

Araştırma / Original article

Türk alkol bağımlılarında beyin kaynaklı nörotrofik faktör Val66Met polimorfizminin alkol bağımlılığına yatkınlık üzerine etkisinin araştırılması

Burçin TEZCANLI KAYMAZ,¹ Ayşe Ender ALTINTOPRAK,² Bülent KAYAHAN,³
Çağdaş AKTAN,⁴ Hakan COŞKUNOL,⁵ Buket KOSOVA⁶

ÖZET

Amaç: Multifaktöriyel ve poligenik kalıtım gösteren alkol bağımlılığının patofizyolojisinde, beyinde ifade edilen ve nöronal yaşam ile işlevsellikten sorumlu bir nörotrofin olan 'beyin kaynaklı nörotrofik faktör' (BDNF) geni de rol almaktadır. Çalışmamızda, BDNF genindeki işlevsel Val66Met [G196A; (rs6265)] polimorfizminin Türk kadın ve erkek alkol bağımlısı olgulardaki yaygınlığının belirlenmesi ve bu polimorfizmin bağımlılığa yatkınlık üzerine etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. **Yöntem:** Çalışma ve kontrol gruplarını oluşturan 110 alkol bağımlısı olgu (10 kadın, 100 erkek) ve 376 sağlıklı bireyde (148 kadın, 228 erkek) BDNF Val66Met polimorfizminin genotip dağılımı ve alel sıklığı PZR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi) yöntemiyle belirlenmiş, istatistiksel analizler ki-kare ve ANOVA testleriyle gerçekleştirilmiştir. **Bulgular:** Çalışma grubunu oluşturan olgular, kontrol grubu olgularıyla karşılaştırıldığında; mutant AA genotipinin dağılımı %3.6'ya karşı %1.6 iken, A alelinin sıklığı %16.0'a karşı %15.0 olarak belirlenmiştir. Bulgularımıza göre, çalışma grubu ve kontrol grubu, kadın olgular ile kadın kontroller ve erkek olgular ile erkek kontroller arasında genotip dağılımı ve alel sıklığı açısından anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Çalışmanın gücü genotip analizi açısından %80.2 olarak hesaplanmıştır. **Sonuç:** Bu bulgular, BDNF geni polimorfik A alelinin Türk olgularda alkol bağımlılığıyla ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Ancak AA genotipli erkek olguların alkol kullanmaya ve sorunlu içiciliğe başlama yaşının diğer genotiplere göre daha erken olduğunun belirlenmesi, alkol bağımlılığı fenotipinde BDNF polimorfizminin önemli olabileceğini düşündürmektedir. (Anadolu Psikiyatri Derg 2013; 14:1-9)

Anahtar sözcükler: Alkol bağımlılığı, beyin kaynaklı nörotrofik faktör, BDNF Val66Met, polimorfizm

Investigating the effect of brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism upon alcoholism tendency in Turkish alcohol dependents

ABSTRACT

Objective: The neurotrophine 'brain derived neurotrophic factor' (BDNF) which is expressed in the brain is responsible for neuronal survive and functioning also plays a role in pathophysiology of alcohol dependence that show multifactorial and polygenic heredity. In the current study, we aimed to define the frequency of the functional Val66Met [G196A; (rs6265)] polymorphism of BDNF gene for Turkish male and female alcohol dependent cases and also to identify whether this polymorphism had any effect upon tendency to alcoholism. **Methods:** Genotype distribution and allele frequency of BDNF Val66Met polymorphism was identified via PCR-RFLP (Polymerase

¹ Arş.Gör.Dr., ³ Doç.Dr., ⁴ Doktorant, ⁶ Yrd.Doç.Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı; ² Doç.Dr., ⁵ Prof.Dr., Psikiyatri Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Yazışma adresi / Address for correspondence:

Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova/İzmir, Türkiye
E-mail: burcin.tezcanli@ege.edu.tr

Geliş tarihi: 05.02.2012, Kabul tarihi: 22.06.2012 doi:10.5455/apd.34461

2 Türk alkol bağımlılarında beyin kaynaklı nörotrofik faktör Val66Met polimorfizminin ...

Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method in 110 alcoholic cases (10 female, 100 male) and 376 healthy subjects (148 female, 228 male) constituting our study and control groups, statistical analyses were revealed by chi-square and ANOVA tests. **Results:** The distribution of the mutant AA genotype was 3.6% to 1.6% and frequency of the A allele was 16.0% to 15.0% in the study group when compared to control group. Our results didn't show any significant differences in genotype distribution and allele frequencies of polymorphism neither between the study and control groups nor between female case and female controls and male alcoholics and male controls. The power of the study for genotype analysis was set at 80.2%. **Conclusion:** These results indicate that the polymorphic A allele of BDNF gene is not related with alcoholism in Turkish subjects. But since AA genotyped male subjects' starting ages of alcohol usage and pathological drinking were detected to be earlier among other genotypes, this gave rise to a conclusion that BDNF polymorphism might be important in the alcoholism phenotype. (*Anatolian Journal of Psychiatry* 2013; 14:1-9)

Key words: alcohol dependence, brain derived neurotrophic factor, BDNF Val66Met, polymorphism

GİRİŞ

Aile, ikiz ve evlat edinme çalışmaları alkol bağımlılığının güçlü bir genetik temele dayandığını göstermektedir. Alkolizm, farklı genlerin birbiriyle ve çevresel etkenle etkileşimi sonucunda ortaya çıkan poligenik ve multifaktöriyel kalıtım modeline sahiptir.¹

Bağımlılık yapan maddelerin mezolimbik/mezokortikal dopamin sistemini aktive ettiği saptandığından; alkol bağımlılığı ile bu sistemi düzenleyen genler arasındaki ilişki ilginç çeken bir araştırma konusu olmuştur.² Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) geninin, dopamin ve serotonin sistemi üzerinde etkisinin bulunduğu; bu nedenle alkol bağımlılığına yatkınlığı tetikleyebileceği düşünülmektedir. Deneysel olarak dopamin nöronları lokal yıkıma uğratılmış ve BDNF eksikliği bulunan fare modelleriyle yapılan bir çalışmada, dopamin nöronlarındaki BDNF'nin nukleus akkumbensteki dopamin D3 reseptörünün ekspresyonunu indüklediği ve davranışsal duyarlılığı tetiklediği belirlenmiştir.³ BDNF aleli çıkartılmış olan BDNF (+/-) heterozigot mutant olan farelerle yapılan başka bir çalışmada ise, mutant farelerin yabani tiplere oranla alkol içeren içecekleri daha çok seçtikleri görülmüştür.⁴ Çoklu madde kullanımına duyarlılık sağlayan genler arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik insanlar üzerinde yapılan ve 1494 tek nükleotid polimorfizminin tarandığı çalışmada pozitif belirtecin (marker) BDNF genine denk geldiği gösterilmiştir.⁵ Alkol bağımlılığının genomda riskli bölgelerini saptamak için yapılan bir lokus çalışmasında 11p13 bölgesinin,⁶ linkage analizi çalışmasında ise 11p15.5 bölgesinin⁷ alkol bağımlılığının ortaya çıkmasında etkin olabileceği gösterilmiştir. Tüm bu bulgular, genomda 11p.13-15'e lokalize BDNF'nin alkol bağımlılığında önemli bir gen olduğuna işaret etmektedir.⁸

Hipokampus ve kortekste yüksek düzeyde ifade
Anatolian Journal of Psychiatry 2013; 14:1-9

edilen BDNF, nörogenezden, nöronların proliferasyonundan, yaşamlarını sürdürmelerinden, farklılaşmalarından ve etkinliklerini artırmalarından sorumlu bir nörotrofindir.^{9,10} Nörotrofinlerin sinir sisteminin gelişiminde hücre canlılığından sinaptik etkinliğin ayarlanmasına kadar geniş bir çeşitlilikte önemli rolleri vardır.¹¹⁻¹³ Merkezi ve periferik sinir sistemindeki özgül nöron popülasyonlarının oluşumu ve güçlenmesi, nörotrofik faktörlerin yüksek afiniteli hücre yüzey reseptörlerine bağlanmalarıyla kontrol edilmektedir. BDNF'nin nöronal gelişim ve sinaptik plastisitenin önemli bir moleküler düzenleyicisi olduğu bildirilmektedir.¹⁴

İnsan BDNF geni, her biri kendine özgü promoter bölgesine sahip; ancak farklı derecelerde tek bir 3' terminal eksona bağlanan (splays) en az altı tane 5' eksona sahiptir. 3' terminal kodonu, farklı BDNF pre-mRNA'ların birleşmesine olanak sağlayan tek işlevsel splays akseptör bölgesini içermekte ve olgun mRNA'nın tüm sekansını kodlamaktadır. Böylece, BDNF ekspresyonunu transkripsiyon düzeyinde düzenleyebilecek büyük bir potansiyel oluşmaktadır.¹⁵ BDNF'nin promoter bölgesindeki gen varyantları henüz tam olarak tanımlanmamış olmakla birlikte, BDNF geninde 40'tan fazla tek nükleotid polimorfizmi (SNP) saptanmıştır.¹⁶ Bu SNP'ler arasında G196A (Val66Met, rs6265) işlevsel polimorfizmi, üzerinde en fazla çalışılmıştır. BDNF'nin kodlama bölgesinde meydana gelen bu işlevsel SNP, prekürsör polipeptidinin 66. kodonda varyant BDNF'yi kodlamaktadır. Met66 varyantı pro-BDNF'nin işleyişini ve nöronlar aktifleştince salıverilmesini etkilemektedir. Ancak, BDNF'deki bu değişiklik kendini olgun proteinden proteolitik yıkım ile ayrılan prekürsör peptidinde (pro-BDNF) gösterdiği için, olgun BDNF proteininin biyolojik aktivitesini etkilememektedir.¹⁷

Bu çalışmada, alkol bağımlılığına yatkınlıkta sorumlu olabileceği düşünülen aday genlerden

biri olan BDNF'nin Val66Met polimorfizminin Türk alkol bağımlılarındaki yaygınlığının saptanarak; bu polimorfizmin alkolizme yatkınlık gelişimi üzerine etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM

Çalışma ve kontrol grubu

Çalışma grubu, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ve bir psikiyatrist ile görüşme sonrasında DSM-IV ölçütlerine göre alkol bağımlılığı tanısı konmuş 110 olgudan (100 erkek, 46±9.28 yıl; 10 kadın, 36±7.77 yıl) oluşmaktadır. Olgu grubu, 2005-2011 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı'na tedavi amacıyla başvuran kişiler arasından, komorbid bozukluğu bulunmayan ve çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul etmiş kişilerden oluşmaktadır. Alkol kullanımı sorunlarının şiddeti Michigan Alkol Tarama Testi (MAST) ile saptanmıştır. Kontrol grubu ise aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 376 sağlıklı bireyden oluşmaktadır (228 erkek, 44.51±13.23 yıl; 148 kadın 37±18.56 yıl). Katılımcılar, Ege Bölgesi'nden seçilmiş ve çalışma Yerel Etik Kurulu tarafından 25. 01. 2005 tarihli, 04-11/31 M-93 sayılı karar ile onaylanmış; tüm katılımcılardan imzalı 'aydınlatılmış gönüllü onamı' alınmıştır.

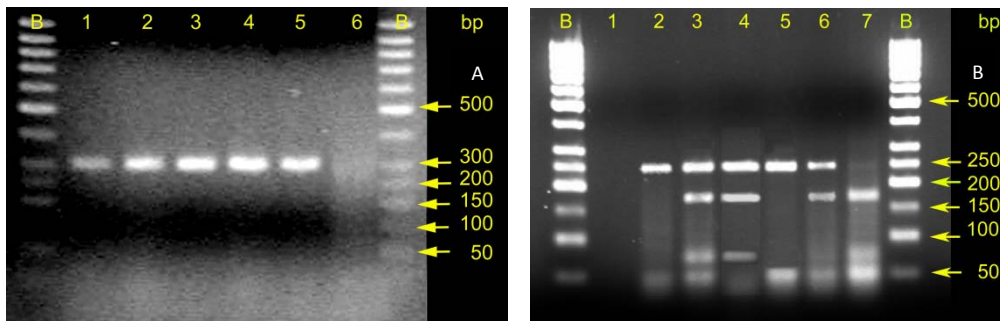
Genotip analizi

Üç ml periferik venöz kandan 'High Pure PCR Template Preparation Kit' (Roche Applied Science, Germany) maneline göre genomik

DNA izole edildikten sonra; 308 bp büyüklüğündeki BDNF gen fragmenti genotiplendirme analizi için ileri primer: 5'-ACT CTG GAG AGC GTG AAT-3'; geri primer: 5'-ATA CTG TCA CAC ACG CTC-3' kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu karışımı: 25 mM MgCl₂, 100 µM her bir primer, 2 mM dNTP karışımı, 10×PZR tamponu, 1U Taq polimeraz, 50 nmol genomik DNA'dan oluşmaktadır. Reaksiyon protokolü: 92°C de 9' denatürasyon, 45 PZR siklusu ile DNA'nın amplifikasyonu (94°C'de 20"; 56°C'de 30"; 72°C'de 30") ve 72°C'de 3' son uzama ile tamamlanmıştır. 10 µl PZR ürünü, 1 U NlaIII (Fermentas) restriksiyon enzimiyle 37°C'de dört saat süreyle inkübe edilip, %2'lik Nusieve agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra, jel görüntüleme analiz-dokümantasyon sistemiyle görüntülenmiş ve genotiplendirme yapılmıştır. BDNF geninin 66. kodonunda Guanin varlığı (G, Val aminoasidi) 243 bp, 59 bp, 6 bp'lik yabancı tip fragment ürünlerini oluşturuyorken; Adenin varlığında (A, Met aminoasidi) 168 bp, 75 bp, 59 bp, 6 bp'lik mutant fragmentler gözlenmektedir. PZR ve enzim kesimi sonuçlarına ait jel görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir.

İstatistiksel analiz

Kontrol ve çalışma gruplarının genotip dağılımı ve alel sıklığı açısından karşılaştırması, anlamlılık değeri p<0.05 kabul edilen ki-kare ve ANOVA testleriyle gerçekleştirilmiş ve sonuçlar SPSS ver15.0 programıyla değerlendirilmiştir. Genotip dağılımının güç analizi, NCSS-PASS 2000 programıyla gerçekleştirilmiştir (α=0.05).



Şekil 1. A) PZR Ürününün Konfirmasyonu: Kontrol ve çalışma grubundaki bazı olguların 308 bp'lik BDNF gen ürününün %2'lik agaroz jel üzerinde koşulmasına ait görüntü. B: Belirteç DNA (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; MBI Fermentas, Germany); 1 - 5: Olgu-kontrol grubu bireylerinin BDNF gen amplifikasyonuna ait fragment, 6: H₂O (Negatif Kontrol) **B) RFLP Sonrası Genotiplendirme:** Bazı olgulara ait örneklerin, restriksiyon enzim kesimi sonrasında %2'lik NuSieve agaroz jel üzerinde koşularak genotiplendirilmeleri. 1: Negatif kontrol; 2 ve 5: yabancı tip (GG) 3,4 ve 6: Heterozigot (GA); 7: Homozigot mutant (AA).*: Jel uzun süre koşulduğu için 6 bp'lik DNA fragmenti kaybedilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızın sonuçlarına göre, kadın ve erkek alkol bağımlısı olgulardan oluşan çalışma grubunun BDNF Val66Met genotip dağılımı, yabancıl tip GG için %71.9, heterozigot GA için %24.5 ve polimorfik AA için %3.6 olarak saptanmıştır. Kontrol grubundaki bireylerin genotip dağılımları ise GG için %71.5, GA için %26.9 ve AA için %1.4 olarak belirlenmiştir. Polimorfik A alelinin sıklığı çalışma grubunda %16 iken, kontrol grubunda %15 olarak saptanmıştır. Çalışma grubu ile kontrol grubunun BDNF Val66Met frekansı genotip ($\chi^2=1.90$, $p=0.387$) ve alel ($\chi^2=0.10$, $p=0.749$) açısından

kıyaslandığında, iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Genotip dağılımı ve alel sıklığı, ne kadın alkol bağımlıları ve kadın kontrol grubu ($\chi^2=0.41$, $p=0.816$ ve $\chi^2=0.02$, $p=0.886$) arasında, ne de erkek alkol bağımlıları ile erkek kontrol grubu ($\chi^2=2.62$, $p=0.270$ ve $\chi^2=0.005$, $p=0.946$) arasında anlamlı bir farklılıkta saptanmıştır. Genotip ve alel sıklığına ait frekans oranları Tablo 1'de özetlenmiştir. Çalışma ve kontrol grubu olguları için G196A polimorfizmi genotiplerinin Hardy-Weinberg dengesinde oldukları belirlenmiştir.

Tablo 1. Çalışma ve kontrol gruplarının BDNF Val66Met polimorfizmine ait genotip dağılımı ve alel sıklığı

	Genotip dağılımı						HWD†		Alel sıklığı			
	G/G (s:348)	G/A (s:128)	A/A (s:10)				p	χ^2	p	G	A	p
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%				%	%	
Çalışma grubu (s=110)	79	71.9	27	24.5	4	3.6	0.387	1.01	0.314	84.0	16.0	0.749
Kadın (s=10)	7	70.0	3	3.0	0	0.0	0.816			85.0	15.0	0.886
Erkek (s=100)	72	72.0	24	24.0	4	4.0	0.270			84.0	16.0	0.946
Kontrol grubu (s=376)	269	71.5	101	26.9	6	1.6		0.75	0.39	85.0	15.0	
Kadın (s=148)	109	73.6	37	25.0	2	1.4				86.0	14.0	
Erkek (s=228)	160	70.2	64	28.1	4	1.8				84.0	16.0	

BDNF Val66Met polimorfizmi ile sırasıyla verilen değişkenler arasında genotip dağılımı ve alel sıklığı açısından anlamlı fark saptanmamıştır:

* Alkolik çalışma grubu (s=110) ve kontrol grubu (s=376) arasında [$\chi^2=1.90$, $p=0.387$] ve [$\chi^2=0.10$, $p=0.749$]

** Kadın alkol bağımlıları (s=10) ve kadın kontrol grubu (s=148) arasında [$\chi^2=0.41$, $p=0.816$] ve [$\chi^2=0.021$, $p=0.886$]

*** Erkek alkol bağımlıları (s=100) ve erkek kontrol grubu arasında (s=228) [$\chi^2=2.62$, $p=0.270$] ve [$\chi^2=0.005$, $p=0.946$]

HWD†: Hardy Weinberg Dengesi; çalışma ve kontrol grubu HW dengesindedir - serbestlik derecesi:1

Olgu grubunun eğitim durumu, meslek dağılımı, medeni durumu gibi sosyal özellikleri ile BDNF genotipleri karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 2).

Çalışma grubunun alkol kullanmaya başlama yaşı, sorunlu içiciliğe başlama yaşı ve alkol bağımlılığı tedavisine başlama yaşı ile BDNF genotip sonuçları Tablo 3'te verilmektedir. Bulgularımıza göre hem kadın, hem de erkek bağımlılar alkol kullanmaya BDNF genotipine bağlı olmaksızın on beşli yaşlarda başlamış; sorunlu içiciliğe başlama yaşı ise 23-30 arasında bulunmuştur. Kadın alkol bağımlılarında hem alkol kullanmaya başlama, hem de sorunlu içiciliğin erkeklere göre daha erken yaşlarda

başladığı saptanmıştır.

Çalışma grubunu oluşturan olguların alkol kullanma miktarı ve içme sıklığı BDNF genotip varyantları açısından değerlendirildiğinde, kadın ve erkek olgu gruplarında genotipe göre anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Ancak, erkek olguların %71'i (s=71), kadın olguların %60'ı (s=6) günde 10 standart içkiden daha fazla; erkeklerin %97'si ve kadınların %90'ı her gün alkol almaktadır. Son olarak olguların sigara/ madde bağımlılığı, ailesel psikiyatrik öyküleri, ailesel alkol ve madde bağımlılıkları ve BDNF genotip varyantları arasındaki ilişki incelendiğinde, bu değişkenlerden herhangi biri için BDNF genotipinin anlamlı bir farklılıkta olmadığı belir-

Tablo 2. Kadın ve erkek olguların sosyal geçmişiyle BDNF genotip varyantlarının karşılaştırılması

	Kadın olgular (s=10)				p	Erkek olgular (s=100)						p
	BDNF Genotipi					BDNF Genotipi						
	G/G (s=7)		G/A (s=3)			G/G (s=72)		G/A (s=24)		A/A (s=4)		
	Sayı	%	Sayı	%		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Eğitim durumu (s=110)					0.788							0.575
İlköğretim (s=42)	2	66.7	1	33.3		27	69.2	9	23.1	3	7.7	
Lise (s=40)	4	66.7	2	33.3		26	76.5	8	23.5	0	0.0	
Üniversite (s=28)	1	100.0	0	0.0		19	70.4	7	25.9	1	3.7	
Meslek dağılımı (s=110)					0.400							0.356
Çalışmıyor (s=10)	3	25.0	1	75.0								
Memur (s=24)	1	100.0	0	0.0		14	60.9	7	30.4	2	8.7	
Emekli (s=36)	0	0.0	1	100.0		24	68.5	10	28.6	1	2.9	
İşçi (s=11)	2	100.0	0	0.0		5	55.6	3	33.3	1	11.1	
Diğer (s=29)	1	50.0	1	50.0		24	88.9	3	11.10	0	0.0	
Medeni durum (s=110)					0.108							0.932
Evli (s=75)	5	100.0	0	0.0		51	72.8	16	22.9	3	4.3	
Boşanmış (s=20)	1	50.0	1	50.0		12	66.7	5	27.8	1	5.6	
Bekar (s=15)	1	33.3	2	66.7		9	75.0	3	25.0	0	0.0	

Tablo 3. Kadın ve erkek olgu gruplarında yaşa bağlı değişkenlerinin BDNF genotip varyantlarına göre karşılaştırılması

	Kadın olgular (s=10)		Erkek olgular (s=100)		
	BDNF Genotipi		BDNF Genotipi		A/A (s=4)
	G/G (s=7)	G/A (s=3)	G/G (s=72)	G/A (s=24)	Ort±SS
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
Alkol kullanmaya başlama yaşı	15.4±2.87	17.0±4.35	16.7±4.30	16.2± 2.88	5.5±2.64
Sorunlu içiciliğe başlama yaşı	23.8±4.70	28.6±10.0	29.9±9.20	28.9±10.6	25.5±3.41
Alkol tedavisine başlama yaşı	33.8±7.98	33.0±8.54	40.4±9.73	41.1±8.82	46.5±9.57

lenmiştir. Hem kadın, hem de erkek bağımlıların tamamında sigara [sadece sigara içenler %85.4 (s=94)] veya madde bağımlılığı öyküsü vardır. Olgu gruplarının ailelerinde psikiyatrik, alkol bağımlılığı ve madde bağımlılığı öyküleri BDNF genotip varyantları açısından karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Analizlerimize göre, alkol bağımlılarının %87.3'ünün (s=96) ailesinde psikiyatrik bozukluk öyküsü vardır; ancak ailede alkol bağımlılığı değerlendirildiğinde, %36.4'ünün (s=40) aile öyküsü yokken; %63.6'sının (s=70) birinci derece/ikinci derece akrabalarında veya ailede birçok kişide alkol bağımlılığı öyküsünün olduğu belirlenmiştir. Çalışma grubunun %91.8'inin (s=101) ailesinde madde bağımlılığı öyküsü yoktur (Tablo 4).

TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları, daha önce yapılan çalışmaların çoğunluğuna paralel olarak BDNF Val66Met polimorfizminin alkol bağımlılığının gelişimi üzerine doğrudan etkisinin olmadığı yönündedir. Erkek alkol bağımlısı olguların alel sıklığı G için %84.0 ve A için %16.0 olarak; kadın alkol bağımlısı olguların alel sıklıkları ise sırasıyla %85.0 ve %15.0 olarak belirlenmiştir. Tüm kontrol grubunun G ve A için alel sıklıkları %85.0 ve %15.0 olarak saptanmıştır. BDNF Val66Met frekansları popülasyon çeşitliliğini gösteren ve 'HapMap Projesi' olarak bilinen çalışmalar kapsamında belirlenmiş popülasyon geneli frekansların Avrupa toplumunda G aleli

6 Türk alkol bağımlılarında beyin kaynaklı nörotrofik faktör Val66Met polimorfizminin

Tablo 4. Kadın ve erkek olguların alkol tüketimi, sigara/madde bağımlılığı ve ailesel psikiyatrik hastalık, alkol ve madde bağımlılığı öyküsünün BDNF genotip varyantlarına göre kıyaslanması

	Kadın olgular (s=10)				p	Erkek olgular (s=100)						p
	BDNF Genotipi					BDNF Genotipi						
	G/G (s=7)		G/A (s=3)			G/G (s=72)		G/A (s=24)		A/A (s=4)		
	Sayı	%	Sayı	%		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
İçme miktarı					0.778							0.133
≤10 standart içki* (s=35)	3	75.0	1	25.0		20	64.5	8	25.8	3	9.7	
>10 standart içki (s=75)	4	66.7	2	33.3		52	75.4	16	23.2	1	1.4	
İçme sıklığı					0.107							0.882
Ayda 1-2 kez (s=1)	0	0.0	0	0.0		1	100.0	0	0.0	0	0.0	
Haftada 1-2 kez (s=3)	0	0.0	1	100.0		1	50.0	1	50.0	0	0.0	
Her gün (s=106)	7	77.8	2	22.2		70	72.7	23	23.7	4	4.1	
Sigara/madde bağımlılığı					0.880							0.795
Sigara içenler (s=94)	5	71.4	2	28.6		63	72.4	20	23.0	4	4.6	
Madde bağımlıları (s=1)	0	0.0	0	0.0		1	100.0	0	0.0	0	0.0	
Sigara+esrar (s=7)	0	0.0	0	0.0		5	71.4	2	28.6	0	0.0	
Karışık madde kul. (s=5)	2	66.7	1	33.3		2	100.0	0	0.0	0	0.0	
Sigara+esrar+hap kul. (s=3)	0	0.0	0	0.0		1	33.3	2	66.7	0	0.0	
Ailede psikiyatrik öykü					0.585							0.825
Yok (s=96)	5	62.5	3	37.5		64	72.7	21	23.9	3	3.4	
Birinci derece akraba (s=10)	1	100.0	0	0.0		6	66.7	2	22.2	1	11.1	
İkinci derece akraba (s=4)	1	100.0	0	0.0		2	66.7	1	33.3	0	0.0	
Ailede alkol bağımlılığı öyküsü					0.103							0.540
Yok (s=40)	0	0.0	2	100.0		24	63.2	12	31.6	2	5.3	
Birinci derece akraba (s=21)	1	100.0	0	0.0		15	75.0	5	25.0	0	0.0	
İkinci derece akraba (s=14)	2	100.0	0	0.0		9	75.0	3	25.0	0	0.0	
Ailede birçok üyede (s=35)	4	80.0	1	20.0		24	80.0	4	13.3	2	6.7	
Ailede madde bağımlılığı öyküsü					0.301							0.570
Yok (s=101)	5	62.5	3	37.5		65	69.9	24	25.8	4	4.3	
Birinci derece akraba (s=4)	2	100.0	0	0.0		2	100.0	0	0.0	0	0.0	
İkinci derece akraba (s=5)	0	0.0	0	0.0		0	0.0	5	100.0	0	0.0	

* Standart içki: İçerisinde 14 gram saf alkol bulunan içecek, 1 standart içkiye karşılık gelmektedir.²³

için %80.5 ve A aleli için %19.5 olduğu belirlenmiştir. Asya toplumu için Çin ve Japon grupların iki farklı çalışmasında ise, polimorfik A alelinin sıklığı sırasıyla %61.6 ve %37.2 olarak bulunmuştur.¹⁸ Bu çalışmada, Türk alkol bağımlılarında BDNF genotipi açısından polimorfik A alelinin oldukça düşük olduğu, bu nedenle Avrupa kökenliler ile daha yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmaların büyük bir kısmında da, bizim çalışmamızda olduğu gibi, A alelinin alkol bağımlılığının gelişmesinde tek başına etkin bir risk etkeni oluşturmadığı bildirilmektedir. Matsushita ve arkadaşları, 377 Japon erkek alkol bağımlısı ile yaptığı çalışmada, BDNF polimorfizmi ile alkol bağımlılığı arasında

ilişki saptamamıştır.¹⁹ Tsai ve arkadaşlarının 110 Çinli alkol bağımlısı erkek ile gerçekleştirdiği çalışmada da, bizim bulgularımıza benzer sonuçlar elde edilmiş ve alkol bağımlılığı ile BDNF genotipi arasında ilişki saptanmamıştır.²⁰ Jiang ve arkadaşlarının, Alzheimer, affektif bozukluklar, travma sonrası stres bozukluğu, şizofreni, alkol ve madde bağımlısı olgu grupları ile yaptıkları çalışmalarda BDNF gen varyantları araştırılmış, Val66Met polimorfizmi için alkol bağımlısı olgular ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.²¹ Grzywacz ve arkadaşlarının 138 alkol bağımlısı ile yaptıkları aile tabanlı çalışmada, G alel sıklığı %83.0 iken polimorfik A alel sıklığı %17.0 olarak saptanmıştır; bulgularımız bu çalışma ile benzerlik

göstermektedir.²² Çalışmamızın gücü genotip analizi açısından yüksek ve %80.2 olarak bulunduğundan, sonuçlarımız Türk popülasyonu için alkol bağımlılığı ile BDNF G196A polimorfizmi arasında ilişki olmadığı yönündedir. Ancak rs6265 polimorfizmi ile alkolizm arasında ilişki saptamış iki çalışma bulunmaktadır. Shin ve arkadaşlarının 68 Kore'li alkol bağımlısında BDNF rs6265 polimorfizmini inceledikleri çalışmalarında, Met alel sıklığının 79.0% olduğu belirlenmiş ve alkolizm ile anlamlı bir ilişki olduğu rapor edilmiştir.²³ Su ve arkadaşlarının 548 alkol bağımlısını, alkol bağımlılığına bağlı depresyon gözlenen [+D] 166 olgu, depresyon gözlenmeyen [-D] 382 olgu olarak iki gruba ayırdıkları çalışmalarının sonucunda, BDNF rs6265 ile bağımlılığa bağlı depresyon arasında anlamlı ilişki olduğu rapor edilmiş; polimorfik A alelinin bağımlılığın patofizyolojisinde önemli bir aday olabileceği öne sürülmüştür.²⁴ Wojnar ve arkadaşlarının 158 Polonyalı erkek alkol bağımlısı ile yaptıkları çalışmalarında ise, BDNF Val66Met aleline sahip olguların tedavi sonrasında daha erken relaps olduğu saptanmış; Val66Met polimorfizmi ile tedavi sonrası relaps arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür.²⁵ Çalışmamızın sonuçlarına göre alkol bağımlılığı ile BDNF gen polimorfizmi arasında ilişki saptamamış olmanın olası nedeni; bu polimorfizmin hastalığın kendisiyle (*per se*) değil de; prognoz (şiddet eğilimi ve/veya deliryum dahil hastalığın gerilemesine yol açan komplikasyonlar) ve tedaviye verilen yanıt ile daha çok ilişkili olmasıdır.^{19,25} Bu nedenle, BDNF gen polimorfizminin alkol bağımlılığına yatkınlık gelişimi üzerinde direkt etkin bir faktör olmaktan çok, alkolizmin fenotipini etkileyebilecek ve prognozunda bireysel farklılıkların oluşmasını sağlayabilecek bir etken olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışma, olgu sayısının görece az olması nedeniyle sınırlanmış olsa da, örneklem büyüklüğüne göre yapılan güç analiz sonucunda, BDNF polimorfizmi ile alkol bağımlılığı arasında ilişki bulunmadığını ifade edebilmekte; hatalı negatif sonuçları dışlamaktadır.

Alkol bağımlılığının multifaktöriyel kalıtım gösterdiği, etiyolojisinde genetiğin yanı sıra çevresel ve sosyal etkenlerin de önemli olduğu bilinmektedir; olgu grubumuzun eğitim, medeni durum, meslek gibi sosyal geçmişleri ile BDNF genotip varyantları arasındaki ilişki araştırılmış, ancak herhangi bir değişken için anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte çalışma grubunu oluşturan olguların iyi bir sosyal geçmişe sahip olduğu söylenebilir; %61.8'inin (s=68) lise/üniversite mezunu, %90.1'inin (s=100) sabit

bir işte çalıştığı veya emekli olduğu ve %68.1'inin (s=75i) evli olduğu belirlenmiştir.

Çalışma grubumuzu oluşturan erkeklerin, alkol bağımlılığı geçmişinin yaşa bağlı değişkenleri incelediğimizde, polimorfik AA genotipine sahip olguların yabanıl tip GG genotipine göre ortalama 2.2 yıl daha erken (15.5 yaşa karşı 16.7 yaş) alkol kullanmaya başladığı belirlenmiştir. Benzer şekilde AA genotipe sahip erkek olguların sorunlu içiciliğe başlama yaşının GG genotipe sahip olanlara göre ortalama 4.4 yıl daha erken olduğu ve bu kişilerin tedaviye daha geç başladıkları belirlenmiştir. Bulgularımıza benzer olarak Matsushita ve arkadaşları da AA genotipe sahip erkek alkol bağımlısı olguların alkol kullanımına GG genotiplilere göre ortalama dört yıl daha erken (37.5 yaşa karşı 41.5 yaş) başladığını bulmuştur.¹⁹ Ancak AA genotipe sahip kadın bulunmamakla birlikte, GA genotipe sahip olanların hem alkol kullanmaya, hem de sorunlu içiciliğe başlama yaşları GG genotipli olgulara göre sırasıyla 1.6 yıl ve 4.8 yıl daha geç olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Olgularımızın alkol alma miktarı ve sıklığı BDNF genotip varyantlarıyla karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Alkol kullanım miktarı ve sıklığının bilinmesi, bağımlılığın derecesini yansıtabilmektedir. Örneğin, %12 oranında alkol içeren iki şişe (yaklaşık 1.4 litre) şarap tüketimi, 10 standart içkiye denk gelmektedir.²⁶ Bu durumda çalışma grubumuzda yer alan kadın ve erkek olguların ağır içici oldukları söylenebilir; ancak fazla miktarda alkol tüketimi ile BDNF genotip varyantları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Çalışma grubunun sigara içme ile BDNF genotip varyantları incelendiğinde, aralarında anlamlı bir fark olmadığını belirledik. Lang ve arkadaşlarının sigara içen sağlıklı bireylerle hiç sigara içmemiş bireyler arasında BDNF Val66Met polimorfizmini inceledikleri çalışmada, sigara içenlerde polimorfik AA genotipi ile A alelinin yüksek olduğu belirlenmiş, ancak iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır.²⁷ Yeom ve arkadaşları sıçan beyninin striatum bölgesini proteomik analizler ile inceledikleri çalışmalarının sonucunda, BDNF'nin nikotin bağımlılığı ile ilişkili proteinlerden biri olduğunu bildirmiştir.²⁸ Hayvan çalışmaları, dopaminerjik ve serotonerjik işlevleri şekillendiren BDNF'nin madde bağımlılığı ile de yakın ilişkide olduğuna işaret etmektedir.^{29,30} Bu bilgiden yola çıkarak, çalışma grubumuzdaki olguların sigara dışındaki madde kullanımları ile BDNF genotip varyantları

karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir. Chenga ve arkadaşları Çinli madde bağımlısı erkek olgular ile kontrol grubu olgularını BDNF Val66Met polimorfizmi açısından karşılaştırmış, iki grup arasında anlamlı bir fark saptamış ve madde bağımlısı grupta AA genotipi ve A alelinin daha yüksek olduğunu belirtmiştir.³¹

Madde bağımlılığının patogenezi tam olarak bilinmese de, birçok ikiz ve aile çalışması, bu hastalığın genetik bir temele dayandığını göstermektedir. Alkol bağımlılarının yakın akrabaları arasında alkol bağımlılığı riskinin üç-dört kat daha yüksek olduğu saptanmıştır.³² Çalışmamızda, ailesinde alkol bağımlılığı, psikiyatrik bozukluk ve madde bağımlılığı öyküsü bulunma hali ile BDNF genotip varyantları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlarımıza göre, ailede alkol bağımlılığı öyküsü olguların %63.6'sında bulunmaktayken; ailede psikiyatrik bozukluk ve madde bağımlılığı oranları oldukça düşük ve sırasıyla %12.7 ile %8.2 olarak belirlenmiştir. Buna göre bulgularımızın alkol bağımlılığının ailesel geçiş gösterdiği yönünde olduğu düşünülebilir, ancak bu durum,

BDNF genotipleri açısından anlamlı bir farklılıkta değildir. Daha önce yapılan bir çalışmada da, ailede alkol bağımlılığı öyküsü ile BDNF genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunmakla birlikte, bu grupta polimorfik A alelinin artış eğilimi gösterdiği bildirilmiştir.¹⁹

Sonuç olarak çalışmamız BDNF G196A polimorfizminin, alkol bağımlılığın gelişiminde Türk toplumu için tek başına etkin bir rol oynamadığını göstermektedir. Daha önce BDNF polimorfizmini depresyon, şizofreni gibi psikiyatrik bozukluklarda araştıran çok sayıda çalışma olmakla birlikte, alkol bağımlılığının araştırılması yakın bir geçmişe dayanmaktadır. Bu nedenle yapılan tüm çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, BDNF Val66Met polimorfizminin, alkol bağımlılığına yatkınlık sağlamada incelenmesi gereken aday genlerden biri olabileceği görülmektedir. Alkol bağımlılığının etiyolojisini aydınlatılabilmek için, BDNF'nin yanı sıra alkol bağımlılığı ile ilişkilendirilmiş diğer genlerle, dopaminerjik ve serotonerjik sistemleri etkileyebilecek genlerin de daha geniş olgu gruplarıyla çalışılmasının alana daha büyük katkılar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Haber JR, Koenig LB, Jacob T. Alcoholism, personality, and religion/spirituality: an integrative review. *Curr Drug Abuse Rev* 2011; 4:250-260.
2. Wise RA, Rompre PP. Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* 1989; 40:191-225.
3. Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz J-C, Sokoloff P. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 2001; 411:86-89.
4. Hensler JG, Ladenheim EE, Lyons WE. Ethanol consumption and serotonin-1A (5-HT1A) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice. *J Neurochem* 2003; 85:1139-1147.
5. Uhl GR, Liu QR, Walther D, Hess J, Naiman D. Polysubstance abuse-vulnerability genes: genome scans for association, using 1,004 subjects and 1,494 single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1290-1300.
6. Buck KJ, Metten P, Belknap JK, Crabbe JC. Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. *J Neurosci* 1997; 17:3946-3955.
7. Long JC, Knowler WC, Hanson RL, Robin RW, Urbanek M, Moore E, et al. Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosomal-wide scan in an American Indian population. *Am J Med Genet* 1998; 81:216-221.
8. Marini AM, Jiang X, Wu X, Tain R, Zhu D, Okagaki P, et al. Brain-derived neurotrophic factor and NF-kB: from genes to phenotype. *Restor Neurol Neurosci* 2004; 22:121-130.
9. Agarwal DP. Molecular genetic aspects of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacopsychiatry* 1997; 30:79-84.
10. Mehler MF, Goldstein H, Kessler JA. Effects of cytokines on CNS cells: Neurons. RM Ransohoff, EN Benveniste (Eds.), *Cytokines and the CNS*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, p.115-150.
11. Barde YA. Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res* 1994; 390:45-56.
12. Berninger B, Poo M. Fast actions of neurotrophic factors. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6:324-330.
13. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22:295-318.
14. Robinson RC, Radziejewski C, Stuart DI, Jones EY. Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry* 1995; 34:4139-4146.
15. Russo-Neustadt A. Brain-derived neurotrophic factor, behaviour, and new directions for the treatment of mental disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 2003; 8:109-118.

16. Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim Y-M, Tsan G, et al. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Mol Psychiatry* 2002; 7:579-593.
17. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003; 112:257-269.
18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6265
19. Matsushita S, Kimura M, Miyakawa T, Yoshino A, Murayama M, Masaki T, et al. Association Study of Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Polymorphism and Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28:1609-1612.
20. Tsai SJ, Liao DL, Yu YW, Chen TJ, Wu HC, Lin CH, et al. A study of the association of (Val66Met) polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene with alcohol dependence and extreme violence in Chinese males. *Neuroscience Letters* 2005; 381:340-343.
21. Jiang X, Xu K, Hoberman J, Tian F, Marko AJ, Waheed JF, et al. BDNF variation and mood disorders: A novel functional promoter polymorphism and Val66Met are associated with anxiety but have opposing effects. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30:1353-1361.
22. Grzywacz A, Samochowiec A, Ciechanowicz A, Samochowiec J. Family-based study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphism in alcohol dependence. *Pharmacol Rep* 2010; 62:938-941.
23. Shin S, Stewart R, Ferri CP, Kim JM, Shin IS, Kim SW, et al. An investigation of associations between alcohol use disorder and polymorphisms on ALDH2, BDNF, 5-HTTLPR, and MTHFR genes in older Korean men. *Int J Geriatr Psychiatry* 2012; 25:441-448
24. Su N, Zhang L, Fei F, Hu H, Wang K, Hui H, et al. The brain-derived neurotrophic factor is associated with alcohol dependence-related depression and antidepressant response. *Brain Res* 2011; 1415:119-126.
25. Marcin Wojnar, Kirk J. Brower, Stephen Strobbe, Mark Ilgen, Halina Matsumoto, Izabela Nowosad, Elzbieta Sliwerska, Margit Burmeister. Association between Val66Met Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gene polymorphism and post-treatment relapse in alcohol dependence. *Alcoholism Clin Exp Res* 2009; 33:693-702.
26. http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/practitioner/pocketguide/pocket_guide2.htm
27. Lang UE, Sander T, Lohoff FW, Hellweg R, Bajbouj M, Winterer G et al. Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology* 2007; 190:433-439.
28. Yeom M, Shim I, Lee HJ, Hahm DH. Proteomic analysis of nicotine-associated protein expression in the striatum of repeated nicotine-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326:321-328.
29. Dluzen DE, Story GM, Xu K, Kucera J, Walro JM. Alterations in nigrostriatal dopaminergic function within BDNF mutant mice. *Exp Neurol* 1999; 160:500-507.
30. Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, et al. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:15239-15244.
31. Cheng CY, Hong CJ, Yu YW, Chen TJ, Wu HC, Tsai SJ. Brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) genetic polymorphism is associated with substance abuse in males. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 140:86-90.
32. Ries RK. Assessment and treatment of patients with co-existing mental illness and alcohol and other drug abuse. *Treatment Improvement Protocol (TIP) Series, second ed., USA, 1994.*