

AKÜ FEMÜBİD 22 (2022) 061002 (1245-1255)

AKU J. Sci. Eng. 22 (2022) 061002 (1245-1255)

DOI: 10.35414/ akufemubid.1137753

Araştırma Makalesi / Research Article

GHSR rs2232165 Gen Polimorfizminin Genotiplendirilmesi için PCR-RFLP Yönteminin Optimizasyonu ve Türk Erkeklerinde Alel Frekansının Belirlenmesi

Selin ÖZKAN-KOTİLOĞLU^{1*}, Dilek KAYA-AKYÜZLÜ², Gizem DÜZGÜN², Mustafa DANIŞMAN³, Ece AĞTAŞ-ERTAN⁴, İnci ÖZGÜR-İLHAN⁴

¹Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kırşehir, Türkiye.

²Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

³Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, AMATEM Kliniği, Ankara, Türkiye.

⁴Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Sorumlu yazar e-posta: selin.ozkan@ahievran.edu.tr*

kaya@ankara.edu.tr

gizemduzgun01@gmail.com

drmustafadanisman@gmail.com

ecegts@gmail.com

iilhan@medicine.ankara.edu.tr

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2262-5613>

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-3305-0587>

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-3559-4796>

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-7403-8840>

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1937-497X>

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6031-5739>

Geliş Tarihi: 30.06.2022

Kabul Tarihi: 27.10.2022

Öz

Çağımızın ciddi sorunlardan biri olan alkol bağımlılığı, genetik, çevresel, kültürel, gelişimsel ve nörobiyolojik faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yeme davranışı nörobiyolojisi ile bağımlılık yapan maddelere aşerme davranışının nörobiyolojisinin benzer özelliklere sahip olduğunun keşfedilmesi araştırmacıları, alkol bağımlılığı ile grelin gibi besin alımında önemli olan hormonlar arasındaki ilişkiyi araştırmaya sevk etmiştir. Alkol kullanım bozukluğunda ve alkole aşermede grelin sisteminin önemi mevcut çalışmalar tarafından ortaya konulmasına karşın bu ilişkinin biyolojik mekanizmasının aydınlatılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle, bu çalışmada, alkol kullanım sorunu olan Türk erkeklerinde, grelin reseptörünü kodlayan *GHSR* genindeki rs2232165 polimorfizminin alkol kullanım sorunu ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmaya alkol kullanım bozukluğu tanısı konmuş 72 erkek birey ile herhangi bir madde bağımlılığı olmayan 82 sağlıklı erkek dahil edilmiştir. *GHSR* rs2232165 gen polimorfizmi, ilk defa bu çalışmada optimize edilen PCR-RFLP yöntemi ile genotiplendirilmiştir. *GHSR* rs2232165 polimorfizmi için alel frekansları alkol kullanım sorunu olan grupta (n:144); C aleli için 0,99 (n:142), T aleli için 0,01 (n:2) olarak hesaplanmıştır. Karşılaştırma grubunda ise (n:164), C aleli frekansı 0,98 (n:161), T aleli frekansı 0,02 (n:3) olarak belirlenmiştir. İki grup arasında, T alel frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05). Gen polimorfizmleri, çevresel faktörlerden etkilenmediği için Türk erkeklerindeki minör alel frekansını (MAF) belirlemek için iki gruptaki bireyler birleştirilmiş (n=154) ve Türk erkeklerinde *GHSR* rs2232165 polimorfizminin MAF değeri 0,02 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, çağımızda alkol kullanım bozukluğu kadar önemli olan obezite etiyojisinde de rol oynayan *GHSR* rs2232165 polimorfizminin Türk erkeklerinde alel frekansı ile ilgili ilk veriler toplanmıştır.

Anahtar kelimeler

Alkol Kullanım Bozukluğu; Grelinin; Gen Polimorfizmi; *GHSR* rs2232165; PCR-RFLP

Optimization of PCR-RFLP Method for Genotyping of *GHSR* rs2232165 Gene Polymorphism and Determination of Allele Frequency in Turkish Men

Abstract

Keywords

Alcohol Use Disorder;
Ghrelin; Gene
Polymorphism; *GHSR*
rs2232165; PCR-RFLP

Alcohol addiction, which is one of the crucial problems of the current era, arises with the effects of genetic, environmental, cultural, developmental and neurobiological factors. In recent years, the discovery that the neurobiology of eating behavior and craving for addictive substances have similar characteristics has prompted researchers to investigate the relationship between alcohol addiction and hormones such as ghrelin. Even though the importance of the ghrelin system in alcohol use disorder and alcohol craving has been stated by existing studies, more studies are needed. Therefore, in this study the relationship between rs2232165 polymorphism in *GHSR* gene encoding ghrelin receptor and alcohol use disorder in Turkish men. Seventy-two individuals diagnosed with alcohol use disorder and 82 healthy men were included in this study. The *GHSR* rs2232165 gene polymorphism was genotyped by PCR-RFLP which was optimized for the first time. The allele frequency of the *GHSR* rs2232165 gene polymorphism was determined in the group with alcohol use problem (n:144) as 0,99 (n:142) for C allele and 0,01 (n:2) for T allele. The frequency of the C allele was 0,98 (n:161) and T allele was 0,02 (n:3) in the healthy group. There was no statistically significant difference between two groups in terms of T allele frequency. The minor allele frequency (MAF) value of *GHSR* rs2232165 polymorphism in Turkish males was determined as 0,02. The first data on the allele frequency of *GHSR* rs2232165 polymorphism, which plays a role in the etiology of obesity and in alcohol use disorder, were collected in Turkish males.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi.

1. Giriş

Yemek yememiz sadece sinir sistemiyle değil aynı zamanda hormonal olarak da kontrol edilmektedir. Obestatin (Zhang *et al.* 2005) ve kolesistokinin (Tümer 1989) yeme esnasında salınır böylelikle doyma hissi oluşur. Obestatin ve kolesistokinin grelin salınımını mide ve diğer dokularda arttığı için kan ve tükürük derişimini de %70-80 oranında yükseltmektedir (Korbonits *et al.* 2004, Kojima and Kangawa 2005, Aydın vd. 2006). Böylelikle yemeyi başlatan grelin, iştahı baskılayan obestatin, yemek yemeyi sonlandıran ise kolesistokinindir (Wren *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2005).

Grelin hormonu, Kojima ve arkadaşları tarafından 1999 yılında (C149H249N47O42) keşfedilmiştir (Kojima *et al.* 1999). Esas olarak mide fundusundan salınan lipopeptid yapıda 28 aminoasitten (aa) oluşan bir hormondur (Kojima *et al.* 1999, Aydın vd. 2006). Grelin, mide dışında tiroid bezi, böbrekler, gonadlar, hipofiz, ince bağırsak, meme, plasenta, akciğer, dişler, hipotalamus, kalp, immün sistemi, tükürük bezi, santral sinir sistemi ve pankreasın epsilon, alfa ve beta hücreleri gibi birçok doku ve organda da sentezlenmektedir (Kojima *et al.* 2005, Aydın vd. 2006, Kierson *et al.* 2006, Aydın 2007). Grelin iki sözcüğün birleştirilmesi ile türetilen bir isimdir. "Grow" sözcüğü Hint-Avrupa dil ailesinde gelişim anlamına gelmektedir. Bu sözcüğün kökü olan "ghre" ile salgılama anlamına gelen "relin" sözcüklerinin birleşiminden oluşmaktadır (Kojima *et al.* 1999). Aynı zamanda "iştah hormonu" (appetite

hormone) olarak da adlandırılmaktadır (Wren *et al.* 2001). Hormonun keşfinden itibaren "Ghr", "G-HH", "Ghrl" (Aydın, 2006) ve "h-GHS" (Groschl *et al.* 2004) gibi farklı kısaltmalar kullanılmıştır. Dr. Aydın 2006'da "Grelin Appetite Hormone" sözcüklerinin baş harflerini kullanarak "GAH" olarak kısaltılmanın kabul edilmesi için teklifte bulunmuş ve bilim insanları arasında ortak bir terminolojinin kullanılması amacıyla bu teklif desteklenmiştir (Aydın, 2006). İnsan grelin hormonunda üçüncü aminoasit olan serin, N-terminal ucunda yer almaktadır ve sekiz karbonlu oktanil grubu denilen bir yağ asidi içermektedir. Grelin, bu sekiz karbonlu yağ asidi sayesinde aktif formda bulunmaktadır ve aktif grelin (aGAH) olarak kabul edilmektedir. İnaktif grelin ise yapısında yağ asidi içermez ve bu greline desaçile grelin (dGAH) denilmektedir (Korbonits *et al.* 2004, Aydın vd. 2006). Dolaşımdaki toplam grelinin büyük bir çoğunluğunu (%80-90) desaçile grelin oluşturmaktadır (Kaiya *et al.* 2007). Grelin dışında aktivitesi bir yağ asidi tarafından değiştirilebilen bilinen bir peptid hormonu yoktur (Kojima *et al.* 1999, Aydın vd. 2006). Grelin, GHS-R (büyüme hormonu salgılatıcı reseptör) tip 1-a reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir (Miller *et al.* 2005). Reseptöre bağlandığında büyüme hormonu salgılatıcı hormon (*GHRH*)'un hipotalamustan salınımı uyarılmaktadır. Yapılan çalışmalarda iki tip GHS reseptörü (GHS-R tip 1-a ve tip 1-b) olduğu tespit edilmiştir (McKee *et al.* 1997). GHS-R tip 1-a uzun yapılı olup fonksiyonel olarak

aktiftir ve sinyali ileten reseptördür. GHS-R tip 1-b'de ise transmembran alanları 6 ve 7 olmadığından daha kısadır ve ligand bağlama ile sinyal iletim özelliği bulunmamaktadır. Fakat GHS-R tip 1-b'in grelinin öncelikli dokularında etkinliğini göstermesinde GHS-R tip 1-a ile etkileşim halinde olduğu tahmin edilmektedir (Smith *et al.* 1997).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de alkol tüketimiyle beraber alkole bağlı sorunlar artış göstermiştir. Bireyleri alkol kötüye kullanımına yönlendiren çeşitli faktörler vardır. Bunlardan akla ilk geleni alkolün fiyatı, elde edilebilirliği, ekonomik, psikolojik ve genetik faktörlerdir (Schuckit 1994, Holder 1998). İlk alkol alımında gerginliği azaltan, rahatlatan gibi olumlu özellikleri göz önüne alınır ve bu davranışın sürmesine katkı sağlar. Sıkıntı ve sorunlarla baş etmede zorluklar olduğunda kişiler alkole yönelirler ya da aldıkları alkol miktarını arttırırlar. Böylelikle alkol alımı istismarı ve alkole kronik bağımlılık (Alkol kullanım bozukluğu) gelişir (Gelder *et al.* 1995). Alkol kullanım sorunu, kronik bir sorun sayılmaktadır. Kişinin zarar gördüğü halde madde kullanmaya devam etmesi, kullandığı maddeyi uzun süre bırakamaması, sürekli madde arayışı içinde olması, kullandığı madde dozunu giderek arttırmasına bağımlılık denir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) alkol bağımlısını "uzun süre ve alışılmışın dışında alkol alan, alkole bağlı ruhsal-bedensel-toplumsal sağlığı bozulan, buna karşın durumunu değerlendiremeyen; değerlendirse bile alkol alma isteğini durduramayan" diye tanımlar. Bir başka tanıma göre, alkolün işine engel olduğunu değil de işinin alkol almasına engel olduğunu düşünmeye başlayan kişi alkol bağımlısıdır (Meza *et al.* 1996).

Grelın ve alkolün beyindeki ödül sistemi üzerindeki etkilerinin benzer olması ve yapılan çalışmalarda bağımlılık davranışı ile grelin düzeyleri arasında ilişki bulunması, alkol bağımlılığında grelin düzeylerini etkileyen genlere dikkati çekmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, pro-grelın ve GHS-R1A genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin, yeme bozuklukları ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Monteleone *et al.* 2007, Ando *et al.* 2006, Holst and Schwartz 2006, Ando *et al.* 2007, Miyasaka *et al.* 2006, Baessler *et al.* 2005, Wang *et al.* 2004). Bu genlerdeki polimorfizmler ve alkol bağımlılığı

arasındaki ilişkiyi araştıran insan ve hayvan çalışmaları da bulunmaktadır. Landgren *vd.* (2008), 417 İspanyol alkol bağımlısı ile yaptıkları çalışmada GHS-R1A rs2232165 gen polimorfizmi ile ağır alkol kullanımı arasında bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı grubun 2010 yılında, 113 kadın alkol bağımlısı ile yaptıkları diğer çalışmada, bir pro-grelın haplotipi (TAACGT) ile paternal aile öyküsü; başka bir pro-grelın haplotipi (TAACGG) ile yoksunluk belirtileri ve bir GHSR haplotipi (CCGG) ile tip 2 alkol bağımlılığı arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Landgren *et al.* 2010). Ayrıca, GHS-R1A genindeki tek nükleotid polimorfizminin insanlarda fazla alkol tüketimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Landgren *et al.* 2012). Bununla birlikte, Türk alkol bağımlılarında alkol kullanım bozukluğuna *GHSR* rs2232165 polimorfizminin etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1 Olgu seçimi

Bu çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran alkol kullanım sorunu olan 72 erkek ile alkol kullanım sorunu olmayan sağlıklı 82 erkek birey dahil edilmiştir. Alkol kullanım sorunu olan bireylerin çalışmaya dahil edilme kriterleri; (1) 18-65 yaş aralığında olmak, (2) Hastalıkların Uluslararası Sınıflaması-10 (International Classification of Diseases/ICD-10) kriterlerine göre alkol kullanım bozukluğu tanısı almış olmak, (3) ayaktan ya da yatarak tedavi edilmesine karar verilmiş olmak olarak belirlenmiştir. Çalışma grubuna, (1) herhangi bir psikiyatrik ya da nörolojik rahatsızlığı olan, (2) alkol ve sigara dışında kokain, cannabis, opiyat, halüsinojen vb. bağımlılık yapan madde kullanan bireyler dahil edilmemiştir. Karşılaştırma grubu olarak da herhangi bir psikiyatrik rahatsızlığı ve herhangi bir madde bağımlılığı olmayan sağlıklı erkekler çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden her birey için yaşı, kilosu, boyu, aylık geliri, kaç yıldır alkol bağımlısı olduğu, ilaç kullanımı, sigara kullanıp kullanmadığı, günlük sigara sayısı, en son alkol alımı üzerinden geçen süre, tüketilen alkol miktarı, mesleği ile eğitim durumu, alkol ve sigara dışında bağımlılık yapan madde

kullanıp kullanmadığı gibi bilgileri içeren bir form doldurulmuş ve her katılımcıya bilgilendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılmıştır. Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 26.11.2018 tarih ve 19-1300-18 sayılı izni ile yürütülmüştür. Kan örnekleri, Helsinki Bildirgesi prensiplerine uygun şekilde toplanmıştır.

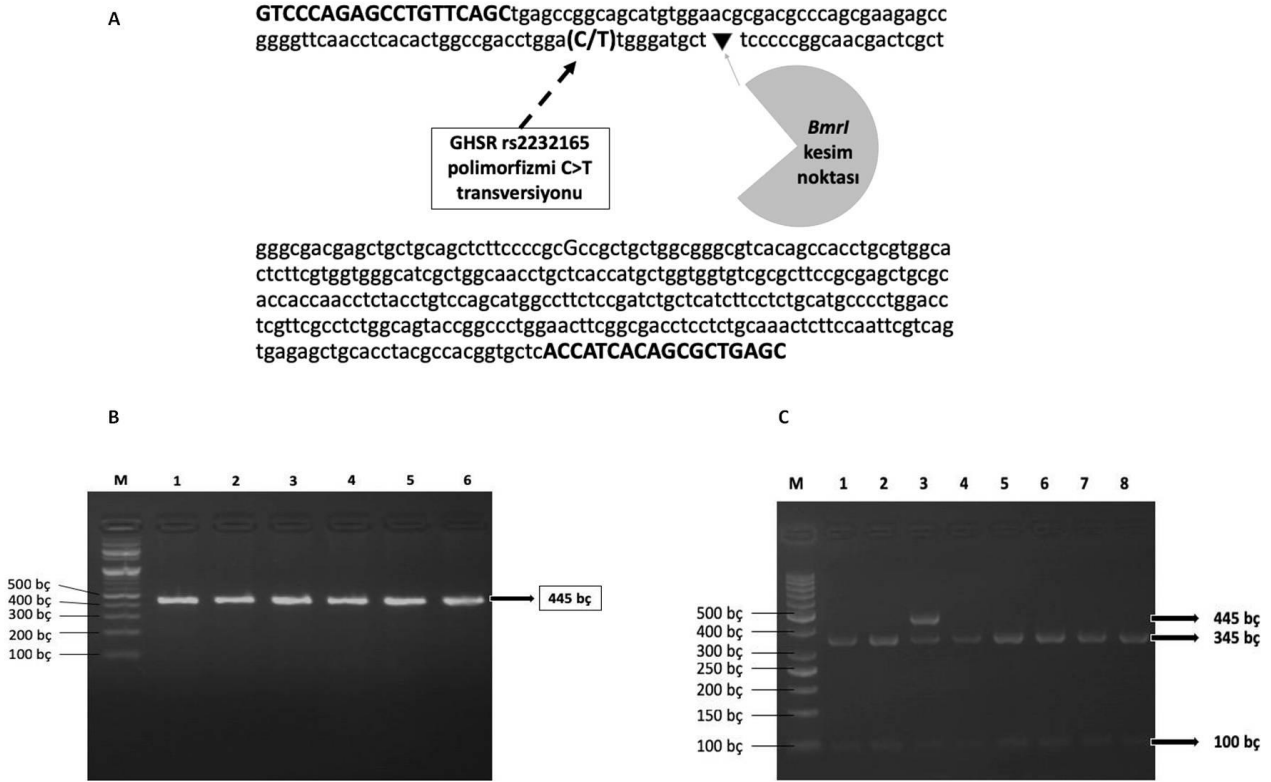
2.2 Kan örneklerinin toplanması ve genetik analizler

Çalışma ve karşılaştırma grubuna dahil edilen bireylerden sadece bir kez 4 ml venöz kan örneği kan örneği EDTA'lı tüplere alınmış ve analiz edilinceye kadar -20°C'de saklanmıştır. Genomik DNA'yı açığa çıkarmak amacıyla; EDTA'lı tüp içerisine alınmış kan örneklerinin 200 µl'si kullanılarak "QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)" ile DNA izolasyonları firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır. *GHSR* rs2232165 gen polimorfizmi PCR-RFLP yöntemi ile genotiplendirilmiştir. Forward (ileri) ve reverse (geri) primerlerin sekansları, F:GTCCCAGAGCCTGTTTCAGC ve R:GCTCAGCGCTGTGATGGT olarak belirlenmiştir. PCR amplifikasyonu, 200 ng genomik DNA, 10XPCR tamponu (Qiagen), 200 mM dNTP, 1.25 U Hot Star Taq DNA polimeraz (Qiagen) ve F ve R primerlerinin her birinden 10 pmol içerecek şekilde 25 µl'lik bir son hacimde Techne Tc512 PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR döngü koşulları, 95 °C'de 15 dakikalık bir ilk denatürasyon adımını takiben, 36

döngü (94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 65 °C'de 1,5 dakika primer bağlanma ve 72 °C'de 1 dakika zincir uzaması) ile 72 °C'de 10 dakikalık bir son uzaması şeklinde tasarlanmıştır. 445 baz çiftlik (bç) PCR ürünleri daha sonra *Bmrl* (New England Biolabs, Hertfordshire, UK) restriksiyon enzimi ile 37 °C'de en az 1 saat inkübe edilmiştir. Tek bir 445 bç bandı, homozigot varyant T alelinin varlığı; 345 bç ve 100 bç'lik bantlar ise yabancıl C alelinin varlığını göstermiştir. Kesilmiş ve kesilmemiş PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 1).

2.3 İstatistiksel analizler

Sonuçlar karşılaştırmalı olarak istatistiksel açıdan analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler, SPSS V20 kullanılarak yapılmıştır. Genlerin alel ve genotip frekansları çıkarılmış ve Hardy-Weinberg dengesine uyum gösterip göstermediği araştırılmıştır ($p^2+2pq+q^2=1$). Verilerin normal dağılımı Kolmogorov-Smirnov Testi ile kontrol edilmiştir. Nicel değişkenler için ortalama (Ort), standart sapma (SS), minimum (Min) ve maksimum (Maks) değerler verilmiştir. İkili gruplar karşılaştırılırken, normal dağılım görülümüşse bağımsız örneklerde t-testi, normal dağılım görülmemişse Mann-Whitney U Testi kullanılacaktır. χ^2 (ki-kare) testi, kategorik değişkenler için gruplar arası farklılık incelenirken uygulanmıştır. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 1. (A) *GHSR* rs2232165 polimorfizminin genotiplendirilmesi için çoğaltılan 445 baz çifti uzunluğundaki PCR ürünü, Bmrl restriksiyon enziminin kesim noktası ve rs2232165 (C>T) tek nükleotid polimorfizmi görülmektedir. **(B)** *GHSR* rs2232165 polimorfizmini içeren gen bölgesine ait PCR ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü. **(C)** *GHSR* rs2232165 polimorfizmi RFLP analizi agaroz jel görüntüsü M:100 bç DNA ladder; 1,2,4,8: CC (345 bp + 100 bp); 3: CT (445 bp + 345 bp + 100 bp).

3. Bulgular

Bu çalışmaya toplam 154 erkek birey (n=72 AKB tanısı konmuş, n=82 sağlıklı karşılaştırma grubu) dahil edilmiştir. Hem alkol kullanım sorunu olan hem de karşılaştırma grubuna dahil edilen bireylerin yaş, kilo, beden kitle indeksi (BKİ), medeni durum, eğitim durumu, sigara kullanımı, alkole başlama yaşı ve aylık gelir gibi demografik bilgileri Çizelge 1’de verilmiştir.

3.1. *GHSR* rs2232165 Polimorfizmi Analiz Sonuçları

GHSR rs2232165 polimorfizminin alkol kullanım bozukluğu olan hastalardaki (n=72) frekansları CC, CT ve TT için sırasıyla %7,2; %2,8 ve %0 olarak saptanmıştır (Tablo 2). *GHSR* rs2232165 polimorfizmi için alel frekansları ise (n:144); C aleli için 0,99 (n:142), T aleli içinse 0,01 (n:2) olarak hesaplanmıştır. *GHSR* rs2232165 polimorfizminin karşılaştırma grubu bireylerindeki (n=82) genotip frekansları ise CC, CT ve TT için sırasıyla %96,3; %3,7 ve %0 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 2).

Alkol kullanım bozukluğu ile *GHSR* rs2232165 gen polimorfizmi arasındaki ilişki istatistiksel olarak ki-kare testi ile analiz edilmiştir. TT genotipi hiçbir bireyde görülmemiştir. Bu nedenle, istatistiksel analizler yapılırken CT genotipli bireyler (en az bir T aleli taşıyan) ile CC genotipli bireyler (T aleli taşımayan) karşılaştırılmıştır. Alkol kullanım bozukluğu olan bireylerin %2,8’si T aleli taşıırken, karşılaştırma grubundaki bireylerin ise %3,7’si T aleline sahiptir. Bu farklılık istatistiksel olarak kıyaslandığında, T aleli frekansı açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05).

Çizelge 1. Çalışmaya dahil edilen alkol kullanım bozukluğu (AKB) tanısı almış bireyler ile karşılaştırma grubuna ait sosyodemografik bilgiler.

Sosyodemografik Özellikler	AKB (n=72)		Karşılaştırma Grubu (n=82)		p-değeri
	Ort.±S	min.-maks.	Ort± S.S.	min.-maks.	
	.S.				
Yaş (yıl)	44,3±8,74	25-66	39,8±9,39	21-62	0,187
Kilo (kg)	77,3±15,5	49-127	81,4±11,02	55-106	0,370
BKİ (kg/m²)	25,3±4,2	16,37-40,1	26,5±3,2	19,03-35,01	0,05
Eğitim Durumu	n	%	n	%	
İlköğretim	19	26,4	13	15,9	
Lise	28	38,9	17	20,7	0,03
Lisans	19	26,4	32	39,0	
Yüksek Lisans	6	8,3	20	24,4	
Çalışma Durumu	n	%	n	%	
Çalışıyor	38	52,8	77	93,9	
Çalışmıyor	19	26,4	1	1,2	0,001
Emekli	15	20,8	4	4,9	
Aylık Gelir (TL)	n	%	n	%	
Medeni Durum	n	%	n	%	
Bekar	13	18,1	28	34,1	
Eveli	39	54,2	53	64,6	0,001
Boşanmış/dul/ayr ı yaşıyor	20	27,8	1	1,2	
Sigara Kullanımı	n	%	n	%	
Evet	67	93,1	79	96,3	0,359
Hayır	5	6,9	3	3,7	
	Ort.±S.S		Ort.±S.S		
	(min.-maks.)		(min.-maks.)		
Sigara kullanım süresi (yıl)	24,5±10,4	(4-46)	16,6±10,5	(0-40)	0,260
Sigara (paket/gün)	1,3±0,6	(0,1-3)	0,9±0,4	(0-2)	0,001
Sigara (paket/yıl)	32,1±18,3	(0-76)	16,5±13,6	(0-57)	0,09
Alkole başlama yaşı (yıl)	17,7±3,7	(10-30)	*		

* Karşılaştırma grubu alkol kullanım bozukluğu olmayan bireylerden seçildiği için bu veri sunulmamıştır.

Çizelge 2. Alkol kullanım bozukluğu tanılı bireyler, karşılaştırma grubu ve çalışmaya dahil edilen tüm bireylerde GHSR rs2232165 polimorfizmi genotip ve varyant alel frekansları ile Hardy-Weinberg dengesi istatistikleri.

GHSR rs2232165 genotipleri	AKB		Karşılaştırma grubu		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
CC	70	97,2	79	96,3	149	96,8
CT	2	2,8	3	3,7	5	3,2
TT	0	0	0	0	0	0
Varyant alel frekansı	0,01		0,02		0,02	
Hardy Weinberg dengesi	χ ² =0,01; p=0.9		χ ² =0,03; p=0.87		χ ² =0,04; p=0.84	

4. Tartışma ve Sonuç

Şimdiye kadar, alkol kullanım bozukluğu ve çeşitli genlerdeki varyasyonlar arasındaki ilişkinin araştırıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır (Mignini *et al.* 2012, Karpyak *et al.* 2014, Jorde *et al.* 2014, Bach *et al.* 2015, 2019, Warnault *et al.* 2016, D'Addario *et al.* 2017). Beyindeki ödül sistemi üzerinde grelin ve alkolün etkilerinin benzer olması nedeniyle, alkol kullanım bozukluğuna yatkınlıkta grelin düzeylerini etkileyen genlere ilgi artmıştır Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, pro-grelın (GHRL) genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP=single nucleotide polymorphism) yeme bozukluklarına neden olduğu belirlenmiştir (Monteleone *et al.* 2007, Ando *et al.* 2006, Holst and Schwartz 2006, Ando *et al.* 2007, Miyasaka *et al.* 2006, Baessler *et al.* 2005, Wang *et al.* 2004). Bu polimorfizmler ve alkol bağımlılığı arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma da bulunmaktadır (Landgren *et al.* 2008, Suchankova *et al.* 2017, Leggio *et al.* 2012). Landgren vd. (2008), 417 İspanyol alkol bağımlısı ile yaptıkları çalışmada GHSR rs2232165 gen polimorfizmi ile ağır alkol kullanımı arasında bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı grubun 2010 yılında, 113 kadın alkol bağımlısı ile yaptıkları diğer çalışmada, bir pro-grelın haplotipi (TAACGT) ile paternal aile öyküsü; başka bir pro-grelın haplotipi (TAACGG) ile yoksunluk belirtileri ve bir GHSR haplotipi (CCGG) ile tip 2 alkol bağımlılığı arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Landgren *et al.* 2010). Ayrıca, GHSR genindeki tek nükleotid polimorfizminin insanlarda

fazla alkol tüketimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Landgren *et al.* 2012). Bununla birlikte, Türk toplumunda alkol bağımlılarında GHSR genindeki SNP'lerin alkol kullanım bozukluğu üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada, Türk erkeklerinde GHSR rs2232165 genotip farklılıklarının alkol kullanım bozukluğuna etkisi ilk defa araştırılmıştır.

GHSR (büyüme hormonu salgılatıcı reseptör), gıda alımı ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev almaktadır. Fare midesinde izole edilmiş ve daha sonra insanlarda da bulunan bir peptid olan grelin, GHSR için endojen ligand olarak tanımlanmıştır (Kojima *et al.* 1999). Grelini iştahı artırır (Wren *et al.* 2001). İnsan grelin plazma seviyeleri vücut kitle indeksi (BKİ) ile ters orantılıdır; yeme bozukluğu (Ariyasu *et al.* 2001, Otto *et al.* 2001) bulunan hastalarda son derece yüksek düzeyler gözlenmektedir ve obez bireylerde grelin plazma seviyelerinde tam tersi durum gözlenmektedir (Shiia *et al.* 2002). GHSR geni, 3. kromozomda (3q26-31) yer almaktadır. Bu gen insanlarda, domuzlarda, şempanzelerde, domuzlarda, ineklerde ve farelerde yüksek oranda korunmuştur. Dizileme çalışmaları, GHSR-1a ve -1b olmak üzere iki tip GHSR cDNA'nın tek bir genin alternatif mRNA işlemeden kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır. Tam uzunluktaki GHSR1-a cDNA'sı, G protein bağlantılı reseptörlerin tipik bir özelliği olan yedi transmembran etki alanıyla 366 amino asit kodlayan iki ekzondan oluşur. Sadece beş transmembran alanına sahip 289 amino asit olan GHSR1-b ise, eklenmemiş bir transkript tarafından kodlanır (Petersenn *et al.* 2001).

Çalışmamızda AKB tanılı bireylerle karşılaştırma grubu bireylerinde GHSR rs2232165 polimorfizminin genotip frekansları ile literatürde yapılan çalışmalarda tespit edilen genotip frekansları Tablo 3'te verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi, bizim çalışmamızda TT genotipine rastlanılmamıştır. Benzer şekilde, Landgren vd.'nin (2010) yaptıkları çalışmada da alkol kullanım sorunu olan kadın bireylerde homozigot varyant TT genotipine rastlanılmamıştır. Bu iki çalışmadan farklı olarak Garcia vd.'nin (2009) yaptıkları çalışmada homozigot yabancıl genotipe (CC) sahip birey tespit edilmemiştir. Bu çelişkili sonuçlar, farklı

popülasyonlarda yapılan çalışmaların gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Genotip ve alel frekanslarının düşük olması da, planlanan yeni çalışmalarda birey sayısının arttırılması gerektiğini göstermektedir.

Son zamanlarda tek nükleotid polimorfizmlerini belirlemek için TaqMan testi, floresan etiketli prob tekniği ve DNA dizilimi gibi çeşitli testler geliştirilmiş olmasına rağmen, PCR-RFLP hala yaygın, ucuz, hızlı ve hassas bir yöntemdir (Feng *et al.* 2016). Literatürde daha önce sadece Wang vd. (2004), GHSR rs2232165 polimorfizmini genotiplendirmek için PCR-RFLP yöntemini kullanmıştır. Ancak, Wang vd.'nin (2004) yaptığı çalışmada polimorfizmin bulunduğu bölge yanlış verilmiştir ve GHSR rs2232165 polimorfizmini genotiplendirmek için elverişli değildir. Bu nedenle, çalışmamızda yeni bir PCR-RFLP optimize edilmiş ve toplam 154 örnek başarılı bir şekilde genotiplendirilmiştir. Dolayısıyla, grelin sinyal yolağındaki metabolizma hastalıklarının genetik düzeyde irdeleneceği çalışmalara katkı sunulmuştur. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde sınırlı bütçeli araştırma laboratuvarlarında kullanılabilir.

Alkol kullanım bozukluğu için başlangıç yaşının 10'lu yaşlara indiği belirtilmiştir (Öztürk vd. 2015). Türkcan vd. (1998) yaptıkları bir çalışmada bağımlılık içeren tüm maddeler irdelendiğinde AMATEM'de 1983-1995 yılları arasında tedavi gören bireylerin maddeye başlama yaş aralığının genel olarak 15-25 yaş olduğunu belirtmiştir. Coşkun ve Çakmak (2005) alkole başlama yaşının en az 13 en fazla 29 olduğunu saptamışlardır. Türkiye'de, 2011 yılında Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM)'nde genel nüfusa dayalı yapılan maddeyi kötüye kullanımının yaygınlığı araştırmasında Türkiye'de 15-64 yaş aralığında yer alan bireylerin yasa dışı bağımlılık yapan maddelerden minimum birinin deneme oranının %2,7 olduğunu açıklamıştır (Özen Bekar 2014). Bizim çalışmamızda da alkole başlama yaşı ortalama 17 olarak hesaplanmış ve literatürde yer alan çalışmalarla uyumluluk göstermiştir.

Literatürde sigara kullananların başka maddeleri de kullanmasında risk altında olabilecekleri bir başka deyişle sigaranın bağımlılık yapan maddelere geçiş maddesi olabileceği açıklanmasına rağmen,

toplumda sigara başka bağımlılık yapan maddeler gibi tehlikeli olarak tanımlanmamaktadır. Yaygın olarak sigara içenlerin alkol kullanımı ya da denemesinin daha fazla olduğu belirtilmiştir (Tanırıkulu ve Carman 2009, Yalçın vd. 2009, Görgün vd. 2010). Alkol ve tütün sıklıkla birlikte kullanılmaktadır. Çalışmalar, bazı biyolojik faktörlerin eşzamanlı alkol ve nikotin kullanımına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Yetişkinler arasında eş zamanlı yaygınlık ve alkol ile tütün kullanımının bağlantısını açıklayan nispeten az çalışmaya rastlanılmıştır (Ho *et al.* 2021). Emeç ve Gülay (2008) yaptıkları bir çalışmada sigara kullanmayanların kullananlara kıyasla daha az alkol tükettiğini belirtmişlerdir. Sigara kullanımı ile alkol kullanımının orantılı olduğunu açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da, AKB tanılı bireylerin %93,1'inin sigara kullandığı saptanmıştır. AKB ve karşılaştırma grubu arasında sigara kullanımı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bunun nedeni, karşılaştırma grubundaki bireylerin sigara kullanımı açısından alkol kullanım sorunu olan bireylerle eşleştirilmiş olmasıdır. AKB ve karşılaştırma grubundaki bireyler, sigara kullanım süresi (yıl), yılda tüketilen sigara paket miktarları ve günlük sigara tüketimleri açısından karşılaştırılmıştır. Yıllık tüketilen sigara paket sayısı açısından iki grup istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p=0,001$). Bu bulgu, alkol ve sigara birlikte kullanımının yaygın olduğunu bildiren önceki çalışmaları desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, Türk alkol bağımlılarında *GHSR* rs2232165 gen polimorfizminin alkol kullanım sorununa etkisi ilk defa araştırılmıştır. Pilot çalışma niteliğindeki çalışmamızın daha çok bireyin dahil edileceği çalışmalarla tekrarlanması gerekmektedir. Bu ileri çalışmaların gerek bağımlılık gerekse obezite gibi çağımızın önemli sorunlarının tedavisi için yeni ve önleyici yaklaşımların geliştirilmesine ışık tutacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20B0217001 No.'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

5. Kaynaklar

- Ando, T., Ichimaru, Y., Konjiki, F., Shoji, M., Komaki, G., 2007. Variations in the preproghreltin gene correlate with higher body mass index, fat mass, and body dissatisfaction in young Japanese women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **86**, 25-32.
- Ando, T., Komaki, G., Naruo, T., Okabe, K., Takii, M., Kawai, K., Konjiki, F., Takei, M., Oka, T., Takeuchi, K., Masuda, A., Ozaki, N., Suematsu, H., Denda, K., Kurokawa, N., Itakura, K., Yamaguchi C., Kono, M., Suzuki, T., Nakai, Y., Nishizono-Maher, A., Koide, M., Murakami, K., Nagamine, K., Tomita, Y., Ookuma, K., Tomita, K., Tonai, E., Ooshima, A., Ishikawa, T., Ichimaru, Y., 2006. Possible role of preproghreltin gene polymorphisms in susceptibility to bulimia nervosa. *American Journal Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics*, **141**, 929-934.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K., 2001. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 4753-4758.
- Aydin, S., 2006. Increased ghrelin levels in epileptic patients. *Seizure*, **15**, 658.
- Aydin, S., 2007. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **40**, 29-35.
- Aydın, S., Özkan, Y., Çaylak, E., Aydın, S., 2006. Ghrelin and its biochemical functions. *Türkiye Klinikleri, Journal of Medical Sciences*, **26**, 272-283.
- Baessler, A., Hasinoff, M.J., Fischer, M., Reinhard, W., Sonnenberg, G.E., Olivier, M., Erdmann, J., Schunkert, H., Doering, A., Jacob, H.J., Comuzzie, A.G., Kissebah, A.H., Kwitek, A.E., 2005. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. *Diabetes*, **54**, 259-267.
- Coşkun, B., Çakmak, D., 2005. Alkol ve madde bağımlılarının grup psikoterapisinde psikodramanın kullanılması. *Bağımlılık Dergisi*, **6**, 103-110.

- D'Addario, C., Shchetynsky, K., Pucci, M., Cifani, C., Gunnar, A., Vukojevic, V., Padyukov, L., Terenius, L., 2017. Genetic variation and epigenetic modification of the prodynorphin gene in peripheral blood cells in alcoholism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **76**, 195-203.
- Emeç, H., Gülay, E., 2008. Alkol tüketimi ve sosyo-demografik değişkenlerin alkol tüketimi üzerine etkisi. *Ekonomik Yaklaşım Dergisi*, **19**, 115-134.
- Feng, X., Wang, S., Duan, X., Li, C., Yan, Z., Feng, F., Yu, S., Wu, Y., Wang, W., 2016. An improved PCR-RFLP assay for the detection of a polymorphism rs2289487 of PLIN1 gene. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **30**, 986-989.
- Garcia, E.A., King, P., Sidhu, K., Ohgusu, H., Walley, A., Lecoeur, C., Gueorguiev, M., Khalaf, S., Davies, D., Grossman, A.B., Kojima, M., Petersenn, S., Froguel, P., Korbonits, M., 2009. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *European Journal of Endocrinology*, **161**, 307-315.
- Gelder, M., Gath, D., Mayou, R., Cowen, P., 1995. The abuse of alcohol and drugs. Oxford Textbook of Psychiatry, Gelder M, Gath D, Mayou R, Cowen P (ed.) Oxford University Press, Oxford, 438-461.
- Görgün, S., Tiryaki, A., Topbaş, M., 2010. Üniversite öğrencilerinde madde kullanma biçimleri. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, **11**, 305-12.
- Groschl, M., Uhr, M., Kraus, T., 2004. Evaluation of the comparability of commercial grelin assays. *Clinical Chemistry*, **50**, 457-458.
- Ho, R.K.S., Fok, P.W.Y., Chan, H.C.H., 2021. Pattern and determinants of alcohol and tobacco co-use and its relationship with smoking cessation in Hong Kong. *Tobacco Prevention and Cessation*, **24**, 21.
- Holder, H.D., 1998. Alcohol and the community: a systems approach to prevention. Cambridge University Press, 74-96.
- Holst, B., Schwartz, T.W., 2006. Ghrelin receptor mutations-too little height and too much hunger. *Journal of Clinical Investigations*, **116**, 637-641.
- Jorde, A., Bach, P., Witt, S.H., Becker, K., Reinhard, I., Vollstädt-Klein, S., Kirsch, M., Hermann, D., Charlet, K., Beck, A., Wimmer, L., Frank, J., Treutlein, J., Spanagel, R., Mann, K., Walter, H., Heinz, A., Rietschel, M., Kiefer, F., 2014. Genetic variation in the atrial natriuretic peptide transcription factor GATA4 modulates amygdala responsiveness in alcohol dependence. *Biological Psychiatry*, **75**, 790-797.
- Kaiya, H., Darras, V.M., Kangawa, K., 2007. Ghrelin in Birds: Its structure, distribution and function. *The Journal of Poultry Science*, **44**, 18.
- Karpyak, V.M., Winham, S.J., Biernacka, J.M., Cunningham, J.M., Lewis, K.A., Geske, J.R., Colby, C.L., Abulseoud, O.A., Hall-Flavin, D.K., Loukianova, L.L., Schneekloth, T.D., Frye, M.A., Heit, J.A., Mrazek, D.A., 2014. Association of GATA4 sequence variation with alcohol dependence. *Addiction Biology*, **19**, 312-315.
- Kierson, J.A., Dimatteo, D.M., Locke, R.G., Mackley, A.B., Spear, M.L., 2006. Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatrica*, **95**, 991-995.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656-659.
- Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, **85**, 495-522.
- Kojima, S., Nakahara, T., Nagai, N., Muranaga, T., Tanaka, M., Yasuhara, D., Masuda, A., Date, Y., Ueno, H., Nakazato, M., Naruo, T., 2005. Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clinical Endocrinology*, **62**, 74-78.
- Korbonits, M., Goldstone, A.P., Gueorguiev, M., Grossman, A.B., 2004. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **25**, 27-68.
- Landgren, S., Jerlhag, E., Hallman, J., Orelund, L., Lissner, L., Strandhagen, E., Thelle, D.S., Zetterberg, H., Blennow, K., Engel, J.A., 2010. Genetic variation of the ghrelin signaling system in females with severe alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **34**, 1519-1524.

- Landgren, S., Jerlhag, E., Zetterberg, H., Gonzalez-Quintela, A., Campos, J., Olofsson, U., Nilsson, S., Blennow, K., Engel, J.A., 2008. Association of proghrelin and GHS-R1A gene polymorphisms and haplotypes with heavy alcohol use and body mass. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **32**, 2054-2061.
- Landgren, S., Simms, J.A., Hyytiä, P., Engel, J.A., Bartlett, S.E., Jerlhag, E., 2012. Ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonism suppresses both operant alcohol self-administration and high alcohol consumption in rats. *Addiction Biology*, **17**, 86-94.
- Leggio, L., Ferrulli, A., Cardone, S., Nesci, A., Miceli, A., Malandrino, N., Capristo, E., Canestrelli, B., Monteleone, P., Kenna, G.A., Swift, R.M., Addolorato, G., 2012. Ghrelin system in alcohol-dependent subjects: role of plasma ghrelin levels in alcohol drinking and craving. *Addiction Biology*, **17**, 452-64.
- McKee, K.K., Palyha, O.C., Feighner, S.D., Hreniuk, D.L., Tan, C.P., Phillips, M.S., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H.T., Howard, A.D., 1997. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Molecular Endocrinology*, **11**, 415-423.
- Meza, E., Kranzler, H.R., 1996. Closing the gap between alcoholism research and practise: the case for pharmacotherapy. *Psychiatric Services*, **47**, 917-920.
- Mignini, F., Napolioni, V., Codazzo, C., Carpi, F.M., Vitali, M., Romeo, M., Ceccanti, M., 2012. DRD2/ANKK1 TaqIA and SLC6A3 VNTR polymorphisms in alcohol dependence: association and gene-gene interaction study in a population of Central Italy. *Neuroscience Letters*, **522**, 103-107.
- Miller, D.W., Harrison, J.L., Brown, Y.A., Doyle, U., Lindsay, A., Adam, C.L., Lea, R.G., 2005. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **3**, 60-74.
- Miyasaka, K., Hosoya, H., Sekime, A., Ohta, M., Amono, H., Matsushita, S., Suzuki, K., Higuchi, S., Funakoshi, A., 2006. Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *Journal of Neural Transmission*, **113**, 1279-1285.
- Monteleone, P., Tortorella, A., Castaldo, E.D.L., Filippo, C., Maj, M., 2007. The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is significantly associated with binge eating disorder. *Psychiatric Genetics*, **17**, 13-16.
- Otto, B., Cuntz, U., Fruehauf, E., Wawarta, R., Folwaczny, C., Riepl, R.L., Heiman, M.L., Lehnert, P., Fichter, M., Tschöp, M., 2001. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology*, **145**, 669-673.
- Özen Bekar, E., 2014. Bağımlılık yapıcı madde kullanımı olan hemşireler ve hemşirelik hizmetleri yönetiminin yaklaşımı: bir literatür incelemesi. *Sağlık ve Hemşirelik Yönetimi Dergisi*, **1**, 43-47.
- Öztürk, Y. E., Kırılıoğlu, M., Kırış, R., 2015. Alkol ve madde bağımlılığında risk faktörleri. *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, **18**, 97-118.
- Petersenn, S., Rasch, A.C., Penschorn, M., Beil, F.U., Schulte, H.M., 2001. Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, **142**, 2649-2659.
- Schuckit, M.A., 1994. Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. *American Journal of Psychiatry*, **151**, 184-189.
- Shiia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S., Tanaka, M., Nozoe, S-I., Hosoda, H., Kangawa, K., Matsukura, S., 2002. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 240-244.
- Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H.T., Howard, A.D., Feighner, S.D., Cheng, K., Hickey, G.J., Wyvratt, M.J., Fisher, M.H., Nargund, R.P., Patchett, A.A., 1997. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocrinology Reviews*, **18**, 621-645.
- Suchankova, P., Yan, J., Schwandt, M.L., Stangl, B.L., Jerlhag, E., Engel, J.A., Hodgkinson, C.A., Ramchandani, V.A., Leggio, L., 2017. The Leu72Met Polymorphism of the Prepro-

- ghrelin Gene is Associated With Alcohol Consumption and Subjective Responses to Alcohol: Preliminary Findings. *Alcohol and Alcoholism*, **52**, 425-430.
- Tanrıkulu, A.C., Carman, K.B., 2009. Kars il merkezinde çeşitli üniversite öğrencileri arasında sigara kullanımı sıklığı ve risk faktörleri. *Türk Toraks Dergisi*, **10**, 101-106.
- Tümer, A., 1989. Endokrinolojiye Giriş. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1-4.
- Türkcan, A., 1998. Türkiye’de Madde Kullananların Profili: Hastane Verilerinin İncelenmesi. *Düşünen Adam*, **11**, 56-64.
- Wang, H.J., Geller, F., Dempfle, A., Schauble, N., Friedel, S., Lichtner, P., 2004. Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **89**, 157-162.
- Warnault, V., Darcq, E., Morisot, N., Phamluong, K., Wilbrecht, L., Massa, S.M., Longo, F.M., Ron, D., 2016. The BDNF Valine 68 to Methionine Polymorphism Increases Compulsive Alcohol Drinking in Mice That Is Reversed by Tropomyosin Receptor Kinase B Activation. *Biological Psychiatry*, **79**, 463-473.
- Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2001. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5992-5995.
- Yalçın, M., Eşsizoğlu, A., Akkoç, H., Yaşan, A., Gürgen, F., 2009. Dicle Üniversitesi öğrencilerinde madde kullanımını belirleyen risk faktörleri. *Klinik Psikiyatri*, **12**, 125-133.
- Zhang, J.V., Ren, P.G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.W., Rauch, R., Klein, C., Hsueh, A.J., 2005. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin’s effects on food intake. *Science*, **310**, 996-999.