



T.C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESRAR BAĞIMLILARINDA NÖROPEPTİD Y (NPY) GENİ
ANALİZİ**

Fusun TUŞGÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Gaziantep
2011



T.C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ESRAR BAĞIMLILARINDA NÖROPEPTİD Y (NPY) GENİ
ANALİZİ**

Fusun TUŞGÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Gaziantep
2011

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ENSTİTÜ ANABİLİM DALI

ESRAR BAĞIMLILARINDA NÖROPEPTİD Y (NPY) GENİ ANALİZİ
Fusun TUŞGÜL

Tez Savunma Tarihi: 12.01.2011

Sağlık Bilimleri Enstitü Onayı

Prof. Dr. Cahit BAĞCI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr.Sibel OĞUZKAN BALCI

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

.....

Doç. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

.....

Doç. Dr. Abdurrahman ALTINDAĞ

.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

12.01.2011

Fusun TUŞGÜL

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım sırasında bilimsel katkılarıyla desteğini, sabrını ve zamanını esirgemeyen sevgili hocam ve tez danıőmanım Doç. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI'ya sonsuz teőekkürler. Eğitim sürecimde deneyimlerini ve bilgi birikimlerini esirgemeyen başta Prof. Dr. Ahmet ARSLAN olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Hayatımın her aőamasında tüm zorluklara katlanarak emek harcayan, sevgi ve hoőgörülerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, eőime ve canım kızım YAĖMUR'a sonsuz teőekkürler.

FÜSUN TUŞGÜL

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
KISALTMALAR VE SİMGELER	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Madde Bağımlılığı	6
2.1.1. Esrar Bağımlılığı.....	7
2.1.2. Kannabinoidler.....	7
2.1.3. Kannabinoidin Etkileri.....	8
2.2. Bağımlılık Genetiği	8
2.3. Nöropeptid Y (NPY) Geni	9
2.3.1. NPY Gen Yapısı ve Peptid Sentezi.....	9
2.3.2. NPY Geninde Görülen Nükleotid Değişimleri	11
2.4. Nöropeptid Y (NPY)	13
2.4.1. NPY'nin Katıldığı Ana Sinyal Yolakları.....	14
2.4.2. Hipotalamusta NPY Sistemini Düzenleyen Majör Yolak	14
2.4.1. Nöropeptid Y Reseptörleri.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gönüllülerin Özellikleri	17

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Solüsyonlar.....	17
3.2.1. DNA İzolasyonu	17
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu.....	18
3.2.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesimi	18
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	18
3.3. Yöntemler	19
3.3.1. DNA İzolasyonu	19
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	19
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	21
3.3.3.1. %1.5'lük Agaroz Jelin Hazırlanması	21
3.3.4. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Analizi	21
3.4. Verilerin İstatistiksel Analizi	22
4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	38

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.4. NPY reseptörleri ve fizyolojik rolleri.....	16
Tablo 3.1. Bireylere ait bilgiler.....	17
Tablo 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği.....	20
Tablo 3.3. PCR koşulları.....	20
Tablo 3.4. BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim protokolü.....	22
Tablo 3.5. NPY geni T1128C nükleotid değişimine özgül BsiEI restriksiyon endonükleaz enzim kesim koşulları	22
Tablo 4.1. Esrar bağımlıları ve kontrol grubu arasında T1128C nükleotid değişiminin genotip dağılımı ve allel sıklıkları	24
Tablo 4.2. T1128C nükleotid değişimi için Hardy-Weinberg dengesine göre x^2 ve p değerleri	25
Tablo 4.3. Farklı ülkelerde NPY geni T1128C nükleotid değişiminin..... genotip dağılımı ve C allel sıklıkları ile bağımsız iki oran karşılaştırma testi P değerleri	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kannabisin dört ayrı ürününün kimyasal yapıları	8
Şekil 2.2. NPY geni ve protein işlenmesi	11
Şekil 2.3. T1128C nükleotid değişiminin NPY genindeki yerleşimi	12
Şekil 2.4.1. NPY'nin katıldığı ana sinyal yolları	14
Şekil 2.4.2. Hipotalamusta NPY sistemini düzenleyen majör yolak	15
Şekil 4.1. NPY geni T1128C bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonrasında	23
agaroz jeldeki görüntüleri	
Şekil 4.2. NPY geni T1128C nükleotid değişiminin BsiEI enzimi	24
ile reaksiyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü	

KISALTMALAR VE SİMGELER

$\Delta 9$ -THC	Delta 9 tetrahidrokannabinol
$\Delta 8$ -THC	Delta 8 tetrahidrokannabinol
DSM-IV	Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV
NPY	Nöropeptid Y
WHO	Dünya sağlık örgütü
MKB	Madde kullanım bozukluğu
CPON	C-terminal peptid
ARC	Arkut nükleus
PVN	Paraventriküler nükleus
DMN	Dorsamedial nükleus
GABA	γ -Amino butirik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
AC	Adenil siklaz
ROCC	Reseptörle düzenlenen kalsiyum kanalı
PLC	Fosfalipaz C
PIP2	Fosfatidil inositol difosfat
IP3	İnositol tri fosfat
DAG	Diaçil gliserol
CRF	Kortikotropin salınma faktörü
cAMP	Siklik adenozin monofosfat

ÖZET

ESRAR BAĞIMLILARINDA NÖROPEPTİD Y (NPY) GENİ ANALİZİ

Fusun TUŞGÜL

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanı: Doç.Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

OCAK 2011- 38 Sayfa

Madde bağımlılığı çevresel ve genetik faktörlere bağlı olarak gelişen kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu maddelerden biri olan esrar en sık kullanılan yasadışı maddedir. Araştırmamıza konu olan nöropeptid Y molekülü (NPY) 36 amino asitten oluşan bir nörotransmitterdir ve birçok fizyolojik olayın kontrolünde görev almaktadır. Bu araştırmada NPY geninde amino asit değişikliğine neden olan T1128C nükleotid değişiminin esrar bağımlılığına yatkınlıktaki rolünün ve bu nükleotid değişiminin Türkiye’de sağlıklı bireylerde genotip dağılımı ve allel sıklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda planlanmış olan çalışmada 139 esrar bağımlısı ve sağlıklı 100 bireyde NPY geni T1128C nükleotid değişimi polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. NPY geni T1128C nükleotid değişiminin genotip dağılımları ve allel sıklıkları esrar bağımlılarında % 95, % 5 ve % 0; T=0.975, C=0.025, kontrol grubunda % 95, % 5 ve % 0; T=0.975, C=0.025 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarda esrar bağımlılarında sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır (p>0.05). Hardy-Weinberg dengesine (HWE) göre genotip dağılımı ve allel sıklığının beklenen değeri ile gözlenen değerler arasında farklılık olmadığı belirlenmiştir (HWE esrar bağımlısı p=760, HWE kontrol p=0.797). Sağlıklı kontrol bireylerinin allel sıklıkları diğer toplumlarla karşılaştırıldığında ise; Çin, Almanya, Brezilya, İsveç, Finlandiya, Amerika’da yaşayan Avrupalı ve Afrikalı toplumlar ile uyumlu olduğu (p>0.05), buna karşın Japonya ile benzerlik göstermediği saptanmıştır (p=0.022). Sonuç olarak; bu çalışmada esrar bağımlılığına yatkınlıkta NPY geni T1128C nükleotid değişiminin etkisinin olmadığı saptanmıştır. Bu durumda NPY geni reseptörlerinin etkisinin araştırılması gerektiği ve ayrıca bağımlılık genetiğinde diğer moleküllere yönelmek bakımından sonraki araştırmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Esrar bağımlılığı, Nöropeptid Y, T1128C nükleotid değişimi

ABSTRACT

ANALYSIS OF NEUROPEPTIDE Y (NPY) GENE IN CANNABIS USERS

Fusun TUŞGÜL

Master of Thesis, Department of Medical Biology

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

JANUARY 2011- 38 Pages

Substance addiction is a kind of complex and multifactorial disease that develops based on environmental and genetic factors. Cannabis that is the most frequently used illegal substance. Neuropeptide Y (NPY), which is subject to our research interest, is a neurotransmitter, consists of 36 amino acid and regulates many physiologic events. The role of T1128C polymorphism that causes amino acid change at NPY gene at the cannabis users and healthy individuals in Turkey and determining genotype distribution and allele frequency have been aimed in this research. At the planned studies obtained from peripheral blood, NPY gene T1128C polymorphism of DNAs were analyzed in 139 cannabis users and 100 healthy individuals by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) procedures. Genotype distribution and allele frequency of T1128C polymorphism were found as 95%, 5 % and 0%; T=0.975, C=0.025 at the cannabis users group and 95%, 5 % and 0%; T=0.975, C=0.025 at the control group respectively. It has been determined that there is no statically significant difference between the cannabis users than healthy control group ($p>0.05$). It has been also found that there is no difference between expected and observed genotype distribution and allele frequency according to Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) (HWE cannabis addict $p=760$, HWE control $p=0.797$). When the allele frequency of healthy people is compared with other populations; it has been determined that it is coherent with European American, African American, China, Germany, Brazil, Sweden and Finland ($p>0.05$). On the contrary, the results obtained were of different than the Japanese population ($p=0.022$).

In conclusion, NPY gene T1128C polymorphism did not reveal any relationship with the cannabis addiction. It may, there fore, be useful for considering to study NPY gene receptors and/or other related genes for elucidating the genomic basis of addiction.

Key Words: Cannabis addiction, Neuropeptide Y, T1128C polymorphism

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Madde bağımlılığı çevresel ve genetik faktörlere bağlı olarak gelişen kompleks ve multifaktöriyel bir hastalıktır (1). Bu maddelerden biri olan esrar ($\Delta 9$ -tetrahidrokannabinol, $\Delta 9$ -THC), adölesanlar ve genç yetişkinler tarafından en sık kullanılan yasadışı maddedir (2). Esrarın kötüye kullanım sıklığı sigara, kafein ve alkolden hemen sonra gelir (3).

Madde bağımlılığına kalıtımın etkisini ortaya koyan genetik araştırmalar bulunmaktadır. Bu çalışma sonuçları, bağımlılığı olan kişilerin akrabalarında bağımlılığın genel topluma kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir (4). Genetik riski oluşturan, organizmanın biyolojik özelliklerini etkileyen genlerdir. Bu özellikler özgül maddelerin metabolize edilmesi ile (farmakokinetik) ya da bir maddeye karşı vücudun cevabı (farmakodinamik) ile ilgilidir. Bu olaylar merkezi sinir sisteminde (MSS) ve periferik sinir sisteminde (PNS) olmaktadır (5). Bağımlılıkta genetiğin etkisi kompleks olup, genel birkaç konuya dikkat edilmesi gerekmektedir. Birinci olarak, fenotipin iyi tanımlanması gerekir. Tanı için; DSM-IV içinde yer alan 7 fizyolojik ve davranışsal kriter belirlenmiştir. İkinci olarak, bir genin tek başına etkisinden çok birden fazla genin etkisinin olabileceği dikkate alınmalıdır. Üçüncü dikkat edilmesi gereken konu ise bağımlılığın yalnızca genetik etkilerle açıklanamayacağı, gen-çevre etkileşiminin değerlendirilmesi gerektiğidir. Son olarak, bağımlı kişinin birden fazla maddeye bağımlılığının olması da değerlendirilmesi gereken önemli bir konudur (6).

Araştırmamıza konu olan NPY geni 7. kromozomun p kolunda 15.1 bölgesinde yerleşik olup, 4 ekzondan oluşur ve 36 amino asitlik bir peptid sentezler. NPY memeli sinir sisteminde yaygın olarak sentezlenir ve pleiotropik etkisinden dolayı beslenme, biyolojik ritim, nöroendokrin mekanizma, bilişsel fonksiyon, üreme ve kardiyovasküler fonksiyon gibi bir çok fizyolojik olayda etkisi bulunmaktadır (7). Son yıllarda yapılan çalışmalarda etanol ve çeşitli ilaçlara nörobiyolojik cevapta rolünün olduğu ortaya konmuştur (8). NPY molekülü türler arasında oldukça korunmuştur bu da fizyolojik olaylardaki önemini ortaya koymaktadır (7). Korunmuş bir peptid molekülündeki varyasyonlar önemli fonksiyon değişikliklerine yol açabileceğinden çalışılmasının anlamlı olacağı düşünülmüştür.

Bu çalışmada esrar bağımlısı bireylerde nöropeptid Y geninde amino asit değişikliğine neden olan T1128C nükleotid değişimi analiz edilmiştir. Genetik ve farmakolojik çalışmaların ortaya koyduğuna göre NPY sinyali sedatif etkili çeşitli maddelerin etkisini değiştirmektedir (9). NPY geninde daha önce yapılan çalışmalarda, bu gendeki çeşitli nükleotid değişimlerinin alkol ve kötüye kullanılan ilaçlara karşı nörobiyolojik tepkilerle pozitif ilişkili olduğu bulunmuştur (10,11,12,13). Bir başka çalışmada İskandinav toplumunda alkol bağımlılığı ile NPY geni arasındaki ilişki ortaya konmuştur (14). NPY düzenlemede önemli bir faktör olup, stres halinde stres ile ilişkili davranışlarla bağlantılı olarak beyinde salınmaktadır. Yapılan hayvan deneylerinde stres sonucunda gelişen anksiyete benzeri davranışlara savunma olarak NPY sentezinde artış olduğu gösterilmiştir. Yine başka bir çalışmada NPY geni çıkarılmış farelerde anksiyete benzeri fenotipin geliştiği saptanmıştır (9). Bağımlılık yapıcı madde kullanımının depresyon bulgusu olan (15,16) ve antisosyal kişilik yapısına sahip olanlarda daha yaygın olduğu gösterilmiştir (17). Esrar bağımlılığına yatkınlıkta NPY geninin analiz edilmesinin bu noktada önemli olduğunu düşünülerek bu araştırma planlanmıştır.

Literatürde esrar bağımlılığı ve nöropeptid Y molekülü arasındaki olası ilişkileri ele alan bir çalışma bulunmamaktadır. Nöropeptid Y molekülünde amino asit değişimi ile sonuçlanan tek nükleotid değişiminin madde bağımlılarında analiz edilmesini amaçlayan araştırmamızda bu nörotransmitterin esrar bağımlılığına yatkınlığı etkileyip etkilemediği incelenerek, aynı zamanda sağlıklı populasyondaki allel ve genotip frekansları belirlenmiştir. Türkiye’de T1128C nükleotid değişiminin allel ve genotip frekansları bilgilerimiz dahilinde ne sağlıklı populasyonda, ne de hastalıklarla olan ilişkisi açısından henüz çalışılmamıştır. Bu anlamda da literatürdeki ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır.

Bu doğrultuda planlanmış olan araştırmamızda esrar bağımlısı 139 gönüllü ve sağlıklı 100 gönüllü bireyde NPY geni T1128C nükleotid değişimi analiz edilmiş ve sonuçta sağlıklı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Sağlıklı bireylerin sonuçları diğer toplumlarda yapılmış olan sonuçlarla karşılaştırıldığında Japonya ve Kore’den farklı, Amerika’da yaşayan Avrupalı ve Afrikalılar, Çin, Almanya, Brezilya, İsveç ve Finlandiya ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Esrar bağımlılarında bulunmuş olan bu sonuç; sonraki çalışmamızda NPY geni reseptörlerinin analiz edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Ayrıca kompleks

kalıtmalı olan bağımlı genetiğinde diğerk moleküllere yönelmek bakımından sonraki araştırmalara ışık tutabileceği sonucuna varılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Madde Bağımlılığı

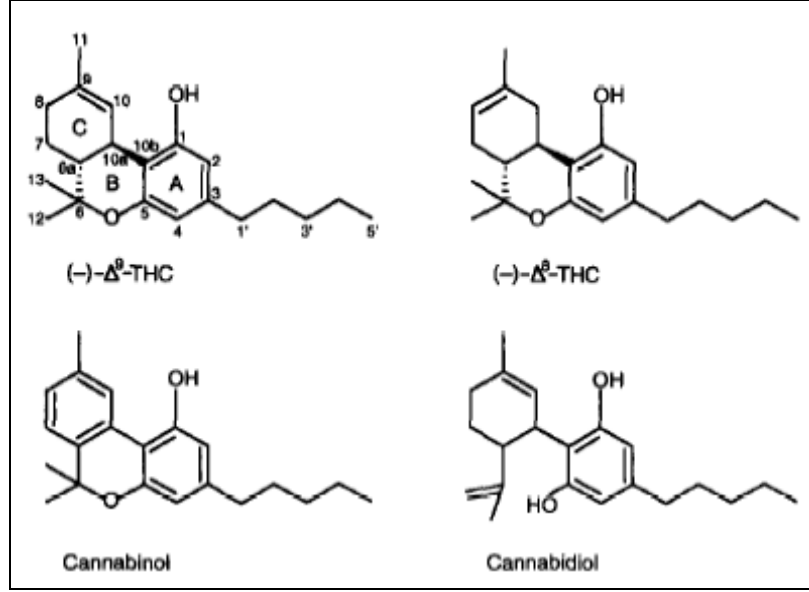
Madde bağımlılığı “santral sinir sistemini etkileyen ilaç niteliğine sahip bir maddenin keyif verici etkilerini duyumsamak veya yokluğundan kaynaklanabilecek huzursuzluktan sakınmak için, maddeyi devamlı ya da periyodik olarak alma arzusu ile kendisini gösteren psişik ve somatik bir sendrom” olarak tanımlanmaktadır (18,19). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bağımlılığı, psikotrop bir madde ile merkezi sinir sistemi arasındaki etkileşmeden doğan ve keyif oluşturuocu etkiyi sağlamak veya yoksunluğun vereceği huzursuzluktan sakınmak için devamlı veya aralıklı olarak bir maddenin alındığı, psişik ve bazen de fiziksel nitelikli bir durum olarak tanımlamaktadır. Bu tanımda, psikotrop madde kapsamına başta morfin ve diğer opioidler olmak üzere, barbitüratlar, benzodiazepinler ve benzeri ilaçlar ile kokain, alkol, nikotin ve esrar gibi farmakolojik etkinliği olan maddeler girmektedir. Bağımlılık yapma etkisi olan maddeler merkezi sinir sisteminde belirgin uyarı veya depresyon yaratarak algılama, duygu, mental durum, davranış ve motor fonksiyonlarında bozukluğa neden olmaktadır (18). Bağımlılığın tipik özellikleri; maddeyi arayışı ve kullanımı için güçlü bir istek, maddenin kontrolsüz şekilde kullanımı ve maddeye ulaşım engellendiğinde negatif duygusal durumların (disfori, anksiyete, çabuk öfkelenme) ortaya çıkması olarak sıralanabilir (20,21,22). Madde bağımlılığı veya madde kullanım bozukluğu (MKB) terimleri genellikle aynı anlamda kullanılmaktadır (21). Amerika’da 1980’li yıllarda yapılan bir çalışma sonucunda yaşam boyu madde bağımlılığının, alkol hariç, prevalansı % 6.1 olarak bildirilmiştir (23). Aynı çalışmada yaşam boyu bağımlılık esrar için % 4.4, uyarıcılar için % 1.7, sedatifler için % 1.2 ve opioidler için % 0.7 olarak bildirilmiştir. Yine 1990’lı yıllarda yapılan diğer bir araştırmada; çalışmaya katılan gönüllülerin % 7.5’i yaşamlarının bir döneminde, % 1.8’i ise son 12 ayda madde bağımlısı olduklarını beyan etmişlerdir. Erkeklerde bağımlılık oranı belirgin şekilde hem yaşam boyu hem de son bir yıllık dönemde daha yüksek bulunmuştur (23,15).

2.1.1. Esrar Bağımlılığı

Esrar (kannabis, marijuana) bağımlılık yapıcı özelliği olan ve dünyada en yaygın kötüye kullanılan yasadışı maddedir (86). Farklı toplumlarda yapılmış olan epidemiyolojik çalışma sonuçlarına göre genel toplumda yaşam boyunca en az bir kez esrar kullanımı % 12'dir, Türkiye'de ise % 1.2-4 olarak bildirilmiştir (24). Esrar, psikotrop ve keyif verici etkisini, % 0.5– 5 oranında içerdiği, yağda erirliği yüksek Δ 9-tetrahidrokannabinol (Δ 9-THC, kannabinoid) ile ortaya çıkarır (3).

2.1.2. Kannabinoidler

Kenevir bitkisi 'Cannabis sativa'; yaklaşık 4000 yıldır bilinci değiştirici etkilerine bağlı olarak rahatlatıcı amaçla kullanılan bir bitkidir. Kannabinoidlerin ortak ismi esrar (marijuhana) bugün dünya çapında sokak ilacı olarak en çok kullanılan maddedir (25). En çok bilinen ve en fazla miktarda elde edilen kannabinoidler Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), Δ 8-tetrahydrocannabinol, (Δ 8-THC), cannabiol ve cannabidiol'dur (Şekil 2.1) (26). Esrarın pekiştirici etkilerden sorumlu olan esas madde ise Δ 9-tetrahidrokannabinol (Δ 9-THC)'dur (3). Lipofilik bir molekül olan Δ 9-THC, bu özelliği ile kan-beyin bariyerini kolayca geçerek özgül membran reseptörleri aracılığı ile santral etkilerin oluşmasını sağlar. Canlı sistemde Δ 9-THC hızlı bir şekilde emilir, akciğerde ve karaciğerde santral olarak aktif metaboliti olan 11-hidroksi- Δ 9-THC'ye çevrilir. Bu metabolit Δ 9-THC'den daha aktiftir ve kan-beyin bariyerini daha kolay geçer (27). Soluma veya damar içi (i.v) enjeksiyon sonrası maksimum beyin konsantrasyonlarına 15 dakika içinde erişilir, bu süre maksimum fizyolojik ve psikolojik etkilerin de başlama süresidir. Beyindeki konsantrasyona bağlı olarak görülen bu etkiler daha sonra bir platoya ulaşır ve yavaş yavaş azalarak 2-4 saat içinde sona erer. Ağız yoluyla alım sonrası en yüksek etki yaklaşık 1 saat sonra başlar ve yine bağırsakta devam eden emilim nedeniyle 5-6 saat sürebilir (28).



Şekil 2.1. Kannabisin dört ayrı ürününün kimyasal yapıları (26).

2.1.3. Kannabinoidin Etkileri

Esrarın kısa süreli kullanımına bağlı psikomotor ve bilişsel fonksiyonlarda bozukluk oluşturması yanında panik bozukluk, anksiyete, şizofreninin artması, akut psikoz, suçla yatkınlıkta artış yapabildiği, uzun süreli kullanımı sonucunda ise bağımlılık ve çekilme sendromu, çoklu madde kullanımına yatkınlık, amfizem, akciğer ve ağız ve yutak kanseri, bronşit, kalp hastalıkları ve endokrin değişiklikler oluşabilmektedir (29).

Kannabinoid sistem beyindeki sinaptik iletimde potansiyasyon veya depresyon ile ilişkili olaylara katılmaktadır (30). Kannabinoid nörotransmisyonuyla aktive edilen ve “long-term potentiation” ve “long-term depression” olarak adlandırılan bu süreçlerin, madde kullanımı ve bağımlılığında gelişen nöroadaptasyonda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (31, 32). Ayrıca, ilaç bağımlılığının gelişmesinde önemli yer tutan çeşitli beyin bölgelerinde kannabinoid reseptörlerinin olduğu da tespit edilmiştir (33).

2.2. Bağımlılık Genetiği

Madde bağımlılığı riskini oluşturan organizmanın biyolojik karakteristiğini etkileyen genlerdir. Bu özellikler maddelerin metabolize edilmesi (farmakokinetik) ile yada bir maddeye karşı vücudun cevabı (farmakodinamik) ile ilgilidir. Bu olaylar santral sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde gerçekleşmektedir. Maddeye bağımlılığın gelişmesi

çoğunlukla yabancı maddenin kendi kendini yönetmesi ile olur. Vücudun maddeyi metabolize etme kapasitesi bağımlılığın gelişme olasılığı üzerine etkilidir. Eğer vücut maddeyi hızla metabolize ediyorsa kişi maddenin etkilerini hissetmez ama yavaş metabolize ediyorsa küçük miktarlar daha büyük etkiler oluşturur (6).

Bağımlılıkta genetiğin etkisi kompleks olup, diğer kompleks kalıtmı hastalıklarda olduğu gibi bir genin tek başına etkisinden çok birden fazla genin ve çevresel faktörlerin ortak etkisi ile oluşmaktadır. Genetik mekanizmaya bağlı olarak kişide birden fazla maddeye bağımlılık olabilmektedir (6,34).

Aile çalışmalarında; belirli bir madde bağımlılığı olan proband ve probandın kan yakını kişilerde maddeye bağımlılığın ne oranda görüldüğü saptanabilmektedir (4). Bir çalışmada; alkol, opioid, kokain, esrar bağımlılığı olan 231 proband ve 61 kontrol bireyi ve her iki gruba ait 1267 kişiden oluşan birinci derece akraba grubu oluşturulmuş kontrollerin akrabalarında % 3.5 oranında ilaç bağımlılığı gözlenmiş, opioid bağımlısı probandların akrabalarının % 20.5'inde, kokain bağımlılarının akrabalarının % 14.9'unda, esrar bağımlılarının yakınlarında ise % 21.3 oranında ilaç bağımlılığı gözlenmiştir. Bu çalışma bağımlı olan kişilerin yakınlarında diğerlerine kıyasla bağımlılığın 8 kat daha fazla görüldüğünü ortaya koymaktadır (6). Yapılan evlat edinme çalışmalarında biyolojik ebeveynleri madde bağımlısı olan çocukların bağımlı olma oranları, ebeveynleri bağımlı olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur (35). İkizlerde yapılan araştırma sonuçları da madde bağımlılığında kalıtımın etkisini desteklemektedir. Kendler ve arkadaşları 1198 ikiz çiftte kokain bağımlılığını; monozigotik ikizlerde % 41, dizigotik ikizlerde % 13 olarak saptamışlardır (36).

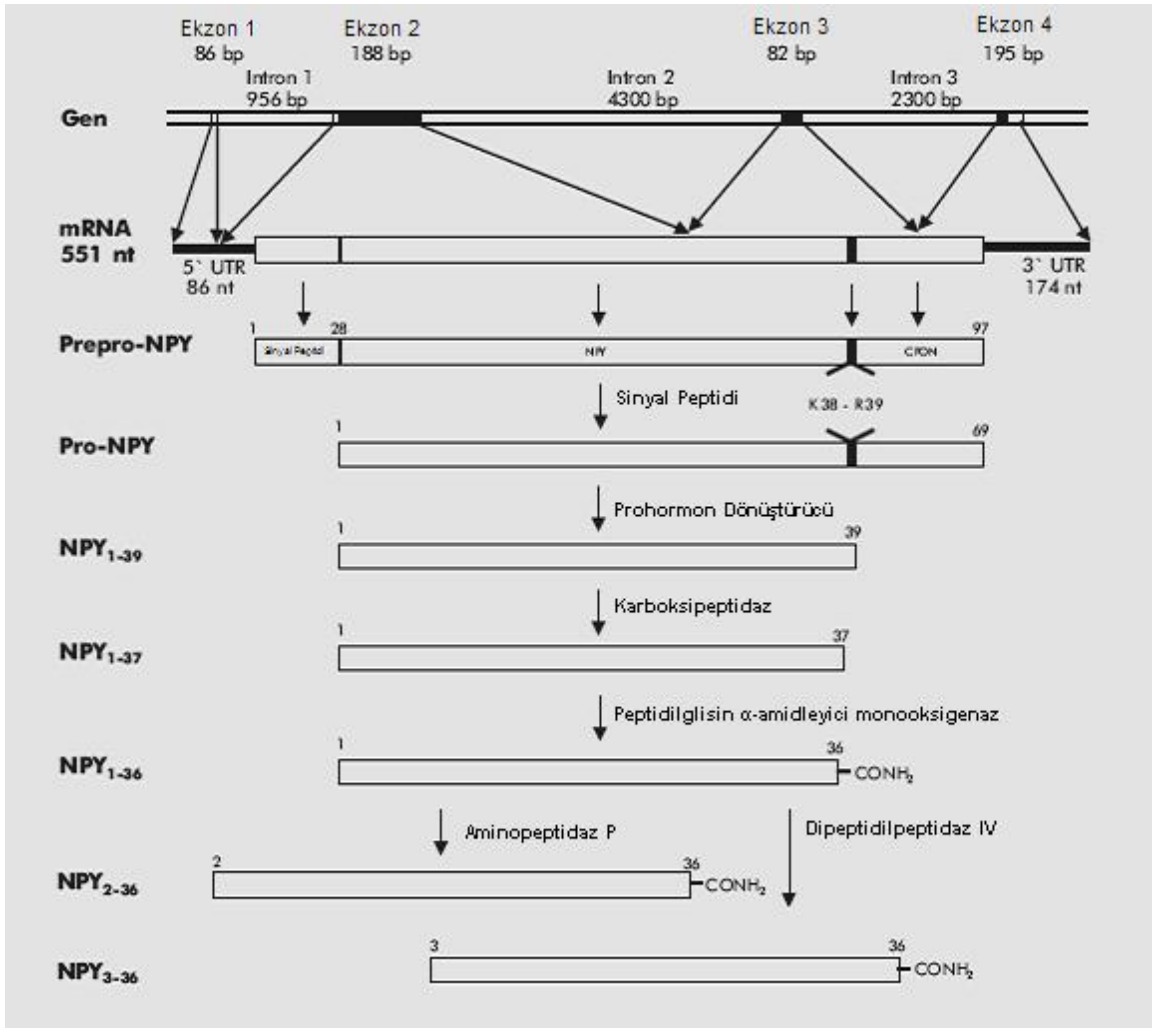
2.3.Nöropeptid Y (NPY) Geni

2.3.1. NPY Gen Yapısı ve Peptid Sentezi

İnsanda NPY geni 7. kromozomun p kolunda 15.1 bölgesinde yerleşik olup, 4 ekzondan ve 3 introndan oluşur 36 amino asitlik bir peptid sentezler. Birinci ekzon 5' uçta proteine çevrilmeyen bölgeyi (5'UTR), ikinci ekzon sinyal peptidini kodlar. Üçüncü ekzondan amid donör bölgesi ve prohormon çevirici enzim için kesim bölgesi ile karboksi ucun

bir kısmı kodlanır. Son ekzondan ise NPY'nin karboksi ucu (CPON) ve 3'uçta proteine çevrilmeyen bölge (3'UTR) kodlanır (Şekil 2.2).

Biyolojik olarak aktif olan NPY 96 amino asitlik öncül NPY (prepro-NPY) molekülünden oluşur. Bu öncül molekül translasyon tamamlandıktan sonra endoplazmik retikuluma gider, burada sinyal peptidi kesilir, geriye kalan 69 amino asitlik öncül NPY (pro-NPY) 38. pozisyondaki lizin ile 39. pozisyondaki glisin amino asitlerinden tanınarak prohormon konvertazlar tarafından kesilir ve 39 amino asitlik NPY oluşur. Bu 39 amino asit uzunluğundaki NPY'nin 30 amino asitini CPON kısmı oluşturmaktadır. CPON kısmı iki enzim (karboksi peptidaz ve peptidilglisin α -amidleyici monooksijenaz) tarafından işlenir ve biyolojik olarak aktif amidlenmiş NPY salınır. Amid grubu NPY'nin biyolojik aktivitesi için esastır aynı zamanda peptidi karboksipeptidazlar tarafından yıkılmaktan korur. Olgunlaşmış NPY daha sonra iki enzim tarafından ileri işlenmeye tabi tutulur. Bu enzimler dipeptidil peptidaz-IV ve aminopeptidaz P'dir. Bu enzimlerin işlemlerinden sonra NPY₃₋₃₆ ve NPY₂₋₃₆ sırasıyla oluşur (Şekil 2.2) (37).

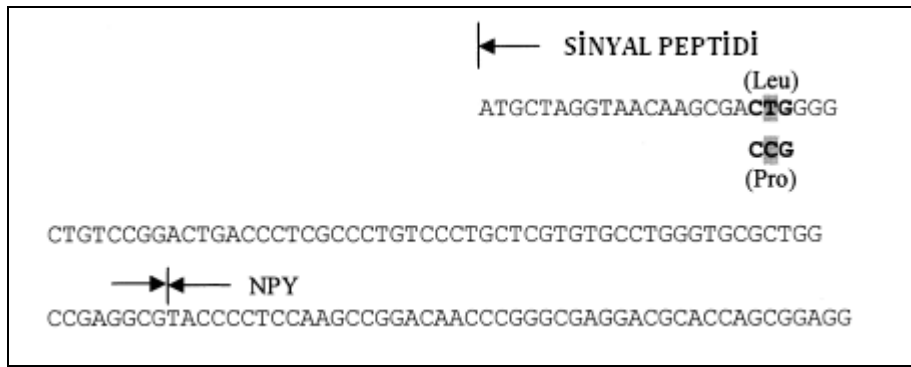


Şekil 2.2. NPY geni ve protein işlenmesi (38).

2.3.2. NPY Geninde Görülen Nükleotid Değişimleri

Araştırmamızda analiz edilmiş olan NPY geni T1128C nükleotid değişimi genin 2. ekzonunda yer alan 1128. pozisyonda bulunan timinin adenine dönüşmesi şeklinde olmaktadır. Gendeki bu değişim peptidin 7. amino asidi olan lösinin proline (Leu7Pro) dönüşümüne neden olmaktadır (Şekil 2.3). Nöropeptid Y molekülünün sinyal dizisi içinde yer almaktadır, peptidin sentezini değiştirmemekte, ancak sentez sonrası paketlenmesini ve salınımını etkilemektedir. Prohormon düzeyinin artışına neden olması bu değişimin fonksiyon katılımı ile sonuçlandığını göstermektedir. Ökaryotik sinyal dizileri tipik olarak N-ucunda hidrofilik bir bölge, ortada hidrofobik bölge ve C ucunda da polar bölge içerirler. Buradaki 7. amino asit hidrofilik-hidrofobik bölge sınırında bulunmaktadır. Başlangıçta bu nükleotid değişimi ile artmış serum kolesterol

seviyesi, obezite, ateroskleroz (39) ve diyabet arasında ilişki kurulmuştur (40). Pro7 varlığında artmış olan NPY düzeyinin depresyon ve anksiyeteye karşı koruyucu rolü olduğuna dair bulgular mevcuttur. Depresyon hastalarında çevresel risk faktörlerinin de analiz edildiği bir çalışmada pro7 allelinin bu risk faktörlerine rağmen koruyucu olduğu gösterilmiştir. Yine bu nükleotid değişimi ile alkol bağımlılığına dair çalışmalar yapılmış ancak birbirine zıt sonuçlar rapor edilmiştir (41). Bir grup çalışmada ilişki bulunmazken (42, 43), diğer birkaçında ise Pro7 alleli ile alkol bağımlılığı arasında birliktelik olduğu ortaya konmuştur (44, 45).



Şekil 2.3. T1128C nükleotid değişiminin NPY genindeki yerleşimi (46).

NPY geninde görülen diğer nükleotid değişimlerinden; genin promotör bölgesinde bulunan -485 C>T ve -399 C>T nükleotid değişimlerinin transkripsiyonu negatif yönde etkilediği saptanmıştır (47). Bunlardan düşük NPY düzeyine neden olan -399 C>T'nin analiz edildiği çalışmaların sonuçlarına göre bu nükleotid değişiminin şizofreni, “non Hodgkin” lenfoma, erken yaşta ortaya çıkan aterosklerozis, iskemik inme ve strese karşı gelişen davranışlarla ilişkilendirilmiştir (48). Bir maymun türünde yapılmış olan araştırmada ise NPY geni promotör bölgesinde bulunan -1002 T>G nükleotid değişiminin promotör aktivitesini etkilediği ve alkol kullanımına yatkınlıkta bu değişimin rolü olduğu sonucuna varılmıştır (49). Sonuç olarak genetik ve farmakolojik veriler NPY sinyalinin, alkol, sodyum pentobarbital ve ketamin gibi ilaçların sedatif etkilerini modüle ettiğine işaret etmektedir (8).

2.4. Nöropeptid Y (NPY)

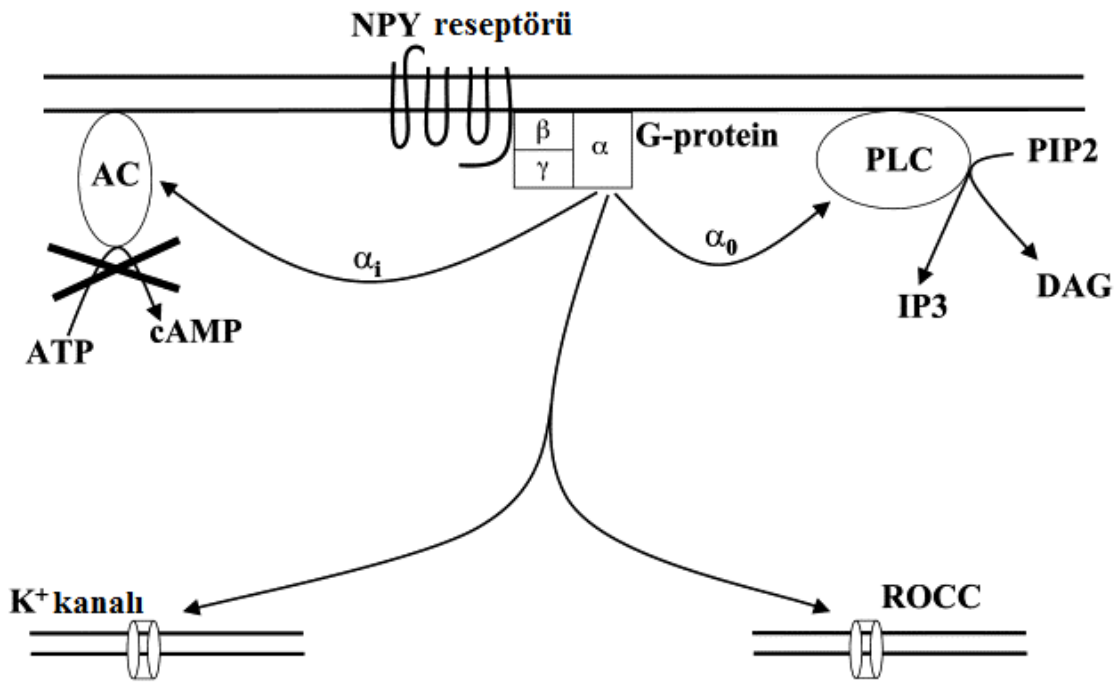
Beyin dokusunda yoğun olarak bulunan NPY molekülü, Tatemoto ve Mutt isimli araştırmacılar tarafından 1982 yılında domuz beyinde saptanmıştır (50). NPY pankreatik polipeptid ailesinin bir üyesidir (47) ve merkezi sinir sisteminde üretilen bir nörotransmitterdir (51). Merkezi sinir sisteminde NPY'nin bulunduğu bölgeler, hipokampus, amygdala, hipotalamusun 3.ventriküle komşu kısmında yerleşen arkut nükleustur (ARC). Kısmi olarak ise paraventriküler nükleus (PVN), suprakiazmatik nükleus, median eminens ve dorsomedial nükleusta (DMN) bulunur. γ -Amino butirik asit (GABA)'erjik internöronlarda ifade olur ve depolanır. Sinir uçlarının merkezi kısımlarında yoğun olarak bulunur ve sinaptik veziküllerde depolanır (52,53,9).

NPY, duygusal davranışların düzenlenmesi (54, 55), besin alımının kontrol edilmesi (56,57), nöronal gelişim (58,59), ağrı modülasyonu (60,61), üreme (62,63), nöbet etkinliği (64), kardiovasküler homeostazis (65), termogenezis (66, 67, 68), uyku-uyanıklık siklusunun düzenlenmesi, günlük sirkadiyen ritm (69), kan basıncının düzenlenmesi (70) gibi birçok fizyolojik fonksiyonla ilişkilidir. Bunların yanında NPY; anksiyete, yeme bozuklukları, Huntington hastalığı, alzheimer, parkinson, epilepsi ve çeşitli nöbetlerin patogenezi karışır (71). Son yıllarda, NPY'nin etanol ve kötüye kullanılan ilaçlara karşı oluşan nörobiyolojik tepkilerle bağlantılı olduğu yönünde kanıtlar ortaya çıkmıştır (10,11,8).

Periferde ise NPY sempatik sinir sisteminde yoğun olarak bulunur ve norepinefrin (NE) ile birlikte salınır ve depo edilir. Ayrıca parasempatik nöronların alt popülasyonlarında da ifade olur. Periferde adrenal medulla NPY kaynağıdır (72). Sinir hücresi dışındaki diğer hücrelerde de NPY ifade olmaktadır. Sıçanlarda yapılan bir araştırmada megakaryositlerde NPY geninin ifade olduğu görülmüştür (73). NPY ayrıca birçok organdaki nonsinaptik nöronlarda bulunur örneğin; gastrointestinal tractusda, tükürük bezinde, tiroid bezinde, pankreasta, ürogenital sistemde, hava yollarında, kalpte, dalakta, kan damarlarının endotel hücrelerinde ve karaciğerde bulunmaktadır (74,75).

2.4.1. NPY'nin Katıldığı Ana Sinyal Yolakları

NPY molekülü G protein eşlikli reseptörleri aracılığı ile bazı sinyal iletim yolaklarında rol almaktadır (Şekil 2.4). Bu sinyal yolaklarının birinde, adenil siklaz inhibisyonu ile ATP'den cAMP oluşmasını engellemektedir. Bir diğerinde, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu değişimine göre inositol fosfata bağımlı yada inositol fosfattan bağımsız olarak fosfolipaz C ile lipid metabolizması üzerinde etki göstermektedir. Son olarak ta, plazma membranı düzeyinde kalsiyum ve potasyum kanallarını bloke ederek ya da aktive ederek kalsiyum ve potasyum sinyal yolaklarında etki göstermektedir (78).

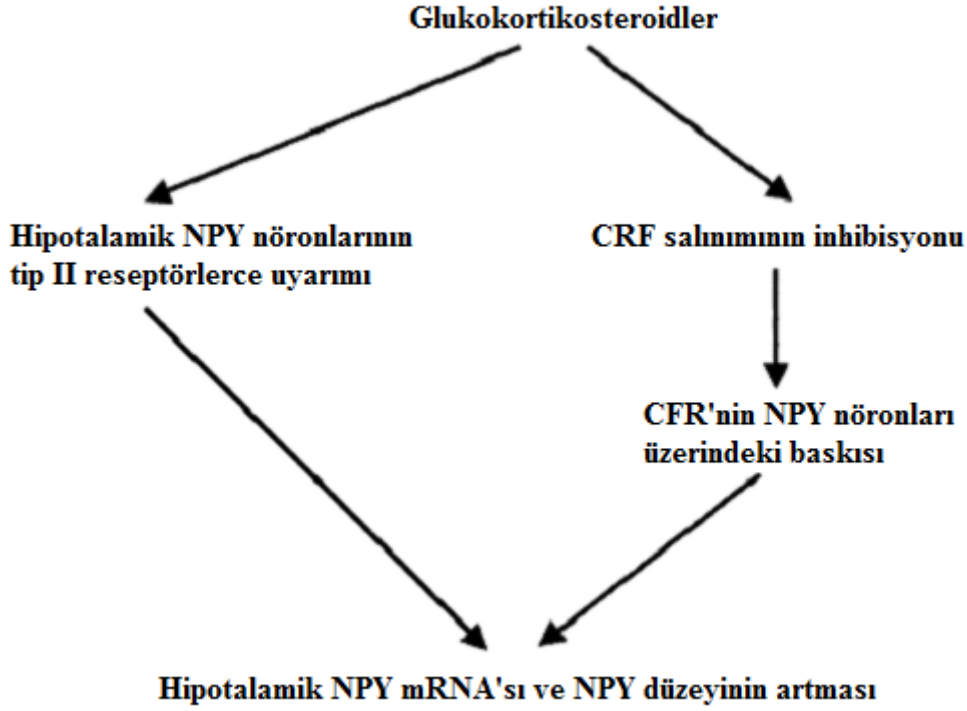


Şekil 2.4.1. NPY'nin katıldığı ana sinyal yolakları (78). AC: adenil siklaz, K⁺: potasyum kanalı, ROCC: reseptörle düzenlenen kalsiyum kanalı, PLC: fosfolipaz C, PIP₂: fosfatidil inositol difosfat, IP₃: inositol tri fosfat, DAG: diaçil gliserol

2.4.2. Hipotalamusta NPY sistemini düzenleyen majör yolak

Hipotalamik PVN, kortikotropin salınma faktörünün (CRF) sentezlendiği ve NPY içeren nöronların uçlarının toplandığı bölgedir. NPY içeren nöronlar ile CRF-ergic nöronlar arasında sinapslar olduğu saptanmıştır. Glukokortikosteroidler, CRF'nin

salınımını inhibe ederek CRF'nin NPY nöronları üzerindeki baskısını kaldırmış olur. Sonuçta; NPY mRNA'sı ve NPY düzeyi hipotalamusta artar. CRF ile NPY arasında negatif geri bildirim vardır (Şekil 2.5) (89).



Şekil 2.4.2. Hipotalamusta NPY sistemini düzenleyen majör yolak (89).

2.4.3. Nöropeptid Y Reseptörleri

Yapılan çalışmalarda NPY etkisinin 6 ayrı reseptör (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6) üzerinden yürütüldüğü saptanmıştır (76). Bu reseptörlerin tümü siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimini inhibe eden G protein eşlikli reseptörlerdir. Y1 reseptörü beyinde hipokampus, hipotalamus ve amygdala bölgelerinde post-sinaptik olarak bulunmaktadır ve etanole karşı nörobiyolojik cevapta görevli olduğu bilinmektedir (8). Hipokampus ve amygdala strese cevapta ve bilginin işlenmesinde önemli beyin bölgeleridir (77). Y2 reseptörü birincil olarak pre-sinaptik bölgede yerleşik olup NPY'nin fazla salınımını inhibe etmektedir. Y5 reseptörü post-sinaptik yerleşimli olup

hipokampusta besin alımının kontrolünde görevlidir. (8). Y4 reseptörü ilk bulunduğu pankreatik polipeptid reseptörü olarak biliniyordu, fakat daha sonraları NPY reseptörü olduğu anlaşıldı. Y5 reseptörü yeme davranışı ile ilgili olan reseptördür. Y6 reseptörü ise klonlanmıştır, fakat insanlarda fonksiyonel değildir (78). NPY reseptörlerinin karıştığı fizyolojik olaylar Tablo 2.4’de özetlenmiştir.

Tablo 2.4. NPY reseptörleri ve fizyolojik rolleri

Fizyolojik Rolü	Reseptörler	
Kan basıncının düzenlenmesi	Y1,Y2	(70)
Besin alımı	Y1,Y2,Y4,Y5	(8,56,57)
Nöbet düzenlenmesi	Y1,Y2,Y5	(64)
Anksiyete	Y1,Y2,Y5	(71)
Kemik oluşumunun düzenlenmesi	Y2	(38)
Ağrı duyarlılığı	Y1,Y2	(60,61)
Depresyon	Y1,Y2	(54,55)
Anjiyogenez	Y1,Y2	(65)
Etanol tüketimi	Y1	(8,10,11)
LH sekresyonu	Y1	(38)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gönüllülerin Özellikleri

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Polikliniği'ne Kasım 2009-Haziran 2010 tarihleri arasında başvuran ve adı geçen Anabilim Dalı'nda yapılan inceleme/tetkikler sonucunda esrar bağımlısı tanısı almış gönüllü 139 birey çalışma kapsamına alınmıştır. Kontrol grubu ise yine Adli Tıp Anabilim Dalı'nda, akrabalık ilişkisi olmayan ve bağımlılık yapıcı herhangi bir madde kullanımı hikayesi olmayan gönüllü 100 sağlıklı bireyden oluşturulmuştur. Bireylere ait bilgiler Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Araştırmanın moleküler analizleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Gönüllü hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından onayları ile alınan periferik kan örneklerinden tuzda çöktürme yöntemi ile DNA elde edilmiştir. Genomik DNA örneklerinde nöropeptit Y geni T1128C tek nükleotid değişimi polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu araştırmanın yapılabilmesi için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Komisyonu'nun onayı (Karar No:5/2010-9) alınmıştır.

Tablo 3.1. Bireylere ait bilgiler

Esrar Bağımlısı Grubu		Kontrol Grubu	
Kadın/Erkek	: 29 Kadın/110 Erkek	Kadın/Erkek	: 22 Kadın/78 Erkek
Yaş Aralığı	: 17-56	Yaş Aralığı	: 17-64
Yaş Ortalaması	: 30	Yaş Ortalaması	: 35

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Solüsyonlar

3.2.1. DNA İzolasyonu

- Lizis Tampon (pH 8.2) : Tris-HCL (Sigma) 10 mM
NaCl (Merck) 400 mM
Na₂EDTA (Merck) 2 mM
- %10 SDS (Merck) : Sodyum dodesil sülfat 10gr
Distile su ile 100 ml'ye
tamamlanır.

- Proteinaz K (Sigma) : 10 mg/ml
1mM Tris-HCl (pH 8.0)
- Sütür amonyum asetat (Sigma) : Amonyum asetat
74 gr/100ml distile su
- Tris-EDTA tampon (pH7.5) : Tris-HCl (Sigma) 10 mM
Na₂EDTA (Merck) 1 mM

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu

- Taq DNA polimeraz tampon (10X) (Fermantas) : 750mM Tris-HCl (pH 8.3)
200 mM (NH₄)₂ SO₄
% 0.1 Twenn 20
- Taq DNA polimeraz (Fermantas) : 5U/ μ l
- MgCl₂ (Fermantas) : 25 mM
- dNTP karışımı (Fermantas) : 2.5 mM dATP, 2.5 mM dCTP
2.5 mM dGTP, 2.5 mM dTTP

NPY geni primer dizileri (T1128C nükleotid değişimi bölgesine özgül)

F: 5'CCC GTC CGT TGA GCC TTC TG 3'

R: 5'CGG TCC CGC GGT CCC 3'

3.2.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi İle Kesimi

- BsiEI tampon (pH 7.9) (BioLabs) : 50mM potasyum asetat
20mM Tris-asetat
10mM magnezyum asetat
1mM dithiothreitol

3.2.4. Agaroz Jel Elektrofözezi

- Tris-asetat tamponu (TAE) : Tris baz (Merck) 2M
Glasiyal asetik asit (Merck) 1.14 ml
Na₂EDTA (Merck) 0.5 M

- Yükleme tamponu : Gliserol (Merck) 5.5 ml
1XTAE tamponu (Merck) 4.5 ml
Orange G boya(Merck) 0.01 gr
- Etidyum bromür (Sigma) : 10mg/ml distile su
- Moleküler ağırlık belirleyicisi : 100 bp DNA Ladder (Fermantas)
(1500, 1000, 900, 800, 700, 600,
500, 400, 300, 200, 100 baz çifti)

3.3 Yöntemler

3.3.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan esrar bağımlısı ve kontrol bireylerinin, EDTA'lı tüplere alınan 10 ml periferel kanlarından yüksek tuz konsantrasyonunda çöktürme yöntemi ile DNA'ları elde edildi. Kanlar 50 ml'lik tüplere alındı ve eritrositlerin parçalanması amacıyla 40 ml soğuk distile su ilave edilerek 2-3 dakika hızla çalkalandı. Tüpler 15 dakika 2500 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edilerek lökositlerin dipte toplanması sağlandı. Üst faz atılarak pelet üzerine 30 ml soğuk su eklendi ve çalkalanarak pelet yıkandı. 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst faz yavaş ve dikkatli bir şekilde döküldü. Pelet üzerine 3ml liziz tampon eklendi ve hücreler çalkalayıcı ile karıştırıldıktan sonra üzerine 200µl %10'luk SDS, 150 µl proteinaz K eklendi. Tüpler dikkatli bir şekilde alt üst edilerek 37°C'lik inkübatörde 16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda karışım üzerine 1 ml doymuş amonyum asetat eklenerek 30 sn. hızlıca çalkalandı. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Üst faz başka bir tüpe alınarak üzerine 15 ml etanol eklendi ve DNA'nın toplanması sağlandı. Toplanan DNA %70 etanol ile yıkandı ve alkol uçuruldu. DNA, TE tamponu içeren tüpe alındı ve erimesi için bir gece oda sıcaklığında veya 37°C'lik inkübatörde bırakıldıktan sonra 4°C'de saklandı (87).

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA üzerinde incelenmek istenen bölgenin, o bölgeye özgül oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Bu

yöntem; denatürasyon ile DNA çift zincirinin birbirinden ayrılması, primerlerin ayrılmış olan DNA zincirlerine bağlanması ve DNA polimeraz enzimi tarafından hedef bölgenin sentezlenmesi olarak üç aşamadan oluşur. Bu aşamaların 30-40 döngü halinde tekrarlanması sonucunda, incelenmek istenen DNA bölgesi çoğaltılmış olur (88). NPY geni T1128C nükleotid değişim bölgesine özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Reaksiyonun içeriği tablo 3.2’de reaksiyon koşulları ise tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği

Stok	25µl İçin Kullanılan	Son Konsantrasyon
10X tampon	2.5 µl	1X
2.5mM dNTP	1.5µl	0.1mM
Primer forward(100ng/µl)	1 µl	
Primer reverse (100ng/µl)	1 µl	
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.2 µl	0.02U
Genomik DNA	1 µl	100 ng
dH ₂ O	16.8 µl	
MgCl ₂	1µl	
TOPLAM	25 µl	

Tablo 3.3. PCR koşulları

95°C	3 dakika (başlangıç denaturasyonu)	
94°C	45 saniye (denaturasyon)	
62°C	45 saniye (birleşme)	32 döngü
72°C	45 saniye (uzama)	
72°C	5 dakika (son uzama)	

3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası elde edilen örnekler % 1.5'luk agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Örnekler 120 V'da yaklaşık 35 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme sistemi kullanılarak UV ışığında bantların görüntüleri alındı.

3.3.3.1. % 1.5'luk Agaroz Jelin Hazırlanması

- 1.5 g agaroz hassas terazide tartıldı.
- Üzerine 100 ml 1XTBE tamponu ilave edildi ve mikrodalga fırın kullanılarak agaroz solüsyonu kaynatıldı.
- 50-55 °C'ye soğutulduktan sonra, içerisine 10µl etidyum bromür (5mg/ml) eklendi.
- Karışım hava olmayacak şekilde jel tabağına döküldü ve oda sıcaklığında yaklaşık 40 dk jelin polimerize olması için bekletildi.
- Jel tabağı tankın içerisine yerleştirildi.
- Birinci kuyucuğa DNA belirleyici, ikinci kuyucuğa negatif kontrol (DNA içermeyen PCR ürünü) daha sonraki kuyucuklara ise sırasıyla çalışılan bireylere ait PCR ürünleri yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi.

3.3.4. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Analizi

Restriksiyon endonükleaz enzimleri, bakterilerin kendi genomunu korumak için sentezlediği enzimlerdir. Bakterilerden elde edilen bu restriksiyon endonükleaz enzimlerini kullanarak DNA baz dizisinde meydana gelen baz değişimlerini saptamak mümkündür. Bu tür değişimler bir restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesi oluşmasına veya ortadan kalkmasına neden olabilir. Çalışmamızda kullanılan NPY geni T1128C nükleotid değişimine özgül restriksiyon endonükleaz enzimi kesim protokolü Tablo 3.4'de, bu enzimin tanıma bölgesi ise Tablo 3.5'te verilmiştir. Enzim kesim reaksiyonu sonuçları, % 2'lik agaroz jelde analiz edilmiştir.

Tablo 3.4. BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim protokolü

İçerik	Miktar
Hedef DNA	10 µl
10X kesim tamponu	2 µl
Restriksiyon enzimi	0.5 µl
Steril distile su	7.5 µl
Toplam	20µl

Tablo 3.5. NPY geni T1128C nükleotid değişimine özgül BsiEI restriksiyon endonükleaz enzim kesim koşulları

Nükleotid Değişimi	Enzim	Tanım Bölgesi	İnkübasyon Sıcaklığı İnkübasyon Süresi
T1128C	BsiEI	5' CGRY↓CG..3' 3'..GC↑YRGC..5'	60°C 4 saat

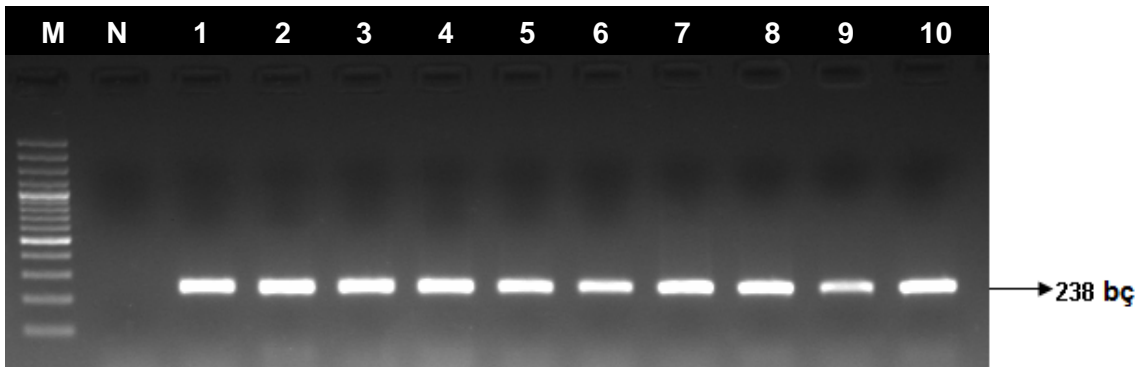
3.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

Esrar bağımlısı ve kontrol gruplarından elde edilen genotip dağılımı ve allel sıklıklarının karşılaştırılmasında istatistiksel analiz yöntemlerinden “ki-kare” testi kullanıldı. Relatif riski hesaplamak için risk oranı (odds ratio) ve % 95 güven aralığı (GA) kullanıldı. Ki-kare analizleri “Graphpad Instat version 3.05” programı kullanılarak yapıldı. NPY geni T1128C tek nükleotid değişiminin genotip dağılımları ve allel sıklıkları için kontrol ve esrar bağımlısı gruplarda Hardy-Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı “de-finetti” programı (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>) kullanılarak analiz edildi. Türkiye’de yapılmış olan bu çalışmanın sağlıklı kontrol grubu sonuçları diğer ülkelerde yapılmış olan sonuçlarla ‘bağımsız 2 oran karşılaştırması testi’ kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm istatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

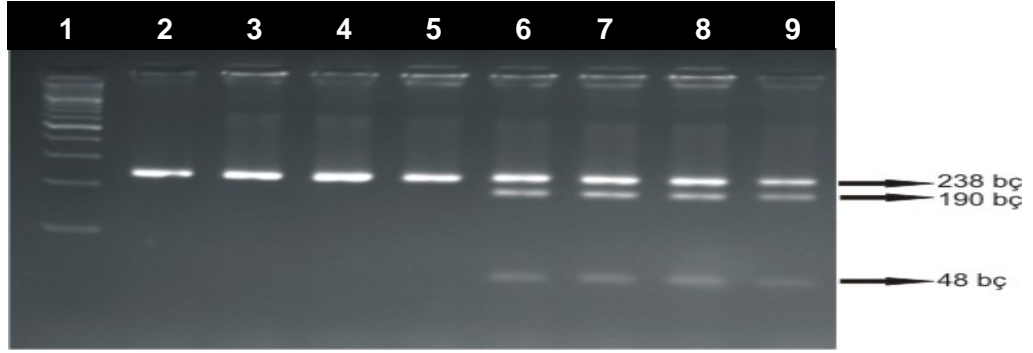
4.BULGULAR

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Polikliniğine başvuran ve Esrar bağımlısı tanısı alan gönüllü 139 hasta ve 100 sağlıklı kontrol bireylerinin periferik kanlarından tuzla çöktürme yöntemi ile DNA'ları elde edildi. DNA örneklerinde, NPY geni T1128C nükleotid değişimi PCR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edildi.

DNA örnekleri T1128C nükleotid değişimi için polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra (Şekil 4.1) BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi ile analiz edildi. Bu analizde 1128. pozisyonda bulunan yabancı allele olan T alleli varlığında BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma bölgesi yokken mutant allele olarak anılan C alleli varlığında tanıma bölgesi oluşmaktadır. PCR ürünlerinin enzim ile muamelesi sonucunda C alleli varlığında, 248 baz çiftlik PCR ürünü 190 bp ve 48 bp uzunluğunda iki parçaya ayrılmaktadır, T alleli varlığında ise enzim kesim bölgesi olmadığından 248 b.ç.'lik kesim ürünü elde edilmektedir. Heterozigotluk durumunda ise 248, 190 ve 48 b.ç.'lik DNA bantları gözlenmiştir. Enzim kesim reaksiyonu sonuçları, % 2'lik agaroz jelde analiz edildi. Analiz sonucunda çalışma grubunu oluşturan bireylerin homozigot TT ve heterozigot TC allellerini taşıdıkları saptanmış olup, homozigot CC allele rastlanmamıştır. T1128C nükleotid değişiminin BsiEI restriksiyon endonükleaz enzimi ile analizine ait jel fotoğrafı Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. NPY geni T1128C bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonrasında agaroz jeldeki görüntüleri (M: 100 b.ç.'lik moleküler ağırlık belirleyicisi, N: Negatif Kontrol, 1-10: PCR ürünleri).



Şekil 4.2. NPY geni T1128C nükleotid değişiminin BsiEI enzimi ile reaksiyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü (1: 100 b.ç.'lik moleküler ağırlık belirleyicisi, 2: PCR ürünü, 3-5: TT, 6-9: TC)

NPY geni T1128C nükleotid değişimi için TT, TC ve CC genotip dağılımları esrar bağımlılarında sırasıyla % 95, % 5 ve % 0; kontrol grubunda ise % 95, % 5 ve % 0 olarak bulundu. Allel sıklıkları esrar bağımlılarında T alleli için 0.975, C alleli için 0.025 kontrol grubundaki allel sıklıkları T alleli için 0.975, C alleli 0.025 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Esrar bağımlıları ve kontrol grubu arasında T1128C nükleotid değişiminin genotip dağılımı ve allel sıklıkları

Genotip	Kontrol s (%)	Esrar bağımlısı s (%)	Risk Oranı (GA %)	P
<i>TT</i>	95 (95)	132 (95)	0.9 (0.30-3.22)	0.495
<i>TC</i>	5 (5)	7 (5)	1 (0.31-3.27)	0.495
<i>CC</i>	0 (0)	0 (0)	0	0
Allel				
<i>T</i>	195 (97.5)	271 (97.5)	0.9 (0.31-3.17)	0.495
<i>C</i>	5 (2.5)	7 (2.5)	1 (0.31-3.22)	0.495

GA: Güven aralığı, s: birey sayısı

Esrar bağımlısı ve kontrol bireylerinde Hardy-Weinberg dengesine (HWE) göre genotip dağılımı ve allel sıklığının beklenen değeri ile gözlenen değerler arasında farklılık olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. T1128C nükleotid değişimi için Hardy-Weinberg dengesine göre χ^2 ve p değerleri

	χ^2	p
Esrar Bağımlıları Grubu	0.093	0.76
Kontrol Grubu	0.066	0.79

NPY geni T1128C nükleotid değişimi için analiz edilmiş olan 100 sağlıklı bireyde CC genotipine hiç rastlanmazken TC genotipi % 5, düşük olan C allel sıklığı ise 0.025 olarak saptanmıştır (Tablo 4.1). Literatürdeki diğer ülkelerde yapılmış olan çalışmalar incelenerek 'bağımsız 2 oran karşılaştırması testi' ile Türkiye'deki C allel sıklıkları diğer toplumlar ile karşılaştırıldı. Türkiye'deki C allel sıklığı Japonya'dan anlamlı düzeyde yüksek ($p=0.022$) bulunurken, Kore toplumundan ise sınırda anlamlı düzeyde yüksek ($p=0.076$) bulunmuştur. Amerika'da yaşamakta olan Avrupa kökenliler ($p=0.634$), Amerika'da yaşamakta olan Afrika kökenliler ($p=0.527$), Çin ($p=0.878$), Almanya ($p=0.829$), Brezilya ($p=0.805$), İsveç ($p=0.691$) ve Finlandiya ($p=0.214$) ile uyumlu olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Farklı ülkelerde NPY geni T1128C nükleotid değişiminin genotip dağılımı ve C allel sıklıkları ile bağımsız iki oran karşılaştırma testi P değerleri

Ülkeler	s	Genotip			C Allel Sıklığı	P
		TT	TC	CC		
Kore	242	242	0	0	0.000	0.076
Japonya	373	373	0	0	0.000	0.022
Almanya	318	295	23	0	0.036	0.829
Avrupa	1171	1078	92	1	0.040	0.634
Afrika	65	65	0	0	0.000	0.527
Brezilya	331	313	18	0	0.027	0.805
İsveç	572	527	45	0	0.039	0.691
Finlandiya	2176	1920	250	6	0.060	0.214
Hollanda	356	331	25	0	0.035	0.859
Çin	304	303	1	0	0.002	0.878
Türkiye	100	95	5	0	0.025	_____

* Ding B.'den uyarlanmıştır (85). s : birey sayısı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan genomu bireyler arasında farklılık gösteren milyonlarca tek nükleotid değişimi içermektedir. Bunların büyük kısmı protein kodlayan bölgeler dışında olmasına karşın hastalıklara yatkınlıkta bireyler arası çeşitliliğe neden olabilmektedir (79). Araştırmamızda analiz edilmiş olan NPY genindeki T1128C tek nükleotid değişimi peptid zincirinde amino asit değişikliği ile sonuçlanmaktadır ve fonksiyonel çalışmalarla etkisi aydınlatılmıştır (40). Çalışma sonucunda esrar bağımlıları ile sağlıklı kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı. Bilgilerimiz dahilinde literatürde esrar bağımlılığı ve NPY geni arasındaki ilişkiyi analiz eden bir çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamıza konu olan NPY molekülü amygdala ve hipokampusta alarm sistemi gibi çalışır. NPY ile düzenlenen yolak kronik strese karşı cevapta rol almaktadır. Bu düzenlemedeki aksama ise depresyon ve anksiyete patofizyolojisinde etkili olabilmektedir (41). Nörotransmitter sistem duygulanım ve stres durumlarında alkol ve diğer bağımlılık yapıcı maddelere başlamada etkilidir (14). Literatüre bakıldığında NPY genindeki nükleotid değişimleri ile depresyon ve bağımlılık yapıcı diğer maddelerde yapılmış olan çalışma sonuçlarında zıtlıklar olduğu görülmektedir. Bu konuda en çok çalışma alkol bağımlılarında yapılmıştır. Bunlardan Almanya, İsveç ve Finlandiya’lılardan oluşan gruplarda yapılmış olan analizlerde NPY geni promotör bölgesindeki -602 G>T nükleotid değişimi ile alkol bağımlılığı arasında güçlü bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir (14, 43). Amerika’da yaşayan Avrupa kökenli gruplarda yapılan çalışmada ise alkol bağımlılığı ile Pro7 alleli (C allel) arasında ilişki olduğu rapor edilmiştir (45). Almanya’da yapılan bir başka çalışmada ise alkol bağımlılığı ile NPY geni T1128C nükleotid değişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı kurulamamıştır (80). Japonya’da yapılmış olan diğer bir araştırmada metamfetamin bağımlılığı ile NPY geni arasında ilişki bulunmazken, nöropeptid Y Y1 reseptör geni ile ilişki kurulmuştur. (81). Nöropeptid Y geninde genetik değişimler yapılmış olan hayvanlarla yapılan çalışmalar da alkol bağımlılığı ile NPY geni ilişkisinin varlığını desteklemektedir (45). Bu çalışmalardan birinde NPY geni delesyona uğramış farelerin su yerine alkol ile hazırlanmış çözeltileri tercih ettikleri ve alkolün hipnotik ve sedatif etkilerine normal NPY geni taşıyan farelerden daha az duyarlı oldukları saptanmış, bunun tam tersine NPY geni aşırı ifade edilen farelerde ise alkol tercihinin düşük olduğu ve etanolün etkilerine duyarlı

oldukları gösterilmiştir (82). Bağımlılık geçmişi olan Wistar sıçanlarda da NPY geninin aşırı ifade olduğu durumda alkol tercihinin ve anksiyete benzeri davranışların azalmış olduğu belirlenmiştir (83). NPY'nin intraserebroventriküler (i.c.v.) uygulaması sonucunda ise etanol yoksunluğuna karşı oluşan reaksiyonları önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (84). Thiele ve arkadaşlarının (12) yaptıkları bir diğer çalışmada etanol ve kötüye kullanılan diğer ilaçlara karşı oluşan nörobiyolojik tepkilerle NPY geninin rolünün olduğu ortaya konmuştur.

Majör depresyon hastalarında yapılan çalışmalarda ise pro7 allel sıklığının hasta grubunda sağlıklı kontrol gruplarından düşük olduğu ve böylece pro7 allelinin depresyon için koruyuculuğunun olduğu öne sürülmektedir. Depresyon hastaları ve intihar girişiminde bulunan bireylerde plazma ve beyin omurilik sıvısında (CSF) NPY düzeyinin azalmış olduğu saptanmıştır (41). Pro7 allelinin varlığında NPY derişikliğinin artmış olduğu bilindiğine göre, bu bulgular Pro7 allelinin koruyuculuğunu desteklemektedir.

Sağlıklı bireyleri kapsayan araştırmalara göre; Avrupa ülkelerinde ve İsrail'de yapılmış olan çalışmalarda Pro7 allel sıklığı % 2-10 arasında bulunmuştur (41). Türkiye'de yapılmış olan bu çalışmanın sonucunda Pro7 allel sıklığının % 2.5 olduğu saptanmıştır ve aynı aralıkta yer almaktadır. Pro7 allel sıklığı kuzeyden güneye geldikçe azalmaktadır. Finlandiya gibi kuzey ülkeleri Pro7 allel sıklığının en yüksek görüldüğü toplumlar iken Japonya ve Kore'de yoktur ya da çok düşük olarak bulunmaktadır. Yine Amerika'da yaşayan Afrikalılarda da Pro7 alleli saptanmamıştır (85). Kuzey ülkelerinde alkol ve diğer madde bağımlılıkları yüksek oranda görülmektedir. Tüm bunlar bağımlılığa yatkınlıkta NPY'nin tek başına etki gösteremeyeceğini, NPY geni ile birlikte NPY reseptörlerinin ve başka genetik faktörlerin de birlikte değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; NPY molekülü türler arasında evrimsel açıdan en iyi korunan peptidlerden biridir. Korunmuş moleküldeki varyasyonlar önemli fonksiyon değişikliklere yol açabileceğinden NPY molekülünün çalışılmasının anlamlı olacağı düşünülmüştür. Bu doğrultuda planlanmış olan araştırmamızda esrar bağımlısı bireyler ile sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Sağlıklı bireylerin sonuçlarının ise diğer toplumlar ile karşılaştırıldığında Türkiye'deki

C allel sıklığı Japonya'dan anlamlı düzeyde yüksek bulunurken, Kore toplumundan ise sınırda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Amerika'da yaşamakta olan Avrupa kökenliler, Amerika'da yaşamakta olan Afrika kökenliler, Çin, Almanya, Brezilya, İsveç ve Finlandiya ile uyumlu olduğu saptanmıştır.

Esrar bağımlılarında bu sonuç; NPY geni reseptörlerinin etkisinin araştırılması ve ayrıca kompleks kalıtmı bağımlılık genetiğinde diğer moleküllere dikkat çekmek açısından bundan sonraki araştırmalara yön verebileceği düşünülmektedir. Toplumlar arası genetik farklılıkların hastalık etiolojisindeki önemi göz önüne alındığında Türk toplumunda NPY geni T1128C fonksiyonel nükleotid değişiminin analizinin yapılmış olması sonraki çalışmalar için bir alt yapı oluşturmuştur.

6. KAYNAKLAR

1. Lachman HM. An overview of the genetics of substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 2006;8:133–143.
2. Schneider M. Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addict Biol.* 2008;13:253-263.
3. Busto U, Bendayan R, Sellers EM. Clinical pharmacokinetics of non-opiate abused drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16:1-26.
4. Merikangas KR, Stolar M, Stevens DE, Goulet J, Preisig MA, Fenton B, Zhang H, O'Malley SS, Rounsaville BJ. Familial transmission of substance use disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 1998;55:973-979.
5. Hardie TL. The genetics of substance abuse. *AACN Clin Issues.* 2002;13:511-522 .
6. Saxon AJ, Oreskovich MR, Brkanac Z. Genetic determinants of addiction to opioids and cocaine. *Harv Rev Psychiatry.* 2005;13:218-232.
7. Bhaskar LV, Thangaraj K, Shah AM, Pardhasaradhi G, Praveen Kumar K, Reddy AG, Papa Rao A, Mulligan CJ, Singh L, Rao VR. Allelic variation in the NPY gene in 14 Indian populations. *J Hum Genet.* 2007;52:592–598.
8. Thiele TE, Navarro M, Sparta DR, Fee JR, Knapp DJ, Cubero I. Alcoholism and obesity: overlapping neuropeptide pathways? *Neuropeptides.* 2003;37:321-337.
9. Goodman A, Neurobiology of addiction. An integrative review, *Biochem Pharmacology.* 2008;75:236-322.
10. Pandey SC, Carr LG, Heilig M, Ilveskoski E, Thiele TE. Neuropeptide y and alcoholism: genetic, molecular, and pharmacological evidence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27:149-154.
11. Thiele TE, Badia-Elder NE. A role for neuropeptide Y in alcohol intake control: evidence from human and animal research. *Physiol Behav.* 2003;79:95-101.
12. Thiele TE, Sparta DR, Hayes DM, Fee JR, A role for neuropeptide Y in neurobiological responses to ethanol and drugs of abuse. *Neuropeptides.* 2004;38:235-243.
13. Lindell SG, Schwandt ML, Sun H, Sparenborg JD, Björk K, Kasckow JW, Sommer WH, Goldman D, Higley JD, Suomi SJ, Heilig M, Barr CS.

- Functional NPY variation as a factor in stress resilience and alcohol consumption in rhesus macaques. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67:423-431.
14. Mottagui-Tabar S, Prince JA, Wahlestedt C, Zhu G, Goldman D, Heilig M, A novel single nucleotide polymorphism of the neuropeptide Y (NPY) gene associated with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29:702–707.
 15. Kessler RC, Crum RM, Warner LA, Nelson CB, Schulenberg J, Anthony JC. Lifetime co-occurrence of DSM-III-R alcohol abuse and dependence with other psychiatric disorders in the national comorbidity survey. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54:313-21.
 16. Köknel O. Clinical effectiveness of psychotropic drugs and drug-induced side effects. *Int J Psychiatry*. 1969;7:297-299.
 17. Çöpür M, Elmas İ, Can Y. Madde bağımlılığı ve antisosyal kişilik. *Kriz Dergisi*. 1995; 3(1-2):194-196.
 18. Yüksel N, Uzbay İT. Madde kötüye kullanımı ve bağımlılığı. Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi, 2003: p.485-520.
 19. Sağlam E, Uzbay İT, Beyazyürek M. Madde bağımlılığının psikofarmakolojik özellikleri. *Bağımlılık Dergisi* 2003;4:81-87.
 20. American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th edition). *N Engl J Med*. 1994;331:1163-1166.
 21. Koob GF, Le Moal M. Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychology*. 2008;59:29-53.
 22. Koob GF, Le Moal M. Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nat Neurosci*. 2005;8:1442-1444.
 23. Duaux E, Krebs MO, Loo H, Poirier MF. Genetic vulnerability to drug abuse. *Eur Psychiatry*. 2000;15:109-114.
 24. Ögel K, Corapçıoğlu A, Sir A, Tamar M, Tot S, Dogan O, Uguz S, Yenilmez C, Bilici M, Tamar D, Liman O. Tobacco, alcohol and substance use prevalence among elementary and secondary school students in nine cities of Turkey. *Turk Psikiyatri Derg*. 2004;15:112-118.
 25. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiology*. 1999;58: 315-348.
 26. Hall W, Solowij N. Adverse effects of cannabis. *Lancet*. 1998;352:1611-1616.
 27. Abood ME, Martin BR. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol. Sci*. 1992;13(5):201-206.

28. Leirer VO, Yesavage JA, Morrow DG. Marijuana carry over effects on aircraft pilot performance. *Aviation Space and Environmental Medicine*. 1991;62(3): 221-227.
29. Ashton CH. Adverse effects of cannabis and cannabinoids. *Br J Anaesth*. 1999; 83(4):637-649.
30. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain, *Science*. 2002; 296:678-682.
31. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*. 1993;18(3):247-291.
32. Robinson TE, Berridge KC. Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*. 2001;96(1):103-114.
33. Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Distribution of the neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. 1992;48(3):655-668.
34. Hardie TL. The genetics of substance abuse. *AACN Clin Issues*, 2002;13(4): 511-522.
35. Cadoret RJ, Troughton E, O'Gorman TW, Heywood E. An adoption study of genetic and environmental factors in drug abuse. *Arch Gen Psychiatry*. 1986;43(12):1131-1136.
36. Kendler KS, Bulik CM, Silberg J, Hettema JM, Myers J, Prescott CA. Childhood sexual abuse and adult psychiatric and substance use disorders in women: an epidemiological and cotwin control analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 2000;57(10):953-959.
37. Product Monograph NPY Neuropeptide Y, https://www.vwrsp.com/about/suppliers/supplier_profiles/bachem/pdf/monograph_npy.pdf, (Erişim tarihi: 10 Kasım 2010).
38. Silva AP, Cavadas C, Grouzmann E. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta*. 2002;326(1-2):3-25.
39. Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, Niskanen L, Laakso M, Rissanen A, Dekker JM, Hart LM, Valve R, Uusitupa MI. Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. *Nature Medicine*. 1998;4(12):1434-1437.

40. Mitchell GC, Wang Q, Ramamoorthy P, Whim MD. A common single nucleotide polymorphism alters the synthesis and secretion of neuropeptide Y. *J Neurosci.* 2008;28(53):14428–14434.
41. Sjöholm LK, Melas PA, Forsell Y, Lavebratt C. PreproNPY Pro7 protects against depression despite exposure to environmental risk factors. *J Affect Disord.* 2009;118(1-3):124-130.
42. Zhu G, Pollak L, Mottagui-Tabar S, Wahlestedt C, Taubman J, Virkkunen M, Goldman D, Heilig M. NPY Leu7Pro and alcohol dependence in Finnish and Swedish populations. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27(1):19-24.
43. Zill P, Preuss UW, Koller G, Bondy B, Soyka M. Analysis of single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the neuropeptide Y gene: no evidence for association with alcoholism in a German population sample. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(3):430-434.
44. Kauhanen J, Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, Tuomainen TP, Uusitupa MI, Salonen JT. Neuropeptide Y polymorphism and alcohol consumption in middle-aged men. *Am J Med Genet.* 2000;93(2):117-121.
45. Lappalainen J, Kranzler HR, Malison R, Price LH, Van Dyck C, Rosenheck RA, Cramer J, Southwick S, Charney D, Krystal J, Gelernter J. A functional neuropeptide Y Leu7Pro polymorphism associated with alcohol dependence in a large population sample from the United States. *Arch Gen Psychiatry.* 2002;59(9):825-831
46. Makino K, Kataoka Y, Hirakawa Y, Ikeda A, Yamauchi A, and Oishi AR. A leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y was not identified in the Japanese population. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.* 2001;26(3):201-203.
47. Lindberg C, Koefoed P, Hansen ES, Bolwig TG, Rehfeld JF, Møllerup E, Jørgensen OS, Kessing LV, Werge T, Haugbøl TS, Wang AG, Woldbye DPD. No association between the 399 C>T polymorphism of the neuropeptide Y gene and schizophrenia, unipolar depression or panic disorder in a Danish population. *Acta Psychiatr Scand.* 2006;113(1):54–58.
48. Kim NS, Oh SM, Ko MM, Cha MH, Kang BK, Bang OS. Association of the C-399T promoter polymorphism of neuropeptide Y with susceptibility to ischemic stroke. *Clin Biochem.* 2009;42(16-17):1699-1704.

49. Lindell SG, Schwandt ML, Sun H, Sparenborg JD, Björk K, Kasckow JW, Sommer WH, Goldman D, Higley JD, Suomi SJ, Heilig M, Barr CS. Functional NPY variation as a factor in stress resilience and alcohol consumption in rhesus macaques. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(4):423-431.
50. Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y: a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*. 1982;296(5858):659-660.
51. Hökfelt T. Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*. 1991;7(6):867-879.
52. Gehlert DR. Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides*. 1999;33(5):329-338.
53. Small CJ, Bloom SR. Gut hormones as peripheral anti obesity targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004;3(5):379-388.
54. Heilig M, McLeod S, Brot M, Heinrichs SC, Menzaghi F, Koob GF, Britton KT. Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology*. 1993;8(4):357-363.
55. Heilig M, Widerlöv E. Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y. *Crit Rev Neurobiol*. 1995;9(2-3):115-136.
56. Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 1984;115(1):427-429.
57. Levine AS, Morley JE. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides*. 1984;5(6):1025-1029.
58. Hansel DE, Eipper BA, Ronnett GV. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature*. 2001;410(6831):940-944.
59. Hansel DE, Eipper BA, Ronnett GV. Regulation of olfactory neurogenesis by amidated neuropeptides. *J Neurosci Res*. 2001;66(1):1-7.
60. Shi TJ, Tandrup T, Bergman E, Xu ZQ, Ulfhake B, Hökfelt T. Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57 BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression. *Neuroscience*. 2001;105(1):249-263.
61. Shi TJ, Cui JG, Meyerson BA, Linderoth B, Hökfelt T. Regulation of galanin and neuropeptide Y in dorsal root ganglia and dorsal horn in rat

- mononeuropathic models: possible relation to tactile hypersensitivity. *Neuroscience*. 1999;93(2):741-757.
62. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10931–10935.
 63. Kasuya E, Mizuno M, Watanabe G, Terasawa E. Effects of an antisense oligodeoxynucleotide for neuropeptide Y mRNA on in vivo luteinizing hormone-releasing hormone release in ovariectomized female rhesus monkeys. *Regul Pept*. 1998;75-76:319-325.
 64. Woldbye DP, Larsen PJ, Mikkelsen JD, Klemp K, Madsen TG, Bolwing TG. Powerful inhibition of kainic acid seizures by neuropeptide Y via Y5 –like receptors. *Nat Med*. 1997;3(7):761-764.
 65. Pedrazzini T, Seydoux J, Künstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F, Brunner HR. Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat Med*. 1998;4(6):722-726.
 66. Lopez-Valpuesta FJ, Nyce JW, Griffin-Biggs TA, Ice JC, Myers RD. Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proc Biol Sci*. 1996;263(1372):881-886.
 67. Gribkoff VK, Pieschl RL, Wisialowski TA, van den Pol AN, Yocca FD. Phase shifting of circadian rhythms and depression of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus by neuropeptide Y: mediation by different receptor subtypes. *J Neurosci*. 1998;18(8):3014-3022.
 68. Harrington ME, Schak KM. Neuropeptide Y phase advances the in vitro hamster circadian clock during the subjective day with no effect on phase during the subjective night. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000;78(2):87-92.
 69. Yannielli PC, Harrington ME. Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides*. 2001;22:547-556.
 70. Hu Y, Dunbar JC. Intracerebroventricular administration of NPY increases sympathetic tone selectively in vascular beds. *Brain Res Bull*. 1997; 44: 97-103
 71. Chen SH, Cheung RT. Neuropeptide Y and its receptor analogs differentially modulate the immunoreactivity for neuronal or endothelial nitric oxide synthase in the rat brain following focal ischemia with reperfusion. *Journal of Biomedical Science*. 2005;12(2):267-278.

72. Cavadas C, Silva AP, Mosimann F, Cotrim MD, Riberio CA, Brunner HR, Grouzmann E. NPY regulates catechoamine secretion from adrenal chromaffin cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5956-5963.
73. Ericson A, Schalling M, McIntyre KR, Lundberg JM, Larhammar D, Seroogy K, Hökfelt T, Persson H. Detection of neuropeptide Y and its mRNA in megakaryocytes: enhanced levels in certain autoimmune mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(16):5585-5589.
74. Myersen U, Ahren B, Sundler F. Neuropeptide Y is expressed in subpopulations of insulin- and non-insulin-producing islet cells in rat after dexamethasone treatment: a combined immunocytochemical and in situ hybridisation study. *Regul Pept.* 1995;60(1):19-31.
75. Strand FL. Neuropeptides: general characteristics and neuropharmaceutical potential in treating CNS disorders. *Prog Drug Res.* 2003;61:1-37.
76. Wettstein JG, Earley B, Junien JL. Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol Ther.* 1995;65(3):397-414.
77. Morales-Medina CJ, Dumont Y, Quirion R. A possible role of neuropeptide Y in depression and stress. *Brain Research.* 2009;1314:195-205.
78. Silva AP, Cavadas C, Grouzmann E. Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets. *Clin Chim Acta.* 2002;326(1-2):3-25.
79. Larson MG, Atwood LD, Benjamin EJ, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, Fox CS, Govindaraju DR, Guo CY, Heard-Costa NL, Hwang SJ, Murabito JM, Newton-Cheh C, O'Donnell CJ, Seshadri S, Vasani RS, Wang TJ, Wolf PA, Levy D. Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes. *BMC Med Genet.* 2007;8 Suppl 1:S5.
80. Koehnke MD, Schick S, Lutz U, Willecke M, Koehnke AM, Kolb W, Gaertner I. Severity of alcohol withdrawal symptoms and the T1128C polymorphism of the neuropeptide Y gene. *J Neural Transm.* 2002;109(11):1423-1429.
81. Okahisa Y, Ujike H, Kotaka T, Morita Y, Kodama M, Inada T, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. Association between neuropeptide Y gene and its receptor Y1 gene and methamphetamine dependence. *Psychiatr Clin Neurosci.* 2009;63(3):417-422.
82. Thiele TE, Marsh DJ, Ste Marie L, Bernstein IL, Palmiter RD. Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. *Nature.* 1998;396(6709):366-369.

83. Thorsell A. Central neuropeptide Y in anxiety- and stress-related behavior and in ethanol intake. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1148:136-140.
84. Woldbye DP, Ulrichsen J, Haugbøl S, Bolwig TG. Ethanol withdrawal in rats is attenuated by intracerebroventricular administration of neuropeptide Y. *Alcohol Alcohol.* 2002;37(4):318-321.
85. Ding B. Distribution of the NPY 1128C allele frequency in different populations *J Neural Transm.* 2003;110(11):1199-1204.
86. Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci.* 2001;21(23):9506-9518.
87. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc Acid Res.* 1988;16(3):1215.
88. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via Polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods In Enzymology.* 1987;155:335-350.
89. Krysiak R, Obuchowicz E, Herman ZS. Interactions between the neuropeptide Y system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Endocrinol.* 1999;140(2):130-136.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Çorum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Çorum'da tamamladı. Muğla Üniversitesi Fen–Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2003 yılında mezun olduktan sonra yine Muğla Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü'nde Tezsiz Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Moleküler Genetik ve Hematoloji Tanı Biriminde 2007 yılından bu yana çalışmaktadır.