

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELDA MERCAN

KOKAİN KULLANIM BOZUKLUĞU OLAN ERKEK BİREYLERDE PERİFERİK
KANDAKİ MİRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SÜHEYLA AYFER ALKAÇ
İSTANBUL, 2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELDA MERCAN

KOKAİN KULLANIM BOZUKLUĞU OLAN ERKEK BİREYLERDE PERİFERİK
KANDAKİ MİRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

SÜHEYLA AYFER ALKAÇ
İSTANBUL, 2024

İstanbul, 12 Ocak 2024

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 50. Maddesi uyarınca Enstitümüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Süheyla Ayfer ALKAÇ'ın “**Kokain Kullanım Bozukluğu Olan Erkek Bireylerde Periferik Kandaki miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması**” başlıklı tezinin ve tez savunmasının kabul edilmesine jürimizce oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Selda MERCAN
Danışman

Prof. Dr. Hüseyin ÇAKAN
Üye

Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Şenay KORTKUT VURAL
Üye

Bu tez İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon

Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TDK-2020-35144

Bu tez Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) Acil Araştırma ve Geliştirme

Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 20066

İTHAF

Sevgili anneme ve babama ithaf ediyorum.

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince güler yüz ve desteğini eksik etmeyen, bilgi birikimi ve değerli fikirleri ile her zaman yol göstericim olan danışmanım ***Doç. Dr. Selda Mercan'a,***

Doktora eğitimim süresince bende önemli bir yeri olan değerli hocam ***Prof. Dr. Münevver Açıkkol'a,***

Doktora tez sürecimde sağladığı değerli destekleri ve laboratuvar olanakları için değerli hocam ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek'e,***

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan değerli hocam ***Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu'na,***

Araştırmamın örnek toplama aşamasında katkılarından dolayı Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği'nde birlikte çalıştığım hocalarım ***Psikiyatrist Doç. Dr. Hasan Mırsal, Uzm. Psikiyatrist Güney Çetin, Uzm. Psikiyatrist Ozan Odabaşı ve Uzm. Psikiyatrist Rengin Güvenç'e,***

Araştırmamın örnek toplama aşamasında desteklerinden dolayı ***Balıklı Rum Hastanesi Vakfı'na ve Anatolia Kliniği'nde çalışan hastane personeline,***

Doktora tez sürecimde vermiş oldukları burs desteklerinden dolayı ***TÜSEB Proje Yönetimi ve Destek Daire Başkanlığı'na,***

Hayatımdaki en büyük şansım olarak gördüğüm, en değerli iki varlığım olan ***sevgili anneciğim ve babacığuma*** teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Süheyla Ayfer Alkaç

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	6
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. Kokain	10
2.1.1. Kokainin tarihsel gelişimi	11
2.1.2. Kokain eldesi	13
2.1.3. Kullanım yolları	15
2.1.4. Kokainin fizikokimyasal özellikleri ve tanımlamaya yönelik analitik yöntemler ..	16
2.1.5. Kokainin metabolizması	18
2.1.6. Kokainin etkileri ve toksisitesi.....	21
2.2. Kokain Bağımlılığı	23
2.2.1. Bağımlılığın nörobiyolojisi.....	25
2.3. Bağımlılıkta Genetik Bağlantılar	34
2.4. Epigenetik.....	36
2.5. MikroRNA.....	39
2.5.1. miRNA biyogenezi.....	40
2.5.2. Kokain kullanım bozukluğunda mikroRNA'lar	40
2.5.3. Kokain Bağımlılığının Tedavisi	45

2.6. Çoklu Madde Kullanım Bozuklukları	49
2.7. Kokain Bağımlılığında Biyobelirteç Olarak Kullanılan Kandaki miRNA'lar	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1. Gereç.....	57
3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	57
3.1.2. Kullanılan kitler	57
3.1.3. Kullanılan ekipman.....	58
3.2. Yöntem	58
3.2.1. Araştırmanın tipi	58
3.2.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	58
3.2.3. Etik kurul onayı ve yasal/özel izinler.....	59
3.2.4. Araştırmanın evreni ve örneklem grubu.....	59
3.2.5. Çalışmanın dahil edilme ve dışlama ölçütleri	61
3.2.6. Çalışmanın değişkenleri.....	62
3.2.7. Çalışma materyali	62
3.2.8. Veri toplama araçları	62
4. BULGULAR	73
4.1. Katılımcıların Demografik Verileri	73
4.1.1. Cinsiyet ve yaş	73
4.1.2. Boy ve kilo	74
4.1.3. Madde Kullanım Öyküleri	77
4.2. RNA İzolasyonu Sonuçları	79

4.3. İkili Çalışma Grupları ve Kontrol Grubunda Periferik Kan miRNA Ekspresyon Analizleri	81
4.3.1. miR-9-5p ekspresyon analizi	83
4.3.2. miR-26b-5p ekspresyon analizi	86
4.3.3. miR-132-3p ekspresyon analizi	89
4.3.4. miR-134-5p ekspresyon analizi	92
4.4. Klinik Özelliklerin miRNA Ekspresyonları ile Korelasyon Analizi	95
4.4.1. miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi.....	95
4.4.2. Madde kullanım öykülerinin miRNA ekspresyonları ile korelasyonu.....	96
4.5. miRNA'ların ROC Değerlendirmesi	98
4.5.1. mir-9-5p ROC değerlendirmesi	98
4.5.2. mir-26b-5p ROC değerlendirmesi	100
4.5.3. mir-132-3p ROC değerlendirmesi	103
4.5.4. mir-134-5p ROC değerlendirmesi	105
4.6. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası miRNA Ekspresyon Değişiminin Tedavi Üzerine Olan Etkisi	108
5. TARTIŞMA	110
5.1. miR-9-5p.....	113
5.2. miR-26b-5p.....	116
5.3. miR-132-3p.....	118
5.4. miR-134-5p.....	120
5.5. Çalışmadaki Hedef miRNA'lar için Gelecek Perspektifleri.....	123

6. SONUÇ	128
7. KAYNAKLAR.....	133
EKLER.....	149
ÖZGEÇMİŞ	157



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Erythroxyllum coca	10
Şekil 2: Kokainin yapısı.....	16
Şekil 3: Kokainin metabolik yolları.....	21
Şekil 4: Ön beyne dopamin projeksiyonları	27
Şekil 5: Psikostimülan eylem.....	29
Şekil 6: Beyindeki Dopamin Projeksiyonları	30
Şekil 7: Uyuşturucu madde bağımlılığında beyin ve davranış modeli.	32
Şekil 8: Nörodejeneratif hastalıklar için RNA terapötik yaklaşımı	49
Şekil 9: miR-9-5p düzeylerinin ΔCt değerleri üzerinden karşılaştırılması.....	85
Şekil 10: miR-9-5p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	86
Şekil 11: miR-26b-5p düzeylerinin ΔCt değerleri üzerinden karşılaştırılması.....	88
Şekil 12: miR-26b-5p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	89
Şekil 13: miR-132-3p düzeylerinin ΔCt değerleri üzerinden karşılaştırılması.....	91
Şekil 14: miR-132-3p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	92
Şekil 15: miR-134-5p düzeylerinin ΔCt değerleri üzerinden karşılaştırılması.....	94
Şekil 16: miR-134-5p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	95
Şekil 17: Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-9-5p'nin ROC analizi.	99
Şekil 18: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-9-5p'nin ROC analizi.	100
Şekil 19: Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-26b-5p'nin ROC analizi.	101
Şekil 20: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-26b-5p'nin ROC analizi.	102

Şekil 21: Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında bağımlı grubunda miR-132-3p'nin ROC analizi.	104
Şekil 22: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-132-3p'nin ROC analizi.	105
Şekil 23: Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında bağımlı grubunda miR-134-5p'nin ROC analizi.	106
Şekil 24: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-134-5p'nin ROC analizi.	108



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I: Kokainin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	17
Tablo II. cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	67
Tablo III. cDNA sentezi için RNA örneği-su karışımının hesaplanması.	68
Tablo IV. cDNA sentez reaksiyonu koşulları.	68
Tablo V. Aday miRNA dizileri.	69
Tablo VI. qRT-PCR bileşenleri ve miktarları.	70
Tablo VII. qRT-PCR Koşulları.	70
Tablo VIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama yaş değerleri.....	74
Tablo IX. Çalışmaya katılan bireylerin yaş değişkeni açısından gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	74
Tablo X. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama boy değerleri.....	75
Tablo XI. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama kilo değerleri.	76
Tablo XII. Çalışmaya katılan bireylerin kilo değişkeni açısından gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	76
Tablo XIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama BMI değerleri.....	77
Tablo XIV. Çalışmaya katılan bireylerin BMI değişkeni açısından gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	77
Tablo XV. Kokain bağımlısı olan bireylerin madde kullanım öyküleri.....	78
Tablo XVI. Kokain bağımlılığı tedavi gören bireylerin madde kullanım öyküleri.....	79
Tablo XVII. Çalışmaya katılan bireylerden elde edilen örneklerin total RNA konsantrasyonları.	80
Tablo XVIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerine ait miRNA Δ CT değerleri.	82
Tablo XIX. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-9-5p Δ Ct değerleri.	84

Tablo XX. miR-9-5p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	84
Tablo XXI. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-26b-5p Δ Ct değerleri.....	87
Tablo XXII. miR-26b-5p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	87
Tablo XXIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-132-3p Δ Ct değerleri.....	90
Tablo XXIV. miR-132-3p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	90
Tablo XXV. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-134-3p Δ Ct değerleri.....	93
Tablo XXVI. miR-134-5p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.	93
Tablo XXVII. Bağımlı grubunda miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi.	96
Tablo XXVIII. Tedavi grubunda miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi.	96
Tablo XXIX. Kontrol grubunda miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi.	96
Tablo XXX. Bağımlı grubunda madde kullanım öykülerinin miRNA ekspresyonları ile korelasyonu.	97
Tablo XXXI. Tedavi grubunda madde kullanım öykülerinin miRNA ekspresyonları ile korelasyonu.	98
Tablo XXXII. miR-9-5p için Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	99
Tablo XXXIII. miR-9-5p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	100
Tablo XXXIV. miR-26-5p için Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	101
Tablo XXXV. miR-26-5p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	102

Tablo XXXVI. miR-132-3p için Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında bağımlı grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	103
Tablo XXXVII. miR-132-3p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	105
Tablo XXXVIII. miR-134-5p için Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında Bağımlı grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	106
Tablo XXXIX. miR-134-5p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında Tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.	107



KISALTMALAR DİZİNİ

AMPAR	a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit reseptör
ASAM	American Society of Addiction Medicine (Amerikan Bağımlılık Tıbbı Derneği)
AUC	Area under the curve (Eğri altında kalan alan)
BBB	Blood brain barrier (Kan-beyin bariyeri)
BE	Benzoilekgonin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (Beyin kaynaklı nörotrofik faktör)
BMI	Body mass index (Vücut kütle indeksi)
CBD	Cannabidiol (Kannabidiol)
CE	Cocaethylene (Kokaetilen)
CSF	Cerebrospinal fluid (Serebrospinal sıvı)
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein (cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein)
Ct	Cycle threshold
CUD	Cocaine use disorder (Kokain kullanım bozukluğu)
DA	Dopamin
DAT	Dopamin taşıyıcısı
DNA	Deoksiribo nucleic acid (Deoksiribonükleik asit)
EC	Ekgonin
ECF	Extracellular fluid (Ekstrasellüler sıvı)
ED	Ekgonidin
EMA	European Medicines Agency (Avrupa İlaç Ajansı)
EME	Ekgonin metil ester
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (Avrupa

Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi)

EtOH	Ethanol (Etanol)
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)
GABA	Gama aminobütirik asit
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi)
hCE ₂	Karboksilesteraz tip 2
HPLC	High-performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
LD ₅₀	Letal Doz ₅₀
LTD	Long-term depression (Uzun süreli depresyon)
LTP	Long-term potentiation (Uzun süreli potansiyasyon)
m-OH-BE	meta-hidroksibenzoilekgonin
miRNA	MicroRNA (MikroRNA)
MSN	Medium Spiny Neurons (Orta dikenli nöronlar)
NAc	Nucleus accumbens (Nükleus akümbens)
NBE	Norbenzoilekgonin
NDMA	N-metil-d-aspartat
ncRNA	Non-coding RNA (Kodlamayan RNA)
NMDAR	NMDA Receptor (NMDA reseptör)
NEDME	Norekgonidin metil ester
NEME	Norekgonin metil ester
NGS	Next Generation Sequencing (Yeni nesil dizileme)
NCOC	Norkokain

PChE	Psödokolinesteraz
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PFC	Prefrontal cortex (Prefrontal korteks)
PUD	Polysubstance Use Disorder (Çoklu madde kullanım bozukluğu)
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction (Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
RISC	RNA-induced silencing complex (RNA kaynaklı susturma kompleksi)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonükleik asit)
RNAz	Ribonükleaz
ROC	Receiver operating characteristic (Alıcı işlem karakteristiği)
SAMSHA	Substance Abuse and Mental Health Services Administration (Madde Bağımlılığı ve Ruh Sağlığı Hizmetleri İdaresi)
SUD	Substance use disorder (Madde kullanım bozukluğu)
SIRT1	Sirtuin 1
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime (Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi)
VMAT	Vesicular monoamine transporter (Veziküler monoamin taşıyıcısı)
VTA	Ventral tegmental area (Ventral tegmental alan)
WGCNA	Weighted correlation network analysis (Ağırlıklı ekspresyon ağı analizi)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ÖZET

Kokain Kullanım Bozukluğu Olan Erkek Bireylerde Periferik Kandaki miRNA

Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması

Birçok hayvan ve hücre çalışması mikroRNA'ların kokain, alkol, eroin ve metamfetamin bağımlılığı dahil olmak üzere psikotrop madde bağımlılıklarının gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli roller oynadığını göstermiştir. Uluslararası literatürde kokain kullanım bozukluğunun, insan periferik kanında mikroRNA düzeyindeki etkisini araştıran bilimsel çalışmaların sınırlı sayıda olduğu gözlenmektedir. Bununla birlikte, ülkemizde mikroRNA'ların kokain bağımlılığı üzerine periferik kanda potansiyel biyobelirteçler olarak rolü henüz keşfedilmemiştir. Bu bağlamda, bu çalışma kokain bağımlılarının periferik tam kanında yer alan bazı mikroRNA'ların (miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p) ifadelerindeki değişimi saptayarak, kokain bağımlılığı düzenlenmesinde rol oynayabilecek aday mikroRNA'ları tanımlamayı hedeflemiştir. Bu çalışma, uluslararası literatüre göre kokain bağımlısı insan periferik kanında ilgili mikroRNA'ların analizinin yapıldığı ilk çalışmadır.

Bu çalışmada, kokain bağımlısı olan 12 erkek birey bağımlı grubunu, kokain bağımlılığı tedavisi gören 11 birey tedavi grubunu ve herhangi bir madde bağımlılığı olmayan 16 sağlıklı birey kontrol grubunu oluşturmaktadır. Bağımlı ve tedavi grubu bireylerine ait kan örnekleri Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği'ne tedavi edilmek üzere başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü bireylerden toplanmıştır. Bireylerden alınan periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra ters transkriptaz ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. MikroRNA'ların ifadelerindeki değişim kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile belirlenmiştir. $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne göre mikroRNA ekspresyon düzeylerindeki “fold change” (kat değişimi) değeri belirlenmiştir. İstatistiksel

analizlerde mikroRNA'ların ekspresyonu için ΔC_t değerleri üzerinden analizler yapılmıştır. Bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında aday mikroRNA'ların ΔC_t değerleri açısından fark olup olmadığı One-way ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Post-hoc test olarak LSD testi ya da Tamhane's T2 testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Periferik kan mikroRNA'larının tanısal yeterliliğini değerlendirmek için ROC analizi yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmanın sonucunda, bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında yalnızca miR-132-3p ($p=0,003$) ve miR-134-5p'nin ($p=0,020$) ΔC_t değerleri açısından anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında sırasıyla miR-9-5p ($p=0,012$), miR-26b-5p ($p=0,009$), miR-132-3p ($p=0,026$) ve miR-134-5p'nin ($p=0,023$) ΔC_t değerleri açısından anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Tedavi grubu ile kontrol grubu arasında, yalnızca miR-9-5p ($p=0,019$) ve miR-26b-5p'nin ($p=0,024$) ΔC_t değerleri açısından anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. Yapılan ROC eğrisi analizleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bağımlı grubunda miR-132-3p için AUC değeri 0,778; miR-134-5p için AUC değeri 0,744 ile anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar miR-132-3p ve miR-134-5p'nin kokain bağımlısı olan bireylerde tanıda etkili yardımcı parametreler olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla birlikte gelecekte benzer bulguların başka çalışmalarla ortaya konması durumunda, özellikle kokain bağımlılığı patolojisinde rol oynayabilecek mikroRNA'ların tespit edilmesi ve bu mikroRNA'ların kokain bağımlılığının tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: kokain, kokain bağımlılığı, mikro RNA, periferik kan, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

SUMMARY

Investigation of miRNA expression levels in peripheral blood of males with cocaine use disorder

Many animal and cell studies have shown that microRNAs play important roles in the development and progression of drug addictions, including addiction to methamphetamine, cocaine, alcohol, and heroin. In the international literature, it is observed that there are a limited number of scientific studies investigating the effect of cocaine use disorder on microRNA level in human peripheral blood. However, the role of microRNAs as potential biomarkers in peripheral blood on cocaine addiction has not yet been discovered in our country. In this context, this study detected changes in the expression of some microRNAs (miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p, and miR-134-5p) in the peripheral whole blood of cocaine addicts, which may play a role in the regulation of cocaine addiction aimed to identify candidate microRNAs. According to the international literature, this study is the first to analyze relevant microRNAs in the peripheral blood of cocaine addicted humans.

In this study, 12 male individuals who were addicted to cocaine constituted the addict group, 11 individuals who were being treated for cocaine addiction constituted the treatment group and 16 healthy individuals without any substance addiction constituted the control group. Blood samples of dependent and treatment group individuals were collected from volunteers who applied to the Anatolia Clinic of Balıklı Rum Hospital for treatment and agreed to participate in the study. After isolation of total RNA from peripheral blood samples obtained from individuals, cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase. The change in the expression of microRNAs was determined by the quantitative real-time PCR method. The “fold change” value in microRNA expression levels was determined according to $2^{-\Delta\Delta CT}$. In statistical analyses, analyzes were made based on ΔCt values for the expression

of microRNAs. One-way ANOVA test was used to analyze whether there was a difference in ΔCt values of candidate microRNAs between dependent, treatment and control groups. LSD test or Tamhane's T2 test was used as post-hoc test. In all analyses, $p < 0.05$ was considered statistically significant. ROC analysis was used to assess the diagnostic adequacy of peripheral blood microRNAs.

At the end of the study, it was determined that there was a significant difference between the dependent group and the treatment group only in terms of ΔCt values of miR-132-3p ($p=0.003$) and miR-134-5p ($p=0.020$). There was a significant difference between the dependent group and the treatment group in terms of ΔCt values of miR-9-5p ($p=0.012$), miR-26b-5p (0.009), miR-132-3p ($p=0.026$) and miR-134-5p ($p=0.023$), respectively. There was a significant difference between the treatment group and the control group only in terms of ΔCt values of miR-9-5p ($p=0.019$) and miR-26b-5p (0.024). When the ROC curve analyses were compared with the control group, the AUC value for miR-132-3p was found to be 0.778 and the AUC value for miR-134-5p was found to be 0.744 in the dependent group. These results suggest that miR-132-3p and miR-134-5p can be used as effective diagnostic parameters in individuals with cocaine addiction.

With the results obtained in this study, it is thought that if similar findings are demonstrated by other studies in the future, microRNAs that may play a role in the pathology of cocaine addiction may be identified and these microRNAs may be a potential target in the treatment of cocaine addiction.

Keywords: cocaine, cocaine addiction, micro RNA, peripheral blood, quantitative real time polymerase chain reaction

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1868 yılında Friedrich Miescher'in nükleik asitleri keşfetmesinin ardından DNA ve RNA'nın, hücrenin düzgün çalışması için gerekli bilgileri içeren genetik kod olduğu anlaşılmıştır. Bu keşifleri takip eden yıllarda hiçbir kodlama özelliğine sahip olmayan birçok yeni RNA türünün de ortaya çıkarılması, çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde yeni bir yol haritası yaratmıştır. Ancak RNA, yapısı gereği nispeten kararsızdır ve dokuya özgü bir şekilde bozunmaya karşı oldukça duyarlıdır. Bu durum, RNA stabilitesini arttırıcı yönde gelişmelere ve RNA moleküllerinin hedef dışı etkilerini önlemek için nanopartiküller gibi yeni ilaç dağıtım mekanizmalarının geliştirilmesine yol açmıştır. RNA bazlı tedavilerdeki mevcut gelişmeler, patolojiyi düzelterek birçok insan hastalığının ve bozukluğunun tedavi edilmesi ve önlenmesinde büyük umut vaat etmektedir (1).

Madde kötüye kullanımı ve madde kullanım bozuklukları her yıl milyonlarca insanı doğrudan etkilemekte; yaşam kalitesinin düşmesine, sağlığın bozulmasına ve ölüme neden olmaktadır. Bununla birlikte, madde kötüye kullanımı topluma büyük ekonomik ve kamu güvenliği sorunları getirmektedir (2). Madde bağımlılığının mekanizmasının aydınlatılmasında, önlenmesi ve tedavisinde halen zorluklar yaşanmaktadır (3). Bağımlılık yapan maddelerin uzun süreli alımının gen ekspresyon profilini modüle ettiği, beynin ödül mekanizması ve hafıza ile ilgili bölgelerinde patolojik nöroadaptasyona yol açtığı bilinmektedir (4).

Kodlamayan RNA (non-coding RNA, ncRNA)'ların, uyuşturucu bağımlılığında yer alan genlerin anormal ifadesinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir. ncRNA'lar, insanlarda birçoğunun hücre tipine özgü bir şekilde transkribe edildiği merkezi sinir sisteminde bol miktarda eksprese edilir (5). ncRNA'ların, hücre döngüsünün düzenlenmesi, farklılaşma, sinyal iletimi, apoptoz, sinaptik plastisite ve DNA hasarına yanıt verme de dahil olmak üzere tüm süreçlerde gen ekspresyonunun inhibisyonunu veya aktivasyonunu modüle ederek birçok

hücrel sürecin belirlenmesinde farklı roller oynadığı giderek daha belirgin hale gelmektedir (6,7). Madde kullanım bozukluğu dahil nöropsikiyatrik bozukluklarda, beyindeki ncRNA ekspresyonundaki değişiklikler hastalık patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir ve birçok ncRNA, merkezi sinir sistemi hastalık modellerinde fonksiyonel olarak incelenmiştir (5). Madde kullanım bozukluğu üzerine yapılan araştırmaların çoğunun mikroRNA'lara (microRNA, miRNA) odaklandığı görülmüştür.

ncRNA'ların periferik profillerini araştıran çalışmalar, miRNA'ların gen ekspresyonunu düzenlediklerini ve potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceklerini göstermiştir. Uluslararası literatürde yakın zamanda yapılan üç farklı çalışmada sırasıyla kokain, eroin ve metamfetamin kullanım bozukluklarında miRNA'ların periferik profilleri araştırılmıştır (8-10). Ancak ülkemizde, insanlarda periferik miRNA düzeylerinde kokain kullanım bozukluğunun (Cocaine use disorder, CUD) etkisini araştırmak için herhangi bir çalışma yapılmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmanın iki amacı bulunmaktadır: Birincisi bu çalışmada, özellikle kokain bağımlılığı ile periferik kandaki miRNA ilişkisinin daha önce hiç araştırılmadığı gözlenen miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p, and miR-134-5p'nin ifadelerindeki değişimi saptayarak kokain bağımlılığı patogenezinde rol oynayabilecek aday miRNA'ların tanımlanmasıdır. Çalışmada, bu miRNA'ların ifadelerindeki değişimin kokain bağımlılığının gelişimindeki etkilerinin, kokainin davranışsal etkisine olabilecek katkılarının ve bu miRNA'ların bir biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılamayacaklarının belirlenmesi hedeflenmiştir. İkinci amacı bu çalışmada, kokain kullanım bozukluğu olan erkek bireylerde uygulanacak tedavi/tedaviler sonrasında miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p, and miR-134-5p ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin ölçülerek uygulanan tedavinin/tedavilerin etkinliği ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Bu çalışma ile gerek dünyada gerekse ülkemizde kokain kullanım bozukluğu olan erkek bireylerin periferik miRNA profilleri ilk defa araştırılmıştır. Bu çalışma ile kokain bağımlılığı

tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin miRNA'ların ekspresyon profillerine etkisi ilk defa bu çalışma ile toplumumuz için belirlenmiştir. Bu çalışmada, kokain bağımlılığı tedavisinde önerilen tedavi aracı ve yönteminin miRNA düzeyleri üzerine etkilerinin ortaya çıkarılması, tedavi öncesi ve sonrası miRNA değişimlerinin ortaya konularak tedavinin olası çalışma prensipleri ile ilgili bilgi verebilecek veya tedavi yanıtını öngörmede yardımcı olabilecek "biyobelirteç adayı miRNA'ların" tespit edilmesini de sağladığı düşünülmektedir.

Hızla gelişen biyoinformatik ve veri madenciliği teknolojileri, yüksek riskli bireysel tarama, teşhis, sınıflandırma, prognostik ve nüks tahminine katkıda bulunan psikiyatrik hastalıklarla ilişkili biyobelirteçleri belirlemek için yaygın olarak uygulanmaktadır (11). Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda, uzun süreli madde kullanımının protein kodlayan genlerin ve miRNA'lar dâhil olmak üzere küçük düzenleyici RNA'ların anormal ekspresyonlarına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ile kokain bağımlılığında bir biyobelirteç belirlenmesi ve patogenezin anlaşılmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir. miRNA'ların çeşitli hastalıkların tedavisinde umut verici terapötik bir yaklaşım olmasını ve bağımlılık tedavisinde kullanılan ilaçların sınırlı sayısını göz önünde bulundurarak; benzer bulguların başka çalışmalarla ortaya konması durumunda bu çalışmada gen ifadesi araştırılacak olan aday miRNA'ların kokain bağımlılığının tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, gelecekteki terapiler için ilaçları yeniden konumlandırmada, bu çalışmadan elde edilen gen ekspresyonu verilerinin kullanılması ile CUD tedavilerinin geliştirilmesi için yeni bir yaklaşım sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın hipotezleri aşağıda sıralanmıştır:

H1: Periferik kanda miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p miRNA ekspresyon düzeyleri açısından bağımlı hasta grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır.

H2: Periferik kanda miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p miRNA ekspresyon düzeyleri açısından bağımlı hasta grubu ile bağımlılık tedavisi gören grup arasında fark vardır.

H3: Kokain bağımlılığı tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p miRNA'larının ekspresyon profillerine etkisi vardır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kokain

Aymara halkı, Güney Amerika'nın And Dağları ve Altiplano bölgelerinde yaşayan yerli nüfustur. Modern “koka” kullanımının kökeni, Aymaraca “ağaç” veya “bitki” anlamına gelen “khoka” kelimesine dayanmaktadır. Güney Amerika, Meksika, Endonezya ve Batı Hint Adaları'na özgü olan koka bitkisi 1-2 metre boylarındadır. Yaprakları koyu yeşil renkte, çiçekleri yeşil-beyaz renkte, meyveleri ise kabuklu ve kırmızı renktedir (12-14). Güney Amerika'nın en eski kültür bitkilerinden biridir. Yetiştirilen koka bitkileri, *Erythroxylum* cinsinin (Erythroxylaceae familyası) *Erythroxylum coca* Lam. ve *Erythroxylum novogranatense* (Morris) Hieron olmak üzere iki farklı türüdür. “Bolivian” veya “Huanuco” koka olarak da bilinen *E. coca* Lam. var. *coca* aynı zamanda en iyi bilinen çeşittir ve hem yasal kullanımlar hem de kokainin yasadışı üretimi için And bölgesinde yaygın olarak yetiştirilmeye devam etmektedir. Diğer çeşitleri daha küçük alanlarda bulunur ve çoğunlukla koka yapraklarını çiğnemek veya yerel halklar tarafından diğer geleneksel kullanımlar için yetiştirilmektedir. Kokain, koka bitkisinin yapraklarından elde edilen ve doğal olarak oluşan bir alkaloiddir. Bu yaprakların yaklaşık % 0,1 ile % 0.8 arasında kokain içerdiği bilinmektedir (12). Koka bitkisi *Erythroxylum coca* Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1: *Erythroxylum coca* (15).

2.1.1. Kokainin tarihsel gelişimi

Kokainin hikayesi oldukça eskiye dayanmaktadır. M.Ö. 5000 yılında Arkeolog Ronald K. Siegel tarafından bulunan çanak çömlek parçası, bu dönemde gerçekleşen bir olayda koka yaprağının kullanımını tasvir etmektedir. M.Ö. 3000 yılında Güney Amerika yerlileri tarafından açlık hissini köreltmek ve yorgunluklarını gidermek için koka bitkisinin yaprakları çiğnenerek tüketilmiştir (16). Bu dönemde ayrıca mumyalama ve lokal anestezik olarak kullanılmıştır. Kokain ilk olarak 1855 yılında Alman kimyager Friedrich Gaedcke tarafından koka yapraklarından izole edilerek elde edilmiştir. Gaedcke elde ettiği alkaloidi "eritroksilin" olarak isimlendirmiştir. 1860 yılında Albert Niemann eritroksilini saflaştırarak ilk kez saf formda kokaini sentezlemiştir. 1863 yılında bir kimyager olan Angelo Mariani, Vin Mariani olarak isimlendirdiği ve içerisinde kokain olan şarabı piyasaya sunmuştur. Viyanalı nörolog Sigmund Freud, 1884 yılında kokainin fizyolojik etkileri ve potansiyel terapötik kullanımlarına ilişkin açıklamasını “Uber Coca” başlıklı makalesinde yayınlamıştır. Aynı yıl içerisinde göz doktoru Carl Koller, katarakt ameliyatında lokal anestezik olarak kokain hidroklorür solüsyonunu kullanmış ve büyük bir başarı elde etmiştir. 1886 yılında John Pemberton kokain-kafein karışımı ferahlatıcı bir içecek olan Coca Cola’yı üretmiştir. 1900 yılına gelindiğinde kokain, Vin Mariani'nin başarısından sonra sevilen bileşeni olmaktan çıkıp birçok insanı bağımlılığa mahkum eden korkulan bir uyuşturucuya dönüşmüştür (15). Amerika Birleşik Devletleri'nde, 20. yüzyılın başında nüfusun %5'inin kokain, eroin veya morfinden bir veya daha fazlasına bağımlı olduğu tahmin edilmiş ve çoğunluğunun, iyi niyetli doktorlar tarafından ilaç reçete edilen kırsal kesimden, orta sınıftan beyaz kadınlar olduğu bildirilmiştir. Kokain içeren ürünlerin tıbbi kullanımının hem Birleşik Krallık'ta hem de Amerika Birleşik Devletleri'nde bir bağımlılık salgınıyla sonuçlanması ve tıbbi prosedürler sırasında kokain zehirlenmesi vakalarının sayısının artmasıyla birlikte kokainin düzenlenmesi kaçınılmaz bir gereklilik haline gelmiştir. Birleşik Krallık'ta kokain içeren ürünlerin

etiketlenmesi ve satışı ilk olarak 1908 tarihli Zehirler ve Eczacılık Yasası kapsamında düzenlenmiştir. Birinci Dünya Savaşı sırasında askerlerin kokain bulundurması ve satışından duyulan endişe üzerine 1916 yılında yasa dışı kokain bulundurulmasını engellemek için Defence of the Realm Yasası çıkarılmıştır. 1920 yılında Tehlikeli İlaçlar Yasası kokainin üretimini, ithalatını, ihracatını, bulundurulmasını, satışını veya dağıtımını lisanslı kişilerle sınırlandırmıştır. Tehlikeli Uyuşturucu Yasası'nın kabul edilmesinin ardından Birleşik Krallık'ta kokain kullanımı, sonraki yaklaşık 60 yıl boyunca başarılı bir şekilde düşük bir seviyede tutulmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde kokaine erişimin kısıtlanması, sağlık hizmetlerinin federal yetki yerine eyaletlerin yetki alanına girmesi nedeniyle daha da karmaşık bir hal almıştır; bu da kokaine erişimi kontrol altına alacak ulusal bir yasanın, sağlık hizmetlerine federal müdahaleye izin verecek bir anayasa değişikliği gerektireceği anlamına gelmiştir. Uyuşturucu kontrolüne yönelik ilk federal adım 1906 tarihli Saf Gıda ve İlaç Yasası olmuştur. Bu yasa, sahte ilaç reklamlarını azaltarak uyuşturucu kullanımını azaltmaya hizmet eden, katkılı veya yanlış etiketlenmiş ürünlerin satışını yasaklamıştır. Ancak, kokain gibi tehlikeli uyuşturucuları yasaklamamış, hatta kokain bulundurulmasını ve satışını bile kısıtlamamıştır. Kokain satışının eczacılar ve doktorlar aracılığıyla sınırlandırılmasındaki başarı nihayet 1914 tarihli Harrison Vergi Yasası ile elde edilmiştir. 1970'lerde kokain yeniden ortaya çıktığında, freebase kokain kullanımı; 1970'lerin sonunda da crack (taş) kokain kullanımı ABD'de başlamıştır. 1980'lerin sonlarında, kokain ticaretinin Batı Yarımküre'ye hakim olmasıyla birlikte uluslararası uyuşturucu kaçakçılığı örgütleri daha da güçlenmiştir. 1985'te, crack salgını ABD'yi tüm gücüyle vurmuş ve birçok ABD şehrinde rakip gruplar ve crack kullanıcıları arasında çatışmaların artmasına neden olmuştur. 1989 yılına gelindiğinde, ABD'de uyuşturucu salgını halen devam ederken, uyuşturucu bağımlılığı ülkenin karşı karşıya olduğu en önemli sorun olarak görülmüştür (17). 2012 yılında kokainin dünya çapında yaklaşık 17 milyon kişi tarafından kullanıldığı bildirilmiştir (18). Bugüne

bakıldığında, yüksek rehabilitasyon maliyetleri, nispeten sık görülen aşırı doz ve ölümler, hileli ve çoklu uyuşturucu kullanımından kaynaklanan sağlık komplikasyonları ile 21. yüzyılda kokain, dünya çapında sağlık sistemleri üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır (19).

2.1.2. Kokain eldesi

Koka bitkisinin yaprakları, koka türüne ve çeşidine bağlı olarak % 0,1 ile 0,8 arasında kokain içermektedir (12). İlk üretim sürecinin yanı sıra tedarik zinciri boyunca atılan adımların tümü farklı kokain türleri yaratmaktadır. Koka işleme üç aşamaya ayrılmaktadır. Birincisi koka yaprağının koka macununa dönüştürülmesi olup, bu işlem koka yapraklarının taşınmasını azaltmak için neredeyse her zaman koka tarlalarının çok yakınında yapılmaktadır. İkinci aşama, koka macununun kokain bazına dönüştürülmesidir. Kolombiya'da bu aşama genellikle atlanmakta ve süreç doğrudan macundan kokain hidroklorüre doğru ilerlemektedir. Son aşama ise bazın kokain hidroklorüre dönüştürülmesidir.

Yaprakları macuna dönüştürme işlemi genellikle birkaç gün sürmektedir. Yapraklara alkali bir madde (sodyum karbonat) ve su eklenir. Burada alkali madde, yaprakta bulunan kokain alkaloidinin kerosene ekstrakte edilmesini sağlar. Suyu karışmayan bir çözücü (kerosen) suya, çözeltiye ve yapraklara eklenir. Daha sonra karışım çalkalanır. Çözücü, suda çözünmeyen kokain alkaloidlerini alkali çözeltiden çıkarmak için hareket eder. Kokain alkaloidleri ve kerosen sudan ve yapraklardan ayrılır. Daha sonra su ve yapraklar boşaltılır. Kokain alkaloidleri kerosenden seyreltik bir asit çözeltisi içine ekstrakte edilir. Kalan çözeltiye alkali madde (sodyum karbonat) eklenir ve bu da bir çökelti oluşmasına neden olur. Asit ve su boşaltılır ve çökelti süzülüp kurutularak koka macunu elde edilir, bu macun kirli beyaz- açık kahverengi, macun benzeri bir maddedir.

Koka macununun kokain bazına dönüştürülmesi, macun üretiminden daha karmaşıktır ve daha gelişmiş ekipman ve ilave beceriler gerektirir. Kokain bazı macun tesisinde işlenebilir, ancak baz laboratuvarları koko yetiştirme bölgelerinden uzakta bulunabilir. Koka macunu sülfürik asit veya hidroklorik asit ve suya eklenir. Macun asit çözeltisi içinde çözülür. Potasyum permanganat su ile birleştirilir. Bu karışım koka macununa ve asit çözeltisine eklenir. Potasyum permanganat bu adımda diğer alkaloidleri ve nihai üründe istenmeyen maddeleri ayıklamak için kullanılır. Bu karışımın yaklaşık altı saat beklemesine izin verilir. Çözelti süzülür ve çökelti atılır. Filtrelenen çözeltiye amonyaklı su eklenir ve başka bir çökelti oluşur. Sıvı çözeltiden boşaltılır ve kalan çökelti genellikle ısıtma lambaları ile kurutulur. Elde edilen toz, kokain bazıdır. Kolombiya'da kokain işlemenin temel aşamasını atlamak ve koka macunundan kokain hidroklorüre geçmek yaygındır.

Kokain işlemenin son aşaması, daha fazla beceri ve ekipman gerektirir ve daha önce bahsedilen adımlardan çok daha tehlike arz etmektedir. Kokain bazını çözmek için aseton veya eter eklenir ve istenmeyen maddeleri uzaklaştırmak için çözelti filtrelenir. Aseton veya eter içinde seyreltilmiş HCl kokain çözeltisine eklenir. HCl ilavesi kokainin çözeltiden kokain hidroklorür (tuz) olarak çökmesine (kristalleşmesine) neden olur. Kalan aseton/eter çözücü atılabilir veya yeniden kullanılabilir. Kokain hidroklorür ısı lambaları altında kurutulur, fanlar yardımıyla kurumaya bırakılır veya mikrodalga fırınlarda kurutulur. Kokain hidroklorür, kokainin toz haline getirilmiş halidir. Sonuç olarak, beyaz kristaller halinde görünen, neredeyse kokusuz kokain tuzu elde edilir (20).

Kokain tuzunun sigara gibi içilebilmesi için kokain bazının serbest baz kokain ya da crack (taş) kokain olmak üzere iki formundan birine dönüştürülmesi gerekmektedir. Serbest baz (freebase) kokaini için kokain hidroklorür suda çözüldükten sonra üzerine amonyak eklenir. Ardından eter ya da benzer bir çözücü ilave edilerek çözülür. Burada karışım iki katmana ayrılır. Çözücü içinde çözülmüş olan kokain içeren üst katmandan çözücü

buharlaştırılır ve saf kokain kristalleri elde edilir. Crack, kokain hidroklorürün suda çözülmesi, ardından çözeltiye sodyum bikarbonat veya amonyak gibi zayıf bir bazın karıştırılmasıyla hazırlanır. Bu daha sonra tüm çökelmiş kokain bazı yağlı bir tabaka halinde eriyene kadar kaynatılır, bu da oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşir. Çözelti soğudukça, kokain baz yağı haznenin alt kısmında katılaşır ve bir bıçak ucu gibi bir aletle geri kazanılır. Su atılır ve crack kokain kuru katısı elde edilir (21).

2.1.3. Kullanım yolları

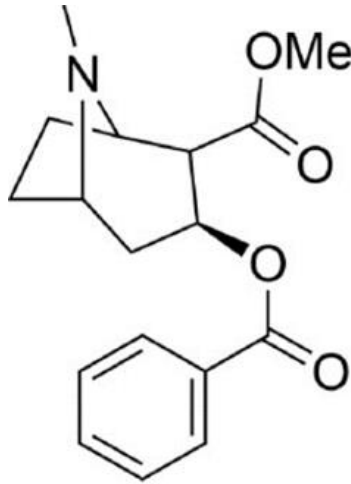
Toz kokain genellikle burundan çekilerek (intranazal kullanım) veya suda eritilip damara enjekte edilerek (intravenöz kullanım) kötüye kullanılmaktadır. Toz kokaini burundan çektiklerinde, kokain tozunu burun deliklerinden çekerler ve kokain burun dokuları yoluyla kan dolaşımına karışır. Kokainin suda eritilmesi ve enjekte edilmesi (intravenöz kullanım) uyuşturucuyu doğrudan kan dolaşımına bırakır ve etkilerinin yoğunluğunu artırır. Kokain bazı, toz kokainden üretilir ve sigara gibi içilerek kullanılır. Kullanıcılar kokain içtiğinde (inhalasyon), kokain buharını veya dumanını akciğerlere çekerler; burada kan dolaşımına emilim neredeyse enjeksiyonla olduğu kadar hızlıdır (13).

Kokainin yarattığı etkiler büyük ölçüde kokainin merkezi ve çevresel sinir sistemlerine ne miktarda ve ne kadar hızlı ulaştığına bağlıdır. Genel olarak, sigara gibi içilen kokain beyne 20 saniye içinde ulaşır; etkileri yaklaşık 30 dakika sürer. Damardan verilen kokain beyne bir dakika içinde ulaşır; etkileri de yaklaşık 30 dakika boyunca devam eder. İntravenöz uygulama, sigara gibi içilen kokaine göre daha fazla biyoyararlanımla sonuçlanır. İntranazal olarak uygulanan kokainin başlangıcı daha yavaştır. Maksimum psikotropik etkiler 20 dakika içinde, maksimum fizyolojik etkiler ise 40 dakika içinde hissedilir. İntranazal olarak uygulanan kokainin etkileri, en yüksek etkilere ulaşıldıktan sonra genellikle yaklaşık 60 dakika sürer. Burundan çekilen kokain miktarının yalnızca yaklaşık % 30-60'ı biyolojik olarak kullanılabilir. Kokain kullanıcılarının en yaygın olarak kullandıkları kokain türü serbest

bazdır. Eter oldukça uçucu ve yanıcı bir solvent olduğundan, serbest baz kokain eterin tamamen buharlaşmadan önce içilmesi durumunda tutuşması veya patlaması tehlike yaratabilir (22).

2.1.4. Kokainin fizikokimyasal özellikleri ve tanımlamaya yönelik analitik yöntemler

Kokainin IUPAC'a göre sistematik adı "metil (1R, 2R, 3S, 5S)-3-(benzoiloksi)-8-metil8-azabisiklo[3.2.1]oktan-2-karboksilat"tır. Kokain zayıf bazik özelliklere sahip bir tropan alkaloididir. Kokainin genel yapısı Şekil 2'de gösterilmiştir. Serbest baz formunda kokain birleşiktir ve sulu ortamda çözünmez, kaynama noktası 187 °C'dir. İyonize hidroklorür tuzu ise suda kolayca çözülür ve çok yüksek sıcaklıklarda yüksek stabilite gösterir. Bu nedenle dumanda buharlaşmaz, sigara ile içmeye uygundur. Kokainin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden bazıları Tablo I'de özetlemektedir.



Şekil 2: Kokainin yapısı (15).

Tablo I: Kokainin fiziksel ve kimyasal özellikleri (13).

Özellikler	Kokain Hidroklorür	Serbest Baz Kokain
Molekül Formülü	C ₁₇ H ₂₂ ClNO ₄	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄
Mol Ağırlığı (g/mol)	339,8 g mol ⁻¹	303,35 g mol ⁻¹
Kaynama noktası	-	187°C
Erime Noktası (°C)	195°C	98 °C
Sudaki Çözünürlüğü	2 g/mL	1,7 × 10 ⁻³ g/mL
pKa; pKb (15 °C'de)	-	8.61; 5.59

Kokain için en çok kullanılan tespit yöntemlerinden biri, test edilen kan ve idrar gibi biyolojik matrikste uyuşturucu maddenin kalitatif bir varsayımsal değerlendirmesini sağlayabilen ve hızlı bir yöntem olan immünoassaylerdir. Ancak, bu tür testler belli ölçüde yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlara maruz kaldığından, daha sonra doğrulayıcı bir kantitatif yöntem kullanılması gerekmektedir. Kokain hem biyolojik hem de biyolojik olmayan matrikslerde kromatografik yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Literatürde kokain ve metabolitlerinin insan idrar örneklerinin yanı sıra kan/plazma veya saç örneklerinde de tespit edilebilmektedir (13). Kromatografik teknikler çok spesifik olmakla birlikte, yanlış pozitifleri ve yanlış negatifleri en aza indirmek; çok hassas olup, düşük uyuşturucu düzeylerini bile tespit edebilmektedir. Kokain ve benzoilekgonin (BE) sınır konsantrasyonları, Madde Bağımlılığı ve Ruh Sağlığı Hizmetleri İdaresi (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, SAMSHA) tarafından başlangıç testi ve doğrulama testi için sırasıyla 150 ng/mL ve 100 ng/mL olarak tanımlanmıştır (23).

Literatürde insan idrarının analizi için kütle spektrometresi ile birleştirilmiş gaz kromatografisi (gas chromatography coupled with mass spectrometry, GC-MS) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High-performance liquid chromatography, HPLC)

arasındaki yöntemleri karşılaştıran çalışmalar benzer sonuçlar bildirmiştir. HPLC tekniğinin, numune üzerinde bir ön işlem uygulamadan direkt numune inceleme kolaylığı sağladığını; bununla birlikte analitik laboratuvarlarda giderek daha fazla kullanılan güçlü bir araç haline geldiği belirtilmektedir (13,23). Kan/plazma örneklerindeki kokain, eğer örnekler sodyum florür gibi bir psödokolinesteraz (PChE) inhibitörü ile muamele edilmezse, kendiliğinden ve enzimatik olarak metaboliti benzoilekgonine hidrolize uğrayabilmektedir. Bu nedenle, kokain içerdiğinden şüphelenilen numuneler asetik asit ile pH 5'e ayarlanmalı ve maddenin stabilitesini artırmak için 4 °C'de soğutulmalı veya dondurulmalıdır. Ancak -20 °C'de bile zaman içinde bir miktar bozulma meydana gelebileceği belirtilmektedir (13).

2.1.5. Kokainin metabolizması

Kokain kullanıcısının seçtiği kokain formu (kokain tuzu veya serbest baz), uygulama yolu ve kullanım kalıpları farklılık göstermektedir. Kokain hidroklorür, hidrofilikliği nedeniyle genellikle “burundan çekilerek” tüketilmektedir. Crack kokain, genellikle sigara şeklinde içilen tek kokain şeklidir; bunun nedeni, kokain hidroklorürün yüksek kaynama noktasına sahip olması ve yanma sıcaklıklarında buharlaşmamasıdır. Solunum sistemini içeren bu yollar, uyarıcının beyin dolaşımına yaklaşık 6-8 saniye içinde ulaşmasını sağladığından, kokainin her iki türü için de tercih edilme eğilimindedir. Bu da inhalasyon yolunun, intranazal uygulamaya kıyasla daha hızlı ulaşılan ve daha yüksek pik plazma konsantrasyonları sunmaktadır. İntranazal yol için, kokainin vazokonstriktif özelliklerinin kokainin kendi emilimini yavaşlattığı ve pik plazmatik konsantrasyonlarda 60 dakikalık bir gecikmeye neden olduğu unutulmaması gerekmektedir. Biyoyararlanım açısından, inhalasyon yolu %90'ı aşan en yüksek biyoyararlanım oranına sahipken, intranazal yol yaklaşık %80 orana sahiptir. Tepe etkilere ulaşma süresi ve etki süresi açısından, inhalasyon, doz alımından sonra 1-3 dakika içinde çok yüksek uyarım sağlar ve uyarım 5-15 dakika arasında sürmektedir. İntranazal yol, 15-30 dakika arasında değişen daha uzun bir etki belirlemektedir.

Kokain hidroklorürün, tozun sulu bir ortamda çözülmesi yoluyla damardan verilmesi de kullanıcılar tarafından kullanılmaktadır. İnhalasyon ve intranazal yollarla karşılaştırıldığında, kokain intravenöz olarak uygulandığında kokainin beyin dolaşımına ulaşması iki kat daha fazla zaman almaktadır; pik plazma konsantrasyonları daha yüksektir ve böylece daha hızlı ulaşmaktadır. Biyoyararlanım inhalasyon yoluna daha yakındır (13). Edward (1995) yaptığı çalışmada kokainin inhalasyon, intranazal ve intravenöz yolla sırasıyla; 42 mg crack kokain, 32 mg kokain HCl ve 25 mg kokain HCl farmakokinetiğini farklı yollar için aynı denekleri kullanarak doğrudan karşılaştıran bir çalışma yayınlamış ve en yüksek plazma konsantrasyonlarına intravenöz enjeksiyon ve inhalasyon yoluyla 5 dakika içinde ulaşılırken, intranazal yolun yaklaşık 50 dakika sürdüğü sonucuna varmıştır (24).

Kokain hidroklorür ağızdan da (oral kullanım) alınabilmekte veya ağız, vajina ya da rektum mukozalarına uygulanabilmektedir. Oral uygulamanın, daha yavaş ve düzensiz bir emilim sunarak en düşük biyoyararlanıma sahip olduğu; bu düşük derecenin de gastrik parçalanma ve bağırsak metabolizmasına neden olabileceği belirtilmektedir. En uzun etki süresinin, oral uygulama yolu ile gerçekleşmekte olduğu ve genellikle 1-2 saat arasında değiştiği gösterilmiştir.

Kokain, 1-3 L/kg arasında değişen bir dağılım hacmi ile dokulara hızlı bir şekilde atılmaktadır. Kokain, albümin ve α 1-asit glikoproteine yaklaşık %90 oranında bağlanmaktadır. En yüksek konsantrasyonlarda beyin, dalak, böbrek ve akciğerlerde bulunmakta; ardından bunu kan, kalp ve kas dokusu takip etmektedir. Kokainin ortalama yarılanma ömrü 40-90 dakika arasındadır. Bu sürenin uygulama yoluna bağlı olarak değişiklik gösterdiği; örneğin, intravenöz yol için daha kısa; insuflasyon için daha uzun olduğu belirtilmektedir.

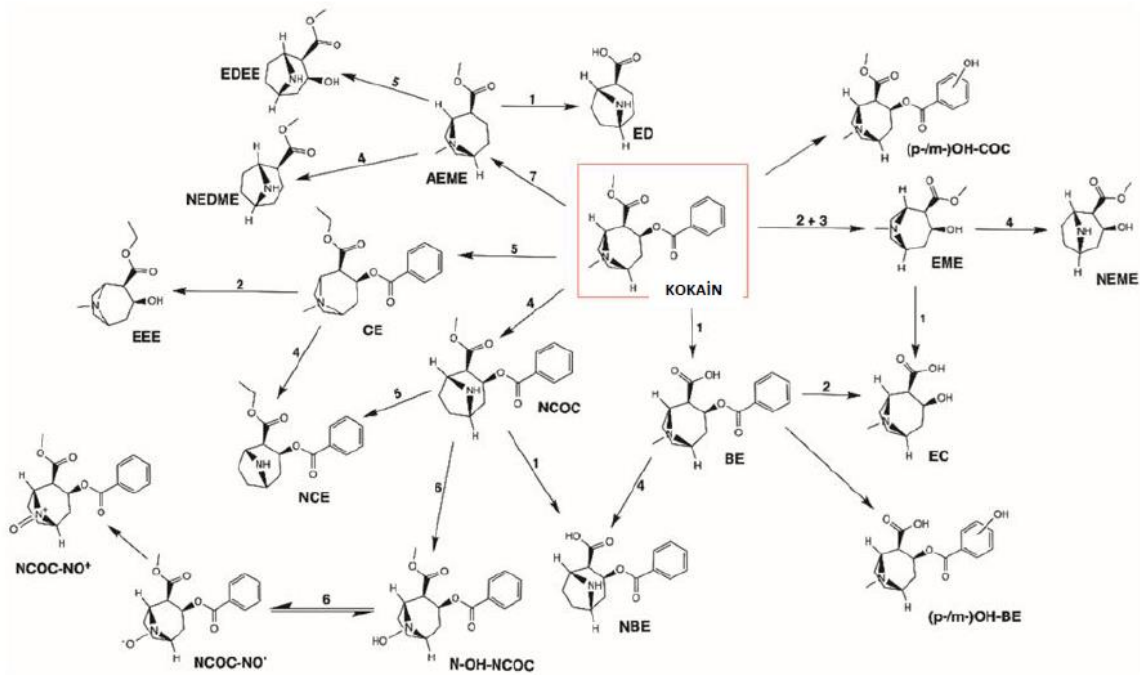
Koka yaprağı tüketmenin bir diğer yolu da çay demlemektir. Jenkins ve ark. (1996) poşet başına ortalama, Bolivya'ya özgü yapraklar içinde 4.86 mg ve Peru'ya özgü yapraklar içinde 5.11 mg kokain içeren çay poşetleri demlendiğinde sırasıyla; 4.29 mg ve 4.14 mg kokain içeren çaylar ürettiğini bildirmiştir (13).

Kokain, ekgonine (EC) daha fazla hidrolize uğrayabilen BE ve ekgonin metil ester (EME) olmak üzere iki ana metabolit üretmektedir. EME, sırasıyla psödokolinesteraz (PChE) ve karboksilesteraz tip 2 (hCE₂) etkisiyle plazmada ve karaciğerde oluşan farmakolojik olarak inaktif bir metabolittir. Tüm uygulama yolları için kokainin diğer önemli inaktif metaboliti olan BE, fizyolojik pH'da kendiliğinden veya karaciğerde hCE₁ tarafından oluşturulabilmektedir. Kokain ayrıca sitokrom P450 (CYP) enzimi CYP3A4 tarafından N-demetilasyonuna uğrayarak kan-beyin bariyerini (BBB) geçebilen oldukça hepatotoksik bir metabolit olan norkokain (NCOC) oluşturabilmektedir. NCOC, emilen kokainin yaklaşık %5'ini oluşturmakta ve daha güçlü bir lokal anestezi ve beyin sinaptozomları tarafından noradrenalin alımını inhibe etmede ana ilaçtan daha etkili olarak tanımlanmıştır. BE ve EME, CYP tarafından daha fazla N-demetilasyonuna uğrayarak sırasıyla norbenzoilekgonin (NBE) ve norekgonin metil ester (NEME) üretebilmektedir. İlave minör metabolitler meta-hidroksibenzoilekgonin (m-OH-BE), para-hidroksibenzoilekgonin (p-OH-BE), meta-hidroksikokain (m-OH COC), ekgonidin (ED) ve norekgonidin metil esterdir (NEDME). Kokainin metabolik yolları Şekil 3'te özetlenmektedir.

Özellikle kokain ve alkolün birlikte tüketilmesi, her iki ilacın transesterifikasyon ürünü olan kokaetilen oluşumuna yol açmaktadır. Kokaetilen in vivo olarak sadece hCE₁ tarafından kataliz yoluyla üretilmektedir. Harris ve ark. (2003) yaptığı çalışmada, 10 insan deneğe kokain alımından 1 saat önce intravenöz kokain (0,3, 0,6 ve 1,2 mg/Kg) ve tek bir oral doz etanol (1 g/Kg) verilen bir çalışma gerçekleştirmiştir. Kokaetilen, kokaine göre daha uzun

ortalama yarılanma ömrüne (148 ± 15 dakika) sahip, farmakolojik aktivite gösteren aktif bir metabolittir.

Kokain ve ana metabolitleri metabolizmanın ardından idrarla atılmaktadır. EME ve BE, uygulama yoluna bakılmaksızın (intravenöz, inhalasyon ve intranazal) başlıca atılım ürünlerini oluşturmaktadır (13).



Şekil 3: Kokainin metabolik yolları (13).

2.1.6. Kokainin etkileri ve toksisitesi

Kokainin ortalama letal dozu (LD_{50}) değeri farklı hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Farelerde intraperitoneal uygulama ile 95.1 mg/Kg; sıçanlarda ve köpeklerde intravenöz yolla sırasıyla 17.5 ve 21 mg/Kg olduğu bildirilmiştir (13).

Kokaini fazla miktarda çeken, sigara şeklinde içen veya enjekte eden bir kullanıcı, yaşamı tehdit edebilecek aşırı dozla karşılaşabilir. Kokain dozları genel olarak 30-70 mg arasında değişmektedir, ancak kullanıcılar tolerans geliştirdikçe daha fazla kullanmakta ve dozlarını 1 g'ın üzerine çıkarma eğiliminde olmaktadır. Letal kabul edilen minimum kokain dozu 1,2 gramdır, ancak kokaine aşırı duyarlılığı olan kullanıcıların 30 mg kadar düşük letal doz aşımına maruz kaldığı tespit edilmiştir. Oldukça yüksek toleransa sahip bazı nadir kullanıcıların günde 5 g kokain kullanımlarının olduğu bildirilmiştir (22).

Her ne kadar serbest baz ve crack genellikle başlangıçtaki kokain hidroklorür maddesinden daha saf olsa da, bu durum kokaini içmenin kullanıcılar için biyolojik olarak kullanılabilir hale getireceği anlamına gelmemektedir. Çünkü uyuşturucunun önemli bir kısmı sıklıkla içme cihazında ve kullanıcıların solunum yollarında tutulacak ve akciğerlere ulaşmayacaktır (25).

Bazı kokain kullanıcıları kokaini alkol ile birlikte kullanmayı tercih etmektedir. Yapılan araştırmalar, kokainin alkol ile birlikte alımının, kokaine kıyasla daha ölümcül olabileceğini; daha ağır akut toksik reaksiyonlara neden olabileceğini, ayrıca kalp atış hızında daha büyük bir artışa neden olabileceğini bildirmektedir. Kokaetilen, alkol ve kokainin birlikte kullanımı için bir biyobelirteç olarak kullanılmakta ve maddenin son kullanımını belirlemek için idrarda veya kronik maruziyet için saçta tespit edilebilmektedir.

Kokain merkezi sinir sistemini hedef alarak; kullanıcının profiline, uygulama yoluna ve doza bağlı olarak birçok fiziksel, psikolojik ve davranışsal etkiye neden olmaktadır. Nörodejenerasyon, erken beyin yaşlanması, depresyon ve kan damarları hasarı kokainin kronik tüketimi nedeniyle kullanıcılarında ortaya çıkan ciddi patolojik etkiler arasında yer almaktadır. Taşikardi, hipertansiyon, hipertermi, terleme, titreme, nöbet, midriyazis, baş ağrısı, karın ağrısı, kas hiperaktivitesi, hemorajik inme ve çoklu organ yetmezliği gibi bazı

etkiler de akut kokain kullanımı nedeniyle ortaya çıkan etkilere. Bununla birlikte, bazı kokain metabolitlerinin kan-beyin bariyerini geçme yeteneğini koruduğu ve böylece gerek arzu edilen etkilere gerekse kullanıcılar tarafından belirtilen advers/toksik reaksiyonlara katkıda bulunduğu belirtilmektedir (13).

2.2. Kokain Bağımlılığı

Amerikan Bağımlılık Tıbbı Derneği (American Society Addiction Medicine, ASAM) bağımlılığı; beyin devreleri, genetik, evre ve bireyin yaşam deneyimleri arasındaki karmaşık etkileşimleri içeren, tedavi edilebilir, kronik bir tıbbi hastalık olarak tanımlamıştır (26). Uyuşturucu ve alkol bağımlılığı en yaygın bağımlılık çeşidi olsa da bireyler; bir maddeye, bireye ya da aktiviteye bağımlı hale gelebilir. Madde kullanım bozukluğu (Substance use disorder, SUD), zararlı sonuçlarına rağmen bir maddenin kontrolsüz kullanımının olduğu karmaşık bir durumdur (27). Amerikan Psikiyatri Birliği APA'nın yayınlamış olduğu DSM-V listesinde madde kötüye kullanım bozuklukları için tanımlanan maddeler; alkol, kafein, kenevir (esrar), halusinojenler (LSD, meskalin, fensiklidin vb.), inhalanlar (uçucular), opiyatlar, sedatif-hipnotik ve anksiyolitikler (Dinginleştirici, uyutucu ve kayęı gidericiler), stimulanlar (kokain, amfetamin, ekstazi ve diğer uyarıcılar), tütün ve diğer bilinmeyen maddeler olarak belirlenmiştir (28). Kokain kullanım bozukluğu için klinik tanı, güncel versiyonu DSM-V olan Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'na dayanmaktadır (29). APA tarafından hazırlanan Madde Kullanım Bozukluklarına İlişkin DSM-V Kriterlerine göre, kullanıcılara tanının konması için 12 aylık bir süre içinde iki veya daha fazla madde kullanım bozukluğu kriterini karşılaması gerekmektedir. Bu kriterler (28) aşağıda sıralanmıştır:

- nemli sorumluluklarını yerine getirememe
- Tehlikeli durumlarda madde kullanımının tekrarlanması
- Toplumsal ve kişilerarası olumsuz etkilere rağmen kullanıma devam etme

- Tekrarlanan hukuki sorunlara rağmen kullanıma devam etme
- Amaçlanandan daha fazla veya daha uzun süre kullanma
- Kullanmak için önemli faaliyetlerden vazgeçme
- Kullanarak çok zaman harcama
- Tekrarlayan fiziksel/psikolojik sorunlara rağmen kullanımın olması
- Kalıcı, başarısız bırakma girişimlerinin olması
- Maddeye özlem-uyuşturucu kullanma konusunda güçlü dürtü veya istek duyulması

Madde kullanım bozukluğu dünya çapında bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (30). Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC) Dünya Uyuşturucu Raporu'nda (2023), son 10 yılda madde kullanımının yüzde 23 arttığı; 2021 yılında dünya genelinde 15-64 yaş aralığındaki her 17 kişiden birinin madde kullandığı ifade edilmiştir. Rapora göre, esrarın 2021 yılında 219 milyon kullanıcıyla (dünya nüfusunun yaklaşık %4'ü) küresel olarak en çok kullanılan uyuşturucu madde olarak devam ettiği bildirilmiştir. 2021'de son bir yıl içinde 36 milyon kişinin amfetamin, 22 milyon kişinin kokain ve 20 milyon kişinin ekstazi türü madde kullandığı belirtilmiştir. 2021'de dünya genelinde yaklaşık 39,5 milyon kişinin madde kullanım bozukluklarından muzdarip olduğu, ancak madde kullanım bozukluğu olan her 5 kişiden yalnızca 1'inin bağımlılık tedavisi gördüğü ve bu oranın da önceki 10 yıla göre % 45 artış gösterdiği belirtilmiştir. Raporda, 2021 yılında 13,2 milyon damar içi madde kullanıcısı olduğu ve bunların 1.6 milyonunun HIV taşıdığı bildirilmiştir. Ayrıca, madde kullanımına bağlı ölümlerin 2019 yılında yaklaşık 500.000 olduğu belirtilmekte ve bu sayının 2009 yılına göre yüzde 17,5 oranında arttığı tespit edilmiştir (19).

Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi'nin (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA) 2023 yılı yayını olan Avrupa Uyuşturucu Raporunda, kokainin Avrupa'nın en yaygın kullanılan yasa dışı uyarıcı uyuşturucusu olduğu; önceki yıl 15-64 yaş arası kişilerin yaklaşık %1,3'ünün (3,7 milyon)

tarafından kullanıldığı belirtilmiştir. Rapora göre 2021 yılında kokainin, hastane acil servislerinde akut zehirlenme başvurularıyla ilişkilendirilen en yaygın madde olduğu; vakaların ise %27'sinde belirtildiği bildirilmiştir (31).

Narkotik Suçlarla Mücadele Başkanlığı'nın yayınladığı Türkiye Uyuşturucu Raporu'nda (2023), madde bağımlılıkları için yatarak bağımlılık tedavisi gören hasta bireylerin 1.787'sinin damar içi madde kullanıcısı olduğu; bu kullanıcılarda HIV için test edilen hasta bireylerin 14'ünde (%0,8) pozitif sonuç tespit edildiği bildirilmiştir. Raporda, ülkemiz genelinde madde bağımlılığı için yatarak tedavi görenlerin cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde; %92,3'ünün erkek, %7,7'sinin kadın olduğu belirtilmektedir. Rapora göre, 2022 yılında ayaktan tedavi için başvuran kokain bağımlısı bireylerin sayısının 1.852 olduğu; yatarak tedavi gören kokain bağımlısı bireylerin sayısının 275 olduğu bildirilmiştir (32)

2.2.1. Bağımlılığın nörobiyolojisi

Bağımlılık yaratan davranışlar genellikle belirli bir uyuşturucunun denenmesiyle başlamakta ve toleransın ortaya çıkmasıyla bağlantılı olarak tekrarlanan maruz kalmalarla kullanımı artmakta; başka bir deyişle bireyin hedonik (zevk) ayar noktası artmakta ve daha önceki düşük miktarların ürettiği yüksek seviyeye ulaşmak için artan miktarda uyuşturucuya ihtiyaç duyulmaktadır (33). Birey bağımlılığa yöneldikçe, madde edinme ve kullanmaya devam etme motivasyonu artmakta ve madde alımını sınırlama konusunda kontrol kaybı yaşamaktadır. Kronik uyuşturucu madde kullanımının ardından birçok kişi, genellikle kendi isteğiyle yoksunluk durumuna girmektedir. Bazı kullanıcılarda yoksunluk sendromlarının gelişmesine neden olabilmektedir (34). Bireylerde geri çekilme, sıklıkla yüksek düzeyde depresyon, stres ve kaygı meydana getirdiği olumsuz bir duygusal durumlarla ilişkilendirilmektedir (35). Bu durumu takiben, bireylerin çoğunda uyuşturucu madde arayışının sonlanmasına karşı yüksek düzeyde direnç gösteren, tekrarlayan, döngüsel madde alma modeliyle sonuçlanan bir nüksetme takip etmektedir.

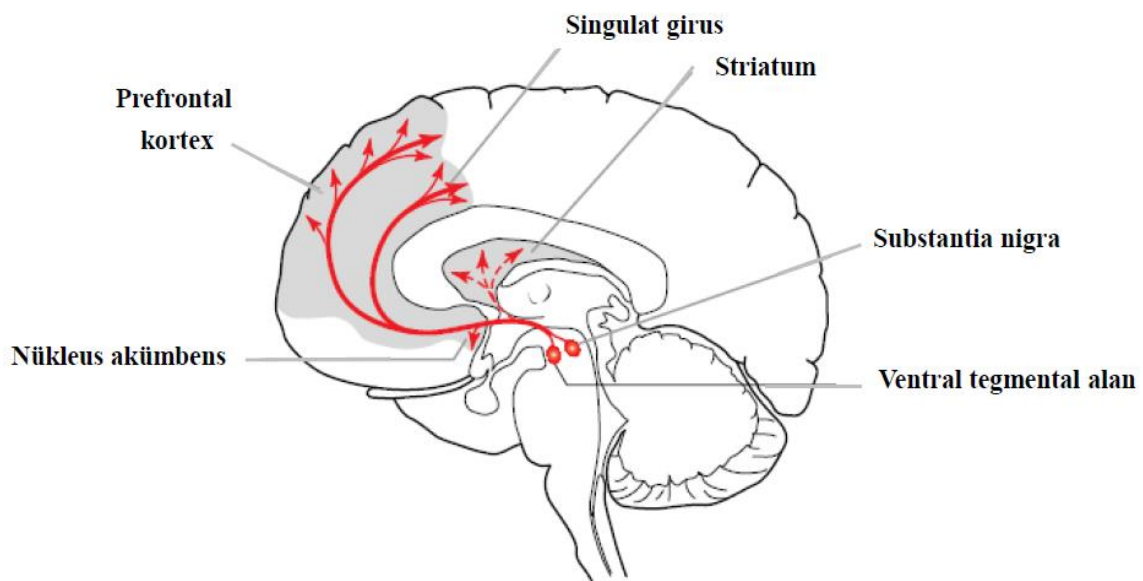
Bağımlılık döngüsü, uyuşturucu madde kullanımından bağımlılık durumuna doğru ilerlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Gerçekleşen bağımlılık durumu sırasıyla; uyuşturucu maddeyle ilgili meşguliyet ve beklenti; genellikle aşırı yeme benzeri bir şekilde kontrol kaybıyla birlikte sarhoşluk; genellikle olumsuz duygulanımla ilişkili yoksunluk; genellikle maddeye olan özlemin ardından nüksetme olarak meydana gelmektedir (36). Bununla birlikte, uyuşturucu madde kullanmayı deneyen tüm bireyler bağımlı hale gelmemektedir. Uyuşturucu madde kullanan bireylerin az bir oranının bağımlılık kriterlerini karşılayacağı tahmin edilmektedir (37). Uyuşturucu madde bağımlılıkların nedeni çok faktörlüdür. Genetik, epigenetik, biyolojik ve çevresel faktörleri içermektedir (38).

Bağımlılık davranışları sergilemeye devam eden bireyler, uyuşturucu madde kullanımını başlatma ve sürdürme konusundaki hassasiyetlerine aracılık eden faktörlerden etkilenebilmekte; bu faktörler, sıradan madde kullanımından kompulsif uyuşturucu kullanımına geçişlerine aracılık eden faktörlerden daha da etkilenmektedir. Bağımlılık aynı zamanda hem dürtüsellik hem de dürtüsellik bileşenlerini içermektedir. Uyuşturucu madde kullanımı insanlarda yüksek dürtüsellik ile ilişkilendirilmekte ve bireyin dürtüsellik sorununun doğasını daha da şiddetlendirebilmektedir. Bu durum, bir bireyin uyuşturucu arama ve alma davranışlarını sürdürme eğilimi üzerindeki etkisinde dürtüsellik sorununun daha büyük bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Dürtüsellliği azalttığı bilinen ilaçlar nüksün önlenmesine yardımcı olabileceğinden, yoksunluk sırasında bu davranışları bırakmaya karşı direnç de buna dahil olmaktadır. Dürtüsellğin aynı zamanda kompulsiflikten önce geldiği düşünülmekte ve birçok kişide bağımlılığın gelişmesiyle bağlantılı olan dürtüsel davranışlardan kompulsif davranışlara geçiş olduğu belirtilmektedir (36).

2.2.1.1. Beyin devreleri ve nörotransmitterler

Toplumda yaygın olarak kötüye kullanılan birçok farklı uyuşturucu madde bulunmaktadır. Alkol, tütün ve inhalanlar yasal yollardan elde edilirken; esrar, amfetamin,

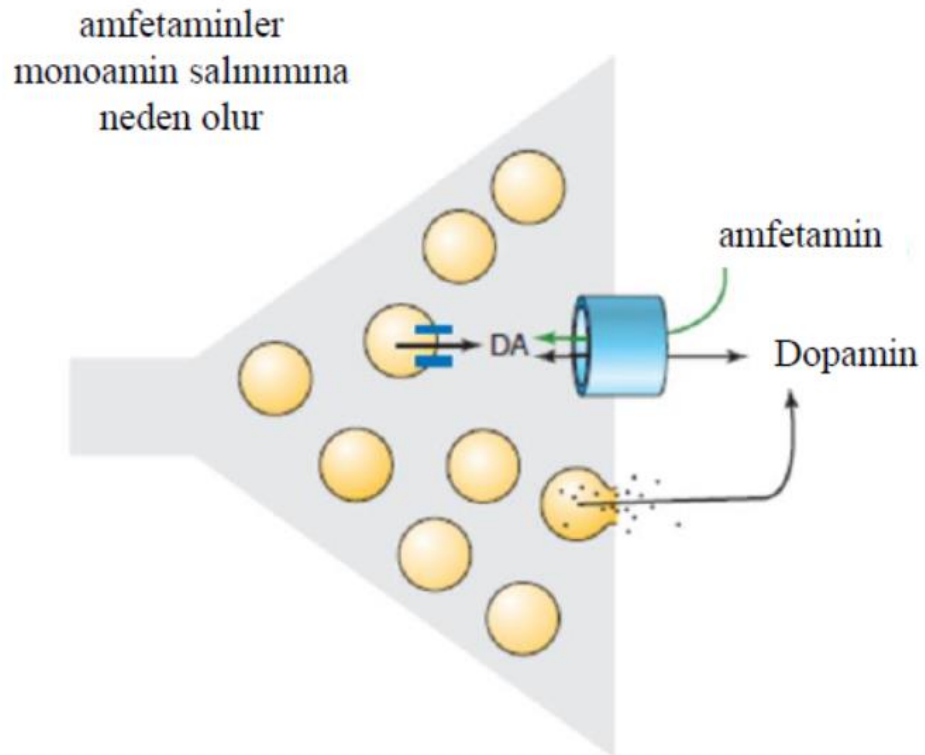
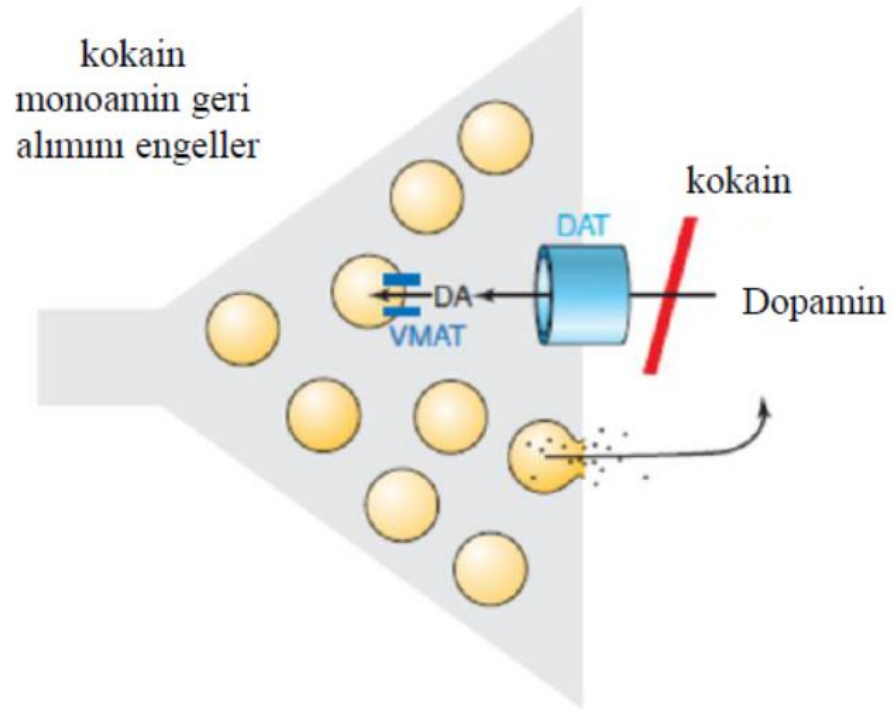
kokain ve eroin yasa dışı yollardan elde edilmektedir. Her bir uyuşturucu madde farklı kimyasal ve farmakolojik profile sahip olmakla birlikte, farklı yollarla uygulanabilmektedir. Ayrıca, farklı nörobiyolojik sistemler üzerinde etki göstermekte ve farklı metabolik yollardan geçmektedir. Bununla birlikte, tüm maddelerin ilk etkilerini, takviyeli öğrenmeye büyük ölçüde dahil olan mezokortikolimbik dopaminerjik yol üzerinde gösterdiği görülmektedir. Orta beynin ventral tegmental alanında (ventral tegmental area, VTA) bulunan dopaminerjik nöronlardan kaynaklanan bu yol; nükleus accumbens (Nucleus accumbens, NAc) (motivasyon), amigdala (ödülün ipuçları ve negatif pekiştirme ile ilişkilendirilmesine aracılık eder), ventral pallidum, hipokampus (hafıza ve öğrenme ile ilişkili limbik sistem) ve ön beyin, özellikle prefrontal kortekse (prefrontal cortex, PFC) projeksiyon yapmaktadır. Bir maddeye akut maruz kalma, NAc ve diğer projeksiyon bölgelerindeki hücre dışı dopamin seviyelerinde geçici bir artışa neden olmakta, ancak bunun gerçekleştiği süreç maddenin kendisine bağlı olabilmektedir (36). Şekil 4’de beyin dopamin projeksiyonları, ventral tegmental alandan nükleus akumbens ve prefrontal serebral kortekse ve substantia nigra’dan dorsal striatuma olan projeksiyonlar gösterilmiştir. (39).



Şekil 4: Ön beyne dopamin projeksiyonları (39).

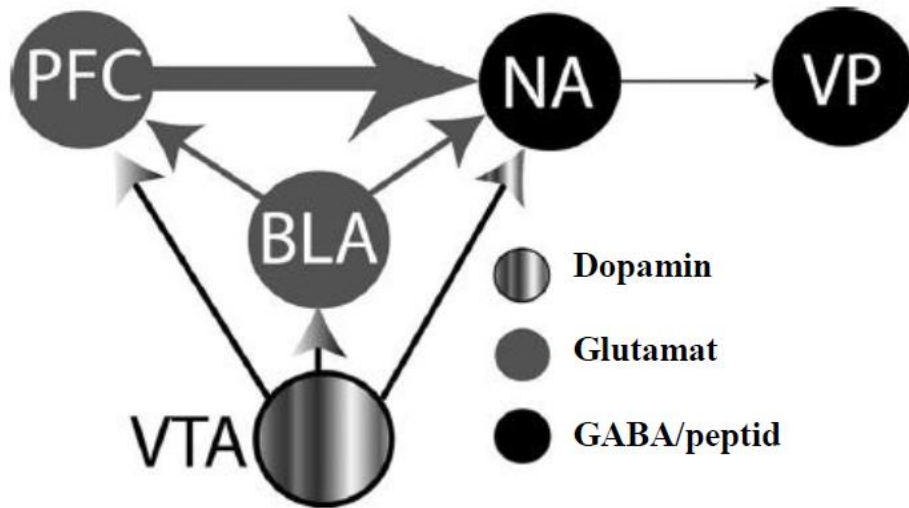
Alkol, nikotin, opiyatlar, esrar ve inhalanlar için bu, öncelikle VTA'da artan nöronal ateşlemenin bir sonucu olarak presinaptik terminallerden dopamin salınımının arttırılması yoluyla gerçekleşmektedir. Buna karşılık, kokain için bu durum, dopamin taşıyıcısı (DAT) tarafından presinaptik dopamin alımının inhibisyonu yoluyla veya amfetamin için olduğu gibi NAc'de hücre dışı dopamini yükseltmek için DAT işlevini aktif olarak tersine çeviren veziküler monoamin taşıyıcısı (vesicular monoamine transporter, VMAT) üzerindeki eylemler yoluyla gerçekleşmektedir (34). Şekil 5'te gösterildiği gibi kokain ve amfetamin psikostimülan maddeleri sinaptik dopamini arttırmaktadır.

Tekrarlı maddeye maruz kalmanın ardından, bazal dopamin seviyelerinde bir artış meydana gelmekte; değişen dopamin reseptör ekspresyonu ile birlikte tolerans ortaya çıkmaktadır (40). Uyuşturucu maddeye maruziyetin sona ermesi halinde, dopamin seviyeleri tipik olarak normal bazal seviyelerin altına düşmektedir. Bununla birlikte, VTA yaklaşık %65'i dopaminerjik, %30'u gama aminobütirik asit (GABA) erjik ve %5'i glutamaterjik olmak üzere heterojen bir hücre popülasyonu içermektedir. VTA'ya giden birincil afferentler PFC'den gelen uyarıcı glutamaterjik girdiler ve NAc'deki orta dikenli nöronlardan (Medium Spiny Neurons, MSN) gelen inhibitör GABAerjik girdiler olup; her ikisi de bu bölgedeki aktiviteyi düzenlemek için geri bildirim döngüleri oluşturabilmekte, ancak bu farklı mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilmektedir (38).



Şekil 5: Psikostimülan eylem (39).

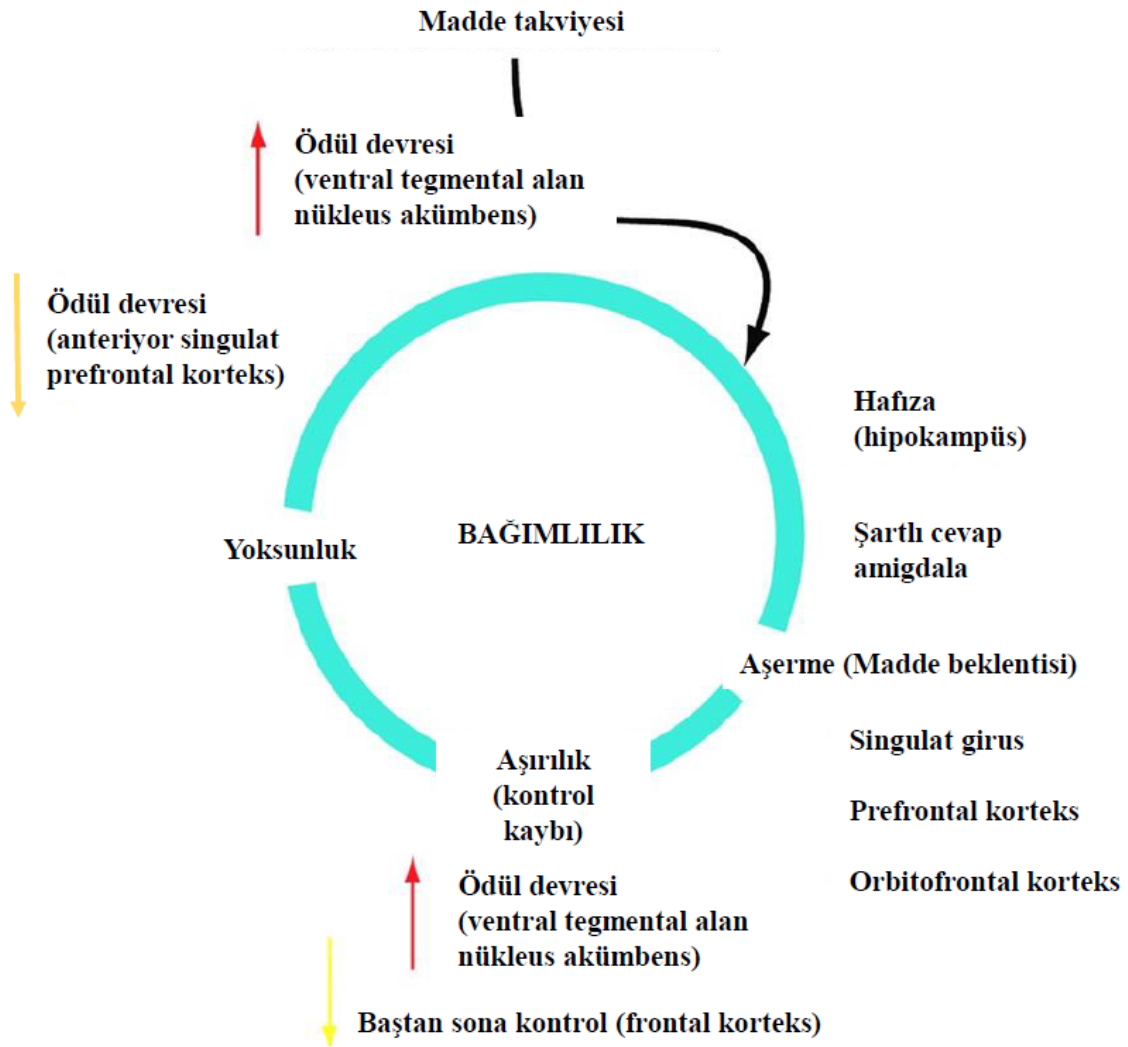
Şekil 6’da gösterilen beyin devresi, uyuşturucuyla ilişkili çevresel durumlarda normal yanıt vermeyi yeniden sağlamak ve böylece bir bağımlının uyuşturucu alımına nüksetme üzerindeki kontrolünü artırmak için manipüle edilebilecek potansiyel olarak önemli iki beyin yoluna ve nörotransmitter sistemine işaret etmektedir. Özellikle, prefrontal korteksten Nac’e giden çıkış glutamaterjik; akumbens’ten ventral palliduma giden çıkış GABAerjik ve peptiderjiktir. Glutamat iletiminin kronik kokainden çekilme ile nasıl değiştiğine dair günümüzde çok sayıda hücresel bilgi bulunmaktadır. Glutamat ve GABA iletimini etkileyen ajanlarla yapılan son klinik çalışmalar, kokain bağımlıları arasında nüks oranlarını ve/veya uyuşturucuyla ilişkili ipuçlarına yanıtı azaltmada potansiyel fayda olarak göstermektedir. Sistemik olarak ilaç uygulayarak glutamat veya GABA iletimini düzenlemek potansiyel olarak sorunludur, çünkü bu ileticiler beyindeki nöronal iletişimin bel kemiğidir, glutamat uyarıcı ve GABA inhibitördür. Bu sistemlerin aşırı veya az uyarılmasının sonucu, beyin aktivitesini baskılayarak ölüme; beyinin aşırı aktivitesiyle hayatı tehdit eden nöbetlere neden olabilmektedir (41).



Şekil 6: Beyindeki Dopamin Projeksiyonları (41).

VTA'nın yanı sıra NAc'nin de bağımlılık davranışlarına aracılık etmede önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. NAc, uyarıların motivasyonel değerinin kontrolünde, ödül takviyesinde ve dürtüsel seçimin arabuluculuğunda yer almaktadır. NAc, VTA'dan gelen dopaminerjik girdilerin yanı sıra PFC, amigdala, talamus ve hipokampustan da uyarıcı glutamaterjik girdi almakta ve böylece limbik (yeni ve öğrenilen bilgilerin işlenmesi) ve motor (görev performansı) yolları arasında bir arayüz görevi görmektedir.

Bununla birlikte, suistimal edilen bir maddeye maruz kalmanın aracılık ettiği son derece entegre ağlar ve üzerinde hareket edebilecekleri farklı nörotransmitter sistemleri, sinyal iletimini dikkatli ayarlamak üzere hareket eden önemli bir karışma sağlamakta ve sonuçta ortaya çıkan sonuç, gelen tüm sinyallerin bir entegrasyonu tarafından yönlendirilmektedir (36). Şekil 7'de uyuşturucu madde bağımlılığında beyin ve davranış modelinde; uyuşturucu bağımlılığı döngüsünün temel klinik özellikleri (zehirlenme, aşırma, aşırı yeme ve yoksunluğu kapsayan), uyuşturucu bağımlılığına ve bunun altında yatan nöropsikolojik mekanizmalara dahil olan mezolimbik ve mezokortikal dopamin devresini oluşturan subkortikal ve kortikal beyin bölgelerinin işleyişi ile eşleştirilmiştir.



Şekil 7: Uyuşturucu madde bağımlılığında beyin ve davranış modeli (42).

2.2.1.2. Sinaptik plastisite ve kokain bağımlılığı

Sinaptik plastisite, beyindeki öğrenme mekanizmasının önemli bir bileşenidir. Uygun zamanda uygun ölçüde gerçekleşmesi için sıkı bir şekilde düzenlenmesi hayati önem taşımaktadır. Kokain gibi maddelere maruz kalmak, moleküler hedeflerin aktivitesinin modülasyonu yoluyla bu uzun vadeli sinaptik adaptasyonları tetikleyebilmektedir (43).

2.2.1.2.1. Dendritik dikenler

Dendritik dikenlerin yoğunluğu ve morfolojisindeki değişiklikler, kötüye kullanılan bir maddeye maruz kalmanın ardından veya yoksunluk sırasında yaygın olarak bildirilen bir nöroadaptasyondur. Golgi-Cox boyaması, sıçanlarda bir aylık kendi kendine uygulamadan sonra bir ay boyunca kokainden uzak durmanın ardından NAc kabuğundaki MSN'lerin dendritik dikenlerinin yoğunluğunda önemli bir artış olduğunu ve dallanmasında ise 2,6 kat artış olduğunu göstermiştir (36).

2.2.1.2.2. Nörotrofik faktörler

Nörotrofin beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) ve TrkB reseptörleri (birincil reseptörü) ile etkileşimlerinin, maddeye bağlı nöroadaptif değişikliklerde ve dolayısıyla bağımlılık davranışlarında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Kokain bağımlısı bireylerin serum *BDNF* seviyeleri yüksektir ve bu seviyelerin 90 güne kadar yoksunluk döneminin ardından nüksetme riskinin artmasında belirleyici olduğu ve alkol bağımlısı hastalarda yoksunluktan 6 ay sonrasına kadar yüksek seviyelerin korunduğu tespit edilmiştir (36).

2.2.1.2.3. LTP ve LTD

Nöronların aktivite sonucunda yapılarını ve işlevlerini değiştirme yeteneği, normal gelişim, öğrenme, beyin hasarı ve nörolojik hastalığa yanıt verme açısından kritik öneme sahiptir. Sinaptik düzeyde, nöral aktivite, uzun süreli potansiyasyon (long-term potentiation, LTP) ve uzun süreli depresyon (long-term depression, LTD) gibi kalıcı sinaptik plastisite biçimleri oluşturabilmektedir. LTP ve LTD mekanizmalarının aktive edilmiş nöron ağlarında yeni bilgileri saklamak için kullanıldığını gösteren çok sayıda veri bulunmaktadır. Bu nedenle, LTP veya LTD'nin doygunluğa ulaşmasını önlemek için önlemler alınmalıdır; bu da

ağların olayları ayırt etme ve bilgi saklama becerisini tehlikeye atabilir ve aşırı LTP seviyeleri durumunda eksitotoksisteye yol açabilir (43).

LTP sürecinin önemli bir bileşeni glutamat reseptörü N-metil-d-aspartattır (NMDA). NMDA reseptörlerinin (NMDA Receptor, NMDAR) varlığı LTP'nin başlatılmasında hayati öneme sahiptir. Sinaptik öncesi ve sonrası nöronlar arasındaki eşzamanlı aktivite, NMDAR yoluyla postsinaptik nörona büyük miktarda kalsiyum akışını tetiklemektedir. Daha sonra, postsinaptik nöronun zarına çok sayıda a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit reseptörü (AMPA) yerleştirilmektedir. AMPAR ifadesindeki bu artışın, LTP'de kritik olan güçlendirilmiş sinaptik iletimin altında yattığına inanılmaktadır (44).

Sıçan küçük parça preparatlarında kokaine akut maruziyet, VTA'daki glutamaterjik sinapslarda LTP'yi indüklemek için yeterli olup, LTP'nin tekrarlanan indüksiyonları sinaptik güçlenmeye yol açmaktadır. Her biri 24 saat arayla glutamata maruz bırakma yoluyla 3 LTP indüksiyonundan sonra, sinapsla ilgili genlerin ifadesinde son maruziyetten 24-96 saat veya 6-12 gün sonra meydana gelen uzun süreli ve zamana bağlı değişiklikler olmuştur. Sonuçta, dopaminerjik nöronlarda kokaine maruz kalma, LTP oluşumuna yol açan süreçleri depolarizasyondan hiperpolarizasyona tersine çevirmiştir (36).

2.3. Bağımlılıkta Genetik Bağlantılar

Her yıl milyonlarca insan, örneğin ağrı tedavisi için tıbbi bakım sırasında bağımlılık yapıcı maddelere maruz kalmaktadır. Geçici tolerans ve bağımlılık ortaya çıksa bile büyük çoğunluk bağımlı hale gelmemektedir. İlk kullanım olasılığı ve patolojik bir kullanım modeline doğru ilerleme olasılığı; içsel faktörlerden (genotip, cinsiyet, yaş, ilk kullanım yaşı, daha önceden var olan bağımlılık bozukluğu veya diğer zihinsel hastalık), dışsal faktörlerden (uyuşturucu bulunurluğu, akran sosyal destek etkileri, çocuklukta yaşanan sıkıntılar, ebeveynlik tarzı, sosyoekonomik durum) ve bağımlılık yapıcı maddenin doğasından

(psikoaktif özellikler, farmakokinetik, kullanım veya uygulama şekli) etkilenmektedir (45). İkiz ve evlat edinme çalışmaları, bir bireyi bağımlı olmaya yatkın hale getiren genlerin kalıtsallığının kokain bağımlılığı için %60, alkol bağımlılığı için %50, opioidler için %70 olduğunu göstermektedir. CUD'nin kalıtsallığına dair kanıtlara rağmen, bozukluk için spesifik genetik risk faktörlerini belirlemeye yönelik çok az çalışma yer almaktadır. Ayrıca, genetik risk faktörlerinin kokain bağımlılığına katkısı çok yüksek olsa da, bağımlılığın altında yatan spesifik faktörlerin belirlenmesinin, bu bozukluğun çok faktörlü ve poligenik olan karmaşık bir hastalık olması nedeniyle zor olduğu belirtilmektedir (29). İnsanlarda kokain bağımlılığının uygun şekilde güçlendirilmiş genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome-Wide Association Studies, GWAS), büyük olasılıkla en az on bin bireyden oluşan yeterli popülasyon boyutlarının tespit edilmesini beklemektedir. Yeterli sayıya ulaşmanın önündeki engeller arasında kokain bağımlısı bireylerin işe alınmasındaki zorluklar, gen-çevre etkileşimleri, popülasyon ve fenotipik heterojenite yer almaktadır (46). Genetik dizi üzerindeki en yaygın ve en iyi anlaşılan etkiler, bir gendeki tek bir nükleotidde (single nucleotide polymorphism, SNP) meydana gelen değişiklik düzeyinde ortaya çıkmaktadır (36). Nöropeptid Y için Y2 reseptörünü kodlayan genlerdeki SNP'ler, kokain bağımlılığı ile ilişkilendirilmiştir (47). BDNF geni Val66Met polimorfizmi, bağımlılıklara yatkınlık oluşturmada rol oynayan bir gen varyantıdır. Farelerde bu polimorfizmin, kokain tepkisinin yok olmasında rol oynadığı; ancak eski haline dönmesinde rol oynamadığı ortaya konmuştur (48). Kokain bağımlılığına ilişkin pozitif bulgulara sahip ilk GWAS'da alkol, opioidler ve nikotin gibi diğer maddelere atfedilebilecek etkiyi ortadan kaldırmak için bir model geliştirmiş; böylece kokain bağımlılığı için genetik risk varyantlarının belirlenmesini kolaylaştırmıştır (29). Daha sonra, *FAM53B* geninde kokain kullanım bozukluğu için genom çapında anlamlı bir varyant tanımlanmıştır. Aynı verilerin gen tabanlı bir test kullanılarak analizi *C1QL2*, *STK38*, *KCTD20* ve *NDUFB9*'u bağımlılık genleri olarak tanımlarken, bir

meta-analiz *HIST1H2BD*'yi tanımlamıştır. Yakın tarihli bir GWAS, 13 önemli geni tanımlamak için gen-çevre etkileşimlerini kullanmış ve başka bir araştırma, kokain kullanımından bağımlılığa gecikme ile ilişkili iki önemli lokus bulmuştur. Elde edilen bu bulgular, birlikte genetik değişkenlik ve bunun bağımlılık davranışının ortaya çıkmasındaki rolü hakkında fikirler sunmaktadır (46).

2.4. Epigenetik

Kokain bağımlılığının kalıtsallığının altında yatan spesifik genler hala tanımlanamamış olsa da, kokaine tekrar tekrar maruz kalmanın, özellikle limbik sistemde olmak üzere çeşitli çekirdeklerde gen ekspresyonunda belirgin değişikliklere yol açtığına dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Aday gen, gen dizisi ve genom çapında yaklaşımlar, limbik sistemin merkezi olan ve çok sayıda kokain aracılı davranışı modüle eden NAc'deki gen ekspresyonundaki değişiklikleri tanımlamıştır. Gen ekspresyonundaki değişiklikler transkripsiyon faktörleri, kromatin ve epigenetik süreçler arasındaki karmaşık etkileşimlerle düzenlenmektedir. Gen ekspresyonunda kokaine bağlı değişikliklerin altında yatan epigenetik mekanizmaların tanımlanması son yıllarda hız kazanmış; terapötik gelişim için umut verici yeni bir yolu temsil etmektedir (49).

Altta yatan gen yapısındaki değişiklikler bir bireyin bağımlılık davranışlarına yatkınlığını artırabilirken, bugünün bakış açısıyla belirli mekanizmaların gen ifadesinin posttranslasyonel modifikasyonlarını düzenlediğini göstermektedir. Bu, genetik kodun kendisindeki değişikliklere bağlı olmayan fenotiplerdeki kalıtsal değişikliklerin kontrol edilmesini sağlamaktadır. “Epigenetik” olarak adlandırılan bu değişiklikler, çevresel uyaranların etkisini içeren kromatin yapısının yeniden modellenmesi yoluyla gerçekleşir. Sonuç olarak, genlerin proteinlere transkripsiyonunun artması veya baskılanması, histonlardaki posttranslasyonel modifikasyonların toplamından veya DNA dizisinden bağımsız olarak DNA'nın kendisindeki değişikliklerden etkilenmektedir. Bu modifikasyonlar

transkripsiyon faktörlerinin erişimini sınırlamakta; böylece gen ifadesinin değişmesine neden olmaktadır. Her hücre aynı DNA dizisini içermektedir. Epigenetik mekanizmaların herhangi bir zamanda ifade edilen belirli gen modelini düzenlemek üzere hareket ettiği ve böylece belirli hücre tiplerinde farklı gen ekspresyon programlarının oluşturulmasında, sürdürülmesinde ve o hücreye bir fenotipin tanımlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Kötüye kullanılan maddelere maruz kalmanın, bağımlı bir duruma geçişte ve bu durumun sürdürülmesi sırasında görülen gen ifadesini ve nöroadaptif değişiklikleri değiştiren kararlı epigenetik modifikasyonlarla sonuçlandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu epigenetik değişikliklerin, yoksunluk dönemlerini takiben nüksü sürdürmek için hareket ettiği düşünülmektedir (36).

Yakın zamanlarda histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve miRNA'lar gibi epigenetik mekanizmalarda kokaine bağlı değişiklikler olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak, insan örneklerinde sadece birkaç çalışma yapılmıştır. Histon posttranslasyonel modifikasyonları ile ilgili olarak, kronik kokaine maruz kalan bireylerin postmortem hipokampusünde H3K4Me3'teki genom çapında değişiklikleri inceleyen ve 1115 genin promotörlerinde değişiklikleri ortaya koyan yalnızca bir çalışma yapılmış; ancak bunlardan sadece beşi çoklu test düzeltmelerini geçmiştir. CUD hastalarının periferik kanındaki DNA metilasyon profillerinin incelendiği bir çalışmada, 186 farklı şekilde metillenmiş pozisyon bulunarak bu bölgelerin potansiyel biyobelirteçler olduğu öne sürülmüştür. Son olarak, iki çalışma insan kültür hücrelerinde ve diğer ikisi de periferik kanda ve kokain bağımlılarının postmortem beyinlerinde kokain tarafından indüklenen miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri araştırmıştır. Bu araştırmaların tümünde, kemirgenlerde kokain etkileriyle de ilişkili olan bir miRNA olan miR-124'ün ifadesinde değişiklikler bulunmuştur (29).

Gelişen teknoloji ile birlikte, çok çeşitli insan dokuları ve hücreleri için transkriptom bilgilendirici veri setlerinin kullanılması, transkriptomik verileri genetik varyasyonla ilgili bilgiler ile entegre etmek için hesaplama yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Böylece, genetik ve transkriptomik bilginin entegrasyonunun, örneğin madde kullanım özellikleri ile ilişkili dokuya özgü transkriptomik değişikliklerin genetik olarak düzenlenen bileşeninin hesaplanmasına veya kokain gibi kötüye kullanılan maddelerin tüketimi ile ilişkili risk alellerinin ekspresyon kantitatif özellik lokusları ile birlikte lokalizasyonunun tahmin edilmesine izin verebileceği belirtilmektedir (50). Literatürde yakın zamanda yapılan bir çalışmada, genom/transkriptom çapında analizi entegre ederek, kokain bağımlılığının ve kokain kullanımının genetik ve moleküler mimarisini türler arası analizlerle araştırmıştır. Bunun için araştırmacılar, daha önce yapılan başka bir çalışmadan elde edilen post-mortem insan hipokampal RNA dizileme verileri ile bir fare kokain kullanımı/maruziyeti modeli üzerinden genom çapında elde ettikleri sonuçları ve hipokampal RNA dizi verilerini entegre etmiştir. Yapılan araştırmada, insan hipokampüsünde farklı şekilde eksprese edilen genler/transkriptlerin, kokaine maruz kalan farelerde hipokampal ekspresyona ve nominal olarak kokain bağımlılığına olan yakınlıkla ilişkili genlere paralel olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kokain bağımlılığı ile ilişkili genom çapında anlamlı üç genden biri olan *KCTD20*'nin, insan hipokampal dokusundaki güçlü bir gen ağının merkezi bir parçası olduğu ve kokain kullanımıyla güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu tespit edilmiştir; daha da önemlisi *KCTD20*'nin kokain kullanıcılarının hipokampüsündeki gen ağlarını bozarak kokain bağımlılığına olan genetik yakınlığa katkıda bulunabileceğini de düşündürmektedir. Sonuç olarak, bu ve benzeri çalışmalar, genetik plan ile dokuya özgü moleküler altyapı arasındaki boşluğu kapatan ve nihayetinde belirli biyolojik mekanizmalarla belirsiz genetik ilişkileri yorumlamaya giden yolu açabilecek bir çerçeve çizmektedir (51).

2.5. MikroRNA

miRNA'lar, ilk kez 1993 yılında bir nematod (yuvarlak solucan) olan *Caenorhabditis elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda olan ama protein kodlamayan lin-4 geninde keşfedilmiştir (52). miRNA'lara ait bilgiler miRBase isimli merkezi bir veri tabanında toplanmaktadır. Bu veri tabanına göre 271 organizma için 38.589 pre-miRNA ve 48.860 olgun miRNA ürünü bulunmaktadır (53).

miRNA'lar, 15-22 nükleotitlik kısa, tek sarmallı ncRNA molekülleridir. miRNA'lar, gen ekspresyonu farklı seviyelerde düzenleyebilirler. Çoğunlukla, miRNA'lar hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak protein ekspresyonunu, mRNA degradasyonu veya translasyonel baskılama yoluyla negatif olarak düzenler. Bununla birlikte, miRNA'ların 5'UTR, kodlama dizisi ve gen promoterleri de dahil olmak üzere diğer bölgelerle etkileştikleri bildirilmiştir. Farklı hücresel konumlara ve bağlanma bölgelerine sahip olan miRNA'lar, translasyonu aktive ederek post-transkripsiyonel seviyede farklı bir fonksiyon daha sunmaktadır (54).

miRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki etkileşimler dinamiktir. Bu dinamik etkileşimler sırasında, mRNA translasyonun miRNA'ya bağlı aktivasyonu hedef bölgelere, hücresel konumlara veya hücresel yanıtlara bağlıdır. Diğer bir ifadeyle, dinamik miRNA-mRNA etkileşimleri, miRNA'ların translasyonu baskılamasından aktivasyona geçebilmesinin; hedef bölgelere, alt hücresel konumlara ve hücresel koşullara bağlı olduğunu gösterir (55). Tek bir miRNA'nın yarattığı ifade düzeyindeki değişiklik 100'den fazla farklı geni etkileyebilmektedir (56). miRNA'ları veya miRNA kümelerini kodlayan genler, intronlar, intergenik bölgeler ve eksonlar içinde yer almakta ve bu nedenle, ortak düzenleyici sekansların kontrolü altında sıklıkla transkripsiyonel olarak birlikte ifade edilmektedir. Bu da dokuya özgü ekspresyon paternleri oluşturur (57). miRNA'lar hücre içinde, plazma, serum, gözyaşı, idrar, beyin omurilik sıvısı, anne sütü ve tükürük dahil olmak üzere birçok biyolojik sıvıda bulunmaktadır (58).

Günümüzde miRNA'ların ekspresyonundaki düzensizliklerin sıklıkla insan hastalıklarının patogeneziyle ilişkili olduğu gösterilmekte ve bu da onları çekici terapötik hedefler haline getirmektedir (59). Protein kodlayan genlerin %20-50'sini modüle etme yeteneğine sahip olan miRNA'lar, birçok hücresel aktivitenin ana düzenleyicileri olarak kabul edilir. Özellikle miRNA'lar beyin gelişiminde ve nöroplastisitede önemli role sahiptir ve miRNA'ların ekspresyon düzensizliği çoğu nöropsikiyatrik bozukluğun patofizyolojisi ile ilişkilendirilmektedir (5). miRNA'ların, hücre döngüsünün düzenlenmesi, farklılaşma, sinyal iletimi, apoptoz, sinaptik plastisite gibi birçok biyolojik süreçlerde gen ekspresyonunun inhibisyonunu veya aktivasyonunu modüle ederek birçok hücresel sürecin belirlenmesinde farklı roller oynadığı giderek daha belirgin hale gelmektedir (60,61).

2.5.1. miRNA biyogenezi

Başlangıçta miRNA'lar, pri-miR'ler adı verilen daha uzun birincil transkriptlere kopyalanır. Pri-miRNA daha sonra çekirdekte Drosha tarafından bölünerek öncü miRNA'yı (pre-miR) üretir ve ardından olgun miRNA'yı vermek üzere sitozolde Dicer tarafından işlenir. Olgun miRNA daha sonra RNA kaynaklı susturma kompleksine (RNA-induced silencing complex, RISC) yüklenir ve burada translasyonel inhibisyona, bölünmeye veya degradasyona aracılık etmek üzere hedef mRNA'ların üç ana çevrilmemiş bölgesine (3'-UTR) hibritlenir. Protein kodlayan genlerin %20-50'sini modüle etme yeteneği ile miRNA'lar, birçok hücresel aktivitenin ana düzenleyicileri olarak kabul edilir. Özellikle miRNA'lar beyin gelişimi ve nöroplastisitede önemli roller oynar ve bunların ekspresyon düzensizliği çoğu nöropsikiyatrik bozukluğun patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir (62).

2.5.2. Kokain kullanım bozukluğunda mikroRNA'lar

Madde kullanımında ilk karar çoğu insan için isteğe bağlıdır, ancak tekrarlanan madde kullanımı beyinde, bağımlı kişinin öz kontrolünü zorlayan ve yoğun madde alma dürtüsüne direnmesini engelleyen değişikliklere yol açabilmektedir. Bu değişiklikler kalıcı

olabileceğinden madde bağımlılığı “nükseden” bir hastalık olarak kabul edilmektedir (63). Kronik madde kullanımı, uzun süreli yoksunluk dönemlerinden sonra bile maddenin nüksetmesine zemin hazırlayan çeşitli uyumsuz nöroadaptasyonlarla sonuçlanmaktadır (64). Kokain maruziyeti beyinde, özellikle striatum ve moleküler hafızanın oluştuğu nükleus akümbens gibi ödülde önemli rol oynayan bölgelerde uzun süreli ve kalıcı hücresel ve moleküler değişikliklere neden olmaktadır (65).

miRNA'lar dopaminerjik tepkilere aracılık ettiğinden; reseptör ifadesini değiştirdiğinden (glutamat reseptörleri dahil); yerel mRNA ifadesini düzenlemek için hücresel sinyallere hızla yanıt verme yeteneğine sahip olduğundan; dendritler de dahil olmak üzere hücre altı lokalizasyon gösterdiğinden, ilaca bağlı sinaptik plastisitenin uzun vadeli adaptasyonlara dönüştürülmesinde kilit bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Hem dopamin D1 reseptörlerinin ekspresyonu hem de dopaminerjik süreçlerin ve hareket etme gibi dopaminerjik aracılı davranışların ince ayarı spesifik miRNA'lar tarafından düzenlenebilmektedir (36)

miRNA'lar, beyinde diğer dokulara göre bol bulunmaktadır (66). Elde edilen kanıtlar, çok sayıda miRNA'nın merkezi sinir sisteminde protein ekspresyonunu düzenlediğini göstermektedir (67). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, nöro ve beyin dokularındaki deregüle miRNA'ların, psikotrop madde bağımlılığıyla ilişkili sinaptik plastisite gibi nöroenez ve nöronal fonksiyon dahil olmak üzere birçok nörobiyolojik süreçte yer aldığını göstermiştir (9). Son zamanlarda ise miRNA disfonksiyonunun bağımlılıktaki rolü, geniş çapta çalışmanın dikkatini çekmiştir (9). Bu çalışmalar, miRNA'ların madde kötüye kullanım bozukluklarında rol oynadığını göstermektedir. Hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalar, psikotrop maddeye maruz kalmanın beyindeki birçok bölgede miRNA ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir.

Chandrasekar ve ark. (2009) yaptığı çalışmada, sıçanlara iki hafta boyunca düzenli olarak kokain enjekte edilmesinin ardından dorsal striatumda miR-124 ve let-7'nin ekspresyon düzeyinde azalış; nukleus akübens, prefrontal korteks ve hipokampus bölgelerinde ise miR-181a'nın ekspresyon düzeyinde artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Kokain kullanımı sonrası ekspresyon düzeyleri değişen bu miRNA'ların hedef aldığı genlerin *BDNF*, *CREB*, *AMPA-2* ve *mGluR5* olduğu göstermişlerdir (66). Chandrasekar ve ark. (2011) kokain koşullu yer tercihi (conditioned place preference, CPP) deneylerinde, NAc'de miR-124 ve let-7d'nin lentiviral vektör aracılı ekspresyonu kokain CPP'sini azaltırken; miR-181a'nın lentiviral vektör aracılı ekspresyonunun CPP'yi arttırdığını tespit etmişlerdir (68). Tersine başka bir çalışmada, NAc'de miR-124 ve let-7'nin susturulmasının kokainin neden olduğu CPP'yi artırırken; miR-181a'nın susturulması kokainin neden olduğu CPP'yi azalttığı tespit edilmiştir (69). Bahi ve ark. (2013) sıçanlarda dorso lateral striatumda miR-124a'nın ve onun doğrudan hedefi olan *BDNF*'nin alkolün neden olduğu CPP'yi ve alkol alımındaki rolünü lentiviral vektör kullanarak araştırdıkları çalışmada; miR-124a'nın viral aracılı artan ekspresyonunun, alkolün neden olduğu CPP'yi ve alkol alımını arttırdığını; miR-124a'nın lentiviral vektör aracılı ekspresyon susturucunun, CPP'yi ve alkol tüketimini azalttığını ortaya koymuşlardır (70). Chen ve ark. (2013) tekrarlı kokain maruziyetinin ardından sıçan hipokampusünde miR-133b, miR-134, miR-181c, miR-191, miR-22, miR-26b, miR-382, miR-409-3p ve miR-504 dahil olmak üzere beyin bozuklukları ve madde bağımlılığı ile ilişkili olduğu bildirilen bazı miRNA'ların, ifadelerinde değişiklik olduğunu bulmuşlardır (71). Erdoğan (2016), alkol kullanım bozukluğu olan bireylerde miR-124, miR-125b ve miR-399'un ekspresyon düzeylerinde azalış olduğunu göstermiştir (72). Çaykara (2017), eroin bağımlısı insan NAc dokusunda miR-133b'nin ekspresyon düzeyinde artış; miR-132, miR-140, miR-181a, miR-206, miR-212 ve miR-339-5p'nin ekspresyon düzeylerinde azalış olduğunu tespit etmiştir (73). Sadakierska-Chudy ve ark. (2017) miR-

132'nin kokain uygulanan ratların dorsal striatumunda ekspresyon analizleri incelemekleri çalışmada, uzun süreli ve yoksunluk döneminde miR-132'nin (10 güne kadar) ekspresyon düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir (74). Demirel (2018), Metilendioksimetamfetamin kullanıcılarının beyin dokularında miR-7975 ve miR-1202'nin ekspresyon düzeyinde azalış olduğunu göstermiştir (75). Cabana-Domínguez ve ark. (2018) insan post-mortem beyin dokusunda miR-9 ekspresyon düzeyinin, kokain kullanım bozukluğu olan bağımlı grubunda, bağımlı olmayan kontrol grubuna göre azaldığını saptamıştır (76). Quinn ve ark. (2018) sıçanlarda kokain bağımlılığında nükleus akumbens kabuğunda miR-132'nin artmış ekspresyon düzeyleri bulundukları çalışmada, artmış mikroRNA düzeylerinin madde arama davranışı ve bağımlılık döngüsünün ileri evreleriyle ilişkilendirilmiş ve miR-132'nin tedavide potansiyel hedeflerin tanımlanmasına aracılık edebileceğini önermişlerdir (77). Jia ve ar. (2019) opioid kendi kendine uygulama (self-administration) deneylerinde, dentat girusta miR-132'nin aşırı ekspresyonunun morfin arama davranışlarını arttırdığını ortaya koymuşlardır (78). Mavrikaki ve ark. (2019) miR-9'un NAc'de aşırı ekspresyonunun oksikodon alımını arttırdığını ve infüzyonlar arası aralığı azalttığını bildirmişlerdir (79). Li ve ark. (2020) kokaine bağlı koşullu yer tercihi fare modeli kullanarak ventral hipokampusta sinaptik plastisite, glia aktivitesi ve nörokimyasal mikro ortamlar ile ilişkili artmış miR-134 ekspresyon düzeyleri ve azalmış gen düzeyleri ile birlikte koşullu yer tercihinin kokain yokluğunda farelerde artan anksiyete ve depresyon benzeri davranışların arttığını tespit etmişlerdir (80). Kumaresan ve ark. (2023) yaptığı çalışmada, kokaine genişletilmiş erişimi olan sıçanların NAc'deki miR-101a-3p ve miR-137-3p'nin ekspresyon seviyelerinin, kokain arama motivasyonunu değiştirerek kokain kullanım davranışını etkileyebileceğini ifade etmişlerdir (81).

miRNA'ların, metilasyon gibi DNA modifikasyonundan bağımsız olarak kromatin yapısını sıkıştırabilen bir DNA bağlayıcı protein olan MeCP2 gibi faktörlerin düzenlenmesi

yoluyla kromatin yeniden şekillenmesine aracılık edebileceği de ortaya çıkmıştır. MeCP2'nin aktivasyonu sadece transkripsiyonun baskılanmasıyla sonuçlanmayabilir. Aynı zamanda cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (cAMP Response Element-Binding Protein, CREB) aracılığıyla transkripsiyonu da aktive edebilir.

MeCP2 ve miR-212 dorsal striatumda kokainin *BDNF* düzeyleri üzerindeki etkilerini değiştiren homeostatik etkileşimler oluşturabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle miRNA'ların değişen ifadesi, sinapsta protein sentezinin doğrudan düzenlenmesi veya hücresel düzeyde transkripsiyon veya epigenetik faktörlerle etkileşim yoluyla meydana gelebilecek karmaşık mekanizmalar yoluyla bağımlılık davranışlarının belirli durumlarını yönlendirmek için yeterli görünmektedir. Bu, aynı hedefin transkripsiyonunu destekleyen CREB'nin veya transkripsiyonu baskılayan REST'in aktivasyonu ile sonuçlanabilmekte; bu faktörlerin her ikisi de miRNA ifadesini düzenleyebilmektedir. Bu nedenle, koordineli geri bildirim mekanizmaları yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyen mekanizmanın bu üç unsurun (miRNA, CREB ve REST) birleşik eylemleri olduğu varsayılmaktadır (36).

miRNA'lar, sadece hücre içinde bulunmaz. Aynı zamanda hücre dışında, dolaşımda ve çeşitli vücut sıvılarında bulunmaktadır. Hücre içi miRNA'lar, hedef mRNA'lara bağlanarak gen ifadesinin düzenlenmesinde işlev görmek ve hücreler arası iletişimde önemli rol oynamaktadır. Patolojik düzeyde, hücresel homeostazdaki değişiklikler, hücrelerin moleküler fonksiyonunun modülasyonuna yol açmakta ve böylece miRNA ifadesi deregüle edilmiş olmaktadır. Deregüle miRNA'lar hücrelerden çıkar ve çeşitli insan hastalıklarının bir parçası olarak sıklıkla hücre dışı vücut sıvılarında dolaşmaktadır. Beyinde moleküler düzeyde deformiteler meydana geldiğinde, kan, CSF/ECF (Serebrospinal sıvı/Ekstrasellüler sıvı), idrar ve tükürük gibi ilişkili vücut sıvılarında anormal miRNA ekspresyonu göstermesi beklenmektedir (82). Son on yılda yapılan çalışmalarda, miRNA'ların serum/plazmada stabil olduğunu ve çeşitli hastalıklarda kan bazlı biyobelirteçler olarak uygun olabileceğini ortaya

çıkarmıştır. miRNA'ların psikotrop madde kullanımıyla ilişkili bağımlılığa katıldığı göz önüne alındığında, eroin kötüye kullanımı ve metamfetamin kötüye kullanımı gibi madde kötüye kullanım bozukluklarının belirlenmesi; dolaşımdaki miRNA'ların ekspresyon paternlerini etkileyebileceği bildirilmiştir. Literatürde yapılan birçok araştırma, beyin ve periferik miRNA'ların, psikiyatrik bozukluklar ve bağımlılık durumları için tanısal ve prognostik bir belirteç olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmalarda, sağlıklı denekler ile diğer fiziksel ve zihinsel hastalıklara sahip olan hastalar arasında plazma ya da serum miRNA ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar ortaya konmuştur (9). Örneğin, özellikle madde bağımlılığı ile ilgili olarak, Xu ve ark. (2020) eroin kullanım bozukluğu olan hastalarda periferik miRNA düzeylerini araştırdıkları çalışmada, erkek eroin bağımlısı hastalarda miR-181a ekspresyon düzeyinin normal kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (83). Viola ve ark. (2019) insan periferik kanda miR-124 anlatımının, CUD olan bağımlı grubunda, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını; miR-181a anlatımının ise anlamlı derecede arttığını saptamışlardır (8).

2.5.3. Kokain Bağımlılığının Tedavisi

Yüksek verimli teknolojiler ve biyoinformatik teknikler sürekli gelişmektedir, bu da periferik kanda CUD'un etkisinin daha derinlemesine araştırılmasına ve tedavi için gelişmiş yollar bulunmasına izin vermektedir. Özellikle son 70 yılda depresyon, şizofreni gibi hastalıkların farmakolojik tedavisinde önemli gelişmeler meydana gelmiştir (85). Madde bağımlılığı konusunda pek çok tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Nükslerin önlenmesi önemli bir sorun oluşturmaktadır (5). Günümüzde madde kullanım bozukluğu için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanan toplamda 11 ilaç bulunmaktadır, bunlardan 4'ü alkol kullanım bozukluğu (Naltrekson, Disulfiram, Akamprosot, Nalmefen); 4'ü opioid kullanım bozukluğu (Metadon, Buprenorfin,

Buprenorfin/nalokson, Naltrekson); 3'ü de tütün kullanım bozukluğu (Veranicline, Bupropion, Nikotin replasman tedavisi) için kullanılmaktadır (86).

Günümüzde kokain kullanım bozukluğunun tedavisi için FDA onaylı ilaçlar bulunmamaktadır. Literatürde, deney hayvanlarında iyi çalışılmış ve şu anda bağımlılık tedavisi veya diğer hastalıklar için klinik araştırmalar altında olan ilaç stratejilerine odaklanan çalışmalar yer almaktadır. Bu stratejiler, dopamin taşıyıcı-tabanlı agonist tedaviler, dopamin reseptör bazlı antagonist tedaviler, glutamat bazlı terapi, GABA tabanlı terapi ve endokannabinoid bazlı tedavilerdir (87).

Disülfiram, alkol kullanım bozukluğunu tedavi etmek için kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Disülfiramın, kokain bağımlılığı için farmakoterapötik etkisinin arkasındaki mekanizmanın tam olarak anlaşılması için çalışmalar yapılmaktadır. Disulfiram, son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda kokain bağımlılığının tedavisinde yararlı olmuştur. Genetik olarak yüksek dopamin taşıyıcı düzeylerine sahip iki SLC6A3 rs28363170 10 tekrarlı alleli olan hastaların, disülfiram farmakoterapisi tedavisinden kaynaklanan artan dopamin düzeylerinden fayda görebildiği bildirilmiştir (88).

Son zamanlarda ise Kannabidiol (CBD), bağımlılık için umut verici bir tedavi olarak büyük ilgi görmektedir (89). Klinik öncesi araştırmalar, sarhoş edici olmayan fitokannabinoid olan kannabidiolün, kemirgenlerde çeşitli maddeler (etanol, opioidler, psikostimülanlar) için bağımlılıkla ilgili davranışları azaltabildiğini göstermiştir (89,90). Mongeau-Pérusse ve ark (2021) stres kaynaklı aşermeyi ve kokain kullanımını azaltmada CBD etkinliğini değerlendikleri çalışmada, CBD'in nispeten iyi tolere edildiğini, ancak kokaine olan özlemi veya nüksetmeyi azaltmadığını tespit etmişlerdir (91).

Vanokserin, oldukça seçici bir dopamin taşıyıcı antagonistidir. 1970'lerin sonlarında sentezlenmiş, ilk olarak Avrupa'da potansiyel bir antidepresan olarak test edilmiştir. Daha

sonra, kokainden daha yavaş bir ayrışma oranıyla dopamin geri alımını bloke etme kabiliyeti nedeniyle kokain bağımlılığı için potansiyel bir tedavi olarak değerlendirilmiştir. Günümüzde, kokain iğnesi olarak bilinen Vanoxerine consta, kokain bağımlılığının tedavisinde ve bağımlılığın tekrar etmesini önlemek için kullanılmaktadır (92).

Madde kullanım bozukluğunun hayvan modellerinde, birkaç ncRNA'nın madde arama davranışlarında işlevsel rol oynadığı gösterilmiştir (93,94). İnsanlarda madde kullanım bozukluğu ile bağlantılı birçok genetik varyant, genomun kodlamayan bölgelerinde bulunur. Bu nedenle, madde kullanım bozukluğundaki varsayılan ncRNA hedeflerinin sayısı artmaya devam ettikçe, bu mekanizmaları modüle etmek için nükleik asit bazlı terapötiklere ihtiyaç duyulacağı düşünülmektedir (5).

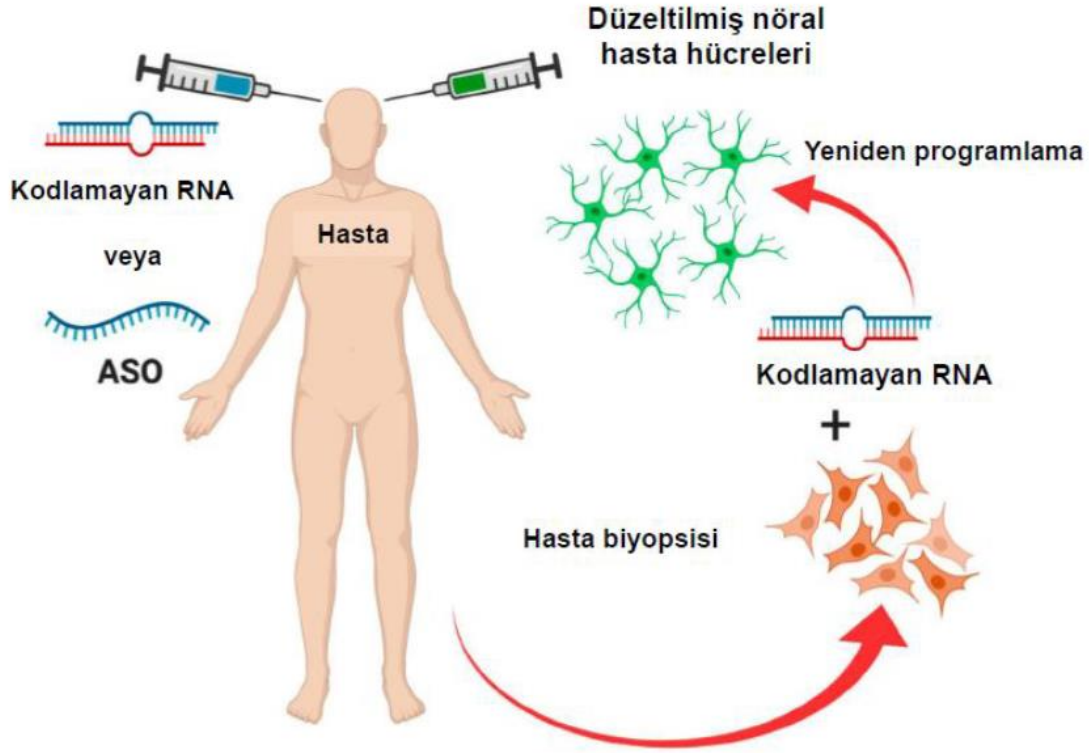
Geleneksel protein hedefli ve DNA bazlı ilaçlarla karşılaştırıldığında, RNA bazlı terapötikler, farklı fizikokimyasal ve fizyolojik özelliklerinden dolayı umut vaad etmektedir (95). “RNA terapötikleri”, bir bileşen olarak RNA'yı kullanan bir hastalık tedavisini veya ilacı ifade eder. Bu bağlamda RNA, küçük molekülü bir ilacın doğrudan hedefi olabilir veya RNA'nın kendisi, bir proteine bağlanmak, başka bir RNA'yı taklit etmek veya hedeflemek üzere tasarlanmış bir ilaç olabilir. Son klinik başarılar ve çığır açan teknolojiler, molekülün ilaca benzer niteliklerinde veya ilaç hedefi olarak kullanışlılığında devrim yarattığından, RNA, ilaç geliştirme dünyasında dikkat çekmiştir (96).

RNA'lar, hastalığın oluşumu ve ilerlemesindeki önemli süreçlerde yer almaktadır ve güçlü terapötik hedefler ve tanısal biyobelirteçler olarak ortaya çıkmıştır. RNA tedavisinin, hastalığa neden olan genleri diziye özgü bir şekilde hedef aldığı ve yaşamı tehdit eden çeşitli hastalıklar için daha kesin ve kişiselleştirilmiş tedaviler sağladığı için en iyi tedavi stratejilerinden biri olduğu düşünülmektedir. Hedef dokuya özgü bir nükleik asit sekansının eklenmesiyle gen ekspresyonu aşağı yönde (down-regulation) düzenlenebilmekte,

artırılabilmekte veya düzeltillebilmektedir. Çeşitli hastalıkların siRNA veya ASO'larla gen modifikasyonları yoluyla tedavisini amaçlayan, özellikle de 2015'ten bugüne 14 RNA bazlı ilaç FDA veya Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency, EMA) onayı almıştır (97).

Bugüne kadar, çeşitli araştırmalar ncRNA'ların dopamin nöronlarının gelişiminde ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde kritik roller oynadığını göstermiştir. Temel, translasyonel ve klinik araştırmalardaki bu son gelişmeler, RNA terapötiklerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde değerli bir araç olduğunu göstermektedir (98, 99). Pascale ve ark. (2020) Parkinson hastalığına karşı mücadelede RNA terapötiklerini gen düzenleme ve hücre yeniden programlamasıyla birleştirerek nörodejeneratif bozuklukların tedavisine yeni bir bakış açısı yaratmıştır. Nörodejeneratif hastalıklar için RNA terapötik yaklaşımı Şekil 8'de gösterilmiştir. Nörodejenerasyona dahil olan genleri modüle etmek için ncRNA'ların veya antisens oligonükleotitlerin (ASO) kullanıldığı potansiyel RNA terapötik yaklaşımlarının ideal bir temsilini göstermektedir. Resmin sağ tarafında, hasta somatik hücrelerini yeniden programlamak ve düzeltmek için ncRNA'ların potansiyel bir kullanımı yer almakta; resmin sol tarafında, yerleşik nöral hücrelerin potansiyel bir doğrudan in vivo yeniden programlama/düzeltilme yaklaşımı yer almaktadır.

miRNA sentezi ve salınım tekniklerinin hızla gelişmesinin bir sonucu olarak, bu biyomoleküllerin tanısal biyobelirteçler olarak ve nörolojik bozukluklar için yeni bir tedavi stratejisi olarak kullanılmasında umut vaad etmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların kokain bağımlılığı için de yeni terapötik girişimlere yol açabilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (99).



Şekil 8: Nörodejeneratif hastalıklar için RNA terapötik yaklaşımı (99).

2.6. Çoklu Madde Kullanım Bozuklukları

Bir uyuşturucunun kötüye kullanılmasıyla ilgili madde kullanım bozukluklarını ele almak üzere ortak çabalar gösterilse de, son epidemiyolojik kanıtlar çoklu madde kullanımının dünya çapında aşırı dozda uyuşturucudan kaynaklanan ölümlerde önde gelen bir faktör haline geldiğini göstermektedir. Uyuşturucu dağıtıcıları, daha düşük üretim maliyetleriyle maddenin etkilerini artırmak amacıyla genellikle maddeye fentanil gibi katkı maddelerini kattıklarından, birden fazla maddenin eş zamanlı kullanımı, kullanıcının bilgisi olmadan gerçekleşebilir. Sentetik opioidlerin yasa dışı maddelere dahil edilmesi nedeniyle reçeteli opioidler, eroin, kokain ve psikostimülanlar için ölüm oranları artmıştır. Bu istatistikler, diğer ilaçlar için pozitif olan hastalar arasında reçetesiz fentanil pozitifliğini önemli ölçüde artıran 2019 koronavirüs hastalığı salgınıyla daha da kötüleşmiştir.

Çoklu madde kullanım bozukluğu (Polysubstance Use Disorder, PUD), iki veya daha fazla yasal veya yasa dışı maddenin kötüye kullanılması anlamına gelir. PUD, kokain gibi bir uyuşturucunun kullanımını veya alkol, tütünün veya opioidler gibi reçeteli bir ilacın kötüye kullanımını içerir. Bu bozukluğa çoklu madde bağımlılığı da denir (100). Frontiers Neuroscience'da 2020'de yapılan bir araştırmada çoklu madde istatistikleri gözden geçirilmiştir. Bu araştırmaya göre 35 milyon kişi madde kullanım bozukluğu kriterlerini karşılamaktadır. Uyuşturucu kullanımı ve bağımlılığı oldukça fazla araştırılıyor olsa da, madde kullanım bozukluklarına ilişkin araştırmaların çoğu, uyuşturucu kullanımını daha yaygın olan eş zamanlı madde geçmişleri bağlamından ziyade, tek başına incelemektedir. Aslında, madde kullanım bozukluğu tanısı alan bireylerin %11,3'ünde eş zamanlı alkol ve yasa dışı uyuşturucu kullanım bozuklukları bulunmaktadır. Ayrıca, bir maddeyle birlikte madde kullanım bozukluğuna sahip olmak, ek maddelere bağımlılık geliştirmeye yatkınlığı artırır. Alkol kullanım bozukluğu olan bireylerin eroin bağımlılığı geliştirme olasılığı iki kat daha fazla; esrar kullanıcılarının eroin bağımlılığı geliştirme olasılığı ise üç kat daha fazladır. Kokain kullanıcılarının eroin bağımlısı olma olasılığı 15 kat daha fazladır. Kokain kullanıcılarının %74'ünün ve amfetamin kullanıcılarının %80'inin çoklu madde bağımlılığı geçmişi vardır. Eş zamanlı kokain ve alkol kullanım sıklığı %24-98 arasında değişirken, eş zamanlı esrar kullanım sıklığı ise %12-76 arasında değişmektedir. Yasadışı bir uyuşturucu madde ile nikotin birleştirildiğinde eş zamanlı kullanım oranı kokain ve nikotinde %70-80, amfetamin ve nikotinde ise %85-95'tir. Nikotin kullanım bozukluğu olan kişilerin başka bir madde kullanım bozukluğuna sahip olma olasılığı 3-4 kat daha fazladır. Amfetamin kullanıcılarının eş zamanlı olarak kokain bağımlısı olma olasılığı 21 kat daha fazladır ve geçen yıl içinde kokain kullanmış olma olasılığı amfetamin kullanmayan kullanıcılara göre 7 kat daha fazladır. Kokain kullanıcılarının %33'ünden fazlası ve metamfetamin kullanıcılarının %20'sinden fazlası aynı zamanda reçeteli opioid kötüye kullananlardır (101).

Uyuşturucu ve alkol kullanım bozuklukları tüm ırklarda, etnik kökenlerde, sosyo-ekonomik gruplarda, cinsiyetlerde, gençlerde ve yaşlılarda aynı şekilde görülür. Kokain ve alkolün aynı anda kullanılması, çoklu madde bağımlılığının yaygın bir şekli olmasına rağmen, diğer çoklu madde kullanımı kalıplarıyla birlikte iyi bir şekilde incelenmemiştir. Çoklu madde kullanım bozukluğu, kokain kullanıcıları da dahil olmak üzere eğlence amaçlı uyuşturucu madde kullanıcıları arasında yaygındır. Kokain ve etanol birlikte kullanıldığında, bu kombinasyon kokaetilen adı verilen kokaine benzer farmakolojik ve psikoaktif özelliklere sahip psikoaktif bir metabolit üretilir. Kokaetilenin, kardiyovasküler ve hepatik sistemler için esas madde olan kokainden daha toksik olduğu kabul edilir ve kokainden (yaklaşık 1 saat) daha uzun bir plazma eliminasyon yarı ömrüne (yaklaşık 2 saat) sahiptir. Alkolün kokainle birlikte tüketilmesinin pek çok nedeni vardır. Alkol bazen, kokainin psikoaktif etkilerini arttırmak veya kokainin süresini uzatmak; aşırı kokain alımından sonra sakinleşmek; kokain kullanımında bazen ani olan “çarpıntıları” hafifletmek; uzun bir aktivite döneminden sonra uykuya dalmaya yardımcı olmak için kokainle birlikte kullanılmaktadır. Kokaetilen, kalp atış hızını ve kan basıncını kokainden daha fazla artırır. Aslında kokaetilenin kokainden 10 kat daha fazla kardiyotoksik olduğu düşünülmektedir. Fare çalışmaları, kokaetilenin ana maddeden hem daha güçlü hem de daha uzun ömürlü olduğunu doğrulamıştır; köpeklerde yapılan bir araştırma kokaetilenin de daha kardiyotoksik olduğunu tespit etmiştir.

Ventral tegmental alandaki dopaminerjik nöronlar, etanol ve kokain de dahil olmak üzere kötüye kullanılan maddelerin ödüllendirici özelliklerinde önemli bir rol oynar. Kokaetilen, esas maddesi kokain gibi, dopaminin geri alımını bloke eder ve sinaptik sonrası nöronal aktiviteyi artırır ve dopaminin uyarıcı etkilerini güçlendirir. Bu nöronal uyarım, hem kokainin hem de kokaetilenin güçlü psikoaktif etkilerine katkıda bulunarak enerji, odaklanma ve heyecan hissi üretir. Bu merkezi uyarıcı etki açısından, kokain ve kokaetilen eş-güçlü gibi görünmektedir, ancak kokaetilenin daha uzun yarı ömrü, etkilerini daha kalıcı kılmaktadır.

Kokaini uzun süre yüksek seviyede tutma yeteneği, birçok kokain kullanıcısının, etanol tüketerek kokainin psikoaktif etkilerini artırdığının farkında olmasalar bile, kokain kullanırken neden alkol içtiğini açıklamaya yardımcı olabilir (102).

Madde kullanım bozukluklarına yönelik geleneksel farmakoterapiler, tek madde kullanımına odaklanmıştır. Bununla birlikte, son epidemiyolojik çalışmalar, çoklu madde kullanım bozukluklarının daha yaygın hale geldiğini ve katkı maddesi içeren maddelerin kötüye kullanımının, kasıtsız aşırı doz ölümlerinin artmasına yol açtığını ortaya koymuştur. Ne yazık ki PUD için onaylanmış farmakolojik ajanlar mevcut değildir. Bu nedenle, büyüyen bu salgına yönelik ilgi çekici bir terapötik model, bireylerin, kötüye kullanılan maddeyi taklit eden haptenlerle formüle edilmiş konjuge aşılarda aşılandığı immünfarmakoterapidir. İmmünfarmakoterapi, geleneksel olarak bireysel ilaç sınıflarını hedef alan tek bir hapten geliştirilmesine odaklanırken; bu alandaki son gelişmeler, farklı hapten-protein konjugatları içeren bir karışımın veya alternatif olarak ikili bir hapten yaklaşımının uygulanmasıyla çoklu madde maruziyetine karşı koruma sağlayabilen konjuge aşılarda üretildiğini göstermektedir (100). Lee ve ark. (2022) konjuge aşılarda, tekli maddenin kötüye kullanımına karşı önemli bir terapötik potansiyel göstermesinden yola çıkarak yaptıkları çalışmalarında, bu modeli PUD'a yönelik olarak uygulamışlardır. Bu yaklaşımın, iki opioide ve her ikisine de maruz kalan aşılanmış sıçanlara karşı yüksek titrelerle sahip antikorlar ürettiğini tespit etmişlerdir. İmmünofarmakoterapi uzun vadeli koruma sağlamakta ve yan etkiler minimum düzeydedir. Bununla birlikte, bağımlılık ve suiistimal potansiyeli bulunmamaktadır, çünkü bu yöntemle üretilen antikorların maddeye karşı yüksek özgüllüğe sahip olduğu ve antikorun kan-beyin bariyerini geçememesi nedeniyle periferde kaldığı belirtilmektedir (100).

2.7. Kokain Bağımlılığında Biyobelirteç Olarak Kullanılan Kandaki miRNA'lar

“Biyobelirteçler” veya “biyolojik belirteçler”, herhangi bir normal veya anormal patofizyolojik sürecin veya bazı terapötik rejime farmakolojik yanıtın potansiyel bir

göstergesi olarak objektif olarak ölçülebilen ve değerlendirilebilen karakteristik özelliklerden bazılarıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (World Health Organization, WHO) göre, biyobelirteç tanımı, herhangi bir biyolojik sistem ile kimyasal, fiziksel veya biyolojik nitelikte olabilen potansiyel olarak tehlikeli bir ajan arasındaki etkileşimleri gösteren herhangi bir değerlendirmeyi kapsamaktadır. Biyobelirteçler, klinik ilaçlarda her zaman kullanılmakta; biyobelirteç tabanlı analizler olarak günümüzde yeni alanlara girmekte, hastalıkların daha erken teşhis edilmesine ve çeşitli hastalıkların etkili bir şekilde tedavi edilmesine yardımcı olabilmektedir. Bunlar, çeşitli hastalık durumlarında uygulanabilirliklerine bağlı olarak çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Günümüzde omiks teknolojilerindeki gelişmeler; genomik stratejiler, epigenetik, metabolomik, transkriptomik, lipid bazlı analiz, protein çalışmaları vb. kullanılarak farklı tipte yeni biyobelirteçler elde etmek için yeni fırsatlar sunmaktadır. Tüm biyobelirteçler, çeşitli çevresel faktörlere maruz kalma seviyelerini veya türlerini, genomik duyarlılıkları, çeşitli çevresel hassasiyetlere genetik yanıtı, sub-klinik veya klinik hastalıklı durumların göstergelerini veya terapötik rejime yanıtların göstergelerini içeren sağlıklı veya hastalıklı durumların bir spektrumunu göstermektedir.

Bir biyobelirteç antikor proteinleri, mikrobiyal göstergeler, RNA'lar, DNA'lar, lipid bazlı ajanlar, metabolik bileşikler ve proteinli bileşikler gibi çeşitli şekillerde bulunabilmektedir. Bunların seviyelerindeki, yapısal özelliklerindeki, işlevsel davranışlarındaki veya farmakolojik etkilerindeki değişiklikler; belirli hastalıkların başlaması, ilerlemesi ve/veya gerilemesi, hastaların vücutlarının bu parametrelere nasıl tepkiler verdikleri ile ilişkilidir. Hastalıklı bir duruma özgü güvenilir ve tutarlı bir biyobelirtecine herhangi bir kolektif yönü genellikle biyobelirteç veya moleküler imza olarak adlandırılmaktadır. Geçmişten bugüne, tüm hastalıkların ve tıbbi durumların yönetimi için veya geniş bir tıbbi ve çevresel ajan yelpazesine maruz kalmanın kanıtı olarak çok çeşitli biyobelirteçler aydınlatılmış ve ölçülmüştür. Proteinler, nükleik asitler, enzimler, antijenler, antikorlar ve

diğer biyolojik ajanlar, patofizyolojik durumların teşhisi veya izlenmesi için değerlendirilen biyoindikatörlerin tüm spektrumunu oluşturmaktadır. Örneğin, kandaki monoklonal proteinlerin seviyesi, tedavi gerektiren bazı kan kanseri kategorilerinde tanı konulan bireylerde izleme parametresi olarak kullanılmaktadır. Benzer şekilde, prostat spesifik antijen (PSA), prostat kanserli hastalarda terapötik sonuçların değerlendirilmesinde bir izleme biyobelirteci olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Biyomoleküllerin ve biyobelirteçlerin tespiti ve analizi için çok çeşitli teknolojiler ve protokoller geliştirilmiştir ve bu, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitlerin karmaşık bir karışımında bu biyomoleküler belirteçlerin karakterizasyonu için büyük miktarda veri toplanmasını sağlamıştır. Omik yaklaşımlar, hastalıkların moleküler imzaları olarak adlandırılabilen yeni biyobelirteç biyomoleküllerin keşfine katkıda bulunmuş; klinik uygulamalarda oldukça önemli ek değerler sağlamıştır (103).

Madde kötüye kullanımının, kan örneği kullanılarak teşhis edilmesi ve izlenmesi birçok alanda büyük önem taşımaktadır. Madde ile mücadelenin önemli unsurlarından biri olan madde analizlerinde, tarama ve doğrulama yöntemleri kullanılmaktadır. Tarama ve doğrulama, çoğunlukla kötüye kullanılan maddelerin ve bunların metabolitlerinin, madde bağımlısı bireylerin tam kan, serum veya plazmasında GC-MS veya HPLC yöntemleri ile tespit edilmektedir (9). Tükürükte kokain 12 saate kadar, BZE ise 24 saate kadar; plazmada kokain 12 saate kadar ve BZE ise 48 saate kadar; idrarda kokain BZE olarak en uzun süre ile 72 saate kadar tespit edilebilmektedir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, bireylerde madde kullanım bozuklarının doğru ve kesin bir şekilde tespit edilebilmesi gerekmektedir. Bunun için hassas ve güvenilir yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir (104).

İdeal bir biyobelirteç, invaziv olmayan yöntemler ile uygulanabilir olmalı, ucuz olmalı, ilgili hastalığa veya fizyolojik duruma özgü olmalı, model sistemlerde olduğu gibi insanlarda

da uygulanabilir olmalı, patolojik durumlar için biyobelirteçler söz konusu olduğunda, tanısal uygulamalara sahip değildir (105). Dolayısıyla, beyin dokusu kolaylıkla ulaşılabilir olmadığından madde bağımlılığında kan bazlı ekspresyon profili çalışmalarının yapılması, bağımlılıkta potansiyel biyobelirteçler geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir (106). Periferik kan fraksiyonları (serum, plazma ve periferik kan hücreleri) arasındaki varyasyonlardan biri de bu fraksiyonların içindeki miRNA ekspresyon düzeyleridir (105).

miRNA'lar küçük boyutları, hücre ve dokularda yüksek bollukta bulunmaları, hücreye ve dolayısıyla dokuya özgü olmaları ve periferik dolaşımdaki göreceli stabiliteleri gibi sahip oldukları bir dizi avantajları ile invaziv olmayan potansiyel biyolojik belirteçler olabilecekleri belirtilmektedir. Dondurularak uzun süre saklanabilme özelliğine sahip olan kan plazması miRNA'ları, endojen RNAaz (ribonükleaz) aktivitesine dirençlidir. Yapılan çalışmalarda, plazma miRNA düzeylerinin, uzun süreli oda sıcaklığında inkübasyona tabi tutulduğunda veya birçok kez dondurularak çözülüğünde stabil kaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda plazma miRNA'larının yüksek ve düşük pH seviyelerine de dirençli olduğu belirtilmiştir (107).

Periferik kanı incelemek için tam kan, serum ve plazma kullanılabilir. miRNA'ların periferik kandaki düzeyleri Northern blot, Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), Mikroarray, In situ hibridizasyon ve Yeni nesil dizileme (next generation sequencing, NGS) yöntemleri kullanılarak belirlenebilmektedir (103).

Keşfedildikleri tarihten itibaren günümüze kadar çok sayıda miRNA tanımlanmıştır. miRNA'ların patolojik vakalardaki rolünü tanımlamaya yönelik ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, henüz gelişmekte olan bir alan olduğu için yeni araştırmalara açıktır. Bunun başlıca nedenleri; miRNA'ların insan doku ve vücut sıvılarında düşük ekspresyon düzeyleri göstermesi, miRNA ile değiştirilmiş moleküler yolların kapsamlı analizinde karmaşıklık

ortaya çıkması ve miRNA verilerini normalleştirmek için uygun referans gen seçiminde zorluklar yaşanmasıdır (108,109).

Kokain kullanım bozukluğu olgularına karşı terapötik yaklaşımların geliştirilmesi ve kokain yoksunluğunun altında yatan mekanizmaların belirlenmesine her zamankinden daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, terapötik yaklaşımların spesifik biyobelirteçlerini bulmak için kokain bağımlılığı progresyonunun altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılması gerekmektedir (98).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

- Etil Alkol (%96) (Tekkim)
- İzopropanol (Sigma)
- PAXgene Blood RNA Tüpü (Qiagen)
- Sample Tüp, RB (2mL) (Qiagen)
- PCR Tüpü (Strip Tüp and Caps, 0.1mL) (Qiagen)
- PCR Tüpü, 0.2 mL (Qiagen)
- Filtreli pipet uçları (0.5-10 µL, 1-100 µL, 100-1000 µL) (Axygen)
- Parafilm (Isolab)
- Nitril eldiven (Beybi)

3.1.2. Kullanılan kitler

- PAXgene Blood miRNA Kit (Qiagen)
- miRCURY LNA miRNA PCR Assay) (Qiagen)
- miRCURY LNA RT Kit (Qiagen)
- miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen)
- Qubit™ Assay Tüpü (Thermo Fisher)
- Rnase-Free Dnase Set (Qiagen)
- Qubit™ RNA HS Assay Kit, 100 rxn (Thermo Fisher)

3.1.3. Kullanılan ekipman

- Buzdolabı (+4°C ve -20°C) (Vestel)
- Derin dondurucu -70 °C (Hettich)
- Vorteks (Weightlab Instruments)
- Mikropipet Seti (Discovery Pro)
- Florometre (Qubit 4-Thermo Fisher)
- Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)
- Santrifüj (Hettich Universal 320R)
- Thermal döngü cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cyclers-Applied Biosystems™)
- Real Time PCR Cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q)

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırmanın tipi

Çalışma olgu-kontrol tipinde, deneysel bir çalışmadır.

3.2.2. Araştırmanın yeri ve zamanı

Bu çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden hasta bireylere çalışmanın detayları ve süreçlerinin anlatılması Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği'nde; alınan örneklerin moleküler genetik analizi ise İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. 26/03/2021 tarihinde Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği'nde bu araştırma için çalışma materyalinin (periferik kan örnekleri) toplanması aşamasına başlanmıştır ve bu aşama 06/11/2022 tarihinde tamamlanmıştır. Sağlıklı kontrol grubu için seçilen gönüllülerden İ.Ü.-C. Adli Tıp ve Adli

Bilimler Enstitüsü'nde biyolojik örnek toplanması aşaması 13/11/2022-15/08/2023 tarihleri arasında tamamlanmıştır.

3.2.3. Etik kurul onayı ve yasal/özel izinler

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 03/11/2020 tarih ve A-30 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayı Ek-1'de sunulmuştur. Çalışmaya Balıklı Rum Hastanesi Vakfı'ndan araştırma yapılabileceğine dair izin 06/01/2020 tarihinde verilmiştir. Hastanede çalışma izni onayı Ek-2'de sunulmuştur.

3.2.4. Araştırmanın evreni ve örneklem grubu

Bu çalışmanın örnekleme, ikili çalışma grubu ve bir kontrol grubu olmak üzere, aşağıda belirtildiği gibi 3 gruptan oluşmaktadır:

i) Bağımlı (hasta) grubu: kokain bağımlısı olan ve tedavi olmak üzere henüz başvurmuş olan 12 erkek birey (n=12);

ii) Tedavi grubu: Kokain bağımlısı olan ve tedavi olmak üzere henüz başvurmuş olan bireyler arasında kendilerine uygulanacak tedavi yöntemleri sonrasında bu gruba gönüllü olarak katılmayı kabul eden bireylerden ve/veya Anatolia Kliniği'nde halihazırda kokain bağımlılığı tedavisi görmekte olan bireylerden toplam 11 erkek birey (n=11);

iii) Sağlıklı kontrol grubu: daha önce hiç kokain kullanmamış ve herhangi bir madde bağımlılığı olmayan 16 gönüllü erkek bireyden (n=16).

Bağımlı çalışma gruplarının tamamı Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği'ne tedavi edilmek üzere başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü bireylerden oluşmaktadır. Kontrol grubu ise çalışmaya katılmayı kabul eden ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan bireylerden rastgele seçilmiştir.

Araştırma yeri olan Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Madde ve Alkol Bağımlılıkları Klinikleri'nde kokain kullanım bozukluğu tanısı almış olan hastalar, ayakta tedavi ya da yatarak tedavi görmektedir. Her iki tedavi türü için de klinikte standart tanı taraması için öncelikli olarak psikiyatr tarafından tıbbi bir muayene yapılmaktadır. Eğer hasta birey, ayakta tedavi görmeyi tercih ederse idrar testi ile idrarda kokain analizi elde edilmektedir. Eğer hasta yatarak tedavi görmeyi tercih ederse EKG, hepatit ve HIV testi, biokimyasal kan testi ve idrar testi yapılmaktadır. Tedavinin türü kişiden kişiye değişmektedir. Kokain bağımlısı olan ve tedavi olmak üzere henüz başvurmuş olan hasta bireylerden oluşan grupta ayakta tedavi olmayı tercih edenler genellikle kendi yaşamını değiştirmeden, bulunduğu çevre ve koşullar içinde madde kullanmamayı öğrenmeye çalışmak istemektedir. Bununla birlikte, bu grup içerisinde yatarak tedavi görmeyi (en az 3 günlük detoksifikasyon tedavisi) tercih edenler de bulunmaktadır ve bu hastalar aynı zamanda tedavi süresince bağımlılık danışmanlığı (bireysel danışmanlık) da almaktadır. Genel olarak bu gruptaki hasta bireylere komorbidite özelliklerine göre detoksifikasyon (arındırma) tedavisi uygulanmaktadır. Bu hasta bireylerin vücudunun maddeden arındırılması gerekir. Vücudun maddeden arındırılması tedavinin ilk aşamasıdır. Detoksifikasyon, kullanılan maddenin bırakıldıktan sonra ortaya çıkan yoksunluk belirtilerinin kaldırılmasını hedefler. Bununla birlikte bu gruptaki bireylerde uygulanan tedavi sonrası yaklaşık bir hafta sonra idrarda madde panellerinin negatif çıkıp çıkmadığının kontrolü yapılmaktadır ve bu aşamadan sonra idrar testinin sonucuna göre (pozitif-negatif) bu bireylere ya ilaç tedavisine (idrara testinin pozitif çıkması durumunda uygulanmaktadır) devam edilmektedir ya da 3 ay kadar etkili olan vanoxerine consta tedavisi (aşı/iğne tedavisi – idrara testinin negatif çıkma durumunda uygulanmaktadır) uygulanmaktadır. Halihazırda kokain bağımlılığı tedavisi görmekte olan bireylerden oluşan grupta ise bireyler ayakta tedavi ya da yatarak tedavi görmektedir. Bu gruptaki bireyler en az bir kez detoksifikasyon tedavisi görmüş olan bireylerden oluşmaktadır. Bununla birlikte bu gruptaki bireylere Vanoxerine

tedavisi de uygulanmaktadır. Aşı tedavisi uygulama öncesi psikiyatr onayı olmalı ve idrarda kokain grubuna rastlanmaması gerekmektedir. Vanoxerine tedavi süresi genellikle 1 yıl olarak uygun görülmekte; 3 ve 6 aylık dozlar halinde üretilmiş olup, intramüsküler olarak uygulanmaktadır. Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği'nde hastalara vanoxerine tedavisi üçer ay arayla üç kez uygulandıktan sonra yoksunluk belirtilerinin ve kokain isteğinin azalması sağlanmaktadır. Ayrıca aşı tedavisi için hastanın bir yıllık takibinde iyilik halinin devam edip etmediği ve üçer ay arayla idrarda madde panellerinin negatif çıkıp çıkmadığının kontrolü yapılmaktadır.

3.2.5. Çalışmanın dahil edilme ve dışlama ölçütleri

Bu çalışmanın örneklemini oluşturan ikili çalışma grubu için (Bağımlı katılımcılar için) çalışmaya dahil edilme ölçütleri şunlardır:

- 18-65 yaş aralığında olması,
- DSM-V tanı kriterlerine göre (ICD-10 F14) kokain kullanım bozukluğu tanısı almış olma,
- miRNA düzeyini etkileyebilecek durumların bulunmaması. (Kokain kullanım bozukluğu tanısı alan kullanıcılarda bağımlılık dışında bir psikiyatrik tanı ya da bedensel bir hastalığın bulunması gerekmektedir. Çünkü, miRNA çalışmalarının sonuçlarını etkileyebilir. Bunun için bireylerin seçimi sırasında katılımcıların tıbbi ve psikiyatrik öyküleri dikkate alınmıştır).

Bu çalışmanın örneklemini oluşturan sağlıklı kontrol grubu için çalışmaya dahil edilme ölçütleri şunlardır:

- 18-65 yaş aralığında olması,
- Herhangi bir tıbbi ya da psikiyatrik bozukluk tanısı olmaması,

- İlaç kullanımı olmaması,
- Herhangi bir madde bağımlılığının olmaması,
- Spor performansına katkıda bulunabilecek takviyeler kullanmaması,
- miRNA düzeyini etkileyebilecek durumların bulunmaması (Bireylerde bir psikiyatrik tanı ya da bedensel bir hastalığın bulunması, miRNA çalışmalarının sonuçlarını etkileyebilir. Bu nedenle, sağlıklı kontrol grubunu oluşturan bireylerin seçimi için hazırlanan katılımcı bilgi (veri) formu, katılımcıların tıbbi ve psikiyatrik öyküleri dikkate alınarak doldurulmuştur ve katılımcılar bu dahil edilme ölçütlerine göre çalışmaya dahil edilmiştir).

Çalışmadan Dışlanma Ölçütleri:

Gebeler ve 18 yaş altı çocuklar çalışmaya dahil edilmemiştir. Ayrıca her iki grup için (ikili çalışma grubu ve sağlıklı kontrol grubu) de mental retardasyon dışlama kriteri olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Çalışmanın değişkenleri

Bağımsız değişken: Kokain kullanım bozukluğu

Bağımlı değişken: miRNA ekspresyon düzeyleri

3.2.7. Çalışma materyali

Bu çalışmanın materyali hasta ve kontrollerden alınan periferik tam kan örnekleridir.

3.2.8. Veri toplama araçları

3.2.8.1. Sosyodemografik ve klinik veri formu

Bu çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden bireylere çalışmanın detayları ve süreçleri anlatılmıştır ve her bir bireyden bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alınmıştır. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu örneği Ek-3'de sunulmuştur. Bu araştırmada, ölçme aracı

olarak hazırlanan katılımcı bilgi formu, olgulardan ve tıbbi dosyadan alınan bilgilere göre doldurulmuştur. Bu bilgi formu şu bölümlerden oluşmaktadır: Sosyodemografik bilgiler (olgunun adı soyadı, doğum tarihi, cinsiyeti, iletişim bilgileri, kardeş sayısı, eğitim durumu, anne ve babanın her birinin yaşı, mesleği ve eğitim durumu, aile ekonomik düzeyi), Madde kullanım öyküsü (başlangıç tarihi, madde türleri, kullanım sıklığı ve miktarı ile ilgili bilgiler). Katılımcı bilgi formu örneği Ek-4'te sunulmuştur.

3.2.8.2. Hasta değerlendirmesi ve Periferik Tam Kan Örneklerinin Toplanması

Anatolia Klinikleri'ne başvuran hasta (bağımlı) bireylere, psikiyatristler tarafından yapılan muayene sonucunda DSM-V tanı kriterlerine göre kokain kullanım bozukluğu tanısı konmaktadır. Çalışma grubunu oluşturan bu bireylerden periferik kan örnekleri alınmıştır. Hasta bireylerden kan örneği bir defaya mahsus alınmıştır. Ancak, bu bireyler arasında kendilerine uygulanacak tedavi yöntemleri sonrasında tedavi grubuna gönüllü olarak katılmayı kabul eden bireylerden tedavi sonrası da olmak üzere bir defa daha kan örneği alınmıştır. Balıklı Rum Hastanesi Merkez Laboratuvarında toplanan kan numuneleri, 2–8°C'de 5 güne kadar hastane laboratuvarında saklanmıştır. Bu numuneler daha sonra, İ.Ü.-C. Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarına soğuk zincirde taşınarak, burada bulunan derin dondurucuda (-70 °C) saklanmıştır. Kontrol grubu için seçilen gönüllülerden kan örnekleri bir defa olmak üzere İ.Ü.-C. Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Numune Kabul Birimi'nde toplanmıştır. Bu toplanan numuneler de derin dondurucuda saklanmıştır. Çalışmada insan kan numunelerinin toplanması, stabilize edilmesi, saklanması ve taşınmasını sağlayan; içerisinde 6.9 mL RNA stabilize edici solüsyon içeren özel PAXgene Blood RNA tüpleri kullanılmıştır.

Periferik kanın toplanma zamanına bağlı olarak sırasıyla açlık-tokluk durumu, sigara ve alkol tüketimi, uyku süresi/düzeni, diyet ve fiziksel aktivite özellikleri için kandaki miRNA ekspresyon profillerinin bireyler arası varyasyon gösterecek olması dikkate alınarak, bu

çalışmada CUD olan hasta bireylerden ve CUD tedavisi gören bireylerden bu altı parametre için gerekli bilgiler alınmıştır. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin özellikle sigara ve alkol tüketimi ile ilgili olarak herhangi bir madde bağımlılığının olmamasına; uyku süresinin en az 6 saat olmasına; kan alımından önce tok olmasına; herhangi bir tıbbi ya da psikiyatrik bozukluk tanısının olmamasına; ilaç kullanımının olmamasına dikkat edilerek gruba seçimleri yapılmıştır.

3.2.8.3. Periferik tam kan örneklerinden total RNA izolasyonu

Periferik kan fraksiyonları arasındaki varyasyonlardan biri de bu fraksiyonların içindeki miRNA ekspresyon seviyeleridir (95). Bu çalışmada, olgu (çalışma) grubunda yer alan bireylerin periferik kan örneklerinde ekspresyon düzeyi araştırılan 4 hedef miRNA'nın kokain bağımlılığı ve kokain yoksunluğu durumunda hangi periferik kan fraksiyonunda değişiklik gösterdiği, kan çalışılmasından dolayı tespit edilemeyecektir. Başka bir ifade ile miRNA sinyallerinin hangi fraksiyondan geldiği belirsiz olacaktır çünkü bunlar lökositlerden, plazma/serumdan veya hücre dışı veziküllerden türetilir (72). Dolayısıyla, bu çalışmada, periferik kandan total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Total RNA izolasyonu için Qiagen PAXgene Blood miRNA Kit kullanılmıştır. Kit, bir PAXgene Blood RNA Tube'da toplanmış 2,5 ml insan kanından total RNA'nın saflaştırılmasına yöneliktir. Kan örnekleri toplandıktan sonra -70°C 'de saklandığı için oda sıcaklığına dengelemek üzere, tüpler izolasyon gününden 2 gün öncesinde -20°C 'de, bir gün öncesinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, daha sonra prosedüre başlamadan önce 1,5 saat boyunca oda sıcaklığında saklandıktan sonra, aşağıdaki basamaklar takip edilerek total RNA izolasyonu yapılmıştır:

- Tüpler 10 dakika boyunca 5000 x g hızda santrifüjlenir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak üzerine 4 mL Rnase free water eklenir.

- Pellet görünür şekilde çözününceye kadar vortekslenir ve ardından 10 dk boyunca 5000 x g'de santrifüj edilir, sonrasında süpernatant uzaklaştırılır.
- 350 µL resüspansiyon tamponu eklenir ve pellet görünür şekilde çözününceye kadar vortekslenir.
- Örnek 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne pipetlenir. 300 µL bağlama tamponu ve 40 µL proteinaz K eklenir. 5 sn boyunca vortekslenerek karıştırılır ve çalkalayıcı-inkübatör kullanarak 10 dk boyunca 55°C'de 1400 rpm hızda inkübe edilir.
- Numune doğrudan 2 mL'lik bir işleme tüpüne yerleştirilmiş kolona pipetlenir ve 15.000 x g hızda 3 dakika santrifüjlenir.
- Kolondaki tüm süpernatantı, işleme tüpündeki pelleti bozmadan yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- 700 µL izopropanol (%96-100, saflık derecesi p.a.) eklenir. Vorteksleyerek karıştırılır.
- 2 mL'lik işleme tüpüne yerleştirilmiş kolona 700 µL örnek pipetlenir ve 15.000 x g hızda 1 dk boyunca santrifüjlenir. Kolon yeni bir 2 mL'lik işleme tüpüne yerleştirilir.
- Kolona kalan örnek pipetlenir ve 15.000 x g hızda 1 dakika boyunca santrifüjlenir. Kolon yeni bir 2 mL'lik işleme tüpüne yerleştirilir.
- 350 µL yıkama tamponu kolona pipetlenir. 15 sn boyunca 12.000 x g hızda santrifüjlenir. Kolon yeni bir 2 mL'lik işleme tüpüne yerleştirilir.
- 10 µL Dnaz I stok solüsyonu 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde 70 µL DNA parçalama tamponuna eklenir. Tüpe parmakla hafifçe vurarak karıştırılır ve kısa süre santrifüjlenir.

- Dnaz I inkübasyon karışımı (80 µL) doğrudan kolonun membranına pipetlenir ve tezgah üzerinde (20-30°C) 15 dakika bekletilir.
- PAXgene RNA döndürme kolonuna 350 µL yıkama tamponu pipetlenir ve 12.000 x g hızda 15 sn boyunca santrifüjlenir. Kolon yeni bir 2 ml'lik işleme tüpüne yerleştirilir.
- Kolona 500 µL yıkama tamponu pipetlenir ve 12.000 x g hızda 15 sn boyunca santrifüjlenir. Kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne kolon yerleştirilir.
- PAXgene RNA döndürme kolonuna 500 µL daha yıkama tamponu eklenir. 12.000 x g hızda 2 dakika santrifüjlenir.
- Kolon yeni bir 2 mL'lik işleme tüpüne yerleştirilir. 20.000 x g hızda 1 dakika santrifüjlenir.
- Kolon 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir ve 40 µL elüsyon tamponu doğrudan kolonun membranına pipetlenir. Ardından RNA elüsyonu için 1 dk boyunca 12.000 x g hızda santrifüjlenir.
- Elüat çalkalayıcı-inkübatörde 5 dk boyunca 65°C'de sallamadan inkübe edilir. İnkübasyondan sonra hemen buz üzerinde soğutulur.
- İzole edilen kan örneklerindeki RNA miktarı önemlidir. Bu nedenle; elde edilen RNA'nın kalite kontrolü yapılmıştır. RNA kalite kontrolü; RNA saflığı ve RNA bütünlüğünün analizini kapsamaktadır. RNA saflığının belirlenmesi ise Qubit® Florometre cihazında RNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ile yapılmıştır. Total RNA izolasyonu, İ.Ü.-C. Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir ve elde edilen ürünler, diğer deneysel çalışmaların yapılacağı tarihe kadar yine üniversitenin laboratuvarında (-70 °C) saklanmıştır.

3.2.8.4. *Complementary DNA (cDNA) sentezi*

İzole edilen RNA'lardan miRCURY LNA RT Kit ile reverse/ters transkripsiyon (RT) işlemi uygulanarak daha stabil olan cDNA elde edilmiştir. Reaksiyon için kullanılan kit içerisindeki çözeltiler -20 °C'de; izole edilen total RNA'lar ise -70 °C'de saklandığı için buz üzerinde çözdürülmüştür. Kit protokolüne göre reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon steril PCR tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Bir örneklik için reaksiyon karışımı toplam 10 µL olacak şekilde Tablo II'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo II. cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µL)
RNA örneği (template RNA)	A µL
Rnaz içermeyen su	B µL
5x miRCURY SYBR® Green RT Reaction Buffer	2 µL
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µL
Toplam Reaksiyon hacmi	10 µL

Reaksiyon karışımına, izole edilen total RNA örnekleri (template RNA) 200 ng olacak şekilde hesaplanarak eklenmiştir. Buna göre, Tablo III'de RNA örneği (A) ile Rnaz içermeyen su (B) ile karışımının nasıl hesaplandığı üzerine örnekler verilmiştir. Toplam reaksiyon hacmine göre $A+B=7$ µL olarak hesaplanmıştır.

Tablo III. cDNA sentezi için RNA örneği-su karışımının hesaplanması.

Örnek adı	RNA konsantrasyonu	RNA (A) miktarı = 200/RNA konsantrasyonu	Su (B) miktarı = 7-RNA miktarı
Örnek 1	100 ng/μL	200 / 100 = 2 μL	7-2=5 μL
Örnek 2	150 ng/μL	200 / 200 = 1 μL	7-1=6 μL

PCR tüpleri kısa bir süre spin yapılmıştır. Ardından, PCR cihazına (Thermal cycler) yerleştirilmiştir. cDNA sentez reaksiyon koşulları Tablo IV’te verilmiştir.

Tablo IV. cDNA sentez reaksiyonu koşulları.

Süre	Sıcaklık
60 dk	42°C
5 dk	95°C
∞	4°C

Tüpler -20°C’ye kaldırılarak, qRT-PCR aşamasına kadar saklanmıştır. Tüm cDNA reaksiyonları ikili tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.5. *miRNA’ların kantitatif gerçek zamanlı PCR analizleri için kullanılan primerler*

Bu çalışmada, kokain bağımlılığı düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülen aday miRNA’lar, “Web of Science”, “PubMed”, “Google Scholar” ve “Sciencedirect” veritabanlarında “addiction”, “substance abuse”, “cocaine addiction”, cocaine use disorder”, “microRNA”, “bağımlılık”, “madde kötüye kullanımı”, “kokain bağımlılığı”, “kokain kullanım bozukluğu” ve “mikroRNA” arama terimleri kullanılarak, son 25 yılı kapsayan literatürün detaylı bir şekilde incelenmesi sonucunda ilgili bilimsel makalelerden alınan referanslarla tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu aday miRNA’lar “mirbase” (Versiyon 22,

<http://www.mirbase.org/>) ve “targetscan” (<http://www.targetscan.org/>) veri tabanlarında taranmış ve toplanan verilerle belirlenmiştir. Bu çalışmada normalleştiriciler olarak SNORD44 ve SNORD48 olmak üzere 2 adet housekeeping (referans) gen seçilmiştir. Aday miRNA’lar olarak da miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p seçilmiştir. Çalışılacak miRNA’lara ait dizi bilgileri miRBase veri tabanından alınmıştır (46). Aday miRNA dizileri Tablo V’de verilmiştir.

Tablo V. Aday miRNA dizileri.

miRBase ID	miRNA dizisi
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-26b-5p	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
hsa-miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG
hsa-miR-134-5p	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG

3.2.8.6. *Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması*

miRNA’ların amplifiye edilmesi ve düzeylerinin ölçülmesi qRT-PCR Rotor-Gene Q cihazında miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit kullanılarak ticari firma protokolleri çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Liyofilize halde temin edilen her bir primer assay’ler 220 µL nükleaz içermeyen su ile sulandırılmıştır. Ardından, kısa bir vorteks ve spin yapılmıştır. 20 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından alikotlanarak -20 °C’ye kaldırılmıştır. cDNA örnekleri 1:10 oranında (10 µL cDNA+90 µL Rnaz içermeyen su) seyreltilmiştir. Bir örneklik için qRT-PCR bileşenleri Tablo VI’de verilmiştir.

Tablo VI. qRT-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µL)
2x miRCURY SYBR® Green Master Mix	5 µL
Primer	1 µL
cDNA template	3 µL
Rnaz içermeyen su	1µL
Toplam reaksiyon hacmi	10 µL

cDNA örnekleri dışında diğer bileşenler belirtilen miktarlarda 1,5 mL’lik ependorf tüpe konularak mix hazırlanmıştır. Bu hazırlanan mix’den, her bir PCR strip tüpüne 6 µL ilave edilmiştir. Ardından, çalışma ve kontrol grubu bireylerine ait olan cDNA’lar, PCR strip tüplerine ilave edilmiştir. Son olarak, tüpler 72 kuyucuklu olan Rotor Gene cihazına yerleştirilmiştir. qRT-PCR koşulları Tablo VII’de verilmiştir.

Tablo VII. qRT-PCR Koşulları.

Basamak	Süre	Sıcaklık
PCR Başlangıç	2 dk	95 °C
Aktivasyonu		
2 Basamaklı Döngü		
Denatürasyon	10 s	95 °C
Primer Bağlanması/Uzama	60 s	56°C
Döngü Sayısı	40	
Erime Eğrisi Analizi		65-95 °C

qRT-PCR sonuçları, Livak ve Schmittgen'nin 2001 (110) yılında yaptıkları çalışmada tanımladığı şekilde “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu” kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir örnek için qRT-PCR reaksiyonları iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Böylece, her bir örneğe ait referans ve hedef miRNA'lar için Real-time PCR sonucunda iki tane “döngü eşik (Cycle threshold; C_t)” değeri elde edilmiştir. C_t değerleri ile ilgili tüm sayısal veriler Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Ardından, her bir örnekte, her bir miRNA (referans ve hedef miRNA'ları) için elde edilen C_t sonuç değerlerinin ortalaması alınarak “ortalama C_t ” değeri hesaplanmıştır. Microsoft Excel'de, her bir örnek için aday miRNA'ların C_t değerlerinden, referans genlerin C_t değerleri çıkartılarak normalize edilmiştir. Bu şekilde, her bir örnekte, her bir gen için delta C_t (ΔC_t) değeri hesaplanmış; $\Delta C_t = C_t (\text{hedef gen}) - C_t (\text{referans gen})$ formülü ile belirlenmiştir. Ardından, her bir bağımlı ve tedavi grubunun ΔC_t değerleri, kontrol grubunun ortalama ΔC_t değerinden çıkartılarak delta delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) değerleri hesaplanmış; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{bağımlı/tedavi grubu}) - \Delta C_t (\text{kontrol grubu})$ formülü ile belirlenmiştir. Tüm miRNA'ların ekspresyon düzeyini belirlemek için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ analizleri yapılmıştır. Son olarak, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre miRNA ekspresyon düzeylerindeki “fold change” (kat değişimi) değeri belirlenmiştir. miRNA ekspresyon düzeyleri genel olarak kat değişimi hesaplaması yapılarak belirtilmiştir. İstatistiksel analizlerde bu değişim kullanılmamış, ΔC_t değerleri üzerinden analizler yapılmıştır.

3.2.8.7. İstatiksel analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS 20 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. İkili çalışma grubunun (bağımlı grubu ile tedavi grubu) ve kontrol grubunun miRNA ekspresyon seviyelerinin normal dağılıma sahip olup olmadığı tespit edilmiştir. İlk olarak bağımlı grubu, tedavi grubu ve kontrol grubunun miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p miRNA'larının ΔC_t değerleri için Skewness (çarpıklık) ve Kurtosis (basıklık) değerleri hesaplanmıştır. George ve Mallery'a (2010) göre, Skewness ve Kurtosis değerleri için -2 ve

+2 arasında yer alan verilerin normal dağılıma uygun olduğu kabul edilmiştir (111). Buna göre, -2 ve +2 arasındaki verilerin normal dağılım gösterdiği kabul edilmiştir. Ardından, yapılan Shapiro-Wilk testi sonucuna göre, $p > 0,05$ değerlerin normal dağılım gösterdiği kabul edilmiştir. Gruplar arası homojenliği tespit etmek için Levene testi kullanılmıştır. Bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında aday miRNA'ların ΔC_t değerleri açısından fark olup olmadığı One-way ANOVA testi ile analiz edilmiştir. Post-hoc test olarak LSD testi ya da Tamhane's T2 testi kullanılmıştır. miRNA'ların ekspresyonları ile bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin klinik verileri arasında korelasyon olup olmadığı normal dağılım gösteren gruplarda Pearson korelasyon analizi; normal dağılım göstermeyen gruplarda Spearman korelasyon testi kullanılarak belirlenmiştir. Grafikler, Graphpad Prism ver. 8.4.3 programı ile oluşturulmuştur. Değişkenlerin tanısal performans incelemesi için ROC (receiver operating characteristic, alıcı işlem karakteristiği) analizi yöntemi kullanılmıştır. ROC analizi ile değişkenler için uygun kestirim noktaları, Sensitivite (Duyarlılık), Spesifite (Özgüllük) değerleri ve eğri altında kalan alanlar (area under the curve, AUC) incelenmiştir. AUC 0,50 ile 1 arasında değer alır. AUC değeri 1 değerine yaklaştıkça sonuçların doğruluğu artar. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Katılımcıların Demografik Verileri

4.1.1. Cinsiyet ve yaş

Bu çalışmanın, bağımlı grubuna kokain bağımlısı olan ve tedavi olmak üzere henüz başvurmuş olan 12 erkek birey; tedavi grubuna kokain bağımlısı olan ve tedavi olmak üzere henüz başvurmuş olan bireyler arasında kendilerine uygulanacak tedavi yöntemleri sonrasında bu gruba gönüllü olarak katılmayı kabul eden bireylerden ve/veya Anatolia Kliniği'nde halihazırda kokain bağımlılığı tedavisi görmekte olan 11 erkek birey; kontrol grubuna daha önce hiç kokain kullanmamış ve herhangi bir madde bağımlılığı olmayan 16 sağlıklı erkek birey dahil edilmiştir.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında yer alan bireylerin periferik kan örneklerinde ekspresyon düzeyi araştırılan 4 aday miRNA'nın kokain bağımlılığı ve kokain yoksunluğu durumunda hangi periferik kan fraksiyonunda değişiklik gösterdiği, tam kan çalışılacak olmasından dolayı tespit edilemeyecektir. Ancak, daha çok çevresel faktörlerin miRNA'lar üzerinde değişiklik meydana getirdiği bilinen serum ve plazma fraksiyonları da periferik kan örneğine dahil olacağından dolayı; bu çalışmada kontrol grubuna çoğunluğu 18-21 yaş arası olan bireyler, bağımlı ve tedavi gruplarına ise yaş farkı birbirine yakın olan bireyler tercih edilerek, özellikle çevresel faktörlerin miRNA'lar üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin en aza indirgenmiş olduğu ve kontrol grubunda miRNA ifadeleri için yaş faktörünün kontrol altına alındığı düşünülmektedir.

Bağımlı grubunun yaş ortalaması $35,17 \pm 5,86$, tedavi grubunun yaş ortalaması $36,55 \pm 10,76$ ve kontrol grubunun yaş ortalaması $22,25 \pm 5,94$ olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun ortalama yaş değerleri Tablo VIII'de gösterilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarının yaş değişkeni açısından normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek için Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-

Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda 0,26-(-1,67); tedavi grubunda 1,82-4,04; kontrol grubunda 2,29-5,11 bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı grubunda $p>0,05$; tedavi ve kontrol gruplarında $p<0,05$ bulunduğu için grupların yaş açısından normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir. Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05'ten büyük olduğu için ($p = 0,226$) yaş değişkeni açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Kruskal Wallis testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında yaş değişkeni açısından anlamlı fark bulunmuştur ($F=15,266$; $p<0.01$). Bu farklılık, post-hoc testinde Tamhane's T2 testi ile değerlendirilmiştir. Tablo IX incelendiğinde, yaş değişkeni açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında ve tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken, bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Tablo VIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama yaş değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Bağımlı	12	35,17 $\pm$ 5,86	28	44
Tedavi	11	36,55 $\pm$ 10,76	25	64
Kontrol	16	22,25 $\pm$ 5,94	18	40

Tablo IX. Çalışmaya katılan bireylerin yaş değişkeni açısından gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	P değeri
Bağımlı-Kontrol	<0,001
Tedavi-Kontrol	0,004
Tedavi-Bağımlı	0,976

4.1.2. Boy ve kilo

Bağımlı grubunun boy ortalaması 178,6 $\pm$ 6,10, tedavi grubunun boy ortalaması 176,5 $\pm$ 6,30 ve kontrol grubunun boy ortalaması 178,3 $\pm$ 5,42 olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun

ortalama boy değerleri Tablo X’de gösterilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarının boy değişkeni açısından normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek için Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda 0,52-(-0,06); tedavi grubunda 0,77-(-0,45); kontrol grubunda -0,55-0,15 bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında $p>0,05$ bulunduğu için grupların boy açısından normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05’ten büyük olduğu için ($p = 0,687$) boy değişkeni açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Tek yönlü ANOVA testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında boy değerleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($F=0,439$; $p>0,05$).

Tablo X. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama boy değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Bağımlı	12	178,6 $\pm$ 6,10	170	190
Tedavi	11	176,5 $\pm$ 6,30	170	189
Kontrol	16	178,3 $\pm$ 5,42	166	186

Bağımlı grubunun kilo ortalaması 84,50 $\pm$ 13,2, tedavi grubunun kilo ortalaması 79,27 $\pm$ 11,7 ve kontrol grubunun kilo ortalaması 72,5 $\pm$ 9 olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun ortalama kilo değerleri Tablo XI’de gösterilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarının kilo değişkeni açısından normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek için Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda -0,05-1,28; tedavi grubunda -0,21-0,59; kontrol grubunda 0,64-0,48 bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında $p>0,05$ bulunduğu için grupların kilo açısından normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05’ten büyük olduğu için ($p =$

0,650) kilo değişkeni açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Tek yönlü ANOVA testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında kilo değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur ($F=2,070$; $p<0.05$). Bu farklılık, post-hoc testinde LSD testi ile değerlendirilmiştir. Tablo XII incelendiğinde, kilo değişkeni açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında ve bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Tablo XI. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama kilo değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Bağımlı	12	84,50 $\pm$ 13,2	57	109
Tedavi	11	79,27 $\pm$ 11,7	57	98
Kontrol	16	72,5 $\pm$ 9	58	92

Tablo XII. Çalışmaya katılan bireylerin kilo değişkeni açısından gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	P değeri
Bağımlı-Kontrol	0,008
Tedavi-Kontrol	0,130
Bağımlı-Tedavi	0,270

Bağımlı grubunun vücut kütle indeksi (body mass index, BMI) ortalaması $26,57 \pm 4,32$, tedavi grubunun BMI ortalaması $25,46 \pm 3,40$ ve kontrol grubunun kilo ortalaması $22,79 \pm 2,38$ olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun ortalama BMI değerleri Tablo XIII’de gösterilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarının BMI değişkeni açısından normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek için Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda -0,53-1,16; tedavi grubunda -1,53-2,91; kontrol grubunda 0,40-(-0,92)

bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında $p>0,05$ bulunduğu için grupların BMI açısından normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05'ten büyük olduğu için ($p = 0,477$) BMI değişkeni açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Tek yönlü ANOVA testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında kilo değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur ($F=4,719$; $p<0.05$). Bu farklılık, post-hoc testinde LSD testi ile değerlendirilmiştir. Tablo XIV incelendiğinde, BMI değişkeni açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken; bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Tablo XIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerin ortalama BMI değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Bağımlı	12	26,57 $\pm$ 4,32	17,21	33,64
Tedavi	11	25,46 $\pm$ 3,40	17,21	29,59
Kontrol	16	22,79 $\pm$ 2,38	19,08	26,59

Tablo XIV. Çalışmaya katılan bireylerin BMI değişkeni açısından gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	P değeri
Bağımlı-Kontrol	0,006
Tedavi-Kontrol	0,050
Bağımlı-Tedavi	0,436

4.1.3. Madde Kullanım Öyküleri

Kokain kullanım bozukluğu olan 12 bireyden dördünün kokain ve sigara; beşinin kokain, sigara ve alkol; üçünün kokain, sigara, alkol ve esrar kullanımının olduğu kaydedilmiştir. Kokain bağımlısı hastaların çoğunluğunun 1 yıldan uzun kokain kullanım

öyküsü bulunmaktadır ve bu oran %66,7'dir. On bir (%91,7) hasta günlük 1 g'ın üzerinde kokain kullanmaktadır. Sekiz (%66,7) hasta toz kokaini burundan çekerek kullanmaktadır. Dokuz (%75) hastanın kokain kullanım sıklığının her gün üç defanın üzerinde olduğu kaydedilmiştir. Toplamda 10 (%83,3) hastanın ilk detoksifikasyon tedavisi tamamlanmıştır. Kokain bağımlısı olan bireylerin madde kullanım öyküleri Tablo XV'te verilmiştir.

Tablo XV. Kokain bağımlısı olan bireylerin madde kullanım öyküleri.

Özellikler	Bağımlı grubu	Oran (%)
Tercih maddesi		
Kokain	12	100
Alkol	8	66,7
Sigara	12	100
Esrar	3	25
Kullanım süresi (ay)		
<12	4	33,3
12-24	1	8,3
24-48	5	41,7
48-96	2	16,7
Günlük doz (g)		
<1	1	8,3
1-2	5	41,7
>2	6	50
Kullanılan kokain türü		
Toz kokain	8	66,7
Crack kokain	4	33,3
Kullanım sıklığı		
<1 kez/gün	3	25
1-3 kez/gün	9	75
En son kullanım (gün)		
<1	6	50
1-3	4	33,3
3-7	1	8,3
>7	1	8,3
Detoksifikasyon sıklığı		
<2	10	83,3
2-4	1	3,3
>4	1	3,3

Tablo XVI. Kokain bağımlılığı tedavi gören bireylerin madde kullanım öyküleri.

Özellikler	Tedavi grubu	Oran (%)
Tercih maddesi		
Kokain	12	100
Alkol	7	63,6
Sigara	10	90,9
Esrar	3	27,3
Kullanım süresi (ay)		
<12	2	18,2
12-24	4	36,4
24-48	2	18,2
48-96	1	9,1
≥96	2	18,2
Günlük doz (g)		
<1	1	9,1
1-2	5	45,5
>2	5	45,5
Kullanılan kokain türü		
Toz kokain	10	90,9
Crack kokain	1	9,1
Kullanım sıklığı		
<1 kez/gün	3	27,3
1-3 kez/gün	8	72,7
En son kullanım (gün)		
<1	5	45,5
3-7	2	18,2
>10	4	36,4
Detoksifikasyon sıklığı		
<2	7	63,6
2-4	4	36,4
Tedavi türü		
Detoksifikasyon	10	90,9
Vanokserin	1	9,1

4.2. RNA İzolasyonu Sonuçları

Çalışmaya katılan bireylerden elde edilen numunelerden total RNA izolasyonları başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. RNA izolasyonu yapılan kokain bağımlısı olan 12 bireye

ait RNA örneklerinin konsantrasyonu 60-200 ng/ μ L; kokain bağımlılığı tedavisi gören 11 bireye ait RNA örneklerinin konsantrasyonu 40-200 ng/ μ L; sağlıklı 16 bireye ait RNA örneklerinin konsantrasyonu 70-200 ng/ μ L arasında değişmektedir. Tüm örneklerde RNA izolasyonu ve RNA miktar ölçümleri bir kere gerçekleştirilmiştir. Katılımcılardan elde edilen örneklerin total RNA konsantrasyonları Tablo XVII’de gösterilmiştir.

Tablo XVII. Çalışmaya katılan bireylerden elde edilen örneklerin total RNA konsantrasyonları.

Birey No	Total RNA konsantrasyonu (ng/ μ L)
H1	78,8 ng/ μ L
H2	65,8 ng/ μ L
H3	130 ng/ μ L
H4	134 ng/ μ L
H5	67,4 ng/ μ L
H6	78,4 ng/ μ L
H7	200 ng/ μ L
H8	110 ng/ μ L
H9	200 ng/ μ L
H10	63,2 ng/ μ L
H11	100 ng/ μ L
H12	190 ng/ μ L
T1	62,4 ng/ μ L
T2	200 ng/ μ L
T3	89,4 ng/ μ L
T4	130 ng/ μ L
T5	43,2 ng/ μ L
T6	200 ng/ μ L
T7	110 ng/ μ L
T8	114 ng/ μ L
T9	106 ng/ μ L
T10	114 ng/ μ L
T11	128 ng/ μ L

K1	99,4 ng/μl
K2	81 ng/μL
K3	71 ng/μL
K4	200 ng/μL
K5	138 ng/μL
K6	168 ng/μL
K7	136 ng/μL
K8	110 ng/μL
K9	142 ng/μL
K10	132 ng/μL
K11	148 ng/μL
K12	130 ng/μL
K13	170 ng/μL
K14	114 ng/μL
K15	94,6 ng/μL
K16	166 ng/μL

H:Hasta (bağımlı) grubu; T: Tedavi grubu; K: Kontrol grubu

4.3. İkili Çalışma Grupları ve Kontrol Grubunda Periferik Kan miRNA Ekspresyon Analizleri

Bu çalışmada, kokain bağımlılığı düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'lerden miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p aday miRNA'lar olarak seçilerek; kokain bağımlısı olan 12 birey, kokain bağımlılığı tedavisi gören 11 birey ve kontrol grubunu oluşturan 16 sağlıklı bireye ait örneklerde qRT-PCR yöntemi kullanılarak miRNA'ların ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu aday miRNA'ların ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemiyle analiz edilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında miRNA sonuçları incelenmiştir. Bunun için ilk olarak her bir örnekte her bir aday miRNA için ΔCT değerleri hesaplanmıştır. Ardından, ΔCT değerleri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak analiz

edilmiştir ve p değerleri hesaplanmıştır. Son olarak, gruplar arasında miRNA periferik kan düzeyleri açısından gözlemlenen değişim “fold change” değerleri ile hesaplanmıştır.

Kokain bağımlısı olan bireylerden oluşan bağımlı grubuna; kokain bağımlılığı tedavisi gören bireylerden oluşan tedavi grubuna ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna ait periferik kan miRNA Δ CT değerleri Tablo XVIII’de verilmiştir.

Tablo XVIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerine ait miRNA Δ CT değerleri.

Birey No	miR-9-5p Δ CT	miR-26b-5p Δ CT	miR-132-3p Δ CT	miR-134-5p Δ CT
H1	7,94	-2,19	1,54	6,42
H2	10,145	-0,835	3,165	8,285
H3	11,7725	0,6525	5,2075	8,2375
H4	9,6275	-1,1825	1,9875	6,8675
H5	9,405	-1,775	0,785	4,44
H6	7,5725	-3,0975	-1,2575	2,7925
H7	11,5	0,135	4,6	8,255
H8	12,69	1,46	5,27	8,33
H9	14,18	4,69	6,89	10,09
H10	8,45	-2,185	0,275	2,725
H11	13,1325	3,5025	6,0025	9,7875
H12	12,3375	1,9675	5,3525	9,5075
T1	12,955	3,375	4,725	10,175
T2	12,3525	1,8525	5,5275	9,4675
T3	10,2575	-0,7825	2,4525	6,8225
T4	13,3925	3,5875	6,1425	11,3975
T5	10,82	0,655	3,44	6,785
T6	14,54	3,58	6,985	11,45
T7	13,48	4,425	6,125	9,9
T8	12,3025	3,3425	5,1325	9,8875
T9	12,705	3,315	6,38	9,61
T10	13,1625	4,7275	7,0425	7,5375
T11	14,1225	5,0525	6,5975	9,9775

K1	9,885	-0,195	5,565	8,435
K2	12,0525	1,5725	6,4875	9,6025
K3	11,435	2,445	7,665	11,495
K4	10,3875	-0,9425	5,6475	9,2875
K5	12,38	0,925	5	8,755
K6	8,99	-2,92	3,11	6,47
K7	9,99	-1,24	7,335	9,2
K8	13,835	7,585	12,13	14
K9	13,17	5,1	6,865	12,56
K10	12,41	2,435	6,245	9,585
K11	10,5525	-1,0375	4,4225	9,1575
K12	13,2175	2,8675	6,6925	10,3525
K13	10,7	1,2	4,425	8,86
K14	6,6325	-4,2075	1,2575	4,1725
K15	9,995	-1,485	5,455	8,265
K16	10,0175	-1,2225	8,6675	7,2025
H:Hasta (bağımlı) grubu; T: Tedavi grubu; K: Kontrol grubu				

4.3.1. miR-9-5p ekspresyon analizi

Bağımlı grubunun miR-9-5p ΔCt değerleri ortalaması $10,73 \pm 2,18$, tedavi grubunun miR-9-5p ΔCt değerleri ortalaması $12,74 \pm 1,29$ ve kontrol grubunun miR-9-5p ΔCt değerleri ortalaması $10,98 \pm 1,84$ olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun ortalama miRNA ΔCt değerleri Tablo XIX’de gösterilmiştir. Bağımlı grubu, tedavi grubu ve kontrol grubunun miR-9-5p ΔCt değerleri için normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda $0,01(-1,29)$; tedavi grubunda $(-0,8)-0,26$; kontrol grubunda $(-0,52)-0,63$ bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında $p > 0,05$ bulunduğu için grupların miR-9-5p ΔCt değerleri açısından normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

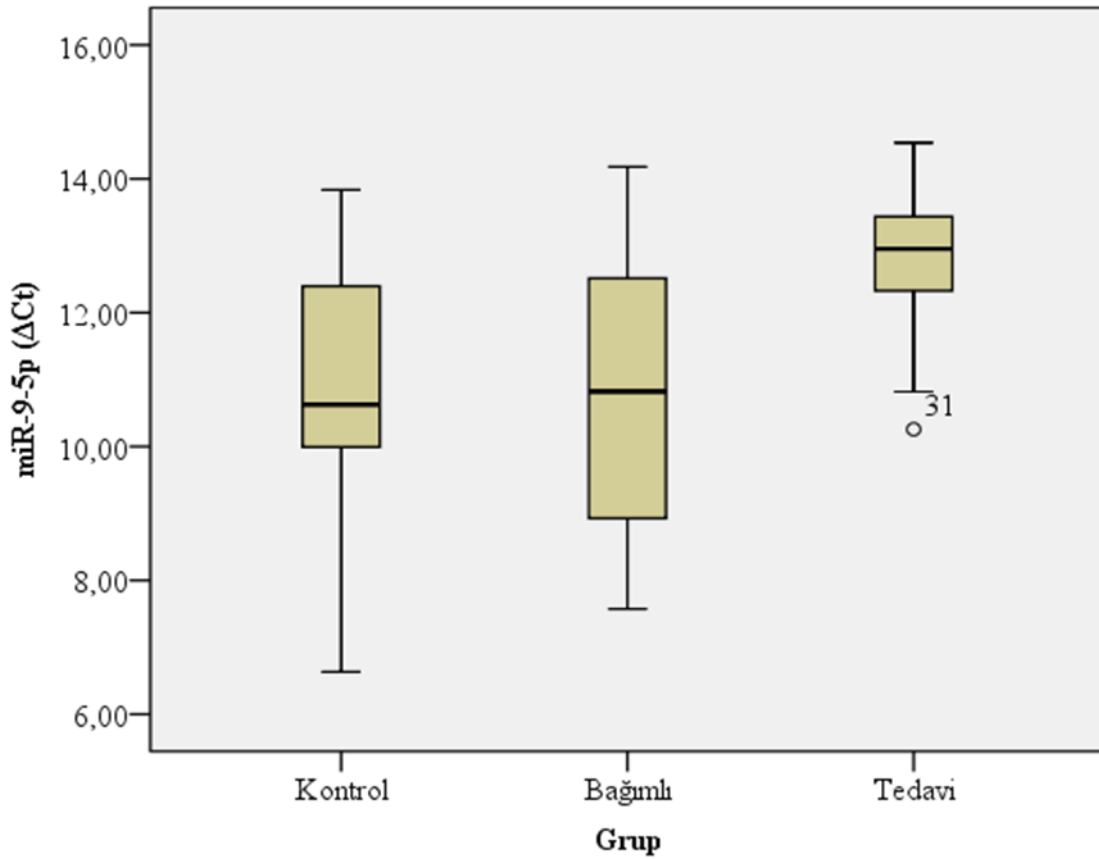
Tablo XIX. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-9-5p Δ Ct değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Bağımlı	12	10,73 $\pm$ 2,18
Tedavi	11	12,74 $\pm$ 1,29
Kontrol	16	10,98 $\pm$ 1,84

Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05'ten büyük olduğu için ($p = 0,087$) miR-9-5p Δ Ct değerleri açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Tek yönlü ANOVA testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında Δ Ct değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur ($F=4,199$; $p<0.05$). Bu farklılık, post-hoc testinde LSD analizi uygulanarak değerlendirilmiştir. Tablo XX incelendiğinde, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken, bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. miR-9-5p Δ CT dağılımlarının kutu grafikleri (boxplot) Şekil 9'da verilmiştir.

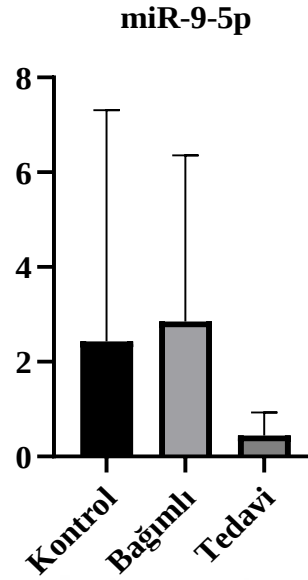
Tablo XX. miR-9-5p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	p değeri
Tedavi-Kontrol	0,019
Tedavi-Bağımlı	0,012
Kontrol-Bağımlı	0,723



Şekil 9: miR-9-5p düzeylerinin ΔC_t değerleri üzerinden karşılaştırılması.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin miR-9-5p ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplanmıştır. Bağımlı grubunda miR-9-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2,849$; tedavi grubunda miR-9-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 0,444$; kontrol grubunda miR-9-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2,433$ olarak hesaplanmıştır. Buna göre, ekspresyon düzeyleri bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 1,17 kat arttığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 5,48 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 6,41 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında miR-9-5p için ekspresyon düzeylerindeki kat değişimi sonuçları Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10: miR-9-5p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi (2^{-ΔΔCT}).

4.3.2. miR-26b-5p ekspresyon analizi

Bağımlı grubunun miR-26b-5p ΔCt değerleri ortalaması $0,10 \pm 2,43$, tedavi grubunun miR-9-5p ΔCt değerleri ortalaması $3,01 \pm 1,77$ ve kontrol grubunun miR-26b-5p ΔCt değerleri ortalaması $0,68 \pm 2,99$ olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun ortalama ΔCt değerleri Tablo XXI'de gösterilmiştir. Bağımlı grubu, tedavi grubu ve kontrol grubunun miR-26b-5p ΔCt değerleri için normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda $0,61-(-0,56)$; tedavi grubunda $(-1,15)-0,86$; kontrol grubunda $0,68-0,63$ bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında $p > 0,05$ bulunduğu için grupların miR-26b-5p ΔCt değerleri açısından normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

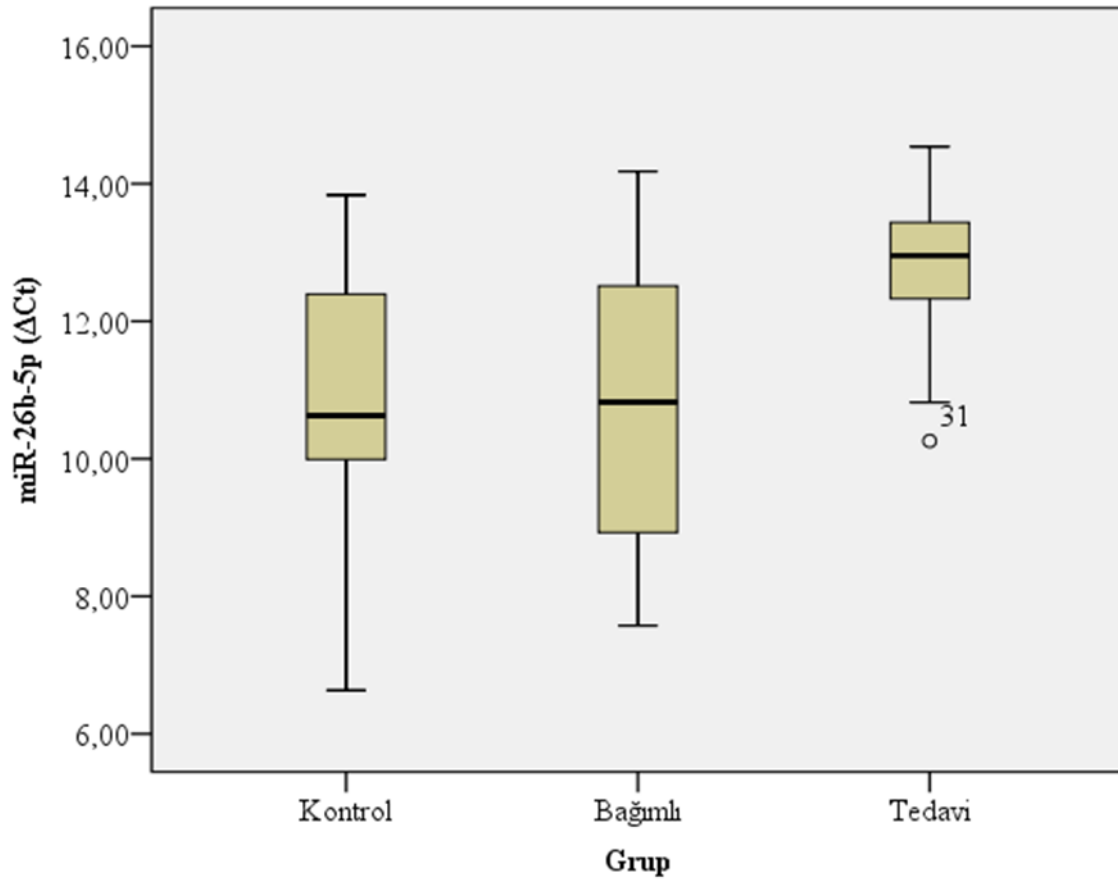
Tablo XXI. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-26b-5p Δ Ct değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Bağımlı	12	0,10 $\pm$ 2,43
Tedavi	11	3,01 $\pm$ 1,77
Kontrol	16	0,68 $\pm$ 2,99

Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05'ten büyük olduğu için ($p= 0,228$) miR-26b-5p Δ Ct değerleri açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Tek yönlü ANOVA testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında Δ Ct değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur ($F=4,288$; $p<0.05$). Bu farklılık, post-hoc testinde LSD analizi uygulanarak değerlendirilmiştir. Tablo XXII incelendiğinde, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken, bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. miR-26b-5p Δ CT dağılımlarının kutu grafikleri (boxplot) Şekil 11'de verilmiştir.

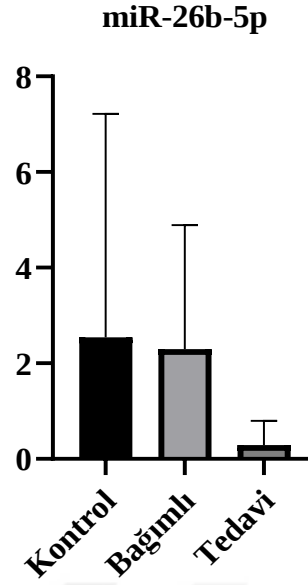
Tablo XXII. miR-26b-5p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	p değeri
Tedavi-Kontrol	0,024
Tedavi-Bağımlı	0,009
Kontrol-Bağımlı	0,549



Şekil 11: miR-26b-5p düzeylerinin ΔC_t değerleri üzerinden karşılaştırılması.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin miR-26b-5p ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplanmıştır. Bağımlı grubunda miR-26b-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2,296$; tedavi grubunda miR-26b-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 0,293$; kontrol grubunda miR-26b-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2,541$ olarak hesaplanmıştır. Buna göre, ekspresyon düzeyleri bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 1,11 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 8,68 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 7,84 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında miR-26b-5p için ekspresyon düzeylerindeki kat değişimi sonuçları Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12: miR-26b-5p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi (2^{-ΔΔCT}).

4.3.3. miR-132-3p ekspresyon analizi

Bağımlı grubunun miR-132-3p ΔCt değerleri ortalaması $3,32 \pm 2,61$, tedavi grubunun miR-132-3p ΔCt değerleri ortalaması $5,50 \pm 1,47$ ve kontrol grubunun miR-132-3p ΔCt değerleri ortalaması $6,06 \pm 2,42$ olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun ortalama ΔCt değerleri Tablo XXIII’de gösterilmiştir. Bağımlı grubu, tedavi grubu ve kontrol grubunun miR-132-3p ΔCt değerleri için normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda $-0,36(-1,16)$; tedavi grubunda $(-1,09)- 0,46$; kontrol grubunda $(0,54)- 2,17$ bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında $p > 0,05$ bulunduğu için grupların miR-132-3p ΔCt değerleri açısından normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

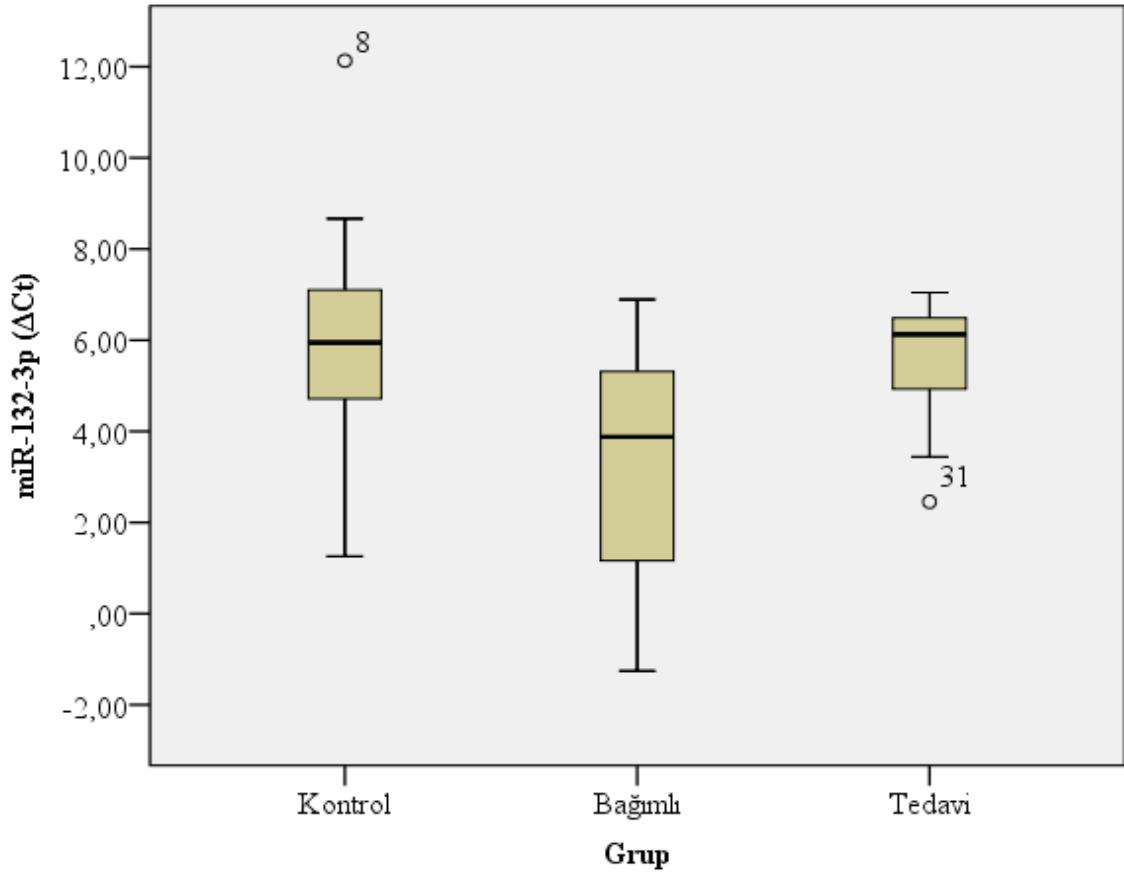
Tablo XXIII. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-132-3p Δ Ct değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Bağımlı	12	3,32 $\pm$ 2,61
Tedavi	11	5,50 $\pm$ 1,47
Kontrol	16	6,06 $\pm$ 2,42

Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05'ten büyük olduğu için ($p = 0,158$) miR-132-3p Δ Ct değerleri açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Tek yönlü ANOVA testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında Δ Ct değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur ($F=5,328$; $p<0.05$). Bu farklılık, post-hoc testinde LSD analizi uygulanarak değerlendirilmiştir. Tablo XXIV incelendiğinde, kontrol grubu ile bağımlı grubu arasında, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. miR-132-3p Δ CT dağılımlarının kutu grafikleri (boxplot) Şekil 13'de verilmiştir.

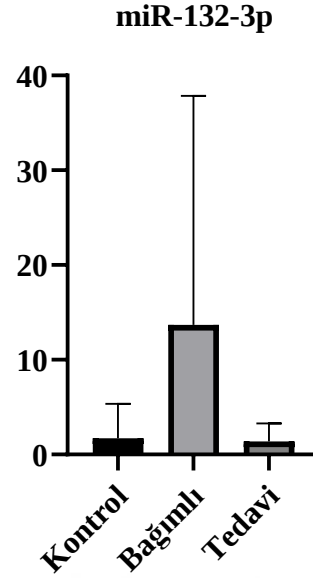
Tablo XXIV. miR-132-3p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	p değeri
Kontrol-Bağımlı	0,003
Tedavi-Bağımlı	0,026
Kontrol-Tedavi	0,534



Şekil 13: miR-132-3p düzeylerinin ΔC_t değerleri üzerinden karşılaştırılması.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin miR-132-3p ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplanmıştır. Bağımlı grubunda miR-132-3p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 13,692$; tedavi grubunda miR-132-3p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,379$; kontrol grubunda miR-132-3p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,721$ olarak hesaplanmıştır. Buna göre, ekspresyon düzeyleri bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 7,96 kat arttığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 1,25 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 9,93 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında miR-132-3p için ekspresyon düzeylerindeki kat değişimi sonuçları Şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 14: miR-132-3p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi (2^{-ΔΔCT}).

4.3.4. miR-134-5p ekspresyon analizi

Bağımlı grubunun miR-134-5p ΔCt değerleri ortalaması $7,14 \pm 2,57$, tedavi grubunun miR-134-5p ΔCt değerleri ortalaması $9,36 \pm 1,63$ ve kontrol grubunun miR-134-5p ΔCt değerleri ortalaması $9,21 \pm 2,31$ olarak hesaplanmıştır. Bu üç grubun ortalama ΔCt değerleri Tablo XXV’de gösterilmiştir. Bağımlı grubu, tedavi grubu ve kontrol grubunun miR-134-5p ΔCt değerleri için normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Skewness ve Kurtosis değerleri ile birlikte Shapiro-Wilk testi sonucu incelenmiştir. Buna göre, Skewness-Kurtosis değerleri sırasıyla, bağımlı grubunda $-0,81(-0,59)$; tedavi grubunda $(-0,60) - (-0,70)$; kontrol grubunda $(0,02) - 1,22$ bulunmuştur. Shapiro-Wilk testi sonucu bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında $p > 0,05$ bulunduğu için grupların miR-134-5p ΔCt değerleri açısından normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

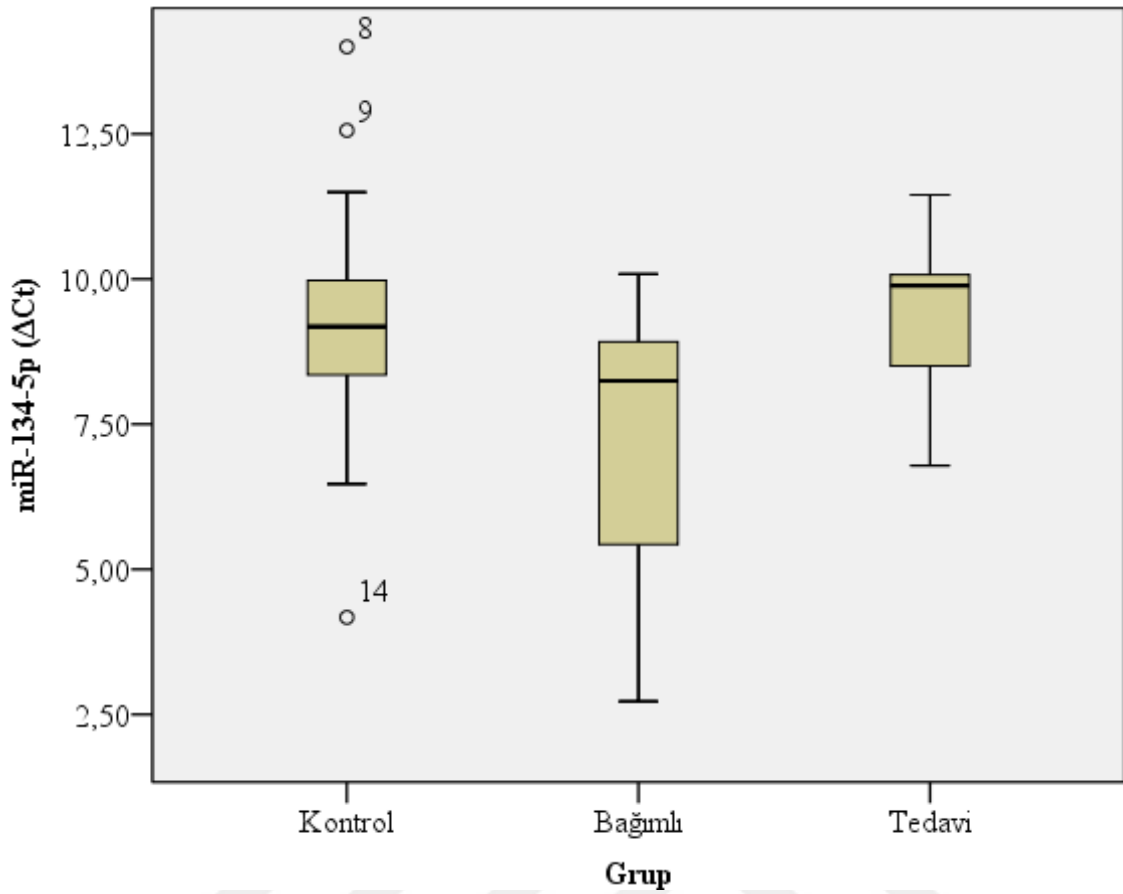
Tablo XXV. Bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin ortalama miR-134-3p Δ Ct değerleri.

Grup	Birey sayısı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Bağımlı	12	7,14 $\pm$ 2,57
Tedavi	11	9,36 $\pm$ 1,63
Kontrol	16	9,21 $\pm$ 2,31

Levene testi sonucuna göre anlamlılık değeri 0,05'ten büyük olduğu için ($p = 0,373$) miR-132-3p Δ Ct değerleri açısından gruplar homojen varyans göstermiştir. Tek yönlü ANOVA testi ile bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında Δ Ct değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur ($F=3,802$; $p<0.05$). Bu farklılık, post-hoc testinde LSD analizi uygulanarak değerlendirilmiştir. Tablo XXVI incelendiğinde, kontrol grubu ile bağımlı grubu arasında, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. miR-134-5p Δ CT dağılımlarının kutu grafikleri (boxplot) Şekil 15'te verilmiştir.

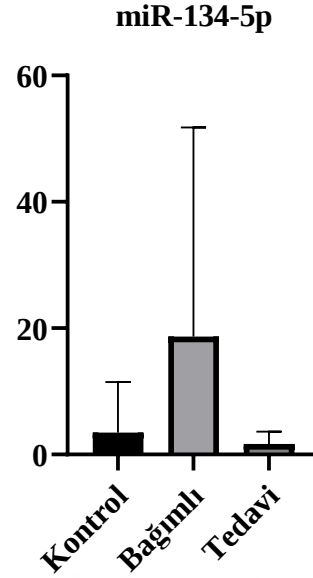
Tablo XXVI. miR-134-5p Δ Ct değerlerinin gruplar arası karşılaştırma sonuçları.

Karşılaştırılan Gruplar	p değeri
Kontrol-Bağımlı	0,020
Tedavi-Bağımlı	0,023
Tedavi- Kontrol	0,863



Şekil 15: miR-134-5p düzeylerinin ΔC_t değerleri üzerinden karşılaştırılması.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin miR-134-5p ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplanmıştır. Bağımlı grubunda miR-134-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 18,698$; tedavi grubunda miR-134-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,654$; kontrol grubunda miR-134-5p için ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta C_t} = 3,452$ olarak hesaplanmıştır. Buna göre, ekspresyon düzeyleri bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 5,42 kat arttığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 2,09 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 11,31 kat azaldığı tespit edilmiştir. Bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında miR-134-5p için ekspresyon düzeylerindeki kat değişimi sonuçları Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16: miR-134-5p bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarında kat değişimi (2^{-ΔΔCT}).

4.4. Klinik Özelliklerin miRNA Ekspresyonları ile Korelasyon Analizi

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerine ait klinik özelliklerin aday miRNA'lar olarak seçilen miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin ΔC_t değerleri ile korelasyonu incelenmiştir. Normal dağılım gösteren gruplarda Pearson korelasyon analizi, normal dağılım göstermeyen gruplarda Spearman korelasyon analizi yapılmıştır.

4.4.1. miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi

Bu çalışmaya dahil edilen bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerinin yaşları ile miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin ΔC_t değerleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bağımlı grubunda yaş ile miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin ΔC_t değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0.05$). Tedavi grubunda yaş ile miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin ΔC_t değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0.05$). Kontrol grubunda yaş ile miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin ΔC_t değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0.05$). Bağımlı, tedavi

ve kontrol grubu bireylerinin yaşları ile miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin ΔCt değerleri arasındaki ilişki sırasıyla, Tablo XXVII, Tablo XXVIII ve Tablo XXIX'de gösterilmiştir.

Tablo XXVII. Bağımlı grubunda miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi.

Bağımlı Grubu		miR-9-5p	miR-26b-5p	miR-132-3p	miR-134-5p
Yaş	r	-0,79	-0,60	-0,104	-0,095
	p	0,808	0,852	0,748	0,770
	n	12	12	12	12

Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. r= Korelasyon katsayısı, n=Birey sayısı

Tablo XXVIII. Tedavi grubunda miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi.

Tedavi Grubu		miR-9-5p	miR-26b-5p	miR-132-3p	miR-134-5p
Yaş	r	-0,173	-0,251	0,100	-0,251
	p	0,611	0,457	0,769	0,457
	n	11	11	11	11

Spearman korelasyon testi uygulanmıştır. r= Korelasyon katsayısı, n=Birey sayısı

Tablo XXIX. Kontrol grubunda miRNA ekspresyonlarının yaş ile ilişkisi.

Kontrol Grubu		miR-9-5p	miR-26b-5p	miR-132-3p	miR-134-5p
Yaş	r	-0,379	-0,336	0,101	-0,255
	p	0,148	0,203	0,710	0,341
	n	16	16	16	16

Spearman korelasyon testi uygulanmıştır. r= Korelasyon katsayısı, n=Birey sayısı

4.4.2. Madde kullanım öykülerinin miRNA ekspresyonları ile korelasyonu

miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p ekspresyonu (ΔCt değerleri) ile bağımlı ve tedavi gruplarına dahil edilen bireylerin bazı klinikopatolojik faktörleri arasındaki

ilişki Spearman korelasyonu ile analiz edilmiştir. Tablo XXX'de gösterildiği gibi, bağımlı grubunda miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p ekspresyonu ile kullanım süresi, günlük doz, kullanılan kokain türü, kullanım sıklığı, en son kullanım özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Tablo XXXI'de gösterildiği gibi, tedavi grubunda miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p ekspresyonu ile kullanım süresi, günlük doz, kullanılan kokain türü, kullanım sıklığı, en son kullanım özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

Tablo XXX. Bağımlı grubunda madde kullanım öykülerinin miRNA ekspresyonları ile korelasyonu.

Özellikler	miR-9-5p		miR-26b-5p		miR-132-3p		miR-134-5p	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Kullanım süresi (ay)	0,163	0,613	0,185	0,565	0,200	0,533	0,241	0,451
Günlük doz (g)	-0,226	0,481	-0,183	0,569	-0,140	0,664	-0,226	0,481
Kullanılan kokain türü	0,256	0,422	0,256	0,422	0,256	0,422	0,307	0,331
Kullanım sıklığı	-0,418	0,176	-0,418	0,176	-0,418	0,176	-0,307	0,332
En son kullanım (gün)	0,267	0,402	0,293	0,355	0,369	0,237	0,293	0,355
Detoksifikasyon sıklığı	0,177	0,581	0,177	0,581	0,118	0,714	0,059	0,855

Spearman korelasyon testi uygulanmıştır. *r*= Korelasyon katsayısı

Tablo XXXI. Tedavi grubunda madde kullanım öykülerinin miRNA ekspresyonları ile korelasyonu.

Özellikler	miR-9-5p		miR-26b-5p		miR-132-3p		miR-134-5p	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Kullanım süresi (ay)	0,358	0,279	-0,224	0,507	0,378	0,252	-0,224	0,507
Günlük doz (g)	0,472	0,142	0,573	0,065	0,472	0,142	0,503	0,115
Kullanılan kokain türü	-0,400	0,223	-0,400	0,223	-0,400	0,423	-0,500	0,117
Kullanım sıklığı	0,194	0,568	0,323	0,333	0,194	0,568	0,065	0,850
En son kullanım (gün)	0,368	0,266	0,270	0,422	0,216	0,524	0,338	0,309
Detoksifikasyon sıklığı	-0,478	0,137	-0,598	0,052	-0,418	0,200	-0,239	0,479

Spearman korelasyon testi uygulanmıştır. *r*= Korelasyon katsayısı

4.5. miRNA'ların ROC Değerlendirmesi

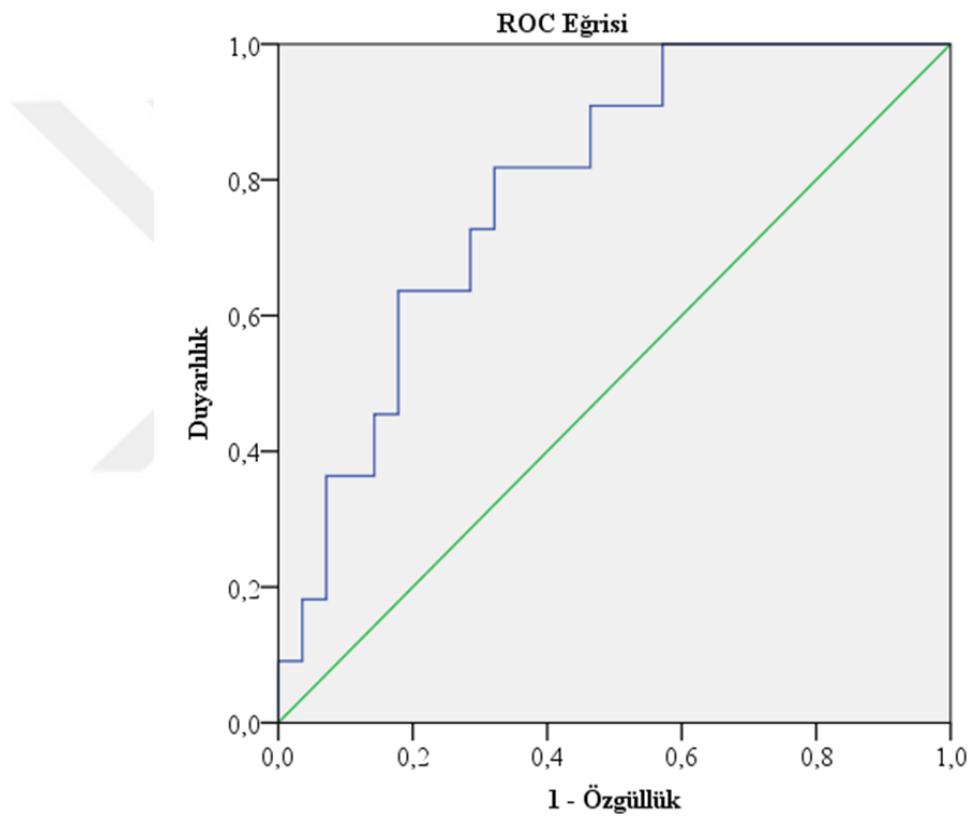
Çalışmada miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p miRNA'larının kokain bağımlılığında tanı için uygunluğunu değerlendirmek ve yapılan miRNA ekspresyon analizleri sonucu elde edilen verilerin doğruluğunu tanımlamak amacıyla ROC eğrisi analizi yapılmıştır.

4.5.1. mir-9-5p ROC değerlendirme

miR-9-5p'nin ΔCt değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu anlamlılıktan yola çıkarak miR-9-5p için tedavi grubunda yapılan ROC eğrisi analizlerinin sonuçları Tablo XXXII'de gösterilmiştir. miR-9-5p için tedavi grubunda AUC değeri 0,789 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,644-0,934; $p=0,005$) ve cut off değeri 12,3450'de, duyarlılık % 72,7 ve özgüllük % 71,4 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-9-5p için tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 17).

Tablo XXXII. miR-9-5p için Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Grup	Cut off	Duyarlılık	Özgüllük	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-9-5p	Tedavi	12,3450	72,7	71,4	0,789	0,644-0,934	p=0,005



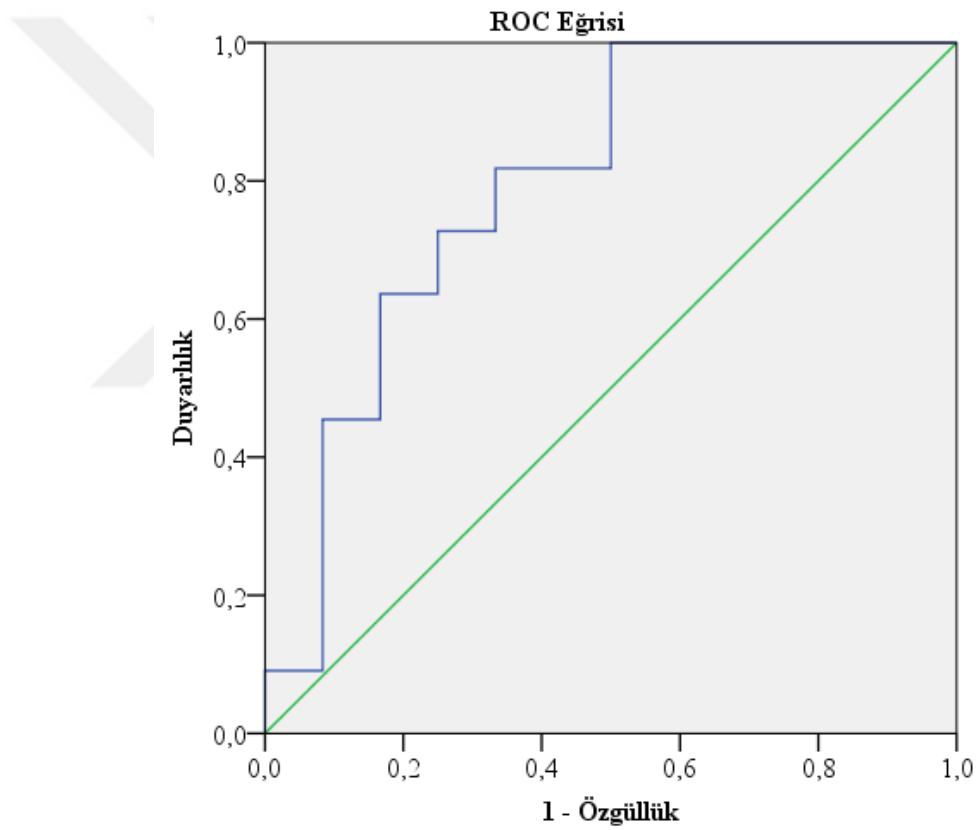
Şekil 17: Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-9-5p'nin ROC analizi.

miR-9-5p'nin ΔC_t değerleri için bağımlı grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu iki grup için yapılan ROC analizleri Tablo XXXIII'de gösterilmiştir. miR-9-5p için tedavi grubunda AUC değeri 0,789 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,644-0,934; p=0,005) ve cut off değeri 12,3450'de, duyarlılık % 72,7

ve özgüllük % 71,4 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-9-5p için tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 18).

Tablo XXXIII. miR-9-5p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Cut off	Duyarlılık	Özgüllük	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-9-5p	12,3450	72,7	75	0,795	0,608-0,983	p=0,016



Şekil 18: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-9-5p'nin ROC analizi.

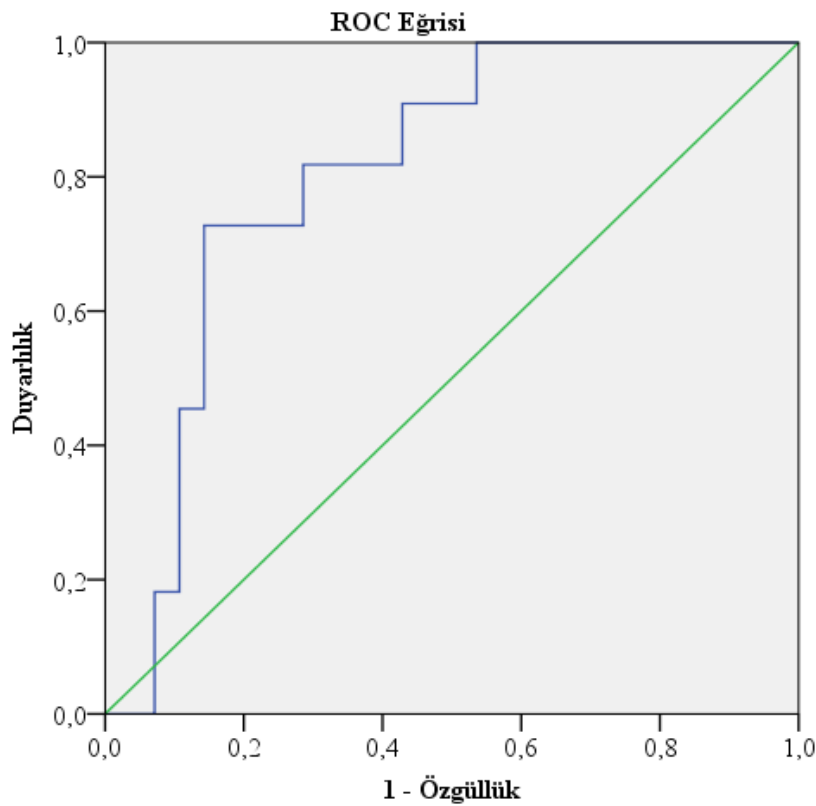
4.5.2. mir-26b-5p ROC değerlendirmesi

miR-26b-5p'nin ΔC_t değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu anlamlılıktan yola çıkarak miR-26-5p

için tedavi grubunda yapılan ROC eğrisi analizlerinin sonuçları Tablo XXXIV’de gösterilmiştir. miR-26-5p için tedavi grubunda AUC değeri 0,805 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,664-0,946; $p=0,003$) ve cut off değeri 1,9100’de, duyarlılık % 72,7 ve özgüllük % 71,4 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-26-5p için tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 19).

Tablo XXXIV. miR-26-5p için Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Grup	Cut off	Duyarlılık	Özgüllük	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-26b-5p	Tedavi	1,9100	72,7	71,4	0,805	0,664-0,946	p=0,003

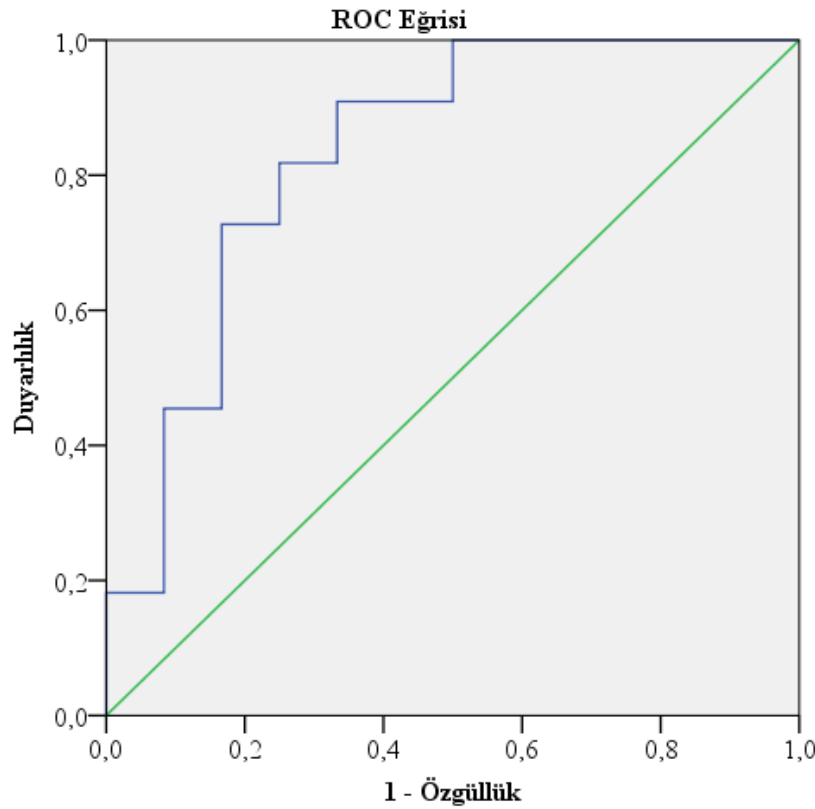


Şekil 19: Kontrol-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-26b-5p’nin ROC analizi.

miR-26-5p'nin ΔCt değerleri için bağımlı grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu iki grup için yapılan ROC analizleri Tablo XXXV'de gösterilmiştir. miR-26-5p için tedavi grubunda AUC değeri 0,833 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,663-1,000; $p=0,007$) ve cut off değeri 1,9100'de, duyarlılık % 72,7 ve özgülük % 75 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-26-5p için tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 20).

Tablo XXXV. miR-26b-5p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Cut off	Duyarlılık	Özgüllük	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-26b-5p	1,9100	72,7	75	0,833	0,663-1,000	$p=0,007$



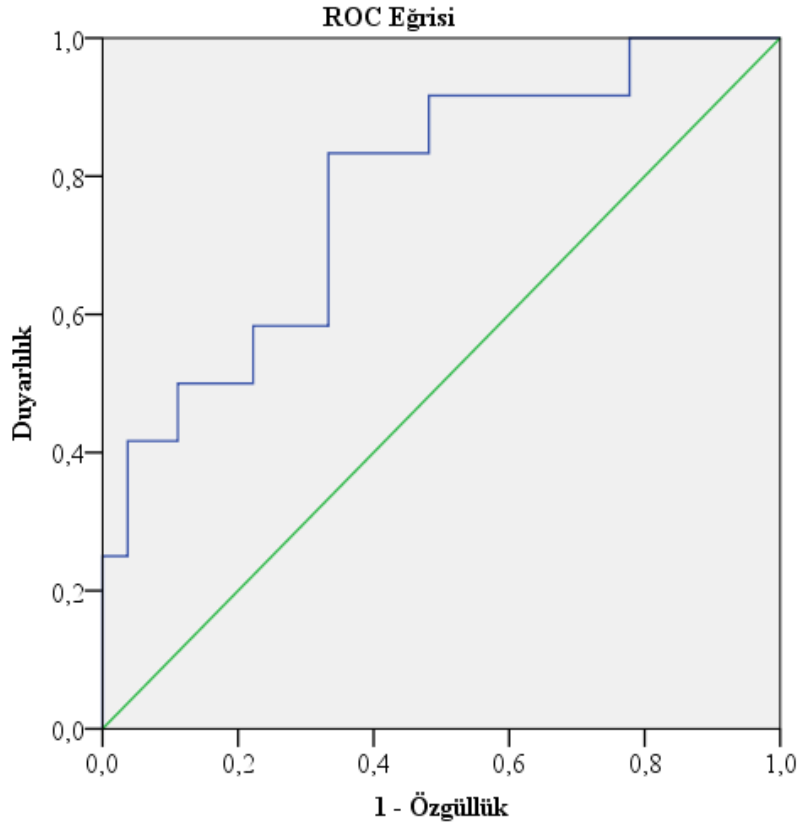
Şekil 20: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-26b-5p'nin ROC analizi.

4.5.3. miR-132-3p ROC değerlendirmesi

miR-132-3p'nin ΔCt değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bağımlı grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu anlamlılıktan yola çıkarak miR-132-3p için bağımlı grubunda yapılan ROC eğrisi analizlerinin sonuçları Tablo XXXVI'de gösterilmiştir. miR-132-3p için bağımlı grubunda AUC değeri 0,778 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,620-0,936; $p=0,006$) ve cut off değeri 5,4038'de, duyarlılık % 88,3 ve özgüllük % 66,7 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-132-3p için bağımlı grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 21).

Tablo XXXVI. miR-132-3p için Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında bağımlı grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Grup	Cut off	Duyarlılık	Özgüllük	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-132-3p	Bağımlı	5,4038	88,3	66,7	0,778	0,620-0,936	p=0,006

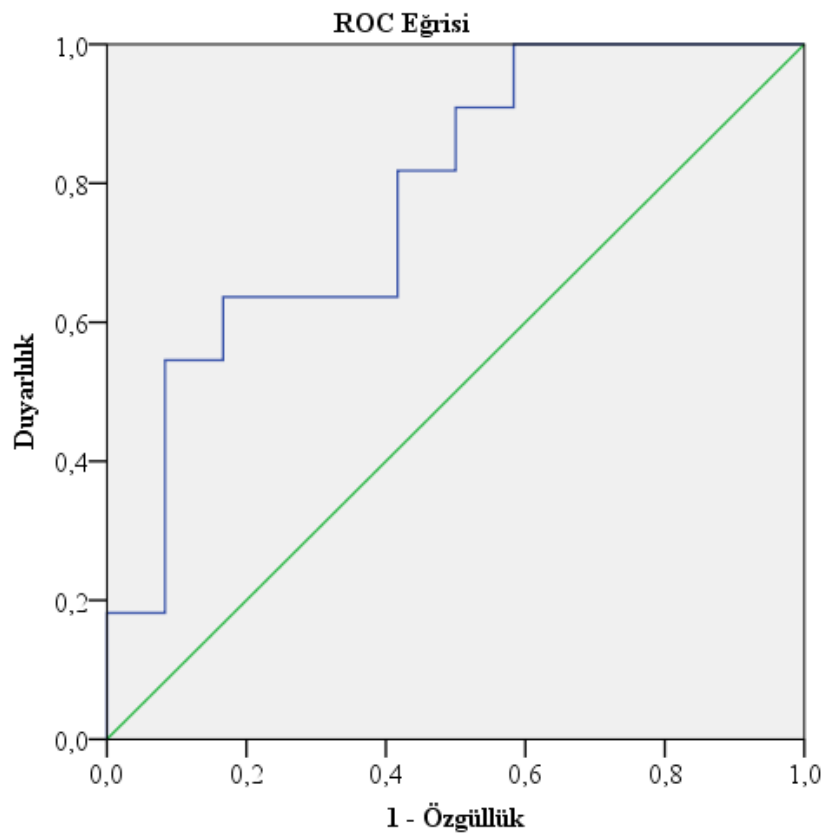


Şekil 21: Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında bağımlı grubunda miR-132-3p'nin ROC analizi.

miR-132-3p'nin ΔCt değerleri için bağımlı grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu iki grup için yapılan ROC analizleri Tablo XXXVII'de gösterilmiştir. miR-132-3p için tedavi grubunda AUC değeri 0,780 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,590-0,971; $p=0,023$) ve cut off değeri 5,2388'de, duyarlılık % 63,6 ve özgüllük % 66,7 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-132-3p için tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 22).

Tablo XXXVII. miR-132-3p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Cut off	Duyarlılı (%)	Özgüllük (%)	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-132-3p	5,2388	63,6	66,7	0,780	0,590-0,971	p=0,023



Şekil 22: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-132-3p'nin ROC analizi.

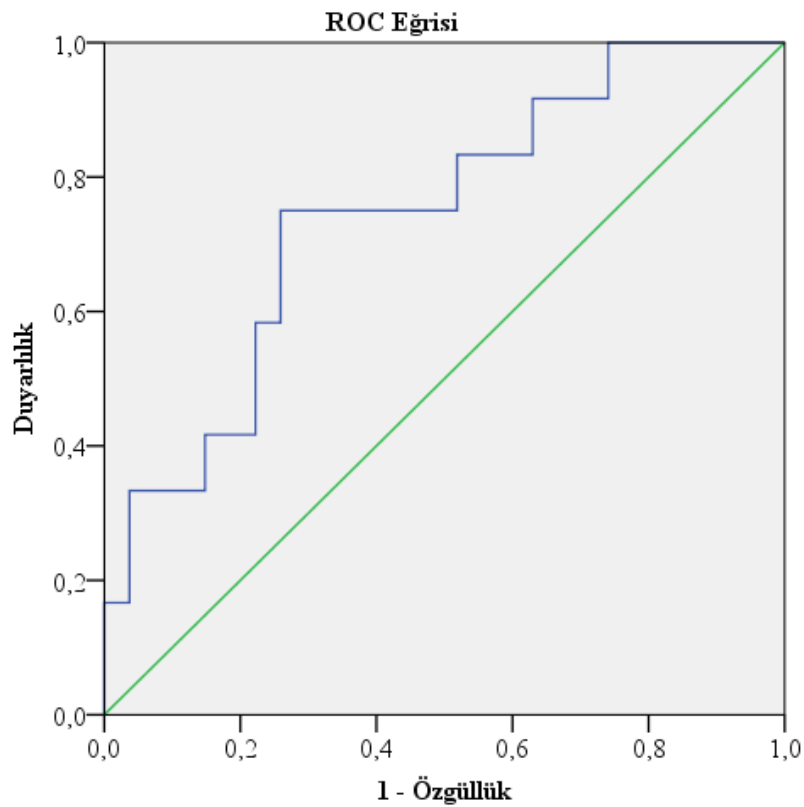
4.5.4. mir-134-5p ROC değerlendirmesi

miR-134-5p'nin ΔC_t değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bağımlı grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu anlamlılıktan yola çıkarak miR-134-5p için bağımlı grubunda yapılan ROC eğrisi analizlerinin sonuçları Tablo XXXXVIII'de gösterilmiştir. miR-134-5p için bağımlı grubunda AUC değeri 0,744 (%95 Güven Aralığı

(GA): 0,577-0,911; $p=0,016$) ve cut off değeri 8,3825’de, duyarlılık % 75 ve özgüllük % 25,9 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-134-5p için bağımlı grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 23).

Tablo XXXVIII. miR-134-5p için Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında Bağımlı grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Grup	Cut off	Duyarlılık	Özgüllük	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-134-5p	Bağımlı	8,3825	75	25,9	0,744	0,577-0,911	p=0,016

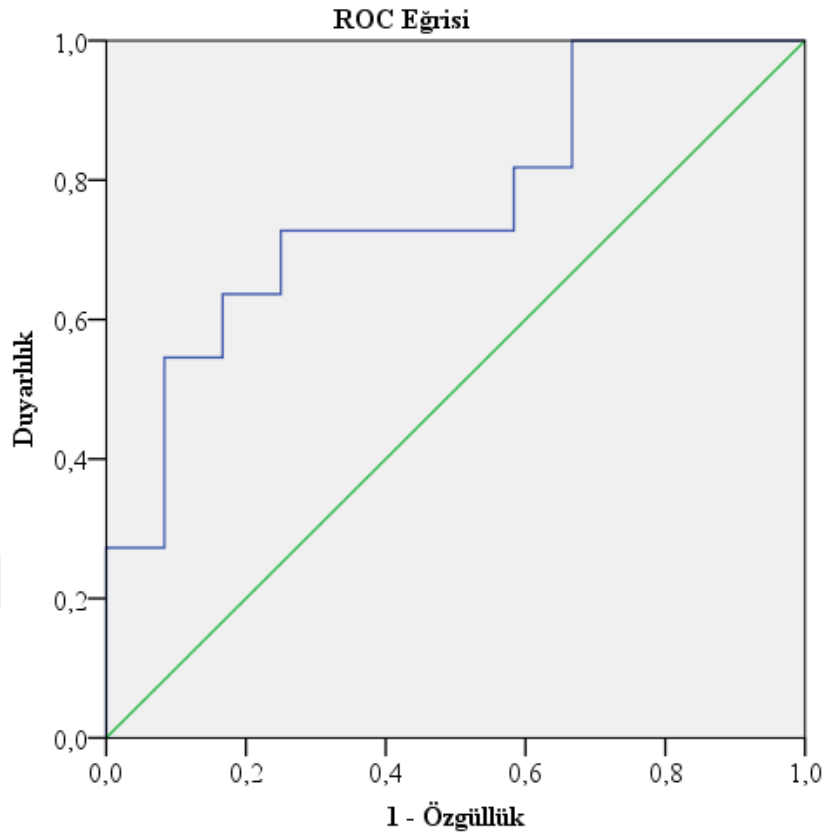


Şekil 23: Kontrol-Bağımlı grupları karşılaştırılmasında bağımlı grubunda miR-134-5p’nin ROC analizi.

miR-134-5p'nin ΔCt değerleri için bağımlı grubu ile karşılaştırıldığında, tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu iki grup için yapılan ROC analizleri Tablo XXXIX'de gösterilmiştir. miR-134-5p için tedavi grubunda AUC değeri 0,765 (%95 Güven Aralığı (GA): 0,566-0,964; $p=0,031$) ve cut off değeri 8,8898'de, duyarlılık % 72,7 ve özgüllük % 75 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, yapılan ROC analizi miR-134-5p için tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 24).

Tablo XXXIX. miR-134-5p için Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında Tedavi grubunda ROC eğrisi Sonuçları.

	Cut off	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	AUC	% 95 Güven Aralığı	p değeri
miR-134-5p	8,8898	72,7	75	0,765	0,566-0,964	p=0,031



Şekil 24: Bağımlı-Tedavi grupları karşılaştırılmasında tedavi grubunda miR-134-5p'nin ROC analizi.

4.6. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası miRNA Ekspresyon Değişiminin Tedavi Üzerine Olan Etkisi

Bu çalışmada, bağımlı ve tedavi gruplarında aday miRNA'ların tedaviden önce ve sonra miRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Ancak, bu çalışmada tedavi grubuna dahil edilen bireylerin büyük çoğunluğunu (%90,9), Anatolia Kliniği'nde halihazırda kokain bağımlılığı tedavisi görmekte olan bireylerin oluşturması nedeniyle, aynı bağımlı olan hasta bir bireyin tedavi öncesi ve sonrası olacak şekilde miRNA ekspresyon düzeyleri açısından karşılaştırmaları yapılamamıştır. Bunun yerine, gruplar arasında olacak şekilde karşılaştırma yapılmıştır. Bu bağlamda, bağımlı hasta bir bireye uygulanan bağımlılık tedavisinde

kullanılan tedavi aracı ve yönteminin, tedavi sonrası miRNA ekspresyon düzeyinin değişimi üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir.



5. TARTIŞMA

ncRNA'lar arasında en çok araştırılan ve en etkili olanlar miRNA'lardır. Beyinde, eksprese olan birçok miRNA bulunmaktadır (66). Kokaine maruz kalma, beyindeki birçok bölgede miRNA ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirmektedir (112,113). Literatürde yapılan birçok çalışmada, kemirgenlerde kokain maruziyetinin beyin birçok bölgesindeki miRNA ekspresyon düzeyini değiştirdiği (artış/azalış) bildirilmiştir. Örneğin bu miRNA'lardan bazıları şunlardır: miR-9, miR-19, miR-26, miR-34, miR-124, miR-132, miR-134, miR-135, miR-181, miR-183, miR-212, miR-375, miR-449 ve Let-7d (8).

Çoğu epigenetik modifikasyonlar dokuya özgüdür ve bağımlılık durumunda epigenetik sapmaları tanımlamak için, canlı denekler üzerinde beyinde meydana gelen değişikliklerin aydınlatılmasında, beyin dokusu ile çalışma şartları sınırlıdır (106). Uluslararası literatürde kokain bağımlılığı alanında yapılan araştırmaların çoğu genellikle deney hayvanlarında gerçekleştirilmiştir ve son yıllarda özellikle insan post-mortem beyin dokuları kullanılmaktadır (76). Benzer çalışmaların doğrudan kokain bağımlılarının canlı beyin dokusunda yapılması şu anda mümkün değildir (114). Uluslararası literatürde yakın zamanda yapılan üç ayrı çalışmada sırasıyla kokain, eroin ve metamfetamin kullanım bozukluklarında miRNA'ların periferik profilleri araştırılmıştır (8,9,26). Ancak ülkemizde, insanlarda periferik miRNA düzeylerinde kokain kullanım bozukluğunun etkisini araştırmak için herhangi bir çalışma yapılmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, daha önce kokain kullanımına bağlı olarak bağımlı kemirgen beyin dokusu ve insan post-mortem beyin dokusunda ekspresyon düzeyi değişikliği gözlenen bazı miRNA (miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p)'ların, ülkemizde kokain kullanım bozukluğu olan erkek bireylerin periferik kanında ekspresyon analizleri yapılmıştır.

Yaş; cinsiyet, ırk, etnik köken ve bir bireyin beslenme durumundan etkilenir. Cinsiyet faktörü, epigenetik profillerdeki bireylerarası farklılığı etkileyebilir (115). Protein kodlayan

ve kodlamayan RNA'lar, X ve Y kromozomları dahil tüm insan kromozomlarında tanımlanmıştır. 27 protein kodlayan genin yanı sıra, insan Y kromozomunun erkeğe özgü bölgesi bir dizi miRNA içermektedir (116). ncRNA'ların her yaşta cinsiyete göre ekspresyon düzeylerinde değişiklikler gözlenebilir, çünkü yaş, cinsiyete göre çok daha fazla değişken içerir. Örneğin, insan X kromozomunun, insan genomunda şimdiye kadar tespit edilen tüm miRNA'ların %10'unu içermesi, kadınların, erkeklerden daha büyük bir miRNA makinesiyle donatılmış olduğunu gösterir. Bu durum, cinsiyete özgü fenotiplerde güçlü bir miRNA katılımı ve patojenetik mekanizmalarda ve/veya patolojik tepkilerde bazı farklılıklar olduğunu göstermektedir (115). Literatürde madde kullanım bozukluklarıyla ilişkili spesifik miRNA'ları araştıran çalışmalarda, örnek gruplara tek cinsiyetin dahil edildiği dikkat çekmiştir. Örneğin, Viola vd. (2019) yaptığı çalışmada, kokain kullanım bozukluğu olan kadın hastalar ve sağlıklı kadın bireyler arasında 3 aday miRNA (miR-124, miR-181 ve miR-212)'nin kan ekspresyon seviyelerini karşılaştırmıştır. Araştırmacılar, literatürde daha önceden yapılmış klinik çalışmalarda; i) kadınların kokain kullanımına erkeklerden daha erken yaşlarda başlaması ii) kadın hastaların, tedavi olmak üzere başvuran erkek hastalardan daha yüksek miktarlarda kokain tüketmesinin rapor edilmesi, iii) kadınların erkeklere göre kokaine daha yüksek aşırma ve yoksunluk belirtileri gösterdiğinin bildirilmesi, iv) kadınlarda erkeklere göre çoklu madde kötüye kullanımında artış olduğu ve bu nedenle, kadınların CUD geliştirmeye daha yatkın olduklarının bildirilmesi sonuçlarına dayanarak CUD'li kadın hastalara odaklanmıştır (8).

Madde kullanımının yaş, cinsiyet, ırk vb. belirleyicilere göre değişiklik göstermesi; cinsiyet farklılıklarının, madde kullanımının başlamasını ve sürdürülmesini etkileyen önemli faktörlerden biri olması; madde kullanımının cinsiyet açısından ele alındığında kadın ile erkek arasındaki yapısal değişikliklerin, kadın ve erkek arasındaki madde kullanım oranları ve biçimini etkilemesi nedeniyle; literatürde yapılan araştırmalarda örnek gruplarının cinsiyet

yönünden uyumlu olması, yaşa göre eşleşmesi, yaşa göre alt gruplara ayrılması veya yaşa göre ayarlanması gerektiği vurgulanmaktadır (117).

Balıklı Rum Hastanesi Anatolia Kliniği'ne kokain bağımlısı olan ve tedavi olmak üzere başvuran bireylerin çoğunluğunun erkek bireylerden oluştuğu; bununla birlikte kadın bireyler arasında yalnızca kokain kullananların oranının daha az olduğu ve bu kadın kokain kullanıcılarında çoklu madde kötüye kullanımının daha sık görüldüğü belirtilmektedir.

Homojenlik örneklem büyüklüğünü etkileyen önemli bir değişkendir ve miRNA biyobelirteç analizlerinin yaş ve cinsiyete göre ayarlanması gerektiği açıktır (116). Dolayısıyla, cinsiyet parametresinin herhangi bir karışıklığa neden olmaması açısından bu çalışmaya yalnızca erkek bireyler dahil edilmiştir. Ayrıca, ülkemiz dahil olmak üzere dünya genelinde erkek kokain kullanıcıları oranının kadınlara kıyasla daha yüksek olması, bağımlılık tedavisi gören erkek bireylerin oranının kadınlara kıyasla daha yüksek olması, madde bağımlılığı ile ilişkili ölümlerde erkeklerin oranının kadınlara kıyasla daha yüksek olması, bu çalışmaya yalnızca erkek bireylerin dahil edilmesinin diğer nedenleridir.

Literatürde kokain kötüye kullanımının gelişmesinde özellikle kadın ve erkek bireylerdeki farklılıklar ile ilgili moleküler araştırma eksikliğinin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada örnek gruplara yalnızca erkek bireylerin dahil edilerek elde edilen sonuçlar ile araştırmalarına yalnızca CUD olan kadın bireyleri ve CUD tedavisi gören kadın bireyleri dahil eden Viola ve ark. (2019) yaptığı çalışma karşılaştırılabilir nitelik göstermektedir. Bu bağlamda, bu çalışma ile cinsiyete dayalı madde kötüye kullanım bozuklarının altında yatan moleküler mekanizmalar hakkındaki eksikliğin giderilecek olması, cinsiyete dayalı bağımlılığın temelini açığa çıkarılması ve gelecekte cinsiyete özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmaya, kokain bağımlılığı patolojisinde rol oynayabilecek aday miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimi saptayabilmek için bağımlı grubuna 12 erkek birey, bağımlılık tedavisi gören gruba 11 erkek birey ve kontrol grubuna 16 sağlıklı erkek birey dahil edilmiştir. Çalışmada bu 3 gruba dahil edilen bireylerin klinik özellikleri değerlendirildiğinde, yaş değişkeni açısından bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık bulunmazken ($p>0,05$); bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında ve tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Boy değerleri açısından bağımlı, tedavi ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Kilo değişkeni açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,05$); tedavi grubu ile kontrol grubu arasında ve bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). BMI değişkeni açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,05$); bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

5.1. miR-9-5p

miR-9, sineklerden insanlara kadar yüksek oranda korunur ve beyinde yüksek derecede eksprese edilir. İnsanlarda, olgun miR-9, türetildikleri öncü miRNA'nın ucuna (5' veya 3') göre adlandırılan hem miR-9-5p hem de miR-9-3p'yi içerir. miR-9 yetişkin beyninin hipokampus gibi nörojenik bölgelerinde ve nöral prekürsör hücrelerinde yüksek derecede eksprese edilen bir miRNA'dır (118). Cabana-Domínguez ve ark. (2018) yaptığı çalışmada, insan dopaminerjik nöron benzeri hücrelerde 5 μ M kokaine 30 dakikalık akut maruziyetin ardından 6 saat sonra belirlenen miR-9-5p ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığını tespit etmişlerdir (76). Gu ve ark. (2020) metamfetamin bağımlılarının serum örneklerinde miR-9-3p ekspresyon düzeyinin kontrol grubu bireylerine göre önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir (9). Büyük iletkenliğe sahip kalsiyum ve voltajla aktive olan

potasyum kanalı (Büyük potasyum=BK), beyinde bol miktarda bulunur ve nöronal fonksiyon için kritik öneme sahiptir. BK potasyum kanalları alkolün beyindeki birincil hedeflerinden biridir. Ayrıca, BK kanalı davranışsal ve moleküler alkol toleransında önemli bir unsurdur (119). Pietrzykowski ve ark. (2008) yaptığı çalışmada, alkol kötüye kullanımı ve bağımlılığında önemli olan iki memeli beyin bölgesinde, supraoptik çekirdek ve striatumda, BK kanalının alkole karşı tolerans geliştirdiğini belirlemişler ve alkolün bu nöronlarda miR-9 ekspresyon düzeyinde hızlı bir artışa neden olduğu göstermişlerdir (119). Mead ve ark. (2023) yaptığı çalışmada, fare striatal nöronlarında kısa bir süreliğine alkol maruziyetinin, miR-9-5p ekspresyon düzeyini arttırdığını tespit etmişlerdir (120).

Bu çalışmada, bağımlı, tedavi ve kontrol grupları miR-9-5p ekspresyonu (ΔCt değerleri) açısından karşılaştırıldıklarında; tedavi grubu ile kontrol grubu arasında, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p < 0.05$); bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık ($p > 0.05$) saptanmamıştır. Dolayısıyla, elde edilen bu bulgulara göre, çalışmanın “periferik kanda miR-9-5p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile bağımlılık tedavisi gören grup arasında fark vardır” hipotezi doğrulanırken; “periferik kanda miR-9-5p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır” hipotezi doğrulanmamıştır. miR-9-5p ekspresyon düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 1,17 kat arttığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 5,48 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 6,41 kat azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, miR-9-5p’nin bağımlı grubunda kontrol grubuna göre up regüle olduğu; tedavi grubunda kontrol grubuna göre down regüle olduğu; tedavi grubunda bağımlı grubuna göre down regüle olduğu tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar ile bu çalışmadan elde edilen periferik miR-9-5p ekspresyon bulguları, kullanılan örnek tipi üzerine karşılaştırıldığında; diğer bağımlılık türlerinin beyin dokusu ve serum örnekleri üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Ancak miR-9-

5p'nin kokain bağımlılığında beyin dokusu örnekleri üzerindeki çalışmaların sonuçlarına göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

miR-9-5p Δ Ct değerleri açısından tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunması, bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunması; bağımlılık tedavisinde kullanılan tedavi yönteminin etkinliğini değerlendirmede tek başına yeterli ve uygun bulgular olamayacağını düşünülmektedir. Bununla birlikte, miR-9-5p Δ Ct değerlerinin tedavi ve bağımlı grupları arasında anlamlı farklılık göstermesi, ayrıca tedavi grubu miR-9-5p ekspresyon düzeylerinin bağımlı grubuna göre azalış göstermesi; tedavi grubunda tedaviden fayda sağlayan hasta bireylerin yer aldığını düşündürmektedir. Dolayısıyla, çalışmanın “kokain bağımlılığı tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin miR-9-5p ekspresyon profiline etkisi vardır” hipotezi kısmen doğrulanmıştır.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerine ait klinik özelliklerin miR-9-5p Δ Ct değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. Bağımlı grubunda, tedavi grubunda ve kontrol grubunda yaş ile miR-9-5p Δ Ct değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0.05$). Periferik kan miRNA'larının kokain bağımlılarının ve bağımlılık tedavisi görenlerin klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını incelemek için, çalışmada tanımlanan miR-9-5p ekspresyonunun madde kullanım öyküleri ile korelasyonları analiz edilmiştir. Bağımlı ve tedavi gruplarında miR-9-5p ekspresyonu ile madde kullanım süresi, kullanılan günlük doz, kullanılan kokain türü, kullanım sıklığı ve maddenin en son kullanımı özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir.

miR-9-5p'nin kokain kullanım bozukluğu için tanısal yeterliliğini değerlendirmek üzere hem tedavi ve kontrol grupları arasında hem de tedavi ve bağımlı grupları arasında olacak şekilde ROC eğrisi analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, kontrol-tedavi gruplarında tedavi grubu için “AUC” değeri 0,789 ($p=0,005$) iken; bağımlı-tedavi gruplarında tedavi grubu için

“AUC” değeri 0,795 ($p=0,016$) olarak hesaplanmıştır. ROC analizleri anlamlı çıktığı için miR-9-5p’nin kokain bağımlılığı tedavisi gören hastalar için bağımlılığın tanısında yardımcı parametreler olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

5.2. miR-26b-5p

miR-26b, transkripsiyonu nöral kök hücrelerde bulunmayan negatif bir geri besleme döngüsü ile sonuçlandığından, nöronal farklılaşmada yer alır. Literatürde, miR-26’nın kardiyak özgülüğü olmaksızın esas olarak kalpte zenginleşmiş olduğu bildirilmiştir. Aile üyeleri arasında bulunan miR-26b, çeşitli tümör dokularında anormal şekilde eksprese edilir ve bu da farklı tümörlerde onkogen veya tümör baskılayıcı genin rolünü oynar. Örneğin, yapılan çalışmalarda miR-26b’nin mide kanseri, karaciğer kanseri ve meme kanseri doku ve hücrelerinde düşük oranda eksprese edildiği ve tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (121). Chen ve ark. (2013) tekrarlı kokain maruziyetini takiben sıçan hipokampusünde miR-26b’nin ekspresyon seviyesinde artış olduğunu gözlemiştir (71). Stringer ve ark. (2013) yaptığı çalışmada, miR-26b’nin doğum öncesi alkol maruziyetinin etkileri de dahil olmak üzere, nörogelişim ve ilgili bozukluklarda (örneğin şizofreni gibi) güçlü bir şekilde yer alan bir gen olan *BDNF*’ün ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir (122).

Bu çalışmada, bağımlı, tedavi ve kontrol grupları miR-26b-5p ekspresyonu (ΔCt değerleri) açısından karşılaştırıldıklarında, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p<0.05$); bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). Dolayısıyla, elde edilen bu bulgulara göre, çalışmanın “periferik kanda miR-26b-5p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile bağımlılık tedavisi gören grup arasında fark vardır” hipotezi doğrulanırken; “periferik kanda miR-26b-5p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır” hipotezi doğrulanmamıştır. miR-26b-5p ekspresyon düzeyleri

bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 1,11 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 8,68 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 7,84 kat azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, miR-26b-5p'nin bağımlı grubunda kontrol grubuna göre down regüle olduğu; tedavi grubunda kontrol grubuna göre down regüle olduğu; tedavi grubunda bağımlı grubuna göre down regüle olduğu tespit edilmiştir. Literatürde kokain bağımlılığı üzerine yapılan çalışmalar ile bu çalışmadan elde edilen periferik miR-26-5p ekspresyon bulguları karşılaştırıldığında; beyin dokusu örnekleri üzerindeki çalışmaların sonuçlarına göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

miR-26b-5p Δ Ct değerleri açısından tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunması, bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunması; bağımlılık tedavisinde kullanılan tedavi yönteminin etkinliğini değerlendirmede tek başına yeterli ve uygun bulgular olamayacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, miR-26b-5p Δ Ct değerlerinin tedavi ve bağımlı grupları arasında anlamlı farklılık göstermesi, ayrıca tedavi grubu miR-26b-5p ekspresyon düzeylerinin bağımlı grubuna göre azalış göstermesi; tedavi grubunda tedaviden fayda sağlayan hasta bireylerin yer aldığını düşündürmektedir. Dolayısıyla, çalışmanın “kokain bağımlılığı tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin miR-26b-5p ekspresyon profiline etkisi vardır” hipotezi kısmen doğrulanmıştır.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerine ait klinik özelliklerin miR-26b-5p Δ Ct değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. Bağımlı grubunda, tedavi grubunda ve kontrol grubunda yaş ile miR-26b-5p Δ Ct değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0.05$). Periferik kan miRNA'larının kokain bağımlılarının ve bağımlılık tedavisi görenlerin klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını incelemek için, çalışmada tanımlanan miR-26b-5p ekspresyonunun madde kullanım öyküleri ile korelasyonları analiz edilmiştir. Bağımlı ve tedavi gruplarında miR-26b-5p ekspresyonu ile madde kullanım süresi, kullanılan günlük doz,

kullanılan kokain türü, kullanım sıklığı ve maddenin en son kullanımı özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

miR-26b-5p'nin kokain kullanım bozukluğu için tanısal yeterliliğini değerlendirmek üzere hem tedavi ve kontrol grupları arasında hem de tedavi ve bağımlı grupları arasında olacak şekilde ROC eğrisi analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, kontrol-tedavi gruplarında tedavi grubu için "AUC" değeri 0,805 ($p=0,003$) iken; bağımlı-tedavi gruplarında tedavi grubu için "AUC" değeri 0,833 ($p=0,007$) olarak hesaplanmıştır. ROC analizleri anlamlı çıktığı için miR-26-5p'nin kokain bağımlılığı tedavisi gören hastalar için bağımlılığın tanısında yardımcı parametreler olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

5.3. miR-132-3p

miR-132, nöronal büyümede rolü olduğu gösterilen ilk miRNA olmuştur (123). Nörit gelişiminde, dendritik büyüme ve dallanmasında, sinaptik iletimde ve plastisitede, öğrenme ve hafıza oluşumunda, apoptoziste ve nörolojik korumada önemli fonksiyon gösterir (124). Sadakierska-Chudy ve ark. (2017) miR-132'nin kokain uygulanan ratların dorsal striatumunda ekspresyon analizlerini incelediği çalışmada, uzun süreli ve yoksunluk döneminde miR-132'nin ekspresyon düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir (74). Quinn ve ark. (2018) kokain bağımlılığında sıçan nükleus akumbens kabuğunda miR-132'nin artmış ekspresyon düzeylerini buldukları çalışmada, artmış miRNA düzeylerini madde arama davranışı ve bağımlılık döngüsünün ileri evreleriyle ilişkilendirmiş ve 132'nin tedavide potansiyel hedeflerin tanımlanmasına aracılık edebileceğini önermişlerdir (77). Karaciğer fibrozisi, kronik inflamatuvar süreçlerin neden olduğu aşırı skarlaşma ile karakterizedir. Momen-Heravi ve ark. (2021) karaciğer fibrozunda kilitli nükleik asit (LNA)-anti-miR yaklaşımını kullanarak miR-132'nin fonksiyonel rolünü ortaya koydukları çalışmada; CCl4 ile tedavi edilen farelerde ve fibrozis/sirozlu hastalarda miR-132 düzeylerinde önemli bir indüksiyon bulmuşlardır. Ayrıca, farelerde miR-132'nin LNA-anti-miR-132 ile

inhibisyonunun, CCl₄'ün neden olduğu fibrojenizde ve inflamatuvar fenotipte azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir (125).

Bu çalışmada, bağımlı, tedavi ve kontrol grupları miR-132-3p ekspresyonu (Δ Ct değerleri) açısından karşılaştırıldıklarında, bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında; tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p < 0.05$), tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Dolayısıyla, elde edilen bu bulgulara göre, çalışmanın “periferik kanda miR-132-3p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır” hipotezi ile “periferik kanda miR-132-3p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile bağımlılık tedavisi gören grup arasında fark vardır” hipotezi doğrulanmıştır. miR-132-3p ekspresyon düzeyleri bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 7,96 kat arttığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 1,25 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 9,93 kat azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, miR-132-3p'nin bağımlı grubunda kontrol grubuna göre up regüle olduğu; tedavi grubunda kontrol grubuna göre down regüle olduğu; tedavi grubunda bağımlı grubuna göre down regüle olduğu tespit edilmiştir. Literatürde kokain bağımlılığı üzerine yapılan çalışmalar ile bu çalışmadan elde edilen periferik miR-132-3p ekspresyon bulguları karşılaştırıldığında; beyin dokusu örnekleri üzerindeki çalışmaların sonuçlarına göre uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerine ait klinik özelliklerin miR-132-3p Δ Ct değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. Bağımlı grubunda, tedavi grubunda ve kontrol grubunda yaş ile miR-132-3p Δ Ct değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p > 0.05$). Periferik kan miRNA'larının kokain bağımlılarının ve bağımlılık tedavisi görenlerin klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını incelemek için, çalışmada tanımlanan miR-132-3p ekspresyonunun madde kullanım öyküleri ile korelasyonları analiz edilmiştir. Bağımlı ve tedavi gruplarında miR-132-3p ekspresyonu ile madde kullanım süresi, kullanılan günlük doz,

kullanılan kokain türü, kullanım sıklığı ve maddenin en son kullanımı özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

miR-132-3p ΔC_t değerleri açısından bağımlı ile kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunması, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı fark bulunması, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmaması; ayrıca bağımlı grubu miR-132-3p ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre artış ve tedavi grubu miR-132-3p ekspresyon düzeylerinin bağımlı grubuna göre azalış göstermesi; bağımlılık tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin etkinliğini değerlendirmede uygun bulgular olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, elde edilen bu bulgular bağımlı ve tedavi gruplarında tedaviden fayda sağlayan hasta bireylerin yer aldığını göstermektedir. Dolayısıyla, çalışmanın “kokain bağımlılığı tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin miR-132-3p ekspresyon profiline etkisi vardır” hipotezi doğrulanmıştır.

miR-132-3p’nin kokain kullanım bozukluğu için tanısal yeterliliğini değerlendirmek üzere hem bağımlı ve kontrol grupları arasında hem de bağımlı ve tedavi grupları arasında olacak şekilde ROC eğrisi analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, bağımlı-kontrol gruplarında bağımlı grubu için “AUC” değeri 0,778 ($p=0,006$) iken; tedavi-bağımlı gruplarında tedavi grubu için “AUC” değeri 0,780 ($p=0,023$) olarak hesaplanmıştır. ROC analizleri anlamlı çıktığı için miR-132-3p’nin kokain bağımlılığı tedavisi gören hastalar için bağımlılığın tanısında yardımcı parametreler olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

5.4. miR-134-5p

miR-134, beyine özgü bir miRNA’dır. miR-134, sirtuin 1 (SIRT1) aracılığıyla hafıza oluşumunda ve sinaptik plastisitede işlev görür ve CREB’in ve BDNF’nin ekspresyonunu düzenler (112). Li ve ark. (2020) yaptığı çalışmada, kokaine bağlı koşullu yer tercihi fare modeli kullanarak ventral hipokampusta sinaptik plastisite, glia aktivitesi ve nörokimyasal

mikro ortamlar ile ilişkili artmış miR-134 seviyeleri ve azalmış gen seviyeleri ile birlikte koşullu yer tercihinin kokain yokluğunda farelerde artan anksiyete ve depresyon benzeri davranışların arttığını tespit etmişlerdir (80). Mamdani ve ark. (2015) alkol bağımlılığı olan deneklerin ve sağlıklı kontrollerin NAc’de genom çapında mRNA ve miRNA ekspresyonu üzerinde ağırlıklı gen korelasyon ağı analizleri (Weighted correlation network analysis, WGCNA) gerçekleştirdikten sonra, alkol bağımlılığı ile önemli ölçüde korelasyon gösteren 6 mRNA ve mir-134-5p içeren 3 miRNA modülü tanımlamışlardır (126).

Bu çalışmada, bağımlı, tedavi ve kontrol grupları miR-134-5p ekspresyonu (ΔC_t değerleri) açısından karşılaştırıldıklarında, bağımlı grubu ile kontrol grubu ile arasında; tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken ($p < 0.05$), tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Dolayısıyla, elde edilen bu bulgulara göre, çalışmanın “periferik kanda miR-134-5p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır” hipotezi ile “periferik kanda miR-134-5p ekspresyon düzeyi açısından bağımlı grubu ile bağımlılık tedavisi gören grup arasında fark vardır” hipotezi doğrulanmıştır. miR-134-5p ekspresyon düzeyleri bakımından bağımlı grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 5,42 kat arttığı; tedavi grubu değerlerinin kontrol grubuna göre 2,09 kat azaldığı; tedavi grubu değerlerinin bağımlı grubuna göre 11,31 kat azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, miR-134-5p’nin bağımlı grubunda kontrol grubuna göre up regüle olduğu; tedavi grubunda kontrol grubuna göre down regüle olduğu; tedavi grubunda bağımlı grubuna göre down regüle olduğu tespit edilmiştir. Literatürde kokain bağımlılığı üzerine yapılan çalışmalar ile bu çalışmadan elde edilen periferik miR-134-3-5p ekspresyon bulguları karşılaştırıldığında; beyin dokusu örnekleri üzerindeki çalışmaların sonuçlarına göre uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol grubu bireylerine ait klinik özelliklerin miR-134-5p ΔC_t değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. Bağımlı grubunda, tedavi grubunda

ve kontrol grubunda yaş ile miR-134-5p Δ Ct değerleri arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0.05$). Periferik kan miRNA'larının kokain bağımlılarının ve bağımlılık tedavisi görenlerin klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını incelemek için, çalışmada tanımlanan miR-134-5p ekspresyonunun madde kullanım öyküleri ile korelasyonları analiz edilmiştir. Bağımlı ve tedavi gruplarında miR-134-5p ekspresyonu ile madde kullanım süresi, kullanılan günlük doz, kullanılan kokain türü, kullanım sıklığı ve maddenin en son kullanımı özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

miR-134-5p Δ Ct değerleri açısından bağımlı ile kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunması, tedavi grubu ile bağımlı grubu arasında anlamlı fark bulunması, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmaması; ayrıca bağımlı grubu miR-134-5p ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre artış göstermesi, tedavi grubu miR-134-5p ekspresyon düzeylerinin bağımlı grubuna göre azalış göstermesi; bağımlılık tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin etkinliğini değerlendirmede uygun bulgular olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, elde edilen bu bulgular bağımlı ve tedavi gruplarında tedaviden fayda sağlayan hasta bireylerin yer aldığını göstermektedir. Dolayısıyla, çalışmanın “kokain bağımlılığı tedavisinde kullanılan tedavi aracı ve yönteminin miR-134-5p ekspresyon profiline etkisi vardır” hipotezi doğrulanmıştır.

miR-134-5p'nin kokain kullanım bozukluğu için tanısal yeterliliğini değerlendirmek üzere hem bağımlı ve kontrol grupları arasında hem de bağımlı ve tedavi grupları arasında olacak şekilde ROC eğrisi analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, bağımlı-kontrol gruplarında bağımlı grubu için “AUC” değeri 0,744 ($p=0,016$) iken; tedavi-bağımlı gruplarında tedavi grubu için “AUC” değeri 0,765 ($p=0,031$) olarak hesaplanmıştır. ROC analizleri anlamlı çıktığı için miR-134-5p'nin kokain bağımlılığı tedavisi gören hastalar için bağımlılığın tanısında yardımcı parametreler olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

5.5. Çalışmadaki Hedef miRNA'lar için Gelecek Perspektifleri

Çalışmaya dahil edilen kokain kullanım bozukluğu olan bireylerin madde kullanım öyküleri farklılık göstermektedir. Çalışmada, kokain kullanım bozukluğu olan hasta bireylerin büyük bir çoğunluğunun (%66,7) ve kokain kullanım bozukluğu tedavisi gören bireylerin yine büyük bir çoğunluğunun (%63,6) kokain ile birlikte alkol kullanımının olduğu kaydedilmiştir. Ülkemiz genelinde çoklu madde kullanıcıları arasında alkol, opioid ve kokain kullanımı özellikle yaygındır. Birçok kokain kullanıcısı alkolü kokainle birlikte alırken, çok azı bunun vücutta daha uzun yarı ömre sahip ve potansiyel olarak daha tehlikeli kardiyotoksik etkilere sahip yeni bir güçlü metabolit ürettiğini anlamaktadır. Kokain kullanıcıları, nedenini tam olarak bilmeden, alkolün olumsuz etkilerini uzattığını veya artırdığını hissedebilmektedir. Bu çalışmada, kokain bağımlılığında bir biyobelirteç belirlenmesi ve patogenezin anlaşılmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmada kokain kullanım bozukluğu olan bireylerde, kokainin en sık suistimal edilen uyuşturuculardan biri olan alkol ile birlikte kullanım öykülerinin olması nedeniyle; gelecekteki terapiler için ilaçları yeniden konumlandırmada bu çalışmadan elde edilen gen ekspresyonu verilerinin kullanılması ile yalnızca kokain kullanım bozukluğuna özgü tedavilerin geliştirilebilmesi için yeni bir yaklaşım sağlanması önem arz etmektedir.

Bu çalışmada aday miRNA'lar olarak seçilen miR-9-5p, miR-26b-5p, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin, literatürde alkol bağımlılığı (120,122,126) ve alkol kullanımına bağlı olarak gelişen hastalıklarda (125) ekspresyon profillerinin araştırıldığı tespit edilmiştir. Özellikle alkol kullanımının memeli nöronlarında miR-9 ekspresyon düzeyinde artışa neden olduğu bulguların; bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre kokain kullanımının periferik kanda aday miR-9-5p ekspresyon düzeyinde neden olduğu artış ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, bu çalışma ile kokain bağımlısı olan bireylerin periferik kanında ekspresyon profilleri araştırılan aday miRNA'ların, gelecekte alkol bağımlılığı patolojisinde rol

oynayabilecek aday miRNA'lar olarak ekspresyon profillerinin ortaya konması durumunda, bu miRNA'ların hem alkol bağımlılığının tedavisinde hem de çoklu madde kullanım bozukluğu tedavisinde uygulanabilir potansiyel RNA bazlı terapötik hedefler olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amaçları ve hedefleri doğrultusunda, sadece İstanbul bölgesinde çalışılmasının bazı nedenleri bulunmaktadır. Araştırma yeri olarak seçilen Balıklı Rum Hastanesi ülkemizin en büyük metropolü olan İstanbul kentinde bulunan sayılı bağımlılık merkezlerinden biridir. Bununla birlikte, bu merkez kokain kullanım bozukluğu olan bireylere uygulanan tedavi hizmetleriyle de özel bir konumdadır. Bu nedenle, çalışmada ulaşılan hasta sayısı ile standart ölçekli bir profillemeye gerçekleştirilmiş olması ve elde edilen bulguların hem dünya hem de ülkemiz adına bir ilk olma özelliği taşıması bile kendi başına büyük bir katkı sağladığını göstermektedir. miRNA ekspresyon çalışmalarının sonuçlarını standardize hale getirmek için çalışmada kullanılan örnek tipinde miRNA paterninin değerlendirilmesi ve belirli bir profilin tanımlanması son derece önemlidir. Başka bir ifadeyle aynı örnek tipini kullanan farklı çalışmalar arasında yüksek düzeyde örtüşmenin olması gerekir. Ulusal ve uluslararası literatür incelendiğinde madde bağımlılığı üzerine yapılan miRNA profillemeye çalışmalarının genel olarak tek bir araştırma merkezinde yürütüldüğü dikkat çekmektedir. Kullanılan metodların farklılığı, ısı ve numune alma gibi faktörler profillemeye çalışmalarının sonucunda farklılıklara yol açabilecek nedenler arasında sayılabilir. Bu çalışmada, miRNA ekspresyon sonuçlarını etkileyebilecek deneysel aşamadaki olası risk faktörlerinin dışındaki etkenlerin azaltılması ya da ortadan kaldırılması amacıyla numune alınması, hastalara doğru bağımlılık tanısının konması, benzer tedavi türü ve yönteminin uygulanması aşamalarına dikkat edilmesi üzerine İstanbul bölgesinde tek bir araştırma yeri tercih edilmiştir. Çünkü, ancak bu şekilde bağımlılığın standart bir miRNA biyobelirteci geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Uyuşturucu maddelerin suç ile çeşitli şekillerde bağlantısı bulunmaktadır. Doğrudan ifadeyle, kötüye kullanım potansiyeli taşıyan uyuşturucuların kullanılması, bulundurulması, üretilmesi veya dağıtılması suçtur. Uyuşturucular aynı zamanda kullanıcının davranışı üzerindeki etkileri ve uyuşturucu kaçakçılığıyla bağlantılı şiddet ve diğer yasa dışı faaliyetlere yol açması nedeniyle suçla da ilişkilidir. Elde edilen kanıtlar, uyuşturucu kullanıcılarının suç işleme olasılığının kullanmayanlara göre daha yüksek olduğunu; tutuklananların ve mahkumların suç işledikleri sırada sıklıkla uyuşturucunun etkisi altında olduklarını ve uyuşturucu kaçakçılığının şiddete yol açtığını göstermektedir. Uyuşturucunun suç üzerindeki etkisinin niteliğini ve kapsamını değerlendirmek, suç ve fail hakkında güvenilir bilgilerin mevcut olmasını ve tanımların tutarlı olmasını gerektirmektedir. Sorunlu deliller karşısında uyuşturucunun suç oluşumuna ne kadar etki ettiğini niceliksel olarak söylemek mümkün değildir (127).

UNODC Dünya Uyuşturucu Raporu'nda (2023), yaklaşık on yıllık dönem içinde kokain üretiminde ve kaçakçılığında küresel boyutta bir artış söz konusu olduğu bildirilmiştir (19). Türkiye Uyuşturucu Raporuna (2023) göre, ülkemizde 2022 yılında 3.827 kokain olayına müdahale edilmiş; bu olaylarda 5.647 şüpheli yakalanmış ve 2.299 kg kokain ele geçirilmiştir. Raporda, kokain olay sayılarının suç türlerine göre dağılımı incelendiğinde; 2020 yılında %61,7'si TCK 191, %38,3'ü TCK 188, 2021 yılında %66'sı TCK 191, %34'ünün TCK 188, 2022 yılında ise %58'i TCK 191, %42'sinin TCK 188 suçu olduğu görülmektedir (31).

Son zamanlarda RNA'ya dayalı adli moleküler çalışmalarda hızlı bir şekilde artış yaşanmaya başlamıştır. Adli genetikte RNA'dan çok çeşitli alanlarda yararlanılabileceği düşünülerek bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. RNA türlerinin gen ekspresyon seviyelerinin analizi ve RNA degradasyonunun kantitatif ölçümleri yapılarak RNA'ların vücut sıvılarının ayırt edilmesi, postmortem interval tayini, leke yaşı tayini gibi adli bilimlerde potansiyel kullanım alanları olup olmadığı araştırılmaktadır. miRNA'ların da gen

ekspresyonunun regülasyonunda rol oynaması nedeniyle benzer amaçlarla adli bilimlerin alanında kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Özellikle miRNA temelli analizler; biyolojik sıvıların, lekelerin ve organ dokularının tanımlanmasında, bireylerin ve kan lekelerinin yaş tahmininde kullanılmakta; ayrıca ölüm sonrası geçen zamanın tespit edilebilmesi için yeni bir uygulama olarak önerilmektedir. Bununla birlikte, kokain bağımlılığının periferik kandaki ncRNA'ların spesifik moleküler mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılmamıştır (107). Dolayısıyla, bu çalışma ile bağımlılık etkisi en yüksek maddelerden biri olan kokain ile ilgili insan periferik kanda moleküler araştırma eksikliğinin giderilecek olması, bağımlılığın temelini açığa çıkarılması için büyük önem arz etmektedir. Bununla birlikte, bu çalışmayla kandan elde edilen miRNA profillerinin gelecekte adli amaçlı kullanımı ve bu profillerden oluşturulacak adli RNA veri tabanlarının, suçla mücadelede etkin araçlar olarak yer alabileceği düşünülmektedir.

Biyoinformatik, sistem biyolojisinin farklı alanları arasında köprü kurarak hem klinik hem de temel araştırmaların yönlerini birleştirmektedir. Yakın zamana kadar genetik, transkriptomik ve sinirbilim alanlarındaki bilgilerin birleştirilmesi, hastalık, kritik gelişim devreleri ve dinlenme durumundaki beyin aktivitesindeki ilgili yollara ışık tutmaya başlamıştır (128). Özellikle psikiyatrik bozuklukların teşhisi, karmaşık nozolojisi nedeniyle her zaman biyolojik altın standartlardan yoksun durumdadır. Hasta popülasyonundaki büyük fenotipik değişkenlik, özellikle uyuşturucu madde bağımlılığı alanında güvenilir biyobelirteçleri keşfetmek için de büyük zorluklar getirmektedir (129). Bugüne kadar biyoinformatik yaklaşımlardaki ilerlemeler, CUD için gen ekspresyon ağları ve hücresel temeli hakkında bilgi vermiştir. Bu alanın ilerleyebilmesi için gen ekspresyonu, epigenetik ve kodlamayan genler arasındaki etkileşimleri araştıran daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (88,130). Hassas psikiyatri, “doğru hastaya doğru zamanda doğru ilaç” yaklaşımının daha iyi ve daha kalıcı klinik faydalara dönüşeceğini tavsiye etmektedir.

Gelecekte CUD tedavilerinin geliştirilmesinde gen ekspresyonu verilerinin kullanılması, ilaç keşfinde yeni bir yaklaşım sağlayabilir. Sonuç olarak geniş biyoinformatik alanı, psikiyatride nispeten yeni bir kesişim noktasıdır ve yalnızca yeni biyobelirteçleri ve bunlara en uygun şekilde uyan ilaçları keşfetmek ve geliştirmek için tek bir araç sağlamakla kalmaz, aynı zamanda, kombinasyon halinde, hassas psikiyatrinin anlaşılması zor hedeflerinin kilidini açmaya yardımcı olabileceği belirtilmektedir (131).

Kompulsif madde kullanımını yönlendiren altta yatan mekanizmaların çoğu açıklanmış olmasına rağmen, madde kullanım bozukluğunu tedavi etmek için onaylanan farmakolojik ajanların sayısı sınırlıdır. Madde kullanım bozukluğu için mevcut farmakoterapiler büyük ölçüde nörotransmitter-reseptör aktivitesinin küçük molekül modülasyonundan oluşmaktadır. Bu tedaviler bazı klinik başarılar göstermiş olsa da, umut verici pek çok terapötik fırsatı kaçırmamak adına, konuyu daha geniş bir perspektiften ele almak gerekir. Bu nedenle, alanı ileriye taşımak ve tedaviyi iyileştirmek için madde kullanım bozukluğuna yönelik yeni farmakolojik müdahalelere büyük ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır. Bu perspektifte, madde kullanım bozukluğu için ncRNA'ları yeni terapötik yaklaşımlar olarak geliştirmek üzere; bu araçların madde kullanım bozukluğu üzerindeki potansiyel etkilerinin irdelendiği ve tedavisinin geleceğine ilişkin değerlendirmelerin yapıldığı araştırmaların sınırlı sayıda olduğu dikkat çekmektedir. Söz konusu ihtiyaçtan yola çıkılarak, Alkaç ve Mercan (2023) yaptığı çalışmada, madde kullanım bozukluğunun tedavisi için ncRNA'yı hedefleyen umut verici son terapötik stratejilere bir bakış sunmuştur. Araştırmacılar yaptığı çalışmada, madde kullanım bozukluğunda yer alması olası farklı ncRNA sınıfları tanımlamış, ncRNA'ları değerlendirmek için kullanılan yöntemlere genel bir bakış sağlamış ve madde kullanım bozukluğu için ncRNA bazlı tedavi stratejileri ortaya koymuştur. Ayrıca, ncRNA hedeflemenin devam eden zorluklarını tartışarak, madde kullanım bozukluğunda ncRNA bazlı terapötikler için geleceğe dönük perspektifler sunmuşlardır (132).

6. SONUÇ

Literatürde yapılan araştırmalarda örnek gruplarının cinsiyet yönünden uyumlu olması ve yaşa göre eşleşmesi gerektiği belirtilmektedir. Özellikle madde kullanım bozukluklarıyla ilişkili spesifik miRNA'ları araştıran çalışmalarda, örnek gruplara tek cinsiyetin dahil edildiği dikkat çekmektedir. Deney tasarımı bir diğer önemli bir konu istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmek için gereken örnek sayısının belirlenmesidir. Çünkü gruplar arası homojen dağılım, örneklem büyüklüğünü etkileyen önemli bir değişkendir. Başlangıçta bu çalışmada bağımlı, tedavi ve kontrol gruplarına yeterli sayıda birey dahil edilmiştir. Ancak, gruplara dahil edilen bireylerin bazıları, periferik kanda düşük RNA konsantrasyonları göstermeleri nedeniyle istatistiksel analizlerin anlamlı sonuçlanabilmesi için analiz aşamasından önce gruptan çıkarılmıştır. Bu durum, çalışmada gruplardaki örnek sayısının azalmasına neden olmuştur. Örneklemenin küçük olması çalışmanın kısıtlılıkları arasındadır. Ancak istatistiksel anlamlılık için deneyler iki kez tekrarlanmıştır. Çalışmada, gruplara yalnızca erkek bireylerin dahil edilmesiyle cinsiyet parametresi açısından karışıklığa neden olmaması çalışmanın avantajlı yönlerindendir. Yaş değişkeni açısından bağımlı grubu ile kontrol grubu arasında, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunurken; bağımlı grubu ile tedavi grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadığı ortaya konmuştur. Bu durumun, yaş değişkeni için anlamlı fark bulunan grupların arasında gerçekleştirilen miRNA ekspresyon analizlerinin sonuçlarını etkilediği düşünülmektedir.

Çalışmada, aday miRNA'lardan miR-9-5p ve miR-26b-5p'nin bağımlı ve kontrol grupları arasında miRNA ΔC_t değerleri açısından anlamlı fark bulunmaması, tedavi ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunması; örneklem sayısının azlığından kaynaklanabileceğini göstermiş olsa da, bu gruplar arasında aynı zamanda yaş değişkeni için anlamlı fark bulunması elde edilen miRNA ΔC_t değerleri verilerini desteklediği görülmektedir. miR-9-5p ve miR-26b-5p için elde edilen bu sonuçlar, bu miRNA'ların

yaşlanmada ve yaş ile ilişkili hastalıkların oluşmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, insanlarda yaşlanma sürecinde dolaşımda ve periferik kanda miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde önemli değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Alzheimer hastalarından alınan serum ve tam kan örneklerinde artmış miR-26b'nin ekspresyon düzeyleri bulunurken; nöronal dendritlerde artmış miR-9 ve miR-26a ekspresyon düzeyleri bulunmuştur. Dolayısıyla, miR-9-5p ve miR-26b-5p'nin yaş ve yaşa bağlı hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olabilecekleri düşünülmektedir.

Diğer yandan, bu aday miRNA'lar için bağımlı ve tedavi grupları arasında miRNA ΔCt değerleri açısından anlamlı fark bulunması ve ayrıca farklılığın ROC analizleri verileri ile desteklenmesi; CUD ile ilişkisi kanıtlanmış miR-9-5p ve miR-26b-5p'nin, biyobelirteç olarak erken tanı çalışmalarına eklenebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, miR-9-5p ve miR-26b-5p'nin, bağımlılık tedavisinde terapötik belirteçler olarak görev alabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada, aday miRNA'lardan miR-132-3p ve miR-134-5p'nin miRNA ΔCt değerleri açısından bağımlı ile kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunması, tedavi ile bağımlı grupları arasında anlamlı fark bulunması, tedavi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmaması, ayrıca gruplar arasında görülen bu anlamlı farklılığın yapılan ROC analizleri verileri ile desteklenmesi; CUD ile ilişkisi kanıtlanmış miR-132-3p ve miR-134-5p'nin biyobelirteç olarak erken tanı çalışmalarına eklenebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, miR-132-3p ve miR-134-5p'nin bağımlılık tedavisinde terapötik belirteçler olarak görev alabileceğini göstermektedir.

Beyin hastalıklarının gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaları inceleyen çalışmalar henüz gelişme aşamasındadır ve bu da klinik tedaviler için sınırlamalar yaratmaktadır. Son yıllarda eksozomlar, hastalık sürecindeki kritik önemleri ve klinik

uygulama için potansiyel değerleri nedeniyle Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi beyin hastalıklarının incelenmesinde büyük ilgi görmektedir. miRNA'ların eksozomlar tarafından konak hücrelerin hedef moleküllerine iletildiği ve böylece normal beyin fonksiyonunun sürdürülmesinde önemli rol oynadıkları bildirilmektedir. Alandaki önceki çalışmalar, beyin eksozomlarında bulunan RNA'larda kokaine bağlı bazı değişikliklerin, kokain bağımlısı olan bireylerden izole edilen beyin omurilik sıvısı ve serum eksozomlarında da gözlenip gözlenmediğini araştırmaya yönelik devam etmiştir. Bu bağlamda, yakın gelecekte kokain bağımlılığında beyin omurilik sıvısı ve serum eksozomlarında bulunan miRNA'ların rolünü araştıran çalışmaların ortaya konmasının, bağımlılık tedavisi için yeni hedefler ve/veya kokain bağımlılığı ve yoksunluğu için yeni biyobelirteçler bulunmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

2020 yılına kadar çoğu insanın RNA uygulamalarına aşinalığı yoktu. İnsanlar genom düzenleme ve gen ifadesinin değiştirilmesi hakkında genel bilgilere sahipti. Ancak bu durumun mRNA aşılarının gelişinden bu yana değiştiği görülmektedir. SARS-CoV-2'ye karşı onaylanan ilk aşılarda mRNA aşılarda olması, mRNA temelli tedavilerin kitleler arasında yaygınlaşmasında çok önemli bir rol oynamıştır. RNA uygulaması sadece aşılarda sınırlı değildir; ayrıca teşhis, tedavi ve araştırmalarda önemli bir potansiyel role sahiptir. RNA terapileri oldukça yakın zamanda ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, çeşitli RNA terapileri şimdiden kliniklere girmiştir. RNA ilaçları örneğin, Duchenne kas distrofisi ve Spinal müsküler atrofi için onaylanmıştır. RNA terapilerinin, şu anda herhangi bir tedavi seçeneği bulunmayan hastalıkları tedavi etmek için kullanılacağı öngörülmektedir. RNA ilaçları, her ne kadar maliyetli bir teknoloji olsa da RNA, onu diğer mevcut terapötik teknolojilerden üstün kılan belirli özelliklere sahiptir. İlk olarak, RNA ilaçları hem kodlayan hem de kodlamayan RNA'ların hedeflenmesini sağlamaktadır. İkinci olarak, RNA ilaçlarının tasarımı daha kolay ve hızlıdır. Üçüncüsü ve en önemlisi ise RNA terapileri geçici olup genomda kalıcı

değişikliklere yol açmamakta ve geleneksel ilaçlarla karşılaştırılabilir uzun vadeli bir etki üretebilmektedir. Bugüne kadar, madde kullanım bozukluğunda ncRNA'ların periferik profillerini araştıran çalışmalar, miRNA'ların gen ekspresyonunu düzenlediklerini ve potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceklerini göstermiştir. Bu bağlamda, kokain bağımlılığında miRNA'ların ekspresyon profillerinin ortaya konması, biyobelirteç belirlenmesinde büyük önem arz etmektedir. Çünkü tespit edilebilecek yeni biyobelirteçlerin ileride ticarileşme potansiyeli bulunmaktadır.

Popülasyonlar arasındaki genetik varyasyon kalıplarının hem hastalık riskini hem de tedavi etkinliğini ve güvenliğini etkileyebileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte, GWAS'a katılanların çoğunun Avrupa kökenli olduğu; yine de, çalışmaların çoğunun hala Avrupa soy popülasyonlarında gerçekleştiği belirtilmekte ve bu mevcut durumda sonuçların popülasyonlar arasında sınırlı faydası olabileceği yönünde tartışmalar yer almaktadır. Madde kullanım bozukluklarına olan duyarlılık, insan popülasyonlarındaki bireyler arasında farklılık göstermekte; hem genetik hem de çevresel faktörler tarafından belirlenmektedir. Bununla birlikte, psikostimulanlara duyarlılığın genetik temeli hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla, madde kullanım bozuklukları riskine katkıda bulunan genetik varyasyonu belirlemek için GWAS'ın istatistiksel gücü, çevresel etkilerin ve fenotipik heterojenliğin hesaba katılmadığı ölçüde sınırlıdır. Literatürde, hem bozukluğun fenotipik heterojenliğini hem de çocukluk çağı çevresel faktörlerini inceleyerek gen-çevre etkileşimini dikkate alan CUD için genom çapında çok az çalışma yapıldığı gözlenmiştir. Ülkemizde popülasyon veri tabanımızda toplumumuza ait kokain bağımlılığı ile ilişkili miRNA profilleri, bu çalışmayla ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma ile elde edilen veriler, toplumumuzda fenotipik heterojenite ve gen-çevre etkileşiminin, kokain bağımlılığında transkriptomik biyobelirteçler olan miRNA'ların ekspresyon düzeylerini nasıl etkilediğini göstermektedir. Dolayısıyla, kokain bağımlılığının moleküler mimarisi olarak bu çalışmadan elde edilen verilerin, bugüne

kadar yapılan GWAS ve yakın gelecekte gerçekleştirilecek olan genom/transkriptom çapındaki analizler için katkı sağlayacağı düşnlmektedir. Bununla birlikte, bu çalışmadan elde edilen verilerin, gen ekspresyon veri tabanlarına işlenerek, gelecekte ilaç tasarımı için biyoinformatik tekniklerle birlikte yararlanılmasına katkıda bulunacağı düşnlmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Zogg H, Rajan S, and Seungil R. Current advances in RNA therapeutics for human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(5):2736.
2. Zhao Y, Qin F, Han S, Li S, Zhao Y, Wang H, et al. MicroRNAs in drug addiction: Current status and future perspectives. *Pharmacology & Therapeutics*, 2022;236:108215.
3. Yamada Y. Nucleic acid drugs—current status, issues, and expectations for exosomes. *Cancers*, 2021;13(19):5002.
4. Gowen AM, Odegaard KE, Hernandez J, Chand S, Koul S, Pendyala G, et al. Role of microRNAs in the pathophysiology of addiction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2021;12(3):e1637.
5. Seyednejad SA, Sartor GC. Noncoding RNA therapeutics for substance use disorder. *Advances in drug and alcohol research*, 2022;2:10807.
6. Sharma V, Misteli T. Non-coding RNAs in DNA damage and repair. *FEBS letters*, 2013;587(13):1832-1839.
7. Sharma V, Misteli T. Non-coding RNAs in DNA damage and repair. *FEBS letters*, 2013;587(13):1832-1839.
8. Viola TW, Heberle BA, Zaparte A, Sanvicente-Vieira B, Wainer LM, Fries GR, et al. Peripheral blood microRNA levels in females with cocaine use disorder. *Journal of psychiatric research*, 2019;114:48-54.
9. . Gu WJ, Zhang C, Zhong Y, Luo J, Zhang CY, Zhang C, et al. Altered serum microRNA expression profile in subjects with heroin and methamphetamine use disorder. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020;125:109918.

10. Xu H, Brown AN, Waddell NJ, Liu X, Kaplan GJ, Chitaman JM. Et al. Role of long noncoding RNA Gas5 in cocaine action. *Biological psychiatry*, 2020;88(10):758-766.
11. Roy, B, Yoshino, Y, Allen, L, Prall, K, Schell, G, & Dwivedi, Y. Exploiting circulating MicroRNAs as biomarkers in psychiatric disorders. *Molecular diagnosis & therapy*, 2020;24(3), 279-298.
12. Biondich AS, & Joslin J. Coca: the history and medical significance of an ancient Andean tradition. *Emergency medicine international*, 2016.
13. Roque BR, Faria AC, Brito-da-Costa, A. M., Carmo, H., Mladěnka, P, Dias da Silva, et al. Cocaine: an updated overview on chemistry, detection, biokinetics, and pharmacotoxicological aspects including abuse pattern. *Toxins*, 2022;14(4), 278.
14. Loyola D, Mendoza R, Chiong L, Rueda M, Alvítez-Temoche D, Gallo W, et al. Ethanol extract of *Schinus molle* L.(molle) and *Erythroxylum coca* Lam (coca): Antibacterial properties at different concentrations against *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 2020;10(5), 579.
15. Drake LR, & Scott PJ. DARK classics in chemical neuroscience: cocaine. *ACS chemical neuroscience*, 9(10), 2018;2358-2372.
16. Gold, MS. Cocaine, Springer Science & Business Media. 2012;(3).
17. Wielenga V & Gilchrist, D, From gold-medal glory to prohibition: the early evolution of cocaine in the United Kingdom and the United States. *JRSM Short Reports*, 2013;4(5), 1-5.
18. Degenhardt L, Stockings E, Strang J, Marsden J & Hall WD. Illicit drug dependence. *Mental, Neurological, and Substance Use Disorders*, 2016;109.

19. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2023. ISBN: 9789210028233, Available from: https://www.unodc.org/res/WDR-2023/WDR23_Exsum_fin_SP.pdf. [cited 2023 Sep 19].
20. Unit LA. Coca Cultivation and Cocaine Processing: An Overview. 2021.
21. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Cocaine insights2 2021. Available from: https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/cocaine/Cocaine_Insights_2021_2.pdf (cited 2023 Sep 10).
22. Offenses, FC. (2002). An Analysis of Crack and Powder Penalties. US Department of Justice, 19. Available from: https://www.justice.gov/archive/olp/pdf/crack_powder2002.pdf (cited 2023 May10).
23. Gumus, Z. P., Celenk, V. U., GULER, E., Demir, B., Coskunol, H., & Timur, S. (2016). Determination of Cocaine and Benzoylecgonine in Biological Matrices by HPLC and LC-MS/MS. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry, 3(3), 535-550.
24. Edwards, D. J., & Bowles, S. K. (1988). Protein binding of cocaine in human serum. Pharmaceutical research, 5, 440-442.
25. Hatsukami, DK, & Fischman MW. Crack cocaine and cocaine hydrochloride: Are the differences myth or reality?. Jama, 1996;276(19), 1580-1588.
26. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Available from: <https://www.asam.org/quality-care/definition-of-addiction> (cited 2022 May 22).
27. Merikangas KR, McClair VL. Epidemiology of substance use disorders. Hum Genet, 2012; Jun;131(6):779-89.

28. Hasin DS, O'brien CP, Auriacombe M, Borges G, Bucholz K, Budney A, et al. DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *American Journal of Psychiatry*, 2013;170(8), 834-851.
29. Fernandez-Castillo N, Cabana-Dominguez J, Corominas R, & Cormand B. Molecular genetics of cocaine use disorders in humans. *Molecular psychiatry*, 2022;27(1), 624-639.
30. Lo TW, Yeung JWK, & Tam CHL. Substance Abuse and Public Health: A Multilevel Perspective and Multiple Responses. *International journal of environmental research and public health*, 2020;17(7), 2610.
31. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) European Drug Report Trends and Developments (2023), Available from: https://www.emcdda.europa.eu/index_en# (cited 2023 Sep 23).
32. Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM). Türkiye Uyuşturucu Raporu. EGM Yayın Katalog No: 763. Erişim adresi: https://www.narkotik.pol.tr/kurumlar/narkotik.pol.tr/TUBİM/Ulusal%20Yayınlar/2023_TURKIYE_UYUSTURUCU_RAPORU.pdf (Son Erişim Tarihi: 22.09.2023).
33. Bradberry CW. Book Review: Dynamics of Extracellular Dopamine in the Acute and Chronic Actions of Cocaine. *The Neuroscientist*, 2002;8(4), 315-322.
34. McKeon A, Frye MA, & Delanty N. The alcohol withdrawal syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2008;79(8), 854-862.
35. Dejong, W. Relapse prevention: an emerging technology for promoting long-term drug abstinence. *International Journal of the Addictions*, 1994;29(6), 681-705.

36. Duncan JR. Current perspectives on the neurobiology of drug addiction: A focus on genetics and factors regulating gene expression. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
37. Degenhardt L, & Hall W. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. *The Lancet*, 2012;379(9810), 55-70.
38. Walker, DM, & Nestler E J, Neuroepigenetics and addiction. *Handbook of clinical neurology*, 2018; 148, 747–765.
39. Hyman SE, Malenka RC, & Nestler E J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci*, 2006;29, 565-598.
40. Weiss, F, Paulus MP, Lorang MT, & Koob G F. Increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens by cocaine are inversely related to basal levels: effects of acute and repeated administration. *Journal of Neuroscience*, 1992; 12(11), 4372-4380.
41. Kalivas PW. Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *American journal on Addictions*, 2007;16(2), 71-78.
42. Goldstein RZ, Alia-Klein N, Volkow NS, Larry RS. Drug addiction: neuroimaging. In: *Encyclopedia of neuroscience* (Squire LR, ed), Academic Press, Oxford, 2009;699-711.
43. Abraham WC. Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 2008;9(5), 387-387.
44. Daneff MA, & Jadavji NM The Role of Synaptic Plasticity in the Pathophysiology of Cocaine Addiction. *Journal of Young Investigators*, 2019;37(4).
45. Ducci F & Goldman D. The genetic basis of addictive disorders. *Psychiatric Clinics*, 2012;35(2), 495-519.

46. Khan AH, Bagley JR, LaPierre N, Gonzalez-Figueroa C, Spencer TC, Choudhury M, et al. Genetic pathways regulating the longitudinal acquisition of cocaine self-administration in a panel of inbred and recombinant inbred mice. *Cell reports*, 2023; 42(8), 112856.
47. Wetherill L, Schuckit MA, Hesselbrock V, Xuei X, Liang T, Dick DM, et al. Neuropeptide Y receptor genes are associated with alcohol dependence, alcohol withdrawal phenotypes, and cocaine dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2008; 32(12), 2031-2040.
48. Briand LA, Lee FS, Blendy JA, & Pierce RC. Enhanced extinction of cocaine seeking in brain-derived neurotrophic factor Val66Met knock-in mice. *European Journal of Neuroscience*, 2012;35(6), 932-939.
49. Pierce RC, Fant B, Swinford-Jackson SE, Heller EA, Berrettini WH, & Wimmer ME. (2018). Environmental, genetic and epigenetic contributions to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology*, 43(7), 1471-1480.
50. Gelernter J, & Polimanti R. Genetics of substance use disorders in the era of big data. *Nature Reviews Genetics*, 2021;22(11), 712-729.
51. Huggett SB, & Stallings MC. Cocaine'omics: genome-wide and transcriptome-wide analyses provide biological insight into cocaine use and dependence. *Addiction Biology*, 2020;25(2), e12719.
52. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004;116(2), 281-297.
53. miRBase: the microRNA database. Available from: <http://www.mirbase.org/>
54. Gulyaeva LF & Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of translational medicine*, 2016;14(1), 143.

55. Ni WJ, & Leng XM. miRNA-dependent activation of mRNA translation. *Microna*, 2016;5(2), 83-86.
56. Lu J & Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome research*, 2012;22(7), 1243-1254.
57. Sijen T. Molecular approaches for forensic cell type identification: on mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Science International: Genetics*, 2015; 18, 21-32.
58. Lawrie CH. MicroRNAs: a brief introduction. *MicroRNAs in Medicine*, 2013; 1-24.
59. Sridharan Kgogtay NJ. Therapeutic nucleic acids: current clinical status. *British journal of clinical pharmacology*, 2016;82(3):659-672.
60. Sharma V, Misteli T. Non-coding RNAs in DNA damage and repair. *FEBS letters*, 2013;587(13):1832-1839.
61. Xuan C, Yang E, Zhao S, Xu J, Li P, Zhang Y, Jiang Z, Ding X. Regulation of LncRNAs and microRNAs in neuronal development and disease. *PeerJ*, 2023;11:e15197.
62. Ha M & Kim VN, Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 2014;509-524.
63. Understanding Drug Use and Addiction DrugFacts. Available from: <https://nida.nih.gov/publications/drugfacts/understanding-drug-use-addiction> (cited 2023 Sep 19).
64. Sampedro-Piquero P, Santín L, Castilla-Ortega E. Aberrant brain neuroplasticity and function in drug addiction: a focus on learning-related brain regions. *Behavioral Neuroscience*, 2019;1-24.

65. Jung Y. “Coding” Is Not Enough: The Role of Long “Noncoding” RNA for Cocaine Addiction. *Biological Psychiatry*, 2020;88(10):e45-e47.
66. Chandrasekar V, & Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2019;42(4), 350-362.
67. Dash S, Balasubramaniam M, Martínez-Rivera FJ, Godino A, Peck EG, Patnaik S, et al. J. Cocaine-regulated microRNA miR-124 controls poly (ADP-ribose) polymerase-1 expression in neuronal cells. *Scientific reports*, 2020;10(1), 11197.
68. Chandrasekar V, Dreyer JL. Regulation of MiR-124, Let-7d, and MiR-181a in the accumbens affects the expression, extinction, and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(6):1149-64.
69. Hollander JA, Im HI, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, Willoughby D, Wahlestedt C, Conkright MD, Kenny PJ. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*. 2010;466(7303):197-202.
70. Bahi A, Dreyer JL. Striatal modulation of BDNF expression using micro RNA 124a-expressing lentiviral vectors impairs ethanol-induced conditioned-place preference and voluntary alcohol consumption. *European Journal of Neuroscience*, 2013;38(2):2328-2337.
71. Chen CL, Liu H, & Guan X. Changes in microRNA expression profile in hippocampus during the acquisition and extinction of cocaine-induced conditioned place preference in rats, *Journal of biomedical science*, 2013; 20(1), 1-10.
72. Erdoğan B. Alkol bağımlılığının insan beyin dokusundaki MİR-124,125 B, 206 ve 339-5P ekspresyonları üzerine etkisi (Yüksek Lisans Tezi) Yök Tez, 448851, 2016.
73. Çaykara B. Eroin Bağımlısı Kişilerde Mikrorna Ekspresyonlarının Bağımlılıkla İlişkisinin İncelenmesi (Doktora Tezi). Yök Tez, 482785, 2017.

74. Sadakierska-Chudy, A Frankowska, M, Miszkiel J, Wydra K, Jastrzębska J & Filip M. Prolonged induction of miR-212/132 and REST expression in rat striatum following cocaine self-administration. *Molecular neurobiology*, 2017;54, 2241-2254.
75. Demirel G. Metilendioksimetamfetamin Bağımlısı İnsanlarda Postmortem Beyin Dokularındaki Mikrorna Ekspresyon Profillerinin Araştırılması (Doktora Tezi). Yök Tez, 487613, 2018.
76. Cabana-Domínguez J, Arenas C, Cormand B, & Fernàndez-Castillo N. MiR-9, miR-153 and miR-124 are down-regulated by acute exposure to cocaine in a dopaminergic cell model and may contribute to cocaine dependence. *Translational psychiatry*, 2018; 8(1), 173.
77. Quinn RK, James MH, Hawkins GE, Brown AL, Heathcote A, Smith D, Wet al, Temporally specific miRNA expression patterns in the dorsal and ventral striatum of addiction-prone rats. *Addiction biology*, 2018;23(2):631-642.
78. Jia M, Wang X, Zhang H, Ye C, Ma H, Yang M, Li Y, Cui C. MicroRNA-132 in the adult dentate gyrus is involved in opioid addiction via modifying the differentiation of neural stem cells. *Neuroscience bulletin*. 2019;35:486-96.
79. Mavrikaki M, Anastasiadou E, Ozdemir RA, Potter D, Helmholtz C, Slack FJ, Chartoff EH. Overexpression of miR-9 in the nucleus accumbens increases oxycodone self-administration. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2019;22(6):383-93.
80. Li Y, Lu X, Nie J, Hu P, Ge F, Yuan T F, et al. 2020. MicroRNA134 of Ventral Hippocampus Is Involved in Cocaine Extinction-Induced Anxiety-like and Depression-like Behaviors in Mice, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2010; 19, 937-950.

81. Kumaresan V, Lim Y, Juneja P, Tipton AE, de Guglielmo G, Carrette LLG, Kallupi M, Maturin L, Liu Y, George O, et al. Abstinence from Escalation of Cocaine Intake Changes the microRNA Landscape in the Cortico-Accumbal Pathway. *Biomedicines*. 2023; 11(5):1368.
82. Kumar S & Reddy PH. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2016; 1862(9), 1617-1627.
83. Xu W, Zhao M, Lin Z, Liu H, Ma H, Hong Q, Gui D, Feng J, ZhouW. Increased expression of plasma hsa-miR-181a in male patients with heroin addiction use disorder. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2020;34(11):e23486.
84. Viola TW, Heberle BA, Zaparte A, Sanvicente-Vieira B, Wainer LM, Fries GR, Grassi-Oliveira R. Peripheral blood microRNA levels in females with cocaine use disorder. *Journal of psychiatric research*, 2019;114:48-54.
85. García-Gutiérrez MS, Navarrete F, Sala F, Gasparyan A, Austrich-Olivares A, & Manzanares, J. Biomarkers in psychiatry: concept, definition, types and relevance to the clinical reality. *Frontiers in psychiatry*, 2020; 11, 432.
86. Bozkurt M. Madde Kullanım Bozukluklarında Tedavinin Nörobilimsel Temelleri, *Arch Neuropsychiatry* 2022;59:75–80.
87. Xi ZX. "Medication development for the treatment of cocaine addiction—progress at preclinical and clinical levels". *Addictions – From Pathophysiology to Treatment* (2012).
88. Kampangkaew JP, Spellicy CJ, Nielsen EM, Harding MJ, Ye A, Hamon, SC, et al. “Pharmacogenetic role of dopamine transporter (SLC6A3) variation on response to disulfiram treatment for cocaine addiction”, *The American journal on addictions*, 2019; 28(4), 311-317.

89. Chesworth, R., & Karl, T. (2020). Cannabidiol (CBD) reduces cocaine-environment memory in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 199, 173065.
90. Hurd YL, Spriggs S, Alishayev J, Winkel G, Gurgov K, Kudrich C, et al. Cannabidiol for the Reduction of Cue-Induced Craving and Anxiety in Drug-Abstinent Individuals With Heroin Use Disorder: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *The American journal of psychiatry*, 2019;176(11), 911–922.
91. Mongeau-Pérusse V, Brissette S, Bruneau J, Conrod P, Dubreucq S, Gazil G, et al. “Cannabidiol as a treatment for craving and relapse in individuals with cocaine use disorder: a randomized placebo-controlled trial”, *Addiction*. 2021.
- 92 Kadric S, Mohler H, Kallioniemi O, & Altmann KH. A multicenter, randomized, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of long-acting injectable formulation of vanoxerine (vanoxerine consta 394.2 mg) for cocaine relapse prevention. *World Journal of Neuroscience*, 2019; 9(03), 113.
93. Sartor GC, St. Laurent III G, Wahlestedt C. The emerging role of non-coding RNAs in drug addiction. *Frontiers in genetics*, 2012;3:106.
94. Quinn RK, James MH, Hawkins GE, Brown AL, Heathcote A, Smith DW, et al. Temporally specific miRNA expression patterns in the dorsal and ventral striatum of addiction-prone rats. *Addiction biology*, 2018;23(2):631-642.
95. Zhu Y, Zhu L, Wang X, Jin H. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell death & disease*, 2022;13(7):644.
96. Hastings ML, Krainer AR. RNA therapeutics. *RNA*. 2023;29(4):393-5.

97. Zhao M, Wang R, Yang K, Jiang Y, Peng Y, Li Y, Zhang Z, Ding J, Shi S. Nucleic acid nanoassembly-enhanced RNA therapeutics and diagnosis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2023;13(3):916-941.
98. Bannon MJ, Savonen CL, Jia H, Dacht F, Halter SD, Schmidt CJ, et al. Identification of long noncoding RNA s dysregulated in the midbrain of human cocaine abusers. *Journal of neurochemistry*, 2015; 135(1), 50-59.
99. Pascale E, Divisato G, Palladino R, Auriemma M, Ngalya EF, & Caiazzo M, Noncoding RNAs and Midbrain DA Neurons: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Health and Disease, *Biomolecules*, 2020; 10(9), 1269.
100. Lee JC, & Janda KD. Development of effective therapeutics for polysubstance use disorders. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2022;66, 102105.
101. Hiebler-Ragger M & Unterrainer HF. The role of attachment in poly-drug use disorder: an overview of the literature, recent findings and clinical implications. *Frontiers in psychiatry*, 2019;579.
102. Pergolizzi J, Breve F, Magnusson P, LeQuang JAK, Varrassi G & Pergolizzi JrJ. Cocaethylene: when cocaine and alcohol are taken together. *Cureus*, 2022;14(2).
103. Ahmad A, Imran M, Ahsan H. Biomarkers as Biomedical Bioindicators: Approaches and Techniques for the Detection, Analysis, and Validation of Novel Biomarkers of Diseases. *Pharmaceutics*. 2023; 15(6):1630.
104. Özkaya D. Kokain ve Metabolitlerinin İnsan İdrarında Analizi, (Yüksek Lisans Tezi), Yök Tez, 494690, 2016.
105. Machado MTV. (2015). *Microrna Biomarkers For Peripheral Blood Fractions Identification: Possible Forensic Applications*.

106. Nohesara S, Ghadirivasfi M, Mostafav, S, Eskandari MR, Ahmadkhaniha H, Thiagalingam, S, & Abdolmaleky HM. DNA hypomethylation of MB-COMT promoter in the DNA derived from saliva in schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of psychiatric research*, 2011;45(11), 1432-1438.
107. Alkaç SA, Mercan S, Mikro RNA'ların Yaş Tahmininde Kullanılabilirliğinin Değerlendirilmesi, 1. Uluslararası 17. Ulusal Adli Bilimler Kongresi, Çevrimiçi Kongre, Türkiye, 12-15 Kasım 2020.
108. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells*, 2020; 9(2), 276.
109. Borga C, Meeran SM, & Fassan M. Non-coding RNAs, a real next-gen class of biomarkers?. *Non-coding RNA Research*, 2019;4(3), 80.
110. Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 2001;25(4), 402-408.
111. George D & Mallery M (2010). *SPSS for Windows Step by Step: A Simple Guide and Reference*, 17.0 update (10a ed.) Boston: Pearson.
112. Doura MB, & Unterwald EM. MicroRNAs Modulate Interactions between Stress and Risk for Cocaine Addiction. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2016;10, 125.
113. Maze I, Feng J, Wilkinson MB, Sun H, Shen L, & Nestler EJ. Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011;108(7), 3035-3040.

114. Anders QS, Klauss J, Rodrigues LCDM, & Nakamura-Palacios, EM. FosB mRNA expression in peripheral blood lymphocytes in drug addicted patients. *Frontiers in Pharmacology*, 2018; 9, 1205.
115. Di Palo A, Siniscalchi C, Salerno M, Russo A, Gravholt CH, & Potenza N. What microRNAs could tell us about the human X chromosome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020;77, 4069-4080.
116. Maier MC, McInerney MR A, Graves JM, & Charchar FJ. Noncoding Genes on Sex Chromosomes and Their Function in Sex Determination, Dosage Compensation, Male Traits, and Diseases. *Sexual Development*, 2021;15(5-6), 432-440.
117. Rounge TB, Umu SU, Keller A, Meese E, Ursin G, Tretli S, et al. Circulating small non-coding RNAs associated with age, sex, smoking, body mass and physical activity. *Scientific reports*, 2018;8(1), 17650.
118. Kim CK, Asimes A, Zhang M, Son BT, Kirk JA, & Pak TR. Differential stability of miR-9-5p and miR-9-3p in the brain is determined by their unique cis-and trans-acting elements. *Eneuro*, 2020; 7(3).
119. Pietrzykowski AZ, Friesen RM, Martin GE, Puig SI, Nowak CL, Wynne PM, et al. Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. *Neuron*, 2008;59(2), 274-287.
120. Mead EA, Wang, Y, Patel S, Thekkumthala AP, Kepich R, Benn-Hirsch E, et al. miR-9 utilizes precursor pathways in adaptation to alcohol in mouse striatal neurons. *Advances in Drug and Alcohol Research*, 2023; 3, 11323.
121. Song KW, Zhang QG, Tan WB, & Fang YN. Diagnostic significance of serum miR-26b and miR-21 expressions in ovarian cancer and their associations with clinicopathological

characteristics and prognosis of patients. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 2020;24(4).

122. Stringer RL, Laufer BI, Kleiber ML, & Singh SM. Reduced expression of brain cannabinoid receptor 1 (Cnr1) is coupled with an increased complementary micro-RNA (miR-26b) in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders. *Clinical epigenetics*, 2013;5(1), 1-4.

123. Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005;102(45), 16426-16431.

124. Smith PY, Hernandez-Rapp J, Jolivet F, Lecours C, Bisht K, Goupil C, et al. miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Human molecular genetics*, 2015;24(23), 6721-6735.

125. Momen-Heravi F, Catalano D, Talis A, Szabo G, & Bala S. Protective effect of LNA-anti-miR-132 therapy on liver fibrosis in mice. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2021;25, 155-167.

126. Mamdani M, Williamson V, McMichael GO, Blevins T, Aliev F, Adkins, A, et al. Integrating mRNA and miRNA weighted gene co-expression networks with eQTLs in the nucleus accumbens of subjects with alcohol dependence. *PloS one*, 2015;10(9), e0137671.

127. Bureau of Justice Statistics. (1994). Fact sheet: Drug-related crime.

128. Grantham E K & Farris SP. Bioinformatic and biological avenues for understanding alcohol use disorder. *Alcohol*, 2019;74, 65-71.

129. Zhao W, Yang W, Zheng S, Hu Q, Qiu P, Huang X, et al. A new bioinformatic insight into the associated proteins in psychiatric disorders. *SpringerPlus*, 2016;5, 1-8.
130. Choi MR, Jin YB, Kim HN, Chai YG, Im CN, Lee SR, et al. Gene expression in the striatum of cynomolgus monkeys after chronic administration of cocaine and heroin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2021;128(5), 686-698.
131. Fernandes BS, Quevedo J, & Zhao Z. Fostering precision psychiatry through bioinformatics. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 2022; 44, 119-120.
132. Alkaç SA, Mercan S. RNA Dünyasından Kliniğe: Madde Kullanım Bozuklukları için RNA Terapötikleri. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 2024. (Kabul edildi, 27 Kasım 2023)

EKLER**Ek-1 Etik Kurul Onay Formu**

EK-2 Tez Çalışma İzni

EK-3 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

"Bir araştırma çalışmaya katılmak için davet edilmiş bulunmaktasınız. Aşağıdaki bilgileri okuduktan sonra çalışmaya katılmak isterseniz, bu formu imzalayınız. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacıya sorarak bilgi edinini".

Araştırmayla ilgili bilgiler

1. Bu katılacağınız çalışma **bilimsel bir araştırma** olup, **araştırmanın adı** "**Kokain Bağımlılarında Periferik Kandaki miRNA Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması**" dır.
2. **Araştırmanın amacı:**
Bu araştırmanın amacı, kokain bağımlılığının periferik kandaki miRNA üzerine etkisini ortaya koymaktır.
3. **Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre:**
Bu çalışmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Gönüllüden kan örneği alındıktan sonra hiçbir sorumluluğu olmayacaktır.
4. **Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı:**
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü katılımcı sayısı, çalışmaya rıza gösteren en fazla 100 kişi olacaktır.
5. **Araştırmada uygulanacak tedaviler:**
Gönüllülerden kan örneği almak dışında hiçbir müdahale yapılmayacak veya tedavide bulunulmayacaktır.
6. **Varsa farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığının bulunduğu:**
Gönüllülere herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.
7. **Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dâhil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümü:**
Araştırmada, çalışmaya rıza gösteren gönüllülerden bir defaya mahsus yalnızca kan örneği alınacaktır.
8. **Araştırmanın deneysel kısımları:**
Bu çalışmada, çalışmaya rıza gösteren gönüllülerden alınan kan örnekleri kullanılacaktır. Araştırmanın laboratuvar aşamasında ise gönüllülerden alınan kan örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra elde edilen total RNA'dan ters transkriptaz ile cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. Kanda miRNA'ların anlatım düzeyleri kantitatif real-time PCR yöntemi kullanılarak belirlenecektir.
9. **Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar dahil olmak üzere):**

Gönüllüden kan örneği alınacaktır. Bu araştırmada gönüllüler için herhangi bir risk ve zarar söz konusu değildir. Yalnızca kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirler. 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

10. Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirileceği:

Gönüllü açısından hedeflenen bölgeler ile ilgili herhangi bir klinik yarar yoktur.

11. Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve riskleri:

Gönüllüye herhangi bir girişim ya da tedavide bulunulmayacaktır.

12. İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa gönüllüye verilecek tazminat (sigorta) ve / veya sağlanacak tedaviler:

Gönüllülere yapılacak işlem kan örnekleri almak olup, bu işlem sırasında katılımcılarda doğabilecek hukuki ve mali riskleri tez öğrencisi üstlenir.

13. Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler:

Gönüllüler için herhangi bir ulaşım, yemek veya başka bir masraf ödenmeyecektir.

14. Gönüllülerin sorumlulukları:

Gönüllünün bu çalışmayla ilgili hiçbir yükümlülüğü yoktur.

15. 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 çekilebileceği:

Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlı olup, istediği zaman herhangi bir yaptırıma maruz kalmaksızın araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcı araştırma dışı bırakılabilir.

16. Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı:

Gönüllünün kimliği ile ilgili kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

17. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum 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 kanuni temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı:

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri olacaktır. Ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

18. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği:

Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllü veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

19. Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bu kişilere ait günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları:

Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi temin edebilmesi için Doktora tez öğrencisi Ayfer Alkaç'a, XXXXXXXXXX e-posta adresinden ulaşabilecektir.

20. Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler: Gönüllünün biyolojik örneğinden herhangi bir nedenle sonuç elde edilememesi durumunda katılım sona erdirilir.

21. Çalışma sonrası araştırma ürünlerine erişim:

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda gönüllünün kimliği kesin olarak gizli tutulacaktır.

22. Gönüllülerden alınacak biyolojik materyallerin ne olduğu, hangi amaçla alındığı ve analizlerinin nerede yapılacağına dair bilgiler (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması):

Bu çalışmanın materyali, gönüllülerden alınacak periferik tam kan örnekleridir. Gönüllülerden elde edilecek kan örneklerinde, miRNA'ların anlatım (ekspresyon) düzeyleri belirlenecektir. Bu materyal için araştırmaya katılan gönüllülerden, Balıklı Rum Hastanesi Merkez Laboratuvarında tıbbi personel yönetiminde ve denetiminde gerekli örnekler alınacaktır. Çalışma, İ.Ü-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Laboratuvarı'nda yapılacaktır. Biyolojik materyallerin analizleri kesinlikle yurtdışında yapılmayacak olup; çalışma, İ.Ü.-C. Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yapılacaktır.

23. BGOF, gönüllü veya kanuni temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içeremez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülüğün kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

BGOF'nin imza bölümünde:

“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 ayrılabilceğimi biliyorum” İfadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

“Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum” İfadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih

Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının adı / soyadı / imzası / tarih

Gerekli durumda işlemine tanık olan kişinin adı / soyadı / imzası / tarih

Gerekli durumda anne ve baba veya kanuni temsilcinin adı / soyadı / imzası / tarih

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen görevli tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi veya kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından da araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

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

İleride yapılacak araştırmalar için;

“Kokain Bağımlılarında Periferik Kandaki miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması” adlı araştırma kapsamında alınan kan 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:

Soyadı:

Telefon numarası:

Tarih:

Adres:

İmzası:

Yetkin Araştırmacının;

Adı: Süheyla Ayfer

Soyadı: Alkaç

Telefon numarası:

Tarih:

Adres:

İmzası:

Yasal temsilcinin;

Adı:

Soyadı:

Telefon numarası:

Tarih:

Adres:

İmzası:

EK-4 Katılımcı (Bilgi) Veri Formu

Tarih:/...../.....

Adı-Soyadı :

Cinsiyeti : ☐ Kadın ☐ Erkek

Yaş :

Medeni durum : ☐ Bekar ☐ Evli

Eğitim düzeyi : ☐ İlkokul ☐ Lise ☐ Lisans ☐ Yüksek Lisans ☐ Doktora

Yaşadığı İl : Telefon :

Çalışma Öyküsü: ☐ Düzenli bir işi var ☐ Kısa aralıklarla çalışmış şu an işsiz ☐ Hiç çalışmamış

Yaşam şekli : ☐ Yalnız yaşayanlar ☐ Evli veya Ailesi ile yaşayanlar

Boy : Kilo:

Anne yaşı :

Baba yaşı :

Anne eğitim düzeyi : ☐ İlkokul ☐ Lise ☐ Lisans ☐ Yüksek Lisans ☐ Doktora

Baba eğitim düzeyi : ☐ İlkokul ☐ Lise ☐ Lisans ☐ Yüksek Lisans ☐ Doktora

Anne mesleği :

Baba mesleği :

Kardeş sayısı :

Aile ekonomik düzey: ☐ Düşük ☐ Orta ☐ Yüksek

Sigara kullanımı : ☐ Evet ☐ Hayır **Miktar:** **Başlangıç yaşı:** ☐ Hayır

Alkol kullanımı : ☐ Evet ☐ Hayır **Miktar:** **Başlangıç yaşı:** ☐ Hayır

Madde kullanımı : ☐ Evet ☐ Hayır **Miktar:** **Başlangıç yaşı:** ☐ Hayır

Madde kullanmadan önce sigara kullanımı: ☐ Evet ☐ Hayır

Madde kullanmadan önce alkol kullanımı : ☐ Evet ☐ Hayır

Ailede alkol kullanan başka birey : ☐ Evet ☐ Hayır

Ailede madde kullanan başka birey : ☐ Evet ☐ Hayır

Alkol bağımlılığının başladığı yaş: İlk tedavi yaşı: ... Toplam hastaneye yatış sayısı:

Hastaneye yatışından önce almakta olduğu sağıltım: ☐ Yok ☐ Var (İlaç etken-doz):

Yatış esnasında düzenlenen sağıltım ve dozları:

Madde bağımlılığının başladığı yaş: İlk tedavi yaşı: Toplam hastaneye yatış sayısı: ...

Hastaneye yatışından önce almakta olduğu sağıltım: ☐ Yok ☐ Var (İlaç etken-doz):

Yatış esnasında düzenlenen sağıltım ve dozları:

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı-Soyadı : Süheyla Ayfer Alkaç
Doğum Yeri ve Tarihi : XXX
E-posta : XXX

Eğitim Bilgileri

2017-2024 İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler
Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı, (Doktora Programı)
2011-2013 Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Programı)
2006-2011 Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Biyoloji
Öğretmenliği (Lisans Programı)

Yabancı Dil Bilgisi İngilizce (B2), Fransızca (A2)

Makale & Bildiri & Sunum & Poster

1. **Alkaç SA**, Mercan S. RNA Dünyasından Kliniğe: Madde Kullanım Bozuklukları için RNA Terapötikleri. Osmangazi Tıp Dergisi, 2024. (Kabul edildi, 27 Kasım 2023) (Makale)
2. **Alkaç SA**, Mercan S. Mikro RNA'ların Yaş Tahmininde Kullanılabilirliğinin Değerlendirilmesi, 1. Uluslararası 17. Ulusal Adli Bilimler Kongresi, Çevrimiçi Kongre, Türkiye, 12-15 Kasım 2020. (Tam Bildiri ve Sunum)
3. **Alkaç SA**, Mercan S, Bugünü ve Geleceği ile Moleküler Otopsi. 1. Uluslararası 17. Ulusal Adli Bilimler Kongresi, Çevrimiçi Kongre, Türkiye, 2020. (Poster)
4. **Alkaç SA**, Yükseloğlu EH, Adli Cinsiyet Tayininde Farklı Bir Yaklaşım: Cheiloscopy, 15. Adli Bilimler Kongresi Bildiri Kitabı, 2018;151, 2018. (Poster)
5. Çevik FE, **Alkaç SA**, Çakan H, Kronik Psikiyatri Hastalarında İhmal Edilen Bir Alan: Ağız Sağlığı. 15. Adli Bilimler Kongresi Bildiri Kitabı, 2018;247, 2018. (Poster)
6. Sevindik E, Coşkun F, Selvi S and **Alkaç SA**, Comparative analysis of the genomic DNA isolation methods on some Silene L. (Caryophyllaceae). Biological Diversity and

Conservation, 6 (3), 67-71, (2013). (Makale)

7. **Alkaç SA**, Coşkun, F, Demir HK ve Taman N, Alaçam Dağları'nda (Balıkesir-Bigadiç) Arıların Ziyaret Ettiği Bitkiler, Arıcılık Eğitimi ve Etnobotanik Çalışmalar. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 2012;826. (Poster)

Projeler & Görevler

2023-2024	Bursiyer	Kokain Kullanım Bozukluğu Olan Bireylerde Periferik Tam Kan Transkriptom Profillerinin Araştırılması, TÜSEB Araştırma ve Geliştirme Projelerini Destekleme Programı, 12068.
2020-2023	Araştırmacı	Kokain Bağımlılarında Periferik Kandaki miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi, TDK-2020-35144.
2011-2013	Araştırmacı	Bigadiç Bitkisel Biyolojik Çeşitliliğinin Doğal Arıcılık Yoluyla Korunması, UNDP Global Environment Facility Small Grants Programme, GEF/SGP, TUR/SGP/OP5/STAR/BD/12/12.

Kurs Bilgileri

09-20 Aralık 2019	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (A kategorisi) İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
27-28 Şubat 2018	II. Deneysel Sinirbilim Yöntemleri Kursu “Teorik ve Uygulamalı Nörogenetik” İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinir Bilim Anabilim Dalı
01-02 Kasım 2012	Etnobotanik Atölyesi Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Eğitim Merkezi

Staj Bilgileri

01.02.2011 / 14.02.2011	İstanbul Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırmaları Merkezi Uygulama Laboratuvarı
-------------------------	---

19.07.2010 / 20.08.2010	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Prenatal Tanı Uygulama ve Araştırma Merkezi Sitogenetik Bölümü
20.07.2009 / 24.09.2009	İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Prenatal Tanı Uygulama ve Araştırma Merkezi Sitogenetik Bölümü ve Moleküler Genetik Bölümü

Sempozyum & Konferans & Seminerler

12-15 Kasım 2020	1. Uluslararası 17. Ulusal Adli Bilimler Kongresi (Adli Tıp Uzmanları Derneği)
02.05.2019	Adli Genetik Konulu IV. Biyoteknoloji Sempozyumu (İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi)
12-15 Nisan 2018	15. Adli Bilimler Kongresi (Adli Tıp Uzmanları Derneği)
9-11 March 2018	“XV. Molecular Biology and Genetics Students” Winter School (Istanbul University İÜGEN)
03.09.2012 /07.09.2012	21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı) (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)
24-25-26 Mayıs 2012	Kazdağları III. Ulusal Sempozyumu (Uluslararası katılımlı) (Balıkesir Üniversitesi)
27.02.2012	Kök Hücre ve Gen Tedavisi Sempozyumu (Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı)