

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SİĞARA BAĞIMLISI BİREYLERDE ERBB4 ve NRG3 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Hale GÜLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. Emin ERDAL

MERSİN – 2015

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SİGARA BAĞIMLISI BİREYLERDE ERBB4 ve NRG3 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Hale GÜLER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TBB(HG) 2014-4 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 284

MERSİN – 2015

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Sigara Bağımlısı Bireylerde ErbB4 ve NRG3 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/07/2015


Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL

Mersin Üniversitesi

Jüri Başkanı

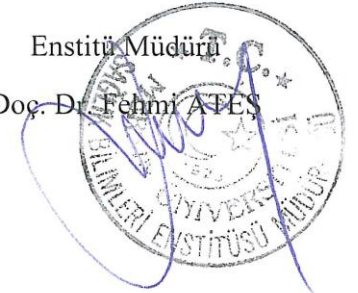

Doç. Dr. I. Ömer BARLAS
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Halit AKBAŞ
Harran Üniversitesi
Jüri Üyesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ~~05.08.2015~~ 2015/244 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Fehmi APES



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda destek olan ve yaptığım hatalar karşısında her zaman anlayış gösteren değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Vaka ve kontrol gruplarını temin etmemdeki rolleri, destekleri ve çalışmaları için Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı hocalarından Sn Doç. Dr. Cem ŞENGÜL'e, Yrd.Doç.Dr. M. Ceyhan BALLI ŞENGÜL'e ve Uzm.Dr. Kamuran KARAKÜLAH'a; ayrıca akademik eğitimime katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalımızın değerli hocalarına; tezimin istatistiksel analizlerinin yapılmasında Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan Sn. Yrd.Doç.Dr. Semra ERDOĞAN'a ve Dilem DİNÇ'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Arş.Gör. Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ'a, karşılaştığım zorluklarda yol gösterici olan Arş.Gör. Neslihan Pınar ÖZATEŞ'e, Arş.Gör. Nisa UYAR'a, Arş.Gör. Ümit KARAKAŞ'a, Okt. Melek ÖZER'e, Fatma SARIDAŞ'a, Onur KARA'ya, tüm anabilim dalı asistan, öğrenci ve çalışanlarına, bu tez çalışmasını lisansüstü araştırma bursuyla destekleyen Türkiye Yeşilay Cemiyeti'ne teşekkür ederim.

Beni, maddi ve manevi her konuda destekleyerek sonsuz emek harcayan ve buralara gelmemi sağlayan kıymetli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL	ve
ONAY	Hata! Yer
işareti tanımlanmamış.	
TEŞEKKÜR	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Bağımlılık.....	2
2.1.1. Sigara Bağımlılığı	3
2.1.1.1. Sigara Kullanım Epidemiyolojisi	4
2.1.1.2. Sigaraya Başlamada Etkili Olan Faktörler	6
2.1.2. Sigaranın Bağımlılık Yapıcı Etkisi	7
2.1.2.1. Nikotinin Beyindeki Rolü	8
2.1.2.2. Nikotin Farmokinetiği	10
2.1.3. Sigara Kullanımının İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	11
2.1.3.1. Nikotinin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi.....	12
2.1.3.2. Nikotinin Genotoksik Etkileri	13
2.1.3.3. Nikotinin Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri	13
2.1.3.4. Nikotinin Endokrin Sistem Üzerine Etkileri	14

2.1.3.5. Nikotinin Apoptoz Üzerine Etkisi.....	15
2.1.4. Sigara Bağımlılığı ve Genetik Faktörler	15
2.1.4.1. Nikotinle İlişkili Aday Genler	17
2.1.4.1.1. Nikotin Metabolizmasında Rol Alan Genler.....	17
2.1.4.1.2. Dopaminerjik Sistem Aday Genleri	17
2.1.4.1.3. Nikotinic Asit Reseptör Genleri.....	19
2.1.4.1.4. Serotonerjik Genler	20
2.1.4.2. ErbB4 ve NRG3 Gen Polimorfizmleri	22
2.1.4.2.1. ErbB Reseptör Yapısı.....	22
2.1.4.2.1.1. ErbB4 İzofomları	25
2.1.4.2.2. Neuregulinler	28
2.1.4.2.2.1. NRG3	28
2.1.5. Tanı Kriterleri.....	31
2.1.5.1. Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi	31
2.1.5.2. DSM-IV-TR - Nikotin Bağımlılığı	33
2.1.5.3. DSM-IV Nikotin Yoksunluğu	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
3.1. Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasallar	35
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları	35
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.1.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	37
3.2. Vaka-Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması ...	38
3.3. DNA İzolasyonu.....	38
3.3.1. Miller tuz çöktürme yöntemi.....	39
3.3.2. Kit yöntemi.....	40
3.4. ErbB4 ve NRG3 Genlerinin Real-Time PCR ile Çoğaltılması	41
3.4.1. ErbB4 Geninde Çalışılan SNP'lerin Özellikleri.....	41
3.4.2. NRG3 Geninde Çalışılan SNP'lerin Özellikleri.....	43

3.4.3. Real Time-PCR reaksiyon ortamının hazırlanması.....	44
3.5. Genotip Tayini.....	45
3.6. İstatistiksel Analiz.....	48
4. BULGULAR.....	49
4.1. Vaka ve Kontrol Gruplarının Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi.....	49
4.2. ErbB4 ve NRG3 Genlerinin Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	50
4.2.1. ErbB4-rs1836724 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	50
4.2.2. ErbB4-rs7562566 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	53
4.2.3. ErbB4-rs10048757 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	55
4.2.4. NRG3-rs1764072 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	57
4.2.5. NRG3-rs6584400 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	59
4.2.6. NRG3-rs10083934 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi.....	61
4.3. Bağımlılık Düzeylerinin Cinsiyet ve Polimorfizmler Açısından Değerlendirilmesi	63
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
7. KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nöronal nAChR yapısı ve şekli.	8
Şekil 2.2. Nikotin beyin bölgelerindeki etkileri.....	9
Şekil 2.3. ErbB reseptörlerinin aktivasyon mekanizması	23
Şekil 2.4. ErbB reseptörlerinin ligandları ve hücre içi sinyal mekanizması	24
Şekil 2.5. ErbB4 reseptörünün proteolitik yıkımı	25
Şekil 2.6. ErbB4 geninin kromozom üzerindeki lokalizasyonu.....	26
Şekil 2.7. ErbB4 izoformları	27
Şekil 2.8. NRG3 geninin kromozom üzerindeki lokalizasyonu.....	29
Şekil 2.9. NRG/ErbB4 sinyal mekanizması ile asetilkolin reseptör ekspresyonu	30
Şekil 3.1. <i>NRG3-rs10883934</i> polimorfizmi için allelik diskriminasyon.	46
Şekil 3.2. <i>NRG3-rs10883934</i> polimorfizminin A/A genotipi.....	46
Şekil 3.3. <i>NRG3-rs10883934</i> polimorfizminin A/G genotipi.....	47
Şekil 3.4. <i>NRG3-rs10883934</i> polimorfizminin G/G genotipi.....	47
Şekil 4.1. <i>ErbB4-rs1836724</i> polimorfizminin allellerine ait vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı.....	52
Şekil 4.2. <i>ErbB4-rs7562566</i> polimorfizminin allellerine ait vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı.....	54
Şekil 4.3. <i>ErbB4-rs10048757</i> polimorfizminin allellerine ait vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı.....	56
Şekil 4.4. <i>NRG3-rs1764072</i> polimorfizminin allellerine ait vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı.....	58
Şekil 4.5. <i>NRG3-rs6584400</i> polimorfizminin allellerine ait vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı.....	60

Şekil 4.6. *NRG3-rs10883934* polimorfizminin allellerine ait vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı..... 62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. GATS üye ülkelerden bazılarında cinsiyete göre sigara kullanım oranları	5
Çizelge 2.2. Nikotinin organizma ve hücre düzeyindeki etkileri.....	12
Çizelge 2.3. Nikotin bağımlılığı ile ilgili aday genler.....	21
Çizelge 2.4. Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi	32
Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler	37
Çizelge 3.2. <i>ErbB4</i> genine ait <i>rs7562566</i>	41
Çizelge 3.3. <i>ErbB4</i> genine ait <i>rs1836724</i>	42
Çizelge 3.4. <i>ErbB4</i> genine ait <i>rs rs10048757</i>	42
Çizelge 3.5. <i>NRG3</i> genine ait <i>rs10883934</i>	43
Çizelge 3.6. <i>NRG3</i> genine ait <i>rs1764072</i>	43
Çizelge 3.7. <i>NRG3</i> genine ait <i>rs6584400</i>	44
Çizelge 3.8. Real-Time PCR protokolü	45
Çizelge 4.1. Vaka-kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları	49
Çizelge 4.2. <i>ErbB4</i> geni üzerinde yer alan <i>rs1836724</i> polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları.....	51
Çizelge 4.3. <i>ErbB4</i> genine ait <i>rs1836724</i> polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımı.....	52
Çizelge 4.4. <i>ErbB4</i> geni üzerinde yer alan <i>rs7562566</i> polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları.....	53
Çizelge 4.5. <i>ErbB4</i> genine ait <i>rs7562566</i> polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımı.....	54
Çizelge 4.6. <i>ErbB4</i> geni üzerinde yer alan <i>rs10048757</i> polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları.....	55

Çizelge 4.7. <i>ErbB4</i> genine ait <i>rs10048757</i> polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımı.....	56
Çizelge 4.8. <i>NRG3</i> geni üzerinde yer alan <i>rs1764072</i> polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları.....	57
Çizelge 4.9. <i>NRG3</i> genine ait <i>rs1764072</i> polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımı.....	58
Çizelge 4.10. <i>NRG3</i> geni üzerinde yer alan <i>rs6584400</i> polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları.....	59
Çizelge 4.11. <i>NRG3</i> genine ait <i>rs6584400</i> polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımı.....	60
Çizelge 4.12. <i>NRG3</i> geni üzerinde yer alan <i>rs10883934</i> polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları.....	61
Çizelge 4.13. <i>NRG3</i> genine ait <i>rs10883934</i> polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımı.....	62
Çizelge 5.1. Nikotin bağımlılığıyla ilişkili SNP ve ekspresyon çalışılan genler	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin bazı
α	: Alfa
A.B.D	: Amerika Birleşik Devletleri
ACh	: Asetilkolin
ANKK1	: Ankyrin Repeat And Kinase Domain Containing 1
β	: Beta
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin bazı
C₂H₇NO₂	: Amonyum Asetat
CHRNA3	: Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha 3
CHRNA4	: Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha 4
CHRNA5	: Cholinergic Receptor, Nicotinic, Alpha 5
COMT	: Catechol-O-Methyltransferase
CREB	: cAMP Responsive Element Binding Protein
CYP2A6	: Cytochrome P450, Family 2, Subfamily A, Polypeptide 6
CYP2B6	: Cytochrome P450, Family 2, Subfamily B, Polypeptide 6
DAT	: Dopamine Transporter
DAT1	: Dopamine Transporter 1
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DRD2	: Dopamine Receptor D2
DRD4	: Dopamine Receptor D4
DSM-IV-TR	: Ruhsal Hastalıklar için Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- Fourth Edition-Text Revision)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik asit
EGF	: Epidermal Growth Factor

TGF-α	: Transforming Growth Factor- α
AR	: Amphiregulin
EPG	: Epigen
BTC	: Betacellulin
HB-EGF	: Heparin-Binding EGF like Growth Factor
NRG	: Neuregulin
HPA	: Hipotalamus-hipofiz adrenal eksenini
ACTH	: Adrenokortikotrop hormon
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
ErbB4	: Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 4
FAM	: 6-Karboksi-Floresan
FNBT	: Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi
G	: Guanin bazı
GABA	: Gama Amino Bütirik Asit
GATS	: Global Adult Tobacco Surveillance System
GWAS	: Genome-wide association study
HW	: Hardy Weinberg
ICD	: International Classification of Disease
M	: Molar
MAPK	: Mitogen Activated Kinase
miRNA	: mikroRNA
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
Na₂EDTA	: Sodyum Etilendiamintetraasetik Asit
NAcc	: Nucleus Accumbens
nAChR	: Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri
NaCl	: Sodyum klorür
NRG3	: Neuregulin 3
°C	: Santigrat derece
pH	: Hidrojenin Gücü
Real Time PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ROX	: 6-Karboksi-X-Rodamin
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
rs	: Referans SNP numarası
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek bir nükleotid polimorfizmi)
T	: Timin bazı
TE	: Tris-EDTA
Tris-HCl	: Tris-Hidroklorit
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeats (Değişken sayıda ardışık tekrarlar)
VTA	: Ventral Tegmental Alan
5-HTT	: 5-Hidroksitriptamin Transporter (Serotonin taşıyıcı protein)

ÖZET

Sigara Bağımlısı Bireylerde *ErbB4* ve *NRG3* Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Sigara bağımlılığı; düzenli olarak sigara kullanma, sigarayı bıraktınca anksiyete, sinirlilik, konsantrasyon güçlüğü, huzursuzluk, sabırsızlık, açlık, titreme, öfke kontrolünde zorluk, terleme, baş dönmesi, nikotin isteği gibi yoksunluk belirtileri yaşama, zararlarının bilinmesine rağmen bırakamama ve sigara bırakma girişimlerinin başarısız olması şeklinde karakterize edilmektedir. Bağımlılık gelişiminde çevresel ve genetik faktörler önemli rol oynamaktadır.

Bu tez çalışması için; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran kişiler arasından; 200 sigara bağımlısı birey ile sigara içimi olmayan, sağlıklı 200 gönüllü bireyden vaka ve kontrol grubu oluşturulup, her bireyden kan örneği alındı. Vaka ve kontrol grubuna ait bireylerden alınmış olan kan örneklerinden, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında, DNA izolasyonu yapılarak, her bireyin, *ErbB4* genine ait *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* ile *NRG3* genine ait *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* polimorfizmlerinin moleküler analizi, Real-Time PCR (Applied Biosystems) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışma sonucunda elde edilen veriler, SPSS v.11.5 paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. *ErbB4* genine ait *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* ile *NRG3* genine ait *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* polimorfizmlerinin vaka ve kontrol gruplarına ait genotip dağılımı ve allel frekansları açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Ayrıca bağımlılık düzeyleri açısından da polimorfizmler arasında bir farklılığın olmadığı gözlemlendi.

Sonuç olarak; *ErbB4* genine ait *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* ile *NRG3* genine ait *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* polimorfizmleri ile sigara bağımlılığı arasında bir ilişkinin olmadığı görüldü. Bu gen polimorfizmlerinin sigara bağımlılığı ile ilişkisinin araştırıldığı bu çalışmanın Türk toplumunda daha önce çalışılmamış olması nedeniyle, hastalığın etiyolojisini anlamada, literatüre katkı sağlayacak ve yapılacak çalışmalar için yol gösterici olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Sigara Bağımlılığı, *ErbB4*, *NRG3*, Real Time PCR, polimorfizm.

ABSTRACT

The Investigation of ErbB4 and NRG3 Gene Polymorphisms in Individuals with Smoking Addiction

Nicotine dependence is characterized as experiencing withdrawal symptoms such as smoking regularly, anxiety after quitting smoking, irritation, difficulty of concentration, uneasiness, impatience, hunger, shivering, difficulty in controlling anger, sweating, dizziness and demand for nicotine; difficulty in voluntarily quitting in spite of knowing health risks of smoking and failure to quit. Environmental and genetic factors play a crucial role in addiction progress.

For this research study, 200 smoker and 200 healthy and who is volunteer non-smoker participants were recruited from among the patients who apply at Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Psychiatry Polyclinics to form experimental and control groups and blood samples from each and every participant were drawn by the researcher. In the study, the molecular analysis of *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* polymorphisms of *ErbB4* gene and *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* polymorphisms of *NRG3* gene of each individual was performed by using Real-Time PCR (Applied Biosystems) method through DNA isolation of blood samples drawn from participants in experimental and control groups which was performed at Mersin University Faculty of Medicine.

Data was analyzed statistically by SPSS v.11.5 packet program. The results show that there is no meaningful difference between *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* polymorphisms of *ErbB4* gene and *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* polymorphisms of *NRG3* gene when it was compared in terms of genotype distribution and allele frequency of experimental and control groups ($p>0,05$). Besides, it was observed that there is no difference in the polymorphisms in terms of addiction level.

As a consequence, it was concluded that there is no correlation between *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* polymorphisms of *ErbB4* gene; *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* polymorphisms of *NRG3* gene and nicotine dependence. Due to the fact that there has been no conducted research study on the correlation between gene polymorphisms and nicotine dependence in the Turkish population before, this study aims to find out the etiology of the disease and to contribute the literature. It can also be a guide for future research studies.

Key words: Nicotine Dependence, *ErbB4*, *NRG3*, Real Time PCR, polymorphism.

1. GİRİŞ

Sigara bağımlılığı; dünya çapında yaygın olup hastalık ve ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya genelinde yaklaşık 1,3 milyar kişi sigara içmektedir ve her 10 yetişkinden biri sigaranın neden olduğu hastalıklar yüzünden ölmektedir. Bu da 500 milyon kişinin sigara kullanımından öleceği anlamına gelmektedir (1).

Sigara bağımlılığı oluşum sürecinde, bireysel, çevresel ve genetik faktörler birlikte rol oynamaktadır. Sigaraya başlama, bağımlılık oluşum süreci ve sigarayı bırakma isteğine kadar sigara içme davranışının tüm aşamalarında genetik faktörlerin rol oynadığı belirlenmiştir (2,3,4). Genetik katkının sigaraya başlamada %50 ve devamlılığında ise %70 etkili olduğu görülmüştür (2).

Nikotin ile ilişkili olduğu düşünülen birçok aday gen tanımlanmış olmasına rağmen son zamanlarda Erb-B2 reseptör tirozin kinaz 4 (ErbB4) ve Neuregulin 3 (NRG3) genlerindeki tekli nükleotid polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) çalışılmaktadır (4,5). Kronik nikotin maruziyetinin ardından ErbB4 ve NRG3 gen ekspresyonlarında önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca NRG3 SNP'lerinin sigara bırakma üzerine olan etkisi de gösterilmiştir (5).

Loukola ve ark. (2014) yaptığı bir çalışmada ErbB4 ve NRG3 genlerindeki SNP'ler ile sigara bağımlılığı arasında bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (4). Bu genlerde meydana gelen SNP'lerin bağımlılığa katkısı olabileceğini düşünerek bu çalışmanın yapılması planlandı. Şimdiye kadar Türk populasyonunda sigara bağımlısı tanısı konulmuş kişilerde bu gen polimorfizmleriyle ilgili yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması bu konuda yapılan ilk çalışma olacaktır. Ayrıca ErbB4 ve NRG3 gen SNP'lerinin bağımlılığın etiyolojisini açıklamada, genetik yatkınlığının belirlenmesinde ve tedavi de yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağımlılık

Dünya çapında herkesi etkileyebilen önemli bir sağlık sorunu olan bağımlılık, tüm olumsuz sonuçlara rağmen madde alımının devamı ve madde alımı üzerindeki kontrolün kaybı olarak tanımlanmaktadır (6). Bağımlılığın gelişimi, maddenin kullanım süresine, kullanan kişinin kişilik özelliklerine, ruh durumuna, beyin gücüne ve alınan maddenin türüne göre değişmektedir. Her maddenin bağımlılık potansiyeli farklılık göstermektedir (8). Çoğu nöropsikiyatrik bozukluklar gibi madde bağımlılığı, bugün davranışsal bozuklukların temelini oluşturmaktadır. Bu bozukluklar tekrarlı madde alımına bağlı olarak aşamalı olarak gelişmektedir (8,9). Bağımlılık oluşum sürecinde etken madde, ilk maruziyetin ardından beyne ulaşarak hedef proteine bağlanır. Bu bağlanma maddenin akut davranışsal etkilere neden olan, beyindeki partiküler sinapslarda sinaptik iletiyi başlatır (10). Sonuç olarak madde bağımlılığı, indüklü nöral plastisitenin bir formu olarak düşünülebilir. Kullanılan madde miktarı ve tipine bağlı olarak spesifik beyin bölgelerindeki gen ekspresyonu değişir. Bu değişmiş gen ekspresyonu özgün nöronların fonksiyonunu etkiler ve nöronal etki alanını değiştirir. Bu nöronal bölgedeki değişiklikler bağımlılıkta ortaya çıkan davranışsal anomalilerin nedeni olduğu düşünülmektedir (8).

Birçok opyat, alkol, esrar, kokain gibi birçok bağımlılık tipi tanımlanmış olmasına rağmen en yaygın olanı tütün bağımlılık tipidir (11,12).

2.1.1. Sigara Bağımlılığı

Sigara bağımlılığı, Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre popülasyonun üçte birini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (13,14). Dünya çapında bir milyardan fazla insan sigara içmektedir. Sigara içimi ölümlerin ve hastalıkların başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir (13,15). Sigarayı bırakma, ilgili hastalıkların gelişimini ve ölüm oranını azaltmaktadır (13).

Sigara, *Nicotiana tobacum* adı verilen tütün bitkisinden yapılmaktadır (15). Sigara dumanı 500 den fazla gaz, çoğu zehir ve 50'si kanserojenik olan 3500 kimyasal bileşenden oluşmasına rağmen esas bağımlılık etkeni nikotindir (10,16).

Sigara bağımlısı bireyler için sigara içme hem bir öğrenilmiş davranış hem de nikotine fiziksel bir bağılıktır(17). Bağımlılık oluşum süreci üç aşamadan oluşmaktadır. Öncelikle nikotinin keyif verici etkisinden kaynaklanmaktadır. Sigara içmeye başladıktan saniyeler sonra nikotin kan beyin bariyerini geçer ve orada keyif verici etkiler oluşturur. Bu keyif ve haz birkaç dakika sürdüğü için sigara bağımlısı kişiler genellikle gün boyu aynı etkiyi devam ettirmek için tekrar tekrar içmek isterler. Daha sonra sürekli alınan sigaraya maruziyetin adaptasyon şekli olan tolerans gelişir. Tolerans, normal etkiyi ortaya çıkarmak üzere daha büyük bir dozu gerektirecek bir şekilde, daha önce alınan nikotinin vücut tarafından azalmış duyarlılığının bir durumudur. Vücut nikotinin tekrarlı alımına adapte olur. Kişinin tekrarlı bir biçimde sigara kullanması nikotinin verdiği etkiyi azaltmaktadır. Bu da aynı etkileri alabilmek için daha fazla sigara içimine neden olmaktadır (16,18).

Sigara bağımlılarının sık sık sigara içmek istemelerinin diğer bir nedeni de nikotinin yol açtığı yoksunluk ya da çekilme semptomlarını yaşamaktan kaçınmaktır (19). Yoksunluk sendromu fizyolojik adaptasyon oluşturan sigara bırakımının ardından kaynaklanan belirti ve bulgulardır. Bu semptomlar geçicidir. Çünkü sürdürülebilir kaçınmadan sonra vücut normale döner. Nikotin geri çekilmesi fiziksel bir etkidir. Çekilme, Ruhsal Hastalıklar için Tanısal ve İstatistiksel El Kitabında (Diagnostic and yer alan ölçütlere göre tanımlanmaktadır. Yoksunluk belirtileri arasında anksiyete, sinirlilik, konsantrasyon güçlüğü, huzursuzluk, sabırsızlık, açlık, titreme, öfke kontrolünde zorluk, terleme, baş dönmesi, nikotin isteği, uyku bozukluğu, baş ağrısı,

sindirim bozukluğu ve depresyon sayılabilir (16,20). Bu belirtilerin ortaya çıkması bireyden bireye değişmektedir (16,18).

Hem cinsiyet hem de sosyoekonomik durumlar bağımlılığın gelişim evrelerini etkileyebilir. Farklı genetik ve çevresel faktörler de bu süreci etkiler (13). Sigara bağımlılığının gelişiminde ve sigara içmeye başlamada çevresel faktörlerin, içicilikten bağımlılığa geçişte genetik faktörlerin rol oynadığı belirlenmiştir (21).

2.1.1.1. Sigara Kullanım Epidemiyolojisi

Sigara içme, hem sanayileşmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaygındır (22). Dünyadaki bir milyardan fazla içicinin yaklaşık %80'i düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır (23). Gelişmiş ülkelerde sigara içen kadınların oranı % 24 iken gelişmekte olan ülkelerde bu oranın yaklaşık %7 olduğu ayrıca gelişen ülkelerde tütün kullanımının her yıl yaklaşık % 3,4 oranında artış göstereceği tahmin edilmektedir (21). DSÖ tarafından Amerika Birleşik Devletleri (ABD) merkezlerinde tütün kullanımı ve kontrolü amacıyla 16 ülkenin katılımıyla oluşturulan Küresel Tütün İzleme Sistemi (Global Tobacco Surveillance System, GATS) verilerinde, sigara kullanımı her yıl kayıt altına alınmaktadır (Çizelge 2.1) (24).

Çizelge 2.1. GATS üye ülkelerden bazılarında cinsiyete göre sigara kullanım oranları (25)

Ülke	Kadın (%)	Erkek (%)
İngiltere	20.6	22.8
ABD	16.2	24
Hindistan	2.9	24.3
Çin	2.4	52.9
Rusya	21.7	60.2
Tayland	3.1	45.6
Mısır	0.5	37.6
Brezilya	13.1	21.6
Meksika	7.8	24.8
Türkiye	15.2	47.9

DSÖ verileri, dünya genelinde erkeklerin %48'i ve kadınların %12'sinin sigara içtiğini göstermektedir. Ayrıca dünya genelinde 12 milyon kadın hamilelik boyunca sigara içmeye devam etmektedir (21).

ABD'de, toplam nüfusun %25'i, 12 yaşında sigara içmeye başlamaktadır (26).

Türkiye'de ise erkeklerin %41.5, kadınların %13.1'i ve tüm toplumun %27.1'i sigara içmektedir. Sigaraya 15 yaşından önce başlayanların oranı kadınlarda %14.3 iken erkeklerde ise %16.7'dir. Sigara içenlerin %42,1'i (erkeklerde %42.7, kadınlarda %39,8) günün ilk sigarasını uyandıktan sonraki ilk yarım saat içinde içtiği bildirilmiştir (27). Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre 15-18 yaş grubunda sigara içme alışkanlığı %30 olup sigara içenlerin %39'u sigara içmeye 15-18 yaşlarında, %20'si 11-14 yaşları arasında başladıklarını, %64'ü günde 1 paketten fazla sigara içtiklerini, %59'u sigarayı bırakmayı denediklerini söylemiş ve sigara içmeyenlerin %14'ünün bir dönem sigara içtiği rapor edilmiştir (28).

Kanada ve diğer batı ¼lkelerinde t¼t¼n kullanımının azaltılmasıyla ilgili önemli adımlar atılmıştır. Günlük içilen sigara miktarı verilerine dayanılarak t¼t¼n kullanım miktarında azalma olduğu gör¼lm¼şt¼r (29).

2.1.1.2. Sigaraya Başlamada Etkili Olan Faktörler

Sigara bağımlılığı, temininin kolay ve maliyetinin düşük olması, kullanımının yasal olması nedeniyle en sık gör¼len bağımlılık tiplerinden biridir. Sigara içme davranışı, biyolojik, psikolojik, farmakolojik faktörler tarafından ele alınması gereken bir konudur (30). Sosyal öğrenme kuramına göre, sigara içme gibi birçok davranış, gözlem yoluyla öğrenilir (31). Birey sosyal çevresini, toplumda üstlendiği rol¼ ve bu rol¼n gerektirdiği davranış kalıplarını benimser ve buna uygun davranmaya çalışır (30). Bundan dolayı ebeveynlerin sigara içmesi gençlerin sigaraya başlama riskini artırmaktadır (32).

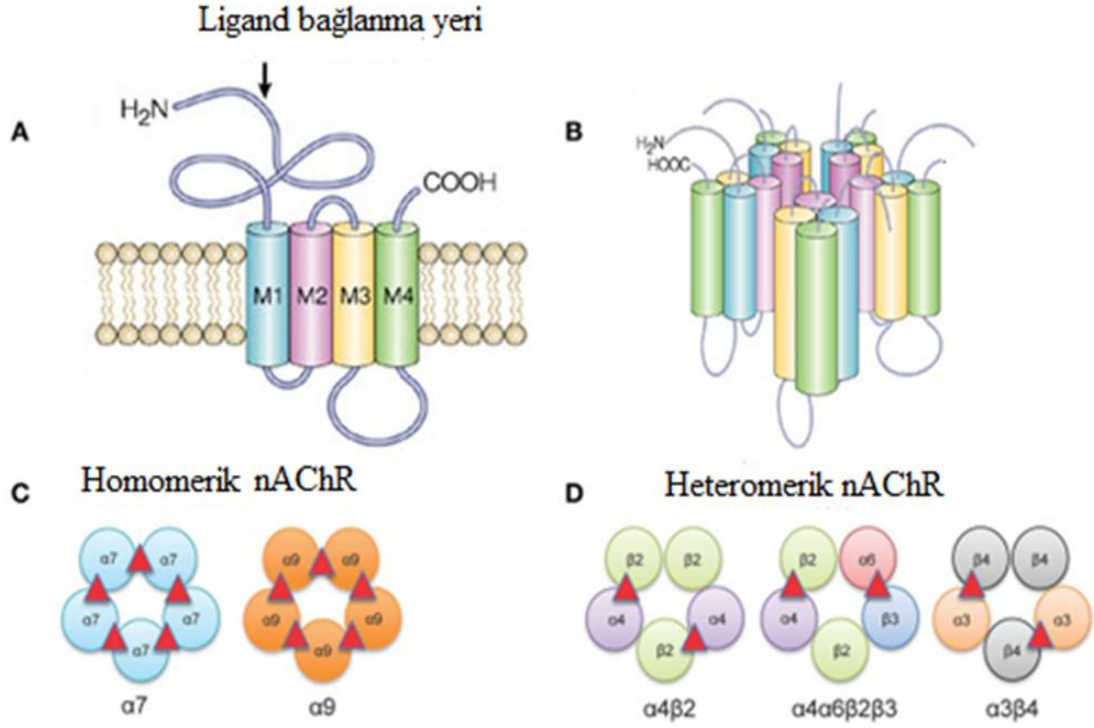
Sigara kullanımının başlıca nedeni kişinin kendini iyi hissetme isteğidir (33). Gençleri sigara içmeye yönlendiren faktörler arasında; ebeveynin sigara kullanım durumu, arkadaş faktörü, sosyo-ekonomik düzey, gösteriş, merak, depresyon, düşük okul başarısı, cinsiyet, yaş, özentisi, güvensizlik, bireyin kişisel özellikleri ve psikolojisi, biyolojik yatkınlığı gibi etkenler yer almaktadır (30,32,34,35).

Gençlerde özentisi ile erken yaşlarda başlayan sigara kullanımı zamanla alışkanlık olarak devam etmektedir (30,31). Sonuç olarak, herhangi bir nedene bağlı olarak sigara içmeye başlanıldığı zaman, içtiği nikotin nedeniyle kısa sürede fiziksel bağımlılık oluşmaktadır (30).

2.1.2. Sigaranın Bağımlılık Yapıcı Etkisi

Tütün içerisindeki bağımlılık yapıcı ana madde nikotindir (26). Tütün ortalama 10-14 mg nikotin içerir ve sigara içimi sırasında 1-1.5 mg nikotin absorbe edilir (27). Absorbe edilen nikotinin kan dolaşımı yoluyla 10 saniye içinde beyne ulaşması, sigara içiminin niçin bir bağımlılık davranışı olma potansiyelinin yüksek olduğunu gösteren bir sebeptir. Piridin ve pirolidin halkasından oluşan alkaloid bir bileşik olan nikotin, bağımlılık ile sonuçlanan motivasyonel ve davranışsal değişikliklerin altında yatan sinaptik ve hücrel değişiklikleri başlatır (16). Sigara bağımlılığıyla ilişkili 3 süreç vardır. Bunlar dopaminerjik ve glutamaterjik sistemlerde nikotin tarafından nikotinic asetilkolin reseptörlerinin (nAChR) uyarılması, upregulasyonu (kronik maruziyetten sonra reseptör sayısının artışı) ve duyarsızlaşmasıdır (13).

Nikotinin kan beyin bariyeri dahil biyolojik membranlardan geçtiği gösterilmiştir. Nikotin, nAChR üzerinden nöronlarda ve diğer hücrelerde agonist gibi bir etki yaratarak endojen nörotransmitter asetilkolin (ACh) gibi davranır (37). ACh'nin iki tip reseptörü vardır. Bunlar; nikotinic ve muskarinic reseptörlerdir (38). nAChR ligand kapılı iyon kanalları olup 5 alt birimden oluşan 290 kDa ağırlığında bir proteindir (38,39,40). Bu alt birimler 2 alfa (α), 1beta (β), 1gama (γ) ve 1 sigma (δ)'dır. Alt birimlerin dağılım ve kombinasyonu türden türe değişmektedir. Nikotinic reseptörler beyinde yaygın bir şekilde dağılım gösterir. Beyin ve gangliada nAChR, sadece α ve β alt birimlerinden oluşur. α alt birimi ligand bağlanması için gerekli 2 sistein rezidüsü içerir. Merkezi sinir sisteminde dokuz α alt birimi ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) ve üç β alt birimi ($\beta 2$ - $\beta 4$) tanımlanmıştır (41). Her bir alt birim; yaklaşık 600 amino asit uzunluğunda olup dört transmembran segment (M1-M4), amino ve karboksi terminal domain ile M3-M4 arasındaki intraselüler lobtan oluşmaktadır. Bu reseptörler α ve β alt birimlerinin farklı şekillerde biraraya gelmesiyle heteromerik ya da homomerik reseptörler oluşturabilirler (Şekil 2.1). Araştırmalar beyinde nikotin için 2 ana bağlanma bölgesi olduğunu göstermiştir. Bunlar; $\alpha 4\beta 2$ kombinasyonundan oluşan nikotine yüksek afiniteli bölge ile $\alpha 7$ alt birimden oluşan nikotine düşük afiniteli bölgedir. Sigara bağımlılığı uzun süreli nikotin maruziyetinden kaynaklanmaktadır (42).



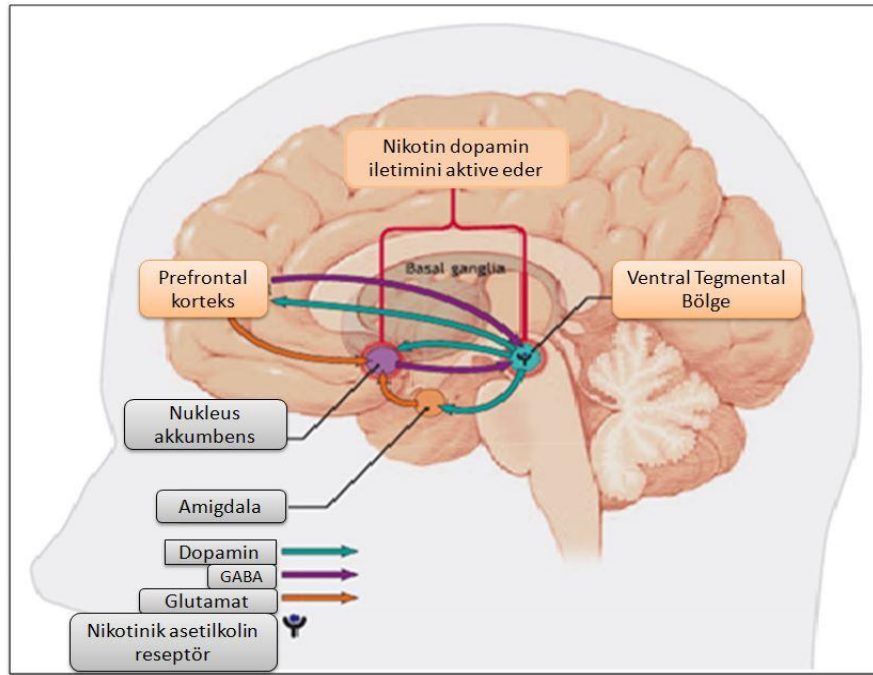
Şekil 2.1. (A) Nöronal nAChR alt-birimi (B) Beş alt birimden oluşan fonksiyonel nAChR (C) Sadece α alt-birimden oluşan homomerik reseptör (D) α ve β alt-birimlerden oluşan heteromerik reseptör. Kırmızı üçgenler ligand bağlanma bölgesini göstermektedir (42,43).

2.1.2.1. Nikotinin Beyindeki Rolü

Bağımlılık ilaçları, mezolimbik sistemin başlıca terminal alanı içinde yer alan nucleus accumbens (NAcc) deki dopamin salınımını artırır. NAcc, farklı fonksiyonlara sahip çekirdek ve kabuk olmak üzere iki bölüme ayrılır. Anatomik olarak kabuk, önemli bir limbik yapı olan amigdalanın bir uzantısını oluştururken çekirdek dorsal striatum ilgili ilişkili olup motor fonksiyon kontrolü ile ilişkili beyin bölgelerine önemli uyarılar gönderir (44).

Nikotinin uyarıcı etkisi NAcc çekirdeğindeki dopamin reseptörlerinin uyarılmasıyla başlar (44). Ventral tegmental alandan (VTA) NAcc'e uzanan mezolimbik dopaminerjik nöronların nikotin tarafından uyarılmaları sonucu, NAcc'deki

ekstrasellüler dopamin artışının ödül cevabına neden olduğu bilinmektedir (39,45). Ödül sistemi, hayatın ve türün devamını sağlayan davranışların tekrarını sağlamak üzere gelişmiş bir adaptasyondur. Yaşamsal önemi olan eylemlerin gerçekleştirilmesi ödül yollarını aktive eder. Bireyin ilgili eylemin gerçekleştirilmesinden haz duymasını ve eylemin tekrarı için motive olmasını sağlar (45,46). Bu nikotinin uyarıcı özelliğe sahip olduğunun kanıtıdır (Şekil 2.2) (44,47).



Şekil 2.2. Nikotinin beyin bölgelerindeki etkileri (30)

Bağımlılık süreci nikotinin beyindeki nAChR ile etkileşimi sonucu başlar. Bu etkileşim merkezi sinir sistemindeki ödül merkezinin aktivasyonuna neden olur. Nikotin, presinaptik nikotinik reseptörler aracılığıyla ACh, epinefrin, dopamin, serotonin ve glutamat gibi nörotransmitterlerin salınımının düzenlenmesinde rol oynar (33). Artan dopamin ve norepinefrin salınımı zevk almayı sağladığı ve iştahı azalttığı, ACh performans ve bellek gücünde artışa, yoksunluk belirtilerinde iyileşmeye, beta endorfin ve GABA salınımı anksiyete ve gerginlikte azalmaya, serotonin salınımı ruh

halinin iyileşmesine neden olmaktadır. Her bir nörotransmitter bağımlılık davranışının gelişmesine katkıda bulunmaktadır (18,48).

2.1.2.2. Nikotin Farmokinetiği

Sistemik dolaşıma giren nikotin miktarı; nikotin içeren ürün çeşidine, tüketim miktarına ve nikotinle temas eden vücut sıvı ve yüzeylerinin pH'ına bağlıdır (34). Nikotin, akciğerler, cilt, gastrointestinal sistem, burun mukoza ve oral mukoza yoluyla absorbe edilebilir (18,34). Nikotinin ilk emilimi oral mukozada başlar. Nikotinin esas inhalasyon yeri akciğer alveolleridir. Bağımlı kişilerde inhalasyondan önce nikotin plazma seviyesi yaklaşık 2,5-8,0 ng/ml iken inhalasyondan sonra nikotin plazma seviyesi 30-40 ng/ml'ye ulaşır. Bu gözlemler yanak mukozası yoluyla nikotin absorpsiyonunun zayıf olduğunu ve akciğer yoluyla absorpsiyonun hızlı olduğunu göstermektedir. Sigaradaki dumanın asidik pH'ında nikotin iyonize olup hücre membranlarından kolaylıkla geçemez. Alkali pH'da ise kolay emilim göstermektedir (18). Puro dumanı daha alkali olduğu için nikotinin oral emilimi sigaradan fazladır. Tütün dumanı akciğer alveollerine ulaştığında nikotinin %80-90'ı hızlıca alveollerin geniş yüzeye sahip olmasından dolayı absorbe edilir. Nikotinin kandaki konsantrasyonu sigara kullanımı sırasında hızla yükselir ve plazmadaki seviyesi 30 dakika içinde maksimum düzeye ulaşmaktadır. Nikotinin yarı ömrü ortalama 2 saat olup 1-4 saat arasında değişebilir ve 10-20 saniye içinde beyne ulaşmaktadır (18,49). Nikotin seviyeleri, daha sonra hızlı dağılım ve metabolizmasından dolayı azalmaktadır. Birçok temel ilaç gibi nikotin de bütün dokulara yaygın bir şekilde dağılım göstermektedir. Karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, nikotine karşı yüksek afiniteye sahipken, yağ dokusu en düşük afiniteye sahiptir (18).

Nikotin karaciğerde metabolize edilmektedir. Altı adet primer metaboliti olup memelilerde nikotinin en önemli metaboliti kotinindir. İnsanlarda nikotinin yaklaşık %70-80'i kotinine dönüşür. Bu dönüşüm iki adımda gerçekleşmektedir. İlk adımda başlıca CYP2A6 ve CYP2B6 olmak üzere sitokrom p450 sistemi tarafından nikotin $\Delta 1$ '(5') iminyum iyon oluşumu gerçekleşir. İkinci adım, nikotin iminyum iyonun aldehid oksidaz (AOX) ile katalize edilmesi sonucu kotinin oluşumudur. Nicotine N'-oxide

(NNO), nikotinin bir diğerk metabolitidir. Nikotinin NNO dönüşümü flavin içeren monoksigenaz 3 (FMO3) tarafından gerçekleşir. İnsanlarda nikotin glukuronasyonu bir N-kuaterner glukuronid ile sonuçlanır. Bu reaksiyon üridin difosfat-glukuronoziltransferaz (UGT) enzimi tarafından katalize edilir. Bu enzim nikotin-glukuronid (Nikotin-Gluc) oluşumundan sorumludur. İn vitro deneylerde son zamanlarda UGT2B10'nin bu dönüşümden sorumlu başlıca karaciğerk enzim olabileceğini düşünülmektedir. Nikotinin yaklaşık %3-5'i nikotin-gluc'a çevrilir. Diğerk metabolitler trans-3'-hidroksikotinin, kotinin glukuronid, trans-3'-hidroksikotinin glukuronid'dir (18,50). Nikotin atılımı üriner pH değerine bağılı olarak, tübüler geri emilimin olduğu böbreklerde meydana gelir (34). Glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon ardından önemli bir rol oynar. İdrar pH'ı asidik özellikte olduğundan nikotin iyonize olup tübüler reabsorbsiyonu minimum seviyede olup renal klirens ise yüksektir. Aksine alkali idrarda nikotin çoğunlukla iyonize olmamıştır ve tübüler reabsorbsiyonu, renal klirensin düşük olması nedeniyle daha kolaydır (18).

2.1.3. Sigara Kullanımının İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Sigara içme, hem sanayileşmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde kanser, solunum yolu hastalıkları ve kalp-damar hastalığı ile ilişkilidir. Sigara içimi ölümlerin ve hastalıkların başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir (16,17). Tüm dünyada sigara içen insan sayısı bir milyarın üzerindedir ve her yıl dünya çapında beş milyondan fazla insan başta akciğerk kanseri olmak üzere sigaranın neden olduğuk hastalıklar nedeniyle ölmektedir ve bu sayının 2030 yılına kadar 9 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (51,52). Sigara içenlerin kanser olma riskinin içmeyenlere göre 2.24 kat daha fazla olduğuk bildirilmiştir (53). Akciğerk kanseri vakalarının % 90'ı, diğerk kanser vakalarının %15-20'si, kronik bronşit ve amfizem vakalarının %75'i ve yaş grubu 35-69 arası kardiyovasküler hastalıklardan ölenlerin %25'ini sigara bağımlısı bireyler oluşturmaktadır. Bununla birlikte serum total kolesterol, trigliseritler, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL-kolesterol), çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL kolesterol) konsantrasyonunda artışa ve antiaterojenik yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)

kolesterol düzeyinin düşmesine bağlı olarak ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı için önemli bir risk faktörüdür (54).

Sigarada bulunan tütün çok sayıda bileşen içerir ve bunlardan en önemlisi ve bağımlılık etkeni olan nikotindir (53). Nikotinin ise organizma ve hücre düzeyinde etkileri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Nikotinin organizma ve hücre düzeyindeki etkileri (34)

Organizma üzerindeki etkileri	Hücresel düzeyde etkileri
Artan kalp hızı	Hormonların sentez ve salınımının artması
Kardiyak kontraktilite	Tirozin hidroksilaz enziminin aktivasyonu
Artmış kan basıncı	Bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu
Azalmış vücut sıcaklığı	Isı şok proteinlerinin indüklenmesi
Kan şekeri mobilizasyonu	Oksidatif stres indüksiyonu
Kandaki serbest yağ asitlerinin artışı	Apoptoz üzerine etkileri
Kanda yüksek katekolamin seviyeleri	Kromozomal anomalilerin indüksiyonu
Uyarılma veya gevşeme	Kardeş kromatid değişimi indüksiyonu

2.1.3.1. Nikotinin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Yüksek doz nikotin periferik ve merkezi sinir sisteminde, hücre içi metabolizması sırasında, sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesini artırıp reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyararak oksidatif stresi oluşturduğu kabul edilmektedir. Nikotinin mitokondriyal solunum zincirini bozup süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksit oluşumunu arttırdığı bilinmektedir (55,56).

Lipid peroksidasyonu ve serbest radikallerin üretimi ateroskleroz patojenezi ile ilgili süreçlerdir. Sigara içenlerde lipid peroksidasyon düzeyinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Nikotin verilen sıçanlarda, serbest yağ asitlerinin konsantrasyonu ve malondialdehit, hidroperoksitlerin düzeyi artmıştır. Ayrıca nikotin uygulaması sonucu serbest radikalleri ortadan kaldıran süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerin aktivitelerinde azalma meydana gelmiştir. Bu enzimlerin aktivitelerindeki azalma artan süperoksit anyon ve hidrojen peroksit üretimi ile sonuçlanmaktadır. Bu da hidroksil serbest radikallerinin oluşuna neden olur. Hidroksil serbest radikalleri birçok toksik reaksiyona katkıda bulunmaktadır (34).

2.1.3.2. Nikotinin Genotoksik Etkileri

Yapılan çalışmalar ile nikotin ve ana metabolitleri kotinin, nikotin-N oksit ve trans-30-hidroksikotinin genotoksik etkileri incelenmiştir. Nikotinin genotoksisite etkisi kardeş kromatid değişimleri ve kromozom yeniden oluşum oranı değerlendirilmiştir. Nikotinin doza ve süreye bağlı bir şekilde kromozom anormallikleri ve kardeş kromatid değişimi frekansını artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca sigara içimi sırasında tükürük düzeylerinde bulunan nikotin konsantrasyonunun genotoksik olduğu bildirilmiştir (34,57).

2.1.3.3. Nikotinin Gen Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri

Tütündeki bağımlılık bileşeni olan nikotin nACh reseptörlerinin aktivasyonu aracılığıyla etki etmektedir. Nikotin kullanımının devamı merkezi sinir sistemindeki uyarlanabilir değişiklikleri indükler. Hücrel sinyal mekanizmalarında bu uzun dönemli değişiklikler gen ekspresyonunu indüklemektedir. Gen ekspresyonunun regülasyonundan sorumlu en iyi karakterize edilmiş protein, Cyclic Adenozin Monofosfat (cAMP) Response Element Binding Protein (CREB) transkripsiyon faktördür. CREB, nikotinin ödüllendirici etkileri için gereklidir. Ayrıca CREB protein seviyeleri, fosforlanmış CREB nikotin gerilemesini takiben beyin genelinde farklı şekilde modüle edilmektedir (5). Nikotinin katekolamin salınımını artırdığı ve adrenal

medulla hücrelerinde tirozin hidroksilaz ve dopamin β -hidroksilaz gibi katekolamin biyosentetik enzimleri aktive ettiği gösterilmiştir. Nikotine uzun süreli maruz kalmanın tirozin hidroksilaz ve dopamin β -hidroksilaz gen ifadesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu 1-2 gün nikotin maruziyetinin tirozin hidroksilaz ve dopamin β -hidroksilaz mRNA seviyelerini artırdığı gösterilmiştir. Nikotin etkisinin transkripsiyonel aracılı olduğu sonucuna varılmıştır. Bir cAMP/kalsiyum düzenleyici bölgeyi içeren tirozin hidroksilaz geninin 5' promotör bölgesinin delesyonu, tirozin hidroksilazın nikotinic uyarılması için gerekli olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışmada, prenatal nikotin maruziyetinin fetal ve neonatal beyinde, c-fos ekspresyonunun artışına sebep olduğu bildirilmiştir (34,58,59).

2.1.3.4. Nikotinin Endokrin Sistem Üzerine Etkileri

Endokrin sistem çeşitli hormonların salınımıyla vücut homeostasisinin korunmasında rol almaktadır (37). Sigaranın hormon salınımı dahil vücudumuzdaki metabolik ve biyolojik süreçlerde çeşitli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (60). Bu hormonların çoğu hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen (HPA), hipotalamus-hipofiz-gonadal eksen (HPG) ve hipotalamus-hipofiz-tiroid eksen (HPT) dahil olmak üzere çeşitli regülör eksenler ile düzenlenmektedir (37). Nikotin uygulamasının hipotalamus-hipofiz eksen (HPA) ile ilişkili hormonlardaki değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Adrenokortikotrop hormon (ACTH) ve kortizol gibi HPA daki hormonlar ile sigara bağımlılığı arasında bir etkileşimin olduğu kanıtlanmıştır (34,37). Bu hormonlar nikotin yoksunluk semptomlarının çoğu için belirlenmiştir. Onlar da anksiyete, huzursuzluk, konsantrasyon eksikliği ve uyku bozukluklarını kapsamaktadır. Nikotin uygulamaları sonucunda ACTH seviyesinin arttığı gözlenmiştir. İstekli sigara içimi için ise kortizol seviyelerindeki artışın gerekli olduğu belirlenmiştir (37).

Yapılan bir çalışmada sigaranın tiroid hormon salınımında uyarıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür (60). Çoklu çalışmalar sigara içenlerde tiroid antikörlerinin içmeyenlerle karşılaştırıldığında düşük bir prevalansa sahip olduğunu ve sigara içenlerde hipotroidi oranlarının daha düşük olduğunu göstermiştir (37).

Svartberg ve Jorde bir kesitsel toplum temelli çalışmalarında 3427 sigara içen erkeğin içmeyenlerle karşılaştırılması sonucu testosteron seviyeleri arasında önemli bir farklılık bulmuşlardır. Sigara içenlerde testosteron seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür (61). Ayrıca prolaktin büyüme hormonu ve follikül uyarıcı hormonların plazma seviyelerinde de artış gözlenmiştir (60).

2.1.3.5. Nikotinin Apoptoz Üzerine Etkisi

Nikotinin tümör nekroz faktörü, UV ışığı, kemoterapötik ilaçlar dahil çeşitli uyarıcılar tarafından indüklenen apoptozu engellediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu nikotinin "Mitogen-Activated Protein (MAP) kinaz sinyal yolağını aktive ettiği ve bu aktivasyonun apoptoz supresörü olan bcl-2 ekspresyon artışıyla sonuçlandığı gösterilmiştir ve bu durumun akciğer kanseri gelişim sürecinde önemli bir etkiye sahip olacağı düşünülmektedir (34,62). Nikotinin bcl-2 fosforilasyonunu uyararak bcl-2 üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca nikotin, UV-kaynaklı apoptozu da inhibe etmektedir. Bu inhibisyon, UV kaynaklı apoptotik yolağın önemli bileşenleri olan sitokrom C salınımı ve kaspaz aktivasyonunun önlenmesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (34).

2.1.4. Sigara Bağımlılığı ve Genetik Faktörler

Sigara bağımlılığı oluşum sürecinde hem genetik faktörler hem de çevresel faktörler rol oynaktadır (26). Yapılan çalışmalarda sigaraya başlama, devam etme ve içilen miktar ile genetik faktörlerin önemli bir role sahip olduğu gözlenmiştir (63). Yapılan ikiz, aile ve evlat edinme çalışmalarıyla bu hipotez desteklenmiştir (16,64). Aile, evlat edinme ve ikiz çalışmalarından elde edilen veriler bağımlılığın başlamasında ve sürdürülmesinde önemli bir genetik etkinin olduğunu desteklemektedir. İkizlerle yapılmış farklı çalışmaların değerlendirmesine göre nikotin bağımlılığının %56 genetik, %24 ailesel-çevresel, %20 bireysel faktörlerden kaynaklandığı bildirilmektedir (63,65).

Hastalıkların genetik temelini araştırılması için yapılan ikiz çalışmalarında, monozigotik ikizler ile dizigotik ikizler arasındaki uyumu incelemek için konkordans oranına bakılmaktadır. Fisher 1958'de ilk kez sigara bağımlılığı açısından değerlendirilen konkordans oranının, tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerinden anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmiştir (63). Bu şekilde monozigotik ikizlerde sigara içmedeki konkordans oranının dizigotik ikizlerden yüksek çıkması genetik faktörlere dayandırılabilir. Aynı çevrede yetişen monozigotik ikizlerde benzerliğin aynı çevrede yetişen dizigotik ikizlerden yüksek çıkması bağımlılıkta genetik katkının da olduğunu desteklemiştir (16,64). Ayrıca 30000 ikiz çifti ile yapılan çalışmada monozigotik ikizlerdeki benzerliğin dizigotik ikizlerden fazla olduğu gözlenmiştir (66). Düzenli sigara kullanımının kalıtsal rolünün, birlikte veya ayrı yetiştirilen İsveç ikiz çiftleri kullanılarak yapılan çalışmada, %60 dan fazla olduğu tahmin edilmiştir (67).

Sigara bağımlılığının genetik temelini incelemek için genom ilişkilendirme, bağlantı çalışmaları ve aday gen analizleri yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar ile bir özellik ya da hastalıkla ilişkili olan genler belirlenir (10,16,64). Bağlantı analizi, nikotin kullanımından sorumlu olduğu düşünülen genom bölgelerinin belirlenmesini amaçlar. 1999 da tam bir genom tarama ile nikotin bağımlılığıyla ilişkili olduğu düşünülen birçok bölge tanımlanmıştır (26). Aday gen çalışmaları ile sigara bağımlılığıyla ilişkili genler belirlenmiştir. Aday genlerin seçimi; nAChR'ni kodlayan genler, nikotinin metabolizmasını etkileyen genler, dopamin ile ilişkili genler, serotonerjik sistemlerle ilişkili proteinleri kodlayan genler, nörotransmitter sentez ve transporter genleri üzerinde yürütülmüştür. Çünkü nörobiyolojik çalışmalar ile bu nörotransmitterlerin sigara bağımlılığının oluşum süreciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (16,17).

2.1.4.1. Nikotinle İlişkili Aday Genler

2.1.4.1.1. Nikotin Metabolizmasında Rol Alan Genler

Sigara bağımlılığıyla ilgili yapılan genetik çalışmalardan biri, sitokrom sistemi (CYP) ile ilgili genler üzerine yapılmıştır. Nikotin, başlıca sitokrom P450 enzimi CYP2A6 tarafından biyolojik olarak kotinine metabolize edilmektedir (68). CYP2A6 genotipinin, sigara tüketimine, karbon monoksit düzeylerine, plazma ve idrardaki nikotin ve kotinin düzeyleri üzerine olan rolü araştırılmıştır (69). CYP2A6 genetik varyasyonları, fenotipik yavaş, orta ve normal metabolizörler olarak gruplandırılmıştır. Yavaş metabolizörler günlük ve haftalık daha az sigara içen gruptur ve normal metabolizörler ile karşılaştırıldığında daha düşük karbon monoksit ve plazma nikotin seviyelerine sahiptir (68). Başlangıçta üç CYP2A6 alleli tanımlanmıştır (62). Normal fonksiyonel allel CYP2A6*1, normal enzim aktivitesi ile ilişkilirken, CYP2A6*2 ve CYP2A6*3 allelleri düşük enzim aktivitesi ile ilişkilidir (63,65). Sigara içen kişiler arasında yapılan bir çalışmada CYP2A6*2 ve CYP2A6*3 allellerini taşıyan bireylerin günde daha az sigara içtikleri ve sigarayı bırakmayı denedikleri görülmüştür (63). CYP2A6 gen lokusunda meydana gelen duplikasyon ve delesyonların enzim aktivitesini değiştirdiği gösterilmiştir (70).

2.1.4.1.2. Dopaminerjik Sistem Aday Genleri

Nikotin, NAcc'de dopamin salımına neden olarak pozitif güçlendirici ödül etkilerinin oluşumuna neden olan mezolimbik dopaminerjik sistemi aktive etmektedir. Dopamin beş reseptör alt tipiyle (D1–D5) etkisini göstermektedir. D1-benzeri (D1 ve D5 reseptörleri) ve D2 benzeri (D2, D3 ve D4) olmak üzere iki reseptör ailesi adı altında sınıflandırılır. Bu reseptör aileleri sinyal iletimi üzerinde karşıt etkilere sahiptir. D1-benzeri reseptörlerin uyarılması adenilat siklazı aktive ederken, D2 benzeri reseptörlerin uyarılması adenilat siklazı inhibe etmektedir. Ayrıca D2 reseptör ailesinin dopamin salınımını azalttığı bildirilmiştir (71).

Kromozom 11q22-q23 bölgesinde lokalize olan Dopamin Reseptör 2 geninin (DRD2) 10 kb upstream bölgesinde yer alan ANKK1 geninin yaygın varyantı olan Taq1A polimorfizmi ile sigara içme davranışı arasında ilişki belirlenmiştir. Özellikle Kafkas örneklerinde yapılan çalışmalarda bu polimorfizmin A1 allelinin, sigara içme riskini artırdığı görülmüştür. Japon populasyonunda yapılan çalışmalar ile de A2/A2 genotipi ile sigara içme davranışı arasında bir ilişki olduğu görülmüştür. Sigara bırakma üzerine ANKK1 / DRD2 polimorfizmlerinin etkisi araştırılmış olup A1 allelini taşıyan Kafkaslıların Asyalılardan daha düşük sigara bırakma ihtimalinin olduğu görüldü. Ayrıca Amerikalılarda A1 allel sıklığının Asyadan daha yüksek olduğu rapor edildi (72). DRD2 TaqIA1 allelinin sigara içenlerde içmeyenlere göre daha yüksek prevalansa sahip olduğu gözlenmiştir. DRD2*A1 allelinin bulunması ile sigaraya başlama yaşı ve sigara içmeme süresi arasında ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir. A1 alleleline sahip kişilerin daha az reseptör sayısına ve bağlantı bölgesine sahip olabileceklerinden dolayı sinaptik dopamin artışı için daha çok nikotine gereksinim olduğu ve bu şekilde nikotine olan toleransın gelişeceği öne sürülmüştür (63).

Dopamin D4 Reseptörünün (DRD4) yapısı ve farmakokinetiği D2 reseptörüne benzer. DRD4 geni yaygın olarak prefrontal kortekste ifade edilir ve nikotin bağımlılığı dahil olmak üzere psikiyatrik bozukluklarla olan ilişkisi incelenmiştir. DRD4 geninde çalışılan ilk polimorfizm reseptörün üçüncü intraselüler lobunu kodlayan ve ekzon 3 bölgesinde lokalize olan 48 baz çifti (bç) içeren “Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar” (Variable Number of Tandem Repeats =VNTR) polimorfizmidir (65,71). Bu DRD4 geninin 7 tekrar varyantlarının diğer yaygın varyantları ile karşılaştırıldığında (2 bç, 4 bç tekrarı) dopamin duyarlılıklarının azaldığını ve dopamin bağlanma potansiyelinde farklılıklar olduğu görülmüştür. İkinci çalışılan polimorfizm ise transkripsiyon başlama noktasından 521 bç upstreamde yer alan C/T dönüşümüdür. T allelinin, C alleleli ile karşılaştırıldığında transkripsiyonel etkinliği % 40 oranında azalttığı gözlenmiştir (71). DRD4 geninin long (L) and short (S) allellerinin sigara davranışı üzerine etkisi araştırılmıştır. En az bir L alleleline sahip Afrikalı-Amerikalı bireylerin homozigot S alleleline sahip bireylerle karşılaştırıldıklarında daha erken yaşlarda sigaraya başladıkları ve sigara içme oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir (63).

Dopamine Transporter (DAT), presinaptik nöronlara sinaptik dopaminin geri alımı yoluyla subkortikal bölgelerde dopamin iletimini sonlandırır. Kromozom 5p15.3

bölgesinde yer alan ve 15 ekzondan oluşan DAT1, birkaç kodlama bölge varyantlarına sahiptir. DAT1 geninin 10 bç tekrar alleli DAT aktivitesinde değişikliklere neden olur ve dopamin iletiminin azalmasına yol açarken 9 tekrar alleli ise dopamin iletiminin artışına neden olur (71). 9 tekrar alleleline sahip kişilerin 16 yaşından sonra sigaraya başladıkları ve diğer genotipe göre daha uzun süre sigarayı bıraktıkları belirlenmiştir (63).

Farmakogenetik çalışmalarda nikotin bağımlılığı ve tedavi çalışmalarıyla ilişkili olan Catechol-O-Methyltransferase (COMT) enziminin dopaminerjik beyin bölgesinde bulunması ve dopaminin degradasyonu ve aktivasyonunda rol alması nedeniyle aday genlerden biridir (63). Dopamin salınmasını regüle eden bir enzim olan COMT geninin ekzon 3 bölgesinde lokalize olan Val108/158Met polimorfizmi en yaygın olan ve en çok çalışılan polimorfizmidir (63,73). Met (A) alleli COMT enzim aktivitesinin azalmasına neden olur. Düşük enzim aktivitesi, dopamin aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (63). COMT Val158Met polimorfizmi enzim aktivite değişikliği aracılığıyla dopaminerjik ödül yolağını üzerine etkili olduğu bildirilmiştir (73,74). Sigara bırakma üzerine COMT genotipinin etkileri kadın ve erkekler arasında değişebilir. COMT östrojen tarafından inaktive edildiği için kadınların kan ve beyindeki enzim aktivitesinin düşük olduğu görülmüştür (63). Yapılan bir çalışmada ise COMT genotipi ile sigaraya erken yaşlarda başlama, devam etme ve bağımlılık şiddetiyle arasında bir ilişkinin olduğu görülmüştür (73).

2.1.4.1.3. Nikotinik Asit Reseptör Genleri

Nikotin bağımlılığı için en güçlü genetik katkı nAChR alt birimlerinin çeşitliliğinden gelmektedir (22). Çalışmalar $\alpha 5$, $\alpha 3$ ve $\beta 4$ nikotinik reseptör alt birimlerini kodlayan genlerin bulunduğu 15. kromozom ile $\alpha 6$ ve $\beta 3$ nikotinik reseptör alt birimlerini kodlayan genlerin bulunduğu 8. kromozom üzerine yoğunlaşmıştır. Genom çalışmalarıyla bu bölgelerin nikotin bağımlılığıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (22, 75).

Nikotinik reseptörler ligand bağı iyon kanallarının bir ailesidir ve sinapslarda sinyal iletimine aracılık eder. (76). Nöronal nAChR α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) ve β ($\beta 2$ - $\beta 4$) alt birimlerinden oluşur ve 9 α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) ve 3 β ($\beta 2$ - $\beta 4$) alt birim genleri tanımlanmıştır. α alt birim Cholinergic reseptör nicotinic alpha (CHRNA) geni, β alt birim ise Cholinergic reseptör nicotinic beta (CHRNB) geni tarafından kodlanır (77,78).

Kromozom 15q25.1 bölgesinde yer alan CHRNA5, CHRNA3 ve CHRNB4 gibi nAChR'ni kodlayan genlerin günlük içilen sigara miktarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (79). CHRNA5 genindeki polimorfizmlerin nikotin bağımlılığıyla ilişkisi ilk kez 2007 de rapor edilmiş olup homozigot A allelini taşıyanların daha fazla risk altında olduğu görülmüştür (80). $\alpha 5$ nAChR alt ünite proteinindeki (Asn398Asp) bir aminoasit değişikliğinin $\alpha 5$ alt birim içeren bazı nACh reseptörlerinin kalsiyum geçirgenliğinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca bu değişikliklerin plazma kotinin seviyelerini de etkilediği bildirilmektedir (81). $\alpha 3$ alt birimi kodlayan CHRNA3 genindeki SNP'lerin nikotin bağımlılığıyla ve günlük içilen sigara miktarıyla ilişkili olduğu yapılan meta analiz çalışmalarıyla görülmüştür (82). Kromozom 15q24-25 bölgesinde yer alan nAChR alt ünite gen varyantlarının özellikle CHRNA3 geninin ekzon 5 bölgesindeki polimorfizminin, sigara bağımlılığı yanında kronik pulmoner hastalık, periferal arter hastalığı ve akciğer kanseri gibi hastalıklarla ilişkisi olduğu görülmüştür (83,84).

2.1.4.1.4. Serotonerjik Genler

Nikotin beyinde serotonin salınımını artırır. Bu yüzden serotonerjik sistem sigara içme davranışı üzerinde önemli etkiye sahiptir (85). Serotonin geri alınımı nikotin yoksunluk belirtilerini etkilemektedir. Serotonin transporter, serotonin nöroiletim süresini regüle etmektedir. Bu geninin 5' promotor bölgesindeki bir polimorfizm ile short (S) ve Long (L) allelleri belirlenmiştir. S alleli azalmış serotonin ekspresyonu ve geri alınımı ile ilişkilidir (63). Azalmış serotonin geri alınımının agresif davranış ve depresyonla ilişkili olduğu görülmüştür (2). Japon popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada L allelinin sigara içme davranışıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (63) .

Nikotin bağımlılığı ile ilgili yapılan genetik analizlerle çok fazla kromozom üzerinde aday gen belirlenmiştir (Çizelge 2.3) (85).

Çizelge 2.3. Nikotin bağımlılığı ile ilgili diğer aday genler (85)

<i>Kromozom</i>	<i>Aday Genler</i>
Kromozom 2	Neurexin 1(NRXN1)
Kromozom 9	Neurotrophic Tyrosine Kinase Reseptör, type 2 (Nörotrofik Tirozin Kinaz Reseptörü tip 2, NTRK2)
Kromozom 7	Dopa decarboxylase (Dopa Dekarboksilaz, DDC)
Kromozom 3	Dopamine receptor D3 (Dopamin D3 reseptörü, DRD3)
Kromozom 9	Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) B receptor, 2 (Gama Amino Bütirik Asit B Reseptör 2, GABBR2)
Kromozom 9	Glutamate Receptor, Ionotropic, N-Methyl-D-Aspartate 3A (Glutamat Reseptörü İyonotropik N-metil-D-Aspartat 3A, GRIN3A)
Kromozom 11	Neurexin 2 (NRXN2)
Kromozom 9	Dynamamin 1 (DNM1)
Kromozom 14	Neurexin 3 (NRXN3)
Kromozom 10	Choline Acetyltransferase (Kolin asetiltransferaz, CHAT)
Kromozom 9	Dopamine Beta-Hydroxylase (Dopamin beta hidroksilaz, DBH)
Kromozom 11	Arrestin Beta 1 (ARRB1)
Kromozom 17	Arrestin Beta 2 (ARRB2)
Kromozom 16	Cadherin 13 (Kadherin 13, CDH13)

Son zamanlarda Loukola ve ark.'larının (2014) yaptığı bir çalışmada ise NRG3/ErbB4 *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* gen polimorfizmlerinin nikotin bağımlılığı ile ilişkili olduğu görülmüştür (4).

2.1.4.2. ErbB4 ve NRG3 Gen Polimorfizmleri

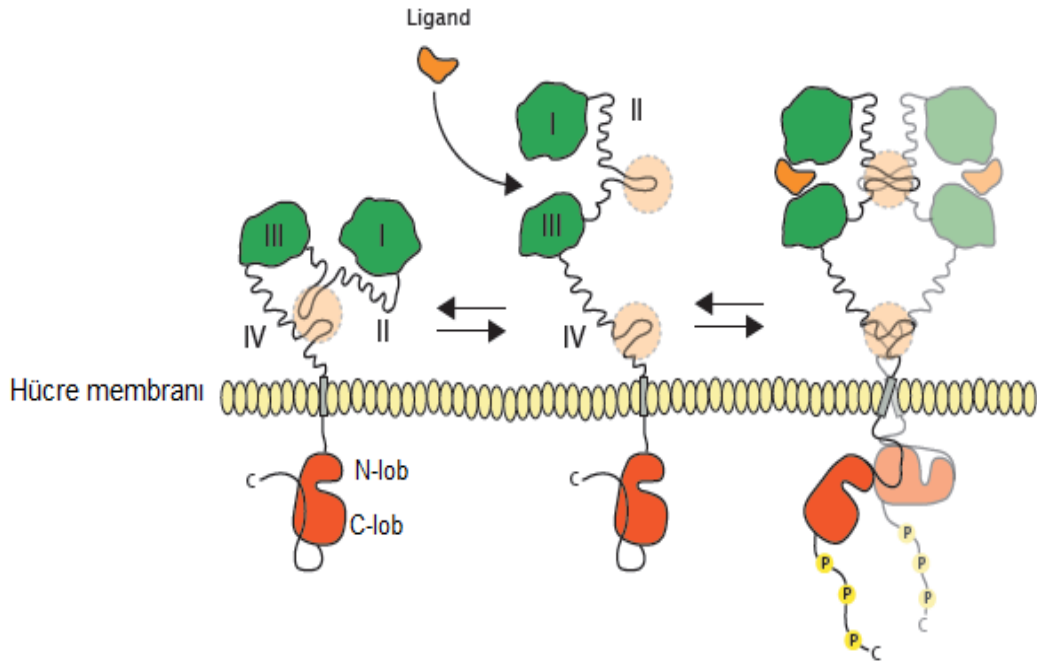
2.1.4.2.1. ErbB Reseptör Yapısı

ErbB reseptör ailesi, en iyi karakterize edilmiş reseptör tirozin kinaz ailesinden biridir (86). Reseptör tirozin kinazlar hedef proteinleri spesifik tirozin rezidülerinden fosforlamaktadır (87). Protein fosforilasyonu, memeli hücrelerinde sinyal iletimini düzenleyen bir post-translasyonel modifikasyondur. Fosforilasyon, hedef proteinlerin spesifik amino asitlerine fosfat grubu transferi yapan enzimler olan protein kinazlar (PTK) tarafından gerçekleştirilmektedir. İnsan genomu 500 den fazla PTK kodlamaktadır (89). PTK'ların 58'i reseptör tirozin kinazları kodlar (87). Reseptör tirozin kinazlar 20 alt familyaya ayrılarak çoğalma, farklılaşma ve göç gibi hücrel olayların regülatörleri gibi hareket ederler (88). ErbB reseptörleri gelişimde, proliferasyonda ve farklılaşmada rol alan epitel, mezenşimal ve nöronal dokularda eksprese edilir (86). ErbB aile üyeleri kalp, meme bezleri ve merkezi sinir sistemi dahil birçok organın büyüme ve gelişmesi sırasında önemli rol oynar. Ayrıca ErbB aşırı ekspresyonu meme, yumurtalık, beyin ve prostat bezlerinde tümör oluşumuyla ilişkilidir (89).

Reseptör tirozin kinazların ErbB alt ailesi ErbB1 (Epidermal Growth Factor Receptor EGFR, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4) olmak üzere dört üyeden oluşur (90,91). ErbB reseptörleri yaklaşık 180 kDa büyüklüğünde transmembran tip 1 glikoproteinleridir (88).

Tüm ErbB reseptörleri, tek geçişli transmembran hidrofobik domain, ligand bağlayan ekstraselüler domain, tirozin kinaz enzimi içeren bir intraselüler domain ve sinyal iletim molekülleri için C-terminal kuyruktan oluşmaktadır (86,88). ErbB3 hariç tüm aile üyeleri tirozin kinaz aktivitesine sahiptir (92). Ekstraselüler domain I, II, III ve IV ya da L1, CR1, L2, CR2 olarak bilinen dört farklı subdomaine bölünür. I ve III

ligand bağlanması için II ve IV ise reseptör dimerizasyonu için gereklidir (88). Transmembran domain, bir α -heliks yapısına sahiptir. İntraselüler domain; kinaz domain ve C-terminal domain olmak üzere ikiye bölünür. Kinaz domaini ise N-lob ve C-lobtan oluşmaktadır (Şekil 2.3) (87).

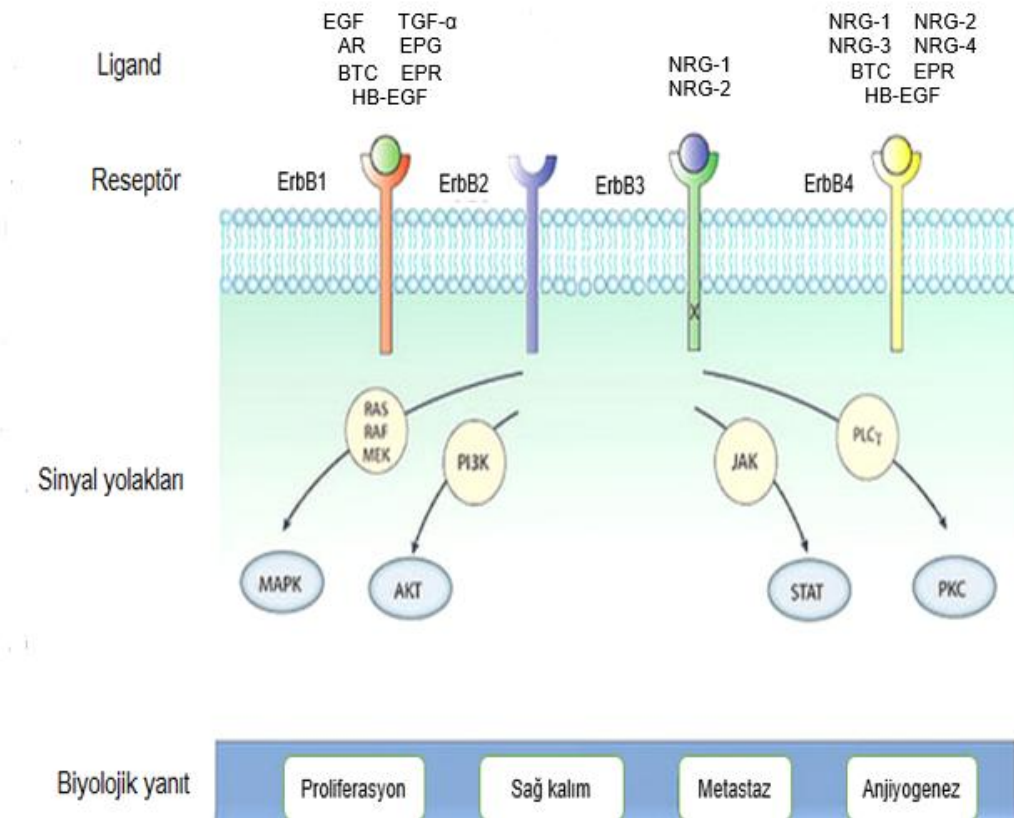


Şekil 2.3. ErbB reseptörlerinin aktivasyon mekanizması (87)

ErbB reseptörlerinin aktivitesi farklı bağlanma afinitelerine göre 11 epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri ligandlar tarafından regüle edilir. Ligandlar bağlanma afinitelerine göre üç gruba ayrılabilir; sadece ErbB1'e bağlanan ligandların ilk grubunu Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü, EGF), Transforming Growth Factor- α (Transforme edici Büyüme Faktörü- α , TGF- α), Amphiregulin (Amfiregulin, AR) ve Epigen (EPG) oluşturur. Hem EGFR hem de ErbB4 reseptörlerini aktive edebilen ikinci grup ligandları Betacellulin (Betaselülin, BTC), Heparin-Binding EGF like Growth Factor (Heparin Bağlayan EGF-benzeri Büyüme Faktörü, HB-EGF) ve

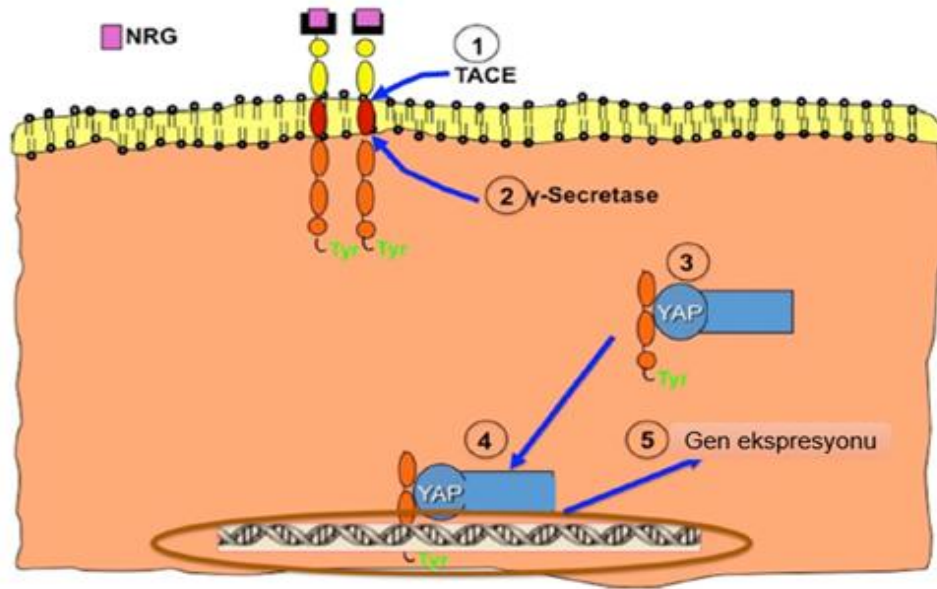
Epiregulin (EPR) oluşturur. Üçüncü grup ise Neuregulin (NRG-1, NRG-2, NRG-3, NRG-4) ailesinden oluşmaktadır. Tüm NRG'ler ErbB4'ü aktive etmesine rağmen NRG-1 ve NRG-2 sadece ErbB3'e bağlanıp ve onu aktive etmektedir (88,90).

ErbB reseptörünün ekstraselüler domainine bağlanan ligandlar, reseptörün homo ya da heterodimer oluşturmasına neden olur (86). Sayısız ErbB homo- ve heterodimer kombinasyonları yoluyla çeşitli ligand sinyalleri memelilerde ErbB sinyalizasyon karmaşıklığını ve çeşitliliğini sağlar (88). Bu dimerizasyon, reseptörün tirozin kinaz domainin aktivasyonuna neden olarak sitoplazmik domaindeki tirozin rezidülerinin fosforlanmasına neden olur. Fosforlanmış rezidüler, intraselüler sinyal yolağı için başlatıcı olarak işlev görür (86,92). ErbB sinyalleri çoklu mediyatörler aracılığıyla ilelemektedir. Bunlar Ras/ Raf /MAPK ve PI3K / Akt yolağı ya da STAT'lar gibi transkripsiyon faktörlerinin doğrudan aktivasyonu yoluyla ilerler (Şekil 2.4) (88,93).



Şekil 2.4. ErbB reseptörlerinin ligandları ve hücre içi sinyal mekanizması (93)

ErbB4 reseptörü, membran üzerinde proteolitik süreçlerden geçen tek ErbB reseptörüdür. Tumor Necrosis Factor-alpha converting Enzyme (TACE) ve γ -sekretaz enzimleri tarafından proteolitik yıkımı sonucu 80 kDa intraselüler domaini serbest kalır. Serbest kalan domain bir şaperon protein olan Yes ilişkili protein (YAP) ile nükleusa geçerek transkripsiyonu regüle etmektedir (Şekil 2.5) (94).



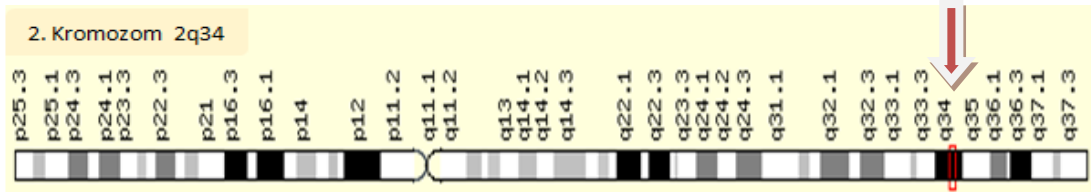
Şekil 2.5. ErbB4 reseptörünün proteolitik yıkımı (94)

2.1.4.2.1.1. ErbB4 İzoformları

HER4 olarak da bilinen tirozin kinaz reseptörlerinin epidermal büyüme faktör ailesinin bir üyesi olan ErbB4 proteini, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen 180 kDa bir transmembran RTK 'dır. ErbB4 geni, tirozin kinazların insan ErbB alt ailesinin dördüncü üyesi olarak izole edilmiştir. ErbB4, özellikle kalp, sinir dokusu ve çeşitli epitel olmak üzere çeşitli dokularda ifade edilir. ErbB4 ve ligandları, normal kardiyovasküler ve nöral gelişimde, meme bezlerinin farklılaşmasında, kalp hastalıkları

ve kanser gibi patolojik koşullarda önemli rol oynamaktadır (88). Ayrıca hücre bölünmesi, göç, adhezyon, farklılaşma, apoptoz mekanizmalarını içeren sinyal yolağının ana aktivatörleridir.

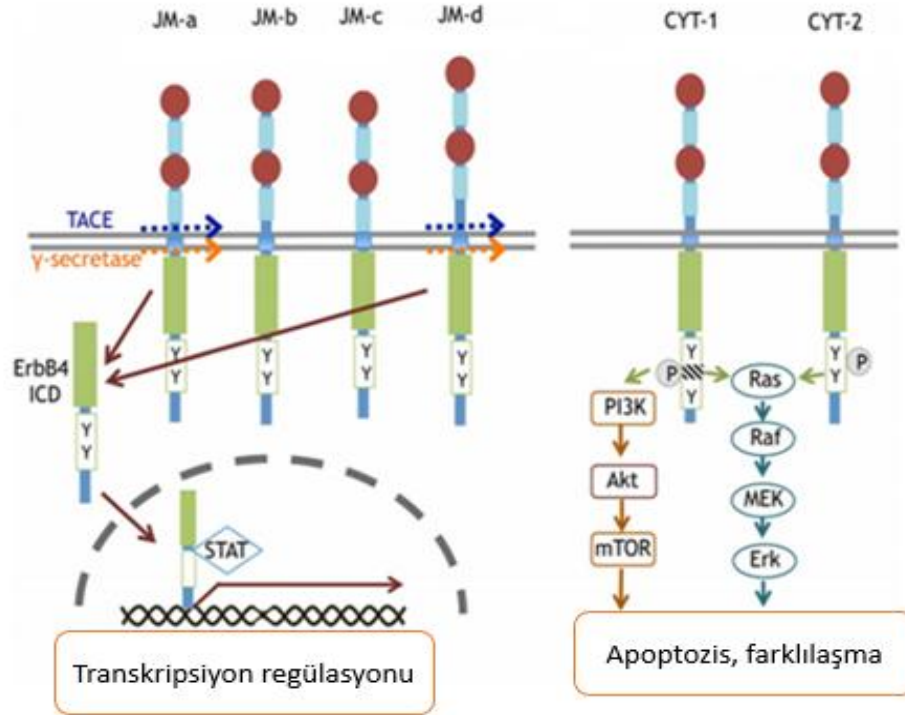
Kromozom 2q34 üzerinde lokalize olan ErbB4 geni 1.16 Mb büyüklüğünde ve 28 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 2.6) (89,95).



Şekil 2.6. ErbB4 geninin kromozom 2 üzerindeki lokalizasyonu (96)

ErbB4, alternatif splicing ile farklı izoformlar oluşturan tek ErbB reseptörüdür (87). Ekzonların 15/16 ve ekzon 26'nın alternatif splicingi ekstraselüler ve intraselüler yıkıma duyarlılıkları farklı olan protein izoformlarının oluşmasına neden olur (94). Yapısal olarak dört farklı ErbB4 izoformu tanımlanmıştır. İzoformlar onların ekstraselüler juxtamembran alt birimi içinde ya da C-terminali sitoplazmik kuyruk içinde farklılık gösterirler. Juxtamembran izoformları, juxtamembran bölgesi içinde, ya ekzon 16 bölgesinde 23 amino asit ya da ekzon 15 bölgesinde 13 amino asit içeren ve sırasıyla JM-a ve JM-b olarak tanımlanmıştır. Ayrıca Jm-c ve Jm-d izoformları da belirlenmiştir. JM-a ve JM-d izoformu, ilk olarak TACE tarafından ikinci adımda ise transmembran alt birimi içinde γ -sekretaz tarafından proteolitik yıkıma uğrarken JM-b izoformunda proteolitik yıkım olmaz. Sitoplazmik izoformları sitoplazmik kuyruk içinde sırasıyla CYT-1 ve CYT-2 olarak isimlendirilmiştir. ErbB4 sitoplazmik izoformları ayrıca CYT-1 ve CYT-2 için, sırasıyla CT-a ve CT-b olarak da adlandırılır (88). C-terminal kuyrukta lokalize olan CYT-1, PI3K için bağlanma bölgesi oluşturur. Bu yüzden ErbB4 CYT-1 izoformu doğrudan PI3K yolağını aktive etmektedir (87). CYT-1 sekansı da TACE and γ -sekretaz tarafından yıkıma uğrar. Bu yüzden ErbB4 proteolizi sonucu 80 kD intracellular fragment (ErbB4-ICD) oluşur. Bu ürün

sitoplazmik boşlukta serbest kalır. ErbB4-ICD, STAT5, östrojen reseptör (ER), ETO2, ve hipoksi indüklük faktör- 1 α (HIF-1 α) gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu regüle etmektedir (Şekil 2.7)(87, 97).



Şekil 2.7. ErbB4 izoformları (97)

ErbB4 izoformları normal ve malignant dokularda farklı şekilde eksprese edilir (94). JM-a izoformları böbrek, tükürük bezleri ve testiste baskınken Jm-b izoformu iskelet kası ve kalpte eksprese olmaktadır. CYT-1 izoformları ise ErbB4'ün eksprese edildiği tüm dokularda eksprese edilmektedir (87).

ErbB4; NRG'ler, BTC ve HB-EGF gibi ligandların bağlanmasıyla aktive olmaktadır (98).

2.1.4.2.2. Neuregulinler (NRG)

NRG'ler sinir sistemi, kalp, meme ve diğer organ sistemlerinde hücre-hücre etkileşimlerine aracılık eden sinyal proteinleridir (99). ErbB ailesinin reseptör tirozin kinazları için ligandları kodlayan EGF ailesinin bir üyesidir. Bu gen ailesi transmembran tirozin kinaz reseptörleri olan ErbB3 ve ErbB4 için ligandları kodlamaktadır. Nöronal gelişim ve beyin aktivitesinin homeostasinde rol oynamaktadır. NRG1 ilk keşfedilen üyesidir (100).

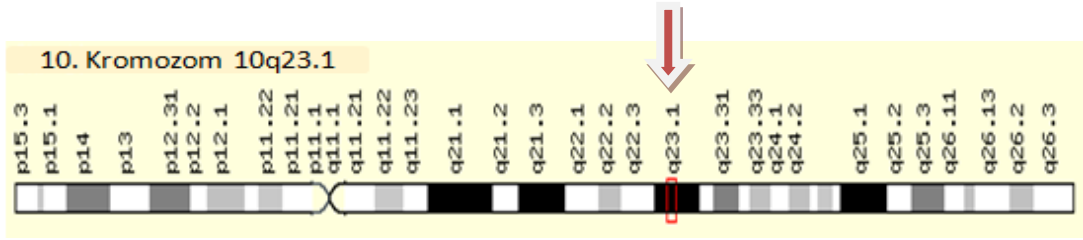
Genomda 4 neuregulin geni keşfedilmiştir ve her bir NRG geni farklı izoformlardan oluşmaktadır (101). NRG-1 nöronlar ve glia yanı sıra kalp karaciğer, mide, akciğer, böbrek, dalak ve ciltte eksprese olurken Don-1 ve NTAK olarak da bilinen NRG-2 geni merkezi sinir sistemi nöronları ve kalpte eksprese edilir. NRG-3 ekspresyonu sinir sisteminde sınırlı olup NRG4 transkriptleri yetişkin iskelet kasında ve pankreasta bulunmasına rağmen nöronal dokularda bulunamamıştır (102).

NRG'ler sinapslarda transmitter salınımı veya iyon kanal reseptörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek elektriksel nöral aktivite ve moleküler bileşenler arasında aracılık etmektedir (103).

2.1.4.2.2.1. NRG3

NRG3, reseptör tirozin kinaz ErbB4'ün spesifik ligandı olan nörotrofik faktördür. NRG3 protein ekspresyonu sinir hücrelerinde ve meme kanser hücrelerinde rapor edilmiştir (104). NRG1 aksine, NRG3 ekspresyonu nörogelişim esnasında sınırlıdır. Kortikal hücre migrasyonunun regülasyonu yoluyla embriyonik serebral korteksin gelişimde önemli rol oynamaktadır (105).

NRG3 geni kromozom 10q22-q23 bölgesinde lokalizedir. NRG3 geni yaklaşık 1.2 Mb büyüklüğünde genomik bölgeye sahip olup 9 ekzon ve 710 aminoasitten oluşmaktadır (105,106) (Şekil 2.8).



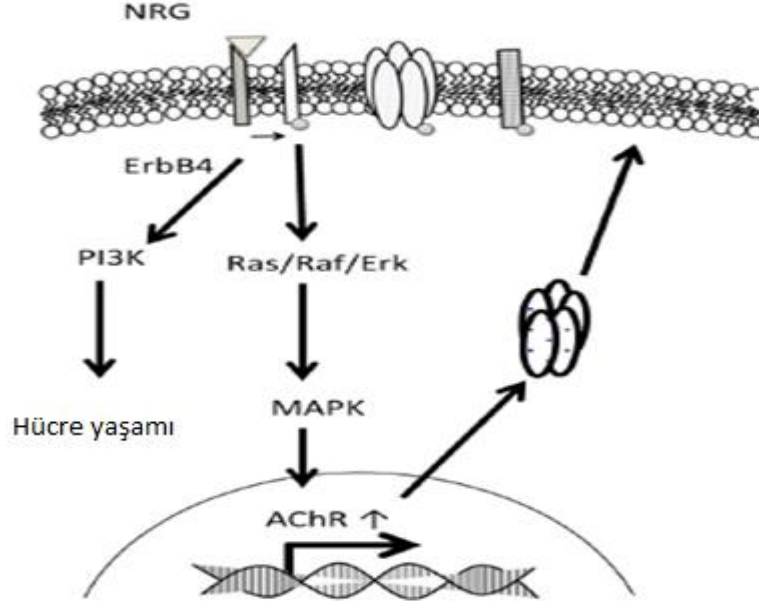
Şekil 2.8. NRG3 geninin kromozom 10 üzerindeki lokalizasyonu (107)

NRG; EGF motifli bir ekstraselüler alt birim, bir transmembran alt birim ve sitoplazmik alt birimden oluşmaktadır. NRG3'ün ekstraselüler fragmenti post-translasyonel proteoliz ile salınmaktadır. NRG3'ün EGF-benzeri alt birimi ErbB4 reseptörünün ekstraselüler alt birimine bağlanır. Bu bağlanma reseptörün aktivasyonunu ve fosforilasyonunu indükler. NRG3'ün ErbB4 reseptörüne bağlanmasının ardından diğer ErbB reseptörleri, ErbB4 ile heterodimer oluşturur (101).

NRG-ErbB sinyal ağı gelişmekte olan yetişkin beyninde çoklu süreçleri kapsamaktadır. Örneğin, nöronal göç ve farklılaşmada rol alırlar Nörotransmitter reseptörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde, glial hücre proliferasyonunda, hayatta kalma ve farklılaşma, sinaptik plastisite rol oynamaktadırlar (102).

NRG/ErbB4 sinyalizasyon basamağının ACh reseptör ekspresyonunu regüle ettiği bildirilmiştir. AChRs, nöromusküler sinapslarda postsinaptik membranda yoğunlaşmıştır. NRG'ler sinaptik nukleusta AChR gen ekspresyonunu aktive eden sinaptik sinyal olarak görev yapmaktadırlar. Kas hücrelerinde yapılan bir çalışmada NRG'lerin AChR transkripsiyon oranını artırdığı görülmüştür (103). NRG izoformlarının neuronal nAChR ekspresyonunu regüle ettiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar ile $\alpha 5$ and $\alpha 7$ nAChR ekspresyonunun arttığı görülmüştür (108).

NRG, ErbB tirozin kinazları ve ardından Ras/Raf/MAP kinaz sinyal yolağını uyarır (86,109). Hem Ras hem de MEK NRG-uyarımli ACh reseptör genlerinin indüklenmesi için gereklidir. Nikotin, eksprese olan asetilkolin reseptörlerine bağlanarak bağımlılık sürecini başlatmaktadır (Şekil 2.9). (109).



Şekil 2.9. NRG/ErbB4 sinyal mekanizması ile asetilkolin reseptör ekspresyonu (109).

Yapılan bir çalışmada kronik nikotin alımının 24 saat takibinde NRG-ErbB4 yolağında rol alan üyelerin mRNA seviyeleri değerlendirildiğinde NRG3 ve ErbB4 mRNA seviyelerinde önemli bir artış olduğu gözlemlendi. Ayrıca ErbB4 protein seviyesinde de artış olduğu belirlendi. Nikotin yoksunluğu bağımlılarda artmış anksiyete ile karakterizedir. Nikotin bağımlılığında önemli bir faktör olan NRG3/ErbB4 sinyal yolağının nikotin ve kronik tedavi sırasında yoksunluk kaynaklı anksiyeteyi azalttığı görülmüştür (5).

2.1.5. Tanı Kriterleri

Nikotin bağımlılığında içicilerin bağımlılık derecelerinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde tüketilen sigara miktarı ve sıklığı, biyokimyasal belirteçler, anket çalışmaları önemli yer tutar. Sigara bağımlılığının belirlenmesinde yaygın olarak bir anket formu şeklinde olan Fagerström nikotin bağımlılık testi (FNBT) kullanılmaktadır (47,110).

2.1.5.1. Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi

FNBT, sıklıkla nikotinin fiziksel bağımlılığını ölçmek için kullanılır (Çizelge 2.4) (110). Bu testte kişinin içtiği sigara miktarı ile belli bir süre sigara içmeden durabilme derecesi incelenmektedir (48). Bu teste göre bağımlı bireylere bir takım sorular sorulur ve verdikleri cevaplara göre bir puan hesaplanır. Bu puana göre bağımlılık şiddeti belirlenir (52). Bu test sonucunda 0-2 puan alanlar çok az düzeyde bağımlı, 3-4 puan alanlar az düzeyde bağımlı, 5 puan alanlar orta düzeyde bağımlı, 6-7 puan alanlar yüksek düzeyde bağımlı, 8-10 puan alanlar çok yüksek düzeyde bağımlı kabul edilir. Bu testin sonucuna göre 6 ve üstünde puan alanlarda, nikotin bağımlılığı yüksek derece olduğu söylenebilir (48).

Çizelge 2.4. Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi

1	İlk sigaranızı sabah uyandıktan ne kadar sonra içersiniz?	<ul style="list-style-type: none">• Uyandıktan sonraki ilk 5 dakika içinde• 6- 30 dakika içinde• 31- 60 dakika• 1 saatten fazla	<ul style="list-style-type: none">○ 3 puan○ 2 puan○ 1 puan○ 0 puan
2	Sigara içmenin yasak olduğu örnek; otobüs, hastane, sinema gibi yerlerde bu yasağa uymakta zorlanıyor musunuz?	<ul style="list-style-type: none">• Evet• Hayır	<ul style="list-style-type: none">○ 1 puan○ 0 puan
3	İçmeden duramayacağınız, diğer bir deyişle vazgeçemeyeceğiniz sigara hangisidir?	<ul style="list-style-type: none">• Sabah içtiğim ilk sigara• Diğer herhangi biri	<ul style="list-style-type: none">○ 1 puan○ 0 puan
4	Günde kaç adet sigara içiyorsunuz?	<ul style="list-style-type: none">• 10 adet veya daha az• 11- 20• 21- 30• 31 veya daha fazlası	<ul style="list-style-type: none">○ 3 puan○ 2 puan○ 1 puan○ 0 puan
5	Sabah uyanmayı izleyen ilk saatlerde, günün diğer saatlerine göre daha sık sigara içer misiniz?	<ul style="list-style-type: none">• Evet• Hayır	<ul style="list-style-type: none">○ 1 puan○ 0 puan
6	Günün büyük bölümünü yatakta geçirmenize neden olacak kadar hasta olsanız bile sigara içer misiniz?	<ul style="list-style-type: none">• Evet• Hayır	<ul style="list-style-type: none">○ 1 puan○ 0 puan

2.1.5.2. DSM-IV-TR -Nikotin Bağımlılığı

Bağımlılığı değerlendirmek için en yaygın kullanılan kriterler arasında DSM-IV yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Hastalık Sınıflaması (ICD) ve DSM-IV'e göre sigara bağımlılığı hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bu iki sınıflandırmanın yeni düzenlenimleri olan ICD-10 ve DSM-IV göre bu kriterler (3 veya daha fazlasının 1 yıllık zaman içerisinde olması);

- 1) Azalmış etki veya aynı etkiyi sağlamak için artan dozlarla belirli nikotin toleransı
- 2) Kesilmede yoksunluk belirtilerinin çıkması
- 3) Azaltma çabalarına karşılık ısrar eden sigara içme isteği
- 4) Sigara içme veya tütün satın alma için yoğun zaman harcama
- 5) Sigara içme için iş, sosyal, ve keyif verici aktiviteleri erteleme
- 6) Sağlık risklerine karşın sigara içmeyi sürdürme (52).

2.1.5.3. DSM-IV Nikotin Yoksunluğu

Nikotin yoksunluğu, nikotin içeren maddeleri kullanan bireylerde bırakma sonrası görülen yoksunluk belirtilerini tarifler ve bu durum DSM-IV-TR ölçütlerinde şu şekilde tanımlanmıştır;

A- En az birkaç hafta süre ile her gün nikotin kullanılması

B- Nikotin kullanımının birden bırakılmasının ya da kullanılan nikotin miktarının azaltılmasının ardından 24 saat içinde aşağıdaki bulgulardan dördünün (ya da daha fazlasının) ortaya çıkması:

- 1-Disforik ya da depresif duygudurum
- 2-İnsomnia
- 3-İrritabilite, sinirlenme ya da öfkelenme
- 4-Anksiyete
- 5-Düşüncelerini yoğunlaştıramama

6-Huzursuzluk

7-Kalp hızında azalma

8-İştah artması ya da kilo alma

C-B tanı ölçütündeki belirtiler klinik açıdan belirgin bir sıkıntıya ya da toplumsal, mesleki alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında bozulmaya neden olur.

D-Bu belirtiler genel tıbbi duruma bağlı değildir ve başka bir mental bozuklukla daha iyi açıklanamaz (20).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasallar

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları

- Real-Time PCR cihazı (ABI 7500, Applied Biosystems)
- Microamp 96 kuyucuklu real time PCR plate için film (Applied Biosystems)
- Standart 96 kuyucuklu polipropilen real time PCR plate (Applied Biosystems)
- Etüv (Nüve EN-500)
- 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüpleri (BD Falcon)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V, OT 40 L)
- Vorteks (VELP)
- Mikropipet seti (Eppendorf)
- Santrifüj (Nüve NF-800)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- Derin dondurucu (Arçelik 2031D)
- Hassas terazi (AND)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Sigma E-5134)
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)
- Amonyum asetat (AMRESCO MW 77.08)
- Absolute etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Sodyum klorür (NaCl)

- TrisHCL (Tris-Hidroklorid) (Sigma T-7149)
- Proteinaz K (Invitrogen 46-7285)
- Steril distile su (Respiflo 21000)
- DNA izolasyon kiti (Invitrogen Pure Link Genomik DNA Mini Kit K1820-02)
- 2X TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems, 4364340)
- 40X Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assays Mix (Applied Biosystems, 85581637) (*rs7562566*; C_29071852_10, *rs1836724*; C_30493268_10, *rs10048757*; C_29646410_10, *rs10883934*; C_1266001_10, *rs1764072*; C_2922125_10, *rs6584400*; C_30519098_10).

3.1.3. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Çizelge 3.1. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

<p>Nüklei Lizis Tampon Çözeltisi</p> <ul style="list-style-type: none">• 10 mM Tris-HCl.....1,576 gr• 400 mM NaCl.....23,4 gr• 2 mM Na₂EDTA.....0,7 gr <p>Hazırlanışı: Distile su ile 1 lt'ye tamamlanarak çözülüp otoklavda steril edildi.</p>
<p>%10 SDS</p> <ul style="list-style-type: none">• 10 gr SDS <p>Hazırlanışı: 10 gr SDS 100 ml distile su ile çözüldü.</p>
<p>TE Tampon Çözeltisi</p> <ul style="list-style-type: none">• 10 mM Tris-HCl.....0,394 gr (pH 8)• 1 mM Na₂EDTA.....0,093 gr <p>Hazırlanışı: 250 ml distile suda çözülüp otoklavda steril edildi.</p>
<p>10 M Amonyum Asetat (C₂H₇NO₂) Tampon Çözelti</p> <ul style="list-style-type: none">• 148 gr C₂H₇NO₂ <p>Hazırlanışı: 148 gr C₂H₇NO₂ 200 ml distile suda çözüldü.</p>
<p>Proteinaz K için Tampon Çözeltisi</p> <ul style="list-style-type: none">• 10mM Tris-HCl.....0,394 gr <p>Hazırlanışı: 200 ml distile suda çözülüp otoklavda steril edildi.</p>

3.2. Vaka-Kontrol Grubunun Oluşturulması ve Periferik Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya başlamadan önce Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Vaka grubu Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Psikiyatri Anabilim Dalı polikliniklerine başvuran kişiler arasında; DSM- IV-TR'ye göre nikotin bağımlılığı tanı kriterlerini karşılayan ve aynı zamanda FNBT'den 5 ve daha yüksek puan alan, erişkin, çalışmaya onay veren, gönüllü 200 sigara bağımlısı bireyden oluşturulmuştur. Kontrol grubu; hayatının herhangi bir döneminde DSM-IV-TR'ye göre nikotin bağımlılığı tanı kriterlerini karşılayacak düzeyde sigara içimi olmayan, vaka grubuyla yaş, cinsiyet ve eğitim düzeyi olarak eşleştirilmiş, sağlıklı 200 gönüllü bireyden oluşturulmuştur.

Hem vaka hem de kontrol grubundaki bireylere, çalışmaya katıldıklarına dair etik kurulda belirtilen yönergelere göre uygun bir biçimde hazırlanmış, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatıldı. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyden 5-6 ml periferik kan alınarak 1 ml, %2'lik etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren santrifüj tüplerine konularak DNA eldesine kadar +4 °C'lik buzdolabında saklandı.

3.3. DNA İzolasyonu

Vaka ve kontrol bireyelerine ait EDTA'lı tüplere alınmış periferik kandan 500µl ayrılarak önce manuel yöntem kullanılarak DNA izolasyonu gerçekteştirildi ve Miller tuz çöktürme yöntemi kullanıldı (111). Manuel yöntemle DNA'sı elde edilemeyen bireylerin ayrılan 500µl periferik kanından kit (İnvitrogen Pure Link Genomik DNA Mini Kit K1820-02) yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı.

3.3.1. Miller tuz çöktürme yöntemi (111)

DNA izolasyonu için, sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulandı:

1. Gün Basamağı

1. EDTA'lı tüp içersinde bulunan 5-6 ml periferik kan, 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine soğuk distile su eklenerek 12 ml'ye tamamlandı ve 2-3 dk hızlı bir şekilde çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra 10 dk 2000 rpm'de oda ısısında santrifüj edildi.
2. Santrifügasyondan sonra, pelet üstündeki sıvı faz (süpernatant), transfer pipeti aracılığıyla 7 ml seviyesine kadar atıldıktan sonra tekrar 12 ml'ye tamamlamak için soğuk steril distile su ilave edildi ve hızla çalkalandı. Tamamlama işleminden sonra 10 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi.
3. Süpernatant kısım; berrak bir görünüm alana kadar soğuk distile su ile yıkama işlemine devam edildi. Bu işlem; süpernatant 7, 5, 1 ml seviyesine kadar uzaklaştırılmak üzere yaklaşık 4-5 kez tekrarlandı.
4. Süpernatant kısım berraklaştıktan sonra, pelet üzerine 3 ml nüklei lizis tampon eklendi ve tüpler yaklaşık 15-20 defa hızla çalkalandı. Bu basamakla beraber nükleus içeriğinin ortama serbest kalması sağlanmış oldu.
5. Tüplere 200 µl % 10'luk SDS ve 150 µl proteinaz-K eklenerek, tüpler alt üst edildi. SDS, hücre membranının ayrışmasına, Proteinaz K, proteinlerin elimine edilmesine neden olur.
6. Proteinaz K'nin optimum düzeyde işlevini yapabilmesi için tüpler bir gece 37°C'de etüvde inkübasyona bırakıldı.

2. Gün Basamağı

1. İnkübasyon işlemi sonrası tüpler 55°C'de 1 saat bekletildi.
2. Tüpler alt-üst edilerek üzerine 2 ml, 10 M amonyum asetat eklendi ve yavaşça çalkalanarak 10 dk oda ısısında bekletildi.
3. Tüpler 15 dk 3500 rpm'de santrifüj edildi.
4. Süpernant başka bir tüpe alındı ve üzerine 12 ml'ye kadar soğuk absölu etanol ilave edilerek, DNA'nın yoğunlaşması sağlandı.

5. Absolü etanol içinde; yoğunlaşmış görülebilir hale gelen DNA, içerisinde Tris-EDTA (TE; pH 8) tampon çözeltisi bulunan ependorf tüplerine mikropipet yardımıyla dikkatlice aktarıldı.
6. 37°C'lik etüvde bir gece bekletilerek, DNA'ların çözünüp homojen hale gelmesi sağlandı. Moleküler analize kadar +4°C'de saklandı.

3.3.2. Kit yöntemi (PureLink Genomic DNA Kits İnvitrogen Life)

1. Manuel yöntem ile DNA elde edilemeyen kan örneklerinden 200 µl periferik kan alınıp 1,5'lik ependorf tüplerine, mikropipet yardımıyla aktarıldı.
2. 20 µl proteinaz K ve 20 µl RNaz A solüsyonu, 200 µl periferik kanın bulunduğu tüpe eklenerek, 5-10 sn. hızlıca vortekslendi.
3. Tüplere 200 µl Lysis/Binding Buffer eklenerek tekrar vorteks işlemi yapıldı.
4. 55 °C'lik etüvde 10-15 dk. bekletildi.
5. Örnekler etüvden çıkarıldıktan sonra 200 µl absolü etanol eklenerek hızlıca vortekslendi. 1,5'lik ependorf tüplerindeki örnekler filtreli tüpler aktarılarak, mikrosantrifüjde 10000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Santrifüjden çıkarılan filtreli tüplerin toplama tüpleri atılarak yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Örneklerin üzerine mikropipet yardımıyla 500 µl Wash Buffer 1 eklendi. Mikrosantrifüjde 10000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Santrifüjden çıkarılan filtreli tüplerin toplama tüpleri atılarak tekrar yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Örnekler üzerine 500 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklenerek mikrosantrifüjde 14000 x g'de 3 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpleri atılarak filtreli tüpler yeni 1,5'lik ependorf tüplerine koyuldu.
8. Filtreli tüplere 200 µl Elution Buffer eklenerek, tüpler 14000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrasında DNA örneği filtreli tüpten ependorf tüpe birikerek DNA örneği elde edildi. Moleküler analize kadar 4°C'de saklandı.

3.4. ErbB4 ve NRG3 Genlerinin Real-Time PCR ile Çoğaltılması

Periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra hem vaka hem de kontrol örneklem grubu üzerinde genotip belirleme deneyi yapıldı. Bu tez çalışmasında *ErbB4* genine ait *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* polimorfizmleri ile NRG3 genine ait *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* polimorfizmleri “Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assays” kullanılarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon (Real Time Polymerase Chain Reaction) sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. ErbB4 Geninde Çalışılan SNP'lerin Özellikleri

Çizelge 3.2. *ErbB4* genine ait *rs7562566* (112)

Genin Adı	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>ErbB4</i> (SNP1)	Ekzon A>G	<i>rs7562566</i>
Çoğaltılan Sekans	TCTAAGATGGCTCTCTTACATGGCT [A/G] TTGACAAGAGGTCTCAGTTGCTTAT	
Çoğaltılan Bölge	AGCAGGAACACCTCAGTTGGATGGTCCTAGCTCAGGGTCTCTCATGAAGTTTCAG TCAAGAAGTTGGCTGTGGCTGCAATCATCTGCAGGCTTGATTGGGGCTGGAGGAT CCACTTCTAAGATGGCTCTCTTACATGGCT [A/G] TTGACAAGAGGTCTCAGTTG CTTATCACATAGGCCTCTGAATAGTGTCCCTATGACATTCAAAGAAAGAACAAGA GAGAATAAGAGAATGATCAAGACAGACATTAGAGTGTCTTTTCTAATCT	

Çizelge 3.3. *ErbB4* genine ait rs1836724 (113)

Genin Adı	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>ErbB4</i> (SNP2)	3'UTR A>G	rs1836724
Çoğaltılan Sekans	GCTACTAATACTATGCAGAAAACCA [A/G] GAGCTGCTTGGTAGTCTAACACCTT	
Çoğaltılan Bölge	GAATCACTTGATTTTAGTTTGTGTGTTTAAATAGAAATTTGAGTTTTCGTTGTT TTTCATGCTATTTAAGAATGTTACTGGAGAAAGGATTCTCATCCTAAGCTGTGC TACTAATACTATGCAGAAAACCA [A/G] GAGCTGCTTGGTAGTCTAACACCTT TTGTGGTGCAGATGCTTTGTGGTTCTGGATCTATCCTAGATCAGAGGCCATCTTTCC TCACCTGTTTACCCTTTCTTTAGGCAATCATTTAA	

Çizelge 3.4. *ErbB4* genine ait rs rs10048757 (112)

Genin Adı	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>ErbB4</i> (SNP3)	İntron A>G	rs10048757
Çoğaltılan Sekans	GAGGCCATTCTGAAACAAACTTTCT [A/G] TCTTTTATCCTTAGCCCAATAAGTA	
Çoğaltılan Bölge	TCCTCTGACAGTCCTCTCTTTTACTATATACACAAAGCCCTAAGCTATTCCTATT TTGAATTCAAGGCATGAAGAGGGCACAATTCTTTGTTGAGAGGCCATTCTGAAAC AAACTTTCT [A/G] TCTTTTATCCTTAGCCCAATAAGTAGAGAGAAAAATCCTAT TAAGTGAGGATTATTTTCTCCAAATATATATATACAGAATAGGTAAGTATTTAG	

3.4.2. NRG3 Geninde Çalışılan SNP'lerin Özellikleri

Çizelge 3.5. NRG3 genine ait rs10883934 (112)

Genin Adı	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
NRG3 (SNP1)	İntron A>G	rs10883934
Çoğaltılan Sekans	TCCAATGTTTCTTAATGCTAGGCAC [A/G] GCAGAATCACCTCAGTTTATTCCCTC	
Çoğaltılan Bölge	TTCCCTAGCATGCCTGTTCCCTTGAACAAAGGCAGGTTTCAGGAGTGTAGTGAAGC TCCAGGCTCCAAAACTCTTTCACCTCATTGCACTCTA TCCAATGTTTCTTAAT GCTAGGCAC [A/G] GCAGAATCACCTCAGTTTATTCCCTC AAAAAATGATGGTTGAA TTTATCTGGCCAGGCATTGGTAGTTTACAGAAGTCTACCAGATGATTCTAATGTG	

Çizelge 3.6. NRG3 genine ait rs1764072 (112)

Genin Adı	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
NRG3 (SNP2)	İntron A>G	rs1764072
Çoğaltılan Sekans	GAGATGTCCTGTAAATCTCTTCTCA [A/G] TTTCTCAACTTGGGTGTGCCATATG	
Çoğaltılan Bölge	AGTAATATCTCTCCACCATTACTAGCCCTGGGGTATTACATCATCTTCATTGC TAGGTATAAAATTTGTCTCACCTATATAA GAGATGTCCTGTAAATCTCTTCTCA [A/G] TTTCTCAACTTGGGTGTGCCATATG CTGTCTACTTGAACCTTGACATGTA TTCTCAAAACAGTGAAGTGGCTATTTAAGCTCCTTCTTTCTTGTGATGCTATCAT	

Çizelge 3.7. *NRG3* genine ait rs6584400 (112)

Genin Adı	Nükleotid Değişimi	SNP referans numarası
<i>NRG3</i> (SNP3)	İntron A>G	rs6584400
Çoğaltılan Sekans	GTTAATTACATGAACAAGCATGCCT [A/G] ATTCTCTTCCACACAGCCTGTCTC	
Çoğaltılan Bölge	GAGAATCTAGGGCTTTTTTTTTTTTTTGGTTTTCTTTAAAGATTGTATGATAAAAA ATGTTTATTATGGCTTAAGGGGAATGAAGGTATTTCAGATAAGTTAATTACATGA ACAAGCATGCCT [A/G] ATTCTCTTCCACACAGCCTGTCTCAAGATCCTTCATT CGTCAACTATTTCTTAAGCACCTACTACTTGCCAGATGCTGTTTTAGGCACCCAG	

3.4.3. Real Time-PCR reaksiyon ortamının hazırlanması

Her bir polimorfizm için aşağıdaki real time-PCR reaksiyon karışımı kullanılmıştır:

- 12.5 µl.....2X TaqMan universal PCR master mix
- 1.2 µl.....40X SNP genotyping assay mix
- 12 µl.....Distile su

Verilen miktarların her biri çalışmada kullanılacak örnek sayısı ile çarpılarak hazırlandı. Real Time-PCR reaksiyon karışımı 96 kuyucuklu saydam tabağın (Applied Biosystems) kuyucuklarına dağıtıldı. Hazırlanan karışımın kontamine olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla her bir reaksiyon tabağının ilk kuyucuğu örnek DNA içermeyen negatif kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı. Negatif kontrol kuyucuğu hariç her kuyucuğa genomik DNA örneğinden 2 µl ilave edildi. Reaksiyon karışımı kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 96 kuyucuklu tabak için Microamp[®] TM Optical

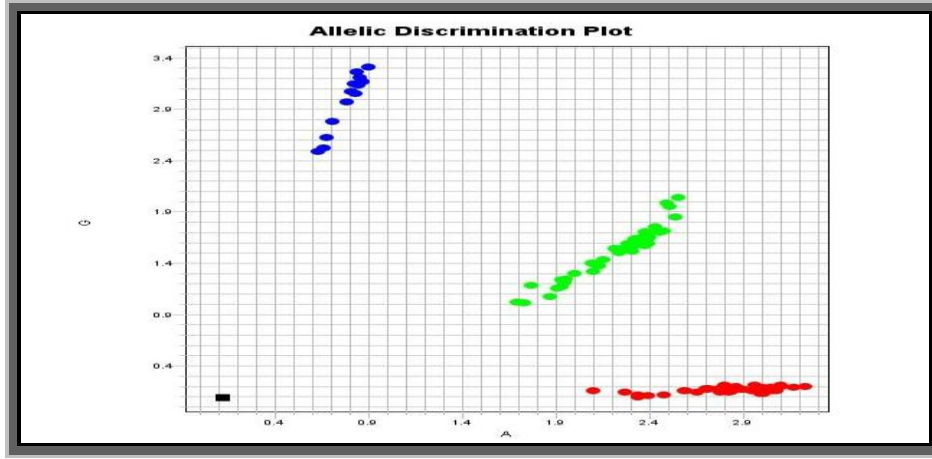
Adhesive Covers (Applied Biosystems) ile kuyucukların üzeri kaplandı ve çizelge 3.7’deki protokollere göre SDS 2.0.6 software for allelic discrimination (Applied Biosystems)” programı ayarlanarak plate cihaza yerleştirildi.

Çizelge 3.8. *ERBB4* ve *NRG3* genlerine ait tüm SNP’lerin Real-Time PCR protokolü

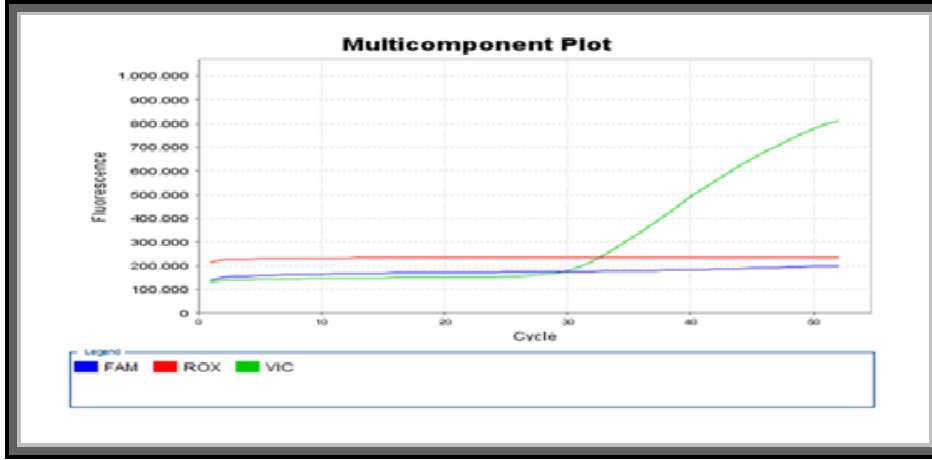
Protokol	
60°C’de	1 dakika ön inkübasyon1 döngü
95°C’de	10 dakika aktivasyon1 döngü
95°C’de	15 saniye denatürasyon..... 50 döngü
60°C’de	1.30 dakika bağlanma/uzama.....50 döngü
60°C’de	1 dakika PCR sonrası okuma.....1 döngü

3.5. Genotip Tayini

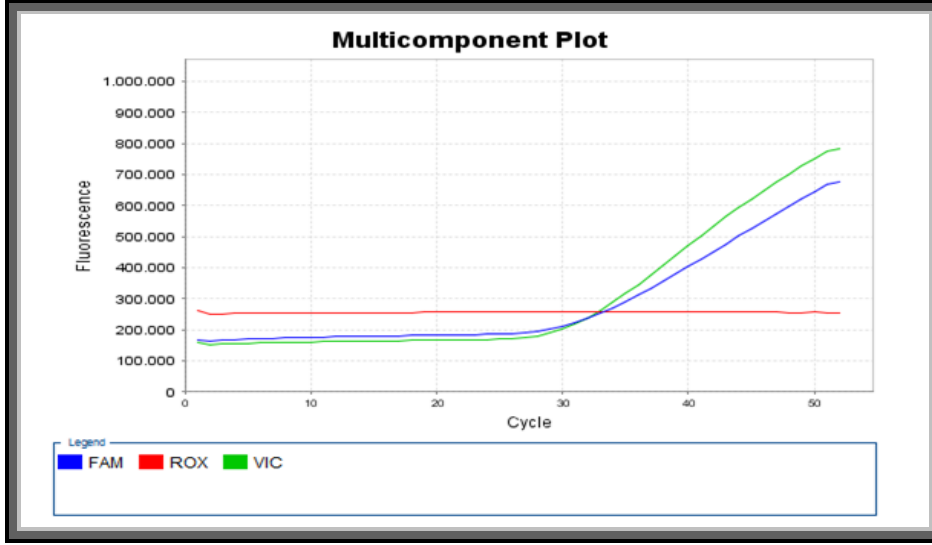
ErbB4 (*rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757*) ve *NRG3* (*rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400*) gen polimorfizmleri için 200 vaka ve 200 kontrolü içeren araştırmada, her bir birey için “Pre-designed TaqMan Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Assays” sistemine göre Real Time-PCR yöntemiyle genotip tayini yapıldı. Bu gen polimorfizmlerine ait alleller uygun floresan boya ile işaretlenip (A= **VIC**, G=**FAM**) elde edilen amplifikasyon eğrileri ile her bir örneğin genotipi tespit edildi (Şekil 3.1).



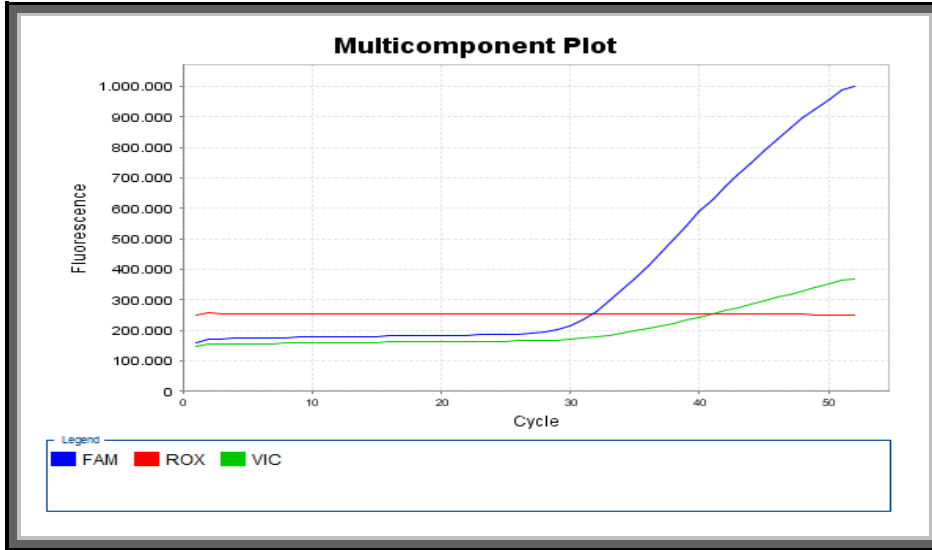
Şekil 3.1. *NRG3-rs10883934* için TaqMan® MGB prob lar (A=**VIC**, G=**FAM**) ile allelik diskriminasyon, elde edilen PCR örneklerinde, vaka gruplarının allel dağılımı. Mavi renkli küreler **G/G** genotipini, kırmızı renkli olanlar ise **A/A** genotipini yeşil renkli küreler ise heterozigot **A/G** genotipli örnekleri göstermektedir.



Şekil 3.2. *NRG3-rs10883934* polimorfizmi A>G için genotipleme sonucunda elde edilen multikomponent grafiğinde homozigot **A/A** genotipi. Yeşil renkli eğri A allelini (**VIC**), mavi renkli eğri G allelini (**FAM**), ve kırmızı renkli yatay çizgi arka plandaki ışımayı belirten **ROX** referans boyayı temsil etmektedir.



Şekil 3.3. *NRG3-rs10883934* polimorfizmi için genotipleme sonucunda elde edilen multikomponent grafiğinde heterozigot A/G genotipi.



Şekil 3.4. *NRG3-rs10883934* polimorfizminde genotipleme sonucunda elde edilen multikomponent grafiğinde homozigot G/G genotipi.

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel testler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda yapıldı.

Cinsiyet, polimorfizmler ve alleler bakımından vaka ve kontrol grupları arasındaki farklılıklar, ayrıca bu parametreler için bağımlılık düzeyleri arasındaki farklılıklar Pearson ki-kare ve Likelihood Ratio ki-kare testleri ile test edilmiştir. Allellerin her birinin frekansları hesaplanmış ve populasyonun denge durumu Hardy Weinberg ile belirlenmiştir. İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapılmış, istatistik analizlerde $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vaka ve Kontrol Gruplarının Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Bu vaka kontrol çalışmasında; vaka grubunu 200 sigara bağımlısı birey oluştururken, kontrol grubunu da 200 birey oluşturmaktadır. Çalışmaya 201'i (% 50,3) kadın, 199'u (% 49,8) erkek olmak üzere toplam 400 birey alınmıştır. Çizelge 4.1'de gösterildiği üzere; kontrol grubundaki 200 bireyin 102 tanesi (% 51,0) kadın, 98 tanesi (% 49,0) erkek; vaka grubundaki 200 bireyin 99 tanesi (%49,5) kadın, 101 tanesi (%50,5) ise erkektir. Cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde vaka ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0.764$).

Çizelge 4.1. Vaka-Kontrol gruplarının cinsiyet dağılımları

CİNSİYET	Vaka Grubu n (%)	Kontrol Grubu n (%)	p Değeri ($p>0,05$)
Kadın	99 (%49,5)	102 (%51,0)	0,764
Erkek	101 (%50,5)	98 (%49,0)	

4.2. ErbB4 ve NRG3 Genlerinin Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi

ErbB4 geni üzerinde yer alan 3 polimorfizm ile *NRG3* geni üzerinde yer alan 3 polimorfizmin vaka ve kontrol gruplarındaki dağılımları incelenmiş olup gruplar arasında Hardy-Weinberg dengesinin korunduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

4.2.1. ErbB4-rs1836724 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizde; vaka ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.580$). Gruplar arasında genotip sıklıkları incelendiğinde;

- **AA** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %43 iken kontrol grubunda %46,
- **AG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %44 iken kontrol grubunda %39,
- **GG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %13 iken kontrol grubunda %15 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *ErbB4* geni üzerinde yer alan *rs1836724* polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları (n=birey sayısı)

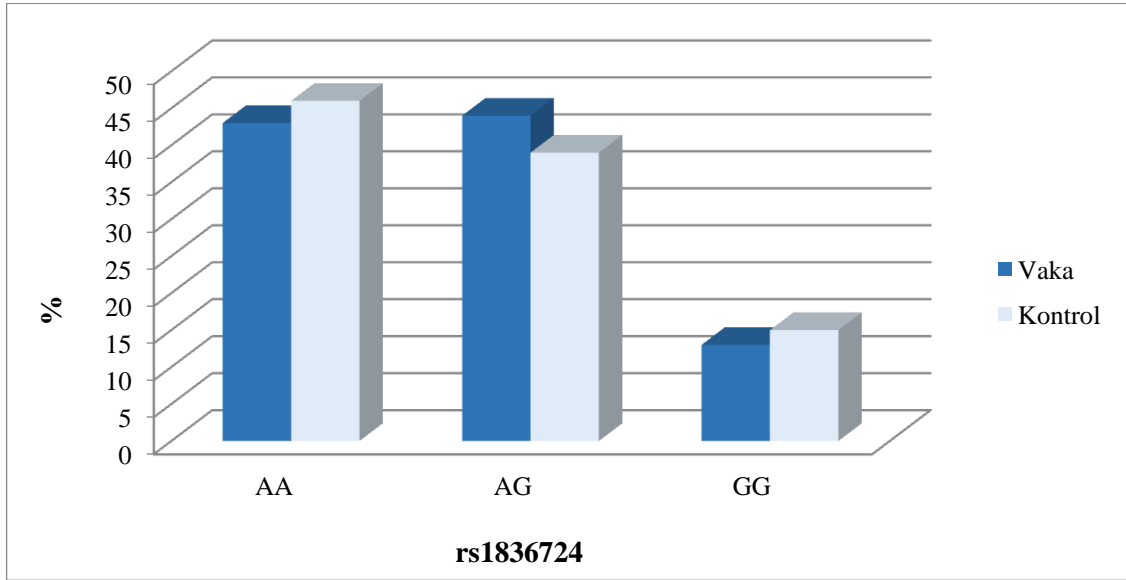
<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	Vaka		Kontrol		χ^2	<i>P</i>	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%			
<i>ErbB4</i>	<i>rs1836724</i>	AA	86	43.0	92	46.0	1.090	0.580
		AG	88	44.0	78	39.0		
		GG	26	13.0	30	15.0		

Sonuçlar allel oranları açısından karşılaştırıldığında ise;

- Vaka grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir (p=0.641). Vaka grubunda ‘A’ alleli %65 ve ‘G’ alleli %35 olarak belirlenmiştir.
- Kontrol grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzde dağılımı arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir (p=0.053). Kontrol grubunda ‘A’ alleli %66 ve ‘G’ alleli %34 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Vaka ve kontrol grupları arasında allelik dağılımı açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). *rs1836724* polimorfizmine ait A ve G allellerin vaka ve kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).

Çizelge 4.3. *ErbB4* genine ait *rs1836724* polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımının (sayı ve yüzde), *Hardy-Weinberg* dengesine ait Ki-kare ve p değeri. (n=birey sayısı)

<i>ErbB4</i> <i>rs1836724</i>	Vaka		Kontrol	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
A alleli	260	0.65	262	0.66
G alleli	140	0.35	138	0.34
χ^2	0.217		3.758	
p	0.641		0.053	



Şekil 4.1. *ErbB4*- *rs1836724* polimorfizminde A ve G allellerinin vaka- kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı

4.2.2. ErbB4-rs7562566 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizde; vaka ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.715$). Gruplar arasında genotip sıklıkları incelendiğinde;

- **AA** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %43.5 iken kontrol grubunda %47,
- **AG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %44 iken kontrol grubunda %40,
- **GG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %12.5 iken kontrol grubunda %13 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *ErbB4* geni üzerinde yer alan *rs7562566* polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları (n=birey sayısı)

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	Genotip	Vaka		Kontrol		χ^2	<i>P</i>
			<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
<i>ErbB4</i>	<i>rs7562566</i>	AA	87	43.5	94	47.0	0.671	0.715
		AG	88	44.0	80	40.0		
		GG	25	12.5	26	13.0		

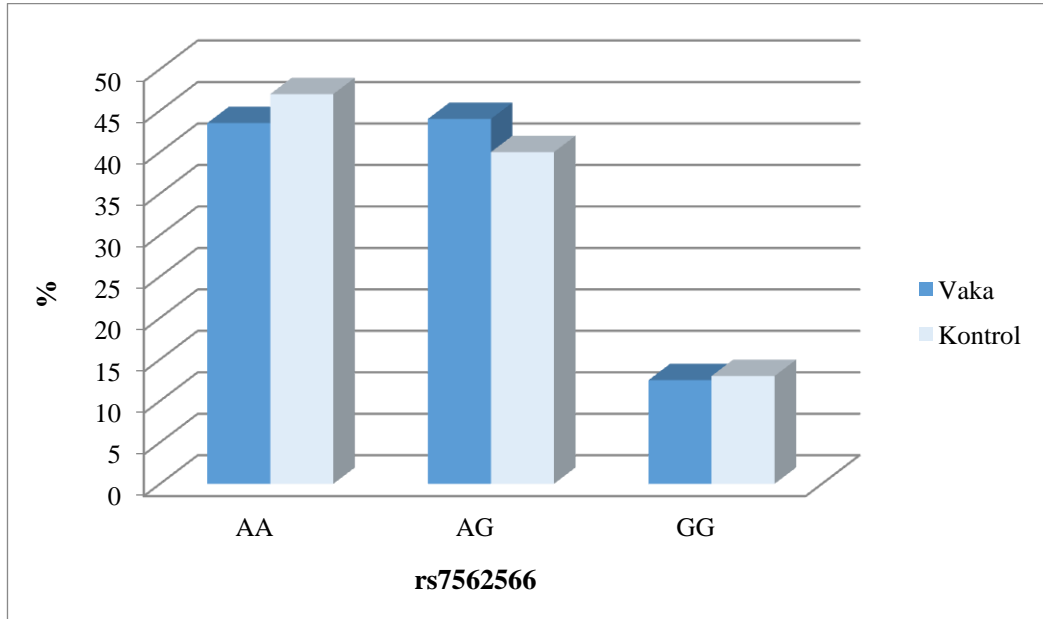
Sonuçlar allel oranları açısından karşılaştırıldığında ise;

- Vaka grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.708$); Vaka grubunda ‘A’ alleli %66 ve ‘G’ alleli %34 olarak belirlenmiştir.
- Kontrol grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzde dağılımı arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.177$). Kontrol grubunda ‘A’ alleli %67 ve

‘G’ alleli %33 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Vaka ve kontrol grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). *rs7562566* polimorfizmine ait A ve G allellerin vaka ve kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.5. *ErbB4* genine ait *rs7562566* polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımının (sayı ve yüzde), *Hardy-Weinberg* dengesine ait Ki-kare ve p değeri. (n=birey sayısı)

<i>ErbB4</i> <i>rs7562566</i>	Vaka		Kontrol	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
A alleli	262	0.66	268	0.67
G alleli	138	0.34	132	0.33
χ^2	0.1398		1.821	
p	0.708		0.177	



Şekil 4.2. *ErbB4*- *rs7562566* polimorfizminde A ve G allellerinin vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı

4.2.3. ErbB4-rs10048757 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizde; vaka ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.580$). Gruplar arasında genotip sıklıkları incelendiğinde;

- **AA** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %42.5 iken kontrol grubunda %45.5,
- **AG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %45 iken kontrol grubunda %40,
- **GG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %12.5 iken kontrol grubunda %14.5 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *ErbB4* geni üzerinde yer alan *rs10048757* polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları (n=birey sayısı)

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	Genotip	Vaka		Kontrol		χ^2	<i>P</i>
			<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
<i>ErbB4</i>	<i>rs10048757</i>	AA	85	42.5	91	45.5	1.089	0.580
		AG	90	45.0	80	40.0		
		GG	25	12.5	26	14.5		

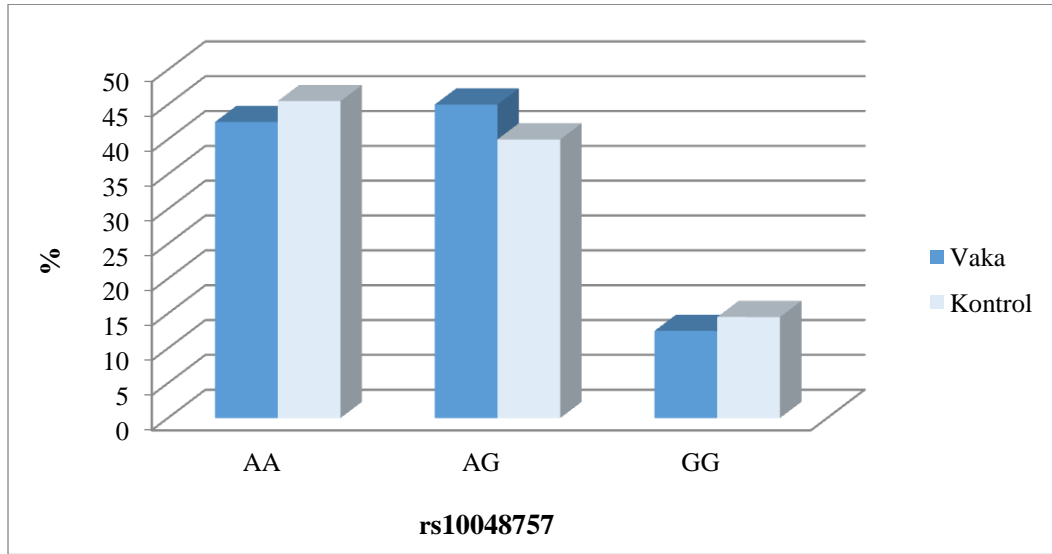
Sonuçlar allel oranları açısından karşılaştırıldığında ise;

- Vaka grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.876$) ; Vaka grubunda ‘A’ alleli %65 ve ‘G’ alleli %35 olarak belirlenmiştir.

- Kontrol grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzde dağılımı arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.104$). Kontrol grubunda ‘A’ alleli %66 ve ‘G’ alleli %34 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Vaka ve kontrol grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). *rs10048757* polimorfizmine ait A ve G allellerin vaka ve kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3).

Çizelge 4.7. *ErbB4* genine ait *rs10048757* polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımının (sayı ve yüzde), *Hardy-Weinberg* dengesine ait Ki-kare ve p değeri. (n=birey sayısı)

<i>ErbB4</i> <i>rs10048757</i>	Vaka		Kontrol	
	n	%	n	%
A alleli	260	0.65	262	0.66
G alleli	140	0.35	138	0.34
χ^2	0.024		2.643	
p	0.876		0.104	



Şekil 4.3. *ErbB4- rs10048757* polimorfizminde A ve G allellerinin vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı

4.2.4. NRG3-rs1764072 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizde; vaka ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.132$). Gruplar arasında genotip sıklıkları incelendiğinde;

- **AA** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %71 iken kontrol grubunda %77,
- **AG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %26.5 iken kontrol grubunda %22.5,
- **GG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %2.5 iken kontrol grubunda %0.5 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. NRG3 geni üzerinde yer alan rs1764072 polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları (n=birey sayısı)

Gen	Polimorfizm	Genotip	Vaka		Kontrol		χ^2	P
			n	%	n	%		
NRG3	rs1764072	AA	142	71.0	154	77.0	4.051	0.132
		AG	53	26.5	45	22.5		
		GG	5	2.5	1	0.5		

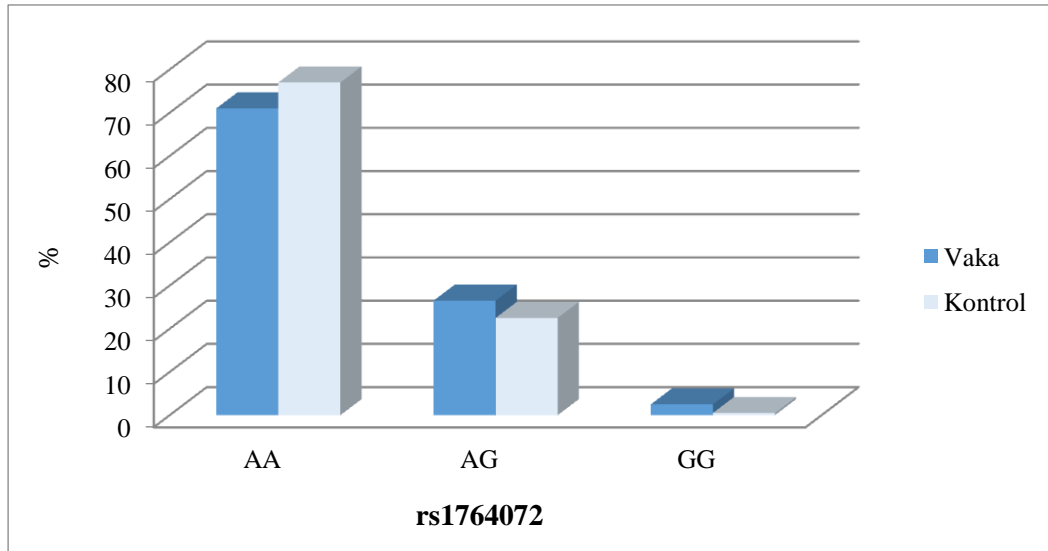
Sonuçlar allel oranları açısından karşılaştırıldığında ise;

- Vaka grubu içerisinde 'A' ve 'G' allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.984$) ; Vaka grubunda 'A' alleli %84 ve 'G' alleli %16 olarak belirlenmiştir.

- Kontrol grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzde dağılımı arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.230$). Kontrol grubunda ‘A’ alleli %88 ve ‘G’ alleli %12 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Vaka ve kontrol grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). *rs1764072* polimorfizmine ait A ve G allellerin vaka ve kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.9. *NRG3* genine ait *rs1764072* polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımının (sayı ve yüzde), *Hardy-Weinberg* dengesine ait Ki-kare ve p değeri. (n=birey sayısı)

<i>NRG3</i> <i>rs1764072</i>	Vaka		Kontrol	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
A alleli	337	0.84	353	0.88
G alleli	63	0.16	47	0.12
χ^2	0.0004		1.442	
p	0.984		0.230	



Şekil 4.4. *NRG3- rs1764072* polimorfizminde A ve G allellerinin vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı

4.2.5. NRG3-rs6584400 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizde; vaka ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.896$). Gruplar arasında genotip sıklıkları incelendiğinde;

- AA genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %1.5 iken kontrol grubunda %1.5,
- AG genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %25 iken kontrol grubunda %23,
- GG genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %73.5 iken kontrol grubunda %75.5 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. NRG3 geni üzerinde yer alan rs6584400 polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları (n=birey sayısı)

Gen	Polimorfizm	Genotip	Vaka		Kontrol		χ^2	P
			n	%	n	%		
NRG3	rs6584400	AA	3	1.5	3	1.5	0.220	0.896
		AG	50	25.0	46	23.0		
		GG	147	73.5	151	75.5		

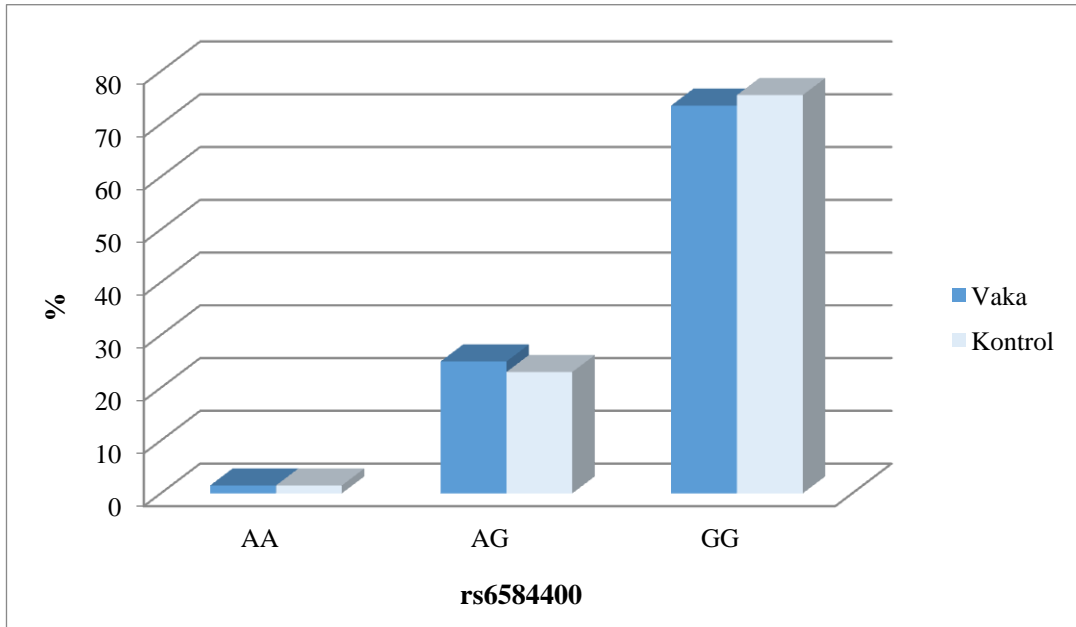
Sonuçlar allel oranları açısından karşılaştırıldığında ise;

- Vaka grubu içerisinde 'A' ve 'G' allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.589$) ; Vaka grubunda 'A' alleli %14 ve 'G' alleli %86 olarak belirlenmiştir.
- Kontrol grubu içerisinde 'A' ve 'G' allellerinin yüzde dağılımı arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.812$). Kontrol grubunda 'A' alleli %13 ve 'G' alleli %87 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Vaka ve kontrol grupları

arasında allelik dağılım açısından da istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). *rs6584400* polimorfizmine ait A ve G allellerin vaka ve kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.11. *NRG3* genine ait *rs6584400* polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımının (sayı ve yüzde), *Hardy-Weinberg* dengesine ait Ki-kare ve p değeri. (n=birey sayısı)

<i>NRG3</i> <i>rs6584400</i>	Vaka		Kontrol	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
A alleli	56	0.14	52	0.13
G alleli	344	0.86	348	0.87
χ^2	0.292		0.056	
p	0.589		0.812	



Şekil 4.5. *NRG3- rs6584400* polimorfizminde A ve G allellerinin vaka-kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı

4.2.6. NRG3-rs10083934 Polimorfizmine Ait Genotip Dağılımı ve Allel Frekanslarının Değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizde; vaka ve kontrol grubu arasında genotip dağılımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.699$). Gruplar arasında genotip sıklıkları incelendiğinde;

- **AA** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %42.5 iken kontrol grubunda %46.5,
- **AG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %47 iken kontrol grubunda %43,
- **GG** genotipinin görülme sıklığı; vaka grubunda %10.5 iken kontrol grubunda %10.5 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. NRG3 geni üzerinde yer alan rs10883934 polimorfizminin vaka ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları (n=birey sayısı)

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	Genotip	Vaka		Kontrol		χ^2	<i>P</i>
			<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
<i>NRG3</i>	<i>rs10883934</i>	AA	85	42.5	93	46.5	0.715	0.699
		AG	94	47.0	86	43.0		
		GG	21	10.5	21	10.5		

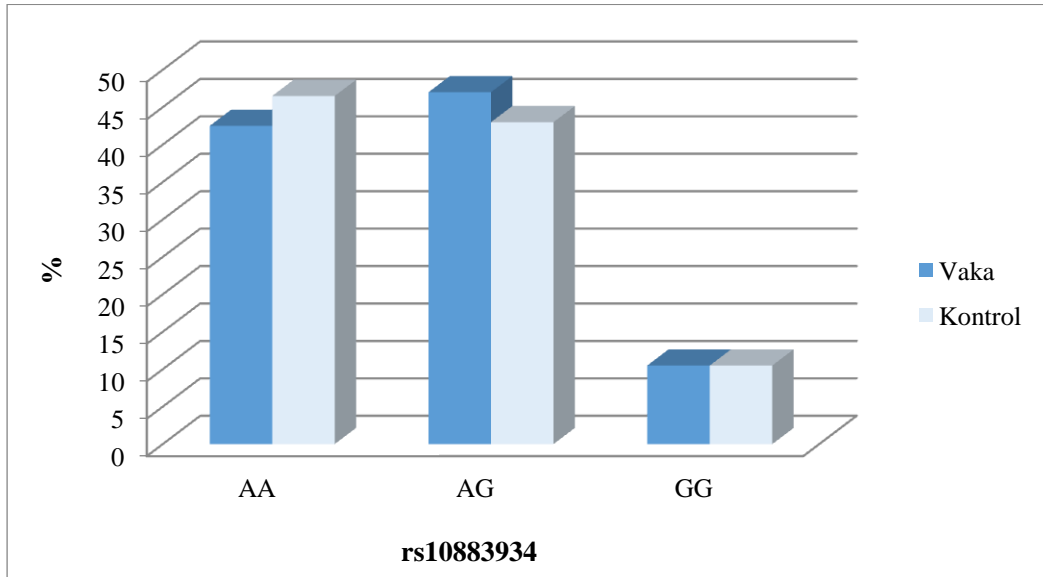
Sonuçlar allel oranları açısından karşılaştırıldığında ise;

- Vaka grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzdesel dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.504$) ; Vaka grubunda ‘A’ alleli %66 ve ‘G’ alleli %34 olarak belirlenmiştir.
- Kontrol grubu içerisinde ‘A’ ve ‘G’ allellerinin yüzde dağılımı arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.866$). Kontrol grubunda ‘A’ alleli %68 ve

‘G’ alleli %32 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Vaka ve kontrol grupları arasında allelik dağılım açısından da istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). *rs10883934* polimorfizmine ait A ve G allellerin vaka ve kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.13. *NRG3* genine ait *rs10883934* polimorfizminin vaka ve kontrol grubundaki allel dağılımının (sayı ve yüzde), *Hardy-Weinberg* dengesine ait Ki-kare ve p değeri. (n=birey sayısı)

<i>NRG3</i> <i>rs10883934</i>	Vaka		Kontrol	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
A alleli	264	0.66	272	0.68
G alleli	136	0.34	128	0.32
χ^2	0.4463		0.029	
p	0.504		0.866	



Şekil 4.6. *NRG3- rs10883934* polimorfizminde A ve G allellerinin vaka- kontrol gruplarına göre yüzdesel dağılımı

4.3. Bağımlılık Düzeylerinin Cinsiyet ve Polimorfizmler Açısından Değerlendirilmesi

Çalışmamızda vaka grubuna FNBT uygulandı Çalışmada vaka grubuna dahil olan bireylerin bu FNBT sonucunda aldıkları puanlara göre gruplama yapıldı. 5 puan alanlar orta düzeyde bağımlı, 6-7 puan alanlar yüksek düzeyde bağımlı, 8-10 puan alanlar çok yüksek düzeyde bağımlı kabul edildi. Bağımlılık düzeylerinin cinsiyet ve polimorfizmler üzerine olan etkileri araştırılmış ve sadece cinsiyet üzerine etkisi anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Bunlara ait tanımlayıcı istatistikler (sayı ve yüzde), ki-kare test istatistik değerleri ve p değerleri Çizelge 4.14'de verilmiştir. Verilere göre orta düzeyde bağımlı olanların %64.4'ü kadın olduğu, yüksek düzeyde bağımlı olanların % 71.9'unun, çok yüksek düzeyde bağımlı olanların ise % 54.3'ünün erkek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Bağımlılık düzeyleri ile cinsiyet ve polimorfizmler açısından, yüzde, Ki-kare, sayı, p değerleri. (n=birey sayısı)

		Orta düzeyde bağımlılık		Yüksek düzeyde bağımlılık		Çok yüksek düzeyde bağımlılık		χ^2	P
		n	%	n	%	n	%		
Cinsiyet	Kadın	65	64.4	18	28.1	16	45.7	20.816	<0.001
	Erkek	36	35.6	46	71.9	19	54.3		
<i>ErbB4 rs1836724</i>	AA	41	40.6	33	51.6	12	34.3	4.114	0.391
	AG	48	47.5	22	34.4	18	51.4		
	GG	12	11.9	9	14.1	5	14.3		
<i>ErbB4 rs7562566</i>	AA	44	43.6	32	50.0	11	31.4	3.220	0.522
	AG	44	43.6	25	39.1	19	54.3		
	GG	13	12.9	7	10.9	5	14.3		
<i>ErbB4 rs10048757</i>	AA	42	41.6	31	48.4	12	34.3	2.818	0.589
	AG	47	46.5	24	37.5	19	54.3		
	GG	12	11.9	9	14.1	4	11.4		
<i>NRG3 rs1764072</i>	AA	70	69.3	51	79.7	21	60.0	4.653	0.319
	AG	28	27.7	12	18.8	13	37.1		
	GG	3	3.0	1	1.6	1	2.9		
<i>NRG3 rs6584400</i>	AA	1	1.0	2	3.1	0	0.0	2.153	0.725
	AG	24	23.8	16	25.0	10	28.6		
	GG	76	75.2	46	71.9	25	71.4		
<i>NRG3 rs10883934</i>	AA	42	41.6	29	45.3	14	40.0	2.283	0.684
	AG	50	49.5	29	45.3	15	42.9		
	GG	9	8.9	6	9.4	6	17.1		

5. TARTIŞMA

Sigara içme, çevresel ve genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı karmaşık bir davranış şeklidir (3). Nikotin bağımlılığının genetik yönünü araştırmak için genom ilişkilendirme çalışmaları, bağlantı çalışmaları ve aday gen analizleri yapılmıştır (16). Yapılan bağlantı çalışmaları ile, sigaraya başlamada kromozom 6,10,14, sigara içme miktarı açısından kromozom 2, 3, 10, 17, 20, 22 ve bağımlılık için kromozom 2 ve 10 üzerindeki ilgili gen bölgeleri tanımlanmıştır (114) . Gen ilişkilendirme çalışmaları nikotin bağımlılığıyla ilişkili aday genleri tanımlar. Bu genler hücre adezyonu, lipid metabolizması, sinyal iletimi, protein ve iyon transportu, transkripsiyon regülasyonu ve protein katabolizması dahil biyolojik süreçlerle ilişkilidir (115).

Aday gen çalışmaları, SNP ve VNTR gibi varyantları kapsayan çalışmalar olarak yapılmaktadır (116). Aday genlerin seçimi çoğunlukla nAChR'ni kodlayan genler, nikotinin metabolizmasını etkileyen genler, dopamin ile ilişkili genler ve daha az oranda da serotonerjik ve nöradrenerjik sistemlerle ilişkili proteinleri kodlayan genlere ve nörotransmitter sentez, transporter genleri üzerine yapılmıştır. Çünkü nörobiyolojik çalışmalar ile bu nörotransmitterlerin sigara bağımlılığının oluşum süreciyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (16,65).

Genetik faktörlerin sigaraya başlama, devamlılık ve bağımlılığa kadar olan süreçte önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (3). Sigaraya başlamada *BDNF*, *CYP2B6*, *SLC6A3*, sigara içmeye devam etmede *GRPR*, *NR3C2*, içilen sigara miktarıyla *CHRNA3*, *CHRNA5*, *MAOA*, *TRPV1*, *FOSB*, *EGLN2*, sigaraya başlama yaşı ile *SLC1A2*, *CYP2A6*, *RYR1*, *CHRNA1*, *NRP1*, sigarayı bırakmada *STXBP6*, *UNC13C*, *RNF144A*, *LNX1*, *CHN2*, *DGKB*, *ST3GAL1*, *PRKG1*, *BNC2*, *PARD3* gen polimorfizmlerinin ilişkili olduğu rapor edilmiştir (4,114).

Nikotin, nikotinik reseptörler üzerinden etki ederek dopamin, serotonin, glutamat, GABA gibi nörotransmitterlerin salınımına neden olmaktadır. Bu nörotransmitter sinyal yollarında yer alan genler üzerindeki genetik varyasyonların nikotin bağımlılığıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.1) (1).

Çizelge 5.1. Nikotin bağımlılığıyla ilişkili SNP ve ekspresyon çalışılan genler (1)

Sinyal Yolağı	Yolaktaki Nikotin Bağımlılığıyla İlişkili Genler	Kaynaklar
Dopamin reseptör sinyali	<i>COMT</i> (rs174696, rs2020917,rs887200), <i>DRD1</i> (rs4532, rs686), <i>DRD2</i> (rs1800497, rs1079597), <i>DRD3</i> (rs2630351, rs1025398), <i>DRD4</i> (VNTR), <i>DRD5</i> (rs1967550), <i>MAOA</i> (rs3027409, rs886716, rs309850), <i>PP1R1B</i> (rs879606, rs907094), <i>SLC18A2</i> (rs363387, rs363333), <i>SLC6A3</i> (rs464049, rs11737901), <i>TH</i> (↑)	79,120,121,122,123,124,125,126, 127,128,129.
Serotonin reseptör sinyali	<i>HTR2A</i> (rs6314, rs6311), <i>HTR6</i> (rs9659997, rs6699866) <i>MAOA</i> (rs2235186, rs3027409), <i>MAOB</i> (↓), <i>SLC6A4</i> (rs1042173), <i>TPH1</i> (779A/C), <i>TPH2</i> (-703G/T)	122,124,129,130.
Glutamat reseptör sinyali	<i>DLG4</i> (rs2242449), <i>GRIK1</i> (rs2832407), <i>GRIK2</i> (rs6570989), <i>GRIN2B</i> (rs7313149, rs2192972), <i>GRIN3A</i> (rs75981117), <i>SLC1A2</i> (rs10836358)	119,123,126,131,133.
GABA reseptör sinyali	<i>DNMI</i> (rs3003609, rs2229917), <i>GABARAP</i> (rs17710, rs222843), <i>GABBR2</i> (rs2779562), <i>GABRA2</i> (rs279858), <i>GABRA4</i> (rs3762611), <i>GABRE</i> (rs2256882, rs1158605)	122,134,135,137.

Kalsiyum sinyali	<p>CHRNA10 (rs2231548), CHRNA2(↑), CHRNA3 (rs12914385, rs12914385), CHRNA4(rs2236196, rs2273504), CHRNA5(rs1051730, rs16969968), CHRNA6(↑),CHRNA7(rs86843), CHRNBI(rs2302765, rs2302762, rs9217), CHRNB2 (rs200223952), CHRNB3(rs4954,rs13277254), CHRNB4(rs56235003), CHRND(rs12466358)</p>	79,121,122,126,129,133,137,138, 139,140.
cAMP aracılı sinyal yolağı	<p>ADRA2A (rs1800544), CHRM1(rs2075748), CHRM2 (rs324650), CNRI(rs2023239,rs12720071,rs806368), CREB1(rs2551640, rs13029936, rs6740584), GABBRI(rs29230, rs29267), GABBR2(rs10985765,rs7865648,rs1328 6336), HTR6 (rs1805054, rs4912138, rs3790756) NPY1R (rs6832644,rs9764), OPRMI(rs557748, rs590761, rs613341, rs510769)</p>	120,121,137,139,141,142,143,144, 145.
<p>↑ : Ekspresyon artışı ↓ : Ekspresyon azalışı</p>		

NRG'ler, sinir sistemi, kalp, meme ve diğer organ sistemlerinde hücre-hücre etkileşimlerine aracılık eden sinyal proteinleri olup, ErbB ailesinin reseptör tirozin kinazları için ligandları kodlayan EGF ailesinin bir üyesidir (99).

Bu tez çalışmasında ErbB4 ve NRG3 gen polimorfizmlerinin sigara bağımlılığı ile ilişkisi olup olmadığı araştırıldı. *ErbB4* geninde bulunan *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* ve *NRG3* geninde bulunan *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400*

polimorfizmlerinde, vaka ve kontrol grupları; genotip dağılımı, allel frekansı ve polimorfizmlerin bağımlılık düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Bugüne kadar diğer populasyonlarda *ErbB4* ve *NRG3* gen polimorfizmleri ile nikotin bağımlılığı arasındaki ilişkinin araştırılması ile ilgili çok az çalışma yapılmış, bu çalışmalar sonucu *ErbB4* ve *NRG3* genleri ile nikotin bağımlılığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (4,5).

Yapılan bir çalışmada Turner ve ark.'ları (2014); *NRG3* geni intron 7 bölgesinde mikrosatellit tekrarlarını içeren gen bölgesi için mutant erkek fareler kullanmışlardır. 14 günlük deri altından kronik nikotin uygulamasının ardından *NRG3* ve reseptörü olan *ErbB4*'ün mRNA ve protein seviyeleri, normal grup farelerle karşılaştırılmıştır. Kronik nikotin uygulaması ve 24 saatlik yoksunluğun ardından *NRG3* ve *ErbB4* mRNA ve protein seviyelerinde önemli bir artışın olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Turner ve ark.'nın yine aynı çalışmasında, 114'ü sigarayı bırakan ve 335'i içmeye devam eden 449 Avrupa bireyinin katıldığı çalışmada *NRG3* *rs10883934*, *rs1896506*, *rs1649947*, *rs765833*, *rs1649967*, *rs1336287*, *rs495978*, *rs540697*, *rs1923560*, *rs2026495*, *rs4362091*, *rs10787519* polimorfizmleri ile sigara bırakma arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (5). Bu tez çalışmasında vaka kontrol grubu arasında *NRG3* *rs10883934* gen polimorfizminin, genotip ve allel frekansı açısından bir farklılık olmamasına rağmen, Turner ve ark. larının yaptığı çalışmada sigarayı bırakmayla ilişkisi olduğu görülmüştür. Populasyonlar arasındaki bu farklılığın, etiyolojik faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini akla getirmektedir. Böylece bazı polimorfik alleller bağımlılık riskini arttırırken bazıları ise azaltabilmektedir (koruyucu allellik). Bundan dolayı farklı sonuçlar elde edilen *NRG3* *rs10883934* gen polimorfizminin, bireye özgü sigara bırakma tedavisinde, farklı ilaç tasarımı ve doz-cevap ayarlamasında yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

Şizofreni hastalarının çoğunluğunu sigara bağımlısı bireylerin oluşturduğu bildirilmiştir. Bağımlılık gibi şizofreni de beyindeki nörotransmitter seviyelerindeki değişikliklerle karakterizedir (146). Şizofreni hastalarında dopamin, glutamat, GABA gibi nörotransmitter sistemlerde değişiklik olmaktadır. Patolojik koşullarda dopamin iletim sisteminin daha hızlı, glutamat ve GABA'nın ise daha yavaş olduğu yapılan

çalışmalarla desteklenmiştir. Şizofreni, serebral kortekste GABA sinaptik iletiminin yetersizliğiyle ilişkilidir (147). ErbB4 başlıca korteks, hipokampusteki GABA nöronlarında ifade edilir. ErbB4, GABAerjik nöron göçü ve farklılaşması için önemlidir (148). Bundan dolayı, sigara bağımlısı bireylerde ErbB4 genindeki genetik varyasyonların GABA seviyesini etkileyerek şizofreniye neden olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte Kao ve ark. (2010), şizofreni hastalarında yaptıkları çalışmada ise NRG3 rs6584400 ve rs1764072 polimorfizmleri ile şizofreni arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (105). Aynı gen polimorfizmlerinin yapılan bu tez çalışmasında, bağımlılıkla bir ilişkisi olmadığı görülmüştür. Bu bakımdan bu NRG3 rs6584400 ve rs1764072 polimorfizmlerine sahip sigara bağımlısı bireylerin şizofreniye genetik olarak daha yatkın olabileceği fikrini akla getirmektedir.

Sigaranın neden olduğu hastalıklardan biri kanserdir (52). Birkaç kanser tipinde özellikle meme, yumurtalık, gastrik, kolon, prostat, akciğer, mide, serviks, tiroid, bronş gibi karsinomlarda ErbB üyelerinin aşırı ekspresyonu görülmektedir (146,147). ErbB üyelerinin aşırı ekspresyonu metastaz ve nüks etme oranının yüksek olmasıyla ilişkilidir. GWAS çalışmalarıyla kromozom 2q34'te lokalize olan ErbB4 gen varyantlarının, Avrupa ve Çin popülasyonlarında meme kanseriyle ilişkili olduğu tanımlanmıştır (146). Buna ek olarak ErbB4 protein ve mRNA aşırı ekspresyonunun, insan akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırarak, akciğer kanseri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (148). Bu yüzden ErbB4 genindeki genetik varyasyonların, sigaranın neden olduğu kanser oluşum süreciyle ilişkili olabileceği ve anti-ErbB4 ilaçlarının tedavi sırasında yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız bu çalışma ile Türk popülasyonundaki sigara bağımlısı bireylerin ErbB4 rs7562566, rs1836724, rs10048757 ve NRG3 rs10883934, rs1764072, rs6584400 gen polimorfizmleri çalışılmış ve sigara bağımlılığı ile arasında bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Bunun farklı sebepleri olabilmektedir. İlk olarak çalışma kapsamına alınan birey sayısıdır. Bu çalışmada değerlendirilen örneklem genişliği daha da artırılarak, bu polimorfizmlere ait allel frekansı ve genotip dağılımları ile sigara bağımlılığı ile arasındaki ilişki farklılık gösterebilir.

NRG ailesinin bir üyesi olan ve nAChR alt birimlerinin ekspresyonunda görevli olan NRG1 ile reseptörünü kodlayan ErbB3 ve ErbB4 genleri üzerinde yer alan

polimorfizmlerin, ErbB4 reseptörüne bağlanan BTC, HB-EGF, EPR, NRG2, NRG4 ligandlarını kodlayan genler üzerindeki varyasyonların sigara bağımlılığı etyopatogenezini aydınlatmada yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın Türk toplumunda daha önce çalışılmamış olması nedeniyle, bağımlılığın etiyolojisini anlamada, literatüre katkı sağlayacağı ve yapılacak çalışmalar için yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çevresel, bireysel ve genetik faktörlerin etkisi altında gelişen sigara bağımlılığı populasyonun üçte birini etkileyen, ölümlerin ve hastalıkların başlıca nedeni olarak kabul edilen önemli bir sağlık sorunudur. Bu yüzden bu bağımlılığın etiyolojisini anlamak, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için yol gösterici olacaktır.

Bu tez çalışmasında kontrol grubu 200, vaka grubu da 200 bireyden oluşmaktadır. ErbB4 geninde bulunan *rs7562566*, *rs1836724*, *rs10048757* ve NRG3 geninde bulunan *rs10883934*, *rs1764072*, *rs6584400* gen polimorfizmlerinin sigara bağımlılığı ile ilişkisi araştırılmıştır. Vaka ve kontrol gruplarının genotip dağılımları incelendiğinde ErbB4 ve NRG3 genleri bakımından iki grubun da *Hardy-Weinberg* dengesinde olduğu, genotip dağılımlarının ise benzer olduğu gözlemlendi. Bu genlerde kontrol ve vaka grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Vaka ve kontrol gruplarının allel dağılımlarının da benzer olduğu tespit edildi.

Bu çalışma sonucunda Türk populasyonunda, sigara bağımlılığı ile ErbB4 ve NRG3 gen profilleri arasındaki farklılıklar ve benzerlikler ortaya konulmuştur. Türk toplumundaki bu çalışma sayesinde populasyonlar arası karşılaştırma çalışmalarında literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ErbB4 ve NRG3'e ait diğer polimorfizmlerin araştırılması, nikotin alımının ardından, nikotin yoksunluğu ve tedavi sırasında bu genlerin; ekspresyon çalışmalarıyla değerlendirilmesi ya da knock-out fare deneyleriyle ekspresyonlarının araştırılması, çalışma populasyonunun arttırılması, tüm gen bölgesi için SNP analizinin yapılması ve her iki gen için de olası ifadesel ve epigenetik değişimlerinin belirlenmesi sigara bağımlılığı etiyolojisindeki olası rolleri belirlemede yardımcı olacaktır.

Sigara bağımlılığı çoklu kalıtım gösterdiğinden tek bir genetik faktörden ziyade birden fazla lokus bağımlılığın etiyolojisinde yer aldığı için tüm genomu kapsayacak şekilde SNP belirlenmesi ya da sigara bağımlısı bireylerin tüm genomunun sekanslanması ile sigara bağımlılığı riski ile ilişkilendirilebilecek gen bölgeleri ortaya çıkarılabilir. Belirlenen bu gen bölgeleriyle ilişkili miRNA ekspresyon seviyeleri

belirlenebilir. Bu sayede gen ürünlerinin düzeyleri hakkında bilgi sahibi olunarak sigara bağımlılığının altında yatan genetik faktörlerin bulunması ile beraber farklı ilaç hedefleri ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Liu M, Fan R, Liu X, Cheng F, Wang J.** Pathways and networks-based analysis of candidate genes associated with nicotine addiction. *Plos One*, **2015**; 10(5):0127438.
2. **MacLeod SL, Chowdhury P.** The genetics of nicotine dependence: relationship to pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **2006**;12(46):7433-9.
3. **De Ruyck K, Nackaerts K, Beels L, Werbrouck J, Volder A, Meysman M, Salhi B, Van Meerbeeck J, Thierens H.** Genetic variation in three candidate genes and nicotine dependence, withdrawal and smoking cessation in hospitalized patients. *Pharmacogenomics*, **2010**;11(8): 1053-63.
4. **Loukola A, Wedenoja J, Keskitalo-Vuokko K, Broms U, Korhonen T, Ripatti S, Sarin AP, Pitkäniemi J, He L, Häppölä A, Heikkilä K, Chou YL, Pergadia ML, Heath AC, Montgomery GW, Martin NG, Madden PA, Kaprio J.** Genome wide association study on detailed profiles of smoking behaviour and nicotine dependence in a twin sample. *Molecular Psychiatry*, **2014**;19(5):615-24.
5. **Turner JR, Ray R, Lee B, Everett L, Xiang J, Jepson C, Kaestner KH, Lerman C, Blendy JA.** Evidence from mouse and man for a role of neuregulin 3 in nicotine dependence. *Molecular Psychiatry*, **2014**;19(7):801-10.
6. **Nestler EJ.** Molecular neurobiology of addiction. *The American Journal on Addictions*, **2001**;10(3): 201-217.
7. **Çoban A.** HTA Nöropsikiyatri. Erişim Adresi: <http://www.htanoropsikiyatri.com/bagimlilik-nedir/>. Erişim tarihi:27.08.2014.
8. **Nestler EJ.** Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, **2004**;47:24–32.
9. **Li CY, Mao X, Wei L.** Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *Plos Computational Biology*, **2008**;4(1): e2.
10. **Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, Horton WJ, Breslau N, Budde J, Cloninger CR, Dick DM, Foroud T, Hatsukami D, et al.** Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *The American journal of psychiatry*, **2008**; 165(9):1163-1171.
11. **Koob GF.** Neurobiology of Addiction. *The Journal Of Life Long Learning In Psychiatry*, **2008**; 3–16.
12. Erişim adresi: <http://bayder.com.tr/bagimlilik-turleri-nelerdir/> Erişim tarihi:24.05.2014.

13. **Ortells MO, Barrantes GE.** Tobacco addiction: a biochemical model of nicotine dependence. *Medical Hypotheses*, **2010**;74(5):884-94.
14. **Dani JA, Biasi MD.** Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **2001**; 70: 439–446.
15. **Changeux JP.** Nicotinic receptors and nicotine addiction. *Comptes rendus biologies*, **2009**; 332(5):421-425.
16. **Broms U.** Nicotine dependence and smoking behaviour a genetic and epidemiological study, Helsinki Üniversitesi, Helsinki, **2008**.
17. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health. Nicotine Replacement Therapy for Smoking Cessation or Reduction: A review of the clinical evidence. Erişim adresi: <https://www.cadth.ca/media/pdf/htis/feb2014/RC0514%20%20Smoking%20Cessation%20Update.pdf>. Erişim tarihi:18.02.2015.
18. **Koudsi NA.** CYP2A6 and CYP2B6: Sources of variation and their role in nicotine metabolism. Doktora tezi, Toronto Üniversitesi, Kanada, **2010**.
19. **Gençöz F, Gençöz T, Soykan A, Soykan Ç.** Sigara bağımlılığı ve tedavisi. 1. Baskı. ART Ofset Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti. **2003**.
20. **Berrettini WH, Lerman CE.** Pharmacotherapy and pharmacogenetics of nicotine Dependence. *The American Journal of Psychiatry*, **2005**;162:1441–1451.
21. **Little J, Cardy A, Munger RG.** Tobacco smoking and oral clefts: A meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, **2004**;82: 213-218.
22. **Bierut LJ.** Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence. *Neuron*, **2011**; 69(4):618–627.
23. World Health Organisation Media Center Tobacco Fact Sheet, Erişim Adresi: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>. Erişim Tarihi:21.02.2015.
24. CDC Global Tobacco Surveillance System Data Fact Sheets, 2012 Erişim adresi: <http://nccd.cdc.gov/gtssdata/Ancillary/Documentation.aspx?SUID=4&DOCT=1>. Erişim tarihi:20.02.2015.
25. **Giovino GA, Mirza SA, Samet JM, Gupta PC, Jarvis MJ, Bhala N, Peto R, Zatonski W, Hsia J, Morton J, Palipudi KM, Asma S; GATS Collaborative Group.** Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross sectional household surveys. *Lancet*, **2012**;380: 668-79

26. **Maserejian NN, Zavras AI.** Genetics of tobacco use. *Tobacco induced diseases*, **2004**; 2(2):1-22.
27. **Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P.** Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Nicotine psychopharmacology*, **2009**; (192):29–60.
28. Tobacco Surveillance System Data Fact Sheets Turkey 2012, Erişim adresi: http://global.tobaccofreekids.org/files/pdfs/en/GATS_factsheet_turkey_2012.pdf. Erişim Tarihi: 24.06.2015.
29. **Akvardar Y, Arıkan Z, Berkman K, Dilbaz N, Uluğ B, Uzbay T, Annette Akgür S, Bilici M, Tamar Gürol D, Mete L, Gürel ŞC, Zorlu N.** Sağlık Bakanlığı Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı, Pozitif Matbaa, **2012**.
30. **Foll BL, George TP.** Treatment of tobacco dependence: integrating recent progress into practice. *Canadian Medical Association Journal*, **2007**; 177(11):1373-80.
31. **Özerkmen N.** Ergenlerde sigara içme davranışını etkileyen faktörlerin sosyolojik analizi. *Sosyoloji Araştırmaları Dergisi/Journal of Sociological Research*, **2004**; 7(1):77-105.
32. **Den Exter Blokland EA, Engels RC, Hale WW, Meeus W, Willemsen MC.** (2004). Lifetime parental smoking history and cessation and early adolescent smoking behavior. *Preventive medicine*, **2004**; 38(3):359-368.
33. **Gilman SE, Rende R, Boergers J, Abrams DB, Buka SL, Clark MA, Colby SM, Hitsman B, Kazura AN, Lipsitt LP, Lloyd-Richardson EE, Rogers ML, Stanton CA, Stroud LR, Niaura RS.** Parental smoking and adolescent smoking initiation: an intergenerational perspective on tobacco control. *Pediatrics*, **2009**; 123(2):274-81.
34. **Yıldız D.** Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*, **2004**; 43:619–632.
35. **Kutlu R, Çivi S.** Seydişehir Meslek Yüksek Okulu Öğrencilerinde Sigara Kullanma Durumu ve Etkileyen Faktörler. *Bağımlılık Dergisi*, **2006**; 7(2):71-79.
36. **Myers MG.** Smoking Intervention With Adolescent Substance Abusers. *Journal of Substance Abuse Treatment*, **1999**; 16(4):289-98.
37. **Tweed JO, Hsia SH, Lutfy K, Friedman TC.** The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **2012**; 23(7):334-342.
38. **Kalaycıyan A, Serdaroğlu S.** Nikotin ve deri. *Dermatose*, **2005**; 4(3):127-133.

39. **Berridge KC, Robinson TE.** Parsing reward. *Trends in neurosciences*, **2003**; 26(9):507-513.
40. **Molas S, Dierssen M.** The role of nicotinic receptors in shaping and functioning of the glutamatergic system: A window into cognitive pathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **2014**; 46:315-325.
41. **Yang K, Jin G, WU J.** Mysterious $\alpha 6$ -containing nAChRs: Function, pharmacology and pathophysiology. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2009**; 30(6): 740-751.
42. **Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR.** Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Frontiers in Psychiatry*, **2013**; 30(4):29.
43. **Laviolette SR, Van Der Kooy D.** The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, **2004**;5(1):55-65.
44. **Balfour DJ, Wright AE, Benwell ME, Birrell CE.** The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence. *Behavioural Brain Research*, **2000**; 113(1):73-83.
45. **Sharples CG, Wonnacott S.** Neuronal nicotinic receptors. *Tocris Reviews*, **2001**;1-12.
46. **Berridge KC, Robinson TE.** What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*, **1998**; 28(3):309-369.
47. **Balfour DJ, Benwell ME, Birrell CE, Kelly J, Al-Aloul M.** Sensitization of the mesoaccumbens dopamine response to nicotine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **1998**; 59(4):1021-1030.
48. **Demir T.** Sigara Bağımlılığı. Türkiye’de sık karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar sempozyum dizisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, **2008**:231-238.
49. Sigara ve Etkileri, Erişim adresi:
<http://www.dicle.edu.tr/Contents/5f2b35bc-134c-4fcd-b627-d07ad6cb6269.pdf>. Erişim tarihi:
25.02.2015.
50. Erişim adresi: <http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP1600>. Erişim tarihi: 30.02.2015.
51. **Swan GE, Lessov-Schlaggar CN, Bierut LJ, Shields AE, Bergen AW, Vanyukov M.** Phenotypes and endophenotypes: Foundations for genetic studies of nicotine use and dependence. *Tobacco Control Monograph*, **2008**;19-21.
52. **Scollo MM, Winstanley MH.** Tobacco in Australia facts & issues, 4th Ed. Melbourne: Cancer Council Victoria, **2012**.
53. **Shin VY, Cho CH.** Nicotine and gastric cancer. *Alcohol*, **2005**; 35(3):259-264.
54. **Akbari MZA, Bhatti MS, Shakoore M.** Lipid profile in smoking. *Journal of Ayup Medical College*, **2000**;12(3):19-21.

55. Sütçü R, Doğuç D, Aktürk O, Altuntaş İ, Delibaş N. Subkronik nikotin uygulamasının, ratlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi. *SDÜ. Tıp Fakültesi Dergisi*, **2006**; 13:17-20.
56. Yıldız D, Ercal N, Armstrong DW. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology*, **1998**;130(2):155-65.
57. Trivedi AH, Dave BJ, Adhvaryu SG. Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test system. *Cancer Letters*, **1990**;54(1-2):89-94.
58. Chang GQ, Karatayev O, Barson JR, Liang SC, Leibowitz SF. Common effects of fat, ethanol, and nicotine on enkephalin in discrete areas of the brain. *Neuroscience*, **2014**; 30;277:665-678.
59. Sun B, Sterling CR, Tank AW. Chronic nicotine treatment leads to sustained stimulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate in rat adrenal medulla. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2003**;304(2):575-88.
60. Kapoor D, Jones TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *European Journal of Endocrinology*, **2005**;152:491–499.
61. Svartberg J, Jorde R. Endogenous testosterone levels and smoking in men. The fifth Tromso study. *International Journal of Andrology*, **2007**;30(3):137-43
62. Heusch WL, Maneckjee R. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis*, **1998**;19(4):551–556.
63. Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT. The genetic determinants of smoking. *Chest Journal*, **2003**;123(5):1730-1739.
64. Hall W, Madden P, Lynskey M. The genetics of tobacco use: Methods, findings and policy implications. *Tobacco Control*, **2002**;11(2):119-24.
65. Karakülah K, Şengül C, Şengül CB. Sigara bağımlılığının genetiği. *Current Approaches in Psychiatry*, **2014**; 6(3):284-293.
66. Sullivan PF, Kendle KS. The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine & Tobacco Research*, **1999**;1:51-57.
67. Gelernter J, Liu X, Hesselbrock V, Page GP, Goddard A, Zhang H. Results of a genomewide linkage scan: Support for chromosomes 9 and 11 loci increasing risk for cigarettesmoking. *American Journal of Medical Genetics Neuropsychiatry Genetics*, **2004**; 128(1):94-101.
68. Strasser AA, Malaiyandi V, Hoffmann E, Tyndale RF, Lerman C. An association of CYP2A6 genotype and smoking topography. *Nicotine & Tobacco Research*, **2007**;9(4):511-8.

69. **Tyndale RF, Sellers EM.** Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk. *Drug Metabolism Disposition*, **2001**; 29:548–552.
70. **Xu C, Goodz S, Sellers EM, Tyndale RF.** CYP2A6 genetic variation and potential consequences. *Advanced drug delivery reviews*, **2002**;54(10):1245-1256
71. **Herman AI, Devito EE, Jensen KP, Sofuoglu M.** Pharmacogenetics of nicotine addiction: Role of dopamine. *Pharmacogenomics*, **2014**;15(2): 221-234.
72. **Ohmoto M, Takahashi T, Kubota Y, Kobayashi S, Mitsumoto Y.** Genetic influence of dopamine receptor, dopamine transporter, and nicotine metabolism on smoking cessation and nicotine dependence in a Japanese population. *BMC genetics*, **2014**; 20:15-151.
73. **Ashare RL, Valdez JN, Ruparel K, Albelda B, Hopson RD, Keefe JR, Loughhead J, Lerman C.** Association of abstinence induced alterations in working memory function and COMT genotype in smokers. *Psychopharmacology*, **2013**;230(4):653-62.
74. **Amstadter AB, Nugent NR, Koenen KC, Ruggiero KJ, Acierno R, Galea S, Kilpatrick DG, Gelernter J.** Association between COMT, PTSD and increased smoking following hurricane exposure in an epidemiologic sample. *Psychiatry*, **2009**;72(4):360-9.
75. **Bierut LJ.** Nicotine dependence and genetic variation in the nicotinic receptors. *Drug and Alcohol Dependence*, **2009**;104:64–69.
76. **Bierut LJ, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau OF, Swan GE, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, et. al.** Novel genes identified in a high density genome wide association study for nicotine dependence. *Human Molecular Genetics*, **2007**;16(1):24-35.
77. **Buczowski K, Sieminska A, Linkowska K, Czachowski S, Przybylski G, Jassem E, Grzybowski T.** Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and several nicotine dependence traits in Polish population: a case-control study. *Biomed Research International*, **2015**;350348.
78. **Feng Y, Niu T, Xing H, Xu X, Chen C, Peng S, Wang L, Laird N, Xu X.** A common haplotype of the nicotine acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene is associated with vulnerability to nicotine addiction in men. *American Journal Human Genetics*, **2004**;75(1):112-21.
79. **Caporaso N, Gu F, Chatterjee N, Sheng-Chih J, Yu K, Yeager M, Chen C, et. al.** Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *Plos one*, **2009**; 4(2):4653.
80. **Ware JJ, Van den Bree M, Munafò MR.** From men to mice: CHRNA5/CHRNA3, smoking behavior and disease. *Nicotine Tobacco Research*, **2012**;14(11):129-9.

81. **Macqueen DA, Heckman BW, Blank MD, Janse Van Rensburg K, Park JY, Drobos DJ, Evans DE.** Variation in the $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor subunit gene predicts cigarette smoking intensity as a function of nicotine content. *Pharmacogenomics Journal*, **2014**;14(1):70-6.
82. **Maes HH, Neale MC, Chen X, Chen J, Prescott CA, Kendler KS.** A twin association study of nicotine dependence with markers in the CHRNA3 and CHRNA5 genes. *Behaviour Genetics*, **2011**;41(5):680-90.
83. **Mohamed Hoessein FA, Wauters E, Janssens W, Groen HJ, Smolonska J, Wijmenga C, Postma DS, Boezen HM, De Jong PA, Decramer M, Lammers JW, Lambrechts D, Zanen P.** Variants in the 15q24/25 locus associate with lung function decline in active smokers. *PLos One*, **2013**;8(1):53219.
84. **Li MD, Yoon D, Lee JY, Han BG, Niu T, Payne TJ, Ma JZ, Park T.** Associations of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster with smoking behaviours in a Korean Population. *Plos One*, **2010**;16:5-8.
85. **Yang J, Wang S, Yang Z, Hodgkinson CA, Iarikova P, Payne TJ, Goldman D, Li MD.** The contribution of rare and common variants in 30 genes to risk nicotine dependence. *Molecular Psychiatry*, **2014**;2:10.
86. **Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A.** The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocrine Related Cancer*, **2001**;8(3):151-9.
87. **Kurppa KJ.** Erbb4 mutations in cancer and amyotrophic lateral sclerosis. Doktora tezi, Turku Üniversitesi, Finlandiya, **2014**.
88. **Hollmen M.** Role of ErbB2 and ErbB4 in cancer growth, prognosis and as targets for immunotherapy. Turku Üniversitesi, Finlandiya, **2010**.
89. **Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS.** Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo and heterodimers. *Molecular Cell Biology*, **1999**;19(10):6845-57.
90. **Sweeney C, Carraway III KL.** Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene*, **2000**; 19:5568-5573.
91. **Yu Q, Zhou CX, Chen NS, Zheng SD, Shen LM, Zhang JK.** A polymorphism within ErbB4 is associated with risk for hepatocellular carcinoma in Chinese population. *World Journal Gastroenterology*, **2012**;18(4):383-7.
92. **Araújo A, Ribeiro R, Azevedo I, Coelho A, Soares M, Sousa B, Pinto D, Lopes C, Medeiros R, Scagliotti GV.** Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer-a review of the literature. *Oncologist*, **2007**;12(2):201-10.
93. Erişim adresi :https://www.humonc.wisc.edu/index.php/Wheeler_Lab Erişim tarihi: 01.06.2015

94. **Fiaturi N, Castellot JJ Jr, Nielsen HC.** Neuregulin-ErbB4 signaling in the developing lung alveolus: a brief review. *J Cell Commun Signal.* **2014**;8(2):105-11.
95. **Goes FS, Rongione M, Chen YC, Karchin R, Elhaik E.** Bipolar Genome Study, Potash JB. Exonic DNA sequencing of ERBB4 in bipolar disorder. *Plos One*, **2011**;6(5):20242.
96. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB4&search=20e03a6eb371dfc372711f36def3c42e>. Erişim tarihi: 28.05.2015.
97. **Iwakura Y, Nawa H.** ErbB1-4-dependent EGF/neuregulin signals and their cross talk in the central nervous system: pathological implications in schizophrenia and Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2013**;7:1-757.
98. **Rokavec M, Justenhoven C, Schroth W, Istrate MA, Haas S, Fischer HP, Vollmert C, Illig T, Hamann U, Ko YD, Glavac D, Brauch H.** A novel polymorphism in the promoter region of ERBB4 is associated with breast and colorectal cancer risk. *Clinical Cancer Research*, **2007**;13(24):7506-14.
99. **Falls DL.** Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental Cell Research*, **2003**;284:14–30
100. **Mei L, Nave KA.** Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron*, **2014**;83(1):27-49.
101. **Kogata N, Zvelebil M, Howard BA.** Neuregulin 3 and ErbB signalling networks in embryonic mammary gland development. *Journal Mammary Gland Biology Neoplasia*, **2013**;18(2):149-54.
102. **Buonanno A, Fischbach GD.** Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, **2001**;11(3): 287-296.
103. **Zhu X, Lai C, Thomas S, Burden SJ.** Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. *The EMBO Journal*, **1995**; 14(23):5842.
104. **Tiao JYH.** The Neuregulin-3 Intracellular Domain is Biologically Active: Molecular and Functional Characterization of Protein Interactions. Doktora tezi, Batı Avustralya Üniversitesi, Avustralya, **2005**.
105. **Kao WT, Wang Y, Kleinman JE, Lipska BK, Hyde TM, Weinberger DR, Law AJ.** Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA*, **2010**;107(35):15619-24.
106. **Pasaje CF, Bae JS, Park BL, Cheong HS, Kim JH, Park TJ, Lee JS, Kim Y, Park CS, Kim BJ, Cha B, Kim JW, Choi WH, Shin TM, Choi IG, Hwang J, Shin HD, Woo SI.** Neuregulin 3 does not confer risk for schizophrenia and smooth pursuit eye movement abnormality in a Korean population. *Genes Brain Behaviour*, **2011**;10(8):828-33.
107. Erişim adresi: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=nrg3>. Erişim tarihi: 04.03.2015.

108. **Mencel M, Nash M, Jacobson C.** Neuregulin upregulates microglial $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor expression in immortalized cell lines: Implications for regulating neuroinflammation. *Plos One*, **2013**;8(7):70338.
109. **Tanowitz M, Si J, Yu DH, Feng GS, Mei L.** Regulation of neuregulin-mediated acetylcholine receptor synthesis by protein tyrosine phosphatase SHP2. *Journal Science*, **1999**;19(21):9426-35.
110. **Uysal MA, Kadakal F, Karşıdağ Ç, Bayram NG, Uysal Ö, Yılmaz V.** Fagerstrom test for nicotine dependence: Reliability in a Turkish Sample and factor Analysis. Toraks Derneği 6. Kongresi, Antalya, **2003**.
111. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **1988**;16(3):1215.
112. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Erişim tarihi: 12.05.2015
113. Erişim adresi: <http://www.lifetechnologies.com/order/genomelibrary/browse/genotyping/keyword/rs1836724?ICID=uc-snp-rs1836724>. Erişim tarihi: 12.05.2015
114. **Horimoto AR, Oliveira CM, Giolo SR, Soler JP, de Andrade M, Krieger JE, Pereira AC.** Genetic analyses of smoking initiation, persistence, quantity and age-at-onset of regular cigarette use in Brazilian families: The Baependi Heart Study. *BMC Medical Genetic*, **2012**; 30:1471-2350.
115. **Lessov-Schlaggar CN, Pergadia ML, Khroyan TV, Swan GE.** Genetics of nicotine dependence and pharmacotherapy. *Biochemical pharmacology*, **2008**;75(1):178-195.
116. **Gold AB, Lerman C.** Pharmacogenetics of smoking cessation: role of nicotine target and metabolism genes. *Human Genetic*, **2012**;131(6):857-876.
117. **Wong HP, Yu L, Lam EK, Tai EK, Wu WK, Cho CH.** Nicotine promotes cell proliferation via $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicology Applied Pharmacology*, **2007**;221(3):261-7.
118. **O'Loughlin J, Sylvestre MP, Labbe A, Low NC, Roy-Gagnon MH, Dugas EN, Karp I, Engert JC.** Genetic variants and early cigarette smoking and nicotine dependence phenotypes in adolescents. *Plos One*. **2014**;9(12):115716.
119. **Lerer E, Kanyas K, Karni O, Ebstein RP, Lerer B.** Why do young women smoke? II. Role of traumatic life experience, psychological characteristics and serotonergic genes. *Molecular Psychiatry*, **2006**;11(8):771-81.
120. **Huang CL, Ou WC, Chen PL, Liu CN, Chen MC, Lu CC, Chen YC, Lin MH, Huang CS.** Effects of interaction between Dopamine D2 Receptor and Monoamine Oxidase A genes on smoking status in young men. *Biological Research For Nursing*, **2015**;17(4):422-8.

121. **Berlin I, Anthenelli RM.** Monoamine oxidases and tobacco smoking. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **2001**; 4(1):32-42.
122. **Beuten J, Ma JZ, Lou XY, Payne TJ, Li MD.** Association analysis of the protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B (PPP1R1B) gene with nicotine dependence in European and African-American smokers. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatry Genetics*, **2007**;144(3):285-90.
123. **Dos Santos VA, Chatkin JM, Bau CH, Paixão-Côrtes VR, Sun Y, Zamel N, Siminovitch K.** Glutamate and synaptic plasticity systems and smoking behavior: results from a genetic association study. *Plos One*. **2012**;7(6):38666.
124. **Novak G, Leblanc M, Zai C, Shaikh S, Renou J, Deluca V, Bulgin N, Kennedy JL, Le Foll B.** Association of polymorphism in the BDNF, DRD1 and DRD3 genes with tobacco smoking in schizophrenia. *Annals of Human Genetics*, **2010**;74(4):291-8.
125. **Schwab SG, Franke PE, Hoefgen B, Guttenthaler V, Lichtermann D, Trixler M, Knapp M, Maier W, Wildenauer DB.** Association of DNA polymorphisms in the synaptic vesicular amine transporter gene (SLC18A2) with alcohol and nicotine dependence. *Neuropsychopharmacology*, **2005**;30(12):2263-8.
126. **Laucht M, Becker K, Frank J, Schmidt MH, Esser G, Treutlein J, Skowronek MH, Schumann G.** Genetic variation in dopamine pathways differentially associated with smoking progression in adolescence. *Journal of the American Academy of Child Adolescent Psychiatry*, **2008**;47(6):673-81.
127. **Reuter M, Hennig J, Amelang M, Montag C, Korkut T, Hueweler A, Stürmer T.** The role of the TPH1 and TPH2 genes for nicotine dependence: A genetic association study in two different age cohorts. *Neuropsychobiology*. **2007**;56(1):47-54.
128. **Yang Z, Seneviratne C, Wang S, Ma JZ, Payne TJ, Wang J, Li MD.** Serotonin transporter and receptor genes significantly impact nicotine dependence through genetic interactions in both European American and African American smokers. *Drug Alcohol Dependence*, **2013**;129(3):217-25.
120. **Vink JM, Smit AB, de Geus EJ, Sullivan P, Willemsen G, Hottenga J J, et.al.** Genome-wide association study of smoking initiation and current smoking. *The American Journal of Human Genetics*, **2009**; 84(3):367-379.
130. **Misailidis G, Ragia G, Ivanova DD, Tavridou A, Manolopoulos VG.** Gene-gene interaction of μ -opioid receptor and GluR5 kainate receptor subunit is associated with smoking behavior in a Greek population: presence of a dose allele effect. *Drug metabolism and personalized therapy*, **2015**; 30(2):129-35.
131. **Xu Q, Huang W, Payne TJ, Ma JZ, Li MD.** Detection of genetic association and a functional polymorphism of dynamin 1 gene with nicotine dependence in European and African Americans. *Neuropsychopharmacology*. **2009**;34(5):1351-9.

132. Agrawal A, Pergadia ML, Saccone SF, Hinrichs AL, Lesov-Schlaggar CN, Saccone NL, Neuman RJ, Breslau N, Johnson E, Hatsukami D, Montgomery GW, Heath AC, Martin NG, Goate AM, Rice JP, Bierut LJ, Madden PA. Gamma-aminobutyric acid receptor genes and nicotine dependence: evidence for association from a case-control study. *Addiction*, **2008**;103(6), 1027-1038.
133. Lou XY, Ma JZ, Sun D, Payne TJ, Li MD. Fine mapping of a linkage region on chromosome 17p13 reveals that GABARAP and DLG4 are associated with vulnerability to nicotine dependence in European-Americans. *Human molecular genetics*, **2007**;16(2): 142-153.
134. Lou XY, Ma JZ, Payne TJ, Beuten J, Crew KM, Li MD. Gene-based analysis suggests association of the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit (CHRN1) and M1 muscarinic acetylcholine receptor (CHRM1) with vulnerability for nicotine dependence. *Human genetics*, **2006**; 120(3): 381-389.
135. Greenbaum L, Lerer B. Differential contribution of genetic variation in multiple brain nicotinic cholinergic receptors to nicotine dependence: recent progress and emerging open questions. *Molecular psychiatry*, **2009**;14(10): 912-945.
136. Wei J, Chu C, Wang Y, Yang Y, Wang Q, Li T, Zhang L, Ma X. Association study of 45 candidate genes in nicotine dependence in Han Chinese. *Addict Behav*. **2012**; 37(5):622-6.
137. Johnson EO, Chen LS, Breslau N, Hatsukami D, Robbins T, Saccone NL, Gruzca RA, Bierut LJ. Peer smoking and the nicotinic receptor genes: an examination of genetic and environmental risks for nicotine dependence. *Addiction*, **2010**;105(11):2014-2022.
138. Prestes AP, Marques FZ, Hutz MH, Roman T, Bau CH. Tobacco smoking and the ADRA2A C-1291G polymorphism. *Journal of Neural Transmission*, **2007**;114(11):1503-6.
139. Mobascher A, Rujescu D, Mittelstrass K, Giegling I, Lamina C, Nitz B, Brenner H, Fehr C, Breitling LP, Gallinat J, Rothenbacher D, Raum E, Müller H, Ruppert A, Hartmann AM, Möller HJ, Gal A, Gieger Ch, Wichmann HE, Illig T, Dahmen N, Winterer G. Association of a variant in the muscarinic acetylcholine receptor 2 gene (CHRM2) with nicotine addiction. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatry Genetics*, **2010**; 153(2): 684-90.
140. Chen X, Williamson VS, An SS, Hettema JM, Aggen SH, Neale MC, Kendler KS. Cannabinoid receptor 1 gene association with nicotine dependence. *Arch Gen Psychiatry*, **2008**; 65(7): 816-24.
141. Ray R, Jepsen C, Wileyto P, Patterson F, Strasser AA, Rukstalis M, Perkins K, Blendy J, Lerman C. CREB1 haplotypes and the relative reinforcing value of nicotine. *Molecular Psychiatry*, **2007**;12: 615-617.
142. Li MD, Mangold JE, Seneviratne C, Chen GB, Ma JZ, Lou XY, Payne TJ. Association and interaction analyses of GABBR1 and GABBR2 with nicotine dependence in European- and African-American populations. *Plos One*. **2009**;4(9):7055.
143. Stassen HH, Bridler R, Hägele S, Hergersberg M, Mehmman B, Schinzel A, Weisbrod M, Scharfetter C. Schizophrenia and smoking: evidence for a common neurobiological basis? *American Journal Medical Genetics*, **2000**;96(2):173-7.

144. **Del Pino I, García-Frigola C, Dehorter N, Brotons-Mas JR, Alvarez-Salvado E, De Lagrán MM, Ciceri G, Gabaldon MV, Moratal D, Dierssen M, Canals S, MARin O, Rico B.** Erbb4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron*, **2013**;79(6): 1152-1168.
145. **Bean JC, Lin TW, Sathyamurthy A, Liu F, Yin DM, Xiong WC, Mei L** Genetic labeling reveals novel cellular targets of schizophrenia susceptibility gene: distribution of GABA and non-GABA ErbB4-positive cells in adult mouse brain. *Journal Neuroscience*. **2014**; 34(40):13549-66.
146. **Alaoui-Jamali MA, Morand GB, da Silva SD.** ErbB polymorphisms: insights and implications for response to targeted cancer therapeutics. *Frontiers in Genetics*, **2015**; 4(6):17.
147. **Starr A, Greif J, Vexler A, Ashkenazy-Voghera M, Gladesh V, Rubin C, Kerber G, Marmor S, Lev-Ari S, Inbar M, Yarden Y, Ben-Yosef R.** ErbB4 increases the proliferation potential of human lung cancer cells and its blockage can be used as a target for anti-cancer therapy. *International journal of cancer*, **2006**;119(2), 269-274.
148. **Sasaki H, Okuda K, Kawano O, Endo K, Yukiue H, Yokoyama T, Yano M, Fujii Y.** ErbB4 expression and mutation in Japanese patients with lung cancer. *Clinical lung cancer*, **2007**; 8(7): 429-433.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Burdur'un Kemer ilçesinde doğdu. İlkokul ve ortaokul eğitimini Burdur Cumhuriyet İlköğretim Okulunda ve lise eğitimini ise Burdur Lisesinde tamamladı. 2011 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2013 yılında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında araştırma görevlisi olarak atandı. 2013 bahar döneminde lisansüstü eğitim için, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine ve görevine devam etmektedir.