



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ALZHEİMER HASTALARINDA BAZI BİYOGÖSTERGELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Başak Özlem PERK

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Benay CAN EKE**

**ANKARA
2019**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ALZHEİMER HASTALARINDA BAZI BİYOGÖSTERGELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Başak Özlem PERK

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. BENAY CAN EKE**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
17L0237008 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2019**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Alzheimer Hastalarında Bazı Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır.

Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Başak Özlem PERK

Tarih: 2019

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında Başak Özlem PERK tarafından hazırlanan
“Alzheimer Hastalarında Bazı Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/
OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 00.00.2019

Prof.Dr. Benay CAN EKE

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Onur ERDEM

Sağlık Bilimler Üniversitesi

Doç. Dr. Bülent ERGUN

Anadolu Üniversitesi

Doç. Dr. İlker ATEŞ

Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Epidemiyoloji	2
1.1.3. Klinik Tanı Kriterleri	3
1.1.4. Sınıflandırma	5
1.1.5. Klinik Evreleri	6
1.1.6. Nöropatofizyoloji	6
1.1.4.1. Amiloid Hipotezi	7
1.1.4.2. Tau hipotezi	8
1.1.4.3. Nöroinflamasyon	10
1.1.7. Tedavi Yaklaşımları	12
1.1.5.1. AChE inhibitörleri	13
1.1.5.2. Memantin	14
1.1.5.3. Donepezil ve Memantin kombinasyonu	14
1.1.5.4. Diğer tedavi yaklaşımları	15
1.1.8. Etiyoloji	16
1.1.8.1. Yaş	16
1.1.8.2. Aile Öyküsü	17
1.1.8.3. Cinsiyet	17
1.1.8.4. Eğitim düzeyi	18
1.1.8.5. Diyet	18
1.1.8.6. Sigara kullanımı	18

1.1.8.7. Genetik	19
1.1.8.7.1. APP geni	20
1.1.8.7.2. PSEN1 ve PSEN2 genleri	21
1.1.8.7.3. ApoE geni	21
1.2. CD33 geni	22
1.2.1. CD33 Proteini	23
1.2.3. CD33 ve AH	27
1.3. Sialik Asit	29
1.3.1. SA biyosentezi	31
1.4. Amaç	33
2. GEREÇ VE YÖNTEM	35
2.1. Gereç	35
2.1.1. Kullanılan cihazlar	35
2.1.2. Kullanılan kimyasallar	36
2.2. Yöntem	37
2.2.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Seçimi	37
2.2.2. Araştırma Kriterleri	39
2.2.2.1. Kontrol grubu dahil olmama kriterleri (dışlama ölçütleri)	39
2.2.2.2. Alzheimer hasta grubuna dahil olmama kriterleri (dışlama ölçütleri)	39
2.2.3. Kan Örneklerinin Toplanması	40
2.2.4. Periferik Kandan Plazma Eldesi	40
2.2.5. Plazma TSA Analizi	41
2.2.6. Periferik Kandan MN Hücre İzolasyonu	43
2.2.7. Akım Sitometri Yöntemi	46
2.2.8. qRT-PCR Yöntemi	48
2.2.8.1. qRT-PCR Yöntemiyle MN Hücrelerde CD33 Gen İfade Değişimlerinin Saptanması	50
2.2.8.1.1. Total RNA İzolasyonu	50
2.2.8.1.2. İzole Edilen RNA'ların Agaroze Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi ve Miktar Tayini	51
2.2.8.1.3. cDNA Sentezi	53
2.2.8.1.4. qRT-PCR Cihazı ile CD33 Gen Ekspresyon Analizi	54
2.2.9. ROC (receiver operator characteristics curve) analizi	54

2.2.10. İstatistiksel Analiz	55
3. BULGULAR	57
3.1. Çalışma Grubunun Özellikleri	57
3.2. Plazma TSA Analizi Bulguları	63
3.3. MN hücre sayısı	70
3.4. Akım Sitometri Bulguları	71
3.5. RNA Miktar Tayini	78
3.6. qRT-PCR Bulguları	82
3.7. ROC Analizi Bulguları	87
4. TARTIŞMA	93
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	101
ÖZET	104
SUMMARY	105
KAYNAKLAR	106
EKLER	117
Ek-1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	117
Ek-2. Anket Formu	120
EK-3. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu	122
ÖZGEÇMİŞ	124

ÖNSÖZ

Bu tez, Alzheimer Hastalığının CD33 protein düzeyi ve gen ekspresyonu ile ilişkisinin araştırılmasını amaçlamıştır. Tez çalışmam esnasında her türlü yardım ve desteği sağlayan, seçimlerim konusunda her zaman kendime örnek aldığım çok değerli danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Benay CAN EKE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım için laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim esnasında her daim başını ağrıttığım, sabırla yol gösteren, açıklayan, tüm problemlerimi çözen, moral ve motivasyonumu her zaman yüksek tutan Dr. Bio. Tülin ÖZKAN'a, deneylerimde yol gösteren, her konuda sıkıntımı dinleyen ve destek olan Uzm. Bio. Yalda HEKMATSHOAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Desteklerini her zaman hissettiğim Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle deneylerim esnasında gerek madde, malzeme gerekse fikir ihtiyacımın acil olduğu durumlarda hayatımı kurtaran canım hocam Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ'a teşekkür ederim.

Numunelerin toplanmasından deneylerin yapılmasına kadar her daim yanımda olan ve kahrımı çeken Ecz. Naile Merve GÜVEN'e teşekkür ederim.

Sevinçlerimi üzüntülerimi paylaştığım değerli arkadaşlarım, can yoldaşlarım Uzm. Ecz. Sezen YILMAZ SARIALTIN'a, Dr. Ecz. Derya ÇİÇEK POLAT'a ve Uzm. Ecz. Melek KARACAOĞLU'na teşekkür ederim.

Son olarak, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan canım aileme, hayatımın her alanında her zaman yanımda olan canım eşim Mehmet PERK'e, varlığıyla bana güç veren canım kızım Ekin PERK'e teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

AChE	Asetilkolinesteraz
AH	Alzheimer hastalığı
ApoE	Apolipoprotein E
AML	Akut Miyeloid Lösemi
APP	Amiloid-beta prekürsör proteini
ATP	Adenozin Trifosfat
A β	Amiloid Beta
BACE1	β -sekretaz 1
CD33	Cluster of differentiation 33 (başkalaşım kümeleri 33)
CD33 PMHO	CD33 pozitif monosit hücre oranı
DSM-IV	Amerikan Psikiyatri Birliği Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBAH	Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GBAH	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome-wide association study)
Ig	İmmüoglobulin
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
ITIM	İmmunoreseptör tirozin-merkezli inhibitör motif
kDa	Kilodalton
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau
MN	Mononükleer
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NANA	N-Asetilnöraminik Asit
NeuAc	N-Asetilnöraminik Asit

NFY	Nörofibriler Yumaklar
NGF	Sinir Hücresi Büyüme Faktörleri
NINCDS-ADRDA	Ulusal ve Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği
NMDA	N-metil-D-aspartat
NSAİİ	Non-steroidal Antienflamatuar İlaçlar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı PCR
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SA	Sialik asit
Siglecs	Sialik asit bağlayıcı immünoglobulin benzeri lektinler
TNF	Tek nükleotid polimorfizmi
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- α
TSA	Total sialik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Demans türleri	2
Şekil 1.2. AH'nın dünyadaki mortalite sıralaması	3
Şekil 1.3. Amiloid kaskad hipotezi (Kumar ve Ekali, 2015)	8
Şekil 1.4. Tau hipotezi (Barron ve ark., 2017)	9
Şekil 1.5. AH'da kanıtlanmış genetik risk faktörleri (Bagyinszky ve ark., 2014)	19
Şekil 1.6. CD33 geni (Human Gene Database).	22
Şekil 1.7. Siglecler	24
Şekil 1.8. CD33 protein yapısı (Laing ve ark., 2017)	26
Şekil 1.9. SA'nın kimyasal yapısı (PubChem)	29
Şekil 1.10. SA biyosentezi	31
Şekil 1.11. SA biyolojisinde yer alan biyokimyasal yollar	33
Şekil 2.1. Hasta grubu erkek ve kadın birey sayıları	37
Şekil 2.2. Kontrol grubu erkek ve kadın birey sayıları	38
Şekil 2.3. Kontrol ve Hasta grupları birey sayıları	38
Şekil 2.4. Deney planı	40
Şekil 2.5. Periferik kandan plazma eldesi	41
Şekil 2.6. TSA standart grafiği	43
Şekil 2.7. Kan hücreleri	44
Şekil 2.8. MN hücre izolasyonu	45
Şekil 2.9. Işık mikroskobu	45
Şekil 2.10. Akım Sitometri cihazı	46
Şekil 2.11. qRT-PCR cihazı	49
Şekil 2.12. Nanodrop cihazı	52
Şekil 3.1. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu öğrenim süreleri bakımından birey sayıları	61
Şekil 3.2. Kontrol ve hasta gruplarında kronik rahatsızlığı bulunan birey sayıları	62
Şekil 3.3. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu sigara öyküsü birey sayıları	62
Şekil 3.4. Kontrol ve hasta bireylerin plazma total SA düzeyleri	64
Şekil 3.5. Kontrol grubu akım sitometri sonuçları	72
Şekil 3.6. Alzheimer hasta grubu akım sitometri sonuçları	73
Şekil 3.7. Alzheimer hastalarında ve kontrol grubunda ortalama CD33 pozitif monosit hücre düzeyleri ($\pm$ ss)	74
Şekil 3.8. %1 Agaroz jelde yürütülen Alzheimer Hasta grubunun total RNA görüntüleri	79
Şekil 3.9. %1 Agaroz jelde yürütülen Kontrol grubunun total RNA görüntüleri	80
Şekil 3.10. Grupların RNA OD260/280 değerleri ve RNA miktarları	81
Şekil 3.11. CD33 gen ifadelerindeki değişim grafiği	83
Şekil 3.12. β -Aktin amplifikasyon eğrisi grafiği	83
Şekil 3.13. CD33 amplifikasyon eğrisi grafiği	84

Şekil 3.14. β -Aktin erime eğrisi

84

Şekil 3.15. CD33 erime eğrisi

85

Şekil 3.16. TSA ROC eğrisi

87



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. DSM-V Tanı Ölçütleri	3
Çizelge 1.2. NINCDS-ADRDA AH Klinik Tanı Kriterleri	4
Çizelge 1.3. AH tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylanmış ilaç etken maddeleri	13
Çizelge 1.4. AH ile ilişkili genler (Özpak ve ark., 2017)	19
Çizelge 1.5. GWAS'da tanımlanan AH ile ilişkili genler	20
Çizelge 1.6. Siglelerin yapısı	23
Çizelge 1.7. Sigleler ve ifade edildikleri hücre tipleri	25
Çizelge 1.8. SA'nın kimyasal özellikleri (PubChem)	29
Çizelge 1.9. SA'nın biyolojik fonksiyonları	30
Çizelge 1.10. SA biyolojisinde yer alan biyokimyasal yollarla ilişkili olduğu bilinen genler	32
Çizelge 2.1. CD33 ve β -actin primer sekansları	50
Çizelge 2.2. cDNA sentezinde termal döngü	54
Çizelge 3.1. Kontrol grubu bireylerin özellikler	58
Çizelge 3.2. Hasta grubu bireylerin özellikleri	59
Çizelge 3.3. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu yaş ortalamaları	60
Çizelge 3.4. Grupların demografik özellikleri ve öyküleri yönünden dağılımları	63
Çizelge 3.5. Kontrol ve Hasta Plazma TSA medyan değerleri	64
Çizelge 3.6. Kontrol (K) ve Alzheimer hasta grubu (A) bireylerin TSA konsantrasyonları (mg/mL)	65
Çizelge 3.7. Biyolojik etkenlere ve diğer etki karıştırıcı faktörlere göre düzeltme yapıldığında çoklu değişkenli lojistik regresyon analizi ile TSA ölçümlerin AH yatkınlığı üzerine etkilerinin incelenmesi	66
Çizelge 3.8. 70 yaş altı ve üstü olgularda TSA ölçümleri	66
Çizelge 3.9. Cinsiyete göre TSA ölçümleri	67
Çizelge 3.10. Öğrenim süresine göre TSA ölçümleri	67
Çizelge 3.11. Hipertansiyon öyküsüne göre TSA ölçümleri	68
Çizelge 3.12. Diyabet öyküsüne göre TSA ölçümleri	68
Çizelge 3.13. Sigara öyküsüne göre TSA ölçümleri	69
Çizelge 3.14. Kahve öyküsüne göre TSA ölçümleri	69
Çizelge 3.15. Çay öyküsüne göre TSA ölçümleri	69
Çizelge 3.16. TSA değerlerinin diğer bulgularla korelasyonu	70
Çizelge 3.17. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu 1 μ L'deki MN hücre sayıları	70
Çizelge 3.18. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu monosit hücrelerde CD33 yüzde değerleri	71

Çizelge 3.19. Biyolojik etkenlere ve diğer etki karıştırıcı faktörlere göre düzeltme yapıldığında çoklu değişkenli lojistik regresyon analizi ile CD33 PMHO ölçümlerin AH yatkınlığı üzerine etkileri	74
Çizelge 3.20. Yaşa göre akım sitometri ölçümleri	75
Çizelge 3.21. Cinsiyete göre akım sitometri ölçümleri	75
Çizelge 3.22. Öğrenim süresine göre akım sitometri ölçümleri	76
Çizelge 3.23. Hipertansiyon öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri	76
Çizelge 3.24. Diyabet öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri	77
Çizelge 3.25. Sigara öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri	77
Çizelge 3.26. Kahve öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri	78
Çizelge 3.27. Çay öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri	78
Çizelge 3.28. CD33 pozitif monosit hücreler ile diğer bulguların korelasyonu	78
Çizelge 3.29. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu medyan değerleri	79
Çizelge 3.30. Biyolojik etkenlere ve diğer etki karıştırıcı faktörlere göre düzeltme yapıldığında çoklu değişkenli lojistik regresyon analizi ile klinik ölçümlerin AH yatkınlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi	79
Çizelge 3.31. Alzheimer hasta grubuna ilişkin CD33 gen değişimi	82
Çizelge 3.32. CD33 gen ifadelerindeki değişim	85
Çizelge 3.33. Demografik özelliklere göre CD33 gen ifadelerindeki değişim	86
Çizelge 3.34. Kontrol ve vaka gruplarını ayırt etmede klinik ölçümlere ilişkin ROC analizi sonuçları	87
Çizelge 3.35. Kontrol ve vaka gruplarını ayırt etmede ROC analizi sonucunda TSA ölçümlerine ait en iyi kesim noktası ve TSA'nın bu noktadaki tanısallık performans göstergeleri	88
Çizelge 3.36. Gruplara ve olguların demografik özelliklerine göre TSA düzeyine (0.222'den yüksek olma prevalansı) ilişkin frekans dağılımları	91

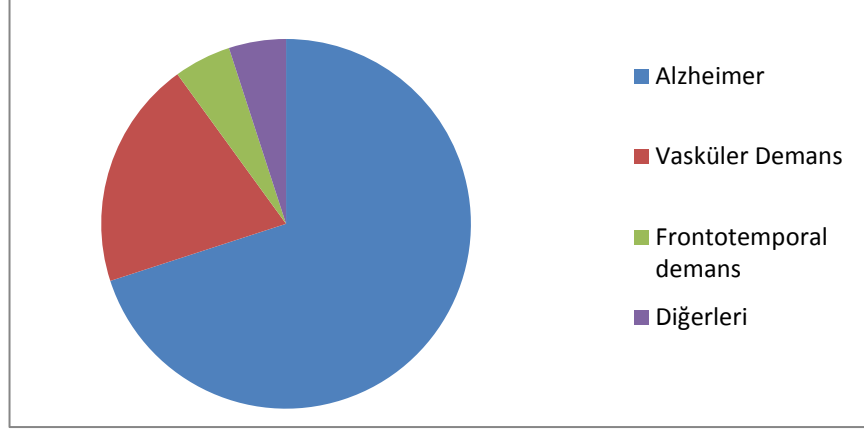
1.GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığı

1.1.1. Tanım

Demans davranışsal, zihinsel ve duygusal bozulmayla karakterize kalıcı ve ilerleyici klinik bir tablodur (Chapman ve ark., 2006). Kişinin günlük aktivitelerini etkileyecek kadar hafıza veya diğer düşünme becerilerinde azalma ile ilişkili semptomları ifade eden demans, nörodejenerasyon sonucunda gelişmektedir (Prince ve ark., 2015). Latince zihin anlamına gelen ‘mens’ kelimesinden zihin yitimi anlamında demans (demens) kelimesi türetilmiştir (Hanağası ve Emre, 2009). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, dünyada 47.5 milyon demanslı hasta bulunmakta ve her yıl 7.7 milyon yeni olgu artışı olmaktadır. Bu sayının 2030 yılında 76 milyona, 2050 yılında ise 135 milyona ulaşması beklenmektedir. Demansın dünya genelinde toplam maliyeti 2015 yılında 818 milyon dolardır. 2030 yılında ise maliyetin 2 trilyon dolara ulaşması öngörülmektedir (Prince ve ark., 2015).

Nörodejeneratif bir rahatsızlık olan Alzheimer Hastalığı (AH) demansın en sık görülen tipidir (Barbagallo ve ark., 2015 ve Gaugler ve ark., 2015) (Şekil 1). Tüm demans olgularının %60-80’ini oluşturmaktadır (Gaugler ve ark., 2015). İlerleyen mental kayıp, davranışsal, fonksiyonel, sosyal hayat ve öğrenmede gerilemeyle karakterizedir (Kumar ve Ekavali, 2015; Selekler, 2010). Demans türleri Şekil 1.1’de gösterilmiştir (Gentier and Leeuwen, 2015; Iadecola, 2013; Olszewska ve ark., 2016).



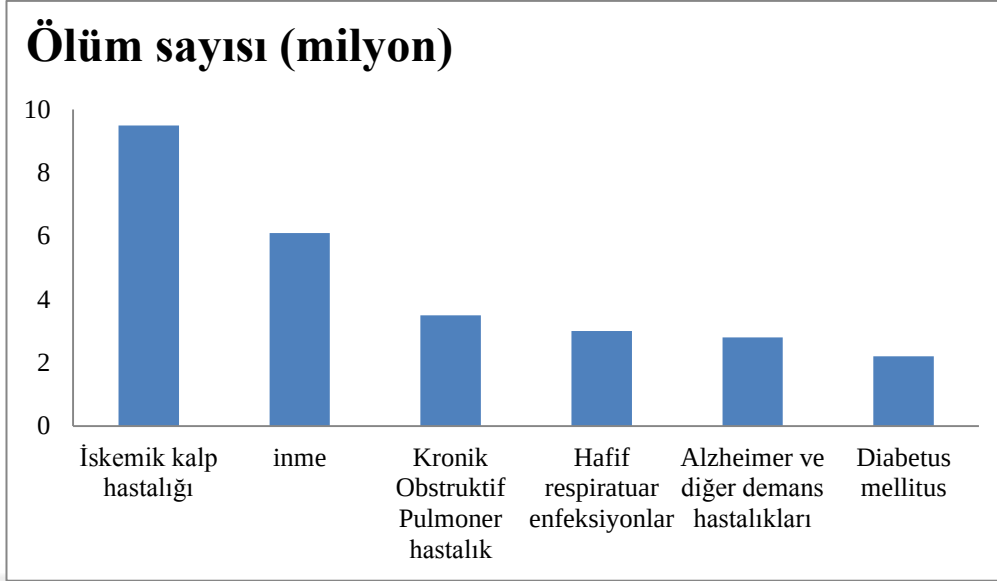
Şekil 1.1. Demans türleri

1.1.2. Epidemiyoloji

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Teşhis İlişkili Gruplar (TİG) raporuna göre Alzheimer tanısı 2014 yılında 18.158 kişiye konmuş olup hastalığın en çok 70-84 yaş aralığında görüldüğü ve 85 yaş üstü vaka sayıları cinsiyetler arasında karşılaştırıldığında kadınlarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2018 verilerine göre yaşlı nüfus son beş yılda %17 artmıştır. 2012 yılında AH'den ölen yaşlı nüfus 7 bin 524 iken, bu oran 2016 yılında 12 bin 900'e yükselmiştir.

Amerikan Alzheimer Derneği'nin 2015 yılı verilerine göre ise Amerika'da yaklaşık 5,3 milyon Alzheimer hastası bulunmaktadır. 65 yaş üstü Alzheimer hastası 5.1 milyon olup, yeni vakaların 2050 yılında her 33 saniyede bir artarak tüm dünyada yaklaşık 135 milyona ulaşması tahmin edilmektedir (Kumar ve Ekavali, 2015). DSÖ verilerine göre tüm dünyada ölüm nedeni olarak AH beşinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.2) (WHO, 2018).



Şekil 1.2. AH'nın dünyadaki mortalite sıralaması

1.1.3. Klinik Tanı Kriterleri

Klinik olarak Alzheimer tanısı; *Amerikan Psikiyatri Birliği Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı (DSM-V)* ve *Ulusal ve Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS-ADRDA)* değerlendirme ölçütüne (McKhann ve ark. 2011) göre konmaktadır.

Çizelge 1.1. DSM-V Tanı Ölçütleri

A. Ağır/Ağır olmayan nörobilişsel bozukluk tanı ölçütleri.
B. Birden çok alanda sessizce başlayan ve yavaş ilerleyen bir bozulmanın olması.
C. Olası/Olabilir AH için tanı ölçütleri: Aşağıdakilerden biri varsa olası AH tanısı konur yoksa olabılır AH tanısı konmalıdır. - Bellek ve öğrenmede ve en az diğer bir bilişsel alanda gerileme olduğunun açık kanıtın olması. - Bilişte, uzun süreli duraksama olmaksızın, sürekli ilerleyen aşamalı gerilemenin olması. - Bilişsel bozulmaya neden olan karışık etkenler olduğuna ilişkin bir kanıtın olmaması.
D. Rahatsızlığın başka nörodejeneratif hastalık, beyin-damar hastalığı ya da başka sinirsel, ruhsal ya da genel bozukluğun etkileriyle açıklanamaması.

AH için DSM-V kriterleri hafıza bozulmasının eşlik ettiği afazi, apraksi, agnozi veya kognitif kontrol işlev bozukluklarını içermektedir. Bu kriterlere göre bilişsel bozukluklar aşamalı olarak ilerlemektedir (Kelley ve Petersen, 2007). NINCDS-ADRDA ölçütleriyle ise klinik ve nöropatolojik bulgular birlikte değerlendirilmekte ve “olası”, “muhtemel” ve “kesin AH” tanısı olarak belirlenebilmektedir (Reitz ve Mayeux, 2014).

Çizelge 1.2. NINCDS-ADRDA AH Klinik Tanı Kriterleri

A. Muhtemel AH klinik tanı ölçütleri: - Klinik muayene ile saptanan Mini-Mental Durum Testi, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dökümanite edilen ve nöropsikolojik testlerle doğrulanan demans. - İki ya da daha fazla bilişsel süreçte bozulma olması. - Bilinç bozukluğunun olmaması. - Başlangıç 40–90 yaşları arasında (genellikle 65 yaşından sonra) olması. - Bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalığın olmaması.
B. Muhtemel AH tanısı aşağıdakilerle desteklenmektedir: - Dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulma. - Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme. - Ailede benzer bozukluk öyküsünün olması (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa). - Standart tekniklerle normal lomber ponksiyon. - EEG’nin normal olması ya da yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler. - Bilgisayarlı Tomografi (BT)’de serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi.
C. AH dışındaki nedenler dışlandıktan sonra, Muhtemel Alzheimer Hastalığı tanısı ile uyumlu olabilecek diğer klinik özellikler: - Hastalığın seyrinde platolar. - Depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halüsinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik patlamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlikçi bulgular. - Bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, myoklonus ya da yürüme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar. - Hastalığın ileri evresinde nöbetler. - Yaş için normal BT.
D. Muhtemel AH tanısını belirsizleştiren ya da ihtimal dışına çıkaran özellikler: - İnme tarzında ani başlangıç. - Hemiparezi, duyuşsal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi fokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerinde bulunması. - Nöbetlerin ya da yürüyüş bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması.
E. Mümkün AH tanı ölçütleri: - Demansa neden olabilecek diğer nörolojik, psikiyatrik ya da sistemik bozukluklar olmaksızın, başlangıç, prezentasyon ya da klinik seyrinde varyasyonların bulunması durumunda konulabilir. - Demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir. - Diğer belirlenebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir.
F. Kesin Alzheimer Hastalığı tanısı ölçütleri: - Muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri. - Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar.

1.1.4. Sınıflandırma

Yaş, AH'de en önemli biyolojik risk faktörüdür. Bu bakımdan erken başlangıçlı (EBAH) ve geç başlangıçlı AH (GBAH) olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca AH birinci dereceden akrabalarda demans görülmesiyle kalıtsal olarak ortaya çıkıyorsa Ailesel Alzheimer Hastalığı (AAH), kendiliğinden ortaya çıkıyorsa Sporadik Alzheimer Hastalığı (SAH) olarak da gruplandırılabilir (Gilleard, 2000).

65 yaş ve sonrasında görülen AH, GBAH olarak tanımlanmaktadır (Nowotny ve ark., 2003). EBAH ise tüm Alzheimer olgularının yaklaşık %10'u kadardır ve ilk semptomlar 30-65 yaş aralığında ortaya çıkmaktadır (Cacaea ve ark., 2016). EBAH'da daha kısa yaşam süresi ve agresif ilerleyiş gözlenmekte, prevalansının düşük olduğu bildirilmektedir (Panegyres ve Chen, 2013; Wattmo ve Wallin, 2017). Yaklaşık %92'si genetik geçişli olan EBAH otozomal dominant geçişli olup ortaya çıkması daha çok genetik faktörlere bağlıdır. Presenilin 1 (PSEN1), presenilin 2 (PSEN2) ve amiloid prekürsor protein (APP) genlerindeki mutasyonlar sonucu amiloid beta (A β) metabolizmasının bozulmasıyla meydana gelmektedir (Cacaea ve ark., 2016).

Erken ve geç başlangıçlı AH'nın klinik açıdan pek çok farklılıkları bulunmaktadır. GBAH daha az vizüospasyal-dil becerilerinde bozulma ve hafıza bozukluğu ile karakterize iken (Licht ve ark., 2007) EBAH'da daha kısa yaşam süresi ve daha agresif ilerleyiş gözlenmektedir (Panegyres ve Chen, 2013). Nöropatolojik çalışmalar EBAH'da nevritik plak ve NFY yükü ile sinaps kaybının GBAH'a göre daha fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 80 yaşından önce ölen Alzheimer hastaları ile ileri yaşta ölen hastaların kıyaslandığı bir çalışma nörotransmitterlerde (örn., Noradrenalin) daha şiddetli bir kolinerjik eksiklik olduğunu bildirmiştir. Başka bir çalışma, EBAH'da dil ve konsantrasyonda daha fazla bozulma gözlenirken, GBAH'da bellek ve oryantasyonda zorluklar göstermiştir (Wattmo ve Wallin, 2017).

1.1.5. Klinik Evreleri

İlerleyici bir hastalık olması sebebiyle AH'de hastalık süreci 3 evreye ayrılmaktadır: (Can ve ark., 2006)

- Erken (Hafif) Evre AH
- Orta Evre AH
- İleri Evre AH

Yavaş ve sinsi başlangıçlı erken evre AH'de unutkanlık, ortaya çıkan ilk bulgudur. Bu dönemde hastanın sosyal ve iş hayatı etkilenmemektedir (Koca ve ark., 2017). Sonraki evrede ise bilişsel bozukluklar sosyal yaşama yansımaktadır. Epizodik bellek ile birlikte dil, algılama, dikkat gibi bilişsel alanlarda bozulmalar görülmektedir. Hastalar bu evrede yaşam aktivitelerini yerine getirebilmek için yardıma ihtiyaç duymaktadırlar. İleri evre AH'de ise 24 saat hasta bakımı gerekmektedir. Bu evrede hastalarda görülen yutma problemleri nedeniyle enfeksiyon hastalıklarına yakalanma riskleri de artmaktadır (Lussier ve ark., 2011; Can ve ark., 2006; Koca ve ark., 2017).

1.1.6. Nöropatofizyoloji

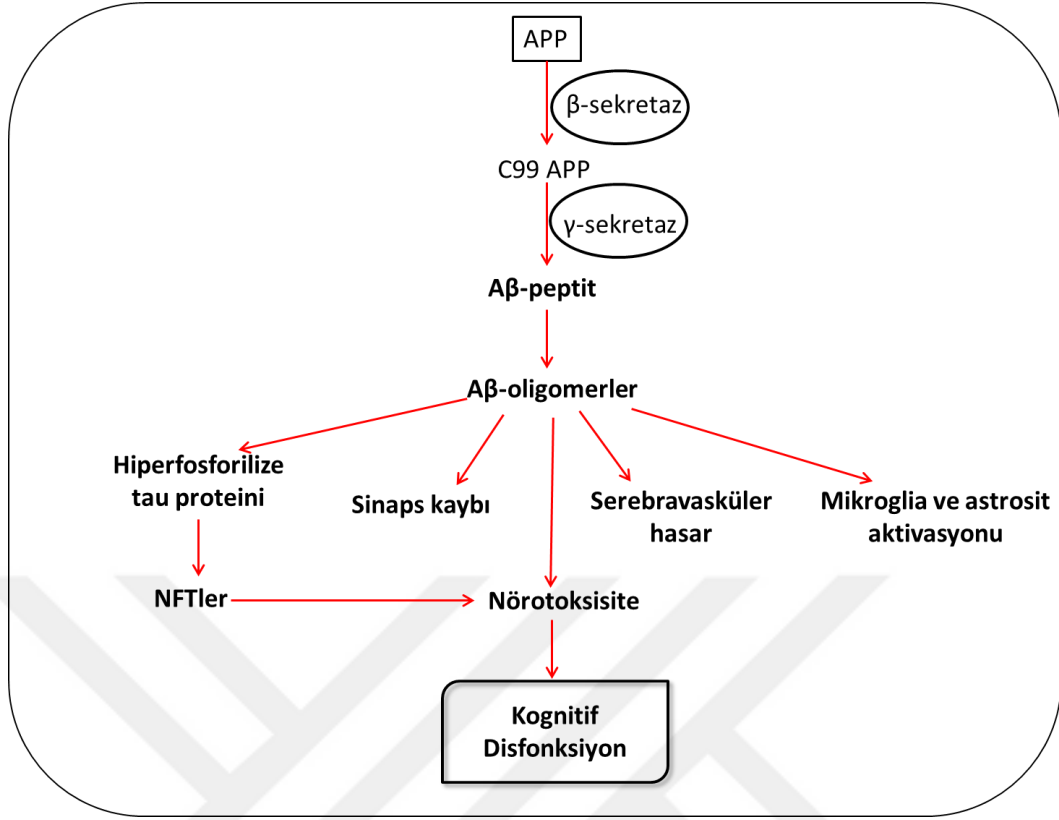
Nörodejeneratif hastalıklar genel olarak nörotransmitterlerin tükenmesi veya yetersiz sentezi, oksidatif stres gibi birkaç biyolojik proses ile ilişkilidir (Cooper ve Ma, 2017). Alman psikiyatristi ve nöropatologu Alois Alzheimer, 1906 yılında garip davranışları ve kısa süreli hafıza defekti olan bir hastanın ölümünden sonra yaptığı beyin otopsisinde amiloid plakları ve NFY'leri gözlemleyip ilk defa Alzheimer Hastalığını tanımlamıştır (Selekler, 2010; Kumar ve Ekavali, 2015). Daha sonra yapılan çalışmalarda; nöronal hücre ölümü, ekstraselüler amiloid-beta (A β) birikmesiyle oluşan yaşlılık plaklarının neden olduğu anormal A β prekürsör proteini (APP), hiperfosforile tau proteinlerinin agregasyonu ile oluşan intraselüler NFY ile

astrosit proliferasyonu ve mikroglial aktivasyon gibi çeşitli ve oldukça karışık patolojik olaylar Alzheimer beyininde aydınlatılmıştır (Barbagallo ve ark., 2015; Cooper ve Ma, 2017).

AH patofizyolojisi ile ilgili hipotezler: Amiloid hipotezi, tau hipotezi ve nöroinflamasyon hipotezidir (Kumar ve Ekavali, 2015).

1.1.4.1. Amiloid Hipotezi

Tip I transmembran proteini olan APP, hücre içinde endoplazmik retikulumda sentezlenerek golgi aygıtına aktarılmaktadır (Šerý ve ark., 2013). APP'nin hücre bütünlüğünün korunmasında önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Kinney ve ark., 2018). Bu protein normal şartlarda α -sekretaz enzimiyle toksik olmayan komponentlere parçalanmaktadır. Amiloid hipotezine göre APP, β - ve γ -sekretaz enzimleri ile parçalandığında A β peptidi oluşarak agregatlar halinde birikmekte ve senil plakların oluşmasına neden olmaktadır (Kumar ve Ekali, 2015; Kinney ve ark., 2018). Başka bir ifadeyle, APP'nin yanlış ayrılması sonucu oligomerik A β ve sonuçta A β fibriller ile plaklar oluşmaktadır (Şekil 1.3). A β oligomer agregatlarının, AH beyininde nöronal ve vasküler dejenerasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Kumar ve Ekali, 2015). Yapılan çalışmalarda A β 'nin öğrenme ve bellekte önemli role sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, düşük A β seviyesinin uzun dönem hippokampal potansiyalizasyonu ve hafızayı arttırdığı bilinmektedir (Šerý ve ark., 2013).



Şekil 1.3. Amiloid kaskad hipotezi (Kumar ve Ekali, 2015)

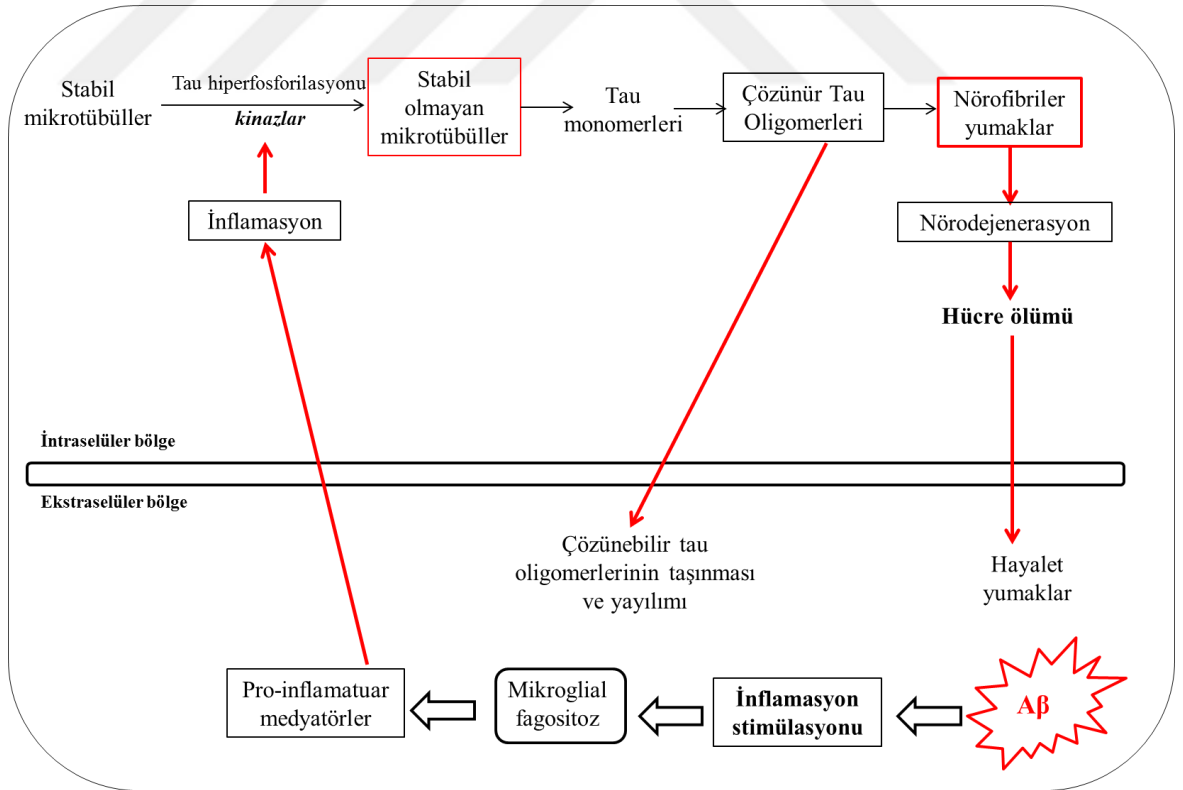
APP prosesinde α -sekretaz enzimi β -amiloid oluşumunu engellemektedir. APP α -sekretaz ile parçalandığında sAPP α molekülü oluşmaktadır. sAPP α nöronal plastisite/sağkalımda önemli bir role sahiptir ve eksitotoksisteye karşı koruyucu özelliktedir (Šerý ve ark., 2013). α -sekretaz enziminin eksik olduğu durumlarda β -ve γ -sekretazların A β molekülünün iki alt türü olan A β 40 ve A β 42'yi oluşmaktadır (Rosenberg ve ark., 2016). β -sekretaz 1 (BACE1), APP metabolizmasında rol oynayan β -sekretazdır. β -sekretaz ekspresyonunun yaşla birlikte arttığı ve özellikle Alzheimer hastalarının beyin korteksinde yükseldiği gösterilmiştir (Šerý ve ark., 2013).

1.1.4.2. Tau hipotezi

AH'da görülen nörofibriler yumaklar (NFY) sinaptik kayıp ve bilişsel gerileme ile ilişkili olup fosforile tau proteinlerinden oluşmaktadır. Tau proteinleri genellikle

çekirdekli tüm hücrelerde görülmekle beraber nöronlarda nispeten bol miktarda bulunmaktadır (Galimberti ve Scarpini, 2012). Bu protein mikrotübüllere bağlanarak mikrotübül oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca hücre iskeletinin bütünlüğünün sağlanmasında, aksonal transportta, mikrotübüllerin stabilize edilmesinde görev almaktadır (Mathew ve ark., 2011; Galimberti ve Scarpini, 2012; Šerý ve ark., 2013).

Nörodejenerasyon sırasında, tau proteini anormal şekilde hiperfosforile olarak mikrotübül ile bağlanma yeteneğini kaybetmektedir. Bu hiperfosforile tau proteinleri nöronlarda birikmekte ve çift sarmal yapıdaki filamentleri oluşturmaktadır. Bunlar da nöronlarda intraselüler bölgede NFY'ler halinde birikerek, hücre iskelet bütünlüğü ile aksonal transportu bozarak nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır. İntraselüler NFY'ler hücre ölümüyle ekstraselüler bölgeye salınmakta ve 'hayalet yumak' ismini almaktadırlar (Şekil 1.4) (Galimberti ve Scarpini, 2012; Šerý ve ark., 2013; Bennett ve ark., 2004).



Şekil 1.4. Tau hipotezi (Barron ve ark., 2017)

Tau patolojisinin A β birikimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. A β ile mitokondri de dahil organellerin taşınması mikrotübüller boyunca olmaktadır. Aksonal transportun inhibisyonu sonucu hücre gövdesinde APP birikimine neden olmaktadır. (Šerý ve ark., 2013).

1.1.4.3. Nöroinflamasyon

İmmün sistemin AH'yi arttıran bir faktör olarak aktif rol aldığı deneysel, genetik ve epidemiyolojik çalışmalarda bildirilmektedir (Cooper ve Ma, 2017). Ayrıca AH nöropatolojisine cevap olarak nöroinflamasyon sürecin aktive olduğu düşünülmektedir (Bagyinszky ve ark., 2017).

Mekanizması oldukça karmaşık olan nöroinflamasyon gelişimine genetik ve çevresel faktörlerin neden olduğu bildirilmektedir. Yaşlı bireylerde kan akımının ve perfüzyonun değişmesiyle ATP ve protein sentezi ile elektrolit dengesinde bozulmalar meydana gelmektedir. Bu bozulmalar reaktif oksijen türlerinde (ROS) dengesizliğe ve oksidatif strese yol açmaktadır (Bagyinszky ve ark., 2017).

AH'nin erken evrelerinde amiloid klirensi, antioksidan gibi nöroprotektif mekanizmalar etkili olabilmektedir. Ancak hastalığın ilerlemesiyle artan oksidatif stres derecesi immün sistemin hücrel mediyatörlerini arttırmaktadır. Bu artış pro-inflamatuar moleküllerin aşırı üretimine ve beyinde inflamasyonun başlamasına neden olmaktadır. AH beyinde artan A β ve NFY yükü immün sistemi stimule edebilmekte ve inflamatuvar süreci başlatabilmektedir (Bagyinszky ve ark., 2017). Ayrıca diyabet ve obezite gibi diğer kronik hastalıklar inflamasyon prosesini arttırmakta dolayısıyla AH ilerleyişini de arttırabilmektedir (Cooper and Ma, 2017). İnflamatuar kaskadın sürekliliği ile de beyin hücrelerinde irreversibl ölüm meydana gelmektedir (Bagyinszky ve ark., 2017).

AH patolojisinde görülen NFY ve amiloid plakların çevresinde inflamatuvar sitokinleri de içeren mediyatörler eksprese olmaktadır. İnflamatuvar süreçte yer alan interlökin-1 β (IL-1 β), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sitokinler sürekli üretildiklerinde sitotoksik olabilmekte ve A β üretimini stimüle edebilmektedir. Sitokinler serebral bölgede aşırı üretilmeleri sonucu MSS'den periferel bölgeye yayılabilmektedirler. Aynı şekilde, periferel sitokinler kan-beyin engelini aşarak serebral bölgeye geçiş yapabilmektedirler. Çalışmalar, serebral bölgedeki (IL-1 veya endotoksin gibi) akut inflamatuvar medyatörlerin periferel sitokin üretimini indüklediğini göstermektedir (Bermejo ve ark., 2008).

Beyinde inflamatuvar sürece katılan komponentler mikrogliya, monositler, makrofajlar ve astrositlerdir. Ayrıca nöronlar da inflamatuvar moleküllerin üretimi ve ekspresyonuyla nöroinflamasyon prosesine katılabilmektedirler (Bagyinszky ve ark., 2017).

Mikrogliya hücrelerinin, amiloid birikimi ve NFT üretimi gibi patolojik değişikliklere karşı koruyucu yetenekleri bulunmaktadır. Bu bakımdan mikrogliya hücreleri inflamasyona karşı koruyucu bir rol oynamaktadır. A β mikrogliya aktivasyonu, hücre sayısı ve fonksiyonunda değişikliğe neden olabilmektedir. Antijen tanıtımında aktif mikrogliya önemli bir role sahiptir. Aktif mikrogliya inflamatuvar faktör üretiminde rol oynamakta ve amiloid klirensi ile nöronların yaşam sürelerini arttırabilmektedir. Ayrıca, mikrogliyal aktivasyon pro-inflamatuvar etki ve nörotoksitesiteyi arttırabilmektedir. Aktif mikrogliya; pro-inflamatuvar faktörlerin üretimi, ROS yükün artışı ile sonuçta oksidatif stres ve nöroinflamasyona neden olarak AH başlamasında önemli role sahiptir (Bagyinszky ve ark., 2017).

Monositler homeostazın korunmasında ve toksik elementlere karşı korunmada önemli bir yere sahiptir. Monositler herhangi bir nedenden dolayı hasara uğradıklarında makrofajlara ve daha sonra diğer inflamatuvar moleküllere dönüşmektedirler. Makrofajlar mikrogliya hücrelerine göre amiloid agregatların

ortadan kaldırılmasına karşı daha etkin katkıda bulunabilmektedirler (Bagyinszky ve ark., 2017).

Astrositler beyinde en fazla bulunan hücrelerdir. Astrositler kan-beyin bariyerinde bulunan endotelial hücrelerin desteklenmesinde, iyon dengesinin sağanmasında ve nöronların beslenmesinde yardımcı role sahiptir. Astrositlerin ayrıca nörodejeneratif bozuklukların gelişiminde de rol oynadığı ileri sürülmektedir. Amiloid plaklar astrositleri aktive ederek sitokinlerin aşırı (örneğin, IL-1 β veya IL6) ekspresyonuna ve daha yüksek derecede oksidatif strese neden olabilmektedir. Astrositler ile çevresindeki nöronlar arasındaki astrosit hasarı ve disfonksiyonu sinaptik homeostazı tahrip edebilmekte ve nöronal hasarın başlamasına neden olabilmektedir (Bagyinszky ve ark., 2017).

1.1.7. Tedavi Yaklaşımları

AH kesin tedavisi günümüzde henüz bulunmamaktadır. Mevcut tedavi protokolleri hastalığın ilerleyişini yavaşlatmak, hastanın ve hasta yakınlarının yaşam kalitesini arttırmaya yönelik semptomatik tedavileri içermektedir (Vural ve ark., 2007).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan 3 asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü: rivastigmin, galantamin ve donezepil ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olan memantin AH tedavisinde kullanılmaktadır (NIA, 2011) (Çizelge 2.1.).

Çizelge 1.3. AH tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylanmış ilaç etken maddeleri

	Etki mekanizması	AH’da kullanıldığı evre
Donepezil	AChE inhibitörü	Tüm aşamalarda
Galantamin	AChE inhibitörü	Hafif-orta dereceli
Rivastigmin	AChE inhibitörü	Hafif-orta dereceli
Memantin	NMDA antagonisti	Orta-ileri dereceli

1.1.5.1. AChE inhibitörleri

AH tedavisinde ilk sırada yer alan AChE inhibitörleri hafıza, düşünme, dil, karar verme ile ilgili semptomları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda AChE inhibitörü kullanımının AH’nın toplumsal ve ekonomik yükü azalttığı bildirilmektedir (Fish ve ark., 2018).

Özellikle serebral korteks ve beyin sapında bulunan bazı nöronlarda kolinerjik yetmezlik ile sinapslarda asetilkolin miktarı azalmakta, sonuçta amiloid plak ve NFY’lerin meydana geldiği düşünülmektedir. AChE inhibitörleri asetilkolin yıkımını engelleyerek ve sinapslardaki asetilkolin miktarının arttırarak hafıza ve dikkati güçlendirmeye yardımcı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, AChE inhibitörleri muskarinik ve nikotinik etkileri nedeniyle APP oluşumunu azaltırken büyüme faktörlerini arttırmakta ve nöronal dejenerasyonu azaltmaktadır. İyi tolere edilebilen AChE inhibitörlerinin yan etkileri genellikle bulantı, kusma, iştahsızlık ve barsak hareketlerinde artış şeklinde ortaya çıkmaktadır (Sirvio, 1999; FDA, 2017; Kim ve Factora, 2018).

1.1.5.2. Memantin

Orta-ileri derece AH tedavisinde kullanılan memantin hafıza ve dikkati arttırdığı, ayrıca mantık yürütme ve basit görevleri yerine getirmeye yardımcı olduğu bilinmektedir. Yalnızca memantin kullanan orta-ileri derece Alzheimer hastaların zihinsel işlevlerde ve günlük aktiviteleri gerçekleştirebilme yeteneğinde iyileşme gözlenirken hafif derece Alzheimer hastalarında anlamlı bir gelişme gözlenmemektedir (FDA, 2017; Kim ve Factora, 2018).

Memantin bilgiyi işleme, saklama ve hatırlamada rol alan glutamatın aktivitesini düzenleyerek etkisini göstermektedir. Glutamat, NMDA reseptörlerini sinir hücrelerine kalsiyum vermek üzere uyarmaktadır. Kalsiyum ise intraselüler bilginin saklanması ve işlenmesi için gerekli kimyasal ortamın oluşturulmasına yardımcı olmaktadır. Ortamda aşırı glutamat varlığında nöronlara aşırı kalsiyum girişi olmakta ve nöronal ölüm meydana gelebilmektedir. Memantin, NMDA reseptörlerini bloke ederek glutamatın aşırı etkinliğinden nöronları korumaktadır. Yan etkileri genellikle baş ağrısı, kabızlık, konfüzyon ve baş dönmesi olarak ortaya çıkmaktadır (FDA, 2017; Kim ve Factora, 2018).

1.1.5.3. Donepezil ve Memantin kombinasyonu

FDA tarafından onaylanan donepezil ve memantin kombinasyonu, orta-ileri dereceli AH tedavisinde kullanılmaktadır. Bu kombinasyonu kullanan hastaların bilişsel işlevlerinde geçici bir iyileşme olduğu bildirilmektedir. Ancak, AH tedavisinde kullanılan diğer ilaçlarda olduğu gibi donepezil-memantin kombinasyon ilacı da hastalığın altta yatan nedenlerini ortadan kaldırmamaktadır (FDA, 2017).

Donepezil-memantin kombinasyon ilacı ciddi yan etkilere neden olabilmektedir:

- Anestezi verilen hastalarda kas problemleri
- Bradikardi ve bayılma

- Mide asidinde artış
- Bulantı ve kusma
- İdrara çıkma zorluğu
- Nöbetler
- Astım veya diğer akciğer hastalığı olan kişilerde akciğer problemlerinin kötüleşmesi.

1.1.5.4. Diğer tedavi yaklaşımları

AH'de anksiyete ve uyku bozukluğundan depresif belirtilere kadar çeşitli bulgular için hastalığın semptomatik tedavisine destek olarak antipsikotikler ve antidepresanlar kullanılmaktadır (Soylu ve Karalı, 2017). Nörotrofinler (sinir hücresi büyüme faktörleri-NGF: Nerve Growth Factor), antioksidanlar, statinler, nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ'ler), sekretaz efektörleri, hormon replasman tedavisi, eksitotoksitenin bloke edilmesi, A β aşı denemeleri ve immünoterapi araştırılmakta olan ve hala tartışmalı tedavi yaklaşımlarıdır (Feng ve Wang, 2012).

AH'de nörodejenerasyonla birlikte ortaya çıkan oksidatif stresin hastalığın ilerleyişi üzerine etkileri araştırılmaktadır. Özellikle α - tokoferol, vitamin C, β -karoten, α -lipoik asit, selenyum, kurkumin, berberin, ginkgo biloba, melatonin, selejilin, östrojen sıklıkla çalışılan antioksidanlardır ve AH üzerine etkileri konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır (Mecocci ve Polidori, 2012; Feng ve Wang, 2012).

NGF'ler kolinerjik atrofiyi önleyerek nöronların yaşam süresini uzatmaktadırlar. Sentezlenen ilaçlarla NGF sentezi artırma hedeflenerek nörodejeneratif rahatsızlıklar tedavi edilmeye çalışılmaktadır (Williams ve ark., 2006). Hipolipidemik ilaçlardan olan statinlerin plak oluşumunu engelleyebildiği ve AH riskini azaltabildiği bildirilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar yüksek kolesterol

düzeylerinin AH riskini arttırabildiğini göstermektedir. Ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır (Zigman ve ark., 2007; Green ve ark., 2006). NSAİİ'lerin AH riski üzerine yapılan çalışmalar çelişkilidir. Zhang ve arkadaşlarının (2018) yaptığı meta-analiz çalışması NSAİİ kullanımının AH riskini düşürdüğünü bildirmektedir. FDA onaylı antikanser bir ajan olan beksarotenin amiloid plakları temizlediği ve AH semptomlarını azalttığı in vivo deneylerde gösterilmiştir (Tousi, 2015). İmmünoterapi çalışmaları ise umut vaat etmektedir. Pasif immünoterapi monoklonal veya poliklonal immunoglobulinler (Ig) ile yapılarak Aβ oluşumuna karşı nöroprotektif etki meydana geldiği çalışmalarda kanıtlanmıştır (Soylu ve Karalı, 2017).

1.1.8. Etiyoloji

Yaş, genetik faktörler, aile öyküsü, cinsiyet, serebrovasküler hastalıklar, hipertansiyon, diyabet, obezite, dislipidemi gibi rahatsızlıklar ile kafa travması, fiziksel aktivite, diyet, sosyoekonomik ve eğitim düzeyi gibi pek çok sosyal, çevresel ve bireysel etkenler AH için risk faktörlerini oluşturmaktadır (Prince ve ark., 2015; Mayeux ve Stern, 2012; Reitz ve Mayeux, 2014 ve Imtiaz ve ark., 2014).

1.1.8.1. Yaş

AH'nin en önemli risk faktörü yaştır. Ayrıca Alzheimer insidans ve prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. 65 yaşından sonra insidans her 5 yılda bir iki katına çıkmaktadır. 85 yaşından sonra ise %30-50 oranlarına ulaşmaktadır (Sloane ve ark. 2002, Hirtz ve ark. 2007, Kelley ve Petersen, 2007, Barbagallo ve ark., 2015).

AH'de başlangıç yaşı genellikle 65 ve sonrasıdır. EBAH'da ise başlangıç yaşı genetik yatkınlığa göre farklılık göstermektedir. PSEN1 mutasyonunda ortalama başlangıç yaşı 45 iken, PSEN2 mutasyonunda ortalama başlangıç yaşı 52'dir (Arioğlu, 2003). Bazı çalışmalar yaş ile AH arasında anlamlı bir ilişki olmadığını

bildirmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ortalama yaşam süresinin kısa olması bu bölgelerde AH prevalansının düşük olmasına neden olabilmektedir (Sharp ve Gatz, 2011).

1.1.8.2. Aile Öyküsü

Aile öyküsü, yaştan sonra en önemli risk faktörüdür. AH olgularının yarısında aile öyküsü saptanabilmektedir. Birinci dereceden akrabalarda AH görülmesi kişide hastalığa yakalanma riskini 3.5 kat arttırmaktadır (Can ve ark., 2006). Ailesinde AH görülen bireylerin hafıza ilgili skorları ailesinde AH görülmeyen bireylere göre daha düşüktür (Donix ve ark., 2012). Aile öyküsü ile karakterize Ailesel EBAH genetik kaynaklı olup PSEN1, PSEN2 ve APP genlerindeki mutasyonlarla tanımlanmaktadır (Wu ve ark., 2012).

1.1.8.3. Cinsiyet

AH kadınlarda erkeklerden 1.5-3 kat daha yaygın görülmektedir. Kadınların yaşam süresinin daha uzun olması daha yaygın görülmesinin sebebi olarak düşünülmektedir (Kelley ve Petersen, 2007). Ayrıca, östrojen hormonunun koruyucu olabileceği bildirilmektedir. In vitro ve in vivo çalışmalar östrojenin β -amiloid oluşumunu engellediğini göstermektedir (Bendlin ve ark., 2010).

Cinsiyete göre AH prevalans ve insidans çalışmaları coğrafi bölgelere göre farklı sonuçlar verebilmektedir. Amerika’da yapılan çalışmalarda cinsiyet ile AH arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmektedir (Kukull ve ark. 2002, Rocca ve ark. 1998, Bachman ve ark. 1993, Nebel ve ark., 2018). Avrupa’da, kadınlarda AH prevalansı daha yüksektir. Yine Avrupa’da kadınların erkeklerden daha fazla, İngiltere’de ise daha az AH riski taşıdığı bildirilmektedir (Nebel ve ark., 2018).

1.1.8.4. Eğitim düzeyi

Düşük eğitim düzeyi AH'de muhtemel risk faktörlerinden kabul edilmektedir. Eğitim düzeyi yüksek bireyler düşük bireylerden daha az risk taşımaktadırlar. Düşük eğitim düzeyi genellikle düşük sosyoekonomik statü ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle kaliteli beslenme, bakım ve tıbbi tedaviye düşük eğitim düzeyindeki bireyler ulaşamamaktadır (Silzer ve Phillips, 2018; Letenneur ve ark., 1999). Yüksek eğitim düzeyi, kaliteli mesleki faaliyet, yeni bir dil öğrenme ve boş zamanların bilişsel etkinliklerle değerlendirilmesi kognitif rezervi artırarak AH riskini azalttığı düşünülmektedir (Xu ve ark., 2015).

1.1.8.5. Diyet

Yüksek miktarda doymuş yağ asidi ile beslenme alışkanlığı AH riskini arttırmaktadır (Moris ve ark., 2003). Pek çok çalışma, deniz ürünleri tüketiminin omega-3 yağ asitleri bakımından zengin olması nedeniyle demansa karşı koruyucu olabileceğini bildirmektedir. Ancak, deniz ürünleri aynı zamanda bir nörotoksin olan cıva kaynağıdır. Çalışmalar deniz ürünlerinin sık tüketilmemesi gerektiğini önermektedir (Morris ve ark., 2016).

Antioksidanlar, vitaminler ve Akdeniz diyetinin AH için koruyucu olabileceği bildirilmektedir. Ancak bireysel farklılıklar, çevresel faktörler ile pişirme işlemleri dahil pek çok etken çelişkili sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir. Bu sebeple daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır (Yusufov ve ark., 2017).

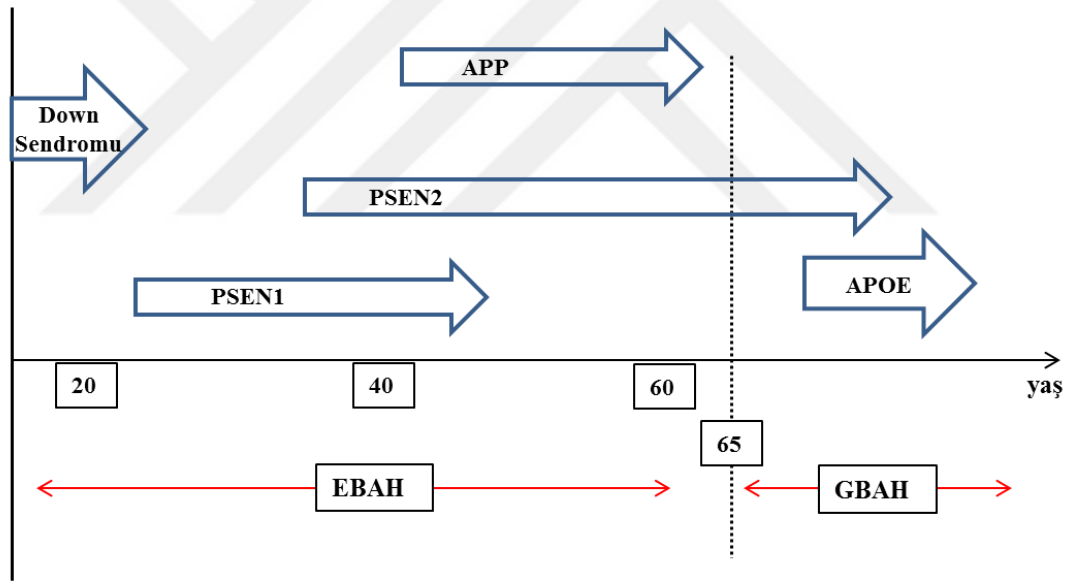
1.1.8.6. Sigara kullanımı

Aktif sigara kullanımı ve AH gelişimi ile ilgili çalışmalar çelişkili sonuçlar vermektedir. Aktif sigara kullanımının AH riskini arttırabileceği bildirilmektedir. Sigaraya bağlı serebral oksidatif stres AH patofizyolojisini ve riskini arttıran

potansiyel mekanizma olarak görülmektedir (Durazzo ve ark., 2014). Vaka-kontrol çalışmaları sonuçlarına göre ise sigaranın içeriğindeki nikotinden dolayı koruyucu olabileceği ileri sürülmektedir (Reitz ve Mayeux, 2014).

1.1.8.7. Genetik

AH genetik (% 70) ve çevresel (% 30) nedenleri olan çok faktörlü nörodejeneratif bir rahatsızlıktır (Dorszewska ve ark., 2016). Ailesel EBAH'a neden olan APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonlar AH'nin %1'inden daha azında görülmektedir. GBAH için ise genetik risk faktörü Apolipoprotein E (APOE) ε4 alelidir (Saka, 2010).



Şekil 1.5. AH'da kanıtlanmış genetik risk faktörleri (Bagyinszky ve ark., 2014)

Çizelge 1.4. AH ile ilişkili genler (Özpak ve ark., 2017)

GEN	LOKUS	PROTEİN	KALITIM TİPİ
APP	21q21.2	Amiloid β	Otozomal Dominant
PSEN1	14q24.3	Presenilin-1	Otozomal Dominant
PSEN2	1q31-q42	Presenilin-2	Otozomal Dominant
APOE	19q13.2	Apolipoprotein E	Risk faktörü

Son yıllarda, Genom-çapında İlişkilendirme Çalışmaları'nda (GWAS: Genome-wide Association Study) aydınlatılan AH ile ilişkili yeni genler Çizelge 1.4.'te verilmiştir.

Çizelge 1.5. GWAS'da tanımlanan AH ile ilişkili genler

GEN	KROMOZOM	
CLU	8	Harold ve ark., 2009 Lambert ve ark., 2009 Seshadri ve ark. 2010
PCALM	11	Harold ve ark., 2009 Seshadri ve ark. 2010
ABCA7	19	Hollingworth ve ark., 2011
MS4A6A	11	Hollingworth ve ark., 2011 Naj ve ark., 2011
MS4A4E	11	Hollingworth ve ark., 2011 Naj ve ark., 2011
CR1	1	Hollingworth ve ark., 2011 Lambert ve ark., 2009
BIN1	2	Hollingworth ve ark., 2011
CD33	19	Hollingworth ve ark., 2011 Naj ve ark., 2011
CD2AP	6	Naj ve ark., 2011
EPHA1	7	Naj ve ark., 2011
TREM2	6	Guerreiro ve ark., 2013 Jonsson ve ark., 2013

1.1.8.7.1. APP geni

APP geni 21. kromozomun q kolunda yer almaktadır ve 19 ekzondandan oluşmaktadır. APP'yi sentezlemekle görevli APP geninin aşırı eksprese olmasıyla β -sekretaz aktivitesinde artış meydana gelmekte ve A β plak oluşumu artmaktadır (Bagyinszky ve ark.). APP geninde 30'dan fazla mutasyon bildirilmektedir. Bunların yaklaşık 25'i patojeniktir ve otozomal dominant EBAH'a neden olmaktadır (Xu ve ark., 2016). APP geni mutasyonu olan bireylerde AH başlangıç yaşı 39-67'dir (Blacker ve Tanzi, 1998).

APP genindeki mutasyon Alzheimer hastaların %0.1'den daha azında görülmektedir (Bagyinszky ve ark., 2014; Saka, 2010). EBAH'da olguların %13-16'sı APP mutasyonuna sahiptir (Özpak ve ark., 2017). Benzer şekilde 21. kromozomun üç kopyasını taşıyan down sendromlu (Trizomi 21) bireylerin %50'sinde erken yaşlarda AH'de görülen nöropatolojik değişiklikler görülmektedir (Bagyinszky ve ark., 2014; Saka, 2010; Özpak ve ark., 2017).

1.1.8.7.2. PSEN1 ve PSEN2 genleri

14. kromozom üzerinde bulunan PSEN1 ve 1. Kromozom üzerinde bulunan PSEN2 genleri γ -sekretaz enzim aktivitesinden sorumludurlar. Bu genlerdeki mutasyonlar A β plak yükünün artışına neden olmaktadır (Khanahmadı ve ark., 2015; Bagyinszky ve ark., 2014).

PSEN1'deki mutasyonlar ailesel EBAH'da olguların yaklaşık %30-70'inden sorumludur (Khanahmadı ve ark., 2015; Bagyinszky ve ark., 2014). PSEN1, 12 eksondan oluşmaktadır ve 467 aminoasitlik proteini kodlamaktadır. PSEN1 proteini, APP yıkımından sorumlu enzimlerden biri olan γ sekretaz komponentidir ve bu enziminin katalitik aktivitesinden sorumludur. PSEN1 genindeki mutasyon γ sekretaz aktivitesini değiştirerek toksik A β protein düzeyini arttırmaktadır. Ayrıca PSEN1 geni mutasyonların NFY oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir. 12 Eksondan oluşan PSEN2 ise 448 aminoasitlik proteini kodlamaktadır. Çalışmalar PSEN2 genindeki mutasyonların hücre yüzeyinde bulunan β sekretaz aktivitesini ve dolayısıyla toksik A β yükünü arttırdığını bildirmektedir (Özpak ve ark., 2017, Özkay ve ark., 2011).

1.1.8.7.3. ApoE geni

19. kromozom üzerinde yer alan ApoE geninin ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 alelleri mevcuttur. Bu aleller 112. ve 158. aminoasitlerinde sistein veya arjinin bulunmasına göre

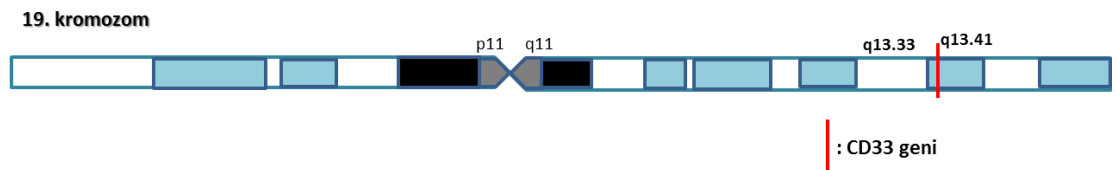
farklılaştığı bilinmektedir: ApoE2 (Sis 112, Sis 158), ApoE3 (Sis 112, Arj 158) ve ApoE4 (Arj 112, Arj 158). Tek bir aminoasitin bu iki pozisyonundaki farklılığı ApoE izoformunu etkilerek ApoE proteinin lipitlere, reseptörlere ve A β 'ya bağlanma yeteneğini değiştirmektedir. Ayrıca in vitro, in vivo ve klinik çalışmalar ApoE izoform farklılığının, A β birikimini ve klirensini etkilediğini bildirmektedir (Panza ve ark.,2003; Liu ve ark., 2013).

Hiperlipidemi ve hiperkolesterolemi ile ilişkili olan ApoE ϵ 4 aleli (Liu ve ark., 2013) GBAH'da en güçlü genetik risk faktörüdür (Kim ve ark., 2009; Panza ve ark.,2003; Liu ve ark., 2013 ve Slooter ve ark, 1998). ApoE2 aleli ise AH'ya karşı koruyucu etkiye sahiptir (Kim ve ark., 2009; Panza ve ark.,2003; Liu ve ark., 2013 ve Slooter ve ark, 1998). ApoE4 homozigot bireylerde Alzheimer sıklığı %91 ve başlangıç yaşı 68; ϵ 4 heterozigot olanlarda sıklık %47 ve başlangıç yaşı 76; ϵ 4 aleli taşımayanlarda ise sıklık %20 ve başlangıç yaşı 84'tür (Liu ve ark., 2013).

1.2. CD33 geni

CD33 geni, hematopoietik progenitörler, miyelomonositik öncüler, makrofajlar, monositler, dendritik hücrelerin de dahil olduğu hematopoietik ve fagositik hücrelerde, beyinde ise mikroglia hücrelerde ifade edilmektedir (Jiang ve ark., 2014).

CD33 geni 7 ekzondan oluşmaktadır. Ekzon 2, IgV bölgesini; ekzon 4, IgC bölgesini; ekson 6 ve 7 ise immünoresptör tirozin-merkezli inhibitör motif (ITIM) bölgesini kodlamaktadır. SA, IgV bölgesinden bağlanarak CD33'ü aktive etmektedir ve ITIM aracılığıyla monosit inhibisyonuna yol açmaktadır (Malik ve ark., 2013).



Şekil 1.6. CD33 geni (Human Gene Database).

19q13.33 kromozomu üzerinde bulunan CD33 geni, 67-kDa ağırlığındaki CD33 proteinini kodlamaktadır (Jiang ve ark., 2014).

1.2.1. CD33 Proteini

Sialik asit (SA) bağlayıcı Ig benzeri lektinler (Siglecler) süperaillesine ait CD33, tip I (Ig-tip) transmembran proteinidir (Crocker ve ark., 2007; Lajaunias ve ark., 2005).

Siglecler

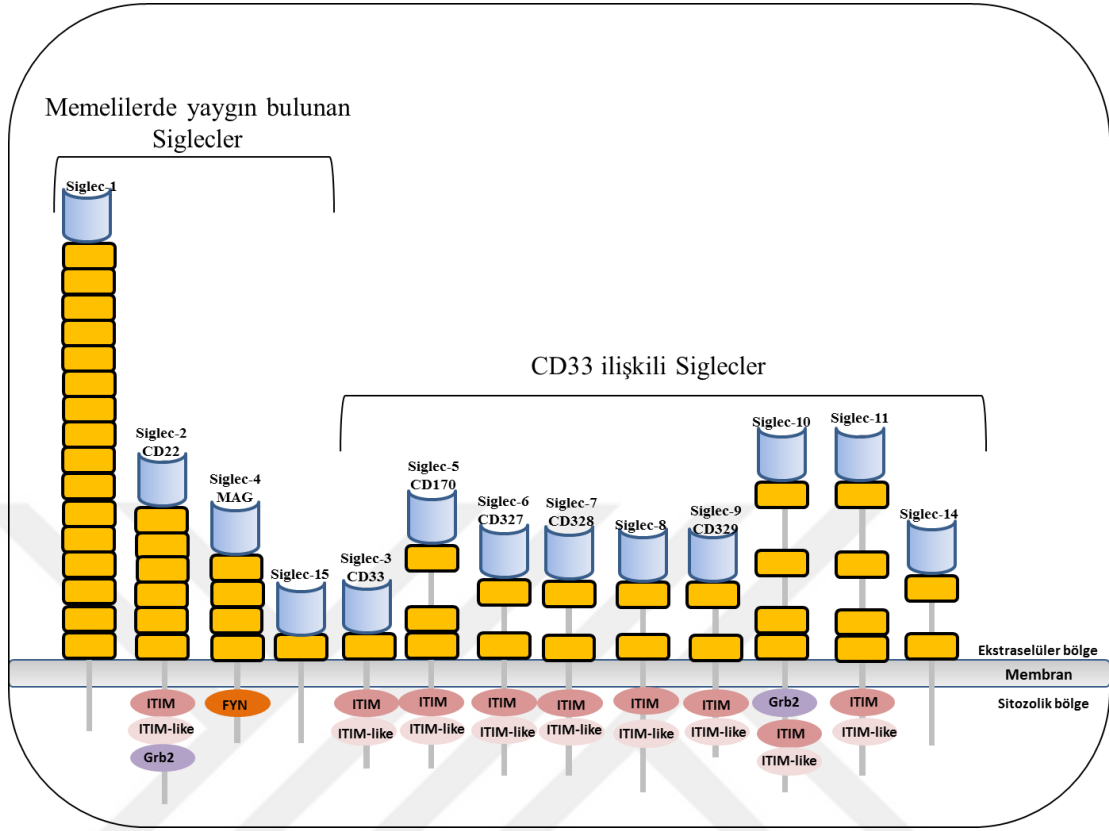
Ig süperaillesine ait protein alanları içeren hücre yüzeyi reseptörleri olan Siglecler tip I (Ig-tip) lektinlerdir (Crocker ve ark. 2007).

Çizelge 1.6. Sigleclerin yapısı

Sigleclerin yapısı

- N-ucunda V-tipi Ig bölge (SA içeren glikanları bağlayan bölge)
- C2-tipi Ig bölge
- Transmembran bölge
- Sinyalizasyon motif

Siglecler, sitoplazmik alanda genellikle bir veya daha fazla tirozin kalıntısı içeren sinyalizasyon motif taşımaktadır. SA'nın bağlandığı N-ucunda V-tipi Ig bölge ve bunu takip eden C2-tipi Ig bölge ise ekstraselüler alanda bulunmaktadır (Crocker ve Varki, 2001).



Şekil 1.7. Siglecler

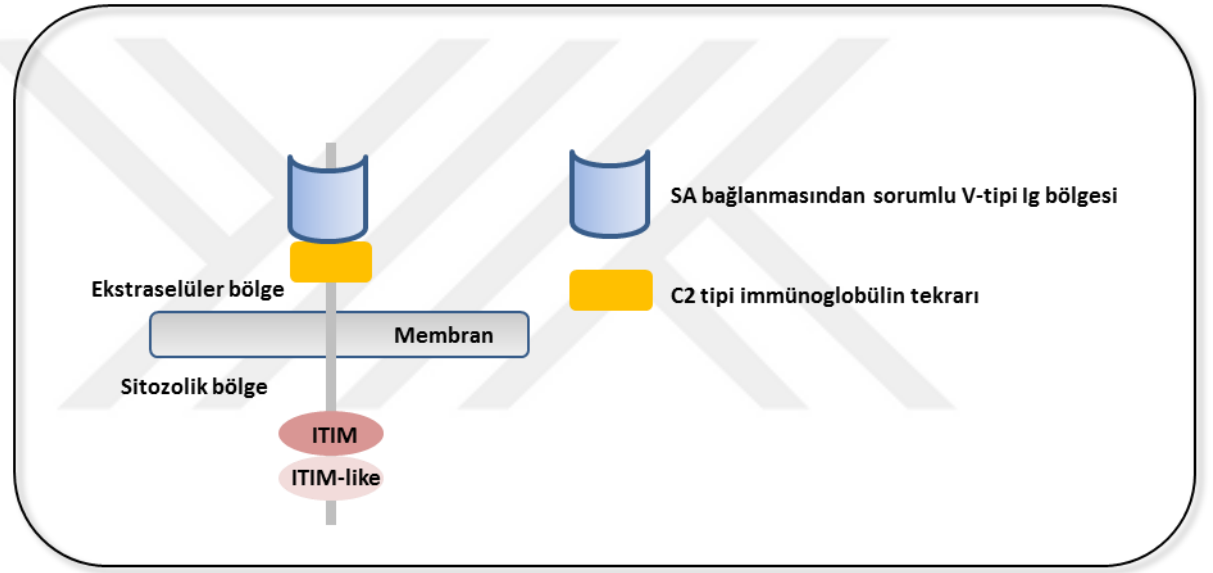
İmmün hücrelerde ifade edilen Sigleclerin, memelilerde 15 farklı türü bulunduğu bilinmektedir. Siglec-1, -2, -4 ve -15 memelilerde ortak olarak bulunmaktadır. Siglec-3, -5, -6, -7, -8, -9, 10, -11 ve -14 ise 'CD33-ilişkili Siglecler' olarak adlandırılmakta ve türler arasında farklılık göstermektedir. Siglec-13 ise evrim sonucu insanlarda kaybolduğu bildirilmektedir (Crocker ve Varki, 2001).

Çizelge 1.7. Siglec'ler ve ifade edildikleri hücre tipleri

Siglec'ler	İfade edildiği hücreler
<i>Klasik Siglec'ler</i>	
Siglec-1 (Sialoadhesin)	Makrofajlar
Siglec-2 (CD22)	B lenfosit
Siglec-4 (MAG)	Schwan hücreleri Oligodendrositler
Siglec-15	Osteoklastlar Makrofajlar
<i>Siglec-3 (CD33)-ilişkili Siglec'ler</i>	
Siglec-3 (CD33)	Monositler Myeloid progenitorler
Siglec-5 (CD170)	Granulositler B-lenfositler
Siglec-6 (CD327)	B-lenfositler Troboblastlar (plasentada)
Siglec-7 (CD328)	Doğal öldürücü hücreler Monositler
Siglec-8	Eozinofil
Siglec-9 (CD329)	Monositler Granülositler Makrofajlar
Siglec-10	B-lenfositler
Siglec-11	Makrofajlar (ayrıca mikrogli hücreleri)
Siglec-12	Monositler
Siglec-14	Granülositler Monositler
Siglec-16	Makrofajlar

CD33 protein yapısı

CD33 proteini, SA tanınmasından sorumlu ekstraselüler bir N-ucu V-tipi immünoglobülin bölge ve ardından buna bağlı bir C2 (karbon) tipi immünoglobülin tekrarından oluşmaktadır (Crocker ve ark., 2007; Demiralp, 2008). İntraselüler olarak ise bir membran-proksimal ITIM ve bir membran-distal ITIM benzeri motif olmak üzere 2 sitoplazmik tirozin-merkezli motif içermektedir (von Gunten ve Bochner, 2008).



Şekil 1.8. CD33 protein yapısı (Laing ve ark., 2017)

CD33, hücre-hücre etkileşimine aracılık etmekte ve primer immun hücrelerin adezyon prosesinde görev almaktadır. Ayrıca, IL-1 β , TNF ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinleri ve immun hücre fonksiyonlarını inhibe ettiği bilinmektedir (Crocker ve ark., 2007; Lajaunias ve ark., 2005).

CD33, proliferasyonu inhibe ederek ve apoptozisi indükleyerek hücrenin yaşamsal faaliyetlerini düzenlemektedir (Jiang ve ark., 2014). Ayrıca, hücre-hücre etkileşimine aracılık ederek hedef hücre membranlarındaki sialoglikanlara bağlanabilmektedir. Aynı şekilde CD33, yüzeylerinde sialo glukanlar bulunan sialile

patojenler ve virüslerle etkileşime girebilmektedir. Bu patojenin CD33'e sialile ligandlarla bağlanmasını ve konak hücre tarafından endositozunu ve klirensini kolaylaştırmakta ya da tam tersi olarak enfeksiyonun yayılmasına aracılık edebilmektedir (Vimr ve Lichtensteiger, 2002).

1.2.3. CD33 ve AH

Çeşitli etnik gruplarda yapılan GWAS çalışmalarında, GBAH ile ilişkili güçlü bir genetik lokus olarak *başkalaşım kümeleri 33* (cluster of differentiation 33: CD33) tanımlanmıştır. CD33'ün mikroglia aracılı A β klirensini azalttığı bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2014; Hu ve ark., 2014; Mao ve ark., 2015 ve Hollingworth ve ark., 2011). Doğal bağışıklığı düzenleyen ancak beyindeki fonksiyonları henüz tam olarak aydınlatılamayan CD33 (Griciuc ve ark., 2013), mikroglia aracılı A β klirens eksikliğine ve amiloid plak oluşumuna neden olduğu kanıtlanmıştır (Jiang ve ark., 2014). Ayrıca, AH beyinde CD33 düzeyi yüksek bulunmuş ve amiloid plak oluşumu ve hastalık şiddetiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Griciuc ve ark., 2013).

GWAS çalışmalarında, CD33 tek nükleotid polimorfizmi olarak (TNP) rs3865444 ve rs3826656 bildirilmiştir. Avrupa, Güney Amerika ve Kore'de yapılan kohort çalışmalarında populasyonun %30'unda görülen rs3865444 minör (T) alelinin koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. (Hollingworth ve ark. 2011; Carrasquillo ve ark., 2011; Chung ve ark., 2012). Han Çin populasyonunun %17'sinde görülen rs3865444 T alelinin ise AH riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Farklı populasyonlarda farklı alellerin aynı etkiyi göstermesi rs3865444 ile AH arasındaki ilişkinin çevresel faktörler tarafından etkilenmiş olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle rs3865444'ün bazı populasyonlarda AH için bir risk oluşturduğu bazı populasyonlarda ise koruyucu etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Jiang ve ark., 2014). AH'de rs3865444 ile rs12459419 arasında ise bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) gösterilmiştir. Başka bir ifadeyle, rs3865444 CD33 ekson 2 eklenmesiyle rs12459419 TNP oluşmaktadır ve CD33 ekspresyonunun artışıyla sonuçlanmaktadır. AH'ye karşı koruyucu olduğu bildirilen rs12459419 T minör aleli

ile CD33 2. ekson atlama arasında bir ilişki olduğu in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Ekson 2, SA bağlanmasına aracılık eden IgV alanını kodladığından dolayı ekson 2 içermeyen CD33'ün fonksiyonun azaldığı bildirilmiştir (Malik ve ark., 2013).

CD33'ün intron bölgesinde yer alan rs114282264'te yeni bir TNP, Afrika kökenli Amerikalılarda AH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu ilişkinin diğer etnik gruplarda da kanıtlanması gerektiği bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2014).

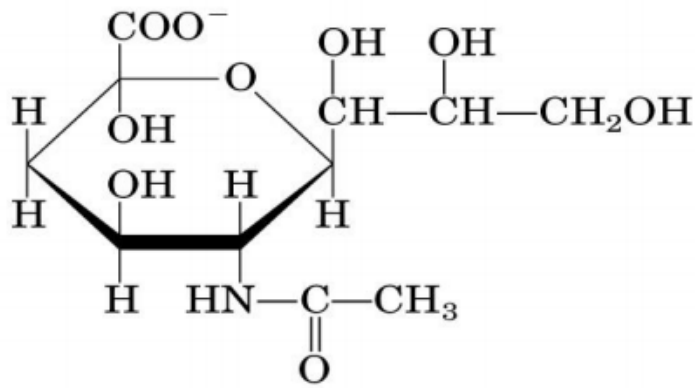
Bazı çalışmalarda rs3826656 minör alelinin AH için risk faktörü olarak gösterilmesine rağmen 2018 yılında yapılan meta-analiz çalışmasında AH riski ile korelasyon saptanmamıştır (Mao ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2018).

AH beyinde CD33 proteini düzeylerinin artmış olduğu ve bu artışın immünoreaktif-CD33 mikrogial hücrelerin artışından kaynaklanmış olabileceği; ayrıca transkripsiyon düzeyinde ise, mikrogial hücrelerde CD33 transkripsiyonunun upregülasyonundan dolayı CD33 mRNA seviyesinde bir artış olduğu düşünülmektedir (Griciuc ve ark., 2013). Bu görüş Karch ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada da gösterilmiştir. Alzheimer hastalarının beyin dokusunun parietal lobunda Iba-1 (mikrogial hücrelerin bir biyogöstergesi) ve CD33 mRNA seviyeleri arasında korelasyon olduğu kanıtlanmıştır (Jiang ve ark., 2014).

Mikrogial hücrelerde CD33 rs3865444 T aleli düşük CD33 protein düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiş; mRNA düzeyleriyle ise anlamlı bir ilişkinin olmadığı gösterilmiştir. Rs3865444 risk alelinin (C) yüksek CD33 seviyeleri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, genç bireyler ile AH hastası olan ve olmayan yaşlılarda yapılan çalışmalarda, TT genotipini taşıyanlar CC genotipini taşıyanların monositlerinde CD33 ekspresyonun yaklaşık yedi kat fazla olduğu bildirilmiştir (Zhao, 2018).

1.3. Sialik Asit

İnflamatuvar bir reaksiyon veya hasara yanıt olarak artan ve hücre membranları ile biyolojik sıvılardaki glikoprotein veya glikolipidlerin karbonhidrat kısmına bağlanan SA, dokuz karbonlu nöraminik asitin asetillenmiş türevidir (Üstündağ ve ark., 2003 ve Pönniö ve ark., 1999). SA hücre membranının önemli komponentlerinden biridir ve hücreye negatif yük yükleyerek hücre yüzeylerine yüksek hidrofilik özellik vermektedir (Wielgat ve Braszko, 2012).



Şekil 1.9. SA'nın kimyasal yapısı (PubChem)

Çizelge 1.8. SA'nın kimyasal özellikleri (PubChem)

IUPAC ismi	(2R,4S,5R,6R)-5-acetamido-2,4-dihydroxy-6-[(1S,2S)-1,2,3-trihydroxypropyl]oxane-2-carboxylic acid
Kimyasal isimleri	• Sialik asit • 5-Acetamido--3,5-dideoxy-D-glyceo-D-galacto-2-nonulosonic acid • N-Asetilnöraminik Asid (NANA)
Moleküler formülü	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉
Molekül ağırlığı	309.271 g/mol

SA'nın büyük bir kısmı insan plazmasında α -1-asit glikoprotein, fibrinojen, seruloplazmin, transferin, haptoglobin ve kompleman proteinlerinin terminal oligosakkarid zincirlerinde bulunmaktadır. Bunların bir bölümü inflamatuvar bir reaksiyon veya hasara yanıt olarak artmakta ve akut faz reaktanı olarak adlandırılmaktadır (Üstündağ ve ark., 2003). Bu sebeple Behçet hastalığı, MSS hastalıkları, kardiyovasküler rahatsızlıklar, bakteriyel enfeksiyonlar, psoriasis ve romatoid artrit gibi inflamasyonlu hastalıklarda serum SA düzeyleri yüksek seyretmektedir (Aypak ve Uysal, 2010). Ayrıca tümörler, miyokardiyal infarktüs, diyabet ve alkolizm gibi rahatsızlıklarda da serum SA konsantrasyonunun arttığı bildirilmektedir. Kanser hastaların SA düzeylerinde artış ile metastaz derecesiyle pozitif bir ilişki olduğu ve tedavinin izlenmesi açısından klinik öneme sahip olabileceği düşünülmektedir (Pönniö ve ark., 1999).

Çizelge 1.9. SA'nın biyolojik fonksiyonları

SA'nın biyolojik fonksiyonları (Pönniö ve ark., 1999 ve Çetinkaya ve ark., 2004):

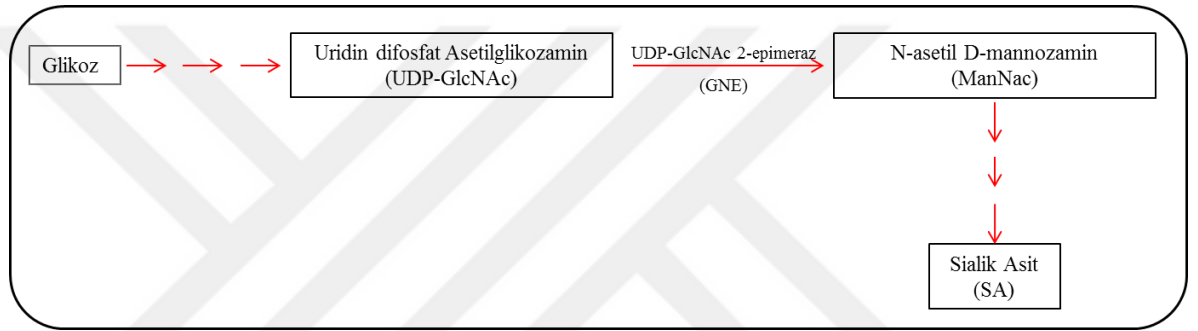
- Hücre membran ve glikoproteinlerin yapı stabilizasyonu.
- Hücrelerin birbirini tanınması ve ilişki kurmasının sağlanması.
- Membran transportuna aracılık etme.
- Ligandlar için bağlanma bölgelerini koruyarak membran reseptör fonksiyonunu etkileme.
- Kan glikoproteinlerin fonksiyonu, stabilitesi ve yaşamlarını düzenleme.
- Glomerüller membran permeabilitesini düzenleme.

MSS, vücutta en fazla SA içeren bölgedir. SA'lar MSS'de genellikle glikolipidlere bağlı halde bulunmaktadır (Wielgat ve Braszko, 2012). AH'de senil plakların yapısında bulunan A β proteinin, hücre yüzeyindeki SA kalıntısı taşıyan glikolipidlere ve glikoproteinlere bağlanması bu proteinin nörotoksitesini azaltmaktadır (Patel ve ark., 2007). SA içeren glikolipidlerin, gangliosidlerin genetik

eksikliği ise MSS inflamasyonu ve nörodejenerasyonla sonuçlanmaktadır (Furukawa ve ark., 2015).

1.3.1. SA biyosentezi

Memeli hücrelerinde SA biyosentezi sitozolde glikozdan gerçekleşmektedir. SA sentezlendikten sonra golgi cisimciğine oradan da çekirdeğe taşınmaktadır (Şekil 1.10) (Wang ve ark., 2017; Chugh ve ark., 2014).



Şekil 1.10. SA biyosentezi

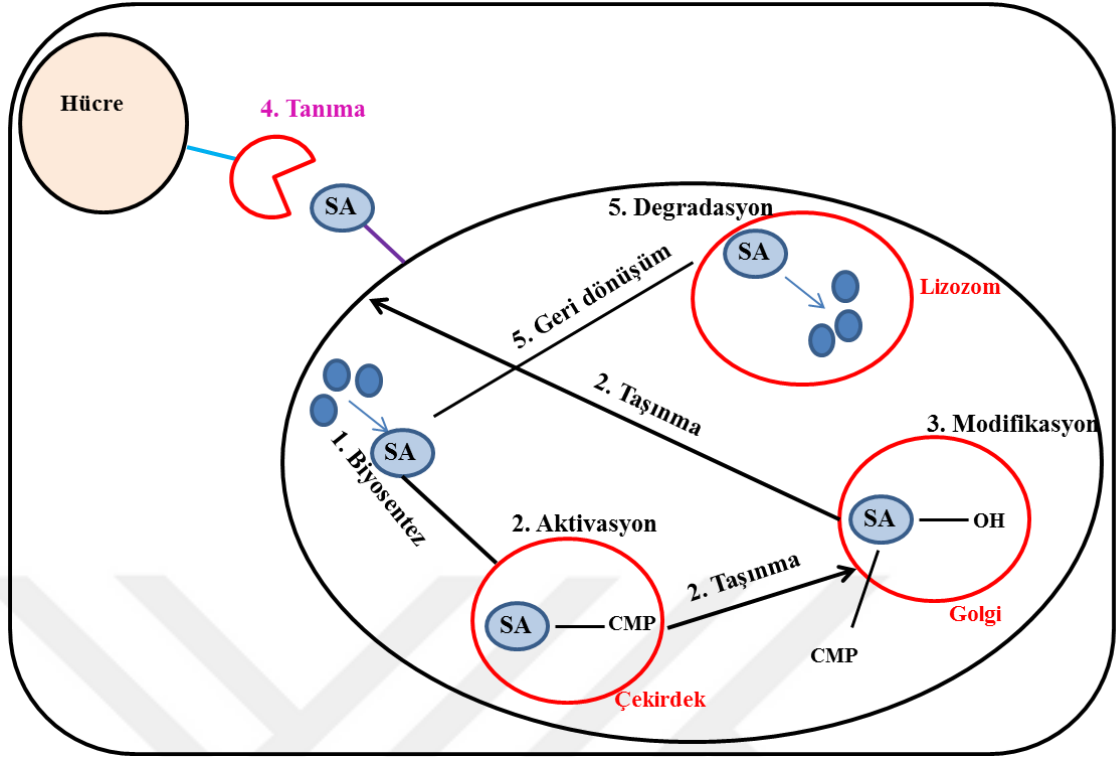
SA biyolojisinde 50'den fazla gen rol almaktadır. Bu genleri 5 kategoride toplamak mümkündür (Moon ve ark., 2018).

1. Biyosentez
2. Aktivasyon ve Taşınma
3. Modifikasyon
4. Tanıma
5. Degradasyon

Çizelge 1.10. SA biyolojisinde yer alan biyokimyasal yollarla ilişkili olduğu bilinen genler

Biyosentez Genleri	Aktivasyon/Taşınma Genleri	Modifikasyon ile ilişkili genler	Tanıma Genleri	Degradasyon ile ilişkili genler
• GNE • NAGK • NANP • NANS • RENBP	• CMAS • SLC35A1 • ST3GAL1-6 • ST6GAL1-2 • ST6GALNAC1-6 • ST8SIA1-6	• CMAH	• SIGLEC1 • CD22 • CD33 • MAG • SIGLEC5-12 • SIGLEC14-16 • LAMA1-2 • SELE • SELL • SELP • CFH • L1CAM	• NEU1-4 • SLC17A5 • SIAE • NPL • CTSA

Biyosentez genleri, sitozolde prekürsör molekülleri birleştirerek SA oluşmasında rol oynamaktadırlar. İkinci kategori ise, SA'ları sitidin monofosfat (CMP) bağlayarak aktifleştiren, glikokonjugatlara bağlanması için golgi cisimciğine ve oradan hücre yüzeyine taşıyan genleri içermektedir. Hücre yüzeyine gelen SA'lar özelleşmiş reseptörler tarafından tanınmaktadır. Görevi biten SA'lar ise lizozomlara gelerek parçalanmaktadır (Moon ve ark., 2018).



Şekil 1.11. SA biyolojisinde yer alan biyokimyasal yollar

1.4. Amaç

Multifaktöriyel nörodejeneratif bir hastalık olan AH, özellikle beyin parankim dokusunda A β peptidini içeren ekstraselüler amiloid plak birikimiyle karakterizedir. Çalışmalarda Alzheimer hastalarında A β klirensinde düşüş gözlenmiş olup AH'da esas patojenik olayın A β klirensinin azalmasından çok aşırı üretilmesi olduğu gösterilmiştir. (Hardy ve Selkoe, 2002; Mawuenyega ve ark., 2010).

Demansın en sık nedeni olan AH, sinaps ve nöron kaybıyla, ekstraselüler amiloid plakların ve intraselüler NFY'lerin oluşması ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır (Barbagallo ve ark., 2015; Selekler, 2010 ve Markesbery, 1997). Radikal tedavisi henüz bulunmayan AH'nin etiyolojisi de tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Ancak hastalığın patogeneğinde yaş, aile öyküsü, genetik

ve çevresel faktörler gibi pek çok etkenin rol oynadığı düşünülmektedir. GWAS çalışmaları AH ile ilişkili pek çok yeni geni ortaya çıkarmaktadır.

65 yaş ve sonrasında görülen GBAH ile CD33 geni arasında son yıllarda güçlü bir ilişki olduğu bildirilmektedir. GBAH beyinde CD33 yüksek düzeydedir. Ayrıca CD33 düzeyinin amiloid plak yükü ve hastalık şiddetiyle ilişkisini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Jiang ve ark., 2014). CD33'ün beyindeki fonksiyonlarının tam olarak belirlenebilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Bu tezde Türk populasyonun CD33 protein düzeyi ve gen ekspresyonun belirlenmesi amaçlanmıştır.

AH ile ilişkili nörodejenerasyonda inflamatuvar cevabın direkt neden olduğunu gösteren pek çok hipotez bulunmaktadır (Bermejo ve ark., 2008). Hücre membranının önemli komponentlerinden biri olan SA, inflamasyonlu hastalıklarda yüksek düzeylerde seyretmektedir (Aypak ve Uysal, 2010 ve Pönniö ve ark., 1999). SA nöraminik asitin asetillenmiş türevidir ve inflamatuvar bir reaksiyon veya hasara yanıt olarak artmaktadır (Üstündağ ve ark., 2003 ve Pönniö ve ark., 1999). Dolayısıyla bu tezde, Alzheimer hastalarında SA düzeylerinin belirlenmesi ve yorumlanması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan cihazlar

Akım sitometre (accuri C6 flow cytometer)

Buz makinesi (Hoshizaki)

Buzdolabı

Çeker ocak

Derin dondurucu (Scancool)

Elektroforez güç kaynağı (consort E452)

Jel elektroforez tankı (Thermo Scientific EasyCast B1A)

Jel görüntüleme cihazı (Kodak 1D)

Lam-Lamel (Menzel Glaser)

Magnetik karıştırıcı ısıtıcılı (IKA)

Mikroskop (CETI Belgium)

Nanodrop (ND-1000)

Otomatik pipetler (Ependorf)

qRT PCR cihazı (Bio-Rad)

Santrifüj (Sigma Aldrich 4K15)

Santrifüj (ThermoScientific Espresso)

Spektrofotometre (Shimadzu UV – 160A)

Spektrofotometre küveti (Starna)

Steril kabin

Su banyosu

Terazi

Termal Döngü cihazı (AB/Verity "96-Well" Thermo Cyclers)

Vorteks (Whirlimixer Fisons Scientific Apparatus)

2.1.2. Kullanılan kimyasallar

FITC anti-human CD45 (BIOLEGEND)

PE anti-human CD33 (BIOLEGEND)

PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) (BIOLEGEND)

FITC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) (BIOLEGEND)

Lymphoprep (STEM CELL TECHNOLOGIES)

RNA izolasyon Kit Blood (Bio-Rad)

iScript RT Supermix (Bio-Rad)

iTaq Universal SYBR Green Supermix SMX1000 (Bio-Rad)

Pkg of 25, clear shell/white well PCR plate for Roche LightCycler 480 real-time

PCR system, bar-coded, rigid 2-component design (Bio-Rad)

Optimized qPCR Primers for CD33 (Bio-Rad)

Optimized qPCR Primers for ACTB (Bio-Rad)

CD33 Antibody Rabbit Polyclonal (Proteintech)

Beta Actin Mouse Monoclonal antibody (Proteintech)

Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate (Proteintech)

Bd accuri6 flow cytometer starter kit (BD biosciences)

Ehrlich ayıracı

Tripan blue çözeltisi

N-asetil nöraminik asit (NANA) (Sigma)

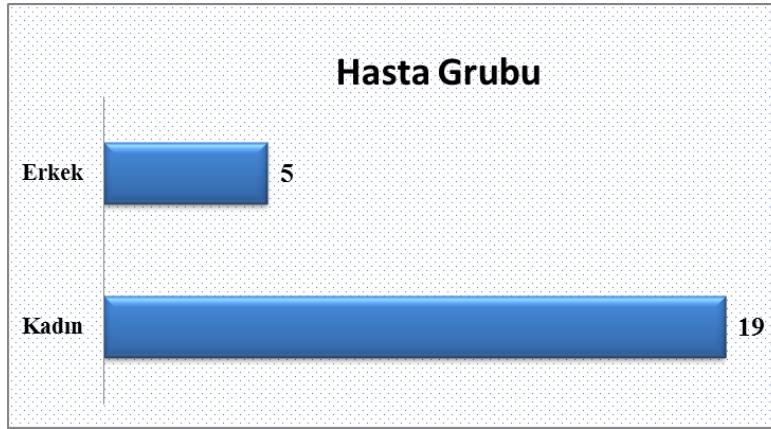
PBS tablet

β -merkaptotanol

2.2. Yöntem

2.2.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Seçimi

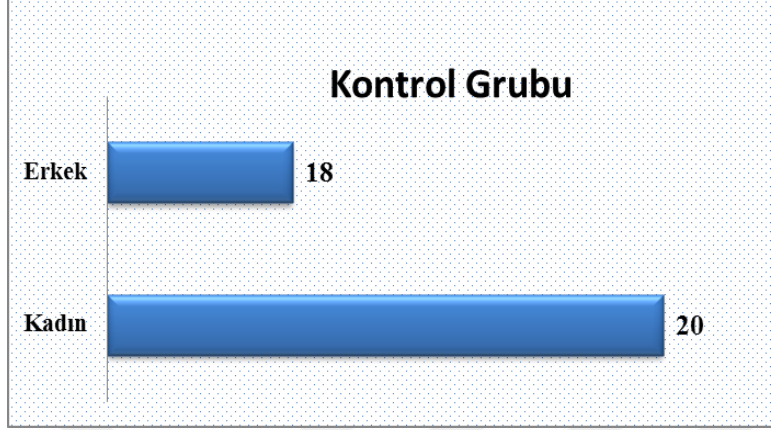
Yaşlı Bakımevi'nde kalmakta olan ve tam teşekküllü hastanelerden konu ile ilgili uzman klinisyenler tarafından AH tanısı almış kişilerin yasal vasileri çalışma hakkında bilgilendirildikten ve yazılı onayları alındıktan sonra 65 yaş ve üstü erkek 5 (%21) ve kadın 19 (%79) toplam 24 Alzheimer hastası çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 2.1. Hasta grubu erkek ve kadın birey sayıları

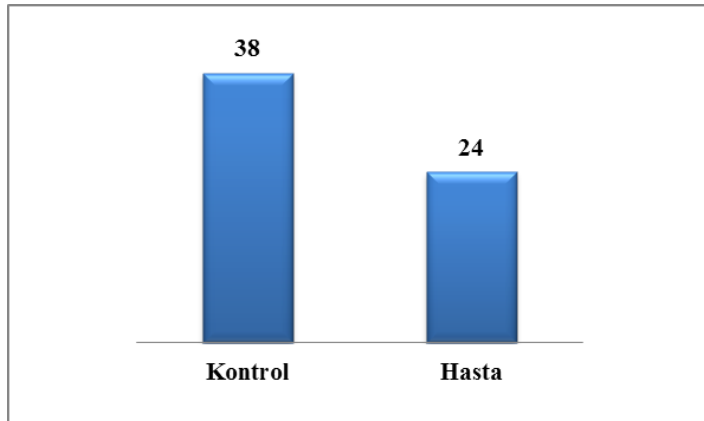
Kontrol grubu için, AH tanısı almamış veya diğer demans ya da bilişsel rahatsızlığı olmayan, yazılı olarak gönüllü onayı alınan, sağlık ocakları ve hastanelerden 65 yaş ve üstü 18 (%47) erkek ve 20 (%53) kadın toplam 38 kişi

gönüllü olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Katılımcılara, çalışmanın sonuçlarını daha iyi değerlendirmek amacıyla anket yapılmıştır (Ek-2).



Şekil 2.2. Kontrol grubu erkek ve kadın birey sayıları

AH ile ilgili yayınlanan klinik çalışmalar tarandığında hasta/kontrol grubu birey sayıları çeşitlilik göstermektedir (Panza ve ark., 2003; Slooter ve ark., 1998; Davis ve ark., 2009; Todaro ve ark., 2004). Bu tür çalışmalarda seçilen örneklem sayısı, geneli temsil etmesi ve sonuçların genel hakkında doğru bilgiye ulaştırabilmesi açısından oldukça önemlidir. Maliyet, zaman ve laboratuvar koşullarımız göz önüne alındığında çalışmamıza 38 Kontrol ve 24 Alzheimer hastası kadın/erkek dahil edilmiştir. Bu bağlamda, bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'u tarafından onay almıştır (EK:2 Karar no: 18-929-16).



Şekil 2.3. Kontrol ve Hasta grupları birey sayıları

2.2.2. Araştırma Kriterleri

2.2.2.1. Kontrol grubu dahil olmama kriterleri (dışlama ölçütleri)

Araştırmaya 65 yaş ve daha büyük Alzheimer hastası olmayan **38** gönüllü kadın/erkek dahil olmuştur.

- 65 yaşından küçük,
- Kan alınamayacak durumda (anemi veya koagülasyon problemi) olan hastalar,
- Alzheimer ve diğer demans tipleri ile hafıza veya bilişsel rahatsızlık, majör psikiyatrik hastalık veya mental bozukluk hikayesi olanlar,
- Sonuçları etkileyebilecek eşlik eden önemli bir rahatsızlığı olanlar: inme, kanser, kontrol edilemeyen diyabet, stabil olmayan hipertansiyon, böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler hastalıklarda son evresinde olanlar.

2.2.2.2. Alzheimer hasta grubuna dahil olmama kriterleri (dışlama ölçütleri)

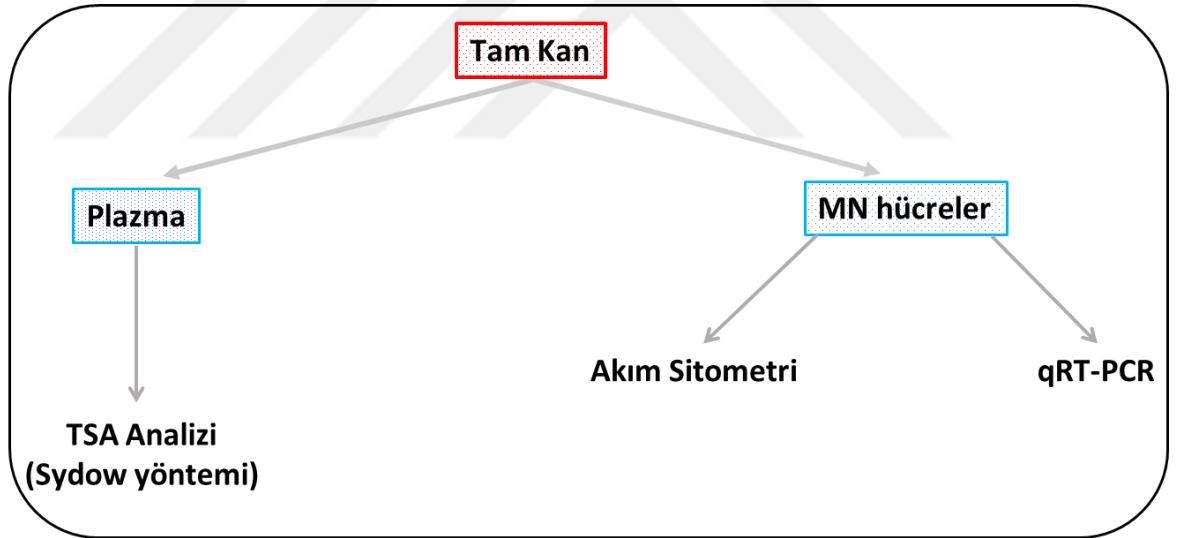
Araştırmaya 65 yaş ve daha büyük kadın/erkek **24** Alzheimer hastası dahil olmuştur.

- 65 yaşından küçük,
- Kan alınamayacak durumda (anemi veya koagülasyon problemi) olan hastalar,
- Diğer hafıza veya bilişsel rahatsızlık, majör psikiyatrik hastalık veya mental bozukluk hikayesi olanlar,
- Alzheimer dışında kalan diğer demans tipleri hastası olmak,
- Sonuçları etkileyebilecek eşlik eden önemli bir rahatsızlığı olanlar: inme, kanser, kontrol edilemeyen diyabet, stabil olmayan hipertansiyon, böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler hastalıklarda son evresinde olanlar.

2.2.3. Kan Örneklerinin Toplanması

Hasta ve kontrol grubu bireylerden alınan 10 ml venöz kan etilendiamin tetraasetik asitli (EDTA) tüplere aktarılmıştır. Alınan kan örneklerinde izole edilen plazmada SA ve mononükleer (MN) hücrelerde ise CD33 düzeyleri değerlendirilmiştir.

Kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları ayrılmıştır. Plazmada total sialik asit (TSA) tayini yapılmıştır. Plazma alındıktan sonra kalan kandan Lympoprep ile MN hücreler izole edilmiştir. Her bireyden elde edilen MN hücrelerin ışık mikroskopunda tripan blue çözeltisi ile sayımı yapılmıştır. MN hücreler akım sitometri ve kantitatif eş zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemleri ile CD33 tayini için hücre sayılarına göre 2 kısma ayrılmıştır.



Şekil 2.4. Deney planı

2.2.4. Periferik Kandan Plazma Eldesi

Kanın yaklaşık %55'i plazmadan kalanı ise şekilli elemanlardan meydana gelmektedir. Plazmanın %90'ı sudan oluşmaktadır. Kalan kısmı ise serum albumin, globülin ve fibrinojenden oluşan plazma proteinleridir. Kan antikoagülan içeren bir

tüpe alınıp santrifüj edildiğinde eritrositler dibe çöker ve sarı renkli plazma üst kısımda toplanır. Bu iki kısım arasında ise oldukça ince bir tabaka halinde lökosit ve trombositleri içermektedir (Ayrar, 1978 ve Dean, 2005).

Plazma Eldesi Protokolü

1. Kontrol ve hasta grubu katılımcılardan EDTA'lı tüplere 10 mL venöz kan alınmıştır.
2. 2500 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek plazmalar elde edilmiştir.



Şekil 2.5. Periferik kandan plazma eldesi

2.2.5. Plazma TSA Analizi

Plazma TSA düzeylerini belirlemek için uygulanması kolay, tekrarlanabilir, zaman ve maliyet bakımından ekonomik bir metod olan Sydow (1985) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır.

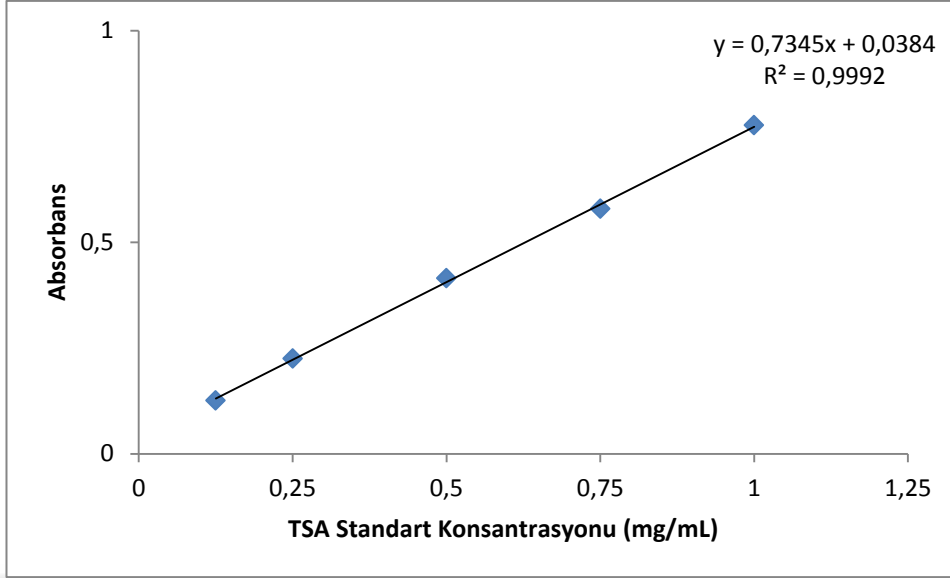
SA, asit ile hidroliz edildiğinde serbest hale geçmektedir. Serbest SA, asidik ortamda veya periyodat varlığında okside olmaktadır. Oksidasyon sonucu meydana gelen bileşik p-dimetilaminobenzaldehid ile pembe renkli bir ürünün oluşmasına neden olmaktadır. Bu ürünün 525 nm dalga boyundaki absorbansı TSA konsantrasyonu ile orantılıdır.

Plazma TSA analiz basamakları

1. 0.2 ml plazma üzerine 1.5 ml % 5'lik perklorik asit ilave edilerek 100°C'de 5 dakika kaynatılmıştır.
2. Deney tüpleri hemen buza gömülerek soğutulmuştur.
3. Deney tüpleri 2500 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Süpernatanttan 1 ml alınarak başka temiz tüplere aktarılmıştır.
5. Her bir deney tüpünün üzerine 0.2 ml Ehrlich ayırıcı ilave edilerek 100°C'de 15 dakika kaynatılmıştır.
6. Kaynatma işleminden sonra tüpler soğutulmuştur.
7. Her bir deney tüpüne 1 ml distile su ilave edilerek 525 nm dalga boyunda absorbanları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Kör ve Standart Tüplerin Hazırlanması

Numunelerin konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için NANA standardı 0.125, 0.25, 0.50 ve 1 mg/ml'lik konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Kör (distile su) ve standart tüpler numunelerde olduğu gibi 100°C'de 15 dakika kaynatıldı ve soğutulmuştur. 525 nm'de absorbanlar okunmuştur. Elde edilen standart absorbanlarla konsantrasyon değerleri grafiğe geçirilerek standart grafiği elde edilmiştir. Plazma TSA konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.



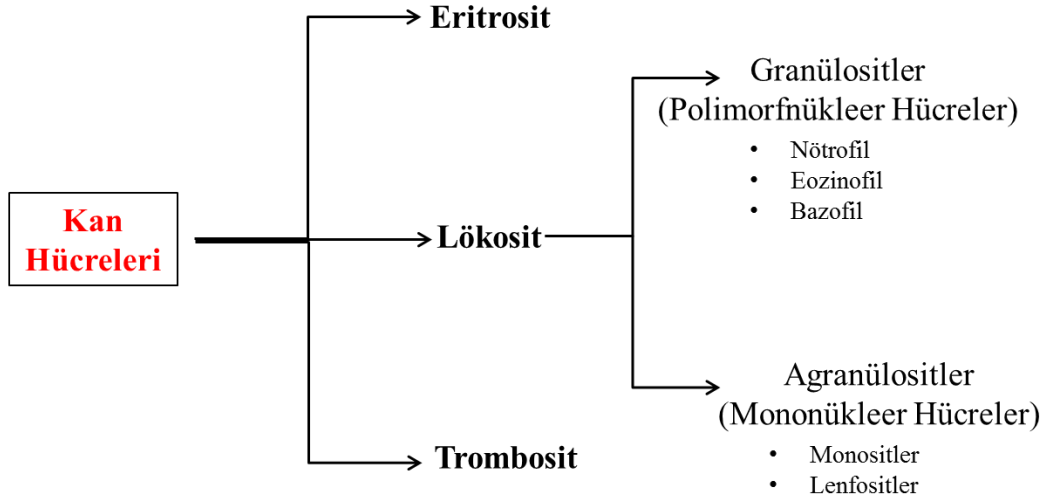
Şekil 2.6. TSA standart grafiği

2.2.6. Periferik Kandan MN Hücre İzolasyonu

Çekirdekleri tek parça halinde olan MN hücreler lenfosit (T-lenfosit, B-lenfosit ve Natural killer hücreler) ve monosit hücrelerden oluşmaktadır. MN hücrelerin çekirdekleri tek lobludur ve yuvarlak veya çentikli olabilmektedir.

MN hücre sayısı bireyler arası farklılık göstermektedir. Ancak genel olarak MN hücre popülasyonunun %70-90'ı lenfositlerden, %10-30'u ise monositlerden oluşmaktadır.

MN hücreler periferik kan, kordon kanı veya kemik iliğinden hidrofilik bir polisakkarit ile santrifüjlenerak elde edilmektedir. Granülositler ve eritrositler, MN hücrelerden daha yoğun olduklarından santrifüj tüpünde dibe çökmektedirler.

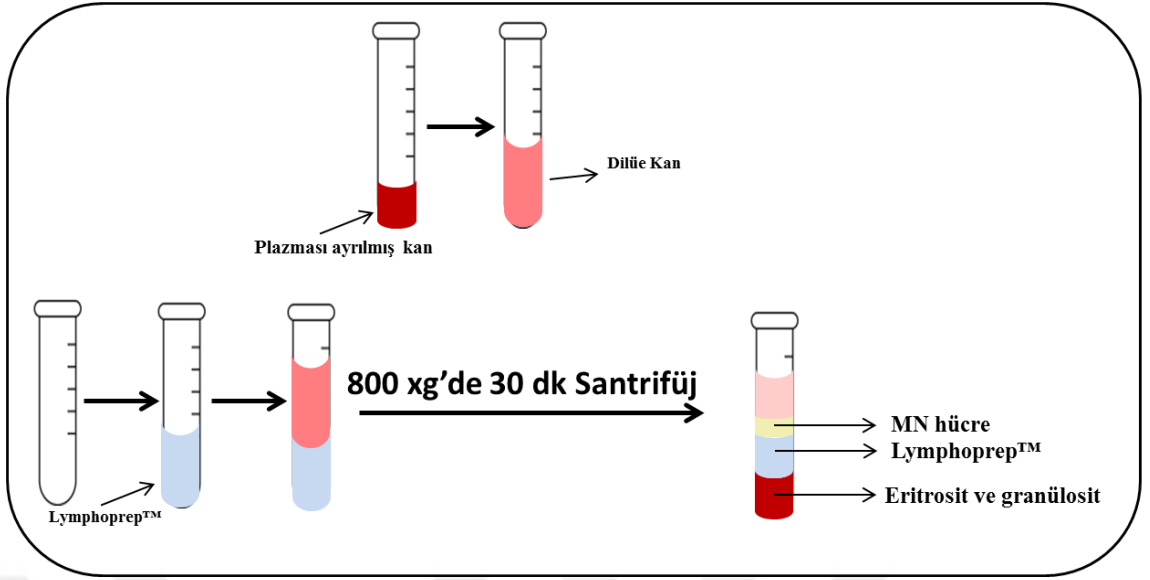


Şekil 2.7. Kan hücreleri

MN Hücre İzolasyonu

MN hücreler tam kandan Lymphoprep™ dansite gradient metodu ile izole edilmiştir. Granülositler ve eritrositler, MN hücelere göre daha yüksek bir dansiteye sahiptir. Bu nedenle santrifüj sırasında Lymphoprep™ tabakası boyunca çökelmektedirler.

1. Kan numunesi 1:1 oranında seyreltilmiştir.
2. Seyreltilmiş kan numunesi ile eşit hacimde Lymphoprep™ 50 ml'lik falkon tüpüne alınmıştır.
3. Lymphoprep™ üzerine kan numunesi falkon tüpünün kenarından sızdırılarak yavaşça aktarılmıştır.
4. Falkon tüpü 800 xg'de 30 dk santrifüj edilmiştir.
5. Oluşan bulutsu tabaka MN hücreler olup, başka temiz bir 50 ml'lik falkon tüpüne alınmıştır.
6. 10 µL MN hücre aynı hacimde tripan blue ile karıştırılmıştır. Neuber chamber üzerine yayılarak ışık mikroskobu ile hücre sayımı yapılmıştır.
7. Her numuneden 1.000.000 MN hücre akım sitometri yöntemi için ayrılmış ve hemen çalışmaya alınmıştır.
8. Kalan hücreler analizleri yapılincaya kadar -80°C'de saklanmışlardır.



Şekil 2.8. MN hücre izolasyonu



Şekil 2.9. Işık mikroskobu

2.2.7. Akım Sitometri Yöntemi

Akım sitometri, çok sayıda hücrenin veya biyolojik partikülün biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerini hızlı bir şekilde incelenmesine olanak sağlayan tekniktir (Dunphy, 2004). Bu teknik ile kan ve kemik iliği, ayrıca beyin omurilik sıvısı, eklem sıvısı gibi biyolojik sıvılar, doku biyopsi örnekleri ve hücre kültürü örnekleri analiz edilebilmektedir (Taneli, 2007).

Akım sitometri cihazında (Şekil 2.2) süspansiyon halindeki hücreler bir sıvı akımı ile lazer ışının önünden tek tek geçerek büyüklük, granülarite ve floresan yoğunluk gibi özellikler değerlendirilerek hücrelerin enzim aktiviteleri, DNA ve protein içerikleri ile hücre canlılığı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Taneli, 2007; Dunphy, 2004).



Şekil 2.10. Akım Sitometri cihazı

Akım sitometri cihazı 4 temel sistemden oluşmaktadır. Bunlar;

1. Akış sistemi (sheath fluid)
2. Lazer sistemi

3. Optik sistem

4. Elektronik sistem (cell sorting)

Hidrolik sistem olarak da bilinen akış sistemi, hücrelerin lazer önünden tek tek geçmelerini sağlayan sistemdir. Bu sistem içerisinde merkezi bir kanaldan hücreleri içeren sıvı ve bu sıvıyı çevreleyen başka bir sıvı (sheath fluid) bulunmaktadır. Bu sıvılar, 'hidrodinamik odaklanma' prensibiyle birbirlerine karışmadan ilerlerken lazer ışının tek hücre üzerine düşmesi sağlanmakta ve analizi yapılmaktadır.

Lazer ışını, lazer ile aynı yönde 20° açıyla yayıldığında ileri saçma grafiği (forward scatter chanel (FSC)) denilen bir lens yardımıyla toplanır ve FSC dedektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi vermektedir. Aynı anda lazer ışını eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayıldığında yana saçılma grafiği (side scatter chanel (SSC)) ile ölçülmektedir ve hücrelerin granülitesi hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca florokrom maddeler (floresan antikor) kullanılarak akım sitometri cihazında floresan filtre ve dedektörle hücrelerin biyolojik ve biyokimyasal özellikleri, hücre yüzey reseptörleri ile intraselüler moleküllerin tespiti yapılabilmektedir (Taneli, 2007).

Akım Sitometri Yöntemiyle MN Hücrelerde CD33 Protein Düzeyinin Ölçülmesi

MN hücreler izole edildikten hemen sonra akım sitometri ile ölçüm için çalışmaya alınmıştır.

1. Her numuneden elde edilen MN hücreler 8 mikrosantrifüj tüpe bölünmüştür.
2. Mikrosantrifüj tüplere sırasıyla izotop veya antikor içermeyen; FITC anti-human CD45; PE anti-human CD33; PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC); FITC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) ve FITC anti-human CD45 + PE anti-human CD33 3 tekrarlı olacak şekilde etiketlenmiştir.
3. İzotip ve antikorlar MN hücreler üzerine kılavuzlarında belirtildiği miktarlar kadar ilave edilmiştir.

4. Mikrosantrifüj tüpleri karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrası her bir mikrosantrifüj tüpüne 1 ml PBS eklenerek 5000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek yıkama işlemi yapılmıştır.
6. Üst faz atılarak 100 µL PBS eklendikten sonra akım sitometri cihazında ölçüm yapılmıştır.

2.2.8. qRT-PCR Yöntemi

qRT-PCR yöntemi, nükleik asitlerin amplifikasyonunun tek bir tüpte eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesine olanak tanıyan bir polimeraz zincir reaksiyonu yöntemidir. Başka bir ifadeyle, sıcaklık değişimleri sırasında floresan okunmaları tek bir tüpte ve cihazda gerçekleştiğinden elektroforeze gerek kalmadan ve kontaminasyona uğramadan hedef gen saptanabilmekte ve çoğaltılabilmektedir. Bu yöntemde kullanılan özel boyalar DNA sarmalına bağlanmaktadır. Numune içeriğindeki DNA miktarına bağlı olarak floresan ışıma meydana gelmektedir. Her PCR döngüsü sonunda amplifikasyon sayısına bağlı ortaya çıkan ışıma ölçülerek kantitatif analiz yapılmaktadır. Başlangıçta ışıma zayıftır. Zamanla ürün miktarı arttıkça sinyal yoğunluğu da artmaktadır (Nolan ve ark., 2006).

qRT-PCR kullanım alanları; tek nükleotid polimorfizmi, kromozom bozuklukları ve gen ekspresyonu analizleri ayrıca mRNA miktarı ile DNA kopya sayısı belirlenebilmektedir (Kubista ve ark., 2006).



Şekil 2.11. qRT-PCR cihazı

Syber Green I, DNA'ya bağlanarak floresan ışıma yapan ve kantitatif qRT-PCR yönteminde sıklıkla kullanılan bir boyadır. Syber Green I çift zincirli PCR ürünlerine bağlanmaktadır. Ancak Syber Green I, spesifik DNA'ya bağlanmayıp primer-dimerlere ya da spesifik olmayan ürünlere de bağlanarak ışıma oluşturabilmektedir. Bu bakımdan, erime eğrisi kullanılarak amplifikasyonun özgünlüğü kontrol edilebilmektedir. Her bir DNA (çift zincirli)'nın kendine özel bir erime ısısı (melting temperature, T_m) bulunmaktadır. T_m değeri, çift sarmal halinde bulunan DNA'nın yarısının tek sarmal hale geçmesi için gereken sıcaklık olarak tanımlanır. Amplifikasyon sonrasında sıcaklık yükselirken floresan miktarı belirli aralıklarla kaydedilir. Bu sırada denatüre olmaya başlayan çift zincirli DNA'ya bağlı bulunan Syber Green I serbest kalmakta ve ışıma miktarı azalmaya başlamaktadır. Çizilen bu erime eğrisinden T_m değeri tespit edilmektedir (Günel, 2007; Kubista ve ark., 2006).

Eşik döngü değeri (threshold cycle = C_t), floresan ışıyım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını ifade eden bir değişkendir. Eşik değer, oluşan üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtmektedir. qRT-PCR tekniğinde aranan DNA miktarı standart kalıp örneklerin C_t değerleriyle karşılaştırılarak ölçülmektedir

Normalizasyon için ise analiz edilecek gen ile birlikte housekeeping bir gen de amplifiye edilmektedir. (Wong ve Medrano, 2005).

2.2.8.1. qRT-PCR Yöntemiyle MN Hücrelerde CD33 Gen İfade Değişimlerinin Saptanması

MN hücrelerinden RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA ürünleri Syber Green I boyası ve primerler ile muamele edildikten sonra qRT-PCR cihazına verilmiştir.

Çizelge 2.1. CD33 ve β -actin primer sekansları

Gene	Primer Sekansları
CD33	5'- TTC CAC AGA ACC CAA CAA CT -3'
	5'- TGC TCT GGT CTC TTG TTT CC -3'
β-Actin (ACTB)	5'- GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG -3'
	5'- AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG -3'

2.2.8.1.1. Total RNA İzolasyonu

Öncelikle MN hücrelerinden RNA izolasyon kit (Bio-Rad) protokolüne göre steril kabinde kontamine olmayacak şekilde RNA izolasyonu yapılmıştır.

RNA izolasyon protokolü;

1. Kitten çıkan RLT tamponu aktifleştirmek için β -merkaptoetanol eklenerek MN hücreleri ile karıştırılmış ve pipetleme yapılmıştır.
2. Kitten çıkan spin kolon içeren mikrosantrifüj tüpüne aktararak 2 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kolon atılarak altta kalan süzüntüden çalışmaya devam edilmiştir.

3. Süzüntü üstüne kitten çıkan RNAaz içermeyen su ile hazırlanan %70'lik etanolden 350 µL eklenmiştir.
4. Kitten çıkan başka bir spin kolon içeren mikrosantrifüj tüpüne aktararak 15 sn 8000 xg'de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonrası alttaki sıvı kısım tüple birlikte atılmıştır. Üstteki kolon başka bir 2 mLlik kitten çıkan toplama tüpüne takılmıştır.
6. 700 µL kitten çıkan RW1 tamponu eklenerek 15 sn 8000xg'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne süzülen sıvı kısım tüp ile birlikte atılmıştır. Kolon yine kitten çıkan başka bir toplama tüpüne takılmıştır.
7. 500 µL RPE tamponu pipetle dikkatlice eklenerek 15 sn 8000 xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı kısım dökülmüştür.
8. Kolon aynı tüpe takılarak RPE tamponundan 500 µL eklenmiştir.
9. 3 dk 20000 xg'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü süzüntüyle birlikte atılmıştır.
10. Kolon yeni bir RNAaz içermeyen toplama tüpüne yerleştirilerek 1 dk en yüksek hızda santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonrası kolon 1.5 mL'lik toplama tüpüne takılmıştır.
12. 30 µL RNAaz içermeyen steril su eklenmiştir.
13. 1 dk oda sıcaklığında beklenmiştir.
14. 8000 xg'de 1 dk santrifüj edilerek RNA'nın mikrosantrifüj tüpünde toplanması sağlanmış ve hemen buza gömülmüştür.

2.2.8.1.2. İzole Edilen RNA'ların Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi ve Miktar Tayini

İzole edilen RNA'lar hazırlanan %1 agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Daha sonra nanodrop cihazıyla miktar tayini yapılmıştır.



Şekil 2.12. Nanodrop cihazı

DNA ve RNA taşıdıkları fosfat grupları nedeniyle negatif yüke sahiptirler. Bu nedenle agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezlerde negatif (Katot) kutuptan pozitif kutba (Anot) doğru göç etmektedirler. Bu göç hızı akıma bağlı olduğu kadar molekül yapısı ve büyüklüğü ile ortamın yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Elektroforez işleminden sonra UV ışık altında görüntüleme yapılmaktadır. 18S ve 28S RNA bantların görülmesi RNA izolasyonunun istenilen şekilde elde edildiğini göstermektedir (Koontz, 2013).

Agaroz Jel Çözeltilerinin Hazırlanması:

- **10X TBE Hazırlanışı:** 81 g Tris base, 41,5 g Borik asit ve 30 ml EDTA 750 ml dH₂O'da çözülmüş ve pH: 8'e ayarlanmıştır.
- **Etidyum bromür (10 mg/ml stok) Hazırlanışı:** 10 mg Etidyum bromür 1ml sdH₂O içinde vortekslenerek çözülmüştür.

Agaroz Jelin Hazırlanması ve RNA'nın Görüntülenmesi

1. 100 ml 1X TBE solüsyonuna 1 gr agaroz eklenerek mikrodalga fırında 330 derecede 4-5 dakika kaynatılmıştır.
2. Karışım soğumadan 3,5 µl ETBr eklenip iyice karıştırıldıktan sonra yatay elektroforez tankına aktarılarak tarak takılmıştır.
3. 30 dk agaroz jelin donması için beklenmiştir.
4. Süre sonunda tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır.
5. Oluşan kuyulara RNA'lardan 5 µl ve yükleme tamponundan 1 µl alınarak yükleme yapılmıştır.
6. 130 voltta 15 dakika yürütülmüştür.
7. RNA'lar UV ışığı altında görüntülenmiştir.

2.2.8.1.3. cDNA Sentezi

MN hücrelerden izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi için iScript RT Supermix (Bio-Rad) kullanılmıştır.

- Her bir numune için 500 ng RNA üzerine kılavuzda belirtilen miktarlar kadar kitten çıkan nükleaz içermeyen su ve RT Supermix eklenerek termal döngü cihazına yerleştirilmiştir.
- Cihaz kılavuzda yazılan 25 °C'de 5 dk, reverse transkripsiyon aşaması için 46 °C'de 20 dk ve inaktivasyon için 95 °C'de 1dk olarak ayarlandı. Süre sonunda oluşan cDNA'lar buza gömülmüştür.

Çizelge 2.2. cDNA sentezinde termal döngü

25 °C’de 5 dk		İnkübasyon
46 °C’de 20 dk		İnkübasyon
95 °C’de 1dk		Reverse transkripsiyonun durdurulması

2.2.8.1.4. qRT-PCR Cihazı ile CD33 Gen Ekspresyon Analizi

Elde edilen cDNA’lardan 20 µL alınarak üzerine 80 µL nükleaz içermeyen su ilave edilmiş ve içinden 2’şer µL alınarak 2 mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Buz içerisinde ilk mikrosantrifüj tüpüne Syber green (Bio-rad) ve CD33 primeri, ikinci mikrosantrifüj tüpüne Syber green (Bio-rad) ve β-aktin (housekeeping) kılavuzda belirtilen miktarlarda eklenerek vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminden sonra hazırlanan örnekler plakalara aktararak qRT-PCR cihazına yerleştirilmiştir. 95°C’de 30 sn, 58 °C’de 30 sn ve 72 °C’de 30 sn 50 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. "SYBR Green" floresans boyası ile primerlerin optimize edildiği sıcaklık olan 58°C’de kantitasyon (qRT-PCR) yapılmıştır.

qRT-PCR sonuçları housekeeping gen olarak seçilen β-aktin ile normalize edilerek genlerin artış, azalış oranları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (hedef gen-referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.9. ROC (reciever operator characteristics curve) analizi

ROC analizi istatistiksel yöntemde, belirli bir tanım aralığında sürekli değerler alan bir değişkenin tanı testi olarak kullanımı amaçlanmaktadır. Değişkeninin tanı değerinin gücü (hasta ve sağlamı ayırt edebilme gücü) ROC eğrisinin altında kalan

alan ile ifade edilmektedir. Alan değeri 1'e yaklaştıkça tanı değeri yükselmektedir. % 100 'lük tanı gücünde alan değeri 1'e eşit olmaktadır.

Çalışmamızda TSA değerleri ve CD33 pozitif monosit düzeyi için ROC analizi yapılmıştır.

2.2.10. İstatistiksel Analiz

Sürekli sayısal değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk testiyle varyansların homojenliği ise Levene testiyle araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler; sürekli sayısal değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterilirken kategorik değişkenler olgu sayısı ve (%) şeklinde ifade edildi.

Gruplar arasında ortalama değerler yönünden farkın önemliliği Student's t testi ile incelenirken parametrik test istatistiği varsayımlarının sağlanmadığı sürekli sayısal değişkenler yönünden farkın önemliliği Mann Whitney U testiyle değerlendirildi. 2x2'lik çapraz tablolarda beklenen frekansın 5'in altında olduğu durumunda Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi, 5-25 arasında olması halinde ise süreklilik düzeltmeli Ki-Kare testi kullanılarak kategorik veriler değerlendirildi.

Sürekli sayısal değişkenlerin birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olup olmadığı ise Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testiyle araştırıldı. Alzheimer grubunun CD33 geni CT değerleri ortalaması ile referans değer arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı tek örneklem t-testi ile değerlendirildi.

Kontrol ve Alzheimer gruplarını ayırt etmede klinik ölçümlerin (TSA ve akım sitometri) istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olup olmadığı ROC eğrisi altında kalan alan ve %95 güven aralıkları hesaplanarak değerlendirildi. Eğri altında kalan alanın önemli bulunması durumunda, Youden indeks kullanılarak söz konusu

klirik ölçüme ilişkin duyarlılık ve seçicilik düzeyleri toplamının maksimuma ulaştığı değer en iyi kesim noktası olarak kabul edildi. Daha sonra en iyi kesim noktasındaki duyarlılık, seçicilik, pozitif ve negatif tahmini değerler ile tanısai doğruluk oranları tespit edildi.

Biyolojik etkenler ve diğer etki karıştırıcı faktörlere göre düzeltme yapıldığında klinik ölçümlerin Alzheimer üzerinde belirleyici olup olmadığı çoklu değişkenli (multiple) lojistik regresyon analizleri ile araştırıldı. Yaş ve cinsiyet gibi biyolojik etkenlerin yanı sıra tek değişkenli istatistiksel analizler sonucunda $p<0,25$ olarak saptanan ve Alzheimer üzerinde etkili olabileceği düşünülen öğrenim süresi ve sigara öyküsü aday risk faktörleri olarak çoklu değişkenli lojistik regresyon modellerine dahil edildi. Ayrıca, geriye dönük adımsal elemeli lojistik regresyon analizleri kullanılarak kontrol ve Alzheimer gruplarını ayırt etmede en fazla belirleyici olan faktör(ler) tespit edildi. Lojistik regresyon modellerinde her bir değişkene ait odds oranı, %95 güven aralığı ve Wald istatistikleri hesaplandı.

Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) paket programında yapıldı. Aksi belirtilmedikçe $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ancak olası tüm çoklu karşılaştırmalarda Tip I hatayı kontrol edebilmek için Bonferroni Düzeltmesi yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

Çalışmaya katılan 24 Alzheimer hastası ve 38 sağlıklı gönüllü ile ilgili yaş, cinsiyet, eğitim düzeyleri, sigara/çay/kahve alışkanlıkları, hipertansiyon ve diyabet rahatsızlığı olan bireylerin dağılımları Çizelge 3.1 ve 3.2’de gösterildi.

İstatiksel olarak kronik rahatsızlıklar hipertansiyon, diyabet ve diğerleri (Guatr, kolesterol, astım, KOAH, vertigo, hipotansiyon, romatizma) olarak değerlendirilirken, eğitim düzeyleri öğrenim süresine göre 8 yıldan uzun ve 8 yıl ve altında olarak, sigara/çay/kahve alışkanlıkları ise içiyor ve içmiyor şeklinde ayrıldı.

Çizelge 3.1. Kontrol grubu bireylerin özellikler

Kontrol Grubu	Yaş	Cinsiyet	Sigara	Kahve	Çay	Hipertansiyon	Diyabet	Eğitim
K1	65	K	1	1	0	0	0	2
K2	67	K	0	1	1	1	0	2
K3	78	E	2	1	1	1	1	1
K4	67	E	1	1	1	1	1	1
K5	72	K	2	0	0	0	0	2
K6	65	K	0	1	1	1	0	2
K7	67	E	2	0	1	0	0	1
K8	65	K	0	1	1	1	0	1
K9	66	E	2	1	1	0	0	2
K10	65	K	0	1	1	1	0	1
K11	69	K	0	1	1	1	1	1
K12	70	E	1	1	1	0	0	1
K13	79	K	0	0	1	1	1	1
K14	65	K	2	1	1	0	0	2
K15	75	K	0	0	1	1	0	1
K16	68	E	2	1	1	1	1	1
K17	73	E	2	1	1	1	0	2
K18	65	K	0	1	1	1	1	1
K19	72	E	2	1	1	1	1	2
K20	73	K	0	1	1	1	0	2
K21	75	K	0	1	1	1	0	1
K22	65	E	2	0	1	1	0	1
K23	73	E	2	1	1	1	0	1
K24	83	E	2	0	1	1	0	1
K25	76	E	2	1	1	1	1	1
K26	74	E	2	1	1	1	0	2
K27	75	E	2	0	1	1	0	1
K28	74	E	2	1	1	1	0	1
K29	67	E	2	1	0	1	1	2
K30	67	E	2	1	0	1	0	2
K31	65	E	0	1	1	1	0	2
K32	64	K	1	1	1	1	0	2
K33	75	K	0	1	1	1	0	1
K34	65	K	0	1	1	1	1	1
K35	73	K	2	1	1	0	0	1
K36	75	K	0	1	1	0	0	1
K37	81	K	0	1	1	0	1	1
K38	66	K	1	1	1	0	0	1

(Sigara= 0:Hiç içmeyen, 1:İçen, 2:İçmiş bırakmış; Çay/Kahve alışkanlığı= 0:içmeyen, 1:İçen; Hipertansiyon/Diyabet= 0:Yok, 1:Var; Eğitim Düzeyi= 1:8 yıldan az; 2: 8 yıl ve daha fazla)

Çizelge 3.2. Hasta grubu bireylerin özellikleri

Alzheimer Hasta Grubu	Yaş	Cinsiyet	Sigara	Kahve	Çay	Hipertansiyon	Diyabet	Eğitim
A1	72	K	0	1	1	1	0	1
A2	82	E	0	0	0	0	0	2
A3	75	E	0	1	1	1	1	2
A4	87	K	0	1	1	0	1	1
A5	82	K	0	1	1	1	0	2
A6	87	E	0	0	1	1	1	2
A7	91	K	0	1	1	1	0	1
A8	82	K	0	1	1	1	0	2
A9	71	K	0	1	1	0	0	2
A10	85	K	0	0	1	1	0	2
A11	84	K	2	0	1	1	0	1
A12	75	K	2	1	1	0	1	1
A13	68	K	0	1	1	0	0	2
A14	85	K	0	0	1	1	0	1
A15	88	K	0	1	1	1	0	2
A16	88	E	2	1	1	1	0	2
A17	94	E	2	1	1	1	0	2
A18	88	K	0	1	1	1	1	1
A19	81	K	0	0	1	0	0	2
A20	91	K	0	0	1	1	0	1
A21	100	K	0	1	1	1	0	1
A22	73	K	0	1	1	1	1	1
A23	66	K	0	1	1	1	0	2
A24	65	E	2	1	1	0	0	2

(Sigara= 0:Hiç içmeyen, 1:İçen, 2:İçmiş bırakmış; Çay/Kahve alışkanlığı= 0:içmeyen, 1:İçen; Hipertansiyon/Diyabet= 0:Yok, 1:Var; Eğitim Düzeyi= 1:8 yıldan az; 2: 8 yıl ve daha fazla)

Yaş

Alzheimer hasta grubunda yaş ortalaması 81.67 ± 9.2 , kontrol grubunda ise ortalama 70.5 ± 5.21 'dir.

Kontrol grubuna göre Alzheimer grubunun yaş ortalaması istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olup ($p < 0,001$), yaş ilerledikçe Alzheimer olma ihtimali istatistiksel anlamlı olarak arttığı gösterildi [Odds oranı=1,222 (%95 Güven Aralığı: 1,108-1,348)].

Çizelge 3.3. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu yaş ortalamaları

	Kontrol (n=38)	Vaka (n=24)	p-değeri	OO (%95 GA)
Yaş (yıl)	$70,5 \pm 5,2$	$81,7 \pm 9,2$	$<0,001^\dagger$	1,222 (1,108-1,348)

OO: Odds Oranı, GA: Güven Aralığı, † Student's t testi

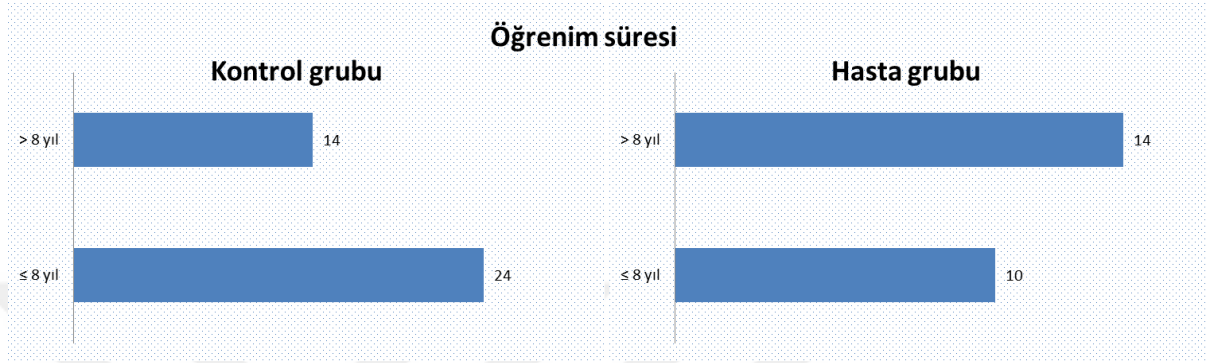
Kontrol grubuna göre Alzheimer grubunda 70 yaş üstü olguların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olup ($p=0,004$), 70 yaş ve altındaki olgulara göre 70 yaş üstü olgularda Alzheimer görülme ihtimali istatistiksel anlamlı olarak 7,778 kat (%95 Güven Aralığı: 1,982-30,519) artmaktadır.

Cinsiyet

Erkeklerle göre kadınlarda Alzheimer görülme ihtimali 2.7 kat (%95 Güven Aralığı: 0,879-8,293) arttığı, Alzheimer ve kontrol grupları arasında kadın ve erkeklerin dağılımının ise istatistiksel olarak benzer olduğu bulundu ($p=0,135$).

Öğrenim durumu

Kontrol ve Alzheimer hasta grubu bireyler öğrenim sürelerine göre 8 yıldan uzun ve 8 yıl ve altında şeklinde ayrıldığında 8 yıl ve daha kısa süre öğrenim görmüş olmanın Alzheimer yatkınlığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi saptanmadı ($p=0,163$).

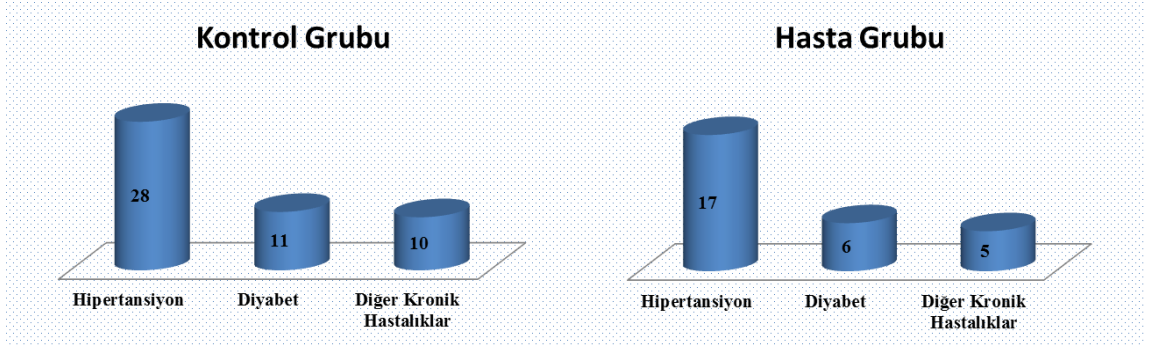


Şekil 3.1. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu öğrenim süreleri bakımından birey sayıları

Hipertansiyon ve Diyabet öyküsü

Kontrol ve Alzheimer hasta grubu katılımcılarda hipertansiyonlu birey sayısı sırasıyla 28 ve 17'dir. Diyabetli birey sayıları ise sırasıyla 11 ve 6'dır. Kontrol grubunda diyabetli hastaların hepsi aynı zamanda hipertansiyon hastasıdır. Gruplardaki bireyler birden fazla kronik hastalığa sahiptir. Hipertansiyon ve diyabet dışındaki diğer kronik hastalıklar guatr, kolesterol, KOAH, hipotansiyon, tiroid, vertigo, gut, astım, hipotiroid, prostat ve romatizmadır.

Hipertansiyon ve diyabet öyküsü ile hastalık yatkınlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik tespit edilmedi ($p>0,05$).

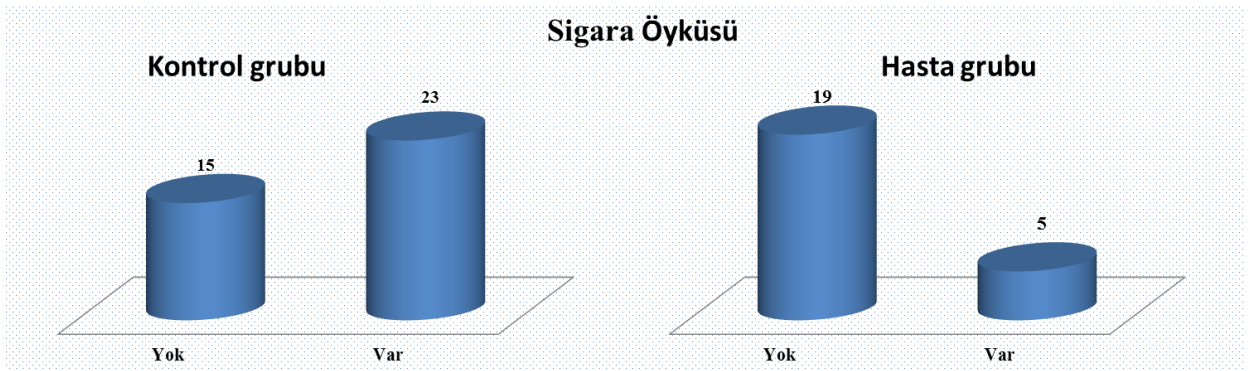


Şekil 3.2. Kontrol ve hasta gruplarında kronik rahatsızlığı bulunan birey sayıları

Sigara öyküsü

Çalışmamıza katılan bireylerin sigara kullanımları değerlendirildi. Sigara içmeyi bırakmış veya hala içmeye devam eden yani sigara öyküsü bulunan birey sayıları kontrol ve hasta gruplarında sırasıyla toplam 23 ve 5'tir. Hiç sigara kullanmayan birey sayıları ise kontrol ve hasta gruplarında sırasıyla 15 ve 19'dur.

Kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunda sigara öyküsüne sahip olanların oranı istatistiksel anlamı olarak daha düşük olup ($p=0,005$), sigara öyküsü ile Alzheimer olma ihtimali arasında istatistiksel olarak anlamlı ve ters yönlü bir birliktelik görüldü [Odds oranı=0,172 (%95 Güven Aralığı: 0,053-0,559)].



Şekil 3.3. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu sigara öyküsü birey sayıları

Çay ve Kahve öyküsü

Çay ve kahve içme alışkanlıkları ile hastalık yatkınlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik tespit edilmedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.4. Grupların demografik özellikleri ve öyküleri yönünden dağılımları

	Kontrol (n=38)	Hasta (n=24)	p-değeri	OO (%95 GA)
Yaş (yıl)	70,5±5,2	81,7±9,2	<0,001†	1,222 (1,108-1,348)
Yaş grupları				
≤ 70 yıl	20 (%52,6)	3 (%12,5)	-	1,000
> 70 yıl	18 (%47,4)	21 (%87,5)	0,004‡	7,778 (1,982-30,519)
Cinsiyet				
Erkek	18 (%47,4)	6 (%25,0)	-	1,000
Kadın	20 (%52,6)	18 (%75,0)	0,135‡	2,700 (0,879-8,293)
Öğrenim süresi				
> 8 yıl	14 (%36,8)	14 (%58,3)	-	1,000
≤ 8 yıl	24 (%63,2)	10 (%41,7)	0,163‡	0,417 (0,146-1,185)
HT öyküsü				
Yok	10 (%26,3)	7 (%29,2)	-	1,000
Var	28 (%73,7)	17 (%70,8)	>0,999‡	0,867 (0,278-2,708)
DM öyküsü				
Yok	27 (%71,1)	18 (%75,0)	-	1,000
Var	11 (%28,9)	6 (%25,0)	0,962‡	0,818 (0,257-2,609)
Sigara öyküsü				
Yok	15 (%39,5)	19 (%79,2)	-	1,000
Var	23 (%60,5)	5 (%20,8)	0,005‡	0,172 (0,053-0,559)
Kahve öyküsü				
İçmeyen	7 (%18,4)	7 (%29,2)	-	1,000
İçen	31 (%81,6)	17 (%70,8)	0,500‡	0,548 (0,165-1,826)
Çay öyküsü				
İçmeyen	4 (%10,5)	1 (%4,2)	-	1,000
İçen	34 (%89,5)	23 (%95,8)	0,640¶	2,706 (0,284-25,783)

OO: Odds Oranı, GA: Güven Aralığı, † Student's t testi, ‡ Süreklilik düzeltmeli Ki-Kare testi, ¶ Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi, Odds oranının 1,000 olarak belirtildiği satırlar; referans kategorileri ifade etmektedir.

3.2. Plazma TSA Analizi Bulguları

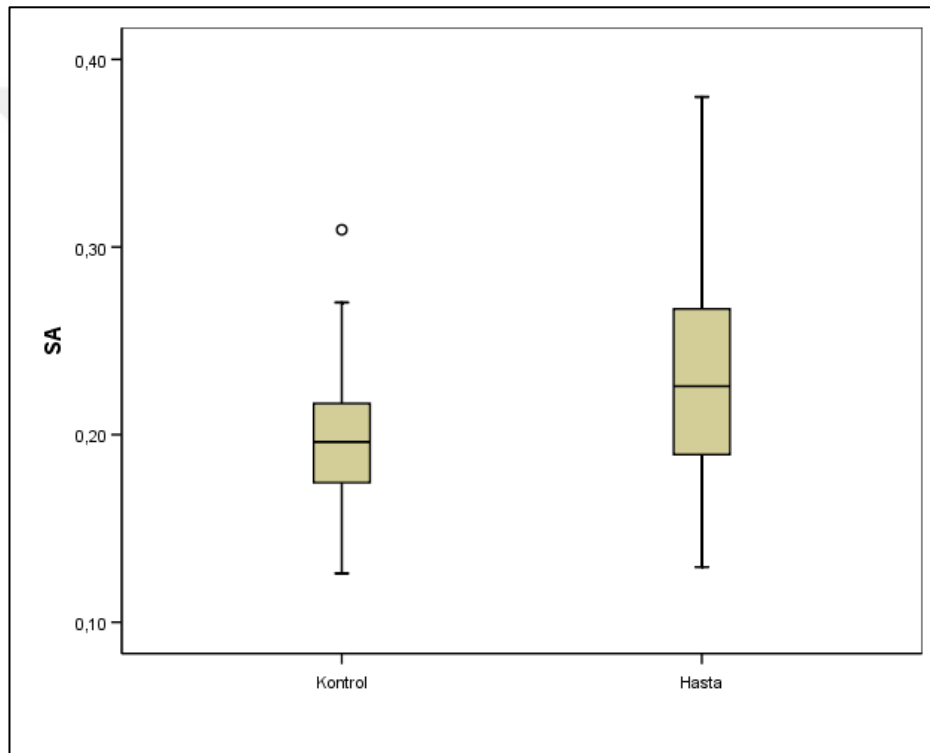
Plazma TSA analizi Sydow metoduna göre yapıldı. Hasta grubunun plazma TSA düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulundu

($p=0,023$). TSA düzeyindeki her 0.01 birimlik artış Alzheimer görülme ihtimali istatistiksel anlamlı olarak 1,155 kat (%95 Güven Aralığı: 1,022-1,305) artırmaktadır (Çizelge 3. 5.).

Çizelge 3.5. Kontrol ve Hasta Plazma TSA medyan değerleri

	Kontrol	Hasta	p-değeri	OO (%95 GA)
TSA	0,196±0,05	0,225±0,08*	0,023	1,155 (1,022-1,305)

*Kontrole göre anlamlı ($p < 0.050$). OO: Odds Oranı, GA: Güven Aralığı



Şekil 3.4. Kontrol ve hasta bireylerin plazma total SA düzeyleri

Çizelge 3.6. Kontrol (K) ve Alzheimer hasta grubu (A) bireylerin TSA konsantrasyonları (mg/mL)

	Kons. (mg/mL)
K1	0,197
K2	0,165
K3	0,146
K4	0,200
K5	0,212
K6	0,154
K7	0,178
K8	0,215
K9	0,221
K10	0,226
K11	0,244
K12	0,147
K13	0,210
K14	0,187
K15	0,227
K16	0,188
K17	0,177
K18	0,242
K19	0,169
K20	0,188
K21	0,174
K22	0,192
K23	0,152
K24	0,178
K25	0,151
K26	0,138
K27	0,126
K28	0,309
K29	0,215
K30	0,202
K31	0,208
K32	0,196
K33	0,217
K34	0,227
K35	0,205
K36	0,270
K37	0,235
K38	0,192

	Kons. (mg/mL)
A1	0,291
A2	0,169
A3	0,141
A4	0,191
A5	0,236
A6	0,241
A7	0,228
A8	0,380
A9	0,257
A10	0,236
A11	0,334
A12	0,209
A13	0,288
A14	0,215
A15	0,146
A16	0,129
A17	0,223
A18	0,277
A19	0,187
A20	0,277
A21	0,204
A22	0,233
A23	0,223
A24	0,172

Yaş, cinsiyet, öğrenim süresi, sigara, çay ve kahve öyküsüne göre düzeltme yapıldığında ise TSA düzeyindeki her 0.01 birimlik artış AH görülme ihtimalini istatistiksel anlamlı olarak 1,249 kat (%95 Güven Aralığı: 1,002-1,556) artırmaktadır (p=0,048) (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. Biyolojik etkenlere ve diğer etki karıştırıcı faktörlere göre düzeltme yapıldığında çoklu değişkenli lojistik regresyon analizi ile TSA ölçümlerin AH yatkınlığı üzerine etkilerinin incelenmesi

	Odds oranı	%95 Güven Aralığı		p-değeri
		Alt sınır	Üst sınır	
Yaş	1,292	1,117	1,493	<0,001
Kadın faktör	1,232	0,127	11,941	0,857
Eğitim süresi ≤8 yıl	0,048	0,005	0,459	0,008
Sigara öyküsü	0,273	0,033	2,223	0,225
TSA †	1,249	1,002	1,556	0,048

Gruplara ve olguların demografik özelliklerine göre TSA düzeyi yönünden yapılan karşılaştırmalar

70 yaş ve altı olgularda kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,457). 70 yaş üstü olgularda da kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,049). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde yaşa göre TSA düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi (p=0,361 ve p>0,999) (Çizelge 3. 8.).

Çizelge 3.8. 70 yaş altı ve üstü olgularda TSA ölçümleri

	Kontrol	Hasta	p-değeri †¶
Yaş grupları			
≤ 70 yıl	0,198 (0,03)	0,223 (0,12)	0,457
> 70 yıl	0,183 (0,07)	0,228 (0,08)	0,049
p-değeri †¶	0,361	>0,999	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Erkekler içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,820). Kadınlar içerisinde de

kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,028$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grupları içerisinde erkeklere göre kadınların TSA düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,008$ ve $p=0,018$) (Çizelge 3. 9.).

Çizelge 3.9. Cinsiyete göre TSA ölçümleri

Cinsiyet	Kontrol	Hasta	p-değeri
Erkek	0,178 (0,05)	0,170 (0,09)	0,820
Kadın	0,211 (0,04)	0,234 (0,07)	0,028
p-değeri	0,008	0,018	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

8 yıl ve daha kısa öğrenim görmüş olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunun TSA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,023$). 8 yıldan uzun süre öğrenim gören olgular içerisinde ise kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,194$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde öğrenim süresine göre TSA düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,260$ ve $p=0,259$) (Çizelge 3. 10.).

Çizelge 3.10. Öğrenim süresine göre TSA ölçümleri

Öğrenim süresi	Kontrol	Hasta	p-değeri
$\leq 8 \text{ yıl}$	0,202 (0,05)	0,230 (0,07)	0,023
$> 8 \text{ yıl}$	0,192 (0,04)	0,223 (0,08)	0,194
p-değeri	0,260	0,259	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Hipertansiyon öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,813$). Hipertansiyon öyküsü olan olgularda ise kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunun TSA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,010$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grupları içerisinde hipertansiyon öyküsünün TSA düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değiştirici bir etkisi yoktur ($p=0,462$ ve $p=0,288$) (Çizelge 3. 11.).

Çizelge 3.11. Hipertansiyon öyküsüne göre TSA ölçümleri

Hipertansiyon öyküsü	Kontrol	Hasta	p-değeri
<i>Yok</i>	0,201 (0,04)	0,191 (0,09)	0,813
<i>Var</i>	0,194 (0,05)	0,233 (0,07)	0,010
<i>p-değeri</i>	0,462	0,288	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Diyabet öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunun TSA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,023$). Diyabet öyküsü olan olgular içerisinde ise kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,733$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde DM öyküsünün TSA düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değiştirici bir etkisi yoktur ($p=0,356$ ve $p=0,673$) (Çizelge 3. 12.).

Çizelge 3.12. Diyabet öyküsüne göre TSA ölçümleri

Diyabet Öyküsü	Kontrol	Hasta	p-değeri
<i>Yok</i>	0,192 (0,04)	0,225 (0,10)	0,023
<i>Var</i>	0,210 (0,07)	0,221 (0,07)	0,733
<i>p-değeri</i>	0,356	0,673	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Sigara öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,271$). Sigara öyküsü olan olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,413$). Kontrol grubu içerisinde sigara öyküsü olmayanlara göre sigara öyküsü olanlarda TSA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktür ($p=0,006$). Alzheimer hasta grubu içerisinde ise sigara öyküsünün TSA düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değiştirici bir etkisi yoktur ($p=0,367$) (Çizelge 3. 13.).

Çizelge 3.13. Sigara öyküsüne göre TSA ölçümleri

Sigara öyküsü	Kontrol	Hasta	p-değeri
<i>Yok</i>	0,217 (0,05)	0,233 (0,09)	0,271
<i>Var</i>	0,188 (0,05)	0,209 (0,13)	0,413
p-değeri	0,006	0,367	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Kahve içmeyen olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,097$). Kahve içen olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında TSA düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,106$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grupları içerisinde kahve içme alışkanlığının TSA düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değiştirici bir etkisi yoktur ($p=0,740$ ve $p=0,664$) (Çizelge 3. 14.).

Çizelge 3.14. Kahve öyküsüne göre TSA ölçümleri

Kahve öyküsü	Kontrol	Hasta	p-değeri
<i>İçmeyen</i>	0,192 (0,03)	0,236 (0,09)	0,097
<i>İçen</i>	0,197 (0,05)	0,223 (0,09)	0,106
p-değeri	0,740	0,664	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Çay içen olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunda TSA düzeyleri istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,014$). Kontrol grubu içerisinde çay içme alışkanlığının TSA düzeyleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değiştirici bir etkisi yoktur ($p=0,420$) (Çizelge 3. 15.).

Çizelge 3.15. Çay öyküsüne göre TSA ölçümleri

Çay öyküsü	Kontrol	Hasta	p-değeri †¶
<i>İçmeyen</i>	0,207 (0,02)	-	-
<i>İçen</i>	0,192 (0,05)	0,228 (0,09)	0,014
p-değeri †¶	0,420	-	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Alzheimer hasta grubu klinik ölçümlerinin birbirleri arasında korelasyon olup olmadığı değerlendirildi. TSA ile sırasıyla; MN hücre sayısı, CD33 pozitif monosit hücreler, RNA miktarı ve CD33 gen frekansı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gözlenmedi ($p>0,05$) (Çizelge 3. 16.).

Çizelge 3.16. TSA değerlerinin diğer bulgularla korelasyonu

TSA	MN hücre sayısı	CD33 pozitif monosit hücreler	RNA miktarı	CD33 Gen frekansı
<i>Korelasyon katsayısı</i>	0,258	0,002	0,165	-0,144
<i>p-değeri†</i>	0,223	0,992	0,440	0,502

† Spearman'ın sıra sayıları korelasyon testi.

3.3. MN hücre sayısı

Kontrol grubu ile Alzheimer hasta grubu arasında MN hücre sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,817$) (Çizelge 3. 17.).

Çizelge 3.17. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu 1 µL'deki MN hücre sayıları

	Kontrol	Hasta	p-değeri	OO (%95 GA)
MN hücre sayısı	2585 (4743,75)	2870 (3100,0)	0,817	0,999 (0,999-1,000)

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi, OO: Odds Oranı, GA: Güven Aralığı, † Mann Whitney U testi

Yaş, cinsiyet, öğrenim süresi, sigara, çay ve kahve öyküsüne göre düzeltme yapıldığında ise MN hücre sayısının AH yatkınlığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir belirleyiciliği görülmedi ($p=0,940$) (Çizelge 3.18.).

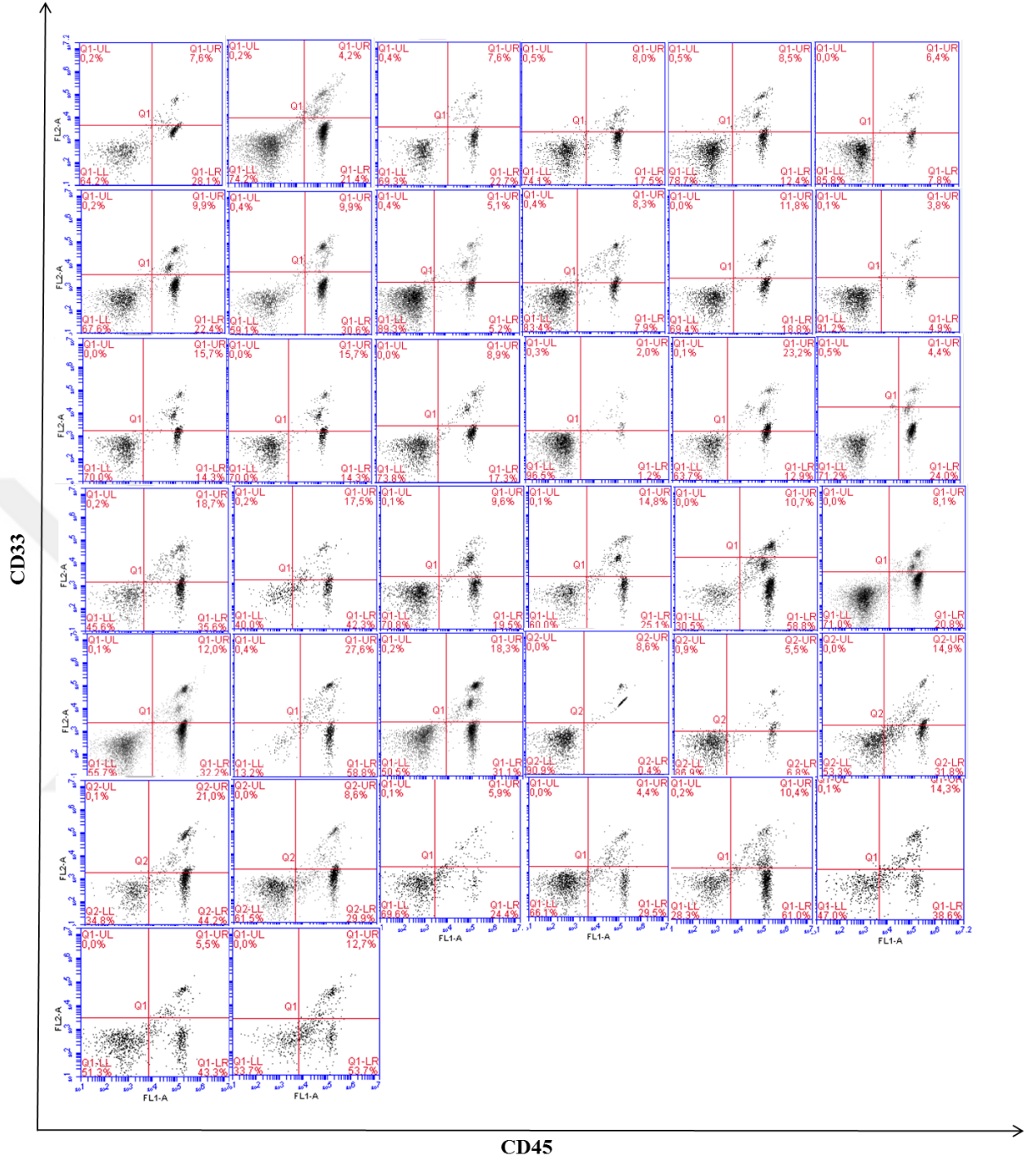
3.4. Akım Sitometri Bulguları

İzole edilen MN hücrelerde ilk olarak monosit popülasyonları FITC anti-human CD45 (BIOLEGEND) ile işaretlendi. Spesifik olmayan boyamalar ise PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) (BIOLEGEND) ile dışlandı. Daha sonra floresan işaretli CD33 pozitif monosit yüzdeleri ölçüldü. Her bir örnek için 3 ölçüm yapıldı ve bu ölçümlerin ortalaması alındı. CD33 pozitif monosit yüzde hücre oranının (CD33 PMHO) hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,061$) (Çizelge 3.19.).

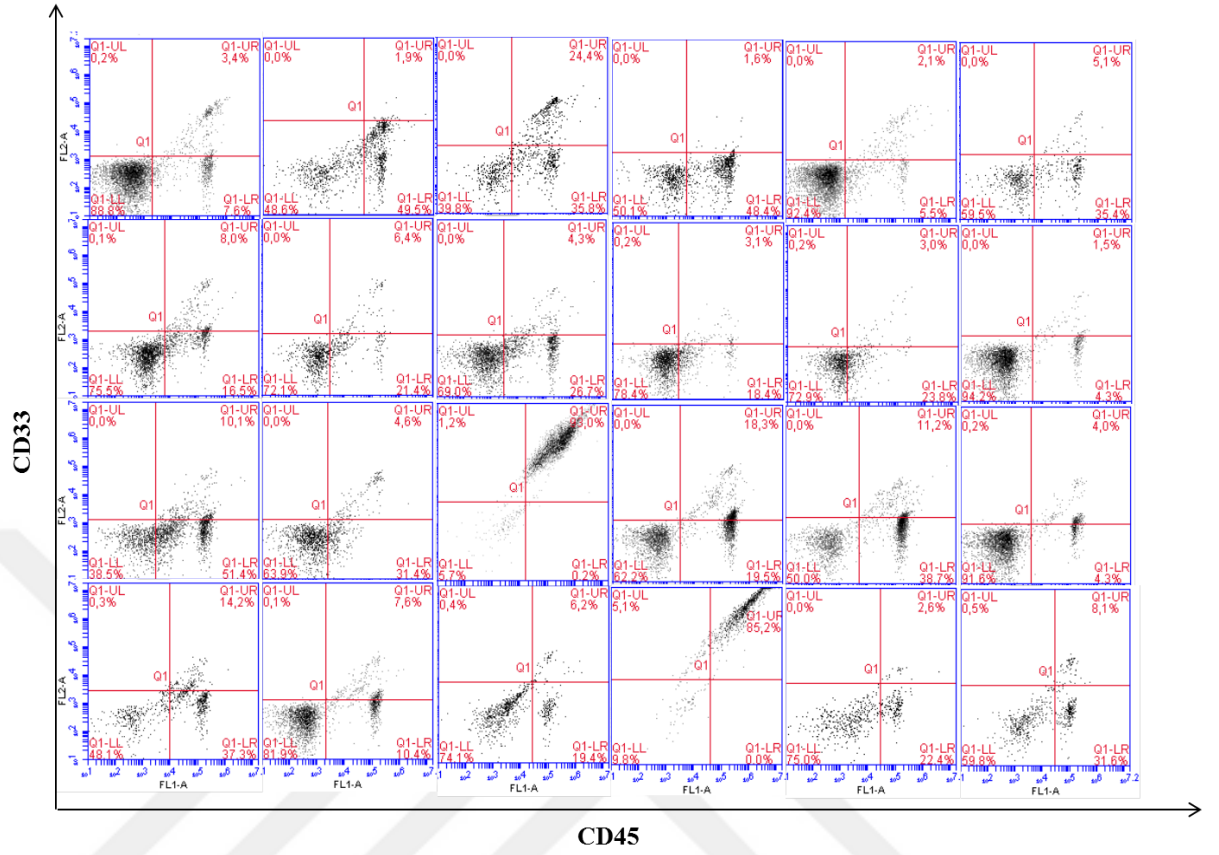
Çizelge 3.18. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu monosit hücrelerde CD33 yüzde değerleri

	Kontrol	Hasta	p-değeri	OO (%95 GA)
CD33 PMHO	%7,89 (6,50)	%5,40 (6,02)	0,061	0,907 (0,806-1,020)

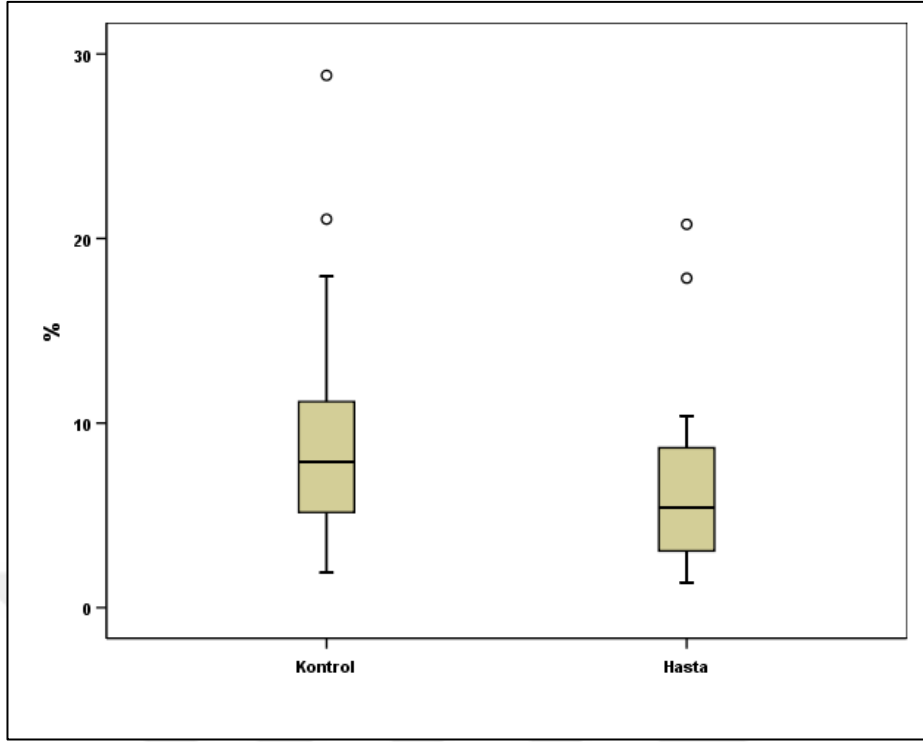
Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi. OO: Odds Oranı, GA: Güven Aralığı



Şekil 3.5. Kontrol grubu akım sitometri sonuçları



Şekil 3.6. Alzheimer hasta grubu akım sitometri sonuçları



Şekil 3.7. Alzheimer hastalarında ve kontrol grubunda ortalama CD33 pozitif monosit hücre düzeyleri ($\pm$ ss)

Yaş, cinsiyet, öğrenim süresi, sigara, çay ve kahve öyküsü sabit tutulduğunda - tek değişkenli istatistiksel analizden farklı olarak- CD33 PMHO sayısındaki artış ile AH yatkınlığı arasında ters yönlü ilişki gözlemlendi [Odds oranı=0,751 (%95 Güven Aralığı: 0,571-0,988) ve $p=0,041$] (Çizelge 3. 20.).

Çizelge 3.19. Biyolojik etkenlere ve diğer etki karıştırıcı faktörlere göre düzeltme yapıldığında çoklu değişkenli lojistik regresyon analizi ile CD33 PMHO ölçümlerin AH yatkınlığı üzerine etkileri

	Odds oranı	%95 Güven Aralığı		p-değeri
		Alt sınır	Üst sınır	
Yaş	1,407	1,129	1,752	0,002
Kadın faktör	0,656	0,058	7,432	0,733
Eğitim süresi ≤ 8 yıl	0,013	0,001	0,316	0,008
Sigara öyküsü	0,282	0,037	2,147	0,222
CD33 PMHO	0,751	0,571	0,988	0,041

Gruplara ve olguların demografik özelliklerine göre CD33 PMHO sonuçları yönünden yapılan karşılaştırmalar

70 yaş ve altı olgularda kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,514$). 70 yaş üstü olgularda da kontrol ve Alzheimer grubu arasında akım sitometri düzeyi yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,066$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grupları içerisinde yaşa göre akım sitometri düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,317$ ve $p>0,999$) (Çizelge 3. 21.).

Çizelge 3.20. Yaşa göre akım sitometri ölçümleri

	Kontrol	Vaka	p-değeri
Yaş grupları			
≤ 70 yıl	7,2 (4,54)	5,4 (8,11)	0,514
> 70 yıl	8,7 (9,00)	5,4 (5,59)	0,066
p-değeri	0,317	$>0,999$	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Erkekler içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,871$). Kadınlar içerisinde de kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında akım sitometri düzeyi yönünden Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,039$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grubu içerisinde cinsiyete göre CD33 PMHO istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,361$ ve $p=0,059$) (Çizelge 3. 22.).

Çizelge 3.21. Cinsiyete göre akım sitometri ölçümleri

Cinsiyet	Kontrol	Hasta	p-değeri
Erkek	8,3 (12,04)	9,4 (14,00)	0,871
Kadın	7,7 (4,92)	4,4 (4,93)	0,039
p-değeri	0,361	0,059	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

8 yıl ve daha az süre öğrenim görmüş olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunun CD33 PMHO istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktür ($p=0,016$). 8 yıldan uzun süre öğrenim görmüş olgular içerisinde ise kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,325$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grubu içerisinde öğrenim sürelerine göre CD33 PMHO’da istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,180$ ve $p=0,082$) (Çizelge 3. 23.).

Çizelge 3.22. Öğrenim süresine göre akım sitometri ölçümleri

Öğrenim süresi	Kontrol	Hasta	p-değeri
$\leq 8 \text{ yıl}$	7,4 (5,25)	4,1 (3,62)	0,016
$> 8 \text{ yıl}$	8,7 (11,5)	8,4 (6,9)	0,325
p-değeri	0,180	0,082	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Hipertansiyon öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,475$). Hipertansiyon öyküsü olan olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,103$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grupları içerisinde hipertansiyon öyküsüne göre CD33 PMHO’da istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,076$ ve $p=0,332$) (Çizelge 3. 24.).

Çizelge 3.23. Hipertansiyon öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri

Hipertansiyon Öyküsü	Kontrol	Hasta	p-değeri
Yok	5,6 (4,90)	5,4 (7,22)	0,475
Var	8,7 (6,94)	5,6 (6,30)	0,103
p-değeri	0,076	0,332	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Diyabet öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,214$). Diyabet öyküsü olan olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,180$). Gerek

kontrol gerekse Alzheimer hasta grupları içerisinde diyabet öyküsüne göre CD33 PMHO'da istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,278$ ve $p=0,493$) (Çizelge 3. 25.).

Çizelge 3.24. Diyabet öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri

Diyabet Öyküsü	Kontrol	Vaka	p-değeri
Yok	7,4 (4,61)	5,4 (5,75)	0,214
Var	9,0 (11,59)	3,6 (13,21)	0,180
p-değeri	0,278	0,493	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Sigara öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,105$). Sigara öyküsü olan olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,684$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer hasta grupları içerisinde sigara öyküsüne göre CD33 PMHO'da istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,883$ ve $p=0,493$) (Çizelge 3. 26.).

Çizelge 3.25. Sigara öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri

Sigara öyküsü	Kontrol	Vaka	p-değeri
Yok	7,9 (5,04)	4,6 (5,69)	0,105
Var	7,3 (8,07)	5,6 (10,72)	0,684
p-değeri	0,883	0,493	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Kahve içmeyen olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,209$). Kahve içen olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer grubu arasında CD33 PMHO istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,137$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde kahve içme alışkanlığına göre CD33 PMHO'da istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,555$ ve $p>0,999$) (Çizelge 3. 27.).

Çizelge 3.26. Kahve öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri

Kahve öyküsü	Kontrol	Vaka	p-değeri
İçmeyen	8,0 (3,09)	5,6 (4,42)	0,209
İçen	7,9 (7,85)	5,4 (7,40)	0,137
p-değeri	0,555	>0,999	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

Çay içen olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer hasta grubu arasında CD33 PMHO yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,123$). Kontrol grubu içerisinde çay içme alışkanlığına göre CD33 PMHO istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p=0,535$) (Çizelge 3. 28).

Çizelge 3.27. Çay öyküsüne göre akım sitometri ölçümleri

Çay öyküsü	Kontrol	Vaka	p-değeri ‡¶
İçmeyen	10,3 (11,93)	-	-
İçen	7,7 (5,22)	5,4 (5,94)	0,123
p-değeri ‡¶	0,535	-	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi.

CD33 PMHO ile TSA, MN hücre sayısı, RNA miktarı, CD33 geni frekansı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gözlenmedi ($p>0,05$) (Çizelge 3. 29.).

Çizelge 3.28. CD33 pozitif monosit hücreler ile diğer bulguların korelasyonu

CD33 PMHO	TSA	MN hücre sayısı	RNA miktarı	CD33 gen frekansı
Korelasyon katsayısı	0,002	-0,292	0,161	0,039
p-değeri ‡	0,992	0,187	0,474	0,863

3.5. RNA Miktar Tayini

Tam kandan Lympoprep ile alınan MN hücre örneklerinden RNA izolasyonu ve ardından nanodrop ile RNA miktar tayini yapıldı. RNA bütünlük ve kalite tayini %1 agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Kontrol grubu ile Alzheimer hasta grubu arasında RNA miktarı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,762$) (Çizelge 3. 30.).

Çizelge 3.29. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu medyan değerleri

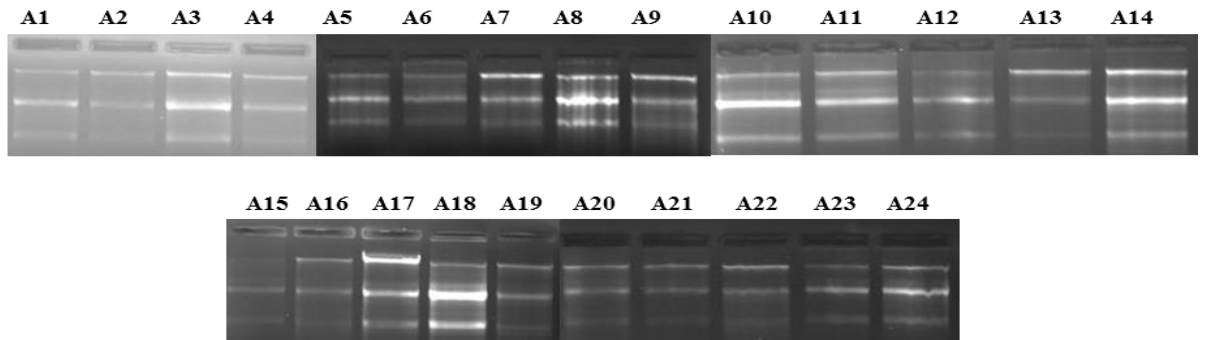
	Kontrol	Hasta	p-değeri	OO (%95 GA)
RNA miktarı	71,85 (89,38)	70,95 (69,55)	0,762	0,998 (0,991-1,006)

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi. OO: Odds Oranı, GA: Güven Aralığı

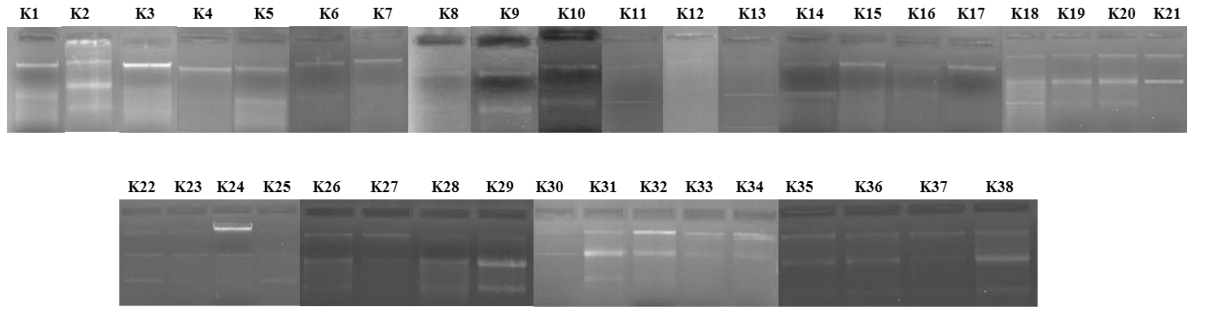
Yaş, cinsiyet, öğrenim süresi, sigara, çay ve kahve öyküsü göre düzeltme yapıldığında RNA miktarının AH yatkınlığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir belirleyiciliği görülmedi (p=0,829) (Çizelge 3.31.).

Çizelge 3.30. Biyolojik etkenlere ve diğer etki karıştırıcı faktörlere göre düzeltme yapıldığında çoklu değişkenli lojistik regresyon analizi ile klinik ölçümlerin AH yatkınlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi

	Odds oranı	%95 Güven Aralığı		Wald	p-değeri
		Alt sınır	Üst sınır		
<i>Yaş</i>	1,273	1,115	1,454	12,688	<0,001
<i>Kadın faktör</i>	3,030	0,370	24,834	1,067	0,302
<i>Eğitim süresi ≤8 yıl</i>	0,091	0,013	0,623	5,971	0,015
<i>Sigara öyküsü</i>	0,335	0,053	2,113	1,354	0,245
<i>RNA miktarı</i>	0,999	0,986	1,012	0,047	0,829



Şekil 3.8. %1 Agaroz jelde yürütülen Alzheimer Hasta grubunun total RNA görüntüleri



Şekil 3.9. %1 Agaroz jelde yürütülen Kontrol grubunun total RNA görüntüleri

	OD260/280	RNA miktarı (ng/μL)		OD260/280	RNA miktarı (ng/μL)
K1	2.075	107,30	A1	2.065	63,40
K2	2.030	158,10	A2	2.170	38,20
K3	1.980	76,50	A3	2.170	149,90
K4	2.020	24,10	A4	2.150	70,60
K5	2.060	182,00	A5	2.080	66,80
K6	2.110	50,10	A6	2.120	57,70
K7	1.970	62,40	A7	2.075	59,30
K8	1.955	44,50	A8	2.030	144,40
K9	1.985	53,60	A9	2.040	43,70
K10	2.230	13,30	A10	1.980	100,50
K11	1.480	34,70	A11	2.035	85,70
K12	0.960	88,40	A12	2.070	72,00
K13	1.485	57,00	A13	1.885	80,90
K14	2.370	50,40	A14	1.930	127,30
K15	2.085	113,50	A15	1.980	38,60
K16	2.045	32,20	A16	1.905	57,60
K17	2.245	27,80	A17	1.910	179,70
K18	2.350	245,80	A18	1.960	310,00
K19	1.990	108,20	A19	1.935	71,30
K20	1.920	127,80	A20	2.125	52,20
K21	1.700	16,40	A21	1.990	52,00
K22	2.090	118,10	A22	2.150	55,10
K23	2.160	85,30	A23	2.070	119,20
K24	2.110	63,30	A24	2.065	131,90
K25	2.170	158,40			
K26	2.045	204,60			
K27	2.085	128,00			
K28	2.065	228,40			
K29	2.030	297,60			
K30	2.075	32,20			
K31	1.995	228,90			
K32	1.875	61,70			
K33	1.820	32,80			
K34	1.945	46,70			
K35	2.145	67,20			
K36	2.095	80,92			
K37	2.135	48,40			
K38	2.095	233,60			

Şekil 3.10. Grupların RNA OD260/280 değerleri ve RNA miktarları

3.6. qRT-PCR Bulguları

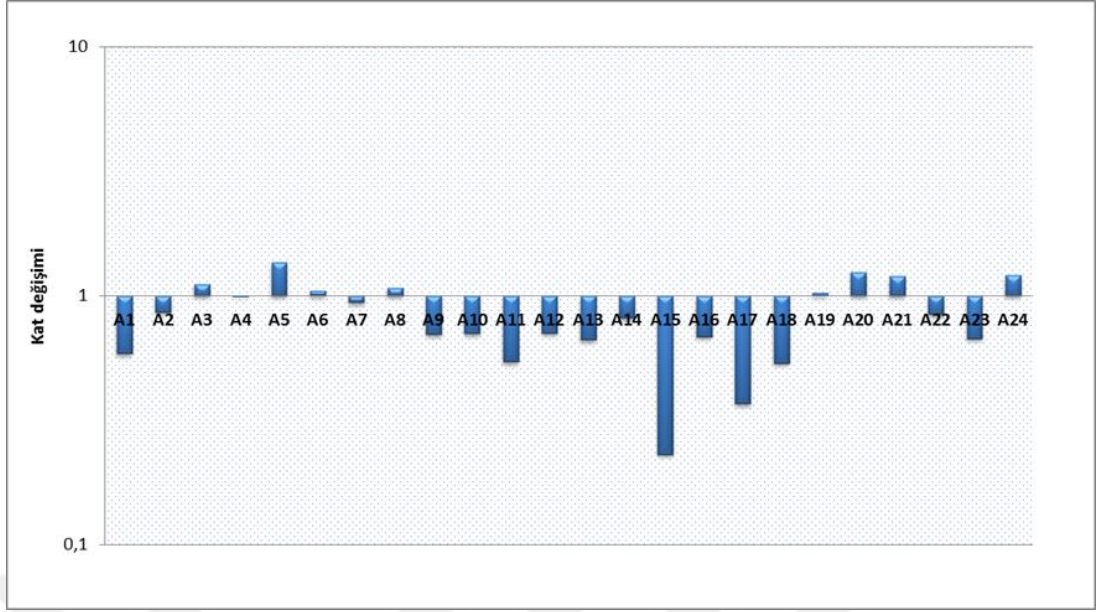
qRT-PCR ürünü SYBR Green I ile bağlanarak floresan ışığa meydana gelmektedir. Eşik değerinin üzerinde anlamlı floresan artışı gözlenen ilk döngü sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. RNA izolasyonu yapılan her bir örnekten 500 ng alınarak cDNA sentezi yapıldı. Daha sonra qRT-PCR analizi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen bu tekrarların ortalaması alınıp $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (hedef gen-referans gen) formülünden hesaplanarak kat değişimleri hesaplandı.

qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen Ct (Cp) değerleri kullanılarak hesaplanan CD33 geni ifade seviyesinin $0,837 \pm 0,289$ olup 0,163 kat (%95 Güven Aralığı: -0,285 – -0,041) daha düşük olduğu tespit edildi. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,011$) (Çizelge 3. 32.).

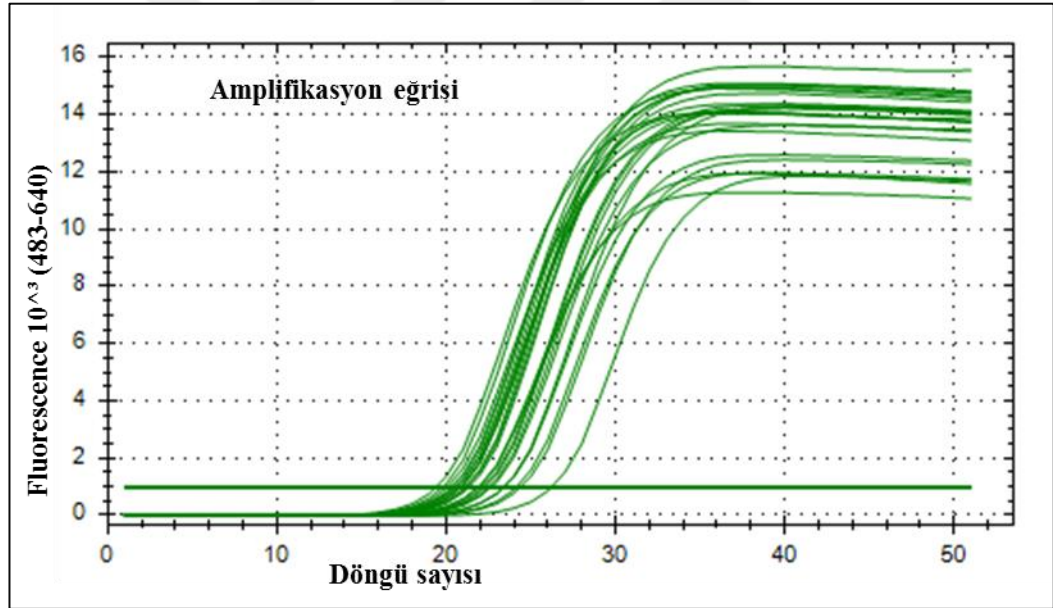
Çizelge 3.31. Alzheimer hasta grubuna ilişkin CD33 gen değişimi

	İstatistikler
CD 33 Gen değişimi	$0,837 \pm 0,289$
Referans ortalama	1,000
Ortalama fark	-0,163
%95 Güven aralığı	-0,285 – -0,041
p-değeri †	0,011

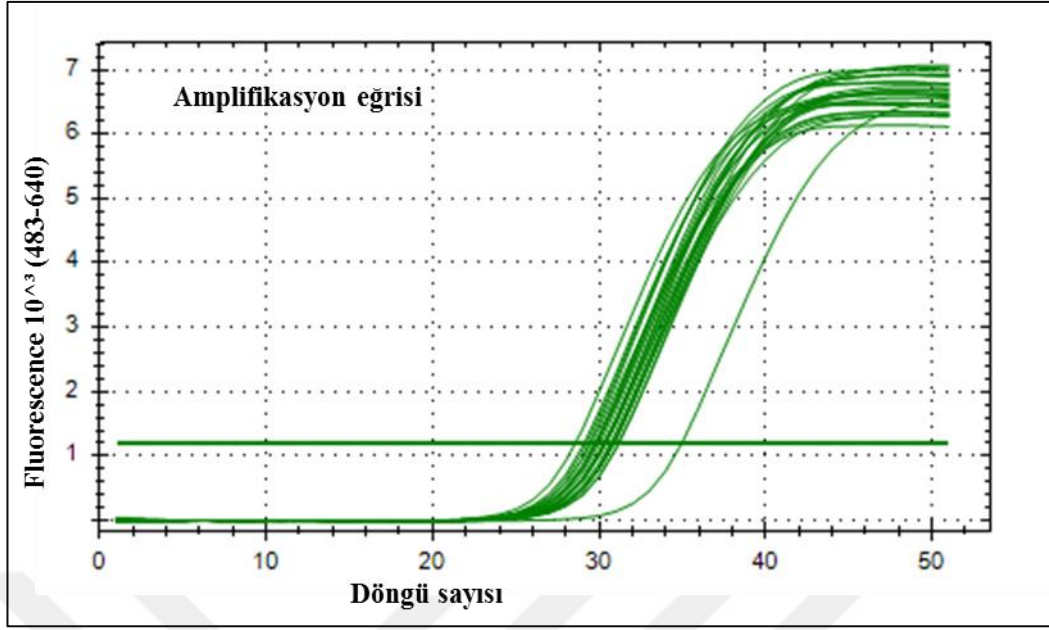
† Tek örneklem t-testi.



Şekil 3.11. CD33 gen ifadelerindeki değişim grafiği

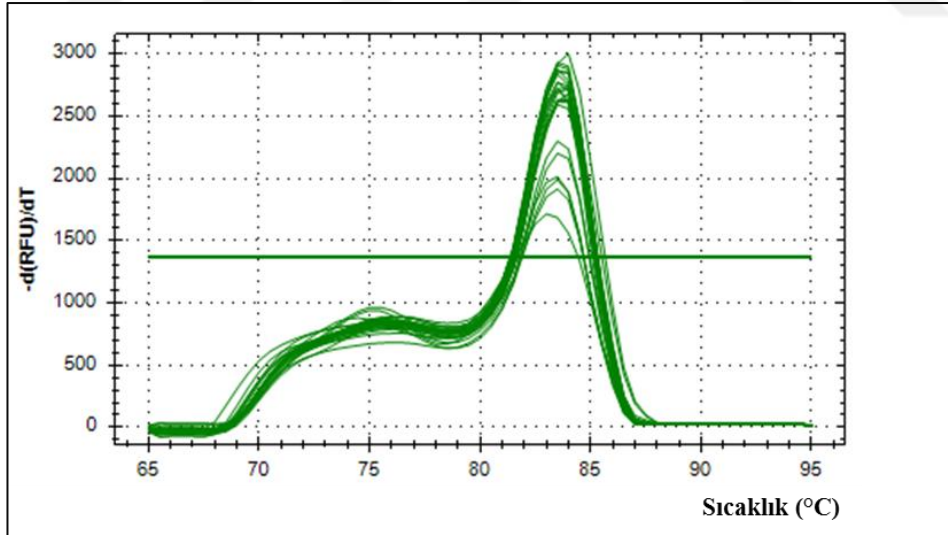


Şekil 3.12. β -Aktin amplifikasyon eğrisi grafiği

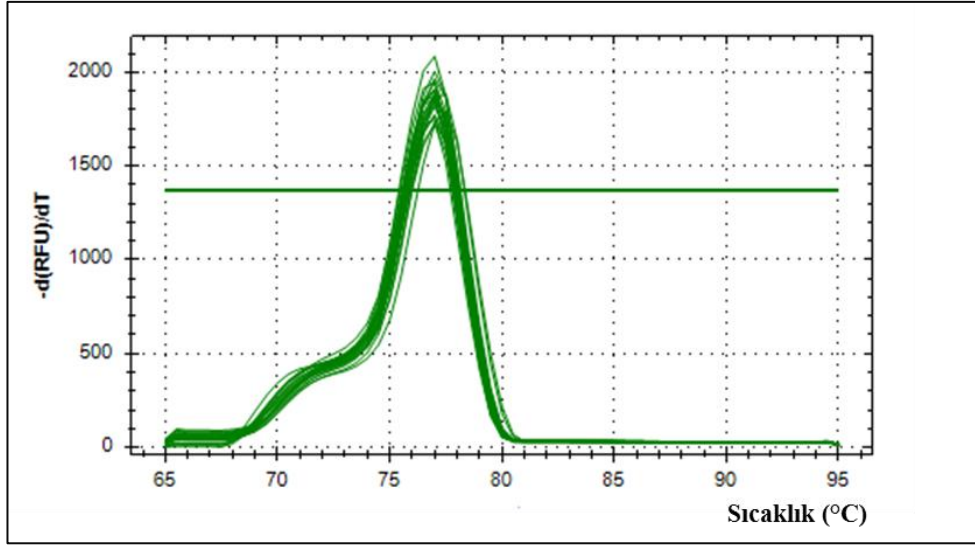


Şekil 3.13. CD33 amplifikasyon eğrisi grafiği

Çoğaltılan bölgenin hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.14. β -Aktin erime eğrisi



Şekil 3.15. CD33 erime eğrisi

Çizelge 3.32. CD33 gen ifadelerindeki değişim

CD33 geni Ct değerleri	
A1	0,58
A2	0,86
A3	1,11
A4	0,99
A5	1,36
A6	1,05
A7	0,94
A8	1,08
A9	0,70
A10	0,70
A11	0,54
A12	0,71
A13	0,66
A14	0,81
A15	0,23
A16	0,68
A17	0,37
A18	0,53
A19	1,03
A20	1,24
A21	1,20
A22	0,84
A23	0,67
A24	1,21

CD33 gen ifadelerindeki değişim cinsiyete, öğrenim süresine, hipertansiyon, diyabet, sigara, çay ve kahve öyküsüne göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği gözlemlendi ($p>0,05$) (Çizelge 3.34.).

Çizelge 3.33. Demografik özelliklere göre CD33 gen ifadelerindeki değişim

	Olgu sayısı	CD 33 gen ifadelerindeki değişim	p-değeri †
Cinsiyet			0,690
<i>Erkek</i>	6	0,88±0,31	
<i>Kadın</i>	18	0,82±0,29	
Öğrenim süresi			0,985
<i>≤ 8 yıl</i>	10	0,84±0,26	
<i>> 8 yıl</i>	14	0,84±0,32	
Hipertansiyon öyküsü			0,664
<i>Yok</i>	7	0,88±0,20	
<i>Var</i>	17	0,82±0,32	
Diyabet öyküsü			0,743
<i>Yok</i>	18	0,82±0,31	
<i>Var</i>	6	0,87±0,22	
Sigara öyküsü			0,246
<i>Yok</i>	19	0,87±0,28	
<i>Var</i>	5	0,70±0,31	
Kahve öyküsü			0,576
<i>İçmeyen</i>	7	0,89±0,23	
<i>İçen</i>	17	0,81±0,31	
Çay öyküsü			-
<i>İçmeyen</i>	1	0,86	
<i>İçen</i>	23	0,84±0,29	

† Student's t testi.

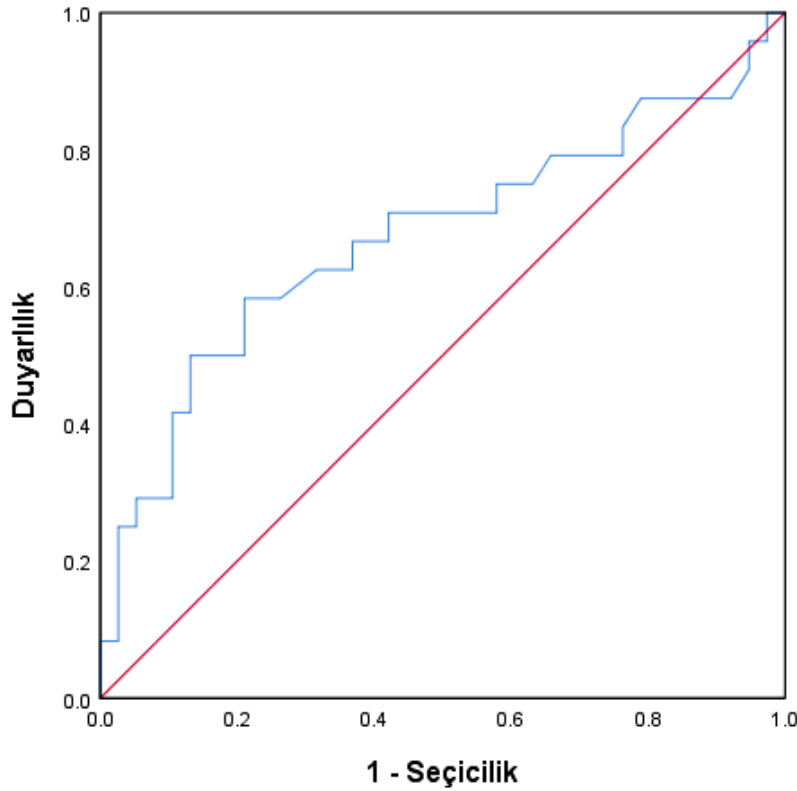
3.7. ROC Analizi Bulguları

Grupları ayırt etmede TSA ölçümlerine ait ROC eğrisi altında kalan alan 0,673 olup (%95 Güven Aralığı: 0,524-0,821) istatistiksel olarak önemli bulundu ($p=0,023$). Buna karşın kontrol ve vaka gruplarını ayırt etmede akım sitometri sonuçlarına ait ROC eğrisi altında kalan alanlar istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0,05$) (Çizelge 3. 35.).

Çizelge 3.34. Kontrol ve vaka gruplarını ayırt etmede klinik ölçümlere ilişkin ROC analizi sonuçları

	EAKA	%95 Güven Aralığı	p-değeri
TSA	0,673	0,524-0,821	0,023
CD33 pozitif monosit	0,646	0,496-0,796	0,061

EAKA: Eğri altında kalan alan



Şekil 3.16. TSA ROC eğrisi

Her bir TSA ölçümüne karşılık gelen duyarlılık ve seçicilik düzeyleri toplamının maksimuma ulaştığı 0.222 değeri TSA için en iyi kesim noktasıdır. Kontrol ve vaka gruplarını ayırt etmede TSA'nın en iyi kesim noktasındaki duyarlılığı; %58,3 olarak seçiciliği; %78,9 şeklinde, pozitif ve negatif tahmini değerleri sırasıyla; %63,6 ve %75,0 olarak tanısal doğruluk oranı ise %71,0 şeklinde tespit edildi.

TSA düzeyi 0.222'nin altında olan olgulara göre TSA düzeyi 0.222'nin üzerinde olan olgularda AH görülme ihtimalinin istatistiksel anlamlı olarak 5,250 kat (%95 Güven Aralığı: 1,704-16,179) arttığı görüldü ($p=0,007$).

Yaş, cinsiyet, öğrenim süresi sigara, çay ve kahve sabit tutulduğunda TSA düzeyi 0.222'nin altında olan olgulara göre TSA düzeyi 0.222'nin üzerinde olan olgularda Alzheimer görülme ihtimalinin istatistiksel anlamlı olarak 8,998 kat (%95 Güven Aralığı: 1,095-73,965) arttığı görüldü ($p=0,041$) (Çizelge 3. 36.).

Çizelge 3.35. Kontrol ve vaka gruplarını ayırt etmede ROC analizi sonucunda TSA ölçümlerine ait en iyi kesim noktası ve TSA'nın bu noktadaki tanısal performans göstergeleri

	Tanımlar	TSA
En iyi kesim noktası	Youden indeks'e göre	0.222
Olgu Sayısı	N	62
Duyarlılık	GP/(GP+YN)	14/24 (%58,3)
Seçicilik	GN/(GN+YP)	30/38 (%78,9)
PTD	GP/(GP+YP)	14/22 (%63,6)
NTD	GN/(YN+GN)	30/40 (%75,0)
Doğruluk	(GP+GN)/(N)	44/62 (%71,0)
Odds oranı		5,250
%95 güven aralığı		1,704-16,179
p değeri †		0,007

N: Toplam olgu sayısı, GP: Gerçek Pozitif, YN: Yalancı Negatif, GN: Gerçek Negatif, YP: Yalancı Pozitif, PTD: Pozitif Tahmini Değer, NTD: Negatif Tahmini Değer, † Süreklilik düzeltmeli Ki-Kare testi.

Gruplara ve olguların demografik özelliklerine göre TSA düzeyine (0.222'den yüksek olma prevalansı) ilişkin frekans dağılımları yönünden farklar

70 yaş ve altı olgularda kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,155$). 70 yaş üstü olgularda da kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın

0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,060$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde yaşa göre TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığında istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmedi ($p>0,999$).

Erkekler içerisinde kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,143$). Kadınlar içerisinde de kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,104$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde cinsiyete göre TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığında Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmedi ($p=0,045$ ve $p=0,192$).

8 yıl ve daha kısa öğrenim görmüş olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,252$). 8 yıldan uzun süre öğrenim gören olgular içerisinde ise kontrol grubuna göre Alzheimer grubunun TSA düzeyi 0.222'den fazla olanların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,002$). Kontrol grubu içerisinde 8 yıl ve daha az öğrenim gören gruba göre 8 yıldan uzun süredir öğrenim gören grupta TSA düzeyi 0.222'den fazla olanların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktür ($p=0,017$). Alzheimer grubu içerisinde ise öğrenim süresine göre TSA düzeyinin 0.222'den yüksek bulunma sıklığında istatistiksel açıdan anlamlı değişim görülmedi ($p>0,999$).

Hipertansiyon öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,999$). Hipertansiyon öyküsü olan olgular içerisinde ise kontrol grubuna göre Alzheimer grubunun TSA düzeyi 0.222'den fazla olanların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,003$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde hipertansiyon öyküsüne göre TSA'nın 0.222'den

büyük olma sıklığında istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmedi ($p>0,999$ ve $p=0,085$).

Diyabet öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer grubunun TSA düzeyi 0.222'den fazla olanların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,004$). Diyabet öyküsü olan olgular içerisinde ise kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,644$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde Diyabet öyküsüne göre TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığında istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmedi ($p=0,195$ ve $p=0,665$).

Sigara öyküsü olmayan olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,539$). Sigara öyküsü olan olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,073$). Kontrol grubu içerisinde sigara öyküsü olmayanlara göre sigara öyküsü olanlarda TSA düzeyi 0.222'den büyük olanların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktür ($p=0,003$). Alzheimer grubu içerisinde ise sigara öyküsüne göre TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığında istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmedi ($p=0,615$).

Kahve içmeyen olgular içerisinde kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,266$). Kahve içen olgular içerisinde de kontrol ve Alzheimer grubu arasında TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığı yönünden Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,028$). Gerek kontrol gerekse Alzheimer grupları içerisinde kahve içme alışkanlığına göre TSA'nın 0.222'den büyük olma sıklığında istatistiksel olarak anlamlı değişim görülmedi ($p>0,999$).

Çay içen olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer grubunda TSA düzeyi 0.222'den fazla olanların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,010$). Kontrol grubu içerisinde çay içme alışkanlığının TSA düzeyinin

0.222'den büyük olması üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değiştirici bir etkisi yoktur (p=0,560).

Çizelge 3. 36. Gruplara ve olguların demografik özelliklerine göre TSA düzeyine (0.222'den yüksek olma prevalansı) ilişkin frekans dağılımları

	Kontrol	Vaka	p-değeri †¶
Yaş grupları			
≤ 70 yıl	4/20 (%20,0)	2/3 (%66,7)	0,155††
> 70 yıl	4/18 (%22,2)	12/21 (%57,1)	0,060‡‡
p-değeri †¶	>0,999††	>0,999††	
Cinsiyet			
Erkek	1/18 (%5,6)	2/6 (%33,3)	0,143††
Kadın	7/20 (%35,0)	12/18 (%66,7)	0,104‡‡
p-değeri †¶	0,045††	0,192††	
Öğrenim süresi			
≤ 8 yıl	8/24 (%33,3)	6/10 (%60,0)	0,252††
> 8 yıl	0/14 (%0,0)	8/14 (%57,1)	0,002††
p-değeri †¶	0,017††	>0,999††	
HT öyküsü			
Yok	2/10 (%20,0)	2/7 (%28,6)	>0,999††
Var	6/28 (%21,4)	12/17 (%70,6)	0,003‡‡
p-değeri †¶	>0,999††	0,085††	
DM öyküsü			
Yok	4/27 (%14,8)	11/18 (%61,1)	0,004‡‡
Var	4/11 (%36,4)	3/6 (%50,0)	0,644††
p-değeri †¶	0,195††	0,665††	
Sigara öyküsü			
Yok	7/15 (%46,7)	12/19 (%63,2)	0,539‡‡
Var	1/23 (%4,3)	2/5 (%40,0)	0,073††
p-değeri †¶	0,003††	0,615††	
Kahve öyküsü			
İçmeyen	1/7 (%14,3)	4/7 (%57,1)	0,266††
İçen	7/31 (%22,6)	10/17 (%58,8)	0,028‡‡
p-değeri †¶	>0,999††	>0,999††	
Çay öyküsü			
İçmeyen	0/4 (%0,0)	0/1 (%0,0)	-
İçen	8/34 (%23,5)	14/23 (%60,9)	0,010‡‡
p-değeri †¶	0,560††	-	

Veriler; medyan (çeyrekler arası dağılım genişliği) biçiminde gösterildi, † Her bir demografik özellik içerisinde kontrol ve vaka grupları arasında TSA>0.222 prevalansı yönünden yapılan karşılaştırmalar, ‡ Kontrol ve vaka grupları içerisinde demografik özelliklere göre TSA>0.222 prevalansı yönünden

yapılan karşılaştırmalar, ¶ Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,025$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, †† Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi, ‡‡ Süreklilik düzeltmeli Ki-Kare testi.

Kontrol grubu ile Alzheimer hasta grubunu ayırt etmede en fazla belirleyici olan etken(ler)in araştırılması

Biyolojik etkenler ve diğer etki karıştırıcı faktörlerin yanı sıra tek değişkenli istatistiksel analizler sonucunda $p < 0,25$ olarak saptanan olası tüm değişkenler aday risk faktörleri olarak lojistik regresyon modeline dahil edildiler. Geriye dönük adimsal elemeli çoklu değişkenli lojistik regresyon analizi sonucunda kontrol grubu ile Alzheimer hasta grubunu ayırt etmede en fazla belirleyici olan etkenler sırasıyla; yaş, öğrenim süresi ve CD33 pozitif monosit hücre oranı'dır.

Diğer faktörlerden bağımsız olarak yaş ilerledikçe Alzheimer görülme ihtimali artmaktadır [Odds oranı=1,408 (%95 Güven Aralığı: 1,154-1,717) ve $p < 0,001$]. Öğrenim süresi [Odds oranı=0,013 (%95 Güven Aralığı: 0,001-0,259) ve $p = 0,004$] ve CD33 pozitif monosit hücre oranı [Odds oranı=0,759 (%95 Güven Aralığı: 0,605-0,952) ve $p = 0,017$] ile AH yatkınlığı arasında ise ters yönlü birliktelik saptandı.

4. TARTIŞMA

Demansın en sık nedeni olan AH, intraselüler NFY ve ekstraselüler amiloid plak birikimi ve nöron kaybıyla karakterizedir. Ayrıca nöroinflamasyon, sinaptik ve nörotransmitter kayıp da nörodejenerasyonda rol almaktadır (Karch ve Goate, 2015). Semptomlar ortaya çıktıktan sonra hastalar ortalama 8 yıl yaşamakta ve yaşa, bakıma ve diğer sağlık koşullarına bağlı olarak sağkalım 4 ila 20 yıl arasında değişmektedir. AH'de görülen nöron kaybı hafıza yetersizliğine, kişilik değişikliklerine, günlük aktivitelerin gerçekleştirilmesinde problemlere ve diğer AH semptomlarına neden olmaktadır (Sundaram, 2017). Demanslı hasta sayısı 2030 yılında yaklaşık 76 milyona çıkması ve teşhis, tedavi ve bakım için toplam maliyetin ise 2 trilyon dolara ulaşması beklenmektedir (Prince ve ark., 2015). Bu bakımdan hastalığın nedenlerinin ve mekanizmalarının anlaşılması oldukça önem arz etmektedir. Çalışmamızda Alzheimer hastalarında SA düzeyleri ile CD33 protein miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. 2050 yılında her 33 saniyede bir yeni vakanın artacağı öngörülen AH'nin etiyolojisinin ve patolojisinin anlaşılması bakımından bu değerlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin aydınlatılması hedeflenmiştir.

A β kaskad hipotezine göre A β birikimi AH'nin temel başlatıcı faktörüdür. Ayrıca 65 yaş sonrası görülen GBAH'da majör patojenik olay A β klirensinin bozulmasıdır (Griciuc ve ark., 2013). Beyinde mikrogial hücreler A β klirensinde kritik rol oynamaktadır. CD33 mikrogia aracılı A β klirensini bozarak AH patogeneze neden olmaktadır. Ayrıca, nöroinflamasyon ve immün yanıtta yetersizliğin de AH patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. GWAS çalışmalarında GBAH'da bu patogeneze ile ilişkili genler tanımlanmıştır: CR1, CD33, MS4A, CLU, ABCA7 ve EPHA1 (Karch ve Goate, 2015).

Siddiqui ve ark. (2017), CD33 rs3865444A and rs12459419T alellerinin GBAH için koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Bundan başka, çalışmalarda

koruyucu alel taşıyan bireylerde CD33m düzeylerinin CD33M'den fazla olduğu kanıtlanmıştır. CD33m sialize ligandları bağlayan Ig-benzeri V-tip domain bölgesi eksiktir. CD33M bilinen adıyla CD33, GBAH için risk faktörüken CD33m koruyucu faktördür (Siddiqui ve ark., 2017; Pérez-Oliva, 2011).

CD33, Siglec ailesinin bir üyesidir. Siglecler, genellikle glikoprotein ve glikolipidlerin glikan zincirinin terminal uçlarında bulunan dokuz karbon-omurga monosakariti ile SA'ları tanımaktadır. Siglecler genellikle birkaç hücre dışı Ig alanı içermektedir. Terminal V-set domain sialize liganlara bağlanmakta ve bunu çeşitli sayıda C2-set domain, bir tek geçişli transmembran domain ve intraselüler kuyruk takip etmektedir.

Siglecler, genellikle immün hücre yüzeylerinde eksprese olmaktadır. Intraselüler aktivasyonun regülasyonu için ekstraselüler ligandlara bağlanmaktadır. Siglecler, immün hücrelere ligand bağlanmasının hücre aktivasyonu üzerine etkisine bağlı olarak inhibe edici veya aktiveleştirici olarak sınıflandırılmaktadır. İnhibitör Siglecler, intraselüler ITIM ve ITIM-benzeri motifler taşımaktadır. Ligand bağlanması, bu motifteki tirozin kalıntısının fosforilasyonuna neden olmaktadır. SHP-1 ve SHP-2 tirozin fosfatazların katılımı immün cevabın inhibisyon kaskadını başlatmaktadır. SHP-1 ve SHP-2'nin tükenmesi, CD33 reseptörünün endositozunda artışa neden olmaktadır (Siddiqui ve ark., 2017; Pérez-Oliva, 2011).

İnhibitör tip Siglec olan CD33, beyinde miyeloid hücreler ve mikroglia üzerinde periferik kanda ise daha çok monosit hücrelerde eksprese edilmektedir. Beyin ve omurilikte yoğun olarak bulunan mikroglialar SSS'deki hasarlı nöronlar ve sinapslarda plakları ve enfeksiyöz ajanları temizlemekle görevlidir. Alzheimer hastalarında plak çevresinde CD33 aşırı eksprese olmaktadır (Sundaram, 2017; Hu ve ark., 2014).

CD33, SA bağlandığında aktive olmakta ve ITIM aracılığıyla monosit inhibisyonu gerçekleşmektedir (Karch ve Goate, 2015). CD33 mRNA ekspresyonu mikrogliyalarda artmakta ve otopsi beyinlerinde bilişsel bozukluk derecesiyle orantılı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca Alzheimer beyinde, CD33 pozitif immunoreaktif mikroglialar ile A β 42 ve plak yükü arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Bu bakımdan CD33'ün beyinde mikrogliya aracılı A β klirensi ve diğer nöroinflamatuvar yollarda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Karch ve Goate, 2015; Griciuc ve ark., 2013). Walker ve ark. (2015), temporal korteks otopsi beyin örneklerinde CD33 ekspresyonunun AH patolojisi ile doğru orantılı olduğunu bildirmişlerdir.

CD33 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca CD33'ün inaktive edilmesi A β patolojisini azalttığını göstermişlerdir. Bu bakımdan CD33'ün inhibe edildiği tedavi protokollerinin AH'de uygulanabileceği söylenebilmektedir.

SA'lar bir grup monosakkaritten oluşmaktadır ve glikolipitler ile glikoproteinlerin oligosakkarit zincirlerinin terminal ucunda bulunmaktadır. SA genellikle fizyolojik pH'da negatif olarak yüklenir ve birçok hücre için önemli tanıma molekülüdür. Memeli hücrelerinde bulunan en yaygın SA, N-asetilneuraminik asittir (NeuAc, NANA) (Schedin-Weiss, 2014; Çetinkaya ve ark., 2004).

Nöraminik asitten N-asetilasyon yolu ile oluşan SA hücre membranının önemli komponentlerindendir (Çetinkaya ve ark., 2004). SA genellikle akut faz glikoproteinlere bağlanmaktadır. Bu nedenle akut inflamatuvar reaksiyonlarda α_1 -asidglikoprotein, α_1 -antikimotripsin, α_2 -makroglobulin gibi akut faz glikoproteinlerin artışına bağlı olarak SA düzeyinde de inflamasyona bağlı artış görülmektedir (Çetinkaya ve ark., 2004; Pönniö ve ark., 1999; Sillanauke ve ark., 1999). Bu bakımdan akut faz protein artışına neden olan romatoit artrit, Crohn hastalığı, pnömoni gibi inflamatuvar hastalıklarda serum SA düzeylerinde artış gözlenmektedir (Üstündağ ve ark., 2003). SA, serbest veya bağlı olarak idrar, serum, plazma, annesütü ve tükürük bezi, mide, kolon, sinoviyal sıvı, sperm, safra kesesi ve ter bezi gibi pek çok vücut epitel yapısında bulunmaktadır. Ayrıca SSS'de gangliozitlerdeki

glikolipit yapısına bağılı olarak bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar serum ve plazma SA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bildirmektedir (Sillanauke ve ark., 1999).

Miyokardiyal infarktüs, diyabet, iflamatuar hastalıklar ve alkolizm gibi rahatsızlıklarda SA konsantrasyonu artmaktadır. Kansere hastalarında SA konsantrasyonlarında artış gözlenmekte, ayrıca metastaz derecesiyle pozitif bir ilişkisi olduğu bildirilmektedir. Kalıtsal SA depo hastalığında ise klinik olarak oldukça önemli olan serum SA düzeyi yükselmektedir. SA düzeyinin erkeklerde yaşla birlikte anlamlı bir artışın olmadığı ancak kadınlarda menopoza sonra anlamlı bir artışın gözlemlendiği bildirilmektedir (Pönniö ve ark., 1999). Serum SA düzeyi ve diyabetik retinopati derecesi arasında ilişki bulunmadığı (Üstündağ ve ark., 2003) ancak bazı çalışmalarda ise anlamlı bir ilişki olduğu öne sürülmektedir (Sillanauke ve ark., 1999; Crook ve ark., 1993). Buna göre, çeşitli mekanizmalar ile pek çok patolojik durum, SA düzeylerinin artışına neden olabilmektedir. SA düzeylerinin, hastalıkların diğer biyogöstergeleriyle birlikte değerlendirildiğinde hastalığın izlenmesi ve tedavinin takibi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir (Pönniö ve ark., 1999).

Hücre membranının yapısında bulunan SA, kanda yüksek düzeyde seyretmesi özellikle vasküler doku hücrelerinde hasarı düşündürmektedir. Vasküler doku hasarı iskemiye, iskemi ise retinopati, nefropati ve nöropatiye neden olmaktadır. Ayrıca, immün yanıtta glikoproteinler, oligosakarit zincirlerinde terminal şeker olarak SA bulundurdıklarından akut faz yanıtının bir ölçüsü olarak da kullanmak mümkündür (Davis ve ark., 2009).

Çalışmamızda Alzheimer hastalarında TSA ve CD33 düzeyleri, herhangi bir demans ve bilişsel rahatsızlığı olmayan kontrol grubu bireyler ile kıyaslanarak çalışılmış ve hipertansiyon ve diyabet öyküsü, öğrenim durumu, cinsiyet, yaş, sigara, kahve, çay ve alkol kullanımı gibi bireysel ve çevresel faktörler ile ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda, kontrol ve hasta gruplarına göre olguların demografik özellikleri ve öyküleri yönünden dağılımları incelendiğinde, yaş ve cinsiyete bağlı istatistiksel bir anlamlılık görülmüştür. Buna göre, yaş ilerledikçe Alzheimer hastası olma ihtimali anlamlı olarak artmaktadır. Ayrıca kadınlarda AH görülme ihtimali 2.7 kat daha fazladır. Yaşın AH için en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir (Barbagallo ve ark., 2015). Kadınlarda yaşam süresinin daha uzun olması nedeniyle AH görülme sıklığının erkeklerden daha fazla olduğu bildirilmektedir. Ancak tersine, bazı çalışmalar kadınlarda AH patogenezin temelini oluşturan A β amiloid düzeyinin daha düşük olduğu ve bunun östrojen hormonun koruyucu etkisi ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir (Kelley ve Petersen, 2007; Bendlin ve ark., 2010).

Çalışmamızda sigara öyküsü olan bireylerde Alzheimer hasta grubu, kontrol grubu birey sayısından istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca sigara öyküsü ile AH olma ihtimali arasında istatistiksel olarak anlamlı ve ters yönlü bir birliktelik gözlenmiştir. Diğer demografik özellikler için ise (öğrenim durumu, hipertansiyon, diyabet, çay ve kahve öyküsü) anlamlı bir farklılık söz konusu değildir. Bu tür çalışmalarda çalışılan örnek sayısı sonuçları oldukça etkilemektedir. Buna göre, sigara içmenin AH'ye karşı koruyucu olabileceği ya da yukarıda belirtilen demografik özelliklerle AH arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı kesin olarak ifade etmek mümkün değildir.

Çalışmamızda Alzheimer hasta grubunun plazma TSA düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Davis ve arkadaşlarının (2009), 27 hasta ve 51 kontrol üzerinde yaptıkları klinik bir çalışmada AH'li hastalarda SA düzeylerinin sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Wang ve ark. (2001), PC12 hücrelerde SA düzeylerinde azalmanın A β toksisitesine karşı hücreleri koruduğunu göstermişlerdir. Başka bir ifadeyle, yüksek düzey SA seviyeleri, A β artışının bir göstergesi olabilmektedir. Yüksek SA düzeyi ile A β arasındaki ilişkiyi açıklamak için daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

Plazma TSA sonuçlarına göre, grupların demografik özellikleri ve öyküleri yönünden dağılımları incelendiğinde; yaş, cinsiyet ve kahve öyküsü bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak, Lindberg ve ark. (1991), yaş ilerledikçe TSA düzeyinin arttığını bildirmişlerdir. Hangloo ve ark. (1990) ise yaş ve cinsiyetin TSA üzerine bir etkisi olmadığını göstermişlerdir. 8 yıl ve daha kısa öğrenim görmüş, diyabet öyküsü olmayan, hipertansiyon ve çay öyküsü olan olgularda ise kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunun TSA düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Kardiyovasküler rahatsızlıklarda ve diyabette TSA düzeyinin risk faktörü olduğu bilinmektedir. Ancak çalışmamızda diyabet öyküsü ile TSA'nın ilişkili olmadığı gözlenmiştir. Çay öyküsü olmayan birey sayıları kontrol ve Alzheimer hasta gruplarında sırasıyla 4 ve 1'dir. Ülkemizde en çok tüketilen içecek olan çayın tüketimi ile TSA ilişkisinin değerlendirildiği daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda, TSA düzeyindeki her 0.01 birimlik artış Alzheimer görülme ihtimalini istatistiksel anlamlı olarak 1,155 kat arttırdığı bulunmuştur (Çizelge 3.5.). Yaş, cinsiyet, öğrenim süresi, sigara, çay ve kahve öyküsüne göre düzeltme yapıldığında ise TSA düzeyindeki her 0.01 birimlik artış AH görülme ihtimalini istatistiksel anlamlı olarak 1,249 kat arttırdığı görülmüştür (Çizelge 3.7.). Değişkenin tanı değerinin ölçüldüğü ROC analizinde ise TSA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Her bir TSA ölçümüne karşılık gelen duyarlılık ve seçicilik düzeyleri toplamının maksimuma ulaştığı 0.222 mg/mL değeri TSA için en iyi kesim noktası olduğu görülmüştür. Başka bir ifadeyle, çalışmamızda plazma TSA düzeyi istatistiksel anlamlı bir tanı değeri olarak 0.222 mg/mL bulunmuştur ve tanısal doğruluk oranı %71 şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 3.36.). Ayrıca, 8 yıldan uzun süre öğrenim gören, diyabet öyküsü bulunmayan, hipertansiyon ve çay öyküsü olan olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunun TSA düzeyi 0.222'den fazla olanların oranı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda, kolanjiokarsinoma, malign melanom ve otizmlili hastalarda serum/plazma TSA düzeyi tanı değerinin gücü ROC analizi ile incelenmiştir (Wongkham ve ark., 2001; Ros-Bullón ve ark., 1999; Yang ve ark.,

2018). Ancak Alzheimer hastalarında TSA düzeylerinin ROC analizi ile değerlendirildiği çalışmaya rastlanmamıştır. Behçet hastalığı, kanser, karaciğer sirozu, romatoid artrit ve hatta astım gibi inflamasyonlu kronik hastalıklarda TSA düzeyi yükselmektedir. TSA'nın inflamasyonun bir belirteci olması, AH inflamasyonunda da rolü olduğunu desteklemektedir, ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda akım sitometri yöntemiyle monosit hücrelerde CD33 protein düzeyi değerlendirilmiştir. Kontrol ve Alzheimer hasta gruplarında CD33 PMHO medyan değerleri sırasıyla %7,89 ve %5,40 olarak analiz edilmiştir. Buna göre, Alzheimer hasta grubunda CD33 PMHO daha düşük düzeyde bulunmuştur. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Demografik özellikler sabit tutulduğunda ise CD33 PMHO'daki artış ile AH yatkınlığı arasında anlamlı olarak ters yönlü bir ilişki gözlenmiştir. Başka bir ifadeyle, yaş, cinsiyet, öğrenim süresi, hipertansiyon ve diyabet de dahil diğer kronik hastalıklar ile sigara, çay ve kahve öyküsüne göre düzeltme yapıldığında Alzheimer hasta grubunda CD33 PMHO kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Alzheimer beyinde A β plak yükünün CD33 pozitif mikrogliya hücre oranıyla doğru orantılı olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Karch ve Goate, 2015; Griciuc ve ark., 2013). Ayrıca CD33'ün inaktive edildiği hücre kültürü çalışmalarında A β birikiminin de azaldığı gösterilmiştir (Griciuc ve ark., 2013). CD33 protein düzeyinin düşük olduğu AH indüklü farelerde ise, A β plak miktarlarının da daha düşük olduğu gözlenmiştir (Sundaram, 2017). Ancak, bulgularımızla orantılı olarak Hu ve ark. (2014) 102 Alzheimer hastasında CD33 PMHO akım sitometri ile analiz ederek kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre, dolaşımdaki CD33 protein düzeyi ile AH yatkınlığı arasında ters orantı olduğunu düşündürmektedir.

CD33 PMHO sonuçlarına göre, grupların demografik özellikleri ve öyküleri yönünden dağılımları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı

herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak, 8 yıl ve daha az süre öğrenim görmüş olgular içerisinde kontrol grubuna göre Alzheimer hasta grubunun CD33 PMHO istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Klinik araştırmalarda çalışılan örnek sayısı sonuçları oldukça etkilemektedir. Bu nedenle eğitim düzeyinin CD33 PMHO ile ilişkili olduğunu kesin olarak söylemek mümkün değildir.

Alzheimer hastalarında A β plak çevresinde CD33'ün over-eksprese olduğu ve Alzheimer mikrogliya hücre kültürü çalışmalarında ise CD33 ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (Sundaram, 2017; Hu ve ark., 2014 Griciuc ve ark., 2013). Ayrıca Walker ve ark. (2015), temporal kortekste CD33 ekspresyonun AH patolojisi ile orantılı olduğunu göstermişlerdir. Mikroglialarda CD33 mRNA ekspresyonunun arttığı ve AH patolojisi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Karch ve Goate, 2015; Griciuc ve ark., 2013). Ancak, Hu ve arkadaşları (2014) da bulgularımızla orantılı olarak Alzheimer hastaların MN hücrelerinde CD33 mRNA ekspresyonunun kontrollere göre down-regüle olduğunu ve 0.13 kat daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Buna göre, Alzheimer hastalarında dolaşımdaki CD33 geni ifade seviyesinin AH ile arasında ters bir birliktelik olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda, qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen Ct (Cp) değerleri kullanılarak hesaplanan CD33 geni ifade seviyesi başka bir ifadeyle MN hücrelerde CD33 mRNA ekspresyonu $0,837 \pm 0,289$ bulunmuş, 0,163 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.32.).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

CD33, SA tanınmasından sorumlu ekstraselüler bir N-ucu V-tipi Ig bölgesine sahip tip I transmembran bir proteindir. CD33 geni, GWAS çalışmalarında AH ile ilişkilendirilmiştir. Daha önceki bulgulara göre, AH beyinde CD33 ekspresyon düzeyinin artışı A β klirensini azaltarak plak birikimini arttırmaktadır. Ancak, farklı doku ve hücre tiplerinin Alzheimer hastalarında CD33 ekspresyonunda farklılığa yol açabildiği düşünülmektedir (Hu ve ark., 2014).

Çalışmamızda Alzheimer hasta grubunun plazma TSA düzeyi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Kontrol ve Alzheimer hasta grubu plazma TSA medyan değerleri sırasıyla 0.196 mg/ml ve 0.225 mg/ml olarak analiz edilmiştir (Çizelge 3.5.). Buna göre hasta grubunun plazma TSA düzeyi kontrol grubuna göre yüksektir ve istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

Yüksek düzey plazma TSA, inflamatuvar kronik hastalıklarda görülmektedir. Buna göre Alzheimer patofizyolojisinden biri olan nöroinflamasyon, hasta grupta plazma TSA düzeylerini bir miktar yükseltmiş olabileceği düşünülmektedir. Diğer kronik hastalıklar, ilaçlar ve çevresel şartların plazma TSA düzeylerini değiştirebilme olasılıkları olmasından dolayı, Alzheimer modelinin oluşturulduğu deney hayvanlarında plazma TSA düzeylerinin değerlendirilmesi daha sağlıklı sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.

Çalışmamızda akım sitometri yöntemiyle kontrol ve Alzheimer hasta grupların monosit hücrelerinde CD33 protein düzeyi değerlendirilmiş ve medyan değerleri sırasıyla %7.89 ve %5.40 olarak analiz edilmiştir. Alzheimer hasta grubunda CD33 PMHO daha düşük düzeyde olduğu gözlenmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Demografik özellikler sabit tutulduğunda ise CD33 PMHO'daki düşüş Alzheimer hastalığına yakınlıkla orantılı olduğu tespit edilmiştir. qRT-PCR

analizi sonucu ise Alzheimer hasta grubu MN hücrelerinde CD33 mRNA ekspresyonu kontrollere göre 0.163 kat istatistiksel anlamlı daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Akım sitometri ve qRT-PCR analiz sonuçlarına göre Alzheimer hasta grubunda MN hücrelerde CD33 protein oranı ve gen ekspresyonu daha düşüktür.

In vitro ve in vivo çalışmalar, A β plak yükünün CD33 protein düzeyi ve ekspresyonu ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir (Karch ve Goate, 2015; Griciuc ve ark., 2013; Griciuc ve ark., 2013; Sundaram, 2017; Hu ve ark., 2014 Walker ve ark., 2015). Ancak, bulgularımız AH yatkınlığının monosit hücrelerde CD33 düzeyi ve ekspresyonu ile ters orantılı olduğunu göstermektedir. Buna göre, A β plak yükünün fazla olduğu Alzheimer hastalarında serebral CD33 protein düzeyi yüksekken, monositlerde bu düzeyin düşük olabileceği ve buna göre AH ile dolaşımdaki CD33 düzeyi ve ekspresyonu arasında ters yönlü bir birlikteliğin söz konusu olabileceği düşünülmektedir. Ancak CD33 ile AH arasındaki ilişkinin başka çalışmalarla da değerlendirildiği araştırmaların yapılması önemlidir.

Çalışmamızda, aynı zamanda TSA ve CD33 düzeylerinin potansiyel bir biyobelirteç olma ihtimali değerlendirilmiştir. ROC eğrisi analizine göre, TSA için eğri altında kalan alan 0.637 olarak bulunmuş; tanısal doğruluk oranı ise %71 şeklinde tespit edilmiştir. Buna göre, TSA seviyesinin Alzheimer hastalarında bir dereceye kadar özgül tanısal bir biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir. Çalışmamız TSA'nın kesin bir biyobelirteç olmasını desteklemese de, ek parametrelerle birlikte değerlendirildiği ileriki çalışmalarda tanısal doğruluğu arttırılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmalar, CD33 +/- farelerde herhangi bir fertilite ve anatomik bozukluğun görülmemesi CD33 hedefli AH tedavisinde güvenli bir seçenek olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Günümüzde, yaklaşık % 90'ında CD33'ü eksprese eden miyeloblast taşıyan akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında da CD33'ü hedef alan başarılı tedaviler uygulanmaktadır (Legrand ve ark., 2000). Aynı

şekilde ileri çalışmalarla CD33 AH tedavisinde de hedef gen olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamız, Ankara ilinde ve küçük bir popülasyonda yapılabilmektedir. Ayrıca, CD33 protein düzeyi ve ekspresyonun Türk popülasyonunda araştırıldığı başka çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, daha sonraki çalışmalarda örnek sayısının artırılarak yapılması sonuçlarımızın desteklenmesini sağlayacaktır.

Progresif bir hastalık olması nedeniyle AH'nin ortaya çıkmadan tespit edilmesi, ayrıca hastalığın kesin tedavisinin sağlandığı protokollerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Buna göre, daha geniş popülasyonlarda hastalığın başlangıç evresinden son evresine kadar CD33 düzeylerinin takibinin yapıldığı çalışmaların dizayn edilmesi hastalık ile ilişkisinin anlaşılabilmesi için önemli olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından yol göstererek, gelecekte pek çok hastaya umut ışığı olabilecektir.

ÖZET

Alzheimer Hastalarında Bazı Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi

Etiyolojisi ve patolojik değişimin başlangıç mekanizması tam olarak aydınlatılamayan Alzheimer, multifaktöriyel bir hastalıktır. Risk faktörü olarak pek çok gen ortaya konmuştur. Sialik asit bağlayan immünglobülin benzeri lektinler (SIGLEC) grubuna ait CD33, pek çok çalışmada Alzheimer ile ilişkili yeni bir genetik risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda 38 sağlıklı kontrol ve 24 Alzheimer hastasından toplanan kanlarda plazma total sialik asit (TSA) düzeyi ile mononükleer hücrelerde akım sitometri yöntemiyle CD33 protein ekspresyonu ve qRT-PCR yöntemiyle CD33 gen ekspresyonu değerlendirilmiştir. TSA değerleri hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. CD33 protein ve gen ekspresyonu ise hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır.

Anahtar Sözcükler: Alzheimer, CD33, Sialik asit, mononükleer, qRT-PCR

SUMMARY

Evaluation of Some Biomarkers for Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease is a multifactorial disease whose etiology and the initial mechanism of pathological mechanism can not be fully understood. CD33 which is in sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (SIGLEC) group is considered as a new genetic risk factor associated with Alzheimer's in many studies. In our study, it was collected blood from 38 healthy controls and 24 Alzheimer's patients, and were evaluated total sialic acid (TSA) levels in plasma and CD33 protein expression by flow cytometry and CD33 gene expression by qRT-PCR method in mononuclear cells. TSA values were significantly higher in patients than in controls. CD33 protein and gene expression were significantly lower in patients than controls.

Keywords: Alzheimer, CD33, Sialic acid, mononuclear, qRT-PCR

KAYNAKLAR

- ALZHEIMER ASSOCIATION OFFICIAL WEB SITE (a), Erişim adresi: [<http://www.alz.org/what-is-dementia.asp#dementia>]. Erişim tarihi: 02/02/2016.
- ALZHEIMER ASSOCIATION OFFICIAL WEB SITE (b), Erişim adresi: [http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp]. Erişim tarihi: 02/02/2016.
- ALZHEIMER ASSOCIATION OFFICIAL WEB SITE (c), Erişim adresi: [http://www.alz.org/alzheimers_disease_causes_risk_factors.asp]. Erişim tarihi: 03/02/2016.
- AMERİKAN PSİKİYATRİ BİRLİĞİ (2013). Ruhsal Bozuklukların Tanımsal ve Sayımsal Elkitabı, Beşinci Baskı (DSM-5) Tanı Ölçütleri Başvuru Elkitabı'ndan, çev. Koroğlu, E. *Hekimler Yayın Birliği*, 291-311.
- ARIOĞUL S. (2003). Alzheimer tip demansta risk faktörleri. 5. *Ulusal İç hastalıkları Kongresi kitabı*, 102-105.
- AYPAK Ü, UYSAL H (2010). Glikoproteinlerin Yapısı ve Fonksiyonları, *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* **24** (2): 107 – 114.
- AYRAL MN (1978). Anatomi ve fizyoloji: Eczacılık fakültesi öğrencileri için (Kan ve dolaşım fizyolojisi), *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, **51**: (15-36).
- BACHMAN DL, WOLF PA, LINN RT, KNOEFEL JE, COBB JL, BELANGER AJ, D'AGOSTINO RB (1993). Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population The Framingham Study, *Neurology*, **43**(3 Part 1), 515-515.
- BAGYINSZKY E, GIAU VV, SHIM K, SUK K, AN SSA, KIM SY (2017). Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis, *Journal of the Neurological Sciences*, **376**: 242-254.
- BAGYINSZKY E, YOUN YC, AN SSA, KIM SY (2014). The genetics of Alzheimer's disease, *Clinical Interventions in Aging*, **9**: 535-551.
- BARBAGALLO M, MAROTTA F, DOMÍNGUEZ L (2015). Oxidative Stress in Patients with Alzheimer's Disease: Effect of Extracts of Fermented Papaya Powder. Erişim adresi: [<http://dx.doi.org/10.1155/2015/624801>]. Erişim tarihi: 01/03/2016.
- BARRONA M, GARTLONB J, DAWSON LA, ATKINSON PJ, PARDON MC (2017). A state of delirium: Deciphering the effect of inflammation on taupathology in Alzheimer's disease, *Experimental Gerontology*, **94**(103-107).
- BENDLIN BB, CARLSSON CM, GLEASON CE, JOHNSON SC, SODHI A, GALLAGHER CL, PUGLIELLI L, ENGELMAN CD, RIES ML, XU G, WHARTON W, ASTHANA S (2010). Midlife predictors of Alzheimer's disease, *Maturitas*, **65**(2): 131-137.
- BERMEJO PE, MARTÍN-ARAGÓN S, BENEDÍ J, SUSÍN C, FELICI E, GIL P, RIBERA JM, VILLAR AM (2008). Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Immunol Lett*, **117**(2): 198-202.

- BENNETT DA, SCHNEIDER JA, WILSON RS, et al. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Archives of Neurology*, **61**(3): 378-384.
- BLACKER D, TANZI RE (1998). The Genetics of Alzheimer Disease Current Status and Future Prospects, *Arch Neurol*, **55**(3): 294-296.
- CACACEA R, SLEEGERSA K, BROECKHOVEN C (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited, *Alzheimer's & Dementia*, **12**: 733-748.
- CAN H, İRKEÇ C, KARAKAŞ S (2006). Alzheimer tipi demansın farklı evrelerinin nöropsikolojik profili. *Yeni Sempozyum*, **44**, 115-135.
- CARRASQUILLO MM, BELBIN O, HUNTER TA, MA L, BISCEGLIO GD, ZOU F, CROOK JE, PANKRATZ VS, SANDO SB, AASLY JO, BARCIKOWSKA M, WSZOLEK ZK, DICKSON DW, GRAFF-RADFORD NR, PETERSEN RC, PASSMORE P, MORGAN K, YOUNKIN SG (2011). Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer's disease: a multi-centre case-control study, *Mol Neurodegener*, **6**(1): 54.
- CHAPMAN DP, WILLIAMS SM, STRINE TW, ANDA RF, MOORE MJ (2006). Dementia and Its Implications for Public Health, *Prev Chronic Dis.*, **3**(2): 1-13.
- CHAUHAN V, CHAUHAN A (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, **13**: 195-208.
- CHUGH SS, MACÉ C, CLEMENT LC, DEL NOGAL AVILA M, MARSHALL CB (2014). Angiopoietin-like 4 based therapeutics for proteinuria and kidney disease, *Frontiers in Pharmacology*, **5**(23): 1-8.
- CHUNG SJ, LEE JH, KIM SY, YOU S, KIM MJ, LEE JY, KOH J (2012). Association of GWAS top hits with late-onset Alzheimer disease in Korean population, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **27**(3):250-257.
- COOPER EL, MA MJ (2017). Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine, *J Tradit Complement Med.*, **7**(4): 380-385.
- CROCKER PR, PAULSON JC, VARKI A (2007). Siglecs and their roles in the immune system, *Nat Rev Immunol*, **7**(4): 255-266.
- CROCKER PR, VARKI A (2001). Siglecs in the immune system, *Immunology*, **103**(2): 137-145.
- CROOK MA, TUTT P, SIMPSON H, PICKUP JC (1993). Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Clinica Chimica Acta*, **219**(1-2): 131-138.
- ÇETİNKAYA Y, GENCER M, ÖZKÖK E, AYDIN M, YÜKSEL GA, TİRELİ H, KARA İ (2004). İdiyopatik Parkinson Hastalığı Ve Sialik Asit, Düşünen Adam, *Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Dergisi*, **17**(4): 205-208.
- DAVIS G, BABOOLAL N, NAYAK S, MCRAE A (2009). Sialic acid, homocysteine and CRP: Potential markers for dementia, *Neuroscience Letters*, **465**: 282-284.
- DEAN L (2005). Blood groups and red cell antigens. *National Center for Biotechnology Information*. Bookshelf Copyright.

- DEMİRALP EE (2008). Hücre Yüzey Antijenleri (CD Sistemi)'Nin İmmünolojiye Katkıları, *ANKEM Derg*, **22**(Ek 2): 98-103
- DONIX M, ERCOLI LM, SIDDARTH P, BROWN JA, MARTIN-HARRIS L, BURGGREN AC, MILLER KJ, SMALL GW, BOOKHEIMER SY (2012). Influence of Alzheimer Disease Family History and Genetic Risk on Cognitive Performance in Healthy Middle-Aged and Older People, *Am J Geriatr Psychiatry*, **20**(7): 1-13.
- DORSZEWSKA J, PRENDECKI M, OCZKOWSKA A, DEZOR M, KOZUBSKI W (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease, *Send to Curr Alzheimer Res.*, **13**(9):952-63.
- DUNPHY CH (2004). Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology, *Arch Pathol Lab Med.*, **128**: 1004-1022.
- DURAZZO TC, MATTSSON N, WEINER MW (2014). Smoking and increased Alzheimer's disease risk: A review of potential mechanisms, *Alzheimers Dement*, **10**(30): 122–S145.
- FDA-approved treatments for Alzheimer's (2017). <https://www.alz.org/media/Documents/fda-approved-treatments-alzheimers-ts.pdf> (Erişim tarihi:19.12.2018)
- FENG Y, WANG X (2012). Antioxidant Therapies for Alzheimer's Disease *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2012**: 1-17.
- FISH PV, STEADMAN D, BAYLE ED, WHITING P (2018). New Approaches for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.034>
- FURUKAWA K, OHMI Y, KONDO Y, OHKAWA Y, TAJIMA O, FURUKAWA K (2015). Regulatory function of glycosphingolipids in the inflammation and degeneration, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **571**: 58–65.
- GAUGLER J, JAMES B, JOHNSON T, SCHOLZ K, WEUVE J (2015). Alzheimer's Association, Alzheimer's Disease Facts and Figures. Erişim adresi: [https://www.alz.org/facts/downloads/facts_figures_2015.pdf]. Erişim tarihi: 01/03/2016.
- GILLEARD CJ (2000). Is alzheimer's disease preventable? A review of two decades of epidemiological research, *Aging & Mental Health*, **4**(2): 101- 118.
- GREEN RC, MCNAGNY SE, JAYAKUMAR P, CUPPLES LA, BENKE K, FARRER LA (2006). Statin use and the risk of Alzheimer's disease: The MIRAGE Study, *Alzheimer's & Dementia*, **2**(2): 96- 103.
- GRICIUC A, SERRANO-POZO A, PARRADO AR, LESİNSKİ AN, ASSELIN CN, MULLIN K, HOOLI B, CHOI SH, HYMAN BT, TANZI RE (2013). Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta, *Neuron*, **78**(4): 631-643.
- GUERREIRO R, WOJTAS A, BRAS J, CARRASQUILLO M, ROGAEVA E, MAJOUNIE E, CRUCHAGA C, SASSI C, KAUWE JS, YOUNKIN S, HAZRATI L, COLLINGE J, POCOCK J, LASHLEY T, WILLIAMS J, LAMBERT JC, AMOUYEL P, GOATE A, RADEMAKERS R, MORGAN K, POWELL J, ST GEORGE-HYSLOP P, SINGLETON A, HARDY J, ALZHEIMER GENETIC ANALYSIS GROUP (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease, *N Engl J Med.*, **368**(2):117-27.

- GÜNEL T (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi, *Türkiye Klinikleri Journal Medicine Science*, **27**: 763-767.
- HANAĞASI H, EMRE M (2009). Demans kavramı ve hastaya yaklaşım, *Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics*, **2**: 1-4.
- HANGLOO VK, KAUL I, ZARGAR HU (1990). Serum sialic acid levels in healthy individuals, *J Postgrad Med.*, **36**(3):140-142.
- HARDY J, SELKOE DJ (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**(5580): 353–356.
- HAROLD D, ABRAHAM R, HOLLINGWORTH P, SIMS R, GERRISH A, HAMSHERE ML, PAHWA JS, MOSKVINA V, DOWZELL K, WILLIAMS A, JONES N, THOMAS C et. al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, *Nat Genet.*, **41**(10):1088-93.
- HIRTZ D, THURMAN DJ, GWINN-HARDY K, MOHAMED M, CHAUDHURI AR, ZALUTSKY R (2007). How common are the “common” neurologic disorders?. *Neurology*, **68**(5), 326-337.
- HOLLINGWORTH P, HAROLD D, SIMS R, GERRISH A, LAMBERT JC, CARRASQUILLO MM, ABRAHAM R, HAMSHERE ML, PAHWA JS, MOSKVINA V, DOWZELL K, JONES N, STRETTON A, THOMAS C, RICHARDS A, IVANOV D, WIDDOWSON C, CHAPMAN J, LOVESTONE S, POWELL J, PROITSI P et. al. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease, *Nat Genet.*, **43**(5): 429–435.
- HUMAN GENE DATABASE, Gene Cards, CD33 gene, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD33> erişim tarihi: 24.12.2018
- HU N, TAN MS, SUN L, JIANG T, WANG YL, TAN L, ZHANG W, YU JT, TAN L (2014). Decreased expression of CD33 in peripheral mononuclear cells of Alzheimer's disease patients, *Neuroscience Letters*, **563**: 51–54.
- IMTIAZ B, TOLPPANEN AM, KIVIPELTO M, SOININEN H (2014). Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention, *Biochem Pharmacol.*, **88**(4): 661-670.
- JIANG T, YU JT, HU N, TAN MS, ZHU XC, TAN L (2014). CD33 in Alzheimer's Disease, *Mol Neurobiol.*, **49**: 529–535.
- JIANG YT, LI HY, CAO XP, TAN L (2018). Meta-analysis of the association between CD33 and Alzheimer's disease, *Ann Transl Med*, **6**(10):169.
- JONSSON T, STEFANSSON H, STEINBERG S, JONSDOTTIR I, JONSSON PV, SNAEDAL J, BJORNSSON S, HUTTENLOCHER J, LEVEY AI, LAH JJ, RUJESCU D, HAMPEL H, GIEGLING I, ANDREASSEN OA, ENGEDAL K, ULSTEIN I, DJUROVIC S, IBRAHIM-VERBAAS C, HOFMAN A, IKRAM MA, VAN DUIJN CM, THORSTEINSDOTTIR U, KONG A, STEFANSSON K (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease, *N Engl J Med.*, **368**(2):107-16.
- KELLEY BJ, PETERSEN RC (2007). Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment, *Neurol Clin.*, **25** (3): 577.

- KANEV MO, MURANLI FDG (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları, *SAÜ Fen Bil Der.*, **20** (1):33-38.
- KARCH CM, GOATE AM (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis, *Biological psychiatry*, **77**(1), 43-51.
- KHANAHMADI M, FARHUD DD, MALMIR M (2015). Genetic of Alzheimer's Disease: A Narrative Review Article, *Iran J Public Health*, **44**(7):892-901.
- KIM J, BASAK JM, HOLTZMAN DM (2009). The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease, *Neuron*, **63** (3): 287–303.
- KIM LD, FACTORA RM (2018). Alzheimer Dementia: Starting, Stopping Drug Therapy, *Cleve Clin J Med*, **85** (3): p. 209-214.
- KINNEY JW, BEMILLER SM, MURTISHAW AS, LEISGANG AM, LAMB BT (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*.
- KLEİVELAND CR (2015). Peripheral blood mononuclear cells, In *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 161-167). Springer, Cham.
- KOCA E, TAŞKAPILIOĞLU Ö, BAKAR M (2017). Alzheimer Hastalığı'nda Evrelere Göre Hastaya Bakım Veren Kişilerin Yüğü, *Arch Neuropsychiatry*, **54**: 82-6.
- KOONTZ L (2013). Chapter Four - Agarose Gel Electrophoresis, *Methods in Enzymology*, **529** (35-45).
- KUBISTA M., ANDRADE, JM, BENGTSSON M., FOROOTAN A., JONÁK J., LIND K., SINDELKA, R., SJÖBACK R, SJÖGREEN B, STRÖMBOM L, STAHLBERG A, ZORIC N (2006). The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, **27**: 95-125p.
- KUKULL WA, HIGDON R, BOWEN JD, MCCORMICK WC, TERI L, SCHELLENBERG GD, LARSON EB (2002). Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Archives of neurology*, **59**(11), 1737-1746.
- KUMAR A, EKAVALI AS (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, **67**(2): 195-203.
- LAING, AA, HARRISON CJ, GIBSON BES, KEESHAN K (2017). Unlocking the potential of anti-CD33 therapy in adult and childhood acutemyeloid leukemia, *Experimental Hematology*, **54**: 40-50.
- LAJAUNIAS F, DAYER JM, CHIZZOLINI C (2005). Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling, *Eur J Immunol* **35**(1):243–251.

- LAMBERT JC, IBRAHİM-VERBAAS CA, HAROLD D, NAJ AC et. al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease, *Nat Genet.* **45**(12): 1452–1458.
- LEGRAND O, PERROT JY, BAUDARD M, CORDIER A, LAUTIER R, SIMONIN G, ZITTOUN R, CASADEVALL N, MARIE JP (2000). The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* **96**(3):870–877
- LETENNEUR L, GILLERON V, COMMENGES D, HELMER C, ORGOGOZO JM, DARTIGUES JF (1999). Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID Project, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **66**:177–183.
- LICHT EA, MCMURTRAY AM, SAUL RE, MENDEZ MF (2007). Cognitive Differences between Early and Late-Onset Alzheimer's Disease, *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, **22**(3):218-222.
- LINDBERG G, RASTAM L, GULLBERG B, EKLUND GA, TORNBERG S (1991). Serum sialic acid concentration and smoking: a population based study, *BMJ*, **303**(6813): 1306–1307.
- LIU CC, KANEKIYO T, XU H, BU G (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy, *Nat Rev Neurol.*, **9**(2): 106–118.
- LUSSIER D, BRUNEAU MA, VILLALPANDO JM (2011). Management of end-stage dementia, *Primary Care: Clinics in Office Practice*, **38**(2): 247-64.
- MALIK, M, SIMPSON JF, PARIKH I, WILFRED BR, FARDO DW, NELSON PT, ESTUS S (2013). CD33 Alzheimer's risk-altering polymorphism, CD33 expression, and exon 2 splicing. *Journal of Neuroscience*, **33**(33):13320-13325.
- MARKESBERY WR (1997). Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **23**(1): 134–147.
- MAYEUX R, STERN Y (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease, *Cold Spring Harb. Perspect Med.*, **2** (8): 1-18.
- MAO YF, GUO ZY, PU JL, CHEN YX, ZHANG BR (2015). Association of CD33 and MS4A cluster variants with Alzheimer's disease in East Asian populations, **609**: 235–239.
- MAWUENYEGA KG, SIGURDSON W, OVOD V, MUNSELL L, KASTEN T, MORRIS JC, YARASHESKI KE, BATEMAN RJ (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease, *Science*, **330**(6012):1774.
- MOON JM, ARONOFF DM, CAPRA JA, ABBOT P, ROKAS A (2018). Examination of Signatures of Recent Positive Selection on Genes Involved in Human Sialic Acid Biology, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **8**(4): 1315-1325.
- MORRIS MC, BROCKMAN J, SCHNEIDER JA, WANG Y, BENNETT DA, TANGNEY CC, van de REST O (2016). Association of Seafood Consumption, Brain Mercury Level, and APOE ε4 Status With Brain Neuropathology in Older Adults, *JAMA*. **02**; **315**(5): 489–497.
- MCKHANN GM, KNOPMAN DS, CHERTKOW H, HYMAN BT, JACK CR, KAWAS CH, & MOHS RC (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging/Alzheimer's Association workgroups on diagnostic

guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, **7** (3): 263-269.

MATTEUCCI E, GIAMPIETRO O (2008). Flow cytometry study of leukocyte function: analytical comparison of methods and their applicability to clinical research. *Curr Med Chem*, **15**: 596-603.

MATHEW A, YOSHIDA Y, MAEKAWA T, KUMAR DS (2011). Alzheimer's disease: cholesterol a menace?, *Brain Res Bull.*, **86** (1-2): 1-12.

MECOCCI P, POLIDORI MC (2012). Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Molecular Basis of Disease*, **1822** (5): 631-638.

MERAZ-RIOS MA, TORAL-RIOS D, FRANCO-BOCANEGRA D, VILLEDA-HERNANDEZ J, CAMPOS-PENA V (2013). Inflammatory process in Alzheimer's Disease, *Front Integr Neurosci*, **7** (59): 1-15.

MORRIS MC, EVANS DA, BIENIAS JL et. al. (2003). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease, *Arch Neurol*, **60**: 194-200.

NAJ AC, JUN G, BEECHAM GW, WANG LS, VARDARAJAN BN, BUROS J, GALLINS PJ, BUXBAUM JD, JARVIK GP, CRANE PK, LARSON EB, BIRD TD et. al. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease, *Nat Genet.*, **43** (5): 436-41.

NEBEL RA, AGGARWAL NT, BARNES LL, GALLAGHER A, GOLDSTEIN JM, KANTARCI K, MALLAMPALLI MP, MORMINO EC, SCOTT L, YUH WH, MAKI PM, MIELKE MM (2018). Special Topic Section: Sex and Gender in Alzheimer's Disease Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action, *Alzheimer's & Dementia*, **14** (9): 1171-1183.

NIA, National Institute on Aging (2011). Fact Sheet: Alzheimer's Disease Medications.

NOLAN T, HANDS E, BUSTIN SA (2006). Quantification of mRNA using real-time RT PCR. *Nat Protoc*, **1** (3): 1559-1582.

NOWOTNY P, KWON JM, GOATE AM (2003). Alzheimer Disease. Erişim adres: [http://www.ufrgs.br/ppgneuro/artigos/Alzheimer_ELS2003.pdf]. Erişim tarihi: 17/03/2016.

ÖZKAY ÜD, ÖZTÜRK Y, CAN ÖD (2011). Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, **18** (1): 35-42.

ÖZPAK L, PAZARBAŞI A, KESER N (2017). Alzheimer hastalığının genetiği ve epigenetiği, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **26** (1), 34-49.

PADURARIU M, CIOBICA A, HRITCU L, STOICA B, BILD W, STEFANESCU C (2010). Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Neurosci Lett*, **469**: 6-10.

PANEGYRES PK, CHEN HY (2013). Differences between early and late onset Alzheimer's disease, *Am. J. Neurodegener Dis.*, **2** (4): 300-306.

- PANZA F, SOLFRIZZI V, COLACICCO AM, BASILE AM, D'INTRONO A, CAPURSO C, SABBA M, CAPURSO S, CAPURSO A (2003). Apolipoprotein E (APOE) polymorphism influences serum APOE levels in Alzheimer's disease patients and centenarians, *Neuroreport*, **4**: 605-608.
- PATEL DA, HENRY JE, GOOD TA (2007). Attenuation of β -amyloid induced toxicity by sialic acid conjugated dendrimers: role of sialic acid attachment, *Brain Res.*, **1161**: 95-105.
- PÉREZ-OLIVA AB, MARTINEZ-ESPARZA M, VICENTE-FERNÁNDEZ JJ, MIGUEL RC, GARCÍA-PEÑARRUBIA P, HERNÁNDEZ-CASELLES T (2011). *Glycobiology*, **21** (6): 757-770.
- PETERSEN RC, THOMAS RG, GRUNDMAN M, BENNETT D, DOODY R, FERRIS S, GALASKO D, JIN S, KAYE J, LEVEY A, PFEIFFER E, SANO M, DYCK CH, THAL LJ for the Alzheimer's Disease Cooperative Study Group (2005). Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *New England Journal of Medicine*, **352** (23): 2379-2388.
- PÖNNIÖ M, ALHO H, NIKKARI ST, OLSSON U, RYDBERG U, SILLANAUKEE P (1999). Serum Sialic Acid in a Random Sample of the General Population, *Clinical Chemistry*, **45**: 10 (1842-1849).
- PRINCE M, BRYCE R, ALBANESE E, WIMO A, RIBEIROA W, FERRI CP (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis, *Alzheimer's & Dementia*, **9**: 63-75.
- PRINCE M, WIMO A, GUERCHET M, ALÍ GC, WU YT, PRINA M (2015). Alzheimer's Disease International "World Report 2015: The Global Impact of Dementia An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost And Trends" Alzheimer's Disease International (ADI), London. Erişim adresi: [<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>]. Erişim tarihi: 01/03/2016.
- PUBCHEM, Open Chemistry Database, Erişim Linki: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/656387#section=Top> (05.01.2019).
- REITZ C, MAYEUX R (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers, *Biochemical Pharmacology*, **88**: 640-651.
- ROCCA WA, CHA RH, WARING SC, KOKMEN E (1998). Incidence of dementia and Alzheimer's disease: a reanalysis of data from Rochester, Minnesota, 1975-1984. *American Journal of Epidemiology*, **148** (1): 51-62.
- ROS-BULLÓN MR, SÁNCHEZ-PEDREÑO P, MARTINEZ-LIARTE JH (1999). Serum sialic acid in malignant melanoma patients: an ROC curve analysis, *Anticancer Res.*, **19**(4C): 3619-22.
- ROSENBERG RN, LAMBRACHT-WASHINGTON D, YU G, XIA W (2016). Genomics of Alzheimer Disease A Review, *JAMA Neurol.*, **73** (7): 867-874.
- RUBIO-PEREZ JM, MORILLAS-RUIZ JM (2012). A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines, *Scientific World Journal*, **2012**: 1-15.

- SCHEDIN-WEISS S, WINBLAD B, TJERNBERG LO (2014). The role of protein glycosylation in Alzheimer disease, *FEBS Journal*, **281**: 46–62.
- SAKA E (2010). Alzheimer Hastalığı Patofizyolojisi: Deneysel Ve Genetik Bulgular, *Geriatrici*, **3**: 21-26.
- SELEKLER K (2010). Alois Alzheimer ve Alzheimer hastalığı, *Türk Geriatrici Dergisi*, **13** (3): 9-14.
- SESHADRI S, FITZPATRICK AL, IKRAM MA, DESTEFANO AL, GUDNASON V, BOADA M, BÍS JC, SMÍTH AV, CARASSQUÍLLO MM, LAMBERT JC, HAROLD D et. al. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease, *JAMA*, **303** (18): 1832-40.
- SHARP ES, GATZ M (2011). The relationship between education and dementia an updated systematic review. *Alzheimer disease and associated disorders*, **25** (4): 289.
- SIDDIQUI SS, SPRINGER SA, VERHAGEN A, SUNDARAMURTHY V, ALISSON-SILVA F, JIANG W, GHOSH P, VARKI A (2017). The Alzheimer's disease-protective CD33 splice variant mediates adaptive loss of function via diversion to an intracellular pool, *J. Biol. Chem.*, **292** (37): 15312–15320.
- SILLANAUKEE P, PONNIO M, JAASKELAINEN IP (1999). Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders, *Eur J Clin Invest*, **29** (5): 413-25.
- SILZER TK, PHILLIPS NR (2018). Etiology of type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Exploring the mitochondria, *Mitochondrion*, **43**: 16–24.
- SIRVIO J (1999). Strategies that support declining cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease patients, *Gerontology*, **458** (Suppl 1): 3-14.
- SLOANE PD, ZIMMERMAN S, SUCHINDRAN C, REED P, WANG L, BOUSTANI M, SUDHA S (2002). The public health impact of Alzheimer's disease, 2000–2050: potential implication of treatment advances, *Annual review of public health*, **23** (1): 213-231.
- SLOOTER AJC, DE KNIJFF P, HOFMAN A, CRUTS M, BRETELERA MMB, BROECKHOVEN CV, HAVEKES LM, VAN DUIJN CM (1998). Serum apolipoprotein E level is not increased in Alzheimer's disease: the Rotterdam study, *Neuroscience Letters*, **248**: 21-24.
- SOYLU Ö, KARALI N (2017). Alzheimer Hastalığı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, **6** (2): 94-109.
- SUNDARAM P (2017). Sialic acid and its analogues as potential neuro antiinflammatory therapeutic candidates for Alzheimer's disease, *Brain Nerves*, **1** (3): 1-4.
- SYDOW G (1985). A simplified quick method for determination of sialic acid in serum, *Biomed. Biochim. Acta.*, **44** (11-12): 1721-1723.
- ŠERÝ O, POVOVÁ J, MÍŠEK I, PEŠÁK L, JANOU V (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review, *Folia Neuropathol*, **51** (1): 1-9

- TADDEI K, CLARNETTE R, GANDY SE, MARTINS RN (1997). Increased plasma apolipoprotein E (apoE) levels in Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, **223**: 29-32.
- TANELİ F (2007). Flow Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı, *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, **5**(2):75-82.
- TOUSİ B (2015). The emerging role of bexarotene in the treatment of Alzheimer's disease: current evidence. *Neuropsychiatric disease and treatment*, **11**: 311.
- TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU (2018). İstatistikle Yaşlılar, 2017, *TÜİK Haber Bülteni*, Sayı: 27595. 10 Mart 2018.
- ÜSTÜNDAĞ Y, AKDOĞAN M, DEMİRCİ H, İBİŞ SŞ, YAVUZ D, KOSKU N (2003). Tip II Diyabetik Hastalarda Retinopati Derecesi ve Serum Siyalik Asit Düzeyi İlişkisi, *Ret – Vit*, **11**: 235-242.
- VIMR E, LICHTENSTEIGER C (2002). To sialylate, or not to sialylate: that is the question, *Trends Microbiol*, **10** (6): 254-257.
- VON GUNTEN S, BOCHNER BS (2008). Basic and clinical immunology of Siglecs, *Ann N Y Acad Sci*, **1143**: 61-82.
- VURAL H, DEMİR CV, YILMAZ N, EREN İ (2007). Alzheimer hastalığında total antioksidan kapasitesinin araştırılması, *Tip Araştırmaları Dergisi*, **5** (2): 63-66.
- YUSUFOV M, WEYANDT LL, PIRYATINSKY I (2017). Alzheimer's disease and diet: a systematic review, *International Journal of Neuroscience*, **127** (2): 161-175.
- YANG X, LIANG S, WANG L, HAN P, JIANG X, WANG J, HAO Y, WU L (2018). Sialic acid and anti-ganglioside antibody levels in children with autism spectrum disorders, *Brain Res*. **1678**: 273-277.
- WALKER DG, WHETZEL AM, SERRANO G, SUE LI, BEACH TG, LUE LF (2015). Association of CD33 polymorphism rs3865444 with Alzheimer's disease pathology and CD33 expression in human cerebral cortex, *Neurobiology of Aging*, **36**: 571-582.
- WANG SS, RYMER DL, GOOD TA (2001). Reduction in cholesterol and sialic acid content protects cells from the toxic effects of amyloid peptides, *J. Biol. Chem.*, **276**: 42027-42034.
- WANG Q, YIN B, CHUNG CY, BETENBAUGH MJ (2017). Glycoengineering of CHO Cells to Improve Product Quality, *Chapter in Methods in Molecular Biology*, **2**: 25-44.
- WARREN L (1959). The Thiobarbituric Acid Assay Of Sialic Acids, *J Biol Chem*, **234** (8): 1971-1975.
- WATTMO C, WALLIN AK (2017). Early- versus late-onset Alzheimer's disease in clinical practice: cognitive and global outcomes over 3 years, *Alzheimer's Research & Therapy*, **9**: 70.
- WHO (2018). Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalDALY_method_2000_2016.pdf?ua=1 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>) Erişim tarihi: 12.02.2019.

- WIELGAT P, BRASZKO JJ (2012). Significance of the cell adhesion molecules and sialic acid in neurodegeneration, *Advances in Medical Sciences*, **57** (1): 23-30.
- WILLIAMS BJ, ERIKSDOTTER-JONHAGEN M, GRANHOLM AC (2006). Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease, *Progress in neurobiology*, **80** (3): 114-128.
- WONG ML, MEDRANO JF (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, **39** (1): 75-85.
- WONGKHAM S, BOONLA C, KONGKHAM S, WONGKHAM C, BHUDHISAWASDI V, SRIPA B (2001). Serum total sialic acid in cholangiocarcinoma patients: an ROC curve analysis, *Clin Biochem.*, **34**(7): 537-41.
- WU L, ROSA-NETO P, HSIUNG GY, SADOVNICK AD, MASELLIS M, BLACK SE, JIA J, GAUTHIER S (2012). Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD), *Can J Neurol Sci.*, **39** (4):436-45.
- XU T, YAN Y, KANG Y, JIANG Y, MELCHER K, XU HE (2016). Alzheimer's disease-associated mutations increase amyloid precursor protein resistance to γ -secretase cleavage and the A β 42/A β 40 ratio, *Cell Discovery*, **2**: 1-14.
- XU W, YU JT, TAN MS, TAN L (2015). Cognitive reserve and Alzheimer's disease, *Molecular neurobiology*, **51** (1): 187-208.
- ZHANG C, WANG Y, WANG D, ZHANG J, ZHANG F (2018). NSAID Exposure and Risk of Alzheimer's Disease: An Updated Meta-Analysis From Cohort Studies, *Frontiers in aging neuroscience*, **10**: 83.
- ZHAO L (2018). CD33 in Alzheimer's Disease – Biology, Pathogenesis, and Therapeutics: A Mini-Review, *Gerontology*, 1-9.
- ZIGMAN WB, SCHUPF N, JENKINS EC, URV TK, TYCKO B, SILVERMAN W (2007). Cholesterol level, statin use and Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. *Neuroscience letters*, **416** (3): 279-284.

EKLER

Ek-1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN BU DÖKÜMANI DİKKATLİCE OKUYUNUZ.

Sayın gönüllü,

“Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı” tarafından yürütülecek olan “Alzheimer Hastalarında Yeni Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi” isimli **araştırmada** yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu formu okuyup onaylamanız, araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz anlamına gelecektir. Ancak, çalışmaya katılmama veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmayı bırakma hakkına sahiptir. Ayrıca araştırmacı da sizi çalışma dışı bırakabilir. Bu çalışmadan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacak olup kişisel bilgileriniz **gizli tutulacaktır**. Ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir. Eğer anlayamadığınız sizin için açık olmayan bölümler varsa ya da daha fazla bilgi edinmek isterseniz lütfen araştırmacılara danışmaktan çekinmeyiniz. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Bu nedenle lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.

Alzheimer hastalığı gittikçe ilerleyen bir şekilde bilişsel yeteneklerin yıkımına neden olan bir beyin hastalığıdır. Kişi yavaş yavaş çevre ile iletişim kurma, karar verme yeteneğini ve belleğini kaybeder. Günlük yaşam aktivitelerini yerine getiremez. Anormal davranışlarda bulunur. Hastalığın kesin nedeni hala bilinmemektedir. Biyogöstergeler hastalığın durumu ve riski hakkında bilgi veren

göstergelerdir. Klinik olarak kan, idrar veya diğer biyolojik sıvılarda tespit edilebilir. Alzheimer hastalığı nedenlerinin anlaşılması ve buna bağlı olarak etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için hastalığın biyogöstergeleri üzerinde araştırmalar günümüzde devam etmektedir. Çalışmamızda bu amaçla Alzheimer tanısı almış hastaların kanlarında bazı biyogösterge değerlerine bakılacaktır. Bu amaçla sizden 10 mL kan örneği alınacaktır. Ayrıca size kısa cevaplar vereceğiniz sorular sorulacaktır. Size verilen anket formlarındaki soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayın. Sorularımıza doğru cevap vermeniz çalışmamızın doğruluğu açısından önemlidir. Çalışmamız bilimsel araştırmadır. Öngörülen süre 2 yıldır. Araştırmaya katılması beklenen gönüllü ve hasta sayısı toplam 100 kişi olması planlanmaktadır. Araştırma Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yürütülecektir. Araştırmanın size ve bağlı olduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumuna bir maliyeti yoktur. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu araştırma tez amaçlı yapıldığı için size daha sonrasında bir bilgilendirme yapılmayacaktır. Sizin için bu çalışmanın beklenen bir yararı yoktur. Fakat sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda bunu size derhal bildireceğiz.

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI:

Ben.....

“Alzheimer Hastalarında Yeni Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi” başlıklı araştırmadan önce katılımcıya/gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum, katılmam istenen çalışmanın amacını ve içeriğini tamamen anladım. Bana çalışma hakkında aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Soru sorma ve tartışma imkanı buldum, gerekli yanıtları aldım. Bu çalışmayı istediğim zaman ve herhangi bir neden belirtmek zorunda kalmaksızın bırakabileceğimi ve bıraktığım takdirde herhangi bir olumsuz durum ile karşılaşmayacağımı anladım.

Araştırmacı da beni çalışma dışı bırakabilir. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir maddi sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerimin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

<i>Hasta/Gönüllü Adı Soyadı:</i>		<i>İmza:</i>
<i>Adres ve Telefon:</i>		

<i>Yasal Vasinin Adı Soyadı:</i>		<i>İmza:</i>
<i>Adres ve Telefon:</i>		

<i>Tanık Adı Soyadı:</i>		<i>İmza:</i>
<i>Adres ve Telefon:</i>		

<i>Araştırmacı Adı Soyadı:</i>		<i>İmza:</i>
<i>Adres ve Telefon:</i>		

ANKET FORMU

1. Adı-Soyadı:

2. Yaş:

3. Kilo:

4. Cinsiyet:

5. Boy:

6. Doğum Yeri:

7. Eğitim durumu:

8. Meslek:

9. Kan Grubu:

10. Sigara içme alışkanlığı;

Hiç içmedim ()

Halen içiyorum ()

Eskiden içerdim ()

1-10 sigara/gün ()

1 yıl önce bıraktım ()

11-20 sigara/gün ()

5 yıl önce bıraktım ()

Günde 20'den fazla ()

10 yıl önce bıraktım ()

1 yıldır içiyorum ()

2-5 yıldır içiyorum ()

5 yıl ve üstü yıldır içiyorum ()

Diğer:

11. Bulunduğum ortamda (ev/iş);

Sigara içiliyor ()

Hangi sıklıkta?

Sigara içilmiyor ()

12. Alkol kullanıyor musunuz?

Evet ()

Hangi sıklıkta?

Hayır ()

13. Kahve içme alışkanlığınız var mı?

Var ()

Günde 1 fincan ()

2 fincan ()

3 ve daha fazla fincan ()

Yok ()

Diğer:

14. Çay içme alışkanlığınız var mı?

Var ()

Günde 1 bardak ()

2 bardak ()

3 ve daha fazla bardak ()

Yok ()

Diğer:

12. Ne zaman ‘Alzheimer Hastalığı’ tanısı aldınız?

13. Alzheimer Hastalığınızın evresi,

14. Ailenizde sizden başka Alzheimer Hastası olan var mı?

Evet () Kim?

Hayır ()

15. (Alzheimer Hastalığı dışında) herhangi bir sağlık sorunuz var mı?

Evet () Nedir?

Hayır ()

16. Herhangi bir şekilde tarım veya böcek ilacına maruziyetiniz söz konusu mu?

Evet () Ne zaman ve ne kadar sıklıkta?

Hayır ()

17. Vitamin dahil herhangi bir ilaç kullanıyormusunuz?

Evet () Nedir?

Hayır ()

18. Beslenme alışkanlığınız? (En fazla tercih edilenden en aza doğru numara veriniz)

Et, haşlama/ızgara ()

Sebze ()

Meyve ()

19. Başınızın şiddetli darbe aldığı (kafa travması) bir kaza geçirdiniz mi?

Evet ()

Hayır ()

20. Düzenli egzersiz yapar mısınız?

Evet () 1 yıldır () 1 yıldan fazla () 1 yıldan az ()

21. Alzheimer tanısı almadan önce yaşadığınız bölge?

Kırsal ()

Şehiriçi ()

Diğer ()

EK-3. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAşTIRMANIN AÇIK ADI	Alzheimer Hastalarında Bazı Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi
VARSA ARAşTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAşVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAşTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Benay Can EKE			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAřTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmasötik Toksikoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAřTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Anabilim Dalı			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAşTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Deneysel Araştırma			
	ARAşTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Melli



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alzheimer Hastalarında Bazı Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:18-929-16	Tarih: 28 Kasım 2016		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üve tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İvi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Serdar ÖZTÜRK	Tabii Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Zeynep ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü. Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Suha YAĞCIOĞLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Nüket KUTLAY	Tabii Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
İlber BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı : Başak Özlem
Soyadı : PERK
Doğum yeri ve tarihi : Adana, 1986
Uyruğu : TC
Medeni Durumu : Evli
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 06100,
Tandoğan, ANKARA
(312) 203 31 21

II- Eğitimi

2018- : **Lisans**
İstanbul Üniversitesi
Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi/Çocuk Gelişimi Pr.
2013- : **Doktora (Ph.D.)**
Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
2011-2013 : **Yüksek Lisans (M.Sc.)**
Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
2005-2011 : **Lisans**
Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Yabancı Dili:

- İngilizce

III-Ünvanları

- 2010-Eczacı
- 2013- Bilim Uzmanı

IV-Mesleki Deneyimi

- 2014 Şubat – 2014 Eylül: Araştırma Görevlisi (Mersin, Eczacılık Fakültesi, ÖYP)
- 2014 Eylül - Devam ediyor: Araştırma Görevlisi (Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, ÖYP, 35. Madde ile)

V- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları

1. Uzun Burcu, Atlı Özlem, **Perk Başak Özlem**, Burukoğlu Dönmez Dilek, Ilgin Sinem (2015). Evaluation of the reproductive toxicity of naproxen sodium and meloxicam in male rats. Human & Experimental Toxicology, 34(4), 415-429., Doi: 10.1177/0960327114542886 (Yayın No: 3089487)
2. Karagoz Serife, Ilgin Sinem, Atli Ozlem, **Perk Basak Ozlem**, Burukoglu Dilek, Ergun Bulent, Sirmagul Basar (2013). Is N acetyl cysteine protective against monocrotaline induced toxicity. Toxin Reviews, 32(3), 47-54., Doi: 10.3109/15569543.2013.809547 (Yayın No: 155661)
3. **Perk Basak Ozlem**, Ilgin Sinem, Atli Ozlem, Duymus Hale Gamze, Sirmagul Basar (2013). Acute and Subchronic Toxic Effects of the Fruits of Physalis peruviana L. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013(2013), 1-10., Doi: 10.1155/2013/707285 (Yayın No: 155617)

4. Perk Başak Özlem, Güven Naile Merve, Eke Binay (2018). CD33 and Alzheimer's Disease. Turkish Journal of Scientific Reviews (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Derleme Makale) (Yayın No: 4588406)

Sözlü/Poster Bildiriler

1. Güven Naile Merve, **Perk Başak Özlem**, Eke Binay (2018). Sigara içmek diyabet için bir risk faktörü müdür?. V. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Sempozyumu (ISMS) (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4572086)

2. Perk Başak Özlem, Güven Naile Merve, Eke Binay (2018). Alzheimer Hastalığı ve Kannabidiol. V. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Sempozyumu (ISMS) (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4572072)

3. Perk Başak Özlem, Özkan Tülin, Güven Naile Merve, Sunguroğlu Asuman, Eke Binay (2018). Evaluation Of Cd33 Levels In Alzheimer's Disease: A Preliminary Study. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS) (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4315304)

4. Güven Naile Merve, **Perk Başak Özlem**, Eke Binay (2018). The Role of Vitamin D in Type 1/Type 2 Diabetes. 1st International Food and Medicine Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4298542)

5. Güven Naile Merve, **Perk Başak Özlem**, Eke Binay (2018). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds intake and the risk for type 1 diabetes. 1st International Food and Medicine Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4298544)

6. Perk Başak Özlem, Güven Naile Merve, Eke Binay (2018). Folic Acid and Alzheimer's disease. 1st International Food and Medicine Congress (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4282651)

7. Perk Başak Özlem, Eke Binay (2018). Can Sialic Acid as a Potential Therapeutic Agent for Alzheimer's disease?. 1st International Food and Medicine Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4282639)

8. Güven Naile Merve, **Perk Başak Özlem**, Eke Binay (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. IV. International Congress on Applied Biological Sciences (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4264991)
9. **Perk Başak Özlem**, Güven Naile Merve, Eke Binay (2018). CD33 and Alzheimer's Disease. IV. International Congress for Applied Biological Sciences (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4315277)
10. Güven Naile Merve, **Perk Başak Özlem**, Eke Binay (2018). Kapalı Mekan Radon Maruziyeti ve Akciğer Kanseri İlişkisi. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4255089)
11. **Perk Başak Özlem**, Güven Naile Merve, Eke Binay (2018). Yenidoğan Hiperbilirubinemi Otizm Spektrum Bozukluğu İle İlişkili Midir?. International Eurasian Conference On Biological And Chemical Sciences (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:4261840)
12. **Perk Başak Özlem**, Eke Binay (2018). Sialik Asit ve Beyin Gelişimi. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4255049)
13. Yılmaz Sariatın Sezen, **Perk Başak Özlem** (2017). Applications, Allergenic and Carcinogenic Potential of p-phenylenediamine. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3468614)
14. **Perk Başak Özlem**, Yılmaz Sariatın Sezen (2017). Asbest Maruziyetinin İnsan Sağlığına Etkisi. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3512371)
15. Yılmaz Sariatın Sezen, **Perk Başak Özlem** (2016). The Benefits and Potential Risks of Mercury in Dental Amalgam. 2nd International Congress of Forensic Toxicology- Industrial and Environmental Toxicology (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3084168)

16. Perk Başak Özlem, Yılmaz Sarıaltın Sezen (2016). Potential Risks of Electronic Nicotine Delivery Systems Electronic Cigarettes. 2nd International Congress of Forensic Toxicology- Industrial and Environmental Toxicology (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3083921)

17. Perk Başak Özlem, Eke Binay (2015). Bazı Nörodejeneratif Hastalıklarda Glutatyonun Önemi. 2nd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3085177)

VI-Bilimsel Etkinlikleri

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Alzheimer Hastalarında Bazı Biyogöstergelerin Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: EKE BİNAY, Araştırmacı: PERK BAŞAK ÖZLEM, 12/05/2017 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
2. Physalis Peruviana L Meyvesinin Altın Çilek Akut ve Subkronik Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi, BAP, Araştırmacı, 2011-2013 (ULUSAL)

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler:

Türk Farmakopesi 2017, (Yayın No: 4743858).

VII- Diğer Bilgiler

Sertifikalar

1. ISO 9001:2015 Quality Management System Basic Training, ISO 9001:2015 Quality Management System Basic Training, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)

2. GMP-İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi, GMP-İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
3. ISO9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi, ISO9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
4. ISO 45001:2018 Occupational Health and Safety Management System Basic Training, ISO 45001:2018 Occupational Health and Safety Management System Basic Training, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
5. GLP-İyi Laboratuvar Uygulamaları Eğitimi, GLP-İyi Laboratuvar Uygulamaları Eğitimi, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
6. ISO45001:2018 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi, ISO45001:2018 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Eğitimi, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
7. ISO13485:2016 Medical Devices Quality Management Systems Basic Training, ISO13485:2016 Medical Devices Quality Management Systems Basic Training, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
8. GMP-GOOD Manufacturing Practices Training, GMP-GOOD Manufacturing Practices Training, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
9. GLP-GOOD Laboratory Practices Training, GLP-GOOD Laboratory Practices Training, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)

10. ISO 13485:2016 Tıbbi Cihazlar için Kalite Yönetim sistemi Temel Eğitimi, ISO 13485:2016 Tıbbi Cihazlar için Kalite Yönetim sistemi Temel Eğitimi, Ankara, Sertifika, 08.12.2018 - 09.12.2018 (Uluslararası)
11. Ulusal ve Uluslararası Proje Hazırlama Eğitimi Programı, Ulusal ve Uluslararası Proje Hazırlama Eğitimi Programı, Rektörlük 100.yıl salonu, Sertifika, 28.05.2018 - 28.05.2018 (Ulusal)
12. Araştırma Görevlileri İçin Araştırma Yöntemleri Eğitim Programı, Araştırma Görevlileri İçin Araştırma Yöntemleri Eğitim Programı, Rektörlük 100.Yıl, Sertifika, 09.04.2018 - 27.04.2018 (Ulusal)
13. Mobbing ve Cinsel Taciz Eğitim Programı, Mobbing ve Cinsel Taciz Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 50.Yıl Salonu, Sertifika, 16.03.2018 - 16.03.2018 (Ulusal)
14. Araştırma Görevlileri için Eğiticilerin Eğitimi sertifika Programı, Ankara Üniversitesi Eğiticilerin eğitimi Sertifika Belgesi, Ankara Üniversitesi Rektörlük, Sertifika, 04.12.2017 - 09.01.2018 (Ulusal)
15. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sertifika, 07.05.2012 -18.05.2012 (Ulusal)

Kurslar

1. Uygulamalı Western Blot Analizi, Uygulamalı Western Blot Analizi, Ankara Üniversitesi Western Blot Analizi, Kurs, 15.02.2018 -16.02.2018 (Ulusal)

2. Nitel ve Nicel Analiz Yöntemleri Eğitim Programı, Nitel ve Nicel Analiz Yöntemleri Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi, Kurs, 06.02.2017 - 10.02.2017 (Ulusal)
3. PCR Temelli Genetik Analiz Yaklaşımlar, PCR Temelli Genetik Analiz Yaklaşımlar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Kurs, 09.06.2016 -10.06.2016 (Ulusal)
4. İş Sağlığı ve Güvenliği eğitim Programı, İş Sağlığı ve Güvenliği, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kurs, 22.06.2015 -22.06.2015 (Ulusal)

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

Türk Toksikoloji Derneği, Üye, 2016