

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
ADLI TIP ENSTİTÜSÜ**

**Danışman: Doç. Dr. E. Hülya Yükseloğlu**

**ON SNP LOKUSUNUN GENETİK POLİMORFİZMİNİN NİKOTİN  
BAĞIMLILIğI İLE İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

**FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOMÜH. ALPEN ORTUğ**

**İSTANBUL, 2017**

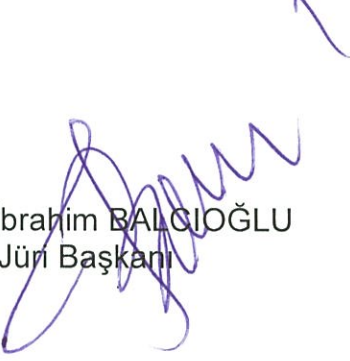
**İ.Ü. ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Alpen ORTUĞ' un

“On SNP Lokusunun Genetik Polimorfizminin Nikotin Bağımlılığı İle İlişkilendirilmesi”

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçene tezinde gerekli düzeltmeleri yapmak üzere 3 ay süre verilmesine ve yeniden tez savunması yaptırılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

  
Prof. Dr. İbrahim BALÇIOĞLU  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Ü Naci GÜNDOĞMUŞ  
Üye

  
Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU  
Danışman

  
Yrd. Doç. Dr. Özlem BÜLBÜL  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT  
Üye

İstanbul, 12 Temmuz 2017

**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Alpen ORTUĞ'un,

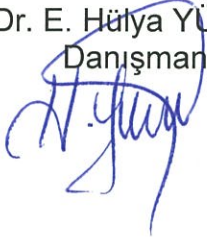
**“On SNP Lokusunun Genetik Polimorfizminin Nikotin Bağımlılığı İle İlişkilendirilmesi”**

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine 2.kez tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir

  
Prof. Dr. İbrahim BALCIOĞLU  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Ü. Naci GÜNDOĞMUŞ  
Üye

  
Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU  
Danışmanı

  
Yard. Doç. Dr. Özlem BÜLBÜL  
Üye

  
Yard. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT  
Üye

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.

Alpen ORTUĞ

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 26736

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında, Yüksek lisans eğitimim boyunca verdiği destek ile bu tezin gerçekleşmesini mümkün kılan değerli tez danışmanım,

Doç. Dr. Hülya Emel YÜKSELOĞLU'NA,

Başta İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü müdürü Prof. Dr. Faruk AŞICIOLU ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı kıymetli hocam Prof Dr. Salih CENGİZ'e ve enstitüdeki tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Fatma ÇAVUŞ ve Ömer KARATAŞ'A

Özellikle tez konuma verdiği katkıları ve emekleri sebebiyle hocam

Yard. Doç. Dr. Özlem BÜLBÜL'e

Laboratuar bilgisini ve sonsuz yardımlarını esirgemeyen sevgili

Gülten RAYİMOĞLU'na,

Çalışmamın son haline gelmesindeki önemli katkıları için Uzm. Dr. Zafer Liman, Arzu Düvenci ve Çağrı Çakıcı'ya, manevi destekleri için Bahar Tekin, Elif Kon ve Ayşe Kaya'ya,

Bütün hayatım boyunca olduğu gibi bu çalışmam sırasında da göstermiş olduğu anlayış ve tüm destekleri ile yoluma hep ışık tutan babam Prof. Dr. Gürsel Ortuğ'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Alpen Ortuğ

İstanbul

11.07.2017

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK .....	3
2.1.1. Genetik Çeşitlilik .....	3
2.1.1.1. Polimorfizmler .....	3
2.2. TARİHSEL SÜREÇ İÇERİSİNDE ADLİ BİLİMLERDE KULLANILAN DNA ANALİZ SİSTEMLERİ.....	4
2.3. SNP (Single Nucleotide Polimorfizm- Tek Nükleotid Polimorfizmi).....	7
2.3.1. Adli Bilimlerde SNP Kullanımı .....	8
2.4. ADLİ DNA FENOTİPLEME .....	9
2.5. SNP ANALİZİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER .....	10
2.5.1. Alel Spesifik Hibridizasyon (ASH) .....	11
2.5.2. Primer Uzaması Reaksiyonu .....	12
2.5.2.1. Alel-Spesifik Uzama Reaksiyonu .....	12
2.5.2.2. Pirosekanslama.....	12
2.5.2.3. Minisekanslama.....	12
2.5.3. Alel Spesifik Oligonükleotid Bağlama (Ligasyon).....	14
2.5.4. İnvazif Kesilme .....	15
2.5.5. Ion Torrent Teknolojisi .....	15
2.6. SNP ANALİZİNDE KULLANILAN TESPİT YÖNTEMLERİ.....	15
2.6.1. Homojen Yöntemler.....	17
2.6.1.1. FRET (Floraslan Rezonans Enerji Transferi).....	17
2.6.1.2. Florasan Polarizasyon (FP) .....	17

2.6.2. Katı-Faz-Yardımlı Yöntemler.....	18
2.6.2.1. MS (Mass spectrometry- Kütle spektrometrisi).....	18
2.6.2.2. Mikroarray.....	19
2.6.2.3. Floresan kodlu mikrobead.....	20
2.6.2.4. Elektroforez.....	20
2.7. YENİ NESİL DİZİLEME (Next Generation Sequencing).....	21
2.7.1. Adli Bilimlerde YND'nin Kullanımı.....	22
2.8. BAĞIMLILIKLAR VE GENETİK ALTYAPISI.....	23
2.8.1. Psikiyatrik Bozuklukların Sınıflandırılması Hakkında Genel Bilgiler.....	24
2.8.1.1. Nikotin bağımlılığının bu kriterlere göre sınıflandırılması.....	25
2.8.2. Nikotin Bağımlılığı.....	26
2.8.3. Adli bilimler ve bağımlıklar.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. DNA izolasyonu.....	29
3.2. DNA miktarının belirlenmesi.....	30
3.3. Multipleks PCR aşaması.....	31
3.3.1. Primer dizaynı.....	31
3.3.2. PCR Primer Karışımının Hazırlanması.....	33
3.3.3. PCR Bileşenlerinin Hazırlanması.....	34
3.3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	34
3.4. İkinci PCR- (SnaPshot Reaksiyonu).....	35
3.4.1. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	38
3.4.2. İkinci PCR Ürünlerinin Elektroforezi ve Değerlendirme.....	38
3.4.2.1. Elektroforez İşlemi için Parametre Tayini.....	38
3.4.2.2. SNaPshot Reaksiyon Ürünlerinin Elektroforeze Hazırlanması.....	39
3.4.2.3. Elde Edilen Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak incelenmesi.....	45
4.1.1. İstatistiksel İncelemeler.....	52
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ.....	58
7. ÖZET.....	59
8. SUMMARY.....	60



9. KAYNAKLAR .....	61
FORMLAR .....	72
ETİK KURUL ONAYI.....	77
ÖZGEÇMİŞ .....	78



## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 SNP'lerin değerlendirilmesinde kullanılan metodlar (34) .....	11
Tablo 2.2 Floresan boya ile işaretli ddNTP'le (ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokolden alınmıştır.) .....	14
Tablo 2.3: DSM-V sınıflandırmasına göre nikotin yoksunluk kriterleri (80).....	26
Tablo 3.1 Tasarlanan primerlerin rs kodları, forward (F), reverse (R) dizileri ve amplicon uzunlukları .....	32
Tablo 3.2 Multipleks PCR için kullanılan primerlerin miktar tablosu .....	33
Tablo 3.3 Birinci PCR karışım tablosu .....	34
Tablo 3.4 Multipleks PCR döngü programı.....	34
Tablo 3.5: İkinci PCR primerleri ve uzunlukları .....	36
Tablo 3.6 SNaPshot PCR karışım tablosu .....	37
Tablo 3.7 SNaPshot reaksiyon döngüsü .....	37
Tablo 3.8 GeneScan E5 modül parametreleri aşağıda gösterilmiştir.....	39
Tablo 4.1: SNaPshot multipleks kiti pozitif kontrol reaksiyonunda beklenen sonuçlar. 41	
Tablo 4.2: Seçilen 25 örneğe ait elde edilen genotip tablosu. (Pasif sigara kullanımı, kullanılmaması anlamındadır) .....	43
Tablo 4.3: Sigara Kullanımına Göre rs16969968 Lokusu Değerlendirmesi .....	45
Tablo 4.4: Sigara Kullanımına Göre rs806380 Lokusu Değerlendirmesi .....	46
Tablo 4.5: Sigara Kullanımına Göre rs3025343 Lokusu Değerlendirmesi .....	47
Tablo 4.6: Sigara Kullanımına Göre rs6265 Lokusu Değerlendirmesi .....	47
Tablo 4.7: Sigara Kullanımına Göre rs1051730 Lokusu Değerlendirmesi .....	48
Tablo 4.8: Sigara Kullanımına Göre rs6474412 Lokusu Değerlendirmesi .....	48
Tablo 4.9: Sigara Kullanımına Göre rs3733829 Lokusu Değerlendirmesi .....	49
Tablo 4.10: Sigara Kullanımına Göre rs2184026 Lokusu Değerlendirmesi .....	50
Tablo 4.11: Sigara Kullanımına Göre rs1329650 Lokusu Değerlendirmesi .....	51
Tablo 4.12: Sigara Kullanımına Göre rs1801272 Lokusu Değerlendirmesi .....	52
Tablo 5.1 Sigara bağımlılığı ile rs16969968, rs1051730 noktalarının bildirilen asosiyasyonu .....	56

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 PCR işleminin basamakları (12) ( <a href="https://experiment.com/u/hzQTnQ">https://experiment.com/u/hzQTnQ</a> ).....	5
Şekil 2.2 VNTR ve DNA parmakizinin temsili gösterimi (17) <a href="http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch22/VNTR.html">http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch22/VNTR.html</a> .....	6
Şekil 2.3 Alelik ayırım yöntemlerinin şeması (34).....	16
Şekil 2.4 FRET ve FP yöntemlerinin şematik gösterimi (36).....	18
Şekil 2.5 Yeni Nesil Dizileme metodlarının özellikleri (54) .....	22
Şekil 4.1 SNaPshot Multipleks Kit pozitif kontrol reaksiyonu sonucu elektroforegramı.....	40
4.4: Dört aktif sigara bağımlısı örnekte tüm lokusların multiplex görüntüsü (Pembe sütunlar ‘pull-up peak’leri göstermektedir) .....	42
Şekil 4.5: <i>rs16969968</i> Lokusu dağılımları .....	45
Şekil 4.6: <i>rs806380</i> Lokusu dağılımı .....	46
Şekil 4.7: <i>rs6474412</i> Lokusu dağılımı .....	49
Şekil 4.8: <i>rs3733829</i> Lokusu dağılımı .....	50
Şekil 4.9: <i>rs1329650</i> Lokusu dağılımı .....	51

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

<b>A</b>	Adenin
<b>ASO</b>	Alel spesifik oligonükleotid hibridizasyon
<b>ATP</b>	Adenozin tri fosfat
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>C</b>	Sitozin
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dATP</b>	Deoksiadenozin trifosfat
<b>dCTP</b>	Deoksisitozin trifosfat
<b>dGTP</b>	Deoksiguanin trifosfat
<b>dTTP</b>	Deoksitimin trifosfat
<b>ddNTP</b>	Dideoksiribonükleotid trifosfat
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotid trifosfat
<b>Ekzo I</b>	Ekzonükleaz I
<b>FP</b>	Floresan polarizasyon
<b>FRET</b>	Floresan rezonans enerji transferi
<b>G</b>	Guanin
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High-performance liquid chromatography)
<b>MALDI-TOF</b>	Matriks destekli lazer ayrılma/uçusun iyonizasyon zamanı (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum klorür
<b>MS</b>	Kütle spektrofotometresi (mass spectrofotometry)
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu (polimerase chain reaction)
<b>RFLP</b>	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphisms)
<b>Rpm</b>	Revolutions per minute (dakikadaki devir)
<b>rRNA</b>	Ribozomal RNA

<b>SAP</b>	Shrimp (karides) alkalın fosfataz
<b>SBE</b>	Tek baz uzaması (single base extension)
<b>SNP</b>	Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism)
<b>STR</b>	Kısa Tekrar Dizileri (Short tandem repeats)
<b>T</b>	Timin
<b>T<sub>m</sub></b>	Primer bağlanma sıcaklığı
<b>tRNA</b>	Transfer RNA
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>VNTR</b>	Değişken Sayılı Bitişik Tekrarlar (Variable Number Tandem Repeat)
<b>YND</b>	Yeni Nesil Dizileme



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde adli bilimler alanı, suçlu ve suç tiplerinin artış ve gelişimine paralel olarak daha fazla bilgi ve teknoloji kullanımına gerek duymakta, her geçen gün genişleyen bir çalışma alanına yayılmakta ve hızla kendisini geliştirmektedir. Bu gelişmeler doğrultusunda bulunan yeni teknikler çağdaş hukuk sisteminin adli bilimlerden beklentilerini arttırmakta ve daha kesin sonuçlar talep etmesine sebep olmaktadır. Biyolojik materyaller üzerinde DNA testi yapılması adli bilimdeki gelişmelerin en önemlilerinden birini oluşturmaktadır. Çoğu zaman çok az miktardaki biyolojik delil DNA testi için yeterli olmakta ve bu da olay yeri inceleme görevlileri ve kriminal laboratuvarlar için DNA'nın önemini daha da arttırmaktadır. DNA testi ile faili meçhul cinayetlerin aydınlatılmasında, toplu felaket kimliklendirmelerine, babalık-annelik davalarından çok çeşitli suç olgularına kadar farklı alanlarda yararlanılmaktadır. Ancak DNA teknolojisi de kendi içerisinde hata payını çok daha aza indirmek, şüphelileri sınırlamak ve adalete en iyi şekilde yardımcı olmak için ilerleme ve gelişme kaydetmektedir.

Suçta eğilim gösteren kişilerin ortak kişilik özellikleri vardır. Bu özelliklerin tanınması, suç işlemeden onlara yardımcı olma fırsatı verebilir. Bağımlılık; kişinin normal fizyolojik fonksiyonlarını ancak belli bir madde varlığında sürdürebilmesidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) madde bağımlılığını “kullanılan bir psikoaktif maddeye kişinin daha önceden değer verdiği diğer uğraşlardan ve nesnelere belirgin olarak daha yüksek bir öncelik tanıma davranışı” olarak tanımlar. Diğer bir deyişle madde kullanımı bireye ve topluma zarar verici düzeyde bir davranış haline gelir. Sigara içme veya dumanının solunması zamanla kişide psikolojik ve fiziksel bağımlılık oluşturur. Tütünde esas bağımlılık yapan madde nikotindir. Sigara, daha çok alışkanlık yapıcı daha az zevk verici bir bağımlılık türü olarak kabul edilmektedir. Dünyada ve ülkemizde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Eroin ve kokain gibi yasadışı bağımlılık yapan maddeler kadar etkili olması sebebiyle bağımlılık yapıcı maddelerin yasal basamağını oluşturmaktadır. Aynı zamanda adli psikiyatrinin de önemli bir çalışma alanıdır.

Buna ek olarak adli bilimlerde DNA teknolojilerinin kendi içerisindeki ilerleme ve gelişmeleri son dönemde DNA fenotipleme çalışmalarına ağırlık verilmesi şeklinde kendini göstermektedir. Adli DNA fenotipleme çok ilginç yeni bir araştırma yöntemidir. Kişinin ait olduğu jeografik bölge, dış ve davranışsal özellikleri de dahil olmak üzere olay yerinden alınan DNA'nın bir açıklama oluşturacak şekilde kullanılmasını hedeflemektedir. Bu noktada kişinin sahip olduğu davranışsal özelliklere başta nikotin ve daha ileriki çalışmalarda da diğer bağımlılık çeşitleri olmak üzere tanımlama sağlanması adli bilimler açısından son derece önemli bir ipucu olma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı da rasgele seçilmiş olan 50 kontrol ve 50 nikotin bağımlısı üzerinde 10 SNP lokusu (rs2273504, rs806368, rs2023239, rs806380, rs324420, rs2184026, rs16969968, rs1051730, rs4950, rs686) çalışılarak genetik polimorfizmleri incelemek ve ayrıca sigara bağımlılığı arasında bir ilişki olup olmadığını saptamaktır. Bu anlamda prediktif tanımlama sağlamaya da yardımcı olmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK

Biyolojik çeşitlilik başka bir deyişle biyoçeşitlilik, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar da dahil olmak üzere doğayı oluşturan tüm komponentlerin tür içi çeşitliliğini, birbirleri ve çevre ile olan ilişkilerini tanımlar (1).

Biyolojik çeşitlilik üç ana başlıkta incelenmektedir. Bunlar;

- Ekosistem çeşitliliği
- Tür çeşitliliği
- Gen çeşitliliği olarak belirtilmektedir. (2)

#### 2.1.1. Genetik Çeşitlilik

Belli bir türün kendi popülasyonu ve diğer popülasyonlar ile olan farklılıklarını temsil eder. Yani genetik çeşitlilik aynı türdeki farklı popülasyonları kapsayabileceği gibi bir popülasyonun kendi içindeki genetik varyasyonlarını da kapsayabilir (2).

Genetik çeşitlilik ve varyasyon sebebiyle türler, evrimsel süreçte adaptasyon, buldukları ortama uyum ve doğal seçimde daha güçlü olmalarına olanak veren alel varyasyonlarına sahip olmuşlardır (2). Herhangi bir genetik karakteri belli eden kromozomların karşılıklı bölgelerindeki gen çiftlerine alel adı verilmektedir.

Bir popülasyonun genetik çeşitliliği; bir genom üzerindeki polimorfik lokusların oranı ile ölçülür (2).

##### 2.1.1.1. Polimorfizmler

Yunanca çok anlamına gelen 'poly' ve biçim anlamına gelen 'morphe' kelimelerinden türemiş olan polimorfizm, kelime anlamı olarak 'çokbiçimliliği' ifade eder (3).

Günümüzde, özellikle popülasyon genetiğindeki terminolojik anlamı ise, toplumda en az %1 oranında görülen genetik varyasyonlardır. Bir lokusta oluşan herhangi bir mutasyonun zaman içinde genetik sürüklenme veya doğal seçim gibi olaylar sonucunda toplumun en az %1 'inde varolması ile oluşur (4). Polimorfizmler, bir veya daha fazla bazın diziye katılması (insersiyon), diziden baz eksilmesi (delesyon) veya bir bazın diğeri ile yer değiştirmesi (substitüsyon) gibi birçok yolla oluşabilir (5). Ancak; bahsedilen bu popülasyon içerisinde, bu lokusla ilgili iki veya daha fazla allelin



bulunması durumunda polimorfizm olarak isimlendirilebilir. Allel sayısının artışı o populasyon için polimorfizmin de yükselmesi ile karakterizedir. ABO kan grupları, Rh faktörü ve MHC proteinleri, insanlar için en bilinen polimorfizmlerden sayılabilir (6).

Polimorfizmlerin, populasyon genetiği çalışmaları ve antropolojik araştırmalarda kullanılabilirliğinin yanısıra klinikte bir bireyin hastalığa yatkınlığı-yakalanma riski, hastalığa verdiği cevap veya farmakolojik preparatlara oluşturduğu tepkilerin gözlenmesinde kullanılabilirdiği de çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (7). Günümüzde ise genetik polimorfizm, adli bilimler için çok önemli bir yer edinerek, ‘genetik markır’ olarak kullanılmakta ve ‘DNA parmak izi (dna fingerprinting)’ metodu ile olay mahallinde bulunan numunelerin değerlendirilmesine ve kimliklendirme yapılmasına olanak sunmaktadır (8).

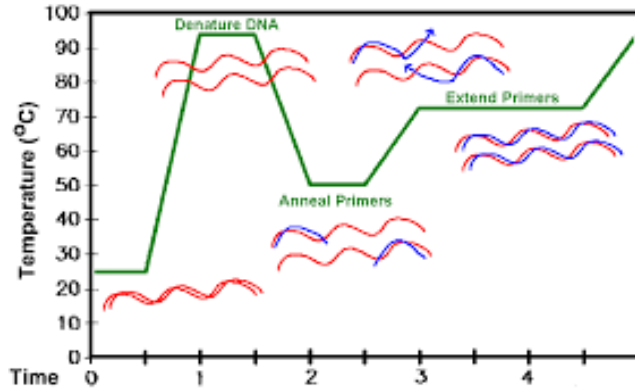
## **2.2. TARİHSEL SÜREÇ İÇERİSİNDE ADLİ BİLİMLERDE KULLANILAN DNA ANALİZ SİSTEMLERİ**

Kimliklendirme çeşitli yüzeyler üzerindeki biyolojik materyalin aidiyetini bulma amacı ile yapılır. Geçmişten günümüze kimliklendirme sistemleri 1800’lü yılların sonlarında Fransız antropolog Alphonse Bertillon’un (1853-1914) kemik boyutlarını ölçmek ve kaydetmek için geliştirdiği antropolojik yöntemlere uzanır. Yaklaşık 30 yıl kullanılan bu yöntem yerini dertamoglifig yöntemlere bırakmıştır. 1901 yılında Karl Landsteiner’in keşfettiği ABO kan grubu sistemi serolojik kimliklendirme metodlarının başlangıcı olmuştur. 1937 yılında ise, kandaki antijen-antikor reaksiyonları ile, genetik olarak aktarılan ABH, MN, Rh, ve Gm antijenleri bulunmuştur. Böylece populasyonda %80’lere ulaşan bir ayırım gücü sağlanmıştır. 1950’lilerde bu sistemlere ek olarak polimorfik enzimler ve proteinler ile insan lökosit antijenleri (HLA-A, -B, -C, -DR, – DQ) kimliklendirme ve nesep tayininde kullanılmaya başlanmış ve ayırım gücü %99’un üzerine yükselmiştir. Bu sistemlerle yeterli miktarda ve taze örneklerde sorun yaşanmaz iken, özellikle örneklerin ısı, güneş ışığı, nem, bakteriyel ajanlarla bozularak parçalanması ve örnek miktarının yetersiz olduğu çoğu durumda tanımlandırma yapılamamaktadır.

DNA’nın adli bilimlerde kullanımı; ilk defa 1985 yılında Dr. Alec Jefferys’in University of Leicester’da, RFLP (Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi-Resctriction Fragment Length Polymorphism)’yi bulmasına dayanır(8). DNA’nın değişik sayıda tekrar eden ve her bireyde farklı olan dizilere sahip olduğunu

göstermiştir. Bu çalışma ile, tekrar dizilerinin yalnızca tek yumurta ikizlerinde aynı olduğunu, bunun dışında herkes için ayırım sağlayabileceğini rapor etmiştir (9). Bu, değişken sayıdaki ardışık tekrarlar yapan lokuslardaki polimorfizm ard arda tekrarlanan belirli baz dizisinin kişiden kişiye değişmesi esasına dayanır. Jeffery's'in 1986'daki başarılı kullanımından sonra doku örnekleri için de kullanılmaya başlanmıştır. Ancak degrede örneklerde çalışılmaması adli tıp laboratuvarları için avantajlı olmamıştır (10).

Adli bilimlerde kimliklendirme ve moleküler biyolojinin en önemli dönüm noktası 1987 yılında Kary Mullis tarafından PCR (Polymerase chain reaction-polimeraz zincir reaksiyonu)'in keşfedilmesidir (11). DNA diagnostik ile ilişkili her alanda kullanım avantajı bulunan bu tekniğin uygulaması kolay ve hızlıdır. Yöntemin esası, genelde nanogram düzeyinde az miktardaki kalıp DNA'nın istenen bölgesinin in vitro koşullarda enzimatik reaksiyonlarla çoğaltılmasıdır. Bu çoğaltıma amplifikasyon adı verilir. Denaturasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere üç aşamadan oluşur (11). İlgili basamaklar Şekil 2.1 de görüldüğü gibidir.

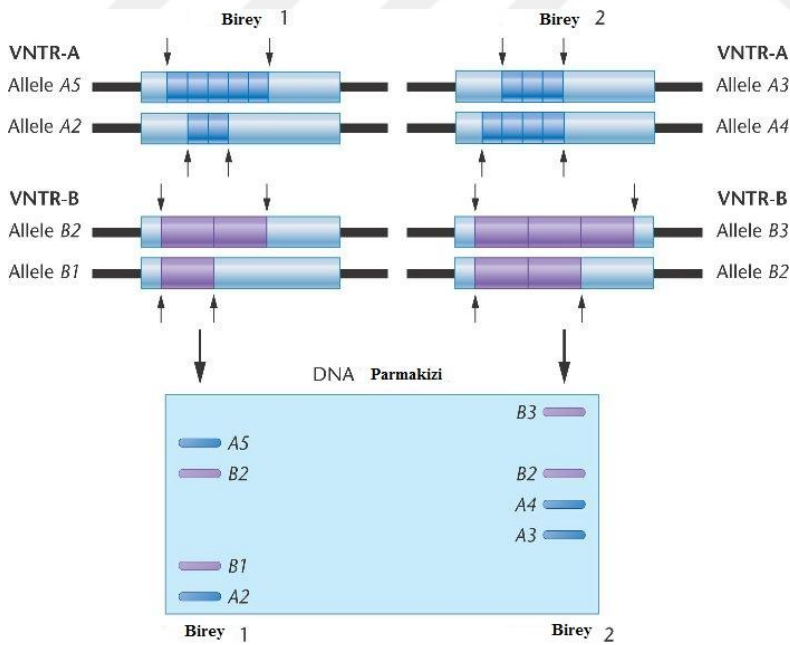


**Şekil 2.1 PCR işleminin basamakları (12) (<https://experiment.com/u/hzQTnQ>)**

PCR tekniğinin özellikle adli bilimler için kullanım avantajı halihazırda çok az miktarda elde edilebilen biyolojik örneklerin çoğaltımına imkan vermesidir. Krimal olaylarda kişiye ait herhangi bir materyalden dahi elde edilebilecek DNA'nın (örneğin sigara filtresi, giysilerdeki kan lekesi vb.) PCR metodu ile çoğaltılması delillerin değerlendirilme oranında artış olmasını sağlamıştır (13). PCR'daki amaç DNA'nın

tamamını kopyalamak değil yalnızca amaca uygun bölgeleri seçerek, o kısımları çoğaltmaktır.

PCR adli bir vakanın değerlendirilmesinde ilk defa 1986 yılında HLA-DQA1 lokusunu çoğaltmak için kullanılmıştır (10). Bunu takiben VNTR (Variable Number Tandem Repeat- Değişken Sayılı Bitişik Tekrarlar) lokusları bu metod kullanılarak tiplendirilmiştir (14). Bu polimorfizmler otozomal kromozomlarda bulunabildiği gibi cinsiyet kromozomları üzerinde de bulunabilir. Y kromozomundaki polimorfik sahalar baba-oğul tespiti için önem arz eder. Evvelce değinildiği üzere DNA parmakizi DNA tekrar dizilerinin sayısındaki farklılıktan kaynaklanır ve buna minisatellit adı verilir (15). Minisatellit DNA, herhangi bir türün DNA'sında GC nükleotid oranının santrifüjlenerek belirlenen yoğunluğunu temsil eder. Bu yolla tetkik edilen DNA'nın ilgili kısmı homojen bir bant biçiminde gözlemlenir. Minisatellit dizileri 2-100 nükleotid uzunluğunda olabilir. VNTR lokusları görece daha büyüktür ve bu da degrede örneklerde başarı oranını azaltmıştır. Multipleks uygulamalara da müsait değildir. Bu sebeplerle adli bilimlerde kullanımı dezavantajlı olmuştur (16).



Şekil 2.2 VNTR ve DNA parmakizinin temsili gösterimi (17)

<http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch22/VNTR.html>

VNTR zamanla yerini bir alt grubu olan STR (short tandem repeat-kısa ardışık tekrar dizinleri, mikrosatellitler) polimorfizmine bırakmıştır. 1990'ların başında tanımlanan STR'lar hızla kimliklendirme çalışmalarında uygulanmaya başlamıştır (10). Multiallelik olan STR'lar 2-6 nükleotid gibi oldukça kısa DNA dizisinin değişken sayıdaki tekrarından oluşur. Tespiti PCR metodunu takiben jel elektroforez ve floresan işaretlerin ilgili cihazda okunması ile olur.

Avrupa, Kanada ve Amerika'ya ait adli laboratuvarlar standart STR lokusları ve varyant allelleri bulmaya yönelik araştırmalar yapmıştır. Bu alanda kullanılan ilk dört lokuslu multipleks STR sistemini (TH01, VWA, FES/FPS ve F13A1) FSS (The Forensic Science Service) geliştirmiştir. Günümüzde İngiltere'de FSS'in oluşturduğu 10 STR lokusu ve cinsiyet belirlenmesinde kullanılan amelogenini içeren sistem kullanılmaktadır (18).

Standardizasyon çalışmalarının sonucunda veritabanları oluşturulmuştur. Veritabanları buldukları ülkeye göre değişiklik göstermektedir. CODIS (Combined DNA Index System) 1990 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde FBI tarafından saptanan 13 STR (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, CSF1PO, TH01, TPOX, D16S539) lokusunu içerir. Sistemde cinsel istismar, cinayet, çocuk tacizi gibi suçlardan cezası kesinleşmiş kişilerin bilgileri bulunmaktadır (18).

Avrupa ülkelerinin de kendilerine ait DNA veritabanları bulunmaktadır. Ülkemizde ise DNA veritabanının kurulmasına ilişkin çalışmalar devam etmekte olup konu ile ilgili "DNA Verileri ve Millî DNA Veri Bankası Kanunu Tasarısı" 2007 yılında Adalet Bakanlığı tarafından hazırlanmış ancak henüz kabul görmemiştir.

### **2.3. SNP (Single Nucleotide Polimorfizm- Tek Nükleotid Polimorfizmi)**

Tek nükleotid polimorfizmleri insan genetik varyasyonunun en sık rastlanan şeklidir. Her bir SNP, tek bir insandaki küçük bir varyasyon ve/veya farklılığı temsil eder. DNA'nın tıbben ilgili varyasyonları sıklıkla nükleotidin tek değişiklikleri şeklinde görülür.

Her 300/500 nükleotidde bir SNP tespit edilebilir ve sonuç olarak DNA düşünüldüğünde her insan için 'normal' varyasyon kabul edilebilir (19). SNP'ler transisyon veya transversiyon adı verilen iki farklı şekilde olabilir. Bir pürin (A,G) bazı diğer bir pürine veya tam tersi bir pirimidin (C,T) bazı bir diğer pirimidin bazına

dönüşüyorsa bu transisyon olarak adlandırılmaktadır. Bir pürin bazı pirimidine veya pirimidin pürine dönüşüyorsa buna da transversiyon olarak tanımlanmaktadır. Bunların dışında tek baz insersiyonu veya delasyonu şeklinde de olduğu kaynaklarda yer alsa da SNP'lerin büyük kısmını transisyonların oluşturduğu belirtilmektedir (20).

ABD'de; Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi (NCBI- National Center for Biotechnology Information) ve Ulusal İnsan Genomu Araştırma Merkezi (NHGRI- National Human Genome Research Institute) işbirliği ile kısa genetik varyasyonların veritabanı olan dbSNP kurulmuştur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). İnsan veritabanının günümüzdeki sürümü RS (refSNP kümelerinin numaraları) numaraları ile sınıflandırılmış 53,558,214 birbirinden farklı varyant içermektedir. dbSNP yalnızca tek baz varyasyonlarını değil küçük delesyonları, insersiyon polimorfizmlerini (indeller), mikrosatellit markırları ve diğer çoklu küçük-oranlı varyasyonları içermektedir. Ancak veritabanı incelendiğinde RS girdilerinin %85'ini SNP'lerin oluşturduğu görülecektir.

Bu veritabanından başlayarak bu konuda yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere bu genetik varyantların çok büyük kısmı DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerinde yer almaktadır (21). Bu veri, DNA'nın transkripsiyon yapmayan bölgelerinin fenotipi nasıl etkilediği sorusunu ortaya çıkarmıştır. SNP'lerin çok az bir yüzdelik kısmı genlerin hem intron hem eksonlarında bulunur ve bu bölgelerde genin fonksiyonuna veya hastalık indüksiyonu ve/veya ilerlemesine direk etkisini yorumlamak daha kolaydır (22,23). Bu durumda SNP'nin gen bölgesinde olması durumunda bu genler tarafından kodlanan proteinlerin moleküler işlevlerini değiştirebilir. Bu proteinleri oluşumunda görevli kodonlarda değişikliğe uğratması sonucunda ise başka proteinlerin oluşmasına neden olabilir (24). DNA'nın kodlama yapan bölgesinde sessiz mutasyona sebep olan SNP'ler ise proteinlerin fonksiyonlarında değişiklik yapmadığından fenotipi etkilemez.

### **2.3.1. Adli Bilimlerde SNP Kullanımı**

SNP'ler çoğu insanda sadece iki baz varyantı olarak görülür ancak üç veya dört allelde görülenleri de vardır. Adli genetik açısından; STR'ler ve VNTR'lerden daha az polimorfik olmaları ve STR'lar ile elde edilebilen miktardaki bir bilgi için çok daha fazla sayıda SNP'ye ihtiyaç olması sebebiyle daha az bilgilendiricidir. İlerleyen zamanda seçilecek 50-100 otozomal SNP ile STR sisteminde kullanılan on bölgenin verdiği sonuçları elde etmek mümkün olacaktır. SNP tiplendirme 40-50 baz çifti kadar

küçük fragmanlarda yapılabilir. Bu nokta, özellikle yangın veya insan kalıntıları gibi DNA'nın çokça degrede olduğu suç ve kimliklendirme durumlarında kullanılabilirliği açısından önemlidir. Babalık veya özellikle göçmenlik davalarında da STR ve VNTR'lerden mutasyon oranı daha az olması sebebiyle avantajlıdır.

SNP'ler yalnızca nükleus genomunda bulunmaz. Babadan soyun erkek çocuklarına geçen Y kromozomunda ve anneden çocuklara tek geçişli kalıtılan mitokondriyal DNA (mtDNA)'da da bulunabilir. Buralardaki SNP'ler haplo-grup olarak kalıtılır. Bu sebeple evrimsel ve antopolojik genetik çalışmalarında, göç yolları haritalarının çıkartılmasında kullanılabilir (25).

#### **2.4. ADLİ DNA FENOTİPLEME**

Adli Bilimlerde, adli DNA analizinde kimliklendirme çalışmaları için STR'ların kullanımının altın standard olduğu belirtilmektedir (26). Ancak, DNA kimliklendirmenin bu mukayeseli yaklaşımında kişinin STR veya SNP profili halihazırda bilinmiyorsa uygulanabilir olmamaktadır. Kimliklendirme yapılmak istenen kişinin DNA veribankalarında profillerinin bulunmamasını yanı sıra, o kişi ile eşleştirme yapılacak bir DNA materyali de yok ise bu durumda sonuç almak neredeyse imkansız olmaktadır (26).

Mukayeseli DNA tiplendirmenin bu bahsedilen kısıtlamaları, adli genetik biliminde Adli DNA fenotiplendirme (FDP) adı verilen yeni bir gelişmeye yol açmıştır (27). Adli DNA fenotiplendirme donörün örneğin dışarıdan görülen karakteristik özelliklerini, olay yeri veya suç mahallinden elde edilecek DNA veya başka moleküler biyomarkırlardan elde etmeyi amaçlamaktadır. Esasen, Adli DNA fenotiplendirme verileri 'biyolojik tanık' olarak görev yapabilir ki bu da çoğunlukla çok tutarlı bilgiler sağlayamayan insan tanıklardan çok daha net sonuçlar verir (28). Böylelikle burada beklenen, konvansiyonel mukayeseli DNA tiplendirme çalışmaları ile tanımlanamayan failerin araştırılmasına öncü bilgiler sağlamasıdır. Aynı zamanda kayıp kişilerin kimliklendirilmesinde, kişinin ante-mortem örneklerine veya akrabalarına ulaşamadığında da yardımcı olması beklenmektedir.

Biyo-coğrafik ataların DNA çıkarımlarının yapılması da kısmen Adli DNA fenotiplendirmenin bir parçası olarak düşünülse de özellikle de karışık genetik soylar söz konusu olduğunda her zaman dışarıdan görülen karakteristikler sergilemezler.

DNA'dan yararlanarak görünüm tahmin edilmesine dair çalışmalar 2000'lerin başlarında başlamış ve çok yavaş ilerleme kaydetmiştir. Adli amaçlı görünüm tahmini ile ilgili çalışmaların kısmen daha geç gelişimi insanda dışarıda görülen karakteristik özelliklere ait genlerin hala çok az biliniyor olmasıdır. Aslında aynı teknik ekipman ve istatistiksel metodları içermesine rağmen hastalıklara ait genler, insanların nasıl göründüklerine ait genlerden daha fazla bilinmektedir (29). Bunun muhtemel sebeplerinden biri olarak araştırma bütçelerine ayrılan fonların daha ziyade hastalıklarla alakalı varyasyonlar ve genetik altyapılarını araştırmaya yönelik olduğu belirtilmektedir.

Dışardan görülen karakteristikde, irisin rengi, ten renginin açık koyuluğu, saç rengi gibi pigmentasyonu içerenler şuan için pratikte bu araştırmaların tek örneğini teşkil etmektedir (26). Dış görünümü etkileyen genler, fenotipi etkileyen genlerin yanısıra çevresel faktörlerin de katılımıyla kompleks taşınmaya sahip olsa da pigmentasyon bunların içinde genetik olarak en az karmaşık olanıdır. Günümüzde, melanocortin-1- reseptör geninde, kızıl saç, açık renk saç ve çilli ten rengine ait SNP markırları bulunmaktadır. Agouti sinyal proteininin kodlanmasında görevli DNA bölgesine ait SNP markırlarının da kahverengi göz ve siyah saç ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (30).

20. yüzyılın başlarında yalnızca DNA analizini adli bilimlerde kullanmak tek ve en önemli durum iken günümüzde DNA veritabanlarının etkili kullanımı adli bilimler için çok önemli bir hal almıştır. Bu sebeple DNA fenotiplemede, yukarıda bahsedilen dışarıdan görülen karakteristik özelliklere ek olarak kişiyi tanımlamaya yarayacak markırları bulmak ve populasyonlara göre standardize etmenin gerekli olduğu düşünülmektedir.

## **2.5. SNP ANALİZİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER**

SNP analizinde bir çok farklı yöntem kullanılabilir. Bu yöntemler içerisinden hangisinin seçileceği daha ziyade amaca uygunluğu ile ilgilidir. Adli bilimler kullanıcak yöntemin, duyarlılığı, tekrarlanabilmesi, degrede örneklerde başarı olması ve multipleks çalışılabilmesi önem taşır. (31, 32, 33).

Sonuçta elde edilecek ürünlerin değerlendirilmesinde kullanılacak tespit (deteksiyon) metodları da ehemmiyetlidir. Bu farklı analiz ve tespit yöntemlerini ilişikteki tabloda görebiliriz

**Tablo 2.1** SNP'lerin değerlendirilmesinde kullanılan metodlar (34)

<b>Allelik Ayrım Reaksiyonu</b>	<b>Tespit Yöntemi</b>
Hibridizasyon	FRET (Florasans Rezonans Enerji Transferi) FP (Florasans Polarizasyon) Mikroarray
Primer Uzama	Elektroforez Mass Spektrometri (MS) Mikroarray (florasans) FRET FP
Ligasyon (bağlama)	Elektroforez FRET
İnvazif Kesilme	Mass Spektrometri (MS) FRET FT
Yeni Nesil Dizileme (Bkz. Şekil 2.5) Ion Torrent Teknoloji (native dNTP proton detection)	Ion S5- Ion PGM

### 2.5.1. Alel Spesifik Hibridizasyon (ASH)

Bu metodun temeli, iki DNA arasındaki tek nükleotid farkını hibridizasyon ile analiz etmektir. Alelik ayırım, problara özel boyalar ile işaretlenmiş iki alelin bu spesifik problemleri kullanılmasıyla olur. Prob dizinin merkezindeki polimorfik baz ile hedef DNA arasında eşleşme olur ise prob-hedef kompleksi yani stabil hibritler oluşur. Bu eşleşme gerçekleşmez ise hibridizasyon metodu çalışmaz (34,35).



### 2.5.2. Primer Uzaması Reaksiyonu

Primer uzama reaksiyonu, DNA polimeraz enzimi aktivasyonu ile dizinini tamamlayıcısına spesifik deoksiribonükleotidlerin (dNTP) bağlanması ile gerçekleşir. Primer uzama reaksiyonları, minisekanslama (tek baz uzama reaksiyonu), pirosekanslama veya alel-spesifik uzama reaksiyonu olarak üçe ayrılabilir (36).

#### 2.5.2.1. Alel-Spesifik Uzama Reaksiyonu

Hedef DNA bölgesinin iki aleli için tasarlanan primerler kullanılır. Primerlerin 3' ucundaki son bazların SNP'ye komplementer olması beklenir. Öyle ise bağlanma kusursuz olur ve polimeraz enzimi vasıtasıyla uzama gerçekleşir. Kullanılan nükleotidler floresans işaretlidir. Böylelikle mikroarray ile tespit edilerek genotiplendirilir (37).

#### 2.5.2.2. Pirosekanslama

Pirosekanslama bir 'sentezleme-ile-sekanslama' yöntemidir. Bu teknoloji, dört enzim ve kalıp DNA dizisine komplementer bir nükleotid yakaladığında ışık üreten spesifik substratlardan oluşan bir enzim kaskat sistemi kullanır (38,39). Işık sinyali oluştuğunda bu baz kaydedilir ve sıradaki nükleotid eklenir. Eğer eklenen nükleotid sıradaki baza komplementer değilse ışık oluşmayacaktır. Tespit DNA polimeraz reaksiyonu esnasında salınan pirofosfat esasına dayanır. Reaksiyon karışımı, bağlanma primeri olan bir tek iplik DNA, DNA polimeraz, ATP sülfüraz, lusiferaz ve apiraz içerir. Dört nükleotid örneğin; CGAT gibi belirli bir sırada karışıma eklenir. Eklenen nükleotid kalıp DNA'ya komplementer ise DNA polimeraz enzimi nükleotidi bağlar ve fosfat (PPi) serbest kalır. Salınan fosfat ATP sülfüraz tarafından ATP'ye çevrilir. Daha sonra lusiferaz enzimi ATP'yi belirlenebilen bir ışığa çevirir.

Pirosekanslama, hedef DNA'dan 20-30 baz çiftine kadar hızlı ve gerçek zamanlı tanımlama sağlar (40).

#### 2.5.2.3. Minisekanslama

Bu reaksiyonda, hedef DNA bölgesindeki SNP noktasında sonlanacak şekilde primer bağlanır. Reaksiyon, tek bazın polimorfik bölgeye DNA polimeraz vasıtasıyla eklenmesi ile sonlanır. Yöntemin başarılı olması DNA polimerazın hedef bölgeyle birleştirmesiyle doğru orantılıdır (41).

İnsan genomu ve benzer büyük genomlarda, SNP'lerin saptanması, öncesinde değişken bölgenin yakınındaki bölgede PCR amplifikasyonu gerektirir. Bu SNP'lerin genotiplendirilmesinde kullanılan çoğu teknolojiye gereklidir. Minisekans reaksiyonundan evvel, primer uzamasına özgü ürünleri alabilmek için PCR primerleri ve dNTP'ler gibi önceki PCR amplifikasyonundan kalan fazla PCR reaktiflerini temizlemek gerekir.

Primer uzama ürünlerini analiz etmenin de çeşitli metodları bulunmaktadır. Minisekans reaksiyonunda işaretli veya işaretsiz nükleotid kullanmak, sadece ddNTP veya ddNTP ve dNTP'yi beraber kullanmak tamamen ürünü tespit etme üzere seçilen yöntemle bağlıdır. Multipleks çalışabilmek de kullanılacak teknolojiye bağlıdır. Minisekans ürünlerini analiz etmek için kullanılan en yaygın teknolojiler, elektroforez ve floresans deteksiyonu (SNaPshot™ -Applied Biosystems), MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) ve mikroarray yöntemidir (34).

- **Elektroforez ve Floresan Deteksiyonu:** Applied Biosystems tarafından üretilen SNaPshot™ kiti, minisekans reaksiyonunu takiben elektroforez ve floresans deteksiyonunda kullanılan en yaygın ticari teknolojilerden biridir. SNaPshot™ multipleks tek baz uzaması reaksiyonu floresan ddNTP'ler kullanır. İşaretsiz primer SNP'ye komşu olan nükleotide bağlanır ve DNA polimeraz ile floresan işaretli ddNTP'ler kullanılarak uzama sağlanır. Her bir ddNTP farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir (Tablo 2.2). Minisekanslama sonrasında uzama ürünleri saflastırılır. Saflaştırmanın amacı ddNTP'lerin 5' fosforil gruplarını uzaklaştırmaktır. Böylece bağlanmayan ddNTP'lerin uzama primerleriyle istenmeyen sinyaller oluşturmaları engellenir (25). Floresan işaretli uzama ürünleri elektroforez ile görüntülediğinde farklı SNP'ler renk ve boyutlarına göre ayrılmış olur. (34).

**Tablo 2.2** Floresan boya ile işaretli ddNTP'le (ABI PRISM SNaPshot Multipleks Kit Protokolden alınmıştır.)

ddNTP	Boya	Sinyal Rengi
A	dR6G	Yeşil
C	dTAMRA™	Siyah
G	dR110	Mavi
T (U)	dROX™	Kırmızı

### 2.5.3. Alel Spesifik Oligonükleotid Bağlama (Ligasyon)

DNA yapısında bulunan DNA ligaz enzimi fosfodiester bağlarını tamir eder. Bu metod DNA ligaz enzimini SNP tiplendirmesinde kullanma esasına dayanır. Öncelikle dizayn edilen üç probdan iki tanesi alele özgü diğer bir tane ise ortaktır. Ortak prob SNP'nin 3' ucundan bağlanır. Alele spesifik olan proplar ise varolan iki alelin her birine özgüdür. Bu alellerden, SNP'ye komplementer nükleotid taşıyanı spesifik prob 3' ucuyla genel probun hemen yanına bağlanır. Sonuçta, alelik bölgede bir kesğin olduğu çift zincirli bir bölge oluşur. Alelik prob ve DNA arasında mükemmel bir komplementer uyum olur. Diğer probda ise DNA ligaz vasıtasıyla tamir gerçekleşerek aradaki bölgede fosfodiester bağı oluşur. SNP ile bağlanma gerçekleşmez ise ligaz enzimi iki probu birleştiremez (34).

Sonuç ürünlerinin tespitinde farklı yöntemler kullanılabilir. Örneğin, ortak proba biyotin, alel spesifik proba ise reporter grup bağlanarak 'bağlanma' ürünleri görüntülenebilir. Ya da boya işaretli oligonükleotid ligasyon analizi (dye-labelled oligonükleotid ligasyon (DOC) yapılabilir. Bu metod ile ortak prob 5' ucuna bir donör boya, alele özgü proba da akseptör boya bağlanarak, 'bağlanma' oluştuğunda FRET'de artış gözlenebilir (34).

#### **2.5.4. İnvazif Kesilme**

Bu yöntem, allel-spesifik örtüşen oligonükleotidlerin, tek nükleotid polimorfizm (SNP) bölgesini içeren hedef DNA'ya hibridizasyonu ile oluşturulan üç boyutlu bir kompleksini kesmek için yapıya spesifik Flap endonükleaz (FEN) enzimini kullanır (The Invader Assay-Third Wave Techology) (42). Hedef moleküldeki SNP aleli tamamlayıcı oligonükleotidin bağlanması, oligonükleotitin, termostabil FEN tarafından bölünmesini tetikler. Bölünme birkaç farklı yaklaşımla tespit edilebilir. Çoğunlukla, bölünme ürünü, bir floresans sinyalinin serbest bırakılması için bir floresan rezonans enerji transferi (FRET) kasetinde sekonder bir bölünme reaksiyonu başlatır. Alternatif olarak, bölünme, doğrudan floresan polarizasyon (FP) problemleri kullanılarak veya kütle spektrometresi ile tespit edilebilir. İnvaziv bölünme reaksiyonu son derece spesiftir, düşük başarısızlık oranına sahiptir ve hedef DNA'nın zeptomol miktarlarını tespit edebilir (42).

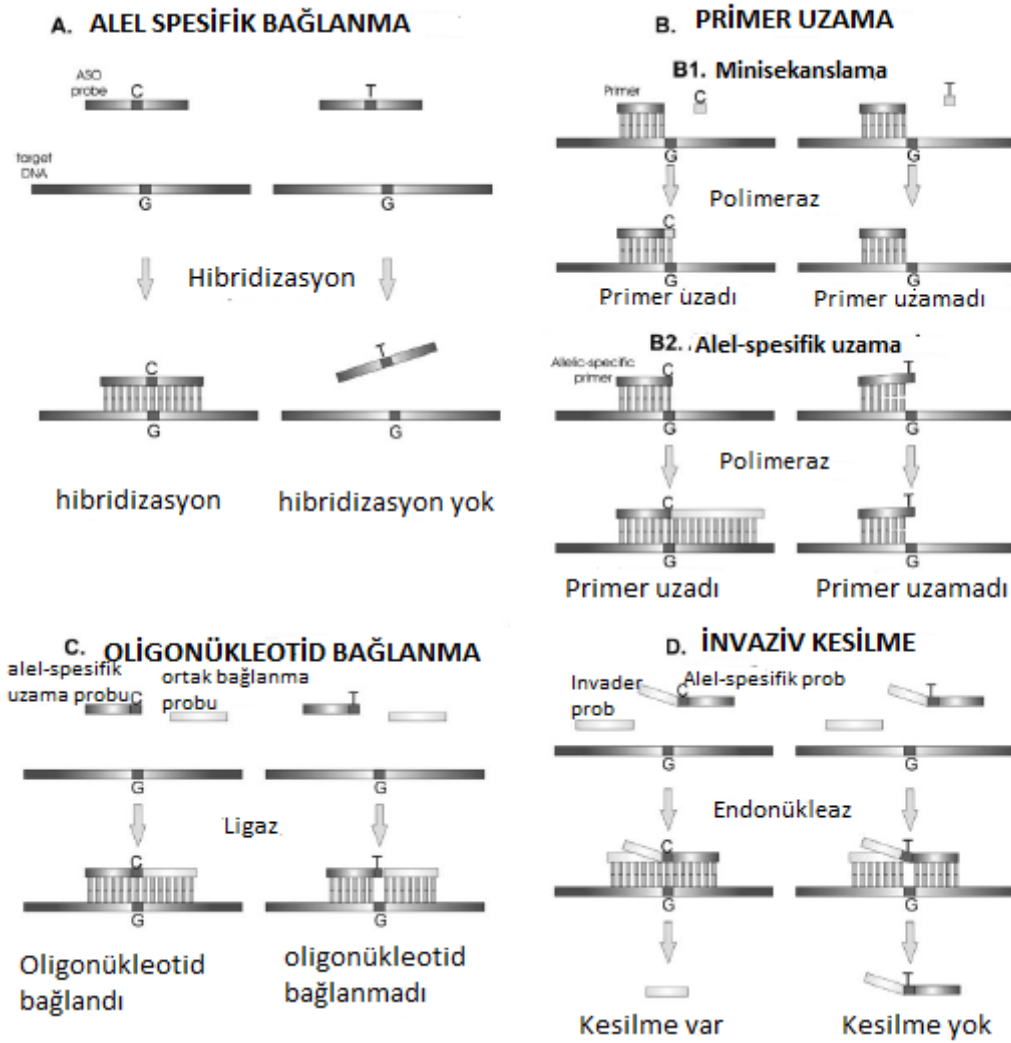
#### **2.5.5. İon Torrent Teknolojisi**

Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme teknolojilerinden biridir. İon-Torrent teknolojisi emülsiyon PCR ve iyon yarı iletken dizileme (ion semiconductor sequencing) kullanır. Optik tarama ve floresan nükleotidlere ihtiyaç duyulmamaktadır. İon semikonduktör dizileme de DNA'nın polimerizasyonu sırasında meydana çıkan hidrojen iyonlarının hipersensitif iyon sensorleri tarafından tespitine dayanır. Okuma uzunluğu 200 baz çifti kadar olup 2-4 saat içerisinde 10 gigabaz kadar çıktı verebilir. En sık raslanan hata çeşidinin insersiyon ve delesyonların saptanmasında gerçekleştiği belirtilmektedir.

### **2.6. SNP ANALİZİNDE KULLANILAN TESPİT YÖNTEMLERİ**

Alel-spesifik ürünlerin tespit mekanizmaları floresans ve lüminesans okumadan kütle ve elektrik yükü hesaplamalarına kadar çok değişkenlik gösterir. Mekanizmalar esasen homojen tespit ve katı faz yardımıyla olanlar olarak ikiye ayrılabilir. Homojen tespit, alel ayrımı reaksiyonlarından sonra saflaştırma veya ayırma işlemlerine ihtiyaç duymaması sebebiyle otomasyona daha uygundur. Ancak, ürünler ayrılmadığı veya saflaştırılmadığı durumlarda homojen metodların multipliks çalışma için kullanımı sınırlıdır. Homojen metodların bir diğer özelliği ise toplu ölçümler olması sebebiyle reaksiyon substrat ve ürünlerinin nispi miktarına bağlı olmasıdır. Bu metodlar ancak ürünlerin baskın olması durumunda ürünleri ölçülebilir. Substratların baskın kalması

durumunda, ürünler reaksiyon içinde varolsa bile tanımlanabilecek kadar duyarlı olmayacaktır. Başka bir deyişle, bu yöntemler yanlış negatife daha yatkındır. Bunun aksine, katı-faz-yardımlı metotlar, ayırma ve saflaştırma basamaklarından dolayı çok üst düzette hassasiyet ve mültepleks çalışma kapasitesi sunar. SNP genotiplendirme teknolojileri düşünüldüğünde verim ve maliyet açısından tespit yönteminin seçimi önemli etkiye sahiptir.



Şekil 2.3 Alelik ayırım yöntemlerinin şeması (34)

## 2.6.1. Homojen Yöntemler

### 2.6.1.1. FRET (Florasın Rezonans Enerji Transferi)

Son yıllarda, DNA testi veya genotiplendirme çalışmalarında floresan yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. FRET’de bu popüler uygulamalardan biridir (43). FRET, fiziksel yakınlıkta ve birinin florofor emisyon spektrumunun (donör) diğersinin eksitasyon (uyarma) spektrumunu (alıcı) çakışması durumunda iki florasın grubu arasında gerçekleşen fiziksel bir olaydır. Donör eksite olduğunda, donör emisyonunun baskılanıp alıcı emisyonunun artması ile FRET gerçekleşir. Hem donörün emisyonunun baskılanması hem de alıcı emisyonunun artmasında FRET monitorize edilebilir.

SNP genotiplendirmesinde, FRET kullanımında iki farklı strateji bulunmaktadır. İlki birbirine yakın mesafedeki iki florasın grubunun ayrılmasıdır. Ayrım enerji transferini kesintiye uğratar ya da etkinliğini oldukça düşürür. İkinci ise, iki floresanı birleştirip gruplayarak, uzak alanlardaki iki florofor arasında enerji transferine yardım etmektedir. SNP tiplenme reaksiyonları için FRET uygulamasındaki prensip şöyle geliştirilebilir, alel-spesifik ürünlerin oluşması FRET olayının oluşması veya kaybolması ile ilişkilidir. Reaksiyonlar ve FRET arasındaki ilişki bir kere kurulduktan sonra alel-spesifik ürünleri oluşması ve böylelikle örneğin genotipini tiplendirmede, alel diskriminasyon reaksiyonları esnasında FRET monitorize edilebilir.

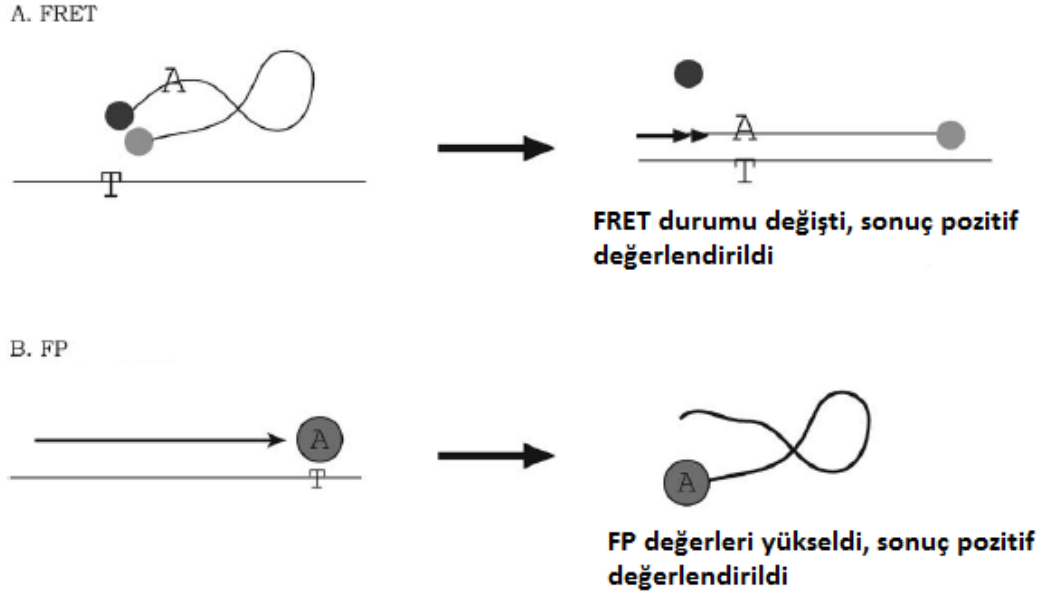
FRET, tek baz uzama, DNA hibridizasyon, DNA bağlama ve yapı spesifik kesilmede başarıyla uygulanmaktadır. Ayrıca, homojen metotlar arasında en çok kullanılanıdır. TaqMan 50 nuclease assay, Molecular Beacons, Invader assay, scorpion AS-PCR assay gibi bir çok genotiplendirme teknolojisi ticari olarak bulunmaktadır.

### 2.6.1.2. Florasan Polarizasyon (FP)

Alelik ayırım ürünlerinin, ilk ve son boyutları farklı ise FP kullanılabilir. Singlepleks yani tek bir bölgenin çoğaltıldığı reaksiyolarda işlev görür. Minisekans reaksiyonunda ddNTP ile uzatılan primersin florofor moleköl ağırlığının artması esasına dayanır (34,44).

FP ölçümünü, sıcaklık, viskosite ve florasın boya ile reaksiyon malzemelerinin yüzeyinde bulunan diğers tampon çözeltiler ile non-spesifik etkileşimler gibi bir çok faktör etkiliyebilir (36). Böylelikle, deney ve örnekler arasında sürekli stabil çevresel

faktörleri devam ettirmek önemlidir. Bunlardaki dalgalanmalar yanlış-pozitif veya yanlış-negatif sonuçlara yol açabilir (34,44).



**Şekil 2.4** FRET ve FP yöntemlerinin şematik gösterimi (36)

### 2.6.2. Katı-Faz-Yardımlı Yöntemler

Tespit basamağında katı faz desteğinin kullanımı, çok fazla paralel deteksiyon ve analizi mümkün kıldığı için verimi arttırıp, maliyeti de önemli ölçüde düşürür. Katı destekli sistemin genel kullanım şekli alel-spesifik ürünleri ayırmak ve saflaştırmak için bir cihaz kullanmaktır. Böylelikle ürünler daha hassas ve verimli olmaktadır. Alel-spesifik ürünleri ayırmada DNA hibridizasyon ve desteklemede de DNA mikroarray ve floresan işaretli mikrobead en sık kullanılan yöntemlerdir. Bir ürün bir destekleyiciye saflaştırıldığında ve/veya ayrıldığında, bu destekleyicide floresan parlaklığı ve rengi ürünün identifikasyonunda kullanılabilir.

#### 2.6.2.1. MS (Mass spectrometry- Kütle spektrometrisi)

Kütle spektrometrisi bir molekülün kesin moleküler ağırlığını hesaplar. Alelik diskriminasyon reaksiyonları her zaman molekül ağırlığını değiştirdiğinden bu reaksiyonar ürünleri tanımlamak için kullanılabilir. DNA'nın dört bazı arasındaki en küçük fark yaklaşık 9 Da ile Adenin (A) ve Timin (T) arasındadır. Bu sebeple A/T polimorfizmlerini ayırt etmek zor olabilir. İşaretli ddNTP'ler kullanarak tek baz uzama reaksiyonunda oluşturulacak değişiklik ile deteksiyon daha kolay olabilir. Bir diğer yaklaşım ise ddNTP ve dNTP kombinasyonunu tek baz uzama reaksiyonu için

kullanmaktır. ddNTP ve dNTP kombinasyonunda, bir alel bir polimorfik bölgede durur, diğer alel ise bir veya birkaç baz aşağısında durur. Bu ürünlerin boyutlarında farklılık oluşturur ve böylece ayırım kolaylaşır (45). MS deteksiyonu multipleks çalışmaya uygundur. İşaretli uzama primerleri kullanmak multipleksin kolay bir yoludur. Farklı işaretli uzama primerleri kütlelerini farklı aralıklara çektiğinden çoklu SNP'ler aynı anda tespit edilebilir.

Alel sıklık (frekans) tahmini için en iyi ölçüm metotlarından birinin MALDI-TOF olduğunu belirtmek gerekir. Minisekanslamada oluşan ürünlerin molekül ağırlıkları bu metot ile ölçülebilir. İşaretli moleküller tarafından yayılan floresan ölçülmesi sebebiyle daha direk sonuç verir. Minisekans ürünleri bir çip veya bir taban üzerindeki matrikse birleştirilir. DNA ürünlerine çarpan lazer ışını sonucunda enerji matrikse geçer ve örnek buharlaşır. Oluşan moleküler iyonlar güçlü bir elektrik alan tarafından hızlandırılıp, detektöre yönlendirir. Uçuş zamanı (time of flight-TOF), elektriksel akımın gelmesi ve ürünün dedektör çarpması arasındaki süredir. Bu zaman diliminde DNA ürününün molekül ağırlığı hesaplanır. Molekül ağırlığı düşük olanlar daha hızlı uçar ve detektöre daha hızlı çarpar. Özel yazılımlar kullanılarak bu uçuş süreleri kullanılarak kesin ağırlıklar hesaplanabilir. Bu yöntemin bir dezavantajı örnek saflığının çok iyi olmasının gerekliliği ve multipleks çalışma kapasitesinin limitli olmasıdır (46) .

### **2.6.2.2. Mikroarray**

Mikroarray'in en önemli özelliği yüksek yoğunluğudur. Çok küçük bir alanda (1–1.5 cm<sup>2</sup>), yüzlerce binlerce daha evvelce belirlenmiş sekans dizilenebilir. Bu daha evvel belirlenen diziler, DNA hibridizasyonu vasıtasıyla alel-spesifik reaksiyonda ayrılmış ürünlerdir. Sıklıkla kullanılan bir uygulama, alel-spesifik reaksiyondaki primerlere kısa bir dizi eklemektir. Bu eklenen dizi, daha evvel belirlenmiş 'array'deki (dizide) sekanslardan birine komplementerdir. Her bir markır için özel bir sekans bulunur. Bu markır-spesifik diziler veya işaretler, alel-spesifik reaksiyonlardan markır-spesifik 'array'de diziler.

Mikroarrayi kullanmanın bir diğer yolu ise hedef sekansın tamamını bir çip üzerinde çakışan çoklu oligonükleotidleri genotiplemeaktır. Bir çok geniş yelpazeli SNP genotipleme çalışmaları bu metodu kullanmaktadır. Sonuçta, bu yöntem hedefi hibridizasyon yoluyla yeniden diziler. Hedefin tamamı yeniden dizilendiğinde, genotipler açık hale gelir. Bu metodun avantajı yeni SNP'lerin bu sayede keşfedilebilmesi ve aynı



anda genotiplenebilmesidir. Yöntemi kısıtlayan en büyük faktör masrafıdır. Yöntemin bir diğer dezavantajı ise düşük duyarlılığıdır (%80-90) bu sebeple normalde linkage disequilibrium ve asosiyasyon çalışmaları için uygun değildir (34).

### **2.6.2.3. Floresan kodlu mikrobead**

DNA çiplerine benzer olarak, iyi karakterize edilmiş ve eşsiz DNA dizileri, benzersiz floresans imza özellikli mikrobeadlere tutturulabilir. Alel-spesifik reaksiyonlardan sonra ürünler mikrobeadlere bağlanır. Hibridizasyon, SNP'nin ürünlerini benzersiz bir işaret ile mikrobeadlere bağlar. Mikrobeadlerin benzersiz imzalarıyla tanımlanması, bunlara melezenen alele özgü ürünlerin tanımlanmasına, dolayısıyla SNP'ler için genotiplerin tanımlanmasına neden olabilir. Renk kodlu mikrobeadler çok sayıda SNP belirteçlerini mikroarray gibi paralel olarak işaretleyebilirler. Buna ek olarak, mikrobeadler daha fazla esneklik sağlamaktadır. Çünkü her bir mikrobead diğer mikrobeadlerden tamamen bağımsızdır; ayrı olarak imal edilebilir ve kullanılabilirler. 10 yada 100 SNP işlendiğinde, 10 yada 100 mikrobead türü ürünlerle karıştırılırken, 10 yada 100 SNP sadece DNA chip'ine kodlanan özelliklerin küçük bir kısmını kullanır. Renkle kodlanmış mikrobeadlerin esneklikleri DNA çipleri ile kıyaslandığında daha kompetitif bir maliyet sunmaktadır (34).

### **2.6.2.4. Elektroforez**

Elektroforez, uzun zamanlardan beri DNA dizilimi gibi uygulamalarda DNA moleküllerini ayırmak ve tanımlamak için kullanılmaktadır. Burada DNA molekülleri boyutlarına göre bir ayırma tabii tutulmaktadır. Alelleri ayırt etmek için, alel-spesifik ürünlerin oluşması daima prob boyutlarında değişikliklere neden olur. Ürünler floresan etiketlerle etiketlendiğinde elektroforez ile kolaylıkla ayrılabilir ve tanımlanabilirler. Uygulanması zor protokoller ve nispeten yüksek maliyetler, genotiplendirme için elektroforez kullanımına karşı temel engellerdir. Kılcal elektroforezin uygulanması gerekli iş gücünü azaltır. Ancak, daha fazla SNP bir şerit/kılcal içine paketlenene kadar, maliyet, SNP genotiplendirme için elektroforezin geniş kullanımı için önemli bir engel olmaya devam edecektir. DNA dizilerinde kullanılmak üzere SNP tiplendirme için SNaPshot ve SNUpe gibi ticari ürünler bulunmaktadır.

## 2.7. YENİ NESİL DİZİLEME (Next Generation Sequencing)

Dideoksi nükleotid ile zincir sonlanması yöntemi ile dizileme 1977'de Sanger tarafından tanımlanmıştır (47). Ardından, DNA dizi analizi, tıbbi genetik tanı ve araştırmalarda kullanılan önemli metotlardan biri olmuştur. PCR'ın bulunması ile de DNA dizi analizinin kullanımı artmıştır (48). Dizi analizinin milad taşlarından bir diğeri de 2003 yılında ilk sonuçları rapor edilen İnsan Genom Projesi'nin önemli bir kısmı olan, birinci jenerasyon DNA dizileme olarak ifade edilen otomatik Sanger dizileme cihazları ile tamamlanmasıdır (49). Günümüzde hala DNA dizi analizi için altın standart metod olarak kabul edilse de, okuma uzunluğunun kısalığı, sonuç verme süresi ve baş başı maliyetin yüksek olması gibi önemli dezavantajları mevcuttur. Sanger yönteminde karşılaşılan kısıtlamalar maliyeti daha düşük, sekans hızı daha yüksek bir teknolojiye gereksinimi ortaya çıkarmıştır. Bu ihtiyaç, yeni nesil dizileme yöntemlerinin doğmasına yol açmıştır (50). 2004 yılında yeni nesil dizileme (YND) teknikleri ortaya çıkmış ve hastalıklara neden olan genleri bulmak dahil birçok moleküler genetik alanında devrim olmuştur (51). 2005 yılında ise ilk YND teknolojisi piyasaya sürülmüştür (52). YND yöntemi ile yüksek hacimde paralel dizileme yapılarak milyonlarca DNA fragmenti eş zamanlı bir şekilde dizilenebilmektedir.

YND ile dizileme, milyonlarca küçük DNA parçacıkları ve adaptör dizilerinin, pikolitrehacimlerde, büyük çaplı paralel dizileme (massively parallel sequencing) ile dizilenmesi prensibine dayanmaktadır (53). YND yöntemleri beraberinde yenilikler getirmiştir. DNA fragmanlarının bakteriyel klonlanmasının yerine hücre içermeyen sistem içinde YND kütüphanelerinin hazırlanmasına olanak sağlamıştır. Bunun yanısıra aynı anda milyonlarca kısa dizilemenin yapılmasına olanak sağlar. Son olarak da sekans çıktısının elektroforez ihtiyacı olmadan direkt çıktısının alınabilmesidir.

YND tarafından oluşturulan çok sayıdaki okuma benzeri görülmemiş bir hızda tüm genom dizilimini sağlamıştır. Bununla birlikte, YND teknolojilerin bir dezavantajı göreceli olarak kısa okumalar yapmasıdır. Bu kısa okumaların genomda birleştirilmesi zor olduğundan yeni hizalama algoritmaların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. YND teknolojisi ile tüm genomun dizi analizinin yapılması mümkün olduğu gibi (Tüm Genom Dizileme –TGD-), genomdaki protein kodlayıcı bölgelerin dizilenmesi (Tüm Ekzom Dizileme –TED-) veya hedeflenmiş gen panelleri kullanılarak hedeflenmiş yeni nesil dizi analizi (HYND)'de imkan dahilindedir (54).

Şirket	Platform	Çoğaltma	Sekanslama	Çıktı hacmi/zaman (okuma başma)	Baskın hata tipi	Hata oranı	
Roche/454 Life Sciences	GS FLX Titanium XL+ GS FLX Titanium XLR70 GS Junior	Emülsiyon PCR	Pirosekanslama	1 kb'a kadar 600 bp'a kadar ~400 bp	700 Mb/23 s 450 Mb/10 s 35 Mb/10 s	Indel	%0.5
Illumina	HiSeq 2000 Genome Analyzer Ix MiSeq	Köprü PCR	Reversible terminator kullanarak sentezleyerek dizileme	36–100 bp 35–150 bp 36–250 bp	105–600 Gb/2–11 gün 10–95 Gb/2–14 gün 540 Mb–8.5 Gb/4–39 s	Yerdeğiştirme	%0.2
Life Technologies/ Applied Biosystems	5500xl SOLiD™ system SOLiD™ 4 system	Emülsiyon PCR	Ligasyon temelli dizileme	35–75 bp 25–50 bp	10–15 Gb/gün 25–100 Gb/3.5–16 gün	Yerdeğiştirme	%0.1
Life Technologies/Ion Torrent	Ion Proton™ sequencer (Proton I chip) Ion PGM™ sequencer (318 chip)	Emülsiyon PCR	İon semiconductor dizileme	200 bp'a kadar 35–200 bp	Up to 10 Gb/2–4 s 300 Mb–1 Gb/0.9–4.5 s	Indel	%1
Helicos BioSciences	HeliScope™ single molecule sequencer	YOK	Tek molekül sekanslama	25–55 bp	21–35 Gb/8 gün	Delesyon	%5
Pacific Biosciences	PacBio RS	YOK	Tek molekül sekanslama	250 bp–10 kb	NA	Indel	%15

Şekil 2.5 Yeni Nesil Dizileme metodlarının özellikleri (54)

### 2.7.1. Adli Bilimlerde YND'nin Kullanımı

Adli bilimlerin uygulama alanlarında, DNA örnekleri genellikle kısıtlı miktarla ve sıklıkla da aynı anda mitokondriyal genomdaki farklı kromozomlarda birden fazla lokusu analiz için gereklilikleri yerine getiremeyecek durumdadır. Bu durum, yeterli bilginin elde edilmesinde zorluklar yaratabileceği gibi adli kanıt olarak kullanımını da kısıtlar. Buna ek olarak, karışık lekelerin tanımlanması ve karmaşık babalık davaları geleneksel STR ile çözülemez. YND teknolojisi sadece bu gereksinimleri karşılamakla kalmaz aynı zamanda DNA veritabanı oluşturma, soy ve fenotipik çıkarımlar, tek yumurta ikiz çalışmaları, vücut sıvısı ve tür tanımlama ve adli mikrobiyolojik analiz de dahil olmak üzere birçok araştırma alanına uygulanabilir (55). Adli tıp bilimlerinde standart STR yazımı, yeterli derecede ayırım gücü sağlamaktadır. Çoğu uygulama için birçok ülke, STR teknolojisine dayalı suçları çözmek için zaten geniş kapsamlı adli DNA veri tabanlarını kurmuştur. Tam exome veya tüm genom dizilişinin kullanılması adli analizler için daha fazla bilgi sağlayabilir, ancak uyumluluk ve maliyet göz önünde bulundurulduğunda, YND teknolojisi kısa sürede geleneksel STR yazımının yerini alması beklenmemektedir. Adli bilim adamları, STR lokusunu analiz etmek için özel olarak tasarlanmış hedef zenginleştirme panelleri gerçekleştirmişlerdir. Bununla birlikte, bu yöntemler yalnızca adli araştırmalarda hali hazırda kullanılan yaygın lokuslardan bazılarını kapsamaktadır. YND teknolojisinin gelişmesiyle maliyetin hızla

düşmesi ve adli uygulamalar için ticari kitlerin piyasaya çıkması beklenmektedir (56). Bu, otozomal ve cinsiyet kromozomlarında birden fazla STR lokusunun eşzamanlı olarak tespit edilmesine, mitokondriyal genom polimorfizmlerinin analizine ve adli araştırmalar için önemli bilgiler sağlayan soy ve fiziksel ve psikolojik özelliklerle ilgili SNP analizine olanak tanıyacaktır.

Bu yöntemleri kullanarak YND, genomdaki lokus verilerini sağlayabilir. Kolluk ajansları bilgi paylaşmaya başladığında, birden fazla uluslararası veri tabanı ek lokasyonların tek bir analizde incelenmesi gerektiğini kabul etmiş ve kendi lokus veritabanını genişletmiştir. Bu genişletilmiş lokus setleri, bir şüphelinin tespit edildiği yerlerde kolluk soruşturmalarının verimliliğini artırmıştır Ya da veri tabanı eşleşme sağlamıştır Bir şüpheli veya bir isabet olduğunda, kanıt örneklerinden elde edilen ek bilgiler, suçlunun fenotipi ile ilgili değerli ipuçları sağlayabilir (56).

Ancak, YND'nin adli bilimler rutinine girebilmesi için, kitlerin validasyonunun yapılması, kütüphanelerin oluşturulması, hata payının düşürülmesi, analist eğitimi ve optimizasyon çalışmaları gibi bir çok etapdaki zorlukların adli bilimciler ve ticari firmaların işbirliği ile aşılması gerekmektedir.

Adli tıp biliminde YND'nin uygulanmasına ilişkin esasların da oluşturulması gerekmektedir. YND teknolojisinin teknik ilerlemeleri ve adli bilim insanlarının sürekli çabaları sayesinde, YND teknolojisinin, adli uygulamalarda kolay erişilebilir rutin bir yöntem haline geleceği düşünülmektedir (57).

## **2.8. BAĞIMLILIKLAR VE GENETİK ALTYAPISI**

Bağımlılık kişinin madde alımı üzerindeki kontrolünü kaybetmesini ifade eder. Esasen, bağımlılık genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği karmaşık bir hastalık dizisidir. Legal veya illegal madde bağımlılığı yaygın bir halk sağlığı sorunudur (58). Bağımlılıklar kompulsif, kontrol edilemeyen ve kronikleşen davranışlardır ve sonuçları uzun vadede yıkıcı olabilmektedir. Uyuşturucu, tütün gibi bağımlılık yaratan maddeler volitif olmasına rağmen, bağımlılık kişinin volitif kontrolünü kaybetmesine neden olur. Alkol ve nikotinin aşırı kullanımı Batı toplumlarında önlenebilir morbitide ve mortalitenin en büyük sebebi olarak gösterilmektedir (59). Alkol, nikotin veya yasadışı madde bağımlılığı ve/veya yatkınlığının hepsinin temelinde aynı genetik alt yapı

bulunmaktadır (60-64). Madde-spesifik faktörler olmasına rağmen, farklı maddelere genetik yatkınlık ortak özellik göstermektedir (63-67). Bağımlılığın genetiği üzerine önemli araştırmalar bulunmaktadır. Bu araştırmalar, reseptörleri ve taşıyıcıları da dahil olmak üzere asetilkolin (ACh), dopamin (DA) ve serotonin gibi biyojenik aminler aracılığıyla yürütülen beyindeki ödül mekanizmalarını hedeflemiştir (68,69). Yapılan çalışmalar farklı etnik grup ve toplumları hedeflemiş, genetik yatkınlığın popülasyon temeli aydınlatılmaya çalışılmıştır (70,71).

Linkage-based genom taramaları sonucunda yasadışı veya yasal maddelere bağımlılığa yatkın allellerin varlığı bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (72,73).

### **2.8.1. Psikiyatrik Bozuklukların Sınıflandırılması Hakkında Genel Bilgiler**

Mental bozuklukların sınıflandırılmasında iki farklı ekole ait iki farklı tanımlama sisteminin kullanıldığı görülmektedir (74). Bunlardan ilki Avrupa merkezli bir kuruluş olan Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization) ICD (International Classification of Diseases) sınıflandırması; diğeri ise Amerika merkezli bir kuruluş olan Amerikan Psikiyatri Birliği'nin (American Psychiatric Association) DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- mental bozuklukların tanısal ve sayımsal el kitabı) kriterleridir. Bilimsel adlandırmanın standardizasyonu ve kolaylaştırılması amacıyla yapılmışlardır.

ICD yalnızca ruhsal bozukluklar değil birçok hastalığa ait tanı kriterlerini ele alarak kategorize etmiştir. Bu sınıflamada 'F' kodu ile numaralandırılmış olan beşinci (5.) bölüm 'Mental ve Davranışsal Bozuklukların Sınıflandırılması'na ayrılmıştır. Her iki sınıflandırma sistemi de günümüzde kullanılmaktadır.

Uluslararası Sağlık Örgütü'ne ait ICD-6'ya ruh hastalıkları ilk defa 1949 yılında eklenmiştir. DSM sınıflandırmasının ilki olan DSM-I ise 1952 yılında yayınlanmıştır. Bu iki kuruluşun neredeyse eş zamanlı olarak mental bozuklukları kategorize etmesi dikkat çekicidir (74).

Amerikan Psikiyatri Birliği'ne ait DSM sınıflandırması; teknoloji, sistemler, psikiyatride yaklaşım metotları gibi değişen birçok sebepler ile yıllar içerisinde güncellenmiş, sınıflandırmalar ve terminoloji kimi zaman değişmiştir. DSM-II 1968, DSM-III ise 1980 yılında yayınlanmıştır. Bundan önceki iki baskısı tanı ölçütleri güvenilir olmadığı gerekçesiyle eleştirildiğinden DSM-III'de çok eksenli değerlendirme yapılmıştır. Bu sınıflandırmanın revize edilmiş çalışması DSM-III-R ismiyle 1987

yılında basılmıştır. 2004 yılında yayınlanmış olan DSM-IV ise daha sonra DSM-IV-TR olarak güncellenmiştir. Bu zamana kadar ICD ile eşzamanlı güncelleme ve tanımlamanın mümkün olmaması sebebiyle DSM-IV, ICD-9 kodları ile uyuşacak şekilde tasarlanmıştır. 2013 yılında günümüze ulaşan son düzenlemesiyle DSM-V kullanılmaya başlanmıştır (74).

### **2.8.1.1. Nikotin bağımlılığının bu kriterlere göre sınıflandırılması**

Kötüye kullanılan veya bağımlılık yapıcı olarak nitelenen maddeler DSM-IV’de 11’e ayrılmışken DSM-V’de aşağıdaki şekilde 10’a ayrılmıştır (75,76);

- 1) Alkol
- 2) Kafein
- 3) Kenevir (esrar)
- 4) Varsandırınlar (LSD, meskalin, fensiklidin vb.)
- 5) Uçucular (tiner, benzin, gazolin, bali vb.)
- 6) Opiyatlar (morfin, eroin, kodein, metadon vb.)
- 7) Dinginleştirici, uyutucu ve kaygı gidericiler (diazepam, klorazepat vb.)
- 8) Uyarıcılar (amfetamin, ekstazi, kokain vb.)
- 9) Tütün
- 10) Diğer bilinmeyen maddeler

DSM-IV’ten farklı olarak çoklu madde bağımlılığı tanısı DSM-5’de bulunmamaktadır (77).

Sigara bağımlılığının terkedilmesinin önüne geçen en önemli sorun olarak ‘yoksunluk’ belirtileri gösterilmektedir. Bırakılmasının ardında bireylerin büyük çoğunluğunda derecesi kişilere göre değişkenlik gösterecek şekilde yoksunluk belirtilerinin ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Bu gibi kişilerde aşırı sinirlilik, depresif duygu durum değişiklikleri, konsantrasyon eksikliği, çabuk sinirlenme ve benzeri bulgular gözlenmekte ve sigaraya yeniden başlamaları ile durumları hızla düzelmektedir. Ortaya çıkan bu döngünün bir noktada kırılabilmesi sigara bırakma tedavilerinin başlıca amacıdır (78).

Sigara bağımlılığının değerlendirilmesinde en sık kullanılan test, Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi olarak belirtilmektedir. Bu test aslında Fagerström Tolerans Testi’nin yeniden düzenlenmiş halidir. Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi’nin, Fagerström

Tolerans Testi'ne göre iç tutarlılığının daha yüksek ve daha kolay yanıtlanabilir olduğu belirtilmektedir (79).

**Tablo 2.3: DSM-V sınıflandırmasına göre nikotin yoksunluk kriterleri (80)**

<b>DSM-V Nikotin Yoksunluk Kriterleri</b>
<b>A.</b> En az birkaç hafta, her gün tütün kullanma
<b>B.</b> A tanı ölçütünde tanımlanan tütün kullanımının bırakılmasından ya da ölçüsünün azaltılmasından sonraki 24 saat içinde, aşağıdaki dört (ya da daha çok) belirti ya da bulgunun gelişmesi: 1. Kolay kızma, katlanamazlık duygusu ya da öfke. 2. Bunaltı. 3. Odaklanma güçlüğü. 4. Yeme isteğinde artma. 5. Huzursuzluk. 6. Çökkün duygudurum. 7. Uykusuzluk
<b>C.</b> B tanı ölçütündeki belirtiler ve bulgular klinik açıdan belirgin bir sıkıntıya ya da toplumsal, işle ilgili alanlarda ya da önemli diğer işlevsellik alanlarında işlevsellikte düşmeye neden olur.
<b>D.</b> Bu belirtiler ve bulgular başka bir sağlık durumuna bağlanamaz ve esriklik ya da başka bir madde yoksunluğu da içinde olmak üzere, başka bir ruhsal bozuklukla daha iyi açıklanamaz.

### **2.8.2. Nikotin Bağımlılığı**

Nikotin bağımlılığı hayat kalitesini düşüren ve hatta ölümle sonuçlanan bir bağımlılık türüdür. Dünya üzerindeki beş ölümden birinin nedeni nikotin bağımlılığının sonucu olan sigara tüketimidir (81). Ayrıca sigara tüketen kişilerde hastalıklara yakalanma oranı sigara tüketmeyen bireylere göre %50 daha fazladır. Tütün kullanımı kanser, kalp hastalıkları ve akciğer hastalıklarının temel nedenidir. Bununla beraber sigara tüketimi solunum sisteminde ve üreme sisteminde bozukluklara, kemik erimesinde, yara iyileşme mekanizmalarında gecikmelere, gastrik ülserle neden olabilmektedir. Yukarıda isimleri geçen hastalıklarda nikotin etkisi az olsa da, nikotin bağımlılığına neden olan sigara tüketimi ve buna bağlı sigaranın içinde bulunan diğer toksinlere maruz kalmak bu hastalıkların temel nedenidir. Nikotin bağımlılığı bu hastalıkların yaklaşık nedenidir (82).

Nikotin zevk veren, stresi ve anksiyetiyi azaltan bir maddedir. Nikotin tüketimi konsantrasyon ve performans artımına neden olmaktadır. Bununla beraber ruhsal halde düzelme, kaygı düzeyinde azalma ve rahatlatıcı bir madde olması nedeniyle bırakılması zordur. Bağımlı olan insanlar bunu hayatlarındaki küçük bir zevk olarak gördükleri için bu bağımlılığı bırakmayı reddederler. Sigara içme veya dumanının solunması zamanla kişide psişik ve fiziksel bağımlılık oluşturur (83).

Nikotin bağımlılığı çevresel ve genetik faktörlere bağlıdır. Sigara sektörünün yaptığı pazarlamalar ve reklamlar, sigara içilen arkadaş ortamları bağımlılığa sebep olan çevresel faktörlere örnek verilebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar gösteriyor ki nikotin bağımlılığında genetik faktörler de büyük rol oynamaktadır. Nikotin bağımlılığına neden olan pek çok gen tespit edilmiştir. Bu tip çalışmaların zorluğu bu bağımlılığa neden olan genlerin çoklu genlerden ve gen gruplarından oluşması, bununla beraber bu gen ve gen gruplarını etkileyen çevresel faktörlerin neden olduğu çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Ayrıca bireylerin genetik geçmesinin farklı olması kişilerde farklı sonuçlar görülmesine neden olmaktadır. Üzerinde çalışılan genler beyinde bulunan nikotin-reseptör alt yapıları (subtypes), dopamin reseptörleri ve dopamin taşıyıcıları, GABA reseptörlerine ait genlerdir (84).

Yakın zamanda yapılan genom çalışmaları göstermiştir ki nikotin bağımlılığına neden olan pek çok belirleyiciler bulunmaktadır (84). Sigara içen ve içmeyen sağlıklı bireylerin genomlarını karşılaştırmıştır. Ayrıca Saccone ve arkadaşları (85) ikincil genler üzerinde bir çalışma yapmıştır. Çalışmalar genellikle onbeşinci kromozom üzerinde bulunan  $\alpha 5/\alpha 3/\beta 4$  nikotinik kolinerjik reseptör gen kompleksidir. Nikotin bağımlılığına bağlı olan kişilerde  $\alpha 5/\alpha 3/\beta 4$  gen bölgelerinde değişiklikler kişinin günde kaç tane sigara tükettiğine, kanda bulunan cotinine miktarına (nikotin alımı biyomarkırı), idrarda bulunan sigaraya ait kanserojen madde miktarına bağlı olarak değişmektedir. Kolinerjik reseptörler beyinde dopamin ve diğer nörotransmitter maddelerin salınımını tetiklemektedir. Beyindeki dopamin, glutamat ve GABA salınımı nikotin bağımlılığında önemli rol oynamaktadır. Bu duruma adaptasyon ve tolerans göstermek için beyindeki nikotinik reseptörlerin ve nöronal plastitede değişikliğe neden olmaktadır (86).



### 2.8.3. Adli bilimler ve bağımlıklar

Adli bilimler ve kriminoloji, suça eğilim gösteren kişilerin ortak kişilik özellikleri olduğu hipotezi üzerinden çalışmalarını devam ettirir. Bu özelliklerin tanınması, suçun daha işlenmeden önlenabilirliği açısından önem taşır (87). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) madde bağımlılığını “kullanılan bir psikoaktif maddeye kişinin daha önceden değer verdiği diğer uğraşlardan ve nesnelere belirgin olarak daha yüksek bir öncelik tanıma davranışı” olarak tanımlar (88). Diğer bir deyişle madde kullanımı bireye ve topluma zarar verici düzeyde bir davranış haline gelir.

Farmakogenetik terimi ilk defa 1950’lerde (89,90) kullanılmıştır ve kişiler arasındaki genetik farklılığa bağlı olarak ilaç cevap mekanizmasının farklılık göstermesi olarak tanımlanabilir. Bu tanımlama nonterapötik yabancı maddelerin tamamı için zenobiyotikler olarak kullanılırken toksikogenetik tabiri de eşanlamı olarak kullanılmıştır (91-95). Daha sonra ortaya çıkan ‘farmakogenomik’ terminolojisi ise genellikle ilaç maruziyetine bağlı gen ekspresyonunda ortaya çıkan değişimi tanımlamaktadır. Ancak genelde farmakogenetik ve farmakogenomik terimleri sinonim olarak kullanılmaktadır. Farmakogenetiğin amaçlarından biri bir madde veya zenobiyotiğin kişiler arasında beklenen etkilerine duyarlılığın genetik temelini tanımlamaktır (96).

Gen polimorfizmleri polimodal dağılım gösteren non-homojen bir popülasyonda ilaç yanıt frekansını açıklamaktadır. Günümüzde farmakogenetik çalışmaları, farmakokinetiğin içerdiği proteinlerde (absorbsiyon, dağılım, metabolizma ve boşaltım) ve farmakodinamiğin (reseptörler, iyon kanalları ve diğer enzimler) yer aldığı genetik varyasyonların kişilerin ilaç yanıtları ile ilişkisini araştırmaktadır (97).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında aydınlatılmış onam formu, FTND (Fagerstrom Test of Nicotine Dependence- bakınız ekte formlar) testini doldurmuş, kendisini Anadolu popülasyonuna ait olarak beyan eden ve adli bilimler alanında çalışmalar yapılmasına izin veren rasgele seçilmiş 100 kişiden (50 nikotin bağımlısı (FTND  $\geq$  4) ve 50 kontrol) alınan ağız içi sürüntü (buccal swab- Whatman® FTA®) örnekleri kullanılmıştır. Olası kontaminasyonların önüne geçmek ve DNA miktarını en verimli şekilde elde etmek adına, alınan örnekler eppendorf tüplerde en fazla 24 saat bekletilmiş, en kısa sürede DNA izolasyon aşamasına geçilmiştir.

Çalışmanın genel prosedürü şu şekildedir;

- toplanan örneklerin DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi,
- DNA miktarının belirlenmesi,
- multipleks PCR aşaması,
- PCR ürünlerinin saflaştırılması,
- SNaPshot reaksiyonu,
- SNaPshot reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması
- ve son olarak da SNaPshot reaksiyon ürünlerinin laboravutarda bulunan ABI 310 kapilerelektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi şeklindedir.

Çalışmanın bütün aşamalarında İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü adli moleküler genetik öğrenci laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. DNA izolasyonu

100 örnek için QIAamp® DNA Mini Kit ticari olarak satın alınmış. Ağız içi sürüntü için aşağıdaki prosedüre uyulmuştur.

1. Sürüntü pamuklarının üzerine 180  $\mu$ l ATL tamponu eklendi.
2. 10 dakika 85°C'de inkübe edildi.
3. 20  $\mu$ l proteinaz K eklendi ve vortekslendi.
4. 56°C'de 1 saat inkübe edildi.
5. 200  $\mu$ l AL tamponu eklendi, vortekslendi ve 70°C'de 10 dk inkübe edildi.
7. 200  $\mu$ l % 96-100 saflıkta etanol eklendi ve vortekslendi.

8. Elde edilen karışım QIAamp® mini spin kolona aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. 500 µl AW1 tamponu eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. 500 µl AW2 tamponu eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika Santrifüj edildi.
11. QIAamp® mini spin kolon steril 1.5µl'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 150 µl AE tamponu eklendi. Oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Örnekler kısa süreli kullanım için +4 °C'ye, uzun süreli saklama için -20°C'ye kaldırıldı.

### **3.2. DNA miktarının belirlenmesi**

DNA miktarının belirlenmesi için florimetrik yöntem kullanılmıştır. Ticari olarak satın alınan Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensetive) kit ile ® Florometre (Invitrogen) cihazında ölçüm yapılmıştır. Yöntem, floresans teknolojisi kullanır ve DNA'yı 260 nm dalga boyunda oldukça yüksek doğruluk ve hassasiyet ile ölçer. Aşağıdaki basamaklar izolatlarla uygulanmıştır.

- Her DNA örneği için 199 µl Quant-iT™ dsDNA HS Buffer ve 1 µl Quant-iT™ dsDNAHS Reagent karışımı hazırlanmıştır
- (200 µl) Buffer-reagent karışımından 190 µl alınarak üzerine 10 µl standart eklenerek standart 1 ve 2 oluşturulmuş böylelikle cihazın kalibrasyonu sağlanmıştır.
- Örnekler için Buffer-reagent (200 µl); 199 µl alınmış üzerine 1µl standart eklenerek birkaç saniye vortekslenmiştir.
- 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 1. Standart 1 ve 2. Standart sırası ile okutularak cihazın kalibrasyonu yapılmıştır.
- Örnek cihaza yerleştirilip, karışım içindeki ölçümü yapılmıştır.
- Cihazda hesaplanan DNA miktarı not edilmiştir.

- İzolatlar bu örneklere göre, PCR için 0,1-10 ng DNA miktar olacak şekilde seyreltilmiştir.

### 3.3. Multipleks PCR aşaması

Bu çalışmada 10 SNP lokusunun nikotin bağımlılığı ile ilişkilendirilmesi hedeflenmiştir. Bu lokusların ilk PCR'da ilgili aralıkları çoğaltılmış ikinci PCR'ında ise saflaştırma işlemini takiben tek baz uzama reaksiyonu esaslı SNaPshot Reaksiyon yapılmıştır.

#### 3.3.1. Primer dizaynı

Çalışmada referans numaraları verilmiş olan 10 SNP noktası (rs2273504, rs806368, rs2023239, rs806380, rs324420, rs2184026, rs16969968, rs1051730, rs4950, rs686) literatür bilgileri dikkate alınarak seçilmiş, bu noktalara uygun primerler multipleks çalışmayı mümkün kılacak şekilde aşağıdaki şekilde tasarlanmıştır;

- Primer uzunlukları 16-88 bp aralığında olmalıdır (en düşük 20 en yüksek 36 bp seçilmiştir),
- Amplikon uzunluklarının 50-145 bp aralığında olmalıdır
- Primerlerin erime sıcaklıklarının  $60 \pm 2$  °C ve tuz konsantrasyonu 180 mM ve pürin: pirimidin oranı 1:1 olmalıdır.
- Dizileri hesaplanan primerler ticari olarak satın alınmış, ürünlerin HPLC ile saflaştırılmış olmasına dikkat edilmiştir.

**Tablo 3.1** Tasarlanan primerlerin rs kodları, forward (F), reverse (R) dizileri ve amplicon uzunlukları

NCBI Rs kodu	PCR- F	PCR- R	Amplikon Boyutu (bç)
rs1051730	GGCTCTTCCATGAACCTCAA	GCCGGATGTACAGCGAGTAT	139
rs6474412	CAACAGAGCAAGACAGCCTCT	TCAACTCTTCACCATCCCCT	117
rs2184026	TGCAGCAAAAGAAAGCTGAA	AGGAAAGATGCTGGGTCACA	83
rs1801272	CGGGCTTCCTCATCGAC	TGGGTGTTTTCTTCTCCTG	83
rs16969968	TGAGAGTGGTAGTGGACCAAAA	CCTCACGGACATCATTTTCC	107
rs806380	CCGCCAGAAAGCAATTAT	CACCTTCCACTTTTAATGACCAA	149
rs1329650	GAATAAGAGGGCCGTGATGA	CTACCCCTTACTGGGCAGGT	127
rs3733829	TGCACTGCTCACTCCCTATG	TGAGGTGGTTGCTCAGAGTG	50
rs3025343	TGAAGTGGTTGCTGTTTCCA	ATGGCTGCAGGCTAAGAAGA	113
rs6265	TGGCTGACACTTTCGAACAC	AGAAGAGGAGGCTCCAAAGG	145

### 3.3.2. PCR Primer Karışımının Hazırlanması

Aşağıdaki tablo 3.2’de rs numaraları verilen primer stoklarından belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra 225 µl olması için 197,3 µl steril saf su eklendi.

**Tablo 3.2** Multipleks PCR için kullanılan primerlerin miktar tablosu

NCBI Rs Kodu	Forward (µl)	Reverse (µl)
rs1051730	1,25	1,25
rs6474412	1,5	1,5
rs2184026	1,8	1,8
rs1801272	1,8	1,8
rs16969968	1,5	1,5
rs806380	1	1
rs1329650	0,5	0,5
rs3733829	2	2
rs3025343	1,5	1,5
rs6265	1	1
TOPLAM	13,85	13,85

27,7 µl primer karışımı

225 µl – 27,7 µl = 197,3 µl steril saf su

### 3.3.3. PCR Bileşenlerinin Hazırlanması

Çalışmada QIAGEN Multipleks PCR kiti kullanılmıştır. Aşağıda PCR karışım tablosu verilmiştir.

**Tablo 3.3** Birinci PCR karışım tablosu

PCR master mix	4 $\mu$ l
Primer karışımı	3 $\mu$ l
Steril saf su	1 $\mu$ l
DNA	2 $\mu$ l
PCR Hacmi	10 $\mu$ l

**Tablo 3.4** Multipleks PCR döngü programı

Daha sonra aşağıda verilen multipleks PCR döngü programı uygulanmıştır.

Sıcaklık	95 °C	95°C	60 °C	65 °C	65°C	+4°C
Süre	10 dk	30 sn	50 sn	40 sn	60 sn	$\infty$

35 döngü

### 3.3.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işleminden sonra elde edilen üründe primer artıkları ve dNTP'ler bulunur. Bu maddeler SNaPshot Reaksiyonun düzgün çalışmamasına neden olur. Ürünlerin saflaştırılması için E.coli Exonükleaz I (Exo I) ve Shrimp (karides) Alkalın Fosfataz (SAP) kullanıldı. Birinci PCR ürününden 5  $\mu$ l alınıp üzerine 0,5  $\mu$ l (10 u/  $\mu$ l) Exo 1 ve 1  $\mu$ l (1u/  $\mu$ l) SAP eklendi. Elde edilen karışım santrifüjlenerek enzimlerin aktive olduğu sıcaklık olan 37°C'de 90 dk. inkübe edildi. Daha sonra enzimlerin inaktif hale gelmesi için 80°C'de 20 dakika bekletildi.

İnkübasyon sonrasında snapshot reaksiyonunda hemen kullanılacak örnekler kullanılmak üzere +4°C’de, daha sonra çalışılacak olanlar ise -20°C’de saklandı.

#### **3.4. İkinci PCR- (SnaPshot Reaksiyonu)**

İkinci PCR aşaması için tek baz uzama reaksiyonu temeline dayanan SNaPshot Multiplex Kit kullanılmıştır. Bu reaksiyonun amacı 10 SNP lokusunun tamamını tek seferde ve tek tüpte gerçekleştirmektir. Reaksiyon için gerekli maddeler ve PCR döngüsü aşağıda verilmiştir.

Kitin temelde ışımaya reaksiyonu olması sebebiyle tüp alüminyum folyo ile sarılı şekilde güneş almasına müsaade etmeden çalışılmıştır. Çalışma süresince maddeler buz ortamında tutulmuş, enzimlerin bozulmamasına dikkat edilmiştir. Örnekler hazırlandıktan sonra PCR işlemi GeneAmp 9700 (Applied Biosystem) cihazında gerçekleştirilmiştir.



**Tablo 3.5: İkinci PCR primerleri ve uzunlukları**

<b>RS NO</b>	<b>KUYRUKLU PRİMER</b>	<b>GÖZLENEN SNP</b>	<b>PRİMER UZUNLUK</b>
rs1051730	ATCATCAAAGCCCCAGGCTA	C/T	20
rs1801272	atattaTTCCTCATCGACGCC	A/T	21
rs1329650	accaAGATGCATAAAGGGTTCAGCA	A/C	25
rs3733829	ctctctcggcTGGGGAGGTCTTGCCC	C/T	26
rs6265	ctcagcTGGCTGACACTTTCGAACAC	A/G	26
rs806380	ctcccaAATATGGCCATGGCTTTTACTTAA	A/G	30
rs6474412	actaCTCTTTTCCTGTGTCTATTTGATGTC	C/T	30
rs3025343	ggatCGCAGTTACTAGATTAACCTTTGTTTG	A/G	31
rs2184026	ctctctcctcAAGCTGAAAAACACAAAAGAGACAA	C/T	35
rs16969968	ctcttcgacTGTGTCTTGTAATGTAGCGAATAGAAT	A/G	36

**Tablo 3.6** SNaPshot PCR karışım tablosu

<b>PCR Bileşenleri</b>	<b>Örnek Hacim/ Reaksiyon (µl)</b>	<b>Pozitif Kontrol Hacim/ Reaksiyon (µl)</b>	<b>Negatif Kontrol Hacim/ Reaksiyon (µl)</b>
SnaPshot Reaksiyon karışımı	2,5	2,5	2,5
SnaPshot primer karışımı	1,5	0,5	0,5
AmplifiyeDNA/ Kontrol DNA	1	1	0
Ultra distile saf H2O	0	1	2
<b>TOPLAM</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

**Tablo 3.7** SNaPshot reaksiyon döngüsü

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü sayısı</b>
94°C	5 dk.	1
96°C	10 sn	30
55°C	5 sn	
60°C	30 sn	
65°C	7 dk.	1
+4°C	∞	--

### **3.4.1. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Tek baz uzama reaksiyonunda bağlanamayan floresan işaretli ddNTP'ler olabilir. Bunlar daha sonra elektroforez aşamasından verim alınmasını engeller. Bu sebeple bu ddNTP'lerin temizlenmesi için 1 µl SAP (1U/µl) kullanıldı. Madde eklendikten sonra vortekslenerek, kısa bir süre (30 sn.) santrifüjlendi. Elde edilen karışım 37°C'de 90 dakika, 85°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında elektroforezde hemen kullanılacak örnekler kullanılmak üzere +4°C'de, daha sonra çalışılacak olanlar ise -20°C'de saklandı.

### **3.4.2. İkinci PCR Ürünlerinin Elektroforezi ve Değerlendirme**

Tez çalışmasının elektroforez değerlendirmesi için İstanbul Üniversitesi Adli Moleküler genetik laboratuvarında bulunan ABI Prism 310 Genetik Analizör (Applied Biosystems) kapiler elektroforez cihazı kullanılarak örneklerin elektroforezi, görüntülenmesi, tiplmesi ve sonuçların değerlendirilmesi yapılmıştır.

#### **3.4.2.1. Elektroforez İşlemi için Parametre Tayini**

Her bir yürütme evvelinde Data Collection Software 3.0 (Applied Biosystems) vasıtasıyla örnek listeleri hazırlanmıştır. GeneScan E5 modül parametreleri ayarlanarak, Matrix Standards Set DS-02 kit (Applied Biosystems) yüklenmiştir. Daha sonra yürütmeler bu standard kullanılarak yapılmıştır.

Analizde Tablo 3.7'de görülen GS POP-4 (1 ml) E5 modül parametreleri seçilmiştir. 36cm kapiler, POP 4 polimer ve GeneScan-120 Liz internal size standardı ticari olarak satın alınmış ve kullanılmıştır.

**Tablo 3.8** GeneScan E5 modül parametreleri aşağıda gösterilmiştir

<b>Parametre</b>	GS POP-4 (1ml) E5 module
<b>Matriks</b>	DS02
<b>Injeksiyon zamanı.</b>	5 sn
<b>Elektroforez voltajı</b>	15 kV
<b>Yürütme zamanı</b>	24 dak.
<b>Yürütme sıcaklığı</b>	60°C
<b>Şırınga pompalama süresi</b>	150 sn.

#### **3.4.2.2. SNaPshot Reaksiyon Ürünlerinin Elektroforeze Hazırlanması**

İkinci PCR ürünlerinin ABI Prism 310 Genetik Analizör cihazına yüklenmeden önce elektroforez işlemi için hazırlanması gerekmektedir. Bu işlem için Hi-Di Formamid, GeneScan-120 Liz internal size standart kullanılmadan önce kısa süre santrifüjlenmiştir. Her reaksiyon için 10 µl Hi-Di Formamid, 0.3 µl GeneScan-120 Liz internal size standard üzerine SAP uygulanmış ve 3 µl SNaPshot ürünü eklenmiştir. Elde edilen karışım kısa bir süre santrifüjlenerek 95°C’ de 5 dakika denatüre edilmiştir. Buzda 5 dakika bekletildikten sonra ABI Prism 310 Genetik Analizör cihazına yüklenmiştir.

#### **3.4.2.3. Elde Edilen Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi**

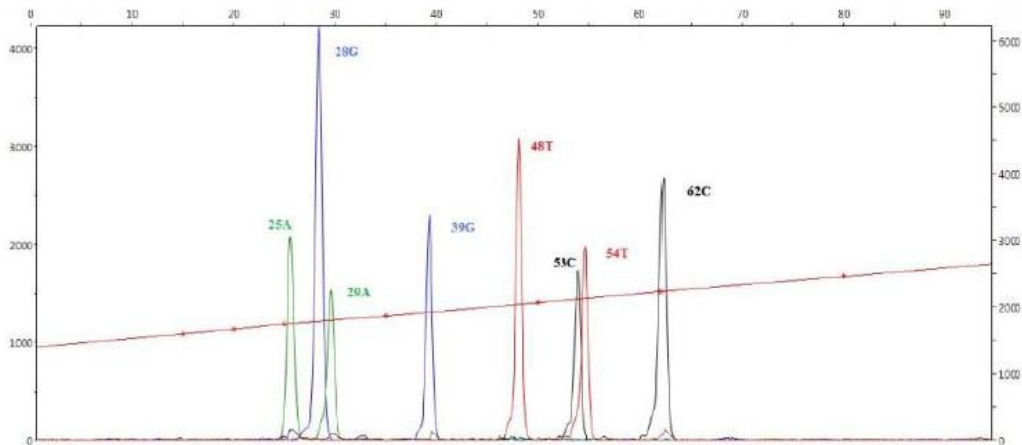
Verilerin analizi için GeneScan Analysis software 3.1.2 (Applied Biosystems) programı kullanılmıştır. Evvelce bilinen alel boyutlarıyla elektroforegramdaki pikler karşılaştırılarak SNP noktaları manuel olarak belirlenmiştir. Analize ilişkin tablo ekte verilmiştir (Bknz: Ham veriler)

#### 4. BULGULAR

Bu çalışma İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan gönüllülerden alınan onam formunun ardından hiç sigara kullanmamış ve kullanmayan 50 kontrol, 50 de FTND testi sonucu doğrultusunda sigara kullanıcılarından ağız içi sürüntü (buccal swap) örneği alınmıştır. Bu örneklerden DNA izolatları elde edilmiş, miktarları tayin edilerek kullanılmaya uygun olanlara aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir.

- Genomik DNA'nın çoğaltılması (Birinci PCR)
- Birinci PCR ürünlerinin saflastırılması
- SNaPshot reaksiyonu (İkinci PCR, uzama reaksiyonu)
- İkinci PCR ürünlerinin saflastırılması
- Elektroferez ayrımı ve sonuçların analizi

Çalışmanın ilk aşamasında ve daha sonra da belli aralıklarla SNaPshot Multiplexs Kitin doğru çalıştığının kanıtlanması için kontrol reaksiyonu yapılmıştır. ABI PRISM 310 Genetik Analizör cihazında Genescan 3.7 programı kullanılarak elde edilen piklerin renkleri ve beklenen son ürün uzunlukları (size) Tablo 4.1'de görülürken, Şekil 4.1'de ise SNaPshot Multiplexs Kit pozitif kontrol reaksiyonu sonucunu gösteren elektrofogram yer almaktadır. Mavi pikler guanini (G), yeşil pikler adenini (A), siyah pikler sitozini (C), kırmızı pikler timini (T) temsil etmektedir.



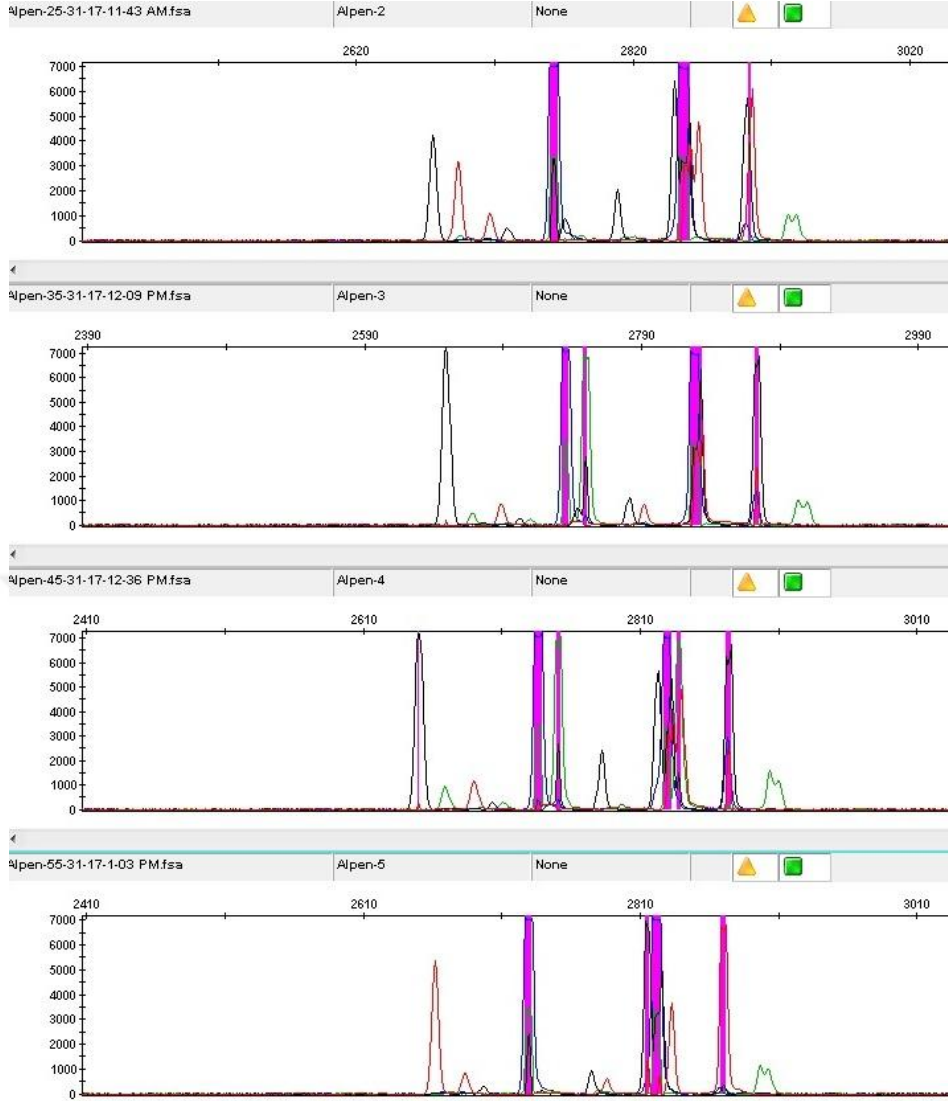
**Şekil 4.1** SNaPshot Multiplexs Kit pozitif kontrol reaksiyonu sonucu elektrofogramı

**Tablo 4.1:** SNaPshot multipleks kiti pozitif kontrol reaksiyonunda beklenen sonuçlar  
(ABI PRISM SNaPshot™ Multiplex Kit Protokol Kitapçığından alınmıştır.)

<b>Multipleks Kontrol Primer Karışımı</b>	<b>Son Ürün Uzunluğu (size)</b>	<b>Sinyal Rengi</b>	<b>Heterozigotluk</b>
20A Primer	21	Yeşil	Homozigot
28G/A Primeri	29	Mavi/Yeşil	Heterozigot
36G Primeri	37	Mavi	Homozigot
44T Primeri	45	Kırmızı	Homozigot
52C/T	53	Siyah/Kırmızı	Heterozigot
60C	61	Siyah	Homozigot

SNP analizi sonuçlarını değerlendirilirken gözlenen ürün uzunlukları beklenenlerden farklı olabilir. Primerlerin boyları, nükleotid içerikleri ve bağlandıkları boyalar uzama ürünlerinin hareketliliğini etkilemektedir. Bu durumda primerlerin boylarını 36 nükleotidi geçmeyecek şekilde tasarlamak uygundur. Genelde kısa fragmentler kendi uzunluklarından (size) yaklaşık 4-6 baz uzun görülebilmektedir. (SnaPshot Protokol)

Çalışılan 10 SNP noktasının bağlantısız 50 aktif 50 pasif sigara kullanıcılarından elde edilen genotip sonuçlarından rastgele seçilen 25 örnek Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, beş SNP lokusunda (rs16969968, rs806380, rs6474412, rs37333829, rs1329650) Türkiye toplumu için polimorfizm belirlenmiştir ancak bunlar muhtemelen örnek sayısının azlığından istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmamıştır.



**4.2:** Dört aktif sigara bağımlısı örnekte tüm lokusların multiplex görüntüsü (Pembe sütunlar 'pull-up peak'leri göstermektedir)

**Tablo 4.2: Seçilen 25 örneğe ait elde edilen genotip tablosu. (Pasif sigara kullanımı, kullanılmaması anlamındadır)**

Sıra No:	Örnek Kodu	Sigara Kullanımı	rs16969968	rs806380	rs3025343	rs6265	rs1051730	rs6474412	rs3733829	rs2184026	rs1329650	rs1801272
			A/G	A/G	A/G	A/G	C/T	C/T	C/T	C/T	A/C	A/T
1	S14	Aktif	A/A	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
2	S15	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/C	T/T
3	S16	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
4	S17	Aktif	G/G	A/G	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
5	S64	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
6	S65	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	T/T	C/T	C/C	-	T/T
7	S73	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
8	S69	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/T	C/C	A/A	T/T
9	S70	Aktif	G/G	-	G/G	G/G	C/C	-	C/T	C/C	A/A	T/T
10	S71	Aktif	-	A/A	G/G	G/G	-	C/C	C/T	C/C	-	T/T
11	S50	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
12	S55	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
13	S59	Aktif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
14	C6	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
15	C7	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
16	C8	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T



Sıra No:	Örnek Kodu	Sigara Kullanımı	rs16969968	rs806380	rs3025343	rs6265	rs1051730	rs6474412	rs3733829	rs2184026	rs1329650	rs1801272
			A/G	A/G	A/G	A/G	C/T	C/T	C/T	C/T	A/C	A/T
17	C171	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
18	C172	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
19	C155	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
20	C8	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
21	C10	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
22	C11	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
23	C145	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
24	C160	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T
25	C164	Pasif	G/G	A/A	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	T/T

#### 4.1. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak incelenmesi

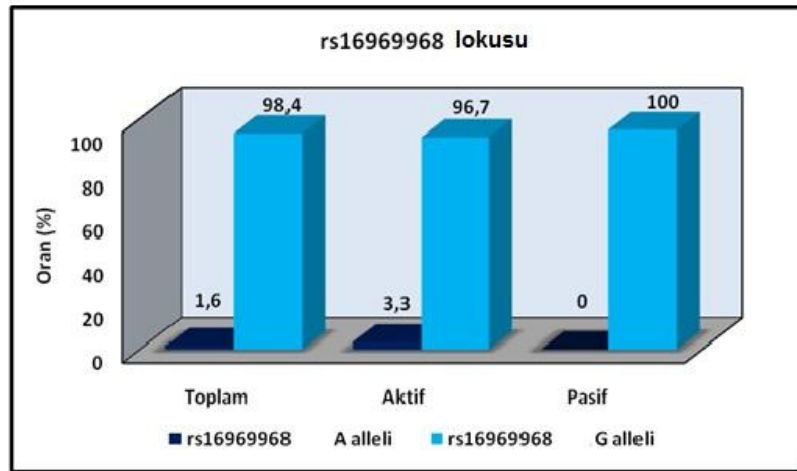
**Tablo 4.3:** Sigara Kullanımına Göre rs16969968 Lokusu Değerlendirmesi

rs16969968 Lokusu	Sigara kullanımı						<sup>a</sup> p	
	Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)			
	n	%	n	%	n	%		
<b>Genotipi</b>	A/A	1	1.1	1	2.1	0	0	0.495
	G/G	92	96.7	44	93.7	48	100	0.117
<b>Allel</b>	A	3	1.6	3	3.3	0	0	0.115
	G	185	98.4	89	96.7	96	100	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

Sigara kullanımına göre rs16969968 Lokusu; A/A ve G/G, genotipleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0,05$ ).

Sigara kullanımına göre rs16969968 Lokusu, A ve G allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.3:** rs16969968 Lokusu dağılımları

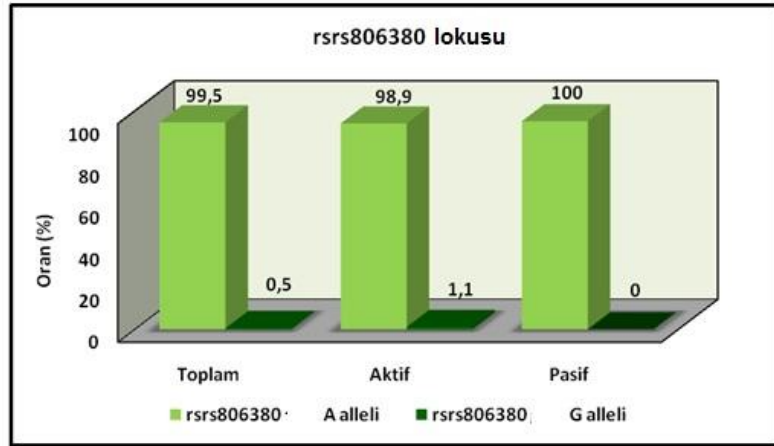
**Tablo 4.4:** Sigara Kullanımına Göre rs806380 Lokusu Değerlendirmesi

rs806380 Lokusu	Sigara kullanımı						<sup>a</sup> p	
	Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)			
	n	%	n	%	n	%		
<b>Genotipi</b>	A/A	95	99.0	46	97.9	49	100	<b>0.490</b>
	A/G	1	1.0	1	2.1	0	0	
<b>Allel</b>	A	191	99.5	93	98.9	98	100	<b>0.490</b>
	G	1	0.5	1	1.1	0	0	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

Sigara kullanımına göre rs806380 Lokusu, A/A ve A/G genotipleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p > 0,05$ ).

Sigara kullanımına göre rs806380 Lokusu, A ve G allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

**Şekil 4.4:** rs806380 Lokusu dağılımı

**Tablo 4.5:** Sigara Kullanımına Göre rs3025343 Lokusu Değerlendirmesi

rs3025343 Lokusu		Sigara kullanımı						<i>p</i>
		Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Genotipi</b>	<b>G/G</b>	99	100	50	100	49	100	-
<b>Allel</b>	<b>G</b>	198	100	100	100	98	100	-

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların (n=99) rs3025343 genotipi G/G'dir.

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların rs3025343 lokusu allellerinin tamamı (n=198) G'dir.

**Tablo 4.6:** Sigara Kullanımına Göre rs6265 Lokusu Değerlendirmesi

rs6265 Lokusu		Sigara kullanımı						<i>p</i>
		Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Genotipi</b>	<b>G/G</b>	88	100	48	100	40	100	-
<b>Allel</b>	<b>G</b>	176	100	96	100	80	100	-

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların (n=88) rs6265genotipi G/G'dir.

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların rs6265 lokusu allellerinin tamamı (n=176) G'dir.

**Tablo 4.7:** Sigara Kullanımına Göre rs1051730 Lokusu Değerlendirmesi

rs1051730 Lokusu		Sigara kullanımı						p
		Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Genotipi</b>	C/C	96	100	47	100	49	100	-
<b>Allel</b>	C	192	100	94	100	98	100	-

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların (n=96) rs1051730 genotipi C/C'dir.

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların rs1051730 Lokusu allellerinin tamamı (n=192) C'dir.

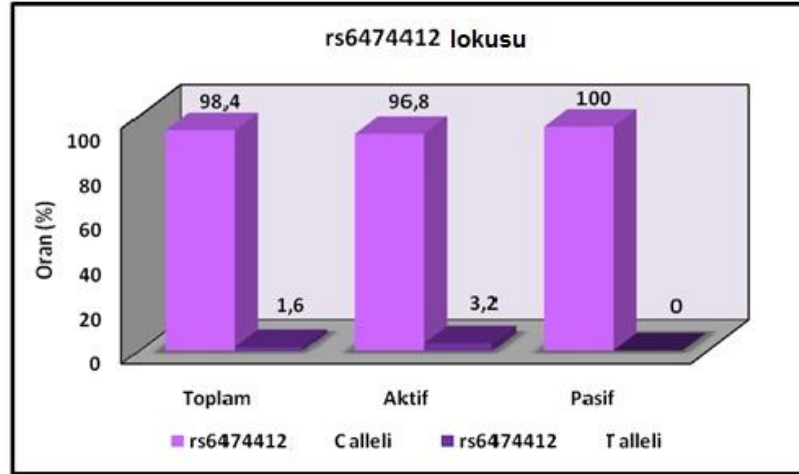
**Tablo 4.8:** Sigara Kullanımına Göre rs6474412 Lokusu Değerlendirmesi

rs6474412 Lokusu		Sigara kullanımı						p
		Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Genotipi</b>	C/C	94	98.0	45	95.8	49	100	<b>0.237</b>
	T/T	1	1.0	1	2.1	0	0	<b>0.490</b>
<b>Allel</b>	C	188	98.4	90	96.8	98	100	<b>0.114</b>
	T	3	1.6	3	3.2	0	0	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

Sigara kullanımına göre rs6474412 Lokusu; C/C ve T/T genotipleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Sigara kullanımına göre rs6474412 Lokusu, C ve T allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0,05).



Şekil 4.5: rs6474412 Lokusu dağılımı

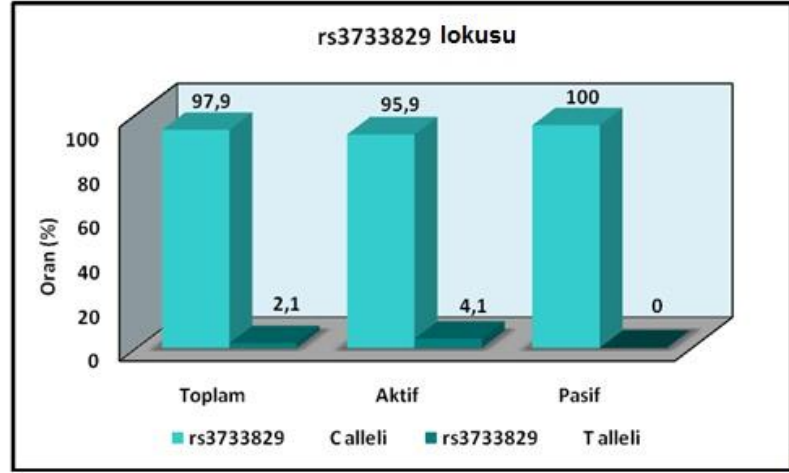
Tablo 4.9: Sigara Kullanımına Göre rs3733829 Lokusu Değerlendirmesi

rs3733829 Lokusu		Sigara kullanımı						<sup>a</sup> p
		Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)		
		n	%	n	%	n	%	
Genotipi	C/C	93	94.9	44	89.8	49	100	0.056
	C/T	4	4.1	4	8.2	0	0	0.117
Allel	C	191	97.9	93	95.9	98	100	0.059
	T	4	2.1	4	4.1	0	0	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

Sigara kullanımına göre rs3733829 lokusu; C/C ve C/T genotipleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p > 0,05$ ).

Sigara kullanımına göre rs3733829 lokusu, C ve T allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).



Şekil 4.6: rs3733829 Lokusu dağılımı

Tablo 4.10: Sigara Kullanımına Göre rs2184026 Lokusu Değerlendirmesi

		Sigara kullanımı						p
		Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)		
rs2184026 Lokusu		n	%	n	%	n	%	
<b>Genotipi</b>	C/C	87	100	48	100	39	100	-
<b>Allel</b>	C	174	100	96	100	78	100	-

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların (n=87) rs2184026 genotipi C/C'dir.

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların rs2184026 Lokusu allellerinin tamamı (n=174) C'dir.

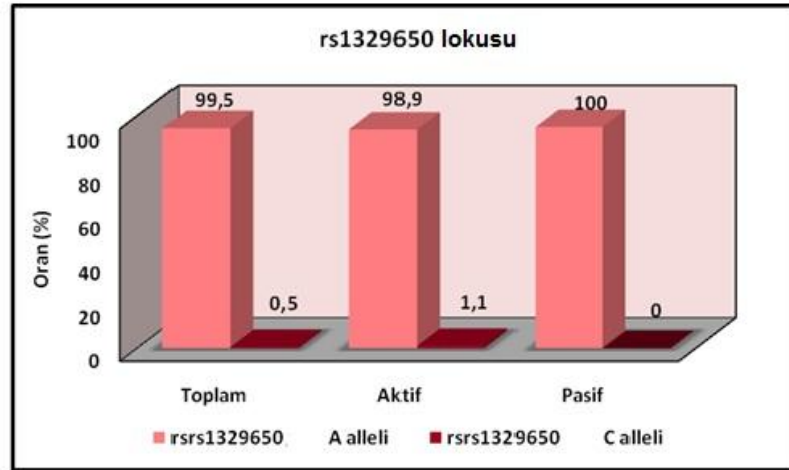
**Tablo 4.11:** Sigara Kullanımına Göre rs1329650 Lokusu Değerlendirmesi

rs1329650 Lokusu	Sigara kullanımı						<sup>a</sup> p	
	Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)			
	n	%	n	%	n	%		
<b>Genotipi</b>	A/A	89	96.7	43	93.5	46	100	<b>0.242</b>
	A/C	1	1.1	1	2.2	0	0	<b>1.000</b>
<b>Allel</b>	A	181	99.5	89	98.9	92	100	<b>0.495</b>
	C	1	0.5	1	1.1	0	0	

<sup>a</sup>Fisher's Exact Test

Sigara kullanımına göre rs1329650 lokusu; A/A ve A/C genotipleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0,05$ ).

Sigara kullanımına göre rs1329650 lokusu, A ve C allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.7:** rs1329650 Lokusu dağılımı



**Tablo 4.12:** Sigara Kullanımına Göre rs1801272 Lokusu Değerlendirmesi

rs1801272 Lokusu		Sigara kullanımı						<i>p</i>
		Total		Aktif (n=50)		Pasif (n=50)		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Genotipi</b>	<b>T/T</b>	92	100	49	100	43	100	-
<b>Allel</b>	<b>T</b>	184	100	98	100	86	100	-

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların (n=92) rs1801272 genotipi T/T'dir.

Sigara kullanımı aktif ve pasif olan tüm olguların rs1801272 Lokusu allellerinin tamamı (n=184) T'dir.

#### 4.1.1. İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için veriler, NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (Frekans, Oran) kullanılmıştır. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi kullanılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Adli DNA analizinde; bir kişinin bilinen bir referans materyali ile bilinmeyen kanıt materyalinden alınacak örneklerinin karşılaştırılması prensibine dayanan ‘kısa bitişik tekrarlar’ın (short tandem repeat-STR) kullanımı altın standard olarak tanımlanmaktadır (23). Ancak, yalnızca STR’ler değil SNP’lerin de en önemli kullanım kısıtlılığı karşılaştırma yapılacak bir referans numune bulunmadığı zamanlardır. Bu durum ile; suçlunun başarılı bir şekilde iz bırakmadığı veya ülkemiz gibi DNA veri bankasına sahip olmayan bölgelerde karşılaşılabılır. Bahsedilen zorluklar, adli bilimler için adli DNA fenotiplendirme isimli yeni bir kavramı ortaya çıkarmıştır (26,98). Adli DNA fenotiplendirmenin amacı öncelikle kişinin saç rengi, göz rengi, ten rengi gibi gözlenebilir özelliklerini eldeki ohay mahallinden gelecek örnek materyalini kullanarak genetik kodlarından bulabilmek, sonrasında ise mümkünse o kişiyi tanımlayabilecek başka özelliklerine dair bilgi edinebilmektir. Günümüzde SNP’ler fenotiplendirmede kullanıldığı gibi madde bağımlılığındaki ilgili genlerin ortaya çıkarılmasında da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Madde bağımlılığı, kompulsif madde arayışı ve alımı ile karakterize olan nörolojik değişikliklerin oluşturduğu kronik bir beyin hastalığıdır (99). Bağımlılığın, dünya genelinde ailevi ve toplumsal seviyelerde korozif etkiler yapan halk sağlığı sorunu olduğu belirtilmektedir (100). Özellikle uyuşturucu bağımlılığına çevre faktörlerinin katkısının yanı sıra çoklu genler ile genetik faktörlerin de etki ettiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Önlenebilir ölüme yol açan ve yaygın olarak istismar edilen maddelerin başında sigara ve esrar gelmektedir. Bir çok araştırmacı tarafından yasal ve yasadışı maddelere bağımlılık yaratmayı öngören allellerin varlığı bildirilmiştir (72, 73, 101, 102). Kokain, opioid, nikotin ve alkol bağımlılığının çoklu SNP asosiyasyonları da araştırılmıştır (103). Bunlara ek olarak, dürtüsel kişilik ve/veya psikiyatrik bozuklukların çeşitli yönlerinin de madde bağımlılığı ile ortaya çıktığı bildirilmektedir (104,105). Bu durumda, adli DNA fenotiplendirmeye ek bir araştırma alanı olarak davranışsal özelliklerin incelenmesi önem taşır.

Genetik ilişkilendirme çalışmaları farklı genetik özellikler taşıyan her bir toplum için farklı sonuçlar verebilir. Bu sebeple elde edilen veriler ilgili toplum için tekrarlandığında daha net değerler verecektir. Bu tez çalışmasında da, evvelce nikotin bağımlılığı ile ilişkilendirilmiş olan on (10) SNP lokusu seçilmiş ve aile geçmişi Türkiye popülasyonuna ait olduğunu beyan eden, katılmaya gönüllü 50 aktif ve 50 pasif sigara kullanıcılarından alınan ağız içi sürüntü örnekleri incelenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, rs16969968'in A alelinin (nikotin bağımlılarında %38, içmeyenlerde %32 alel frekansı) hem kadın hem de erkeklerde nikotin bağımlısı olabilmeyi bağımlı olmayanlarla karşılaştırdığında %30 arttırdığı bulunmuştur (85,106). CHRNA5 geni 15. kromozomda bulunan bu bölge dünya popülasyonları arasında çok farklı alel frekansları göstermektedir. Kokain bağımlılığı ile ilişkilendiren çalışmalar olduğu gibi (107), akciğer kanseri ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) ile ilişkilendiren çalışmalar da yapılmıştır (108,109). Amino asit değişikliğine yol açan rs16969968 risk varyantı, Avrupa kökenli toplumlarda çok yaygın olmasına rağmen (minor alel sıklığı-minor allele frequency (MAF)= 0.42), Asya'lı örneklerde nadir bulunduğu (MAF= 0.01–0.03) ve Sahra altı Afrika popülasyonlarında ise hiç bulunmadığı (MAF=0) bildirilmiştir (84). Bu sebeple Avrupa popülasyonlarında nikotin bağımlılığı için kuvvetli bir risk faktörü iken Afrika-Amerika popülasyonları için risk alel prevalansının düşüklüğü sebebiyle küçük bir rol oynar. Bizim çalışmamızda bu bölgede 50 örneğin bir tanesinde tam mutasyon gözlenmesine rağmen sigara kullanımına göre; A/G ve A/A, genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

Corradini, B., ve ark. (110)'larının nikotin bağımlılığının genetik varyantlarını incelerken referans verdikleri bir bölge olan CNR1 geni üzerindeki rs806380, adolesan beyaz (caucasian) ırkta esrar bağımlılığı semptomları ile ilişkilendirilmiştir (111). Aynı zamanda Avrupa-Amerika'lı örneklerde çoklu madde kullanımı ile ilişkilendirilebileceği öne sürülmüştür (112). Bizim çalışmamızda 50 nikotin bağımlısı arasında yalnızca bir örnekte polimorfizm gözlenmiştir. Buna göre rs806380 lokusu, A/G ve A/A genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

Tütün ve genetik konsorsiyumunun yaptığı çalışmada sigaranın bırakılmasında Dopamine Beta-Hydroxylase (DBH) lokusunda 23 kb 5' yer alan bir SNP olan rs3025343[G]'ün geniş genom (genome-wide) çalışmalarında çok önem taşıdığı belirtilmektedir (113). Sigaranın bırakılmasında anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur ( $p=0.015$ ) (114). Bizim çalışmamızda hiçbir örnekte polimorfizm görülmemiştir. Sigara kullanıcısı olan ve olmayan tüm olguların ( $n=99$ ) rs3025343 lokusu genotipi G/G'dir. ( $p>0,05$ ).

Agrawal, A., ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 'nikotin bağımlılığı ile ilişkili genler esrar bağımlılığına da etki edebilir mi?' sorusuna yanıt aramışlardır (101). Genellikle esrar ve sigara bağımlılığının eşzamanlı yaşandığını savunan araştırmacılar, bu iki maddenin kendilerine özgü farmakolojik profilleri olmasına rağmen, beyindeki ödül merkezinin uyarımı ya da negatif duygu durum stresi gibi ortak özellikler sebebiyle pleiotropik etkileri olabileceğini iddia etmişlerdir. Bu gibi sorularını yanıtını ise genomwide asosiasyon çalışmaları (GWAS) ile meta analiz yapılarak bulunmaktadır (115). GWAS çalışmaları aynı anda milyonlarca SNP noktasını inceler ve yalnızca  $p$  değeri  $5 \times 10^{-8}$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. Agrawal, A., ve ark.(101)'nin çalışmasında genomwide önemli olduğu düşünülen 11 SNP noktası günde içilen sigara miktarı, sigaraya başlama ve sigarayı bırakma/ sigara kullanımına devam etme durumları için incelenmiştir. Bu 11 SNP noktasından biri de BDNF geninde bulunan rs6265'dir. Bahsi geçen çalışmada bu nokta sigara başlama ile ilişkilendirildiği gibi ömür boyu esrar kullanımı ile de ilişkisi bulunmuştur. Bizim çalışmamızda örneklerinde hiç birinde değişiklik gözlenmemiş, sigara kullanımına göre rs6265 lokusu, lokusu genotipi tüm örneklerde G/G'dir ( $p>0,05$ ).

CHRNA5 geninde bulunan rs 1051730 ile daha evvelce bahsedilen CHRNA3 geninde bulunan rs16969868'in genotip dağılımları aynı olması sebebiyle bir çok çalışmada bu iki SNP'nin birlikte çalışıldığı belirtilmektedir (116). Bazı çalışmalarda CHRNA5/A3/B4 gen kümesinde yer alan SNP noktalarını birlikte değerlendirmektedir (117). Bu iki SNP noktasının (rs16969868 ve rs1051730) birlikte kuvvetli linkage disequilibrium (LD)'ye sahip oldukları belirtilmektedir. Bir çok farklı populasyonda bunlara yönelik çalışmalar yapılmıştır (bknz. Tablo 5.1). Bizim çalışmamızda Sigara tüm örneklerde C/C genotipi gözlenmiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 5.1** Sigara bağımlılığı ile rs16969968, rs1051730 noktalarının bildirilen asosiyasyonu

dbSNP ID	Sample origin	Sample size	Cases (N)	Controls (N)	Minor allele frequency	Odds ratio	p value
rs16969968 ( <i>CHRNA5</i> )	European (USA+Australia)	1929	1050	879	0.38	— <sup>a</sup>	6.42E-04
	European (USA+Australia)	1929	1050	879	0.383	1.31	1.30E-04
	Caucasian	1236	955	281	0.34	— <sup>a</sup>	7.00E-03
	European American	1968	1093	875	0.378	1.37	6.30E-08
	European American	377	271	106	0.415	1.79	9.00E-04
	European American	2062	1063	999	0.35	1.4	4.14E-07
	European (meta)	24,807	14,452	10,355	— <sup>a</sup>	1.327	5.96E-31
	German (3 cohorts)	5561	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0.38	1.18	1.90E-04
	Mixed ethnic ancestry	571	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0.357	— <sup>a</sup>	<0.0001
	Caucasian	3441	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0.41	— <sup>a</sup>	1.10E-04
rs1051730 ( <i>CHRNA3</i> )	USA+Australia	1929	1050	879	0.38	— <sup>a</sup>	9.93E-04
	European (USA+Australia)	1929	1050	879	0.382	1.3	2.01E-04
	Caucasian	1236	955	281	0.32	— <sup>a</sup>	2.00E-02
	European American	1933	1073	860	0.378	1.37	9.30E-08
	European American	377	271	106	0.415	1.79	9.00E-04
	European American	2062	1063	999	0.349	1.4	5.88E-07
	German (3 cohorts)	5561	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0.38	1.19	7.50E-05
	Mixed ethnic ancestry	571	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0.358	— <sup>a</sup>	<0.0001
	Caucasian	3441	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0.41	— <sup>a</sup>	1.50E-04

(Wen, L., Jiang, ve ark. (118) 'Contribution of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster on chromosome 15 to tobacco smoking: from genetic association to mechanism'

Chen, L. S., ve arkadaşları (119), Avrupa kökenli 2,047 örneğin (1,062 bağımlı ve 985 kontrol) 8p11 kromozomunda CHRNA6-CHRNA3 gen kümesinde bulunan rs6474412, 19q13 kromozomunda CYP2A6 geni yakınındaki EGLN2'deki rs3733829 ve kromozom 10q23'de bir intergenik bölge olan rs1329650 noktalarını FTND testindeki soruların dağılımı ve ağırlıklarına göre araştırmışlardır. Bu üç bölgenin bizim çalışmamızda da bulunması sebebiyle sonuçlar tarafımızı ilgilendirmiştir. Yaptıkları çalışmada rs6474412 ve rs3733829 anlamlı fakat zayıf ilişkili olarak bulurken rs1329650 noktası için ilişki bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda sigara kullanımına göre rs6474412 lokusu, C ve T allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ancak yalnızca bir kişide değişim gözlenmiştir. Sigara kullanımına göre rs3733829 lokusu; C/T ve C/C genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmazken ( $p=0,056$ ;  $p>0,05$ ); sigara kullanan dört örnekte C/T genotipi görülürken sigara kullanmayan kullanıcılarda C/C genotipi oranının yüksek olması dikkat çekicidir. Sigara kullanımına göre rs3733829 lokusu, C ve T allelleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). rs1329650 lokusunda da; A/C ve A/A

genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p>0,05$ ) ancak bir sigara kullanıcısında A/C genotipi gözlenmiştir.

Beuten ve arkadaşlarının'nın (120) 1,276 sigara kullanıcısı ve kontrol arasında yapmış olduğu kohort çalışmada 404 Afrikan Amerikan veya Avrupa Amerikan kökenli çekirdek aile üzerinde yürütülmüştür. Bu çalışmada C, C, ve G alelleri ile belirtilen rs2491397, rs2184026, ve rs3750344 SNP noktalarından oluşan haplotip tanımlanmıştır. Bu SNP noktaları hem havuz hem de Afrikan Amerika örneklerinde pozitif anlamlı nikotin bağımlılığı ilişkisi göstermiştir. Bu SNP'ler GABABR2 geninin yaklaşık 135 kb'sini kapsamaktadır. Bizim çalışmamızda bu yer alan rs2184026 örneklerin hiçbirinde polimorfizm göstermemiştir. Sigara kullanımına göre rs2184026 lokusu, tüm örneklerde C/C gözlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Siedlinski, ve arkadaşlarının (109), yapmış olduğu çalışmada 19q13 kromozomu CYP2A6 geninde bulunan rs1801272 bu bölgedeki en önemli anlamlılık arz eden ikinci SNP olarak tanımlanmıştır. Ancak bizim çalışmamızda örneklerin hiç birinde ilişki kurulamamıştır. Sigara kullanımına göre rs1801272 lokusu, tüm örneklerde T/T olarak gözlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Çalışmamızın kısıtlılıkları örnek sayısının az olması, ağız içi sürüntü örneklerinden çoğunlukla yeterli miktarda DNA elde etmekte zorlanması veya hızlı çalışılmadığı takdirde kontaminasyona açık olması, sigara kullanıcısı örneklerden alınan FTND testindeki sorularının her birinin ağırlığına göre inceleme yapılabilir olması ve belki de kadın-erkek gruplarının ayrılmamış olması gösterilebilir. Bu alanda yapılacak sonraki çalışmalarda örnek sayısının artırılması ve bağımlılıkla ilgili daha fazla SNP lokusunun çalışmaya dahil edilmesi ile daha anlamlı sonuçlar elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

## 6. SONUÇ

Örnek gösterilen çalışmalar ve bulgulardan görülebileceği gibi araştırma konumuz güncelliğini korumaktadır ve ülkemizde buna yönelik başka bir çalışma yapılmamıştır. SNP noktalarının adli DNA fenotiplendirme ve adli psikiyatri ilişkisi içerisinde çalışılması birçok alandaki profesyonellerin işine yarayacak sonuçlar verecektir.

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışmada istatistiksel olarak anlamlı sonuç veremeyecek kadar az değişim göstermiş olan dört SNP noktası (rs16969968, rs806380, rs6474412, rs3733829, rs1329659) ve diğer populasyonlarda CHRNA5/A3/B4 gen kümesinde birlikte çalışılan rs1051730 tekrar çalışılmalıdır. Bunlara ek olarak, bizim çalışmamızda yer almayan CHRNA3 genindeki rs578776 noktası eklenip, örnek sayısı anlamlı sonuçlar verebilecek çoğunluğa ulaştırılarak tekrarlandığında elde edilecek verilerin Anadolu popülasyonu ile ilgili olarak adli bilimler, adli psikiyatri ve bağımlılık farmakogenetiği alanlarına önemli katkı sağlayacağı açıktır.

## 7. ÖZET

Madde bağımlılığı, kronik bir beyin hastalığı olarak tanımlanır. Bağımlılığın sonucu olan nörobiyolojik değişiklikler, zorlayıcı madde arayışına ve alımına neden olmaktadır. Tütün kullanımı, sadece aşırı derecede bağımlılık yapan, zararlı bir nikotin tüketim biçimi değil, aynı zamanda en yaygın olanıdır. Çevresel faktörler ve genetik altyapı kullanımının başlangıcından kronik bağımlılığa kadar geçen sürecin tamamında yer alır. Yakın zamanda yapılan GWAS ve ilişkilendirme çalışmalarında, nikotinik asetilkolin reseptörleri ve metabolize edici genler arasından kuvvetli ilişki saptanmıştır. Bu da, onları belirleyici markırlar yapmaktadır. Nikotin bağımlılığının farmakokinetik ve farmakodinamikleri, adli bilimler için muhtemel bir belirleme mekanizması olacaktır. Bu çalışmada, Anadolu nüfusunda nikotin bağımlılığı riskini etkileyen varyantları araştırmak için 10 aday gende yer alan 10 tek nükleotid polimorfizmini (SNP), 50 nikotin bağımlısı olguda ve 50 kontrol örneğinde analiz ettik. Çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden 50 bağımlı ve 50 kontrolden ağız içi sürüntü örnekleri toplandı. Bağımlılığı değerlendirmek için ‘nikotin bağımlılığı için Fagerström testi (FTND)’ kullanıldı. Nikotin bağımlısı grup FTND 4 veya daha fazla olanlardan seçildi. Kontrol grubuna ise kesin olarak FTND 0 olanlar dahil edildi.. SNP lokusları SNaPshot multipleks kitiyle genotiplendirildi ve istatistiksel analiz Fishers exact testi ve ki-square testi ile yapıldı. Beş SNP lokusunda varyasyonlar gözlemlendi (rs16969968, rs806380, rs3733829, rs6474412, rs1329650). Olguların sayısı popülasyon genetiği sıklığı ile analiz etmek için yeterli olmadığından sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bulgularımız Anadolu nüfusundaki bu 10 lokus ile nikotin bağımlılığı arasında anlamlı olmayan bir ilişki göstermesine rağmen, varyans bulduğumuz 5 SNP lokusundaki vakaların sayısının artması hem adli genetikçiler hem de psikiyatristler için anlamlı sonuçlar sağlayacaktır

**Anahtar Kelimeler:** Madde Bağımlılığı, Bağımlılık, SNP, Adli Bilimler



## 8. SUMMARY

Substance addiction is defined as a chronic brain disorder. Neurobiological changes as a result of addiction leads to compulsive drug seeking and taking. Tobacco smoking is not only an extremely addictive and harmful form of nicotine (NIC) consumption but also unfortunately the most prevalent one. Environmental factors and genetic background both involves from the beginning to chronic dependence. Recent GWAS and association studies shown strong genetic effect about nicotinic acetylcholine receptors and metabolizing genes which makes them predictive markers. Pharmacokinetics and pharmacodynamics involved in nicotine dependence would be a possible prediction mechanism for forensic sciences In order to discover the variants influencing risk for nicotine dependence in Anatolian population we examined 10 candidate genes and analyzed 10 single nucleotide polymorphisms (SNP) loci in 50 cases and 50 controls.. Buccal swap samples collected from 50 cases and 50 controls accepting to involve in study voluntarily. The Fagerström test for nicotine dependence (FTND) was used to assess dependence. FTND of 4 or more required for case group. Control group strictly choosen from people who has FTND 0. SNP loci genotyped with SNaPshot multiplex kit and statistical analysis were done with Fishers exact test and chi-sqaure test. We observed variations in five SNP loci (rs16969968, rs806380, rs3733829, rs6474412, rs1329650). Number of cases were not sufficient to analyze with population genetics frequencies and found statistically not significant. Eventhough our findings indicated non-significant association between those 10 loci and nicotine dependence in Anatolian population, we believe increased number of cases with 5 SNP loci that we found variance will provide significant results for both foresic geneticist and psychiatrists.

**Keywords:** Drug addiction, Dependence, SNPs, Forensic genetics

## 9. KAYNAKLAR

1. Nevo E. Diversity is the Key to Life and Human Culture. A Lecture delivered at the inauguration of the “Ansell-Teicher Research Foundation for Genetics and Molecular Evolution” Board of Governors Meeting, 28 th May, 1985
2. National Research Council. Perspectives on biodiversity: valuing its role in an everchanging world. National Academies Press,1999.
3. Bernstein J. Polymorphism. In Strength from Weakness: Structural Consequences of Weak Interactions in Molecules, Supermolecules, and Crystals. Springer Netherlands 2002;247-260.
4. Brookes AJ. The essence of SNPs. Gene 1999;234:177–86.
5. Karki R ve ark. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. BMC medical genomics 2015;8(1),37.
6. Mattos LCD. Molecular polymorphisms of human blood groups: a universe to unravel. Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia 2011;33(1):6-7.
7. Bozkaya ÖG. Klinisyenler İçin Mutasyon ve Polimorfizm. Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics 2009;18(2):47-53.
8. Gill P ve ark. Forensic application of DNA ‘fingerprints’. Nature 1985;318(6046): 577-579.
9. Jeffreys AJ ve ark. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature 1985;314:67-73.
10. Budowle B ve Van Daal A. Forensically relevant SNP classes. BioTechniques: The International Journal of Life Science Methods 2008;44(5):603.
11. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 1990;262(4):56-61.
12. <https://experiment.com/u/hzQTnQ>
13. Altunçul H. Kemik Dokudan DNA Çekitleme Ve Tipleme Yöntemleri, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, 2001.
14. Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Investigative Genetics 2013;4(1):22.

15. Connealy PM. Human Genetic Polymorphism. Genetic Stability And Recombinant Product Consistency Dev. Biol Stand. Basel, Karger. Edited By Brown F. Lubinieck A.S. 1994;83: 107-110.
16. Saferstein R., Criminalistics: An Introduction To Forensic DNA Analyses. 2. Edition Pearson Prentice Hall New Jersey, 2004, 34-50.
17. <http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch22/VNTR.html>
18. Bülbül Ö. Kimliklendirme ve Nesep Tayini İçin Otozomal SNP Lokuslarının Belirlenmesi ve Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Ağustos 2009.
19. Sachidanandam R ve ark. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 2001;409(6822): 928–33.
20. Budowle B, Dickinson D. Mitochondrial DNA SNP Detection: Design Issues and Use of the Mass Spectrometer as an Analysis Platform, FBI Laboratory, 2501 Investigation Parkway; Quantico, VA 22135.
21. Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvanen AC. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. Genome Res. 200;10:1031–1042.
22. Hiratani H ve ark. Multiple SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2005;90:2898–903.
23. Hardenbol P ve ark. Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: Over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay. Genome Research 2005;15:269–75.
24. Børsting C, Sanchez JJ, Morling N, Hughes S, Moody A., Forensic genetic DNA typing with PCR based methods. In Pcr: Methods Express. Scion Publishing Limited., 2007
25. Quintana's B, lvarez-Iglesias VA, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. Forensic Science International 2004;140:251–257.

26. Kayser M. Forensic DNA phenotyping: predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics* 2015;18:33-48.
27. Kayser M ve Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3:154-61.
28. National Research Council of the National Academies. (2014) *Identifying the Culprit: Assessing Eyewitness Identification.* Washington D.C.: The National Academies Press;.
29. Stranger BE, Stahl EA ve Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics* 2011;187:367-83.
30. Morling N. Forensic genetics. *The Lancet* 2004;364:10.
31. Morley JM ev ark. Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 1999;112:241– 248.
32. Norton N ve ark. Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools. *Hum Genet* 2002;110:471–478.
33. Coble MD ve ark. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med.* 2004;118:137–146.
34. Sobrino B ve Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic science international*, 2005;154(2):181-194.
35. Jenkins S ve Gibson N. High-throughput SNP genotyping, *Comp Funct Genom* 2002;3:57–66.
36. Chen X ve Sullivan PF Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The Pharmacogenomics Journal* 2003;3(2):77-96.
37. Pastinen T ve ark. A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. *Physiological Genomics* 2003;16:184–93.
38. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 1996;242:84-89.

39. Ronaghi M, Uhlen M, Nyre'n P. A sequencing method based on real-time Pyrophosphate. *Science* 1998;281:363–365.
40. Harrison C ve ark., "A sensitive issue: Pyrosequencing as a valuable forensic SNP typing platform." *International Congress Series*. Vol. 1288. Elsevier, 2006.
41. Sokolov BP. Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:3671.
42. Olivier M. The Invader® assay for SNP genotyping. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2005;573(1):103-110.
43. De Angelis DA. Why FRET over genomics?. *Physiological genomics* 199;1(2):93-99.
44. Timur S. Antalya'da SNP Analizi, Uzmanlık Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, Antalya, 2006.
45. Pusch W ve ark. Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics* 2003;4.4:463-476.
46. Pusch W ve M. Kostrzewa. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in screening and diagnostic research. *Current Pharmaceutical Design* 2005;11(20):2577-2591.
47. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977: 74(12): 5463-7.
48. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986: 51 Pt 1: 263-73.
49. Lveer ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al., Initial sequencing ve analysis of the human genome. *Nature* 2001: 409 (6822): 860-921.
50. Filoglu, G., Sah, I., Dogan, M., Nalcaoglu, S. B., Bulbul, I. T. O., & Unsal, T. Application of next generation sequencing in forensic science Yeni nesil dizilemenin adli bilimlerde kullanımı. *Medicine*, 2017, 6(1), 157-62.

51. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-945.
52. Margulies M, Egholm M, Altman WE et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376-380.
53. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA, Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(5): 490-7.
54. Taşlıdere H. K Mental Retardasyon Ve/Veya Multipl Konjenital Anomali'li Olguların Yeni Nesil Dizileme Tekniği İle Genetik Etiyolojisinin Araştırılması, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2016
55. Børsting, Claus, ve Niels Morling. "Next generation sequencing ve its applications in forensic genetics." *Forensic Science International: Genetics* 18 (2015): 78-89.
56. Y. Yang, B. Xie, J. Yan, Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science, (2014), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2014.09.001>
57. Goodwin, Sara, John D. McPherson, and W. Richard McCombie. "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies." *Nature Reviews Genetics* 17.6 (2016): 333-351.
58. McLellan AT, Lewis DC, O'brien, CP, Kleber HD. Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *Jama*, 2000;284(13):1689-1695.
59. Edwards R. The problem of tobacco smoking. *BMJ* 2004;328: 217–219.
60. Williams JT, Begleiter H, Porjesz B, Edenberg HJ, Foroud T, Reich T ve ark. Joint multipoint linkage analysis of multivariate qualitative and quantitative traits. II. Alcoholism and event-related potentials. *Am J Hum Genet* 1999;65: 1148–1160.
61. Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz R. Genetic Influence on Smoking: A Study of Male Twins. *New England Journal of Medicine*. 1992; 327:829–33

62. Heath AC, Martin NG. Genetic models for the natural history of smoking: evidence for a genetic influence on smoking persistence. *Addict Behav* 1993;18:19–34.
63. Tsuang MT, Lyons MJ, Eisen SA, Goldberg J, True W, Lin N ve ark. Genetic influences on DSM-III-R drug abuse and dependence: a study of 3,372 twin pairs. *Am J Med Genet* 1996;67:473–477.
64. Kendler KS, Prescott CA. Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 1998;173:345–350.
65. Kendler KS, Karkowski LM, Corey LA, Prescott CA, Neale MC. Genetic and environmental risk factors in the aetiology of illicit drug initiation and subsequent misuse in women. *Br J Psychiatry* 1999;175: 351–356.
66. Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC, Prescott CA. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch GenPsychiatry* 2000;57: 261–269.
67. Karkowski LM, Prescott CA, Kendler KS. Multivariate assessment of factors influencing illicit substance use in twins from female-female pairs. *Am J Med Genet* 2000;96: 665–670.
68. Rothman RB, Blough BE, Baumann MH. Dopamine/serotonin releasers as medications for stimulant addictions. *Progress In Brain Research* 2008;172:385-406.
69. Cami J ve Farré M. Drug addiction. *New England Journal of Medicine* 2003;349(10):975-986.
70. Park ER ve ark. Black and White adults' perspectives on the genetics of nicotine addiction susceptibility. *Addictive Behaviors* 2011;36(7):769-772.
71. Center for Substance Abuse Treatment. *Substance Abuse Treatment: Addressing the Specific Needs of Women*. Rockville (MD): Substance Abuse and Mental Health Services Administration (US); 2009.

- (Treatment Improvement Protocol (TIP) Series, No. 51. Chapter 6: Substance Abuse Among Specific Population Groups and Settings. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83240>
72. Li MD. Identifying susceptibility loci for nicotine dependence: 2008 update based on recent genome-wide linkage analyses. *Hum. Genet.* 2008;123:119–131.
  73. Thorgeirsson TE ve ark. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008;452:638–642.
  74. Tyrer P. A comparison of DSM and ICD classifications of mental disorder. *Advances In Psychiatric Treatment* 2014;20(4):280-285.
  75. Jaffe JH ve Anthony JC. "Substance-related disorders: introduction and overview." Sadock BJ, Sadock VA. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. Eighth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
  76. Hasin DS, O'Brein CP, Auriacombe M, Borges G, Bucholz K, Budney A ve ark. DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *Am J Psychiatry*, 2013;170:834-851.
  77. Güleç, G, Köşger F, ve Eşsizoglu A. DSM-5'te Alkol ve Madde Kullanım Bozuklukları. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar* 2015;7(4):448-460.
  78. DiFranza J ve ark. A systematic review of the Diagnostic and Statistical Manual diagnostic criteria for nicotine dependence. *Addictive Behaviors* 2010;35(5): 373-382.
  79. Demir T. Sigara Bağımlılığı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 231 Türkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi Mart 2008;62;231-238.
  80. Amerikan Psikiyatri Birliği. "DSM-5 tanı ölçütleri başvuru el kitabı." Çev.: E Köroğlu. Ankara, Hekimler Yayın Birliği 158, 2013
  81. [http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower\\_report\\_tobacco\\_crisis\\_2008.pdf](http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_tobacco_crisis_2008.pdf)
  82. Karlıkaya, Celal, ve ark. "Tütün kontrolü." *Toraks dergisi* 7.1, 2006: 51-64.
  83. <http://www.yesilay.org.tr/tr/bagimlilik/sigara-ve-tutun-bagimlilik>



84. Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X ve ark. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 2008;165:1163–1171.
85. Saccone SF ve ark. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet.* 2007;16:36–49.
86. Cosci, F., Pistelli, F., Lazzarini, N., Carrozzi, L. Nicotine dependence and psychological distress: outcomes and clinical implications in smoking cessation. *Psychol Res Behav Manag,* (2011). 4, 119-128.
87. Vito, Gennaro F., and Jeffrey R. Maahs. *Criminology.* Jones & Bartlett Publishers, 2015.
88. Kesim, Y., ve A. Tür. "Sigaranın Farmakolojik Etkileri." *Sigaranın Sağlığa Etkileri ve Bırakma Yöntemleri'nde Samsun Logos Yayıncılık Tic AŞ* (1995): 29-53.
89. Clayman CB, Arnold J, Hockwald RS, Yount EHJr, Edgcomb JH ve Alving AS. Toxicity of primaquine in Caucasians. *The Journal of the American Medical Association* 1952;17(149):1563-1568, ISSN 0098-7484.
90. Buscemi L ve Tagliabracci A. *Pharmacogenetics Role in Forensic Sciences.* INTECH Open Access Publisher 2011.
91. Nebert DW. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: Why is this relevant to the clinical geneticist? *Clinical Genetics* 1999;4(56):247–258, ISSN 0009-9163.
92. Mancinelli L, Cronin M ve Sadèe W. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci* 2000;1(2), ISSN 1522-1059.
93. Park BK ve Pirmohamed M. Toxicogenetics in drug development. *Toxicology Letters* 2001;1-3(120): 281–291, ISSN 0378-4274.
94. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000;6788(405):857–865, ISSN 0028-0836.
95. Wolf CR, Smith G ve Smith RL. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. *British Medical Journal* 2000;7240(320):987 990, ISSN 0959-8138.

96. Pirmohamed M ve Park BK. The adverse effects of drugs. *Hospital Medicine* 1999;5(60):348-352, ISSN 1462-3935.
97. Scott, Stuart A. "Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics." *Genetics in medicine* 13.12.2011: 987-995.
98. Kayser M ve Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011;12:179-92.
99. Leshner AI. Addiction is a brain disease, and it matters. *Science*, 1997;278(5335):45-47.
100. Ferri G ve ark. Genetics of addiction in legal medicine and forensic investigation: SNPs variations associated with nicotine and cannabis dependence. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2009;2(1):491-492.
101. Agrawal A ve ark. Are genetic variants for tobacco smoking associated with cannabis involvement?. *Drug And Alcohol Dependence* 2015;150:183-187.
102. Clapper JR, Mangieri RA, Piomelli D. The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabisdependence. *Neuropharmacology* 2009;56:235–243.
103. Sherva R ve ark. Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(9):1921-1931.
104. Cloninger CR, Adolfsson R, Svrakic NM. Mapping genes for human personality. *Nat. Genet.* 1996;12(3).
105. Flory JD ve Manuck SB. Impulsiveness and cigarette smoking, *Psychosom. Med.* 2009;71:431–437.
106. Saccone NL ve ark. The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research*, 2009;69(17):6848-6856.
107. Grucza RA ve ark. A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biological Psychiatry* 2008;64(11):922-929.

108. Young RP ve ark. Lung cancer gene associated with COPD: triple whammy or possible confounding effect?. *European Respiratory Journal* 2008;32(5):1158-1164.
109. Siedlinski ve ark. Genome-wide association study of smoking behaviours in patients with COPD. *Thorax* 2011;66(10):894-902.
110. Corradini B, Sánchez-Diz P, Alù M, Estany-Gestal A, Carracedo A, Ferri G. Genetic variants related to nicotine dependence. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2011;3(1):e492-e493.
111. Hopfer CJ ve ark. Cannabis receptor haplotype associated with fewer cannabis dependence symptoms in adolescents. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006;141:895–901.
112. Zhang PW ve ark. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol Psychiatry* 2004;9:916–931.
113. Tobacco and Genetics Consortium. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nature genetics*, 2010;42(5):441-447.
114. Pillai SG, Ge D, Zhu G ve ark. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000421.
115. Duncan LE ve Keller MC. A critical review of the first 10 years of candidate gene-by-environment interaction research in psychiatry. *Am. J Psychiatry*. 2011;168:1041–1049.
116. Buczkowski, K, ve ark. Association between genetic variants on chromosome 15q25 locus and several nicotine dependence traits in polish population: a case-control study. *BioMed research international* 2015.
117. Ware JJ ve ark. Association of the CHRNA5-A3-B4 gene cluster with heaviness of smoking: a meta-analysis. *Nicotine & Tobacco Research*, 2011;13(12):1167-1175.
118. Wen L, Jiang ve ark. Contribution of variants in CHRNA5/A3/B4 gene cluster on chromosome 15 to tobacco smoking: from genetic association to mechanism. *Molecular neurobiology* 2016;53(1):472-484.

119. Chen LS ve ark. Dissection of the phenotypic and genotypic associations with nicotinic dependence. *Nicotine & Tobacco Research*, 2012;14(4):425-433.
120. Beuten J ve ark. Single-and multilocus allelic variants within the GABA B receptor subunit 2 (GABAB2) gene are significantly associated with nicotine dependence. *The American Journal of Human Genetics*, 2005;76(5):859-864.



## FORMLAR

### Fagerström Nikotin Bağımlılık Testi (FTND)

Soru 1: İlk sigaranızı sabah uyandıktan ne kadar sonra içersiniz?

- a. Uyandıktan sonraki ilk 5 dakika içinde (3 puan)
- b. 6- 30 dakika içinde (2 puan)
- c. 31- 60 dakika (1 puan)
- d. 1 saatten fazla (0 puan)

Soru 2: Sigara içmenin yasak olduğu örneğin; otobüs, hastane, sinema gibi yerlerde bu yasağa uymakta zorlanıyor musunuz?

- a. evet : (1 puan)
- b. hayır: (0 puan)

Soru 3: İçmeden duramayacağınız, diğer bir deyişle vazgeçemeyeceğiniz sigara hangisidir?

- a. Sabah içtiğim ilk sigara (1 puan)
- b. Diğer herhangi biri (0 puan)

Soru 4: Günde kaç adet sigara içiyorsunuz?

- a. 10 adet veya daha az (3 puan)
- b. 11- 20 (2 puan)
- c. 21- 30 (1 puan)
- d. 31 veya daha fazlası (0 puan)

Soru 5: Sabah uyanmayı izleyen ilk saatlerde, günün diğer saatlerine göre daha sık sigara içer misiniz?

- a. evet (1 puan)
- b. hayır (0 puan)

Soru 6: Günün büyük bölümünü yatakta geçirmenize neden olacak kadar hasta olsanız bile sigara içer misiniz ?

a. evet (1 puan)

b. hayır (0 puan)

Toplam skor

0-2: Çok az bağımlılık

3-4: Az bağımlılık

5: Orta derecede bağımlı

6-7: Yüksek bağımlılık

8-10: Çok yüksek bağımlılık



## ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

Bahar 2016

Çalışmanın Adı: On SNP Lokusunun Genetik Polimorfizminin Nikotin Bağımlılığı ile İlişkilendirilmesi

Bu çalışma; bir Yüksek Lisans Tez çalışmasıdır.

Araştırmanın amacı, Nikotin bağımlılığı ile ilişkilendirilmiş olan 10 SNP lokusunun (rs2273504, rs806368, rs2023239, rs806380, rs324420, rs2184026, rs16969968, rs1051730, rs4950, rs686) bir biriyle akrabalık bağı olmayan 50 kronik nikotin bağımlısı ( bağımlılık ölçütü olarak Fagerström Test (FTND) kullanılacaktır) ve 50 de kontrol olmak üzere toplamda 100 kişi ile çalışılmasıdır.

Gönüllülere yapılacak, araştırma için harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca kendisine bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmanın deneysel kısımları; toplanan örneklerin DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi, DNA miktarının belirlenmesi , multipleks PCR aşaması, PCR ürünlerinin saflaştırılması, SNaPshot reaksiyonu, SNaPshot reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması ve son olarak da SNaPshot reaksiyon ürünlerinin laboravutarda bulunan ABI 310 kapiler elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi şeklindedir.

Gönüllünün araştırmaya katılımının isteğe bağlı olduğu ve gönüllünün istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceği veya araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin verilecektir.

İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verilmektedir.

Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir adres olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği araştırmacı Alpen Ortuğ, Alpen Ortuğ'a ait ve günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları; 0541 540 32 62, 0 216 330 06 91 dir.

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü; 100 kişidir.

Gönüllülerden elde edilecek olan Biyolojik Materyal; ağız içi sürüntü (buccal swab) örneğidir.

Biyolojik materyallerin analizlerinin analizleri İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü öğrenci laboratuvarında yapılacaktır. Analizler hiçbir şekilde yurtdışında gerçekleşmeyecektir.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı



belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

“On SNP Lokusunun Genetik Polimorfizminin Nikotin Bağımlılığı ile İlişkilendirilmesi

” kapsamında alınan biyolojik örneğimin (buccal swab örneğimin);

(Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)

- Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

Gönüllünün Adı :

Yetkin Araştırmacının Adı: Alpen

Gönüllünün Soyadı:

Yetkin Araştırmacının Soyadı: Ortuğ

Gönüllünün İmzası:

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Tarih:

Tarih:

NOT:

1. BGOF, gönüllü ve/veya yasal temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içeremez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülükten kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

## ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU



Sayı: B.30.2.İST.0.30.90.00/35454  
Konu:



İstanbul, ...../...../.....

11 Aralık 2012

Adli Tıp Enstitüsü Müdürlüğüne

İLGİ: 13.11.2012 tarihli, 1813 sayılı yazınıza:

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi Yard.Doç.Dr.E.Hülya YÜKSELOĞLU'nun danışmanlığında Yüksek Lisans Öğrencisi Alpen ORTUĞ'un yürütücülüğünde "On SNP Lokusunun Genetik Polimorfizminin Nikotin Bağımlılığı İle İlişkilendirilmesi" başlıklı Yüksek Lisans Tezi ( Araştırma Fonu ) hakkında ilgi yazınız ve ekleri 04 Aralık 2012 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri ( BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:  
1 dosya

Öğrenci İşleri  
MÜDÜR

28.02.2015 İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ Adli Tıp Enstitüsü GELEN EVRAK
Sayı : 2012/2031
Tarih : 11.12.2012

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ  
Dekan Yardımcısı  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

*fatih*

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur.  
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL  
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:ctfetik@istanbul.edu.tr.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Alpen	<b>Soyadı</b>	Ortuğ
<b>Doğ.Yeri</b>	Eskişehir	<b>Doğ.Tar.</b>	11.08.1987
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	
<b>Email</b>	alpenortug@gmail.com	<b>Tel</b>	0532 468 46 80

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Anatomi Programı	Devam ediyor
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Anatomi AD	2015
<b>Lisans</b>	Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü	2011
<b>Lise</b>	Özel Atayurt Lisesi	2004

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı	2015-devam ediyor
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	86,25	
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf		

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	Çok iyi
Matlab	Orta
Fortran 77	Orta

### **Yayınlari/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**

**Ortug A.(1)**,Uzel M.(2)' *'Determination of location, number and shape of the greater palatine foramen in adult anatolian population'*, Poster Presentation, 110th Annual Meeting, Sept. 23-25 2015, Wurzburg Poster sunumu

Kopuz C.(1),Ortug G.(2),**Ortug A.(3)**, *'Morphological variations of the superior cornu of thyroid cartilage in Anatolian Population'* Poster Sunumu,110th Annual Meeting, Sept. 23-25 2015, Wurzburg Poster sunumu

Kurt NK., Ortug G.,**Ortuğ A.** *'Şânîzâde Mehmed Atâullah Efendi (1771-1826) ve Miratü'l Ebdan Fi Teşrih-i Azâü'l-İnsan'*. Ulusal Türk Tıp Tarihi Kongresi ve 2. Türk Diş Hekimliği Tarihi Sempozyumu (2013) Poster sunumu

Yıldırım M., Demirci MS., Ertaş A., **Ortuğ A.** *Arcus Aortae'nin Dördüncü Dalı Olarak Çıkan Arteria Subclavia Dextra Olgusu*. 15. Ulusal Anatomi Kongresi 5-8 Eylül 2013 Samsun, Poster Sunumu

### **Ross ve Wilson Sağlıkta ve Hastalıkta Anatomi ve Fizyoloji/ Waughn –Grant**

Çeviri editörü Cem Kopuz

İngilizce Baskıdan çeviri 13. Bölüm 229-250

### **Topografik Klinik Anatomi / Richard S. Snell**

Çeviri editorü, Mehmet Yıldırım

9. İngilizce Baskıdan Çeviri

Bölüm 1 (s.1-33)

### **Üyelikler**

Anatomische Gesellcshaft

Türk Anatomi ve Klinik Anatomi Derneği

### **Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Türk Balıkadamlar Spor Kulübü üyesi

Atlı Spor- Binicilik

Lisanslı okçu