poster sunum olarak sunulması planlanmaktadır

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.

Proje Bütçesi (Başlangıç ödenğinde proje kabul edilene kadar teklif edilen, kabul edildikten sonra kabul edilen rakamlar gösterilir)

Bütçe Yılı	Detaylar												
	Bütçe Kodu	Açıklama	Önceki Yıdan Devir	Başlangıç Ödenegi	Eklenen Aktarma	Düğülen Aktarma	Eklenen Ödenek	Düğülen Ödenek	Net Ödenek	Harcanan	Bloke Edilen (Avans)	Bloke Edilen (Diğer)	Kalan
2018	03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	0,00	4.956,05	0,00	0,00	0,00	0,00	4.956,05	3.988,40	0,00	0,00	967,65
		Toplam	0,00	4.956,05	0,00	0,00	0,00	0,00	4.956,05	3.988,40	0,00	0,00	967,65
2019	03.2	TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	967,65	20.043,95	0,00	0,00	0,00	0,00	21.011,60	17.700,00	0,00	0,00	3.311,60
		Toplam	967,65	20.043,95	0,00	0,00	0,00	0,00	21.011,60	17.700,00	0,00	0,00	3.311,60



