

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ALZHEİMER TİPİ DEMANS İLE BDNF (BEYİN
KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR) GENİNİ
DÜZENLEYEN MİKRORNA POLİMORFİZMLERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYTEN TUNA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU

AYDIN-2023

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ayten TUNA tarafından hazırlanan “Alzheimer Tipi Demans ile BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör) Genini Düzenleyen mikroRNA Polimorfizmleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07 / 08 / 2023

Üye (T.D.) : Doç. Dr. Seda ÖRENAY
BOYACIOĞLU Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Elif Funda
ŞENER Erciyes Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yaşan Bilge
ŞAİR Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan numaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda bana yol gösterici olan, ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen, her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışmanım Doç. Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca öğrencilerine laboratuvarını açan ve desteğini esirgemeyen Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Olcay BOYACIOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim. Çalışma örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Uzm. Dr. Ayşe DÖNDÜ'ye teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen ve hep yanımda olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	İ
TEŞEKKÜR	İİ
İÇİNDEKİLER.....	İİİ
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
RESİMLER DİZİNİ	Xİ
TABLolar DİZİNİ.....	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT	XV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Demans	3
2.2. Alzheimer Tipi Demans.....	5
2.3. Alzheimer Tipi Demansın Epidemiyolojisi.....	7
2.4. Alzheimer Tipi Demansın Patofizyolojisi	7
2.4.1. Amiloid Beta Hipotezi.....	8
2.4.2. Tau Protein Hipotezi.....	9
2.5. Alzheimer Tipi Demansın Etiyolojisi.....	12
2.6. Etiyolojisinden Sonra Alzheimer Tipi Demansı Değerlendirme.....	13
2.7. Alzheimer Tipi Demansın Genetiği.....	14
2.8. Alzheimer Tipi Demansta Nörogörüntüleme ve Biyobelirteçler	17
2.9. Alzheimer Tipi Demansın Tedavisi.....	19
2.10. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör	26
2.11. BDNF Gen Yapısı ve Transkriptler.....	27

2.12. BDNF'nin Merkezi Sinir Sistemindeki Rollerini	29
2.13. BDNF'nin Alzheimer Tipi Demansta Nöroprotektif Rolü	30
2.14. MikroRNA (miRNA)	32
2.14.1. MiRNA Biyogenezi	32
2.14.2. MiRNA'nın mRNA Hedeflerini Düzenlemesi	34
2.14.3. Nörodejeneratif Bozukluklarda miRNA'lar	35
2.14.4. BDNF'yi Düzenleyen miRNA'ların AD'deki Etkileri.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Çalışma Gereçleri	37
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	37
3.1.2. Kullanılan Yazılımlar	37
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	38
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar.....	38
3.1.5. Kullanılan Kitler	39
3.1.6. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	39
3.2. Deneysel Çalışma Tasarımı	40
3.2.1. Araştırmanın Örneklem Büyüklüğü	41
3.2.2. Kontrol ve Hasta Grubunun Klinik Değerlendirme Ölçekleri.....	41
3.2.3. Kontrol ve Hasta Gruplarının Oluşturulması	41
3.2.3.1. Olguların Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	41
3.2.3.2. Olguların Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri.....	42
3.2.4. Alzheimer Tipi Demansta BDNF İlişkili miRNA'ların Seçilmesi.....	43
3.2.5. Genotipleme için miRNA Polimorfizmlerinin Seçilmesi.....	43
3.2.6. miRNA Polimorfizmleri İçin SNPTyp e Assay Yöntemine Uygun Primer Tasarımı.....	44
3.3. Çalışma Yöntemi	46
3.3.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu.....	46

3.3.2. SNP Genotipleme Testi: SNPTyping Assay.....	48
3.3.3. SNPTyping Assay Flex Six Chip Protokolü.....	49
3.3.3.1. 10X SNPTyping Specific Target Amplifikasyon (STA) Primer Havuzunun Hazırlanması	49
3.3.3.2. Spesifik Target Amplifikasyon (STA) Adımı	51
3.3.3.2.1. SNPTyping Primer Karışımının Hazırlanması.....	54
3.3.3.2.2. 10X Assay Karışımının Hazırlanması	54
3.3.3.2.3. Örnekler için Mix Hazırlanması	55
3.3.3.3. IFC Controllerda Genotyping Flex-Six Chip' in Prime Adımı	56
3.3.3.3.1. Genotyping Flex-Six Chip'e Pipetlemelerin Yapılması	58
3.3.3.4. IFC Controller da Genotyping Flex-Six Chip' in Load Adımı.....	58
3.3.3.5. Genotyping Flex-Six Chip' in BioMark' da Real-Time PCR Yöntemi ile Genotip Analizi	59
3.3.4. AD ve BDNF İlişkili miRNA Genlerine Ait SNP'lerin Data Analizi.....	61
3.4. İstatistiksel ve Analitik Olarak Çalışmanın Değerlendirilmesi	61
4. BULGULAR	62
5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	72
EK-1 (ADÜ-GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU).....	79
BİLİMSEL ETİK BEYANI	80
ÖZ GEÇMİŞ.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

T_m	: Erime Sıcaklığı
3'UTR	: 3' Untranslated Region; 3' Çevrilmeyen Bölgeler
ABCA7	: ATP Bağlayıcı Kaset Alt Aile A Üyesi 7
Ac-CoA	: Asetil Koenzim A
ACh	: Asetilkolin
AchE	: Asetilkolinesteraz
AD	: Alzheimer Tipi Demans; Alzheimer Hastalığı
ADNP	: Activity-Dependent Neuroprotective Protein; Aktiviteye Bağımlı Nöroprotektif Protein
Ago	: Argonat
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
aMCI	: Amnestik Hafif Bilişsel Bozukluk
ApoE	: Apolipoprotein E
APP	: Amiloid Öncü Protein
Arg	: Arginin
Asn	: Asparajin
ASP	: Allel Spesifik Primer
Asp	: Aspartik Asit
Aβ	: Amiloid-Beta Proteini
BBB	: Kan-Beyin Bariyeri
BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CAA	: Serebral Amiloid Anyiyopati

CDC	: Centers for Disease Control and Prevention; Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
ChAT	: Kolin Asetiltransferaz
CJD	: Creutzfeldt-Jakob Hastalığı
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
CNV	: Copy Number Variation; Kopya Sayısı Varyantları
CREB	: cAMP Response Element-Binding Protein
CSF	: Serebrospinal Sıvı (BOS)
DSM-V	: Psikiyatrik Hastalıkların Teşhis ve İstatistiksel Bilgileri
dsRNA	: Çift Zincirli RNA
ExAC	: The Exome Aggregation Consortium; Exome Birleştirme Konsorsiyumu
FAD	: Ailesel Alzheimer Hastalığı
FDG-PET	: Florodeoksiglukoz Pozitron Emisyon Tomografisi
fMRI	: Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme
FOXO3A	: Forkhead Box O-3
G/C	: Guanin/Sitozin Oranı
GLO1	: Glioksalaz-1
GWAS	: Genome-Wide Association Studies; Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HADÖ	: Hamilton Anksiyete Değerlendirme Ölçeği
HDDÖ	: Hamilton Depresyon Ölçeği
His	: Histidin
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
IDE	: Insulin-Degrading Enzyme; İnsülin Parçalayıcı Enzim
IFC	: Integrated Fluidic Circuit; Entegre Akışkan Devre
IL-1	: İnterlökin-1
In/dels	: İnsersiyon/delesyon

LSP	: Lokus Spesifik Primer
LTP	: Uzun Süreli Güçlenme
MAPT	: Mikrotübülle İlişkili Protein Tau
MCI	: Mild Cognitive Impairment; Hafif Bilişsel Bozukluk
MG	: Metilglioksal
miRNA	: Mikro RNA
MMSE	: Mini-Mental Durum Muayenesi
MPTP	: Metil Fenil Tetrahidropiridin Nörotoksin
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NFT	: Nörofibriler Yumaklar
NGF	: Nerve Growth Factor; Sinir Büyüme Faktörü
NGFR	: Sinir Büyüme Faktörü Reseptörü
NIA-AA	: Ulusal Yaşlanma Enstitüsü-Alzheimer Derneği
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
NSAID	: Steroid Olmayan Anti-İnflamatuar İlaç
NT	: Nörotrofinler
NTRK	: Nörotrofin Tirozin Reseptör Kinazlar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD	: Parkinson Hastalığı
PET	: Pozitron Emisyon Tomografi
PHF	: Eşleştirilmiş Sarmal Filamentler
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PiB	: Pittsburgh Bileşik-B
PLC-γ	: Fosfolipaz C-Gama
PSEN	: Presenilin
P-tau	: Fosforile Tau Protein

RISC	: RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rs	: Referans Sekans
RSV	: Resvaratrol
RT-PCR	: Real-Time PCR
SAD	: Sporadik Alzheimer Hastalığı
SCI	: Subjective Cognitive Impairment; Subjektif Bilişsel Bozukluk
SCID-I	: DSM-IV Eksen I Bozuklukları için Yapılandırılmış Klinik Görüşme
SCID-II	: DSM-III-R Kişilik Envanteri
SIRT1	: Sirtuin 1; Sirtuin Ailesine Ait Protein
siRNA	: Small İnterfering RNA; Küçük Engelleyici RNA
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism; Tek Nükleotid Polimorfizmi
SNpc	: Substantia Nigra Pars Compacta
SNPType	: Single Nucleotide Polymorphism Typing; Tek Nükleotid Polimorfizmi Tipleme
SOD2	: Süperoksit Dismutaz 2
SORL1	: Sortilin ile İlişkili Reseptör 1
STA	: Spesific Target Amplifikasyon
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TREM2	: Myeloid Hücrelerde Eksprese Edilen Tetikleyici Reseptör 2
TrkB	: Tropomiyozinle İlişkili Kinaz Reseptörü-B
WES	: Tüm Ekzom Dizilimi
WGS	: Tüm Genom Dizilimi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WT	: Yabanıl Tip
Y-BOKÖ	: Yale Brown Obsesif Kompulsif Bozukluk Ölçeği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Demansın nörodejeneratif ya da non-nörodejeneratif birçok nedene ayrımı.....	4
Şekil 2.	Çeşitli demans nedenleri ve ilişkili nöropatolojik özellikleri	5
Şekil 3.	Alzheimer tipi demansta erken etkilenen beyin bölümleri	6
Şekil 4.	AD' de amiloid plakların hücre dışı agregasyonu ve tau proteinlerinin hücre içi birikimi	8
Şekil 5.	Alzheimer tipi demansta amiloid oligomerlerinin ekstrasellüler birikimi	9
Şekil 6.	Tau proteinlerinin birikimi ve Alzheimer tipi demansta nörofibriler yumakların oluşumu	10
Şekil 7.	Tau proteininin beyin boyunca yayılma modeli, Braak aşamalarına göre değişimi	11
Şekil 8.	AD'ye neden olan bazı moleküler yollar	13
Şekil 9.	AD'de rol oynadığı bilinen genlere genel bir bakış	15
Şekil 10.	Sağlıklı bir birey ile Alzheimer tipi demansa sahip hastanın nörogörüntüleri.....	18
Şekil 11.	AD'nin nedenleri ve tedavi basamaklarında hedeflenen yollar	21
Şekil 12.	Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesteraz enzimini engeller	24
Şekil 13.	BDNF gen yapısı.....	27
Şekil 14.	AD ile ilgili BDNF'nin aracılık ettiği moleküler mekanizmalar.....	31
Şekil 15.	RNA interferans; miRNA ve siRNA Biyogenezi	33

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Minisantrifüj ve ISOLAB Laborgerate Vorteks Cihazı.....	47
Resim 2.	Eppendorf Centrifuge 5702-Santrifüj Cihazı.....	47
Resim 3.	PhileKorea Heating Block Shaker-Çalkalamalı Isıtıcı.	47
Resim 4.	Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spektrofotometre.....	48
Resim 5.	Nüve LN 120 Klas II Biyogüvenlik Kabini.....	50
Resim 6.	PhileKorea Multi Shaker-Well Plate/Piko Plate Karıştırıcı.....	52
Resim 7.	EcoMate 2500 rpm Plate Santrifüjü.....	52
Resim 8.	Piko plateler BİOER Gene-Pro Thermal Cycle cihazına yerleştirilmiş.....	53
Resim 9.	96x96 Dynamic Array; Genotyping Flex-Six Chip.....	57
Resim 10.	Fluidigm IFC Controller (Integrated Fluidic Circuit; Entegre Akışkan Devre). .	57
Resim 11.	Fluidigm IFC Controller'de Flex-Six Chip'in mix ve assayların reaksiyon kanallarına yüklenmesi.....	58
Resim 12.	BioMark HD Real-Time PCR cihazına Genotyping Flex-Six Chip' in yüklenmesi	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Mükemmel bir AD ilacı için belirli kriterler.	22
Tablo 2.	Proteinaz K için gerekli bileşenler.....	39
Tablo 3.	Wash Buffer W1 için gerekli bileşenler.	40
Tablo 4.	Wash Buffer W2 için gerekli bileşenler.	40
Tablo 5.	SNP' ler için Real-Time PCR Primer Dizilerinin Sentezlenmesi.	45
Tablo 6.	STA primer havuzu için gerekli bileşenler.....	50
Tablo 7.	STA karışımı için gerekli bileşenler.	51
Tablo 8.	SNPtype Primer karışımı için gerekli bileşenler.	54
Tablo 9.	10X Assay karışımı için gerekli bileşenler.....	55
Tablo 10.	Örnek Mixi için gerekli bileşenler.....	56
Tablo 11.	BioMark HD' de SNPtype Flex-Six için Real-Time PCR termal döngüleri.....	60
Tablo 12.	Alzheimer tipi demans ve kontrol grubunun miRNA genotip dağılımının karşılaştırılması.....	64
Tablo 13.	Alzheimer tipi demans ve kontrol grubunun miRNA allel frekans dağılımının karşılaştırılması.....	65

ÖZET

ALZHEİMER TİPİ DEMANS İLE BDNF (BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR) GENİNİ DÜZENLEYEN MİKRORNA POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuna A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Alzheimer tipi demans, nöron kaybı ve defektleriyle ilişkili bir nörodejeneratif hastalıktır. BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör), nöronların hayatta kalması ve fonksiyonu için önemlidir ve Alzheimer dahil nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. MikroRNA'lar (miRNA'lar), BDNF geninde dahil gen ekspresyonunun düzenlenmesinde hayati bir rol oynayan küçük, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. Biriken veriler, BDNF sentezinin miRNA'lardan etkilenebileceğini, aslında BDNF ve miRNA'lar arasında düzenleyici bir negatif geri besleme döngüsü olduğunu göstermektedir. Bu açıdan araştırmamızda, Alzheimer tipi demans hastalarında BDNF genini düzenleyen miRNA polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Aydın Devlet Hastanesi Psikiyatri polikliniğine başvuran 70 Alzheimer Tipi Demans hastası ile yine Psikiyatri polikliniğine başvuran ve Alzheimer tipi Demans ile başka nörodejeneratif hastalığı bulunmayan aynı yaş grubunda 70 sağlıklı birey dahil edildi. Çalışmada, Entegre Akışkan Devre (IFC) tabanlı bir BioMark teknolojisi kullanılarak nanolitre hacimlerinde reaktiflerle genotipleme yapıldı. Fluidigm tarafından geliştirilen SNPTYPE Paneli, hasta ve kontrol grubumuzun DNA örnekleri üzerinde 5 ilişkili miRNA bölgesini incelemek için kullanıldı.

Bulgular: Alzheimer tipi demans ve kontrol grupları arasında cinsiyet ve yaş bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Alzheimer tipi demans grubu ile kontrol grubunun karşılaştırılması sonucu *miR-206*, *miR-30e*, *miR-26b* polimorfizmlerinin genotip dağılımında ve *miR-30e* ve *miR-206* polimorfizmlerinin allel frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görüldü ($p < 0,05$).

Sonuç: Araştırmamızın potansiyel sonuçları, Alzheimer tipi demansın mekanizmalarını anlamaya yönelik bilgi sağlayabilir ve miRNA polimorfizmlerini biyobelirteç olarak kullanarak Alzheimer predispozisyonu belirleme ve demans alt tiplerini ayırt etme konusunda katkıda bulunabilir. Ayrıca, miRNA'lar ve BDNF arasındaki ilişkinin terapötik etkilerini araştırarak Alzheimer hastalığına profilaktik etkili hedefli tedaviler geliştirilebilir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer tipi demans, Alzheimer hastalığı, BDNF geni, BDNF genini regüle eden miRNA'lar, SNPTyp e Assay

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN ALZHEIMER'S TYPE DEMENTIA AND MICRORNA POLYMORPHISMS REGULATING THE BDNF (BRAIN INHERITED NEUROTROPHIC FACTOR) GENE

Tuna A. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Molecular Biotechnology Program, Master Thesis, Aydın, 2023.

Objective: Alzheimer's type dementia is a neurodegenerative disease associated with neuronal loss and defects. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) plays a crucial role in the survival and function of neurons and has been linked to neurodegenerative diseases, including Alzheimer's. MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA molecules that play a vital role in regulating gene expression, including the BDNF gene. Accumulating evidence suggests that BDNF synthesis may be influenced by miRNAs, establishing a regulatory negative feedback loop between BDNF and miRNAs. Therefore, the aim of our research is to investigate miRNA polymorphisms regulating the BDNF gene in patients with Alzheimer's type dementia.

Materials and Methods: The study included 70 patients with Alzheimer's type dementia and 70 healthy individuals of the same age group without any other neurodegenerative diseases, who visited the Psychiatry Clinic of Aydın State Hospital. Genotyping with reactive agents in nanoliter volumes was performed using Integrated Fluidic Circuit (IFC)-based BioMark technology. The SNPTyping Panel developed by Fluidigm was used to examine five related miRNA regions in the DNA samples of our patient and control groups.

Results: There was no statistically significant difference in gender and age between the Alzheimer's type dementia and control groups. A comparative analysis of the Alzheimer's type dementia group and the control group revealed statistically significant differences in the genotypic distribution of *miR-206*, *miR-30e*, and *miR-26b* polymorphisms, as well as the allele frequencies of *miR-30e* and *miR-206* polymorphisms ($p < 0.05$).

Conclusion: The potential findings of our research could provide insights into the mechanisms of Alzheimer's type dementia and contribute to identifying Alzheimer's predisposition and distinguishing dementia subtypes using miRNA polymorphisms as biomarkers. Furthermore,

investigating the relationship between miRNAs and BDNF may lead to the development of targeted therapeutic interventions with prophylactic effects against Alzheimer's disease at a molecular level.

Keywords: Alzheimer type dementia, Alzheimer's disease, BDNF gene, miRNAs regulating the BDNF gene, SNPTyping Assay

1. GİRİŞ

Alzheimer tipi demans (AD), dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Amiloid-beta plaklarının birikmesi, nörofibriler yumaklar ve sinaptik disfonksiyon ile karakterize olup, kognitif bozukluk ve hafıza kaybına yol açar. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi nörotrofik faktörler, nöral hücrelerin gelişimini, hayatta kalmasını ve bakım işlevini destekler. Sinaptik yarık içindeki BDNF sekresyonu, uzun süreli güçlenme tarafından modüle edilir ve bu da nörobilişsel açıdan hafızayı ve öğrenme işlevini etkiler ve birbirine bağlar. Yakın tarihli çalışmalarda BDNF, AD'de meydana gelen nöropatolojik değişiklikler sırasında A β ve tau proteinlerinin toplanmasının neden olduğu nöral hücre ölümüne karşı koruyan, nöral plastisitenin moleküler bir düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunun düzenlenmesinde hayati bir rol oynayan küçük, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir. Haberci RNA'ya (mRNA) bağlanırlar ve translasyonunu engellerler ya da degradasyonunu indüklerler. MiRNA polimorfizmlerinin, BDNF geni dahil olmak üzere çeşitli genlerin regülasyonunda görev aldıkları tanımlanmıştır. Bu polimorfizmler, Alzheimer tipi demansın yanı sıra diğer nörolojik bozuklukları geliştirme riskiyle ilişkilendirilmiştir. Bu açıdan çalışmamızda Alzheimer tipi demans ile BDNF genini düzenleyen miRNA polimorfizmleri araştırılmıştır.

Alzheimer tipi demans ile BDNF genini düzenleyen miRNA polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması birkaç nedenden dolayı önemlidir. İlk olarak, Alzheimer tipi demansın gelişimine katkıda bulunan genetik faktörleri anlamak, etkili önleme ve tedavi stratejileri geliştirmek için çok önemlidir. BDNF geninin ekspresyonunu etkileyen spesifik miRNA polimorfizmlerinin belirlenmesi, hastalığın altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir ve potansiyel olarak yeni tedavilerin geliştirilmesine yol açabilir.

İkincisi, BDNF'nin hastalık sürecindeki rolü hakkında fikir verebilir. BDNF, sinaptik plastisite ve nöroproteksiyon dahil olmak üzere nöronal fonksiyonun çeşitli yönlerinde yer alır. Alzheimer tipi demans hastalarının beyinlerinde azalmış BDNF seviyeleri gözlemlenmiştir ve BDNF ekspresyonunun artırılması, potansiyel bir terapötik strateji olarak önerilmiştir.

Sonuç olarak, Alzheimer tipi demans ile BDNF genini düzenleyen miRNA polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması, hastalığa yol açan mekanizmaların

anlaşılması, yeni tedavilerin geliştirilmesi ve erken teşhis için biyobelirteçlerin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu alanda daha fazla araştırma, Alzheimer hastalığının önlenmesi ve tedavisinde önemli ilerlemelere yol açabilir.

2. GENEL BİLGİLER

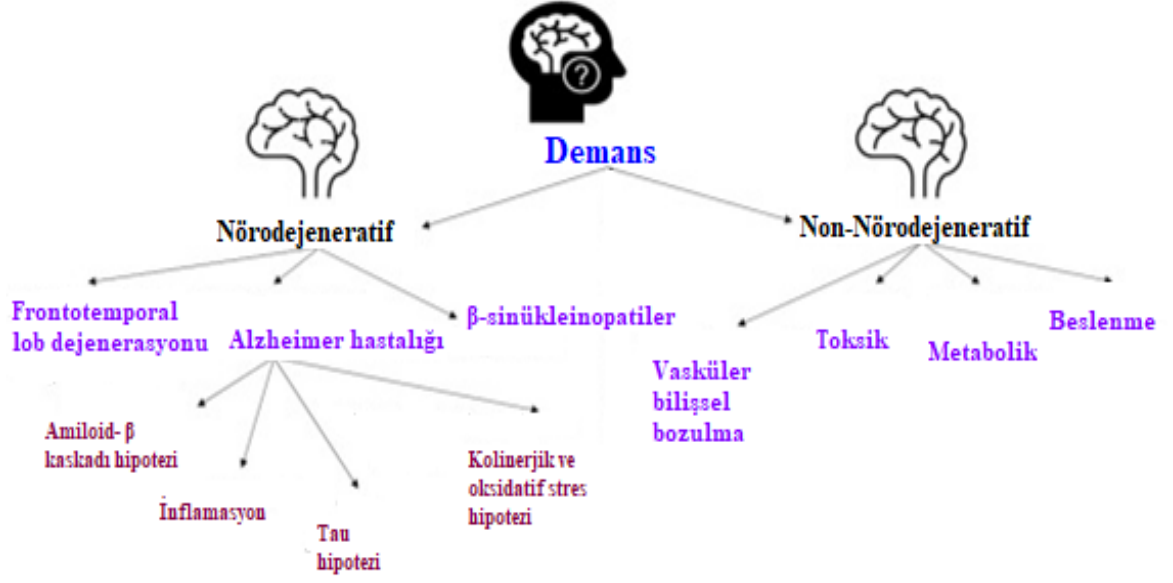
2.1. Demans

Demans, beyin fonksiyonlarında bozulmalara yol açarak günlük yaşamı etkileyen zihinsel yetilerin düşüş durumudur. Çeşitli olası nedenlere sahiptir ve bilişsel gerilemeyi tanımlamak için kullanılır. Spesifik bir hastalık değil, bir sendrom veya bir dizi semptomdur. Beyin hücrelerinin hasar görmesiyle semptomlar genellikle hafıza kaybı, kafa karışıklığı, dil ve iletişimde zorluk, muhakeme bozukluğu, davranış ve kişilik değişikliklerini içerir (Malik ve diğerleri, 2022).

Demansın dünya genelinde yetişkinlerin %7'sini etkilediği düşünülmektedir ve gelişmiş ülkelerde yaşam beklentilerinin artması nedeniyle bu oran (%8-10) biraz daha yüksektir. Demansın nedensel faktörleri arasında yaşlanma (en büyük risk faktörü), genetik faktörler ve sistemik vasküler bozukluklar bulunur (Rao ve diğerleri, 2023).

Demans insidansı hızla artmakta ve son yıllarda önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir. Yılda 7,7 milyon yeni demans vakası teşhis edilmektedir ve bu kanser ve kalp hastalığından daha fazla tıbbi maliyeti beraberinde getirir. Demanslar çok faktörlü nedenleri, örtüşen semptomları ve çeşitli dejeneratif patolojileri içerdiğinden klinik olarak teşhis edilmesi zor vakalardır. Bu durum tutarsız klinik sunular ve tanısal zorluklara neden olur (Raz ve diğerleri, 2016).

Demans basitçe nörodejeneratif (önceden geri dönüşümsüz olarak biliniyordu) ve nörodejeneratif olmayan (potansiyel olarak tersine çevrilebilen) olarak iki türde değerlendirilebilir (Şekil 1). Hastalar, bilişsel bozulmaya yol açan hem nörodejeneratif hem de non-nörodejeneratif birçok nedene sahip olabilir.

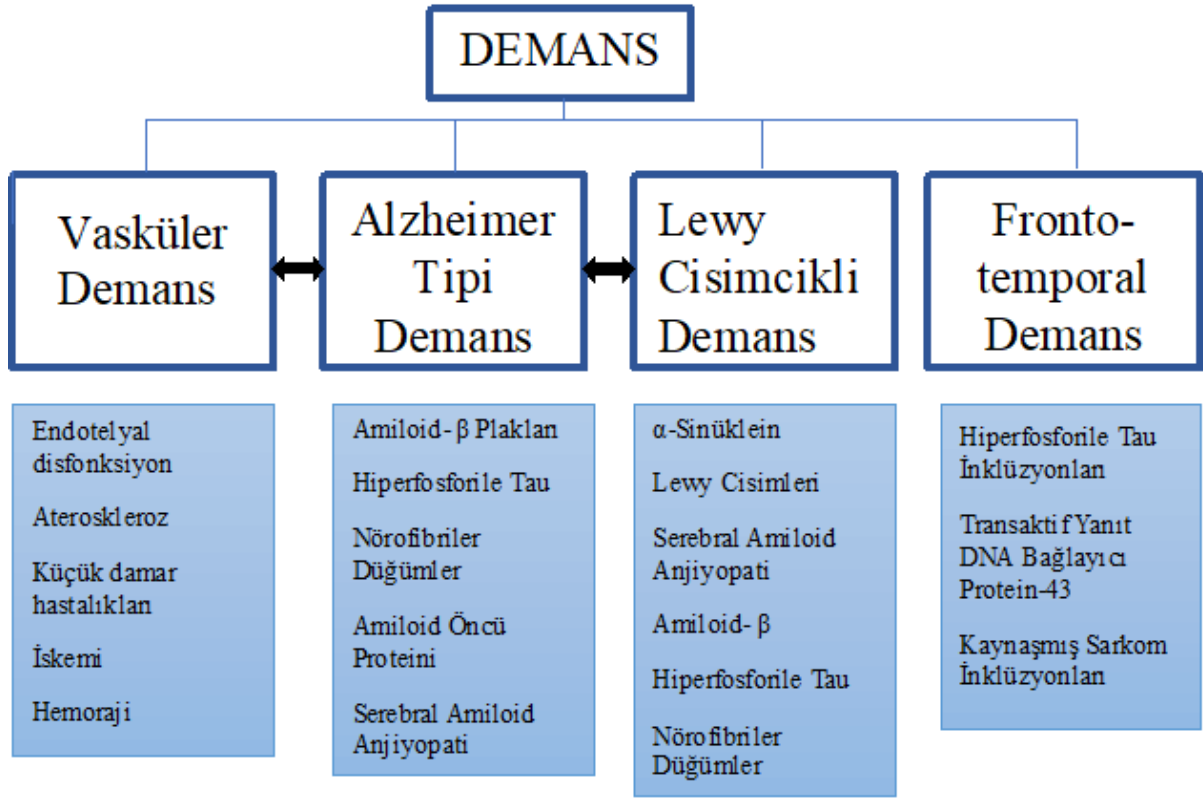


Şekil 1. Demansın nörodejeneratif ya da non-nörodejeneratif birçok nedene ayrımı (Malik ve diğerleri, 2022).

Nörodejeneratif olmayan hafif bilişsel bozulmadan sorumlu etkenler, B12 ve D vitamini eksiklikleri, yetersiz tiroid (hipotiroidizm), kronik alkol kullanımı, kemoterapi, hidrocefali, insan immün yetmezlik virüsü gibi viral enfeksiyonlar, subdural hematomlar, beyin tümörü, travmatik beyin hasarı, anksiyete ve depresyon gibi psikiyatrik zayıflıklardır.

Öte yandan nörodejenerasyon, yetişkinlerde demansın birincil nedenidir ve yaşlı nüfus arasında yaygın olan dejeneratif demanslar arasında; Vasküler Demans, Alzheimer Tipi Demans, Lewy Cisimcikli Demans ve Frontotemporal Demans yer alır (Şekil 2). İster erken ister geç teşhis edilsin, günlük işleyişi değiştirmeden bilişsel işlevi bozan hastalıklar, "Hafif Nörobilişsel Bozukluk" (DSM-V¹'ye göre) ve "Hafif Bilişsel Bozukluk" olarak adlandırılır (Malik ve diğerleri, 2022).

¹ DSM-V, tam adıyla "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition," Psikiyatrik hastalıkların teşhis ve istatistiksel bilgilerini içeren beşinci baskısıdır. DSM-V, Amerikan Psikiyatri Birliği (American Psychiatric Association - APA) tarafından geliştirilmiş ve yayınlanmıştır.



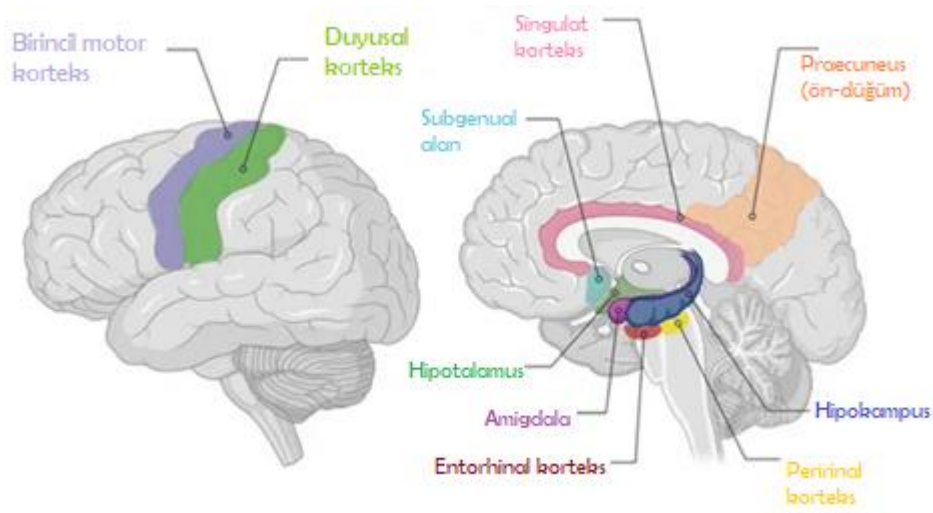
Şekil 2. Çeşitli demans nedenleri ve ilişkili nöropatolojik özellikleri. Dört temel demans kategorisini, ilgili nöropatolojik bulgularla birlikte listeleyen bir sınıflandırma mevcuttur. Bu bulgular beyindeki belirli değişiklikleri yansıtır. İki demans türü arasında ortak bir hastalık nöropatolojisine işaret eden çift taraflı oklarla temsil edilen karma bir fenotip bulunmaktadır. (Raz ve diğerleri, 2016).

Demansın klinik sendromu, 60'tan fazla bilişsel bir bozuklukla ilişkilidir lakin en sık görülen nörodejeneratif hastalık yaklaşık %60-70 ile Alzheimer tipi demanstır (Dodel, 2023).

2.2. Alzheimer Tipi Demans

Alzheimer hastalığı (AD) olarak da bilinen Alzheimer tipi demans, 1906'da Alman psikiyatrist ve nöropatolog Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Alzheimer demansı, nörobilişsel işlevi kesintiye uğratan, hafıza bozukluğu ve davranış değişiklikleri ile karakterize kronik nörolojik bir hastalıktır. Durum, bireyin günlük aktivitelerini gerçekleştirme yeteneğini kademeli olarak bozarak, önemli işlevsel ve sosyal bozukluklara yol açar (Dodel, 2023).

Alzheimer'da ilk hasar gören nöronlar, beynin hafıza, dil ve düşünceden sorumlu bölgelerinde yer alır. Beyinde belirli alanların ilk etkilenenler arasında olduğu, diğer bölgelerin ise yalnızca AD'nin şiddetli aşamalarında bozulacağı bir yayılma sergiler. AD'yi karakterize eden en erken değişiklikler; medial temporal lob yapılarında, entorhinal ve peririnal kortekste ve hipokampusta bulunur (Şekil 3). Bu semptomlar etkilenen birey için yeni olsa da, bunlara neden olan beyin değişikliklerinin semptomlar başlamadan 20 yıl veya daha önce başladığı düşünülmektedir ve semptomların başlamasından sonra Alzheimer için ortalama hayatta kalma süresi 10-12 yıldır (Alzheimer's disease facts and figures, 2023; Van Oostveen ve Lange, 2021).



Şekil 3. Alzheimer tipi demansta erken etkilenen beyin bölümleri (Van Oostveen ve Lange, 2021).

Alzheimer hastalığı ilerleyici bir hastalıktır ve ne kadar hızlı ilerlediği ve hangi yeteneklerin etkilendiği kişiden kişiye değişir. Bununla birlikte ilerleyici bir hafıza kaybının yanında nadir durumlarda, davranışsal, görsel-uzaysal veya dilbilimsel belirtiler de hakimdir. Alzheimer'lı bireyler ruh hallerinde, kişiliğinde veya davranışlarında değişiklikler geliştirebilir. Hastalar belirli bir konumdan uzaklaşır ancak geri adımlarını takip edemeyerek kaybolabilir. Bu da kaybolan hastaları önemli yaralanma ve ölüm riskine sokabilir (Malik ve diğerleri, 2022).

Zaman geçtikçe daha fazla nöron hasar görür ve beynin daha fazla bölgesi etkilenir. Giyinme ve banyo yapma gibi günlük yaşam aktivitelerini yürütmek ve bireyi güvende tutmak için aile üyelerinden, arkadaşlardan ve bakıcılardan artan yardıma ihtiyaç duyulur. Sonunda, Alzheimer'ın nöronal hasarı, beynin yürüme ve yutkunma gibi temel bedensel işlevleri sağlayan

bölümlerine kadar uzanır. Bireyler yatağa bağlı hale gelir ve 24 saat bakım gerektirir. Sonuçta, Alzheimer hastalığı bireyleri ölüme kadar sürükler (Alzheimer's disease facts and figures, 2023).

2.3. Alzheimer Tipi Demansın Epidemiyolojisi

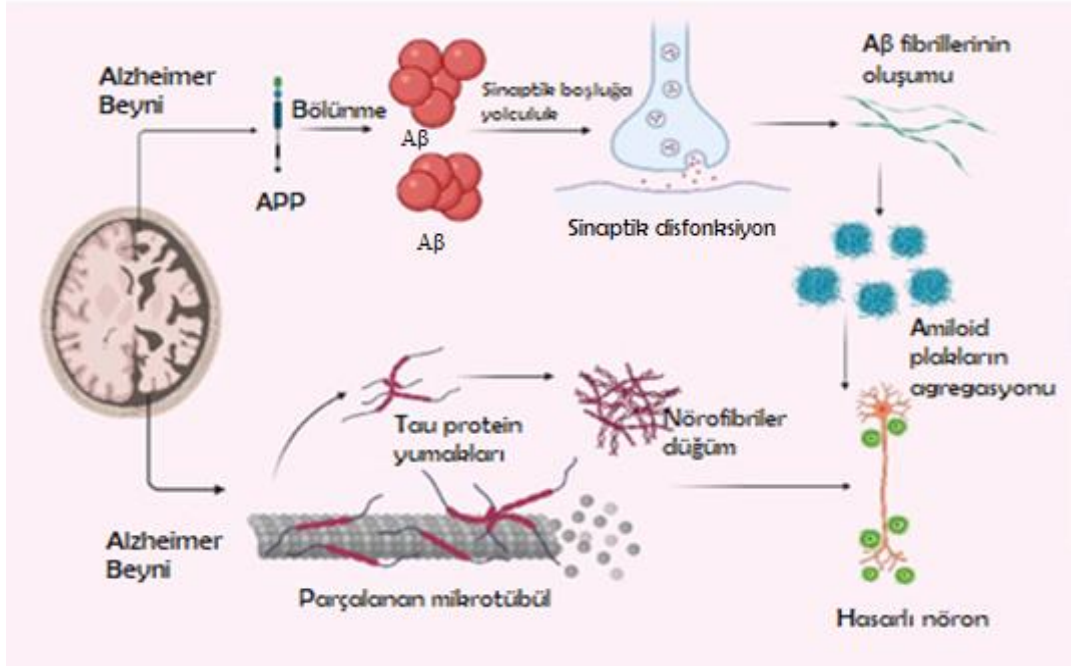
Alzheimer hastalığı esas olarak yaşlı popülasyonu etkileyen en büyük nörodejeneratif demans olarak kabul edilir. 65 yaş ve üzerindekiilerin %5-6'sı ve 85 yaş ve üzerindekiilerin %30'una kadarını etkiler. Tüm vakaların yaklaşık %5'inin erken başlangıçlı olduğu, yani 65 yaşından genç bireylerde olduğu tahmin edilmektedir (Malik ve diğerleri, 2022).

Hastalık dünya çapında milyonlarca kişiyi etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerine (CDC) göre, 2020'de 134.242 kişiye AD tanısı kondu. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yakın tarihli bilgi notuna göre, dünya çapında 50 milyon demans hastası vardır ve vakaların %60-70'ine Alzheimer tipi demans neden olur. Dünya nüfusu yaşlandıkça, hastalığın prevalansının katlanarak artması beklenmektedir. AD'nin ekonomik ve toplumsal yükü, önemli sağlık hizmetleri, maliyetleri ve bakıcı baskısı ile çok büyüktür (Amin ve diğerleri, 2023).

2.4. Alzheimer Tipi Demansın Patofizyolojisi

Alzheimer tipi demansın patofizyolojisi, genetik, çevresel ve yaşa bağlı faktörler arasındaki karmaşık etkileşimi içerir. Hastalığın bilişsel bozukluğun saptanmasından önceki hücresel aşaması, prelinik aşama olarak bilinir. Hastalık nöronlar, astroglia ve mikroglia'daki değişiklikler nedeniyle yavaş ilerler.

AD'nin nöropatolojik ayırt edici özellikleri, toksik amiloid-beta (A β) oligomerlerinden oluşan protein plakların ve hiperfosforile edilmiş mikrotübül ile ilişkili protein Tau (P-tau)'dan oluşan nörofibriler yumakların intranöronal birikimidir (Katta ve diğerleri, 2022) (Şekil 4).

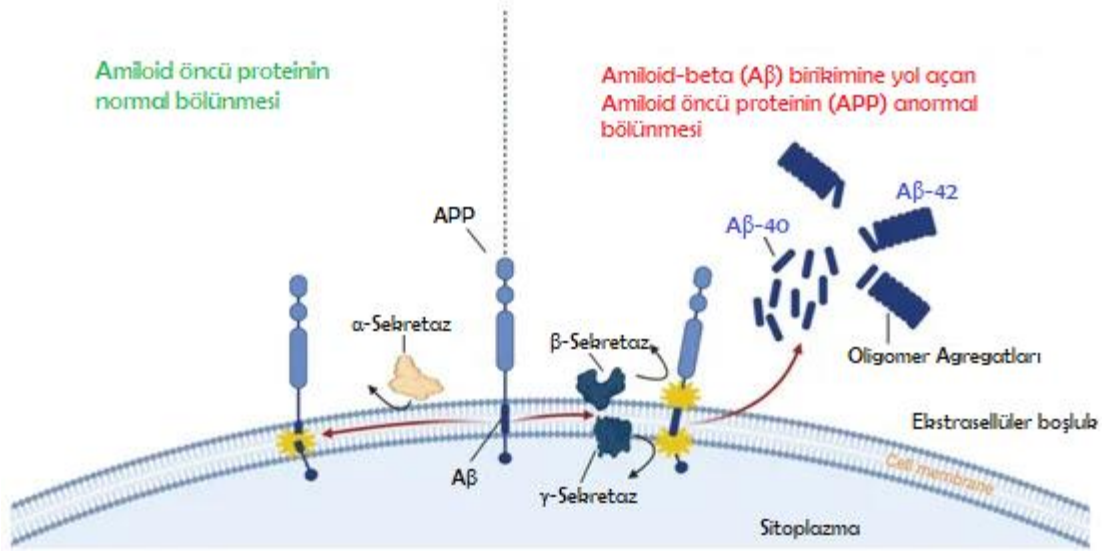


Şekil 4. AD'de amiloid plakların hücre dışı agregasyonu ve tau proteinlerinin hücre içi birikimi (Katta ve diğerleri, 2022).

2.4.1. Amiloid Beta Hipotezi

Amiloid öncü proteini (APP), 21. kromozomda bulunan *APP* geni tarafından kodlanır ve nöronal sitoplazmada çözünmeyen Amiloid-beta proteini için bir öncül oluşturur. Amiloid-beta teorisine göre (AD patogenezi hakkında en çok kabul gören teorilerden biri, ancak halen tartışılmaktadır), bu proteinin üretimi ve klirensi arasındaki dengesizlikten kaynaklanan Aβ peptidinin serebral birikimi, hastalığa neden olan ana olaydır. Normal metabolik düzende Aβ peptidi 36 ila 43 aminoasit içeren, beyin homeostazında önemli roller oynayan fizyolojik olarak üretilen bir proteindir (Klyucherev ve diğerleri, 2022).

Üç proteaz alfa, beta ve gama-sekretaz APP metabolizmasında APP'yi sıralı bir şekilde bölmekten sorumludur. APP, nöronlar, vasküler ve kan hücreleri (trombositler dahil) tarafından ve daha az ölçüde astrositler tarafından üretilir. Metabolik koşullar bozulduğunda sekretazlar APP'yi amiloid-beta 40(Aβ40) ve nörotoksositeye neden olduğu bilinen amiloid-beta 42 (Aβ42)'ye ayırırlar. Aβ42 peptidi, Aβ40'tan daha fazla agregasyona meyillidir. γ-sekretaz tarafından ardışık bölünmede, nörotoksik Aβ peptitleri hücre dışı beyin omurilik sıvısına ve plazmaya salınır (Ballard ve diğerleri, 2011) (Şekil 5).



Şekil 5. Alzheimer tipi demansta amiloid oligomerlerinin ekstrasellüler birikimi (Van Oostveen ve Lange, 2021).

AD'de bu A β plaklar, gri maddede, serebral ve meningeal damarların çevresinde birikir. Plaklar ve daha küçük A β birikimleri, sinaptik iletişime müdahale ederek sinyal iletimine zarar verir. Asetilkolin, dopamin gibi nörotransmitterlerin ve norepinefrin gibi katekolaminlerin AD'da düşük seviyelerinin ölçülmesi bunu doğrular (Dodel, 2023).

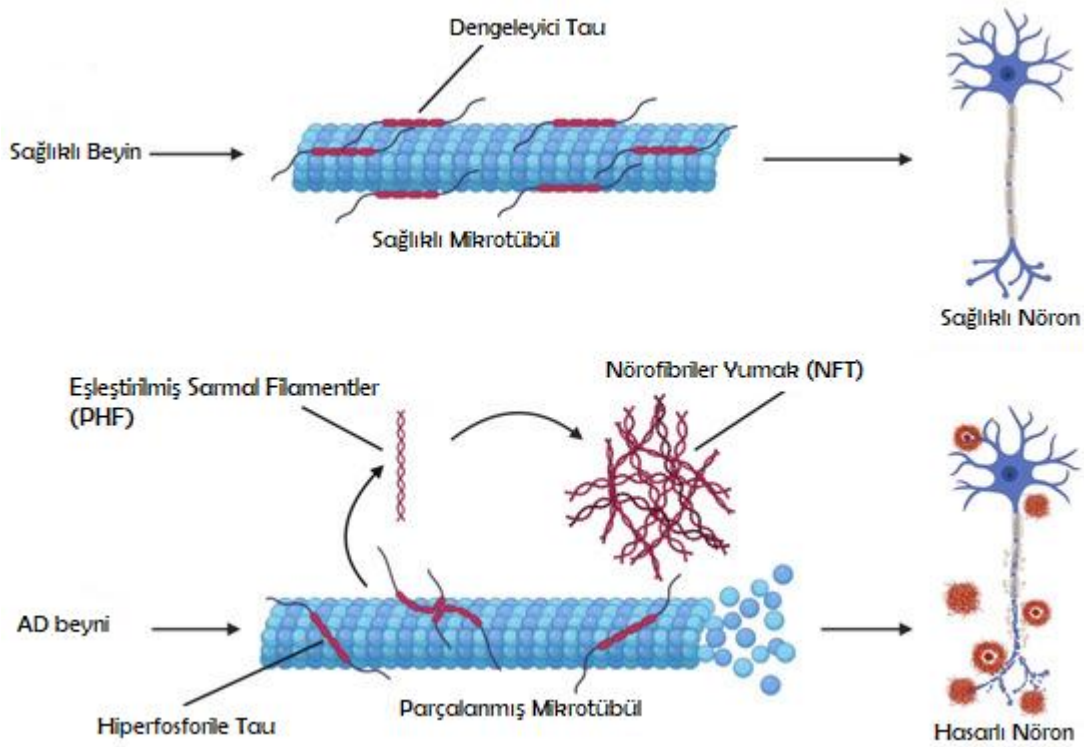
Anti-A β monoklonal antikorların kullanıldığı ilk randomize klinik deneyler plasebo gruplarına kıyasla tedavide daha yüksek sayıda Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) bulgusu bildirmiştir. Bu amiloid ile ilgili görüntüleme anormallikleri, muhtemelen beyin parankiminden kan dolaşımına antikor aracılı A β akışı tarafından getirilen artmış kan-beyin bariyeri (Blood Brain Barrier; BBB) geçirgenliğine işaret etmektedir (Prajwal ve diğerleri, 2023). Bu patolojik beyin değişiklikleri, nöronal dejenerasyon, nöroinflamasyon, mikroglia aktivasyonu, BBB disfonksiyonu ve bilişsel gerileme ile pozitif korelasyon gösterir (Raz ve diğerleri, 2016).

2.4.2. Tau Protein Hipotezi

Tau proteinleri, kromozom 17 üzerindeki MAPT (Mikrotübülle İlişkili Protein Tau) geninin alternatif splayısı ile sentezlenen, çözünür proteinlerden oluşan bir gruptur. Tau, aksonal mikrotübüller dahilinde mikrofilamentler ve ara filamentler ile birlikte hücre iskeletini oluşturan protein komplekslerinin stabilitesi ve bunların montajı için gereklidir. Mikrotübüller,

nöronlarda hücreler arası taşıma için önemlidir. Genel olarak nörona özgü hücre iskeleti proteinleri olarak kabul edilmekle birlikte, tau izoformları Merkezi Sinir Sistemi (CNS) astrositleri ve oligodendrositlerinde çok düşük seviyelerde ifade edilir.

Tau, amiloid-beta varlığı nedeniyle hiperfosforile edilir. Bu hiperfosforilasyon proteinin kümelenmesine ve Nörofibriler Yumaklar (NFT)'in oluşmasına neden olur. Tau kümeleri daha sonra bükülmüş sarmal yapılar oluşturur ve bu durum bozulmuş sinaptik plastisite ile ilişkilidir. (Prajwal ve diğerleri, 2023) (Şekil 6).

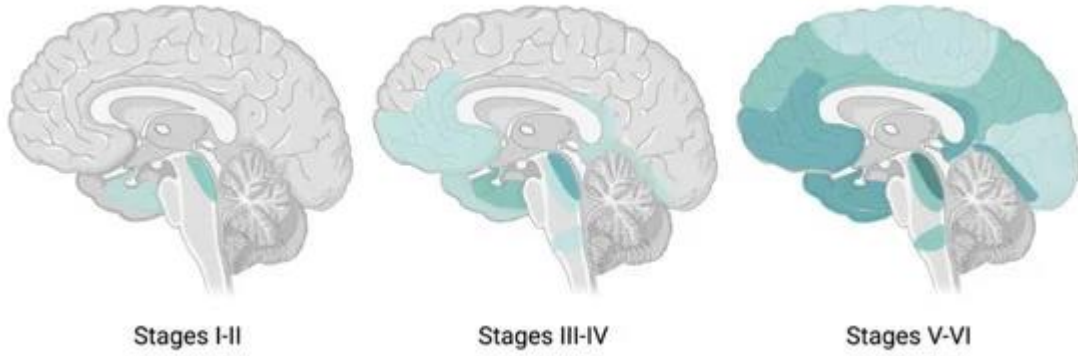


Şekil 6. Tau proteinlerinin birikimi ve Alzheimer tipi demansta nörofibriler yumakların oluşumu (Van Oostveen ve Lange, 2021).

Tau proteinlerinin Eşleştirilmiş Sarmal Filamentleri (PHF), Alzheimer hastalığında ve diğer bazı nörodejeneratif tauopatilerde beyindeki intranöronal lezyonların ayırt edici özelliğidir (Dodel, 2023). Tau kaybı nedeniyle sinaptik disfonksiyon meydana gelir. Araştırmalar, yumakların Alzheimer hastalığı ile senil plaklardan daha güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir. Pek çok çalışma, yetişkin hipokampusta Tau proteininin sinaptik kusurlara neden olabileceği, konsantrasyonun düşmesini ve motor koordinasyonu

etkileyebileceğini bulmuştur. Tau proteinini kodlayan MAPT genindeki mikrodelsiyonlar nedeniyle Tau azaldığında CNS'de gelişimsel sorunlar görülmüştür. Tau-PET görüntüleme kullanılarak toplanan birincil veriler, amiloid beta'nın tau proteini birikimini ve bunun ekstrasellüler matrise yayılmasını hızlandırmaktan sorumlu olduğunu düşündürmektedir (Prajwal ve diğerleri, 2023).

Benzer şekilde, hiperfosforilasyon NFT'lere yol açarak nihayetinde bilişsel gerilemeye yol açar. 1991'de Braak ve Braak, NFT'lerin beyin boyunca yayılmasını altı farklı aşama tanımladılar. Bu Braak aşamaları adı verilen evreler, Alzheimer ilerledikçe NFT'lerin transentorhinal bölgelerden (evre I/II) limbik alanlara (evre III/IV) ve neokortikal bölgelere (evre V/VI) genişlemesine karşılık gelir (Van Oostveen ve Lange, 2021) (Şekil 7).



Şekil 7. Tau proteininin beyin boyunca yayılma modeli, Braak aşamalarına göre değişimi (Van Oostveen ve Lange, 2021).

Alzheimer ile ilişkili diğer beyin değişiklikleri arasında inflamasyon ve atrofi (azalmış beyin hacmi) bulunur. Beyin atrofisi, özellikle hipokampal ve neokorteks atrofisi ve büyük beyaz madde hiperintensiteleri gibi diğer önemli değişiklikler de mevcut olabilir. Toksik A β ve tau proteinlerinin varlığının, beyindeki mikrogliya adı verilen bağışıklık sistemi hücrelerini aktive ettiği düşünülmektedir. Mikrogliya, nekrotik hücrelerden toksik proteinlerin yanı sıra yaygın kalıntıları temizlemeye çalışır. Kronik inflamasyon, mikrogliya temizlenmesi gereken her şeye ayak uyduramadığında ortaya çıkabilir. Hücre kaybı nedeniyle atrofi oluşur. Nörodejenerasyona (atrofi ve nöronal kayıp dahil) beynin ana yakıtı olan glikozu metabolize etme yeteneğindeki azalmalar, sinaptik disfonksiyon, mitokondriyal disfonksiyon, vasküler

değişiklikler, nöro-inflamasyon, yaşlanma ve lenfatik sistem yetmezliği eşlik eder (Alzheimer's disease facts and figures, 2023; Klyucherev ve diğerleri, 2022).

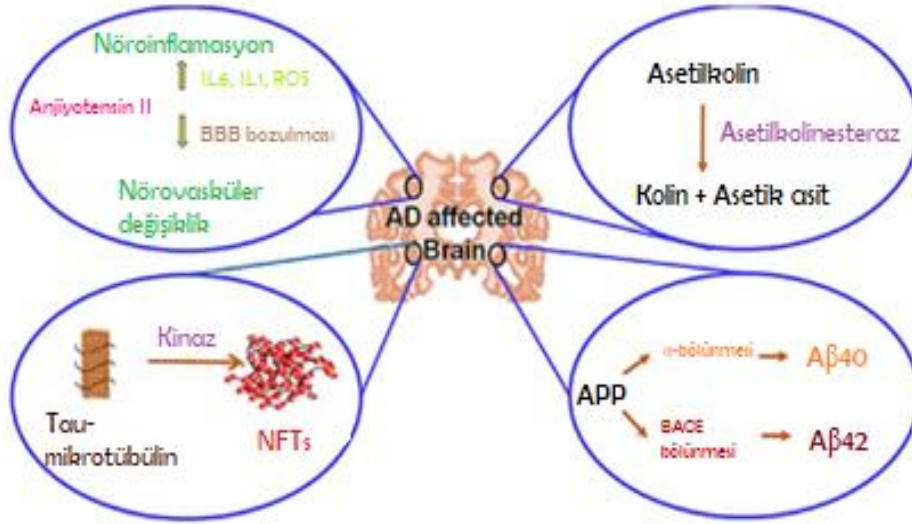
AD'de patolojilerin ortaya çıkışı ve birikmesi, immün fonksiyonların erken bozulmasının ve ortaya çıkan nöro-inflamasyonun bir sonucudur. AD ile önceki enfeksiyon veya diyabet öyküsü arasında bağlantı kuran epidemiyolojik kanıtlar vardır ve bu da inflamasyonun AD patolojisini başlatan bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Aslında, normalde mikroglia tarafından temizlenen A β , mikroglia'nın aktivasyon fenotipini indükleyerek kemokin salınımına ve lokal inflamasyona yol açabilir. inflamasyonun yayılması A β klirensini etkiler ve Tau fosforilasyonunu ve müteakip nörodejenerasyonu artırır (Klyucherev ve diğerleri, 2022).

2.5. Alzheimer Tipi Demansın Etiyolojisi

Alzheimer tipi demansın etiyolojisi belirsizliğini korusada genetik varyantların ve diğer çevresel veya genetik olmayan faktörlerin kombinasyonundan etkilendiğine dair bulgular biliniyor. Muhtemelen tek bir neden değil, her kişiyi farklı şekilde etkileyebilecek birkaç faktör patolojiye katkıda bulunur. Ailede Alzheimer öyküsü bulunup belirli genetik mutasyonları taşıyanların Alzheimer hastalığını geliştirme riski yüksektir. Bunun yanında AD için çevresel veya genetik olmayan faktörler;

- ✓ İleri yaş; hastalığın gelişmesi için en büyük risk faktörüdür ve insidans 65 yaşından sonra önemli ölçüde artmakta,
- ✓ Kardiyovasküler risk faktörleri; Hipertansiyon, Tip II Diyabet, Yüksek Kolesterol dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıklara sebebiyet veren etkenler,
- ✓ Travmatik beyin hasarı,
- ✓ Alüminyum metal maruziyeti,
- ✓ Bulaşıcı ajanlar,
- ✓ Depresyon gibi psikiyatrik faktörler,
- ✓ İskemik inme, metabolik sendrom, obezite, menopoz, dislipidemi, bilişsel hareketsizlik gibi faktörler,
- ✓ Sigara, psikoaktif maddeler,
- ✓ Diyet ve sağlıksız beslenme gibi yaşam tarzı faktörleride bulunur (Armstrong, 2019).

Bu çevresel faktörler, bir şekilde Alzheimer hastalığının gelişimine sebep olabilir veya kötüleştirebilir. Bu metabolik yollardan bazıları oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, kronik inflamasyon, azalmış glukoz kullanımı ve enerji metabolizması, beyinde insülin direnci gibi faktörleri içerir ancak bunlarla sınırlı değildir (Amin ve diğerleri, 2023) (Şekil 8).



Şekil 8. AD'ye neden olan bazı moleküler yollar (Srivastava ve diğerleri, 2021).

Sağlıklı bir yaşam tarzı, Alzheimer hastalığına yakalanma riskini azaltmaya yardımcı olabilir. Kanseri, diyabeti ve kalp hastalığını önlediği gösterilen sağlıklı davranışların öznel bilişsel gerileme riskini de azaltabileceğine dair artan bilimsel kanıtlar bulunmaktadır. İki uzun vadeli çalışma, yeterli fiziksel aktivitenin, besleyici bir diyetin, sınırlı alkol tüketiminin ve sigara içmemenin insanlara yardımcı olabileceğini göstermektedir (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi [CDC], 2020).

2.6. Etiyolojisinden Sonra Alzheimer Tipi Demansı Değerlendirme

İlk olarak, kanıtları giderek artan şekilde Hafif Bilişsel Bozukluğu (MCI) olan ve aslında herhangi bir bilişsel bozukluğu olmayan kişilerinde AD için patolojik kriterleri karşılayabileceği görülmüştür. Bunun in vivo biyobelirteçler için de doğru olduğu bulunmuştur. Bu yüzden AD için kriterler, Alzheimer tipi demans fenotipinin sürekliliğini tanımak ve AD'nin

in vivo biyobelirteçlerinin ortaya çıkan mevcudiyetini dahil etmek için 2011'de revize edildi. Bu kriterler "AD nedeniyle MCI" olarak kabul edildi ancak bilişsel bozukluğu olmayan kişiler AD patofizyolojik sürecinin hantal tanımını yine alacaktı (James ve Bennett, 2019).

Daha sonrasında kriterler 2018'de Ulusal Yaşlanma Enstitüsü-Alzheimer Derneği (NIA-AA), tarafından tekrar revize edildi. Klinik sonuçlarına bakılmaksızın patolojiyi temel alan AT(N) çerçevesi sistemi oluşturuldu. Bu çerçeve, gözlemsel ve girişimsel araştırmalara yöneliktir. Bu sistemde, "A", A β konsantrasyonunu temsil eder, "T", Taudan oluşan nörofibriler yumakların seviyesini ifade eder ve "N", nörodejenerasyon için algılayıcı biyobelirteçlerin değerini yansıtır. AT(N) çerçevesi AD teşhisi için kesin ölçümler sağlarken, beyin vaskülarite değişiklikleri gibi diğer biyobelirteçlerin de dahil edilmesiyle güçlendirilebileceği dikkate değerdir (Van Oostveen ve Lange, 2021; Klyucherev ve diğerleri, 2022).

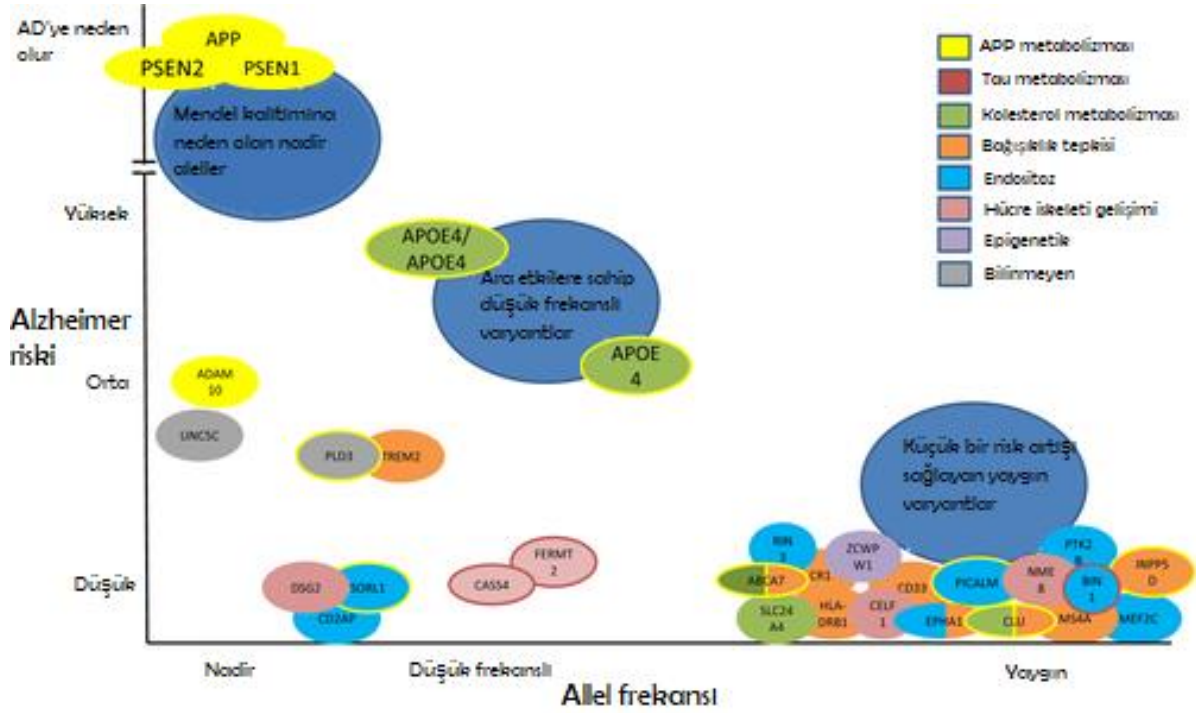
Alzheimer hastalığının patogenezinin tasarlanmasında çok sayıda çalışma yapılmıştır ancak patogenez mekanizmalarının ardındaki kesin etiyoloji hala belirsizdir ve bu konularda hâlâ geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç vardır (Prajwal ve diğerleri, 2023).

2.7. Alzheimer Tipi Demansın Genetiği

Genetik olarak Alzheimer'ın iki formu vardır: Ailesel Alzheimer hastalığı (FAD) erken başlangıçlı formu ve sporadik Alzheimer hastalığı (SAD) geç başlangıçlı formudur. AD'nin çoğunluğu sporadik olmasına rağmen, hastalığın güçlü bir genetik geçişi vardır. AD'nin iki iyi bilinen ayırt edici özelliği olan A β ve tau patolojileri tüm AD vakalarını karakterize eder ve AD ile ilişkili doğrudan bir rol oynar. Ancak karakteristik AD patolojisinin gelişmesine yol açan kesin mekanizmaların bireyler arasında farklılık gösterebileceğine dair bulgular vardır. AD geliştiren bireylerin %1-2'inden daha azını temsil eden 65 yaşından önce ortaya çıkan genetik form, otozomal dominant kalıtım modeli sergiler ve yalnızca APP, Presenilin 1 (PSEN1) ve Presenilin 2 (PSEN2) dahil olmak üzere A β işlemede yer alan genlerdeki mutasyonlara sahiptir (Katta ve diğerleri, 2022).

Sporadik Alzheimer Hastalığı, genellikle 65 yaşından sonra ortaya çıkar ve hastalığın ortaya çıkma riski her beş yılda bir iki katına çıkar. Araştırmacılar, çoğunlukla sporadik AD'ye yol açan mekanizmaları keşfetme çabası içinde, Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS) kullandılar ve AD ile ilişkili 30'dan fazla risk lokusu belirlemek için Tüm Genom/Tüm Ekzom Dizilimi (WGS/WES) çalışmaları yapıldı. Artmış sporadik AD riski ile

ilişkili gen varyantlarının yarısından fazlası, bağışıklık hücresi işleviyle bağlantılıdır. Bugüne kadar, sporadik AD için bilinen en güçlü genetik risk faktörü, büyük ölçüde immünomodülatör fonksiyonları aracılığıyla AD'de rol oynadığı öne sürülen Apolipoprotein E (ApoE) ϵ 4 varyantıdır (Passeri ve diğerleri, 2022; Kloske ve diğerleri, 2023) (Şekil 9).



Şekil 9. AD' de rol oynadığı bilinen genlere genel bir bakış. Dairelerin iç renkleri, genlerin işlevlerini temsil eder. Daire içersinde iki renk varsa, gen birden çok yolakta görev alır. (Lane ve diğerleri, 2017).

ApoE, periferik dokularda ve CNS'de kolesterol de dahil olmak üzere lipidlerin taşınması ile ilişkilidir. Astrosit kaynaklı kolesterolün nöronlara taşınmasındaki rolü sayesinde, nöronlara lipit iletimini; nöron ve beyin lezyonu onarımında kritik bir süreç olan membran homeostazını sağlar (Passeri ve diğerleri, 2022).

İnsanlarda bulunan en yaygın ApoE gen aleli epsilon 3'tür ancak meta-analiz ve GWAS çalışmaları yoluyla bulunan en büyük risk faktörü epsilon 4 alelidir. ApoE ϵ 4 geni, APP veya presenilin mutasyonları gibi deterministik genlerin aksine, bir duyarlılık geni olarak görülür. ApoE ϵ 4'ün bir veya iki kopyasının kalıtımı AD riskini sırasıyla yaklaşık 3 veya 12 kat artırır. Son bulgulara dayanarak, ApoE ϵ 4'ün bir transkripsiyon faktörü gibi davrandığı ve AD hastalığı patogeneziyle ilgili bir dizi süreçte yer alan genlerin promotörlerine bağlandığı görülmektedir.

İlginç bir şekilde, bu genlerin birçoğu daha önce AD patogenezi ile ilişkilendirilmiştir ve inflamasyon, enerji metabolizması, kardiyovasküler hastalık, östrojen regülasyonu, akson rehberliği, nöronal hayatta kalma ve hücre apoptozu ile ilgili genleri içerir (Rao ve diğerleri, 2023).

Son bulgular, ApoE ϵ 4 genotipinin beyindeki kan damarlarında birikmiş olan amiloid protein plakları (Serebral Amiloid Anyiyopati ,CAA) ile korele olduğunu ve en büyük prevalansın oksipital lobda olduğunu gösterir. Bu bulgular, sporadik AD'da serebrovasküler hasarı şiddetlendirmede genetik riskin rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Raz ve diğerleri, 2016).

ApoE ϵ 4 taşıyıcılarının ölüm sonrası beyinlerinde daha yüksek miktarlarda amiloid plakları ve şiddetli amiloid anjiyopati tanındı. AD'ın, ApoE ϵ 4'e sahip hastalarda daha şiddetli ilerlediği bulunmuştur (Prajjwal ve diğerleri, 2023).

AD'deki bir diğer önemli risk geni, Arg62His, Arg47His ve Asp87Asn anahtarına sahip TREM2(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2; Miyeloid Hücrelerde Ekspres Edilen Tetikleyici Reseptör 2) varyantlarıdır. TREM2, özellikle mikroglia adı verilen immün sisteminin CNS'deki hücrelerinde bulunan bir immün reseptördür. TREM2 muhtemelen ApoE'nin immünomodülatör fonksiyonlarında önemli bir rol oynar. ApoE ve TREM2'nin AD'deki rolleri, mikroglia ve bağışıklık değişiklikleri, bu bileşenlerden bir veya daha fazlasının ilaç geliştirmede etkili bir şekilde nasıl hedeflenebileceğini belirlemek amacıyla araştırılmaktadır (Kloske ve diğerleri, 2023).

Ayrıca ABCA7 (ATP Bağlayıcı Kaset Alt Aile A Üyesi 7), SORL1(Sortilin İle İlişkili Reseptör 1) ve TREM2 genleri tarafından yeni nesil sekans teknikleri ile dizilenen proteinlerin sağlıklı bir beyin için gerekli olduğunu bulmuştur. Üzerinde çalışılan bu proteinlerin varyantlarının nöronlara zarar verdiği bulunmuştur (Prajjwal ve diğerleri, 2023).

Oksidatif stresde görevli genler, AD ve MCI'da önemli bir rol oynar ve oksidatif hasar esas olarak mitokondriyal DNA'yı etkiler. Süperoksit Dismutaz 2 (SOD2) geni, ROS'un fizyolojik kontrolünü koruyan bir antioksidan enzimini kodlar; etkinliği sirtuinler tarafından geliştirilmiştir. Sirtuinler (Sessiz Bilgi Düzenleyici Tip, SIRT), mitokondriyal NAD⁺-Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) modülasyonunda, mitokondriyal fonksiyonda ve yaşlanmada yer alan deasetilazlar nörodejenerasyon ve AD ile ilişkilendirilir.

Detoksifiye edici bir enzimi şifreleyen Glioksalaz-1 (GLO1) gen ürünü, Metilglioksal (MG) kaynaklı glikasyona karşı enzimatik savunma sisteminin bir parçasıdır ve yaşa bağlı

hastalıklardan korunmada yer alır. Son araştırmalarda AD'de daha düşük GLO1 ifadeleri gözlemlendi ve GLO1'in nörodejeneratif hastalıklarda yer aldığı bilinen hücre dışı veziküller yoluyla nöronal hücrelerden salındığı gösterildi. SIRT3 ve Forkhead box O-3'ün (FOXO3A) gen varyantlarının, beyinde yüksek oranda eksprese edilen ve oksidatif strese karşı nöronal korumada yer alan bir transkripsiyon faktörünün uzun ömürle ilişkili olduğu varsayılmıştır. Hem GLO1 hem de SOD2, enzimatik aktivitelerinin modifikasyonları ve oksidatif strese karşı artan duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir (Piancatelli ve diğeri, 2022).

Ayrıca, inflamasyona dahil olan molekülleri kodlayan genlerin polimorfizmleri, AD'nin başlangıcını ve gelişimini etkileyebilir; İnterlökin-1 (IL-1) genetik varyasyonları ve haplotipleri, farklı bireysel inflamatuvar yanıtlara ve inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonuna yol açar. AD'de IL-1 ailesinin dolaşımdaki moleküllerinin artan seviyeleri bulundu ve IL-1 polimorfizmleri, AD başlangıcı ve patogenezi ile ilişkiliydi. Bununla birlikte, bu gen varyantlarının AD için nedensel faktörler olarak değil, daha çok hastalık değiştiricileri olarak düşünülmesi gerektiği varsayılmıştır (Piancatelli ve diğeri, 2022).

AD'de koruyucu genler de hevesle çalışılmıştır. ApoE ϵ 2 alelinin sporadik AD'ye karşı koruyucu olduğu saptanmıştır. Koruyucular arasında APOE ϵ 2'nin Ala673Thr değişimi (APP'nin koruyucu mutasyonu) ve PLCG2 (Fosfolipaz C Gama 2) genindeki Pro522Arg aminoasitlerindeki değişiklikler yer alır. ApoE ϵ 2 genotipinin, ApoE ϵ 3 homozigotluğu veya ApoE ϵ 2/ ϵ 3'ten çok daha düşük AD şansına sahip olduğu ve daha hafif nöropatilerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Prajwal ve diğeri, 2023).

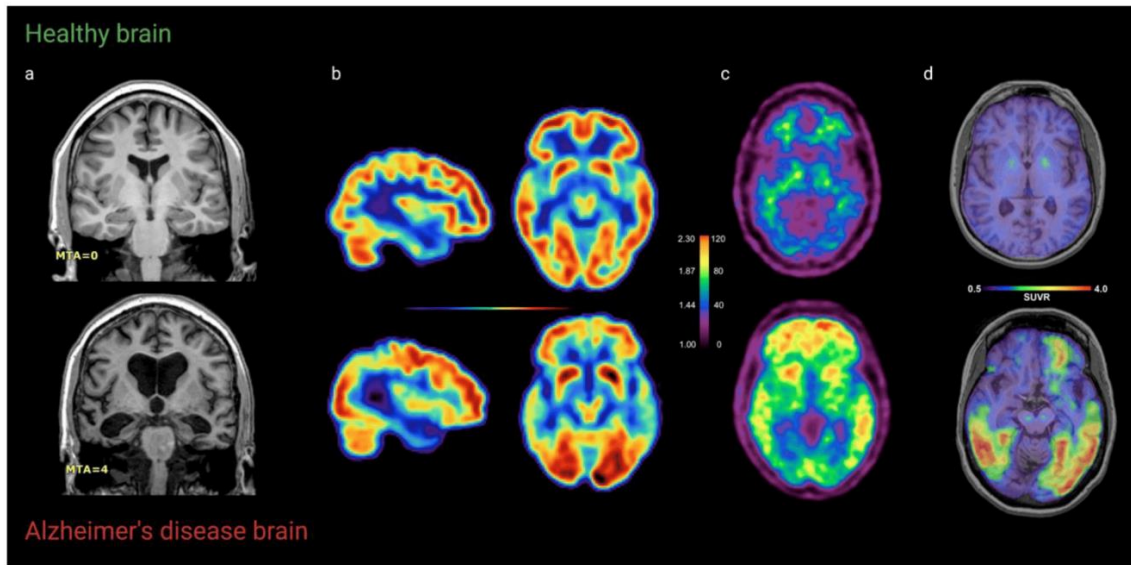
2.8. Alzheimer Tipi Demansta Nörogörüntüleme ve Biyobelirteçler

Alzheimer hastalığı eskiden klinik bir dışlama teşhisiydi ancak biyobelirteçler giderek artan bir şekilde pozitif bir teşhis sağlamaya yardımcı olmuştur. Biyobelirteçler, bir hastalığın varlığını veya yokluğunu yada bir hastalık geliştirme riskini belirtmek için ölçülebilen biyolojik değişikliklerdir (Dodel, 2023). AD için Beyin Omurilik Sıvısındaki (BOS) anormal A β ve tau biyobelirteçleri ölçülebilir ve Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) olarak bilinen bir tarama tekniği ile A β plakları ve tau yumakları görüntülenebilir (Alzheimer's disease facts and figures, 2023).

Günümüzde AD'yi teşhis etmek için görüntüleme modaliteleri ya amiloid birikimini belirlemeye ya da nörodejenerasyonu belirlemeye odaklanmaktadır. AD'nin prediktif

özelliklerini belirlemek için yapısal MRG, Elektroensefalografi, Difüzyon Tensör Görüntüleme, Fonksiyonel MRG (fMRG), Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi, PET, amiloid-PET, tau-PET, Yakın Kızılötesi Spektroskopi ve Proton Manyetik Rezonans Spektroskopisi gibi nörogörüntüleme tekniklerinin tümü kullanılabilir (Prajwal ve diğerleri, 2023).

AD ilerledikçe, beyin MRI taramaları, çevre dokularla birlikte hipokampal alanları etkileyen medial temporal lobun atrofisini ortaya çıkarabilir. Ayrıca, Florodeoksiglukoz-PET (FDG-PET) taraması beyin glikoz tüketiminin azaldığını gösterir. Glikoz kullanımı, nöronal fonksiyondan ziyade astrosit fonksiyonunu yansıtır. Beyinde (bilateral temporo-parietal) ve bir amiloid-Positron Emisyon Tomografisi taraması, çeşitli alanlarda senil plak birikimini gösterir. A β , AD'nin en erken ayırt edici özelliğidir ancak hastalık ilerledikçe birikimi durur. AD için klinik olarak kullanılan tüm testler arasında, Amiloid-PET'in hastalığı ekarte etmede en yararlı olduğu, FDG-PET'in ise hastalığın kısa vadeli sonucunu, kapsamını ve evrelemesini belirlemede en yararlı olduğu bulunmuştur (Malik ve diğerleri, 2022) (Şekil 10).



Şekil 10. Sağlıklı bir birey ile Alzheimer tipi demansa sahip hastanın nörogörüntüleri. (a. Beynin hacim azalmalarını değerlendirmek için ayrıntılı MRG görüntüleri, b. Beynin glukoz metabolizmasını görüntülediği FDG-PET, c. Amiloid Beta birikimlerinin görüntülediği PiB'li amiloid-PET tarama, d. Beynin Nörofibriller yumakların görüntülediği 18 F-AV1451 ile tau-PET tarama) (Van Oostveen ve Lange, 2021).

Tau agregatları, bir dizi tauopatinin ayırt edici özelliğidir. Bununla birlikte, çeşitli tauopatilerde BOS tau düzeylerini değerlendiren araştırma sonuçları, muhtemelen klinik semptomların heterojenliğinin bir sonucu olarak tutarsız bulgular elde etmiştir. P-tau, sırasıyla fosforile edilmiş 181 ve 231 kalıntıları ile tau'dur ve inme, travmatik beyin hasarı veya Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD) 'dan sonra P-tau'da artış görülmediğinden, AD için spesifik bir biyobelirteç olarak görülmektedir.

Garip bir şekilde P-tau seviyeleri, genellikle sağlıklı kontrollerden daha yüksek olmasına rağmen, yumak patolojisi olan diğer nörodejeneratif hastalıklarda AD'de görülen seviyelere ulaşmaz. Bu belirgin tutarsızlık, muhtemelen diğer tauopatilerdeki farklı fosforilasyon durumlarından, çeşitli tauopatilerin heterojenliğinden veya diğer faktörlerden kaynaklanabilir.

Tüm bu görüntüleme teknikleri ve patolojilerin yanında AD için bilinen biyobelirteçler yerine kolayca erişilebilir, karşılanabilir ve uygulaması kolay teşhis prosedürleri geliştirmek, hastalık yükünü azaltmak için hastalığı modifiye edici nöroprotektif stratejilerin geliştirilmesi gereklidir (Prajwal ve diğerleri, 2023).

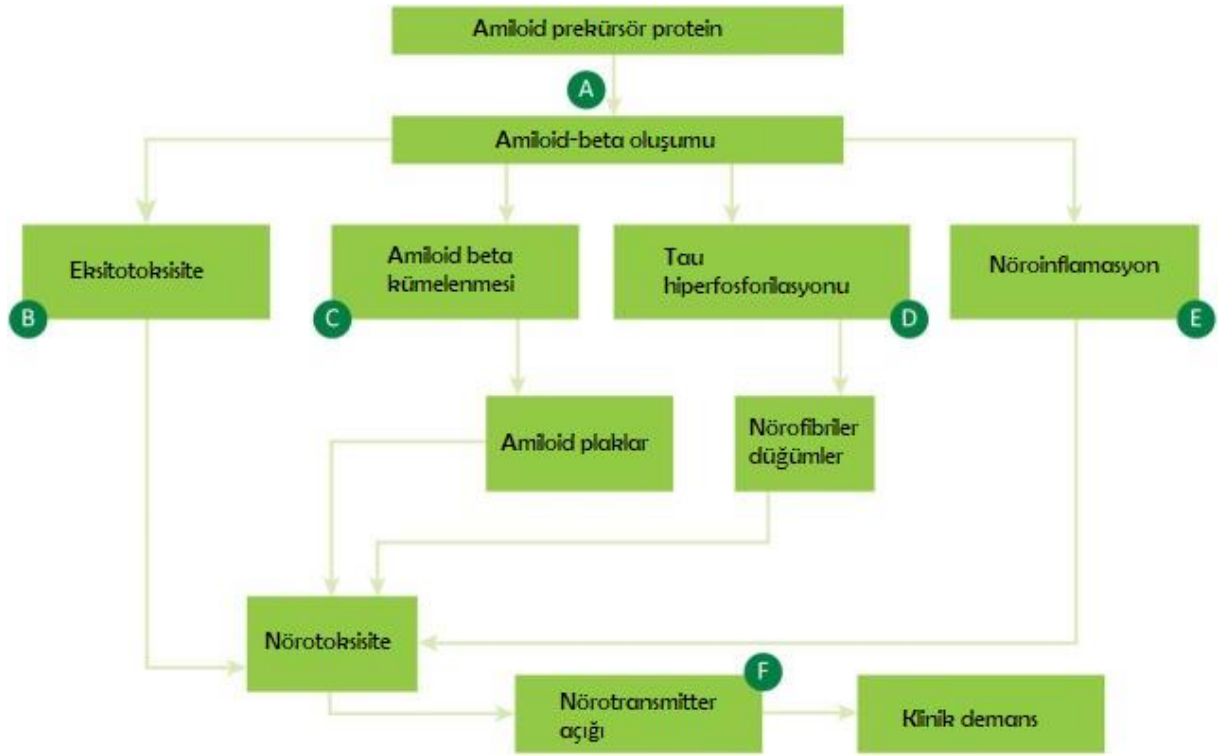
2.9. Alzheimer Tipi Demansın Tedavisi

Alzheimer hastalığı şu anda hastalığı değiştiren farmakolojik tedavilerden veya terapilerden yoksundur. Bugüne kadar AD için hastalığın ana nedenini ortadan kaldırmayı hedefleyen küratif bir tedavi geliştirilememiştir. Yakın tarihli klinik çalışmalardan elde edilen en iyi sonuçlar, bilişi iyileştirmek veya düşüşü durdurmak yerine bilişsel gerilemenin ilerlemesini geciktirmek olmuştur. Son on yılda iki yüzden fazla ümit vaat eden ilaç adayı klinik denemelerde başarısız olmuştur bu da AD ve nedenlerinin karmaşık olabileceğini düşündürmektedir (Rao ve diğerleri, 2023).

Çalışmalardaki terapötik ajanların etkinliğinin yetersiz olmasının nedeni, herhangi bir tedavinin başarısız olacağı belirli bir nöropatolojik eşik aşıldığı hastalığın ileri evresidir. Belirli bir nöropatolojik eşikte tedavinin artık hastalığın gelişimini etkileyemeyeceği varsayılmaktadır. Bu nedenle, hastalığı modifiye edici tedavilerden sağlam bir etki elde etmek için MCI'li hastaları ve AD'nin erken evrelerini tanımlayabilen biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (Van Oostveen ve Lange, 2021).

Hali hazırda AD, prelinik aşamada in vivo olarak, hastalığın moleküler imzası ile belirlenebilir. Örneğin, baskın olarak ailesel AD'li hastalarda, semptomların başlamasından 25 yıl önce CSF-A β (CSF: Serebrospinal Sıvı; BOS) ve 10 yıl önce CSF-P-Tau seviyesinde bir değişiklik saptandı. Kümülatif A β ve Tau patolojileri ardından beyindeki hücrel disfonksiyon, bilişsel bozukluğun başlangıcından önce meydana gelen nörodejenerasyona yol açar. Nörodejeneratif değişikliklerin kesin olarak belirlenmesi zordur, çünkü bu tür değişiklikler bilişsel olarak normal yaşlanan bireylerde de gözlenmektedir (Klyucherev ve diğerleri, 2022).

AD'nin gelecekteki tedavilerine yönelik araştırmalar, etiyolojik patolojilerin hedeflenmesini içerir. Patogenetik unsurların çeşitliliği ve çokluğu nedeniyle, tek başına uygulanan farazi terapötik ajanların hastalığın ilerlemesini durdurması veya önlemesi kavramsal olarak olası değildir. Buna göre AD'nin etiyolojisine göre hedeflenebilir yollar farklı metabolik yollara hizmet eder (Fessel, 2018) (Şekil 11).



Şekil 11. AD'nin nedenleri ve tedavi basamaklarında hedeflenen yollar. a. Sekretaz enzim inhibitörleri: Bu ilaçlar, amiloid-beta oluşum yolağındaki enzimleri inhibe eder. b. NMDA reseptör modülatörleri: Memantin gibi N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörlerinin antagonistini aktive ederek hafızayı ve bilişsel işlevi iyileştirir. c. İmmünizasyon dahil immünoterapi ve anti-amiloid tedavisi: immünoterapi A β plaklarını ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemini tetikler. Monoklonal antikorlar ise doğrudan A β plaklarını hedef alır ve ortadan kaldırır. d. Anti-tau tedavisi: Tau proteinlerinin oluşumunu engelleyen veya yok eden ilaçlar kullanır. e. Anti-inflamatuar tedaviler: Bu tedaviler, A β plaklarının oluşumunu ve ilerlemesini artırabilecek inflamasyonu azaltır. Örneğin, Steroid Olmayan Anti-İnflamatuar İlaçlar (NSAID'ler) f. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ve NMDA-reseptör antagonistleri: Nörotransmitter seviyelerini düzenleme (Briggs ve diğerleri, 2016).

Bir dizi bağımsız gruptan elde edilen son kanıtlara dayanarak, AD'nin her bireye özgü olduğu ve farklı bireylerde farklı genetik, epigenetik, biyokimya, alt tipler ve dolayısıyla tedaviye farklı tepkiler olduğu görülmektedir. Yakın tarihli klinik deneylerin ve gözlemsel çalışmaların birçoğu, AD'ye potansiyel katkıda bulunanların hepsi aynı anda dikkate alındığında "mükemmel" bir ilacın gerekli olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle çoklu terapötik bir yaklaşımla bilişsel düşüşte katkıda bulunan tüm potansiyeller etkili bir hastalık modifiye edici strateji olarak Tablo 1'de belirtilmiştir (Rao ve diğerleri, 2023).

Tablo 1. Mükemmel bir AD ilacı için belirli kriterler.

Artır / Optimize Et	Azalt / Önle / Optimize Et
<ul style="list-style-type: none">❖ APP α-bölünme❖ Neprilisin❖ IDE (İnsülini parçalayıcı enzim)❖ Aβ temizlenmesi❖ Otofaji❖ BDNF (Beyin Türevli Nörotrofik Faktör)❖ NGF (Sinir Büyüme Faktörü)❖ Netrin-1❖ ADNP (Aktiviteye Bağımlı Nöroprotektif Protein)❖ SIRT1 (Sirtuin 1)❖ PP2A aktivitesi❖ Fagositoz❖ İnsülin hassasiyeti❖ Aksoplazmik taşıma❖ Mitokondriyal fonksiyon❖ Kolinerjik nörotransmisyon❖ Uzun vadeli güçlendirme❖ Vit D, B12, ve Çinko❖ Çözücüler❖ Detoksifikasyon❖ Vaskülarizasyon❖ cAMP❖ Glutasyon❖ Estradiol, progesteron, pregnenolon, DHEA, GABA, serbest T3, serbest T4, TSH	<ul style="list-style-type: none">❖ Homosistein❖ APP β-bölünme❖ APP γ- bölünme❖ Kaspaz-6 bölünme❖ Kaspaz -3 bölünme❖ APP b-oligomerizasyon❖ P-tau ve PHF❖ Oksidatif hasar ve ROS üretimi❖ NFkB❖ Glial skarlaşma❖ İnflamasyon❖ Sinaptoklastik sinyal❖ Nöronal hücre ölümü

Bu ilaç, AD ile ilişkili tüm parametreleri optimize edip, düzenleyerek etkili bir tedavi sunmalıdır. İdeal bir ilaç, AD'deki artış eğilimli faktörleri azaltırken, azalma eğilimli faktörleri artırarak dengeli bir yaklaşım sağlar (Rao ve diğerleri, 2023).

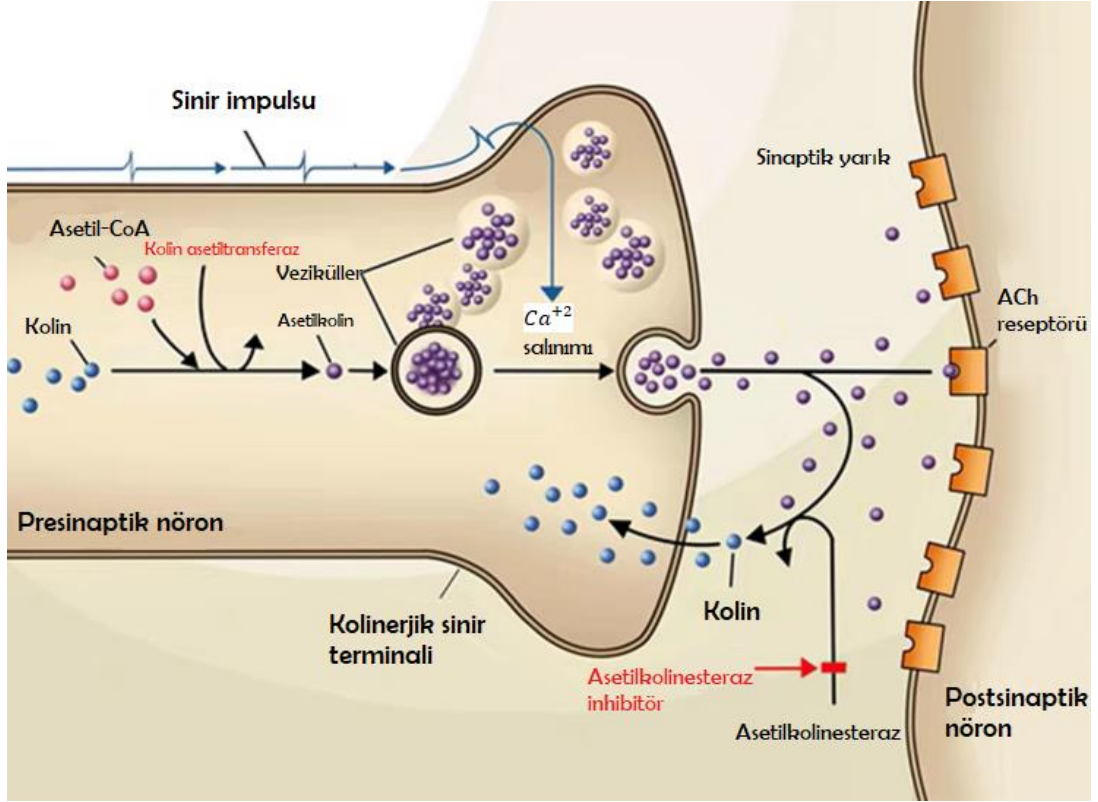
Bugüne kadarki sonuçlar, SCI², MCI veya AD'yi başarılı bir şekilde tedavi etmek için tek terapötik bir ilaç stratejisinin optimal olmayabileceğini göstermektedir. Bunun yerine, en pragmatik yaklaşım, AD patofizyolojisinin altında yatan tabloda belirtilen hedefleri aynı anda ele almayı içerir. Bu stratejilerin her birinin bilişsel gerilemeyi tersine çevirdiği ve nöroplastisiteyi desteklediği gösterilmiş olsa da, birlikte uygulandıklarında, birleşik etkilerine ek sinerjistik etkileri olabilir (Rao ve diğerleri, 2023).

Şu anda AD için iki sınıf farmakolojik tedavi mevcuttur: kolinesteraz inhibitörleri (donepezil, rivastigmin, galantamin) ve NDMA-reseptör antagonistlerini (memantin) içerir. Bu ilaçlar kötüleşmenin genel seyrini değiştirmese de, bilişsel ve davranışsal semptomları 6 aydan birkaç yıla kadar iyileştirebilir (Malik ve diğerleri,2022).

Asetilkolin; korteks, bazal ganglionlar ve ön beyin boyunca aktiviteye sahip önemli bir nörotransmitterdir. Hafıza, öğrenme ve bilişin diğer temel yönlerinde önemli bir işlevi vardır ve nöronal plastisiteyi geliştirmede rol oynar (Dodel, 2023). Antikolinesteraz inhibitörleri, CNS'de gözlenen nöronlar arasında bilgi iletimini sağlayan asetilkolinin seviyesini artırmak için tasarlanmış moleküllerdir. Donepezil, rivastigmin, galantamin, takrin gibi kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolini sinaptik yarıktan parçalayarak kolinerjik iletimi güçlendiren asetilkolinesteraz enzimini bloke eder (Katta ve diğerleri, 2022; Yu ve diğerleri, 2021) (Şekil 12).

² 1. SCI: Subjektif bilişsel bozukluk (Subjective Cognitive Impairment). Bu terim, bireyin kendisinde hafif bilişsel bozulma belirtileri hissettiği ancak klinik olarak tanı konulamayan bir durumu ifade eder.

2. MCI: Hafif bilişsel bozukluk (Mild Cognitive Impairment). Bellek, düşünme, dil veya diğer bilişsel yeteneklerde hafif düzeyde bozulma olduğu, ancak günlük işlevselliği etkilemediği bir durumu tanımlar.



Şekil 12. Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesteraz enzimini engeller. Kolin, Asetilkolin (ACh) sentezi için anahtar substrattır. Glikoz, Krebs döngüsü ile parçalandığında üretilen Asetil-koenzim A (Ac-CoA), Kolin Asetiltransferaz (ChAT) enzimi ile birlikte ACh sentezini sağlar. Nörotransmitter ACh, sinapta salındığında, postsinaptik muskarinik reseptöre bağlanır ve aktive ederek bir nörondan diğerine bir sinyal iletir. Presinaptik zardan sinaptik yarığa salınan ACh, normalde Asetilkolinesteraz (AChE) tarafından hızla koline hidrolize edilir. Kolin, yeni ACh'yi sentezlemek için presinaptik nöron tarafından yeniden alınır. AD'li kişilerde ACh eksikliği vardır ve beyinlerindeki ACh seviyeleri normal insanlardan çok daha düşüktür. AChE İnhibitörleri, AChE'nin aktivitesini inhibe ederek, AD hastalarının bilişsel bozukluğunu hafifleten ACh konsantrasyonu artırır. (Chen ve diğerleri, 2022).

Kolinergik sinapslar, striatum, limbik sistem, talamus ve neokortekste çok sayıda bulunur, bu da onların hafıza ve öğrenme gibi daha yüksek beyin fonksiyonlarında çok önemli bir rol oynadıklarını düşündürür. Kolinergik iletim, çeşitli araştırmaların gösterdiği gibi beyin homeostazını korumada önemlidir (Prajwal ve diğerleri, 2023).

Diğer tedavi yolunda anti-glutaminerjikler, N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörlerinin rekabetçi olmayan bir antagonisti olarak glutamat seviyelerine müdahale ederler (Örn: memantin). Glutamat, beynin öğrenme ve ezberleme işlevlerinde rolü olan bir nörotransmitterdir. Yüksek glutamat seviyeleri, nöronların ölümüne neden olan ekzitotoksisiteye neden olur. NMDA reseptörü kalsiyum iyonlarının hücreye girmesine izin

vererek çalışır ve böylece nörotransmisyonu kolaylaştırır (Dodel, 2023). Glutamata aşırı maruz kalma veya bunun NMDA reseptörünün aşırı uyarılması olarak tanımlanan eksitotoksisite, nöronal kayıptan sorumludur. Kolinerjik nöronların da kaybının bu süreçten etkilenerek hücrelere aşırı kalsiyum akışına neden olduğu düşünülmektedir (Passeri ve diğerleri, 2022).

Bu ilaç tedavileri, hastalığın gelişimini geciktirmek, bilişsel işlevleri geçici de olsa stabilize etmek ve davranış bozukluklarını kontrol altına almak için kullanılır. İyileştirici olmasa da tedaviler AD'li kişiler ve bakıcıları için bağımsızlığın korunmasını ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesini sağlar. Ancak etkinliği kısmi ve en iyi ihtimalle geçici olan bu tedaviler, AD'nin nedeninden çok sonuçlarını etkiler. Denenen ilaç tedavileri, nörodejenerasyon süreci oluşmadan önceki asemptomatik erken aşamada daha faydalı olabilir. Dolaşımdan BBB yoluyla CNS'ye geçişin kısıtlı olması, beyin ilacı hedeflemesindeki en büyük zorluk olmak üzere hedef dışı ilaç etkileri ve immünolojik anormallikler de bu tedavilerin etkinliğine engel olur. Birçok ilaç denemesi, AD'deki BBB'deki geçirgenlik sorunları nedeniyle başarısız olur (Passeri ve diğerleri, 2022).

Sporadik AD için en önemli risk faktörlerinden biri cinsiyettir ve etkilenenlerin %60'ından fazlasına postmenopozal kadınlar katkıda bulunur. Araştırmacılar, kadınların tüm AD hastalarının yaklaşık üçte ikisini oluşturduğu gerçeğine dayanarak, 17 β -estradiolün dışı beynini AD gelişiminden koruyarak nöroprotektif bir etki gösterdiğini öne sürdüler. Son bulgularla östradiolün biliş ve hafızayı içeren sinyalleme ve transkripsiyonel yollardaki rolü desteklenir. AD'de estradiolün nöroprotektif etkisinin mekanizmasını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulurken, AD riski taşıyan kadınlar için hormon replasman tedavisinin (HRT) başarılı bir müdahale olarak kullanılması koruyucu bir tedaviyi oluşturur (Rao ve diğerleri, 2023).

AD'nin semptomatik tedavisi için ayrıca monoklonal antikorlara başvurulmuştur. Amiloide karşı iki antikor (aducanumab, lecanumab) yakın zamanda ABD'de onaylanmıştır; Aducanumab, Avrupa düzenleyici otoritelerinden Avrupa için onay almamıştır ve lecanumab henüz test edilmemiştir. Donanemab gibi başka antikorlar da test için geliştirilmektedir (Dodel, 2023).

2.10. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör

Sinir büyüme faktörü ailesinin nörotrofinleri, CNS’de nöronların büyümesi, hayatta kalması ve farklılaşmasındaki rolleriyle en iyi bilinen çözünür polipeptitlerdir. Nörotrofinler aşağıdaki ligandları içerir ancak bunlarla sınırlı değildir:

- ✓ Sinir Büyüme Faktörü (NGF)
- ✓ Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)
- ✓ Nörotrofin-3 (NT-3)
- ✓ Nörotrofin 4/5 (NT4/5)

Nörotrofinler, Tümör Nekroz Faktörü (TNF) ve Sinir Büyüme Faktörü Reseptörü (NGFR) gibi düşük afiniteli reseptörleri ve Nörotrofin Tirozin Reseptör Kinazlar (NTRK) gibi yüksek afiniteli reseptörler aracılığıyla sinyal verirler. Spesifik olarak, NGF tercihen Nörotrofik Tirozin Reseptörü Kinaz-1’i (NTRK1) aktive ederken, BDNF ve NT4/5 daha önce Tropomiyozinle İlişkili Kinaz Reseptörü-B (TRK-B) olarak bilinen NTRK2’yi aktive eder ve NT-3 tercihen NTRK3 yoluyla sinyal verir. Nörotrofinlerin CNS’de ki rolü iyi belirlenmiş olsa da, periferik dokularda anahtar düzenleyici proteinler olarak önemlidir (Chow ve diğerleri, 2020).

Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF), CNS’de en çok çalışılan ve karakterize edilen küçük bir dimerik protein olan nörotrofik faktörlerden biridir. TRK-B bağlayarak hem periferik sinir sisteminde hem de CNS’de nöronlarda nörotransmisyonu, nöronal rejenerasyonu, morfolojiyi ve fonksiyonel sinaptik plastisiteyi sürdürmek için yaşam boyunca kortikal devrelerde aktif olarak üretilir ve kullanılır (Arora ve diğerleri, 2022).

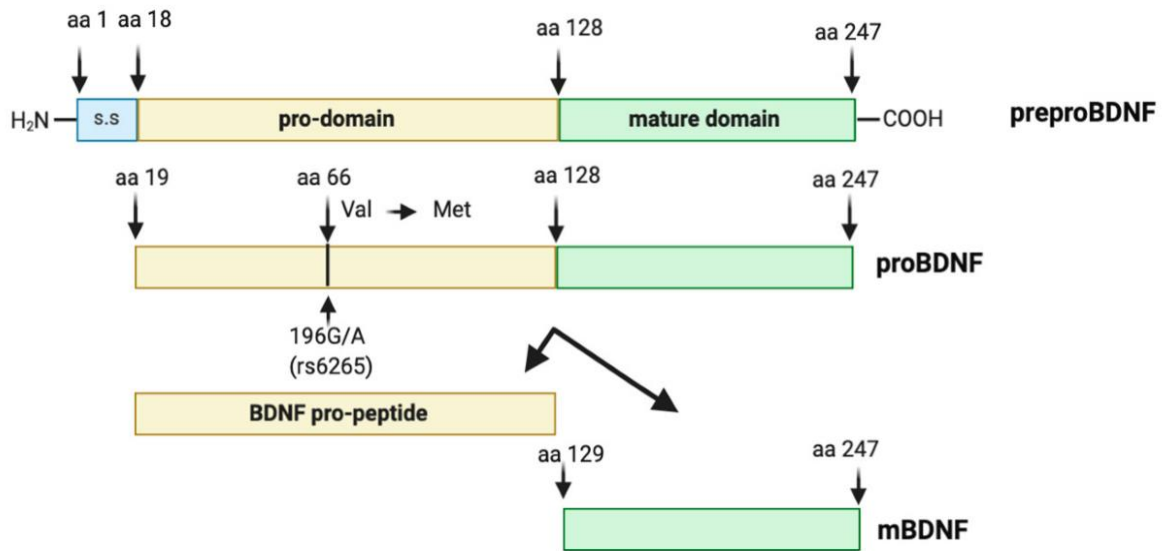
BDNF-NTRK2 etkileşimleri, yalnızca nöronal hayatta kalmayı, farklılaşmayı, büyümesini ve bakımını indüklemeye yeteneğine sahip değildir; anjiyojenezi, hücre proliferasyonu, hücre adezyon, apoptoza direnç ve üreme sırasındaki tüm önemli fizyolojik süreçlerde de yer alır (Chow ve diğerleri, 2020). Ayrıca BDNF, sinaptik plastisiteyi ve bunun moleküler mediyatörlerini çoklu nörotransmitter sistemlerinde modüle edebilir. (Hong ve diğerleri, 2011).

BDNF yetişkin memeli beyinde yaygın olarak eksprese edilir, en yüksek seviyeler hipokampusta bulunur, bunu serebral korteks takip eder. Korteks ve hipokampus bölgelerinden izole edilen astrositler, glial hücreler ve glutamaterjik nöronlar tarafından ifade edilir ancak striatum ve mikroglia tarafından ifade edilmez (Hong ve diğerleri, 2011).

BDNF transkripti, çeşitli promotörler, DNA metilasyonu ve alternatif sprints tarafından düzenlenir. BDNF'nin ekspresyonu, hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde birçok işlem tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. BDNF seviyelerinin nasıl düzenlendiği hakkında birçok bilgi bulunmasına rağmen, hücre altı lokalizasyon ve translasyon gibi transkripsiyon sonrası düzenlemenin ayrıntılı mekanizmaları hala tam olarak açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir (Shrestha ve diğerleri, 2019).

2.11. BDNF Gen Yapısı ve Transkriptler

Ortak protein kodlayan 3' ekson ile birlikte eklenmiş çok sayıda 5' kodlamayan ekzondan oluşan BDNF geninin ekspresyonu, uyarana özgü, hücre tipine özgü ve beyin bölgesine özgü farklı promotör bölgeler tarafından kontrol edilir (Şekil 13). İnsan BDNF geni, kromozom 11p14.1'eşlenmiştir; doku ve beyin bölgesi spesifik olarak on bir ekson ve dokuz fonksiyonel promotordan oluşur (Esvald ve diğerleri, 2022; Hong ve diğerleri, 2011).



Şekil 13. BDNF gen yapısı. PreproBDNF, üç diziden oluşur: sinyal dizisi (ss), pro-domain ve olgun domain. PreproBDNF'nin hücre içinde veya hücre dışında bölünmesi, fonksiyonel olarak etkin izoformlar üretir: BDNF pro-peptit ve olgun BDNF (mBDNF), her biri belirli bir reseptör tipine özgün bir bağlanma sergiler. Oklar, olgun BDNF'nin işlenmesinde yer alan bilinen proteaz kesim bölgelerini gösterir. (Colucci-D'Amato ve diğerleri, 2020).

BDNF'nin üretimi ve olgunlaşması, çeşitli öncü izoformların oluşumunu içeren karmaşık bir süreçtir. 1982'de keşfedilen BDNF proteini, endoplazmik retikulumda preproBDNF (32-35 kDa) olarak sentezlenen ve katlanan, 247 amino asitlik oldukça korunmuş bir proteindir. Golgi aygıtına geçtikten sonra, ön bölgedeki sinyal dizisi hızla bölünür ve proBDNF izoformu (28-32 kDa) oluşur. ProBDNF daha sonra olgun form olan mBDNF'ye (13 kDa) dönüşmek üzere bölünür. ProBDNF'nin hücre içindeki proteolitik bölünmesi, furin gibi endoproteazlar olan subtilisin-kexin ailesi veya hücre içi veziküllerdeki konvertazlar tarafından gerçekleştirilebilir.

BDNF, insanlarda 11 farklı ekzon, kemirgenlerde ise dokuz farklı ekzon ve her iki grupta da dokuz alternatif başlangıç bölgesi promotöre sahip karmaşık bir gen yapısına sahiptir. Bu karmaşıklığa rağmen, kodlama dizisi hem insanlarda hem de kemirgenlerde ekzon IX'da bulunur. Bu ekson, proBDNF proteini kodlayan ortak diziye sahiptir. Diğer tüm ekzonlar ise insan BDNF geninin I, VII, VIII ve IX ekzonları arasında yer alan transle edilmemiş bölgelerdir. Ekson IX, tüm BDNF mRNA izoformlarında ortak olarak bulunur. Bu dokuz alternatif promotörün, BDNF'nin karmaşık zaman ve çevresel koşullarda genin çeşitli uyarılara tepki verme yeteneğine olanak ifadesini düzenleyebileceği düşünülmektedir. Örneğin, insan beyin dokularında tüm ekzonlar ifade edilir, ancak farklı beyin yapılarında ve farklı düzeylerde olabilir. Öte yandan, insan kalp dokusu yüksek seviyelerde BDNF izoformları ifade ederken sadece ekzon IV ve ekzon IX'u içermektedir (Colucci-D'Amato ve diğerleri, 2020).

Başka bir örnek olarak, farelerde BDNF ekson II veya ekson IX içeren BDNF transkriptleri hipokampüste yüksek düzeyde ifade edilirken korteks bölgelerinde çok daha düşük düzeylerde ifade edilir. Tüm rat veya insan BDNF lokusunu içeren transgenik fareler, transgenin hipokampal dentat girus hücrelerinde BDNF ifadesini yeniden oluşturamadığını göstermiştir, bu da korteks ve hipokampus arasındaki BDNF ifadesinde farklılıklar olduğunu ima etmektedir. Farklı BDNF transkriptlerinin ifadesi, şizofreni hastalarında, antidepresan tedavisi yanıtlarında ve farelerde kronik hafif stres etkisi altında beyin bölgelerine özgü bir şekilde düzensizdir. Genel olarak, BDNF'nin ifadesi, sağlık ve hastalık durumlarına bağlı olarak farklı beyin bölgelerinde değişkenlik gösterir (Esvold ve diğerleri, 2022).

2.12. BDNF'nin Merkezi Sinir Sistemindeki Rollerini

BDNF, hipokampus ve diğeri beyin bölgelerinde sinaptik iletim ve Uzun Süreli Güçlenme (LTP) üzerinde önemli bir düzenleyicidir ve belirli hafıza türlerinin oluşumunda rol oynar. BDNF'nin LTP üzerindeki etkileri, Trk-B reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir ve bu reseptörler Ras/ERK, fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt ve Fosfolipaz C-Gamma (PLC- γ) yollarının aktivasyonuna bağlıdır. BDNF'nin LTP'deki rolü en iyi hipokampusda çalışılmış olup, nörotrofinin presinaptik ve postsinaptik duyarlılığını sinaptik plastisitede uzun süreli bir artışa neden olmak için modüle ettiği düşünülmektedir. Son çalışmalar, BDNF'nin dendritler boyunca mRNA taşınımını ve bu mRNA'ların sinapsta translasyonu, protein sentezi başlatma ve uzama aşamalarını düzenleyerek ve belirli miRNA'lara etki ederek düzenlediğini göstermiştir (Leal ve diğeri, 2014).

BDNF'nin en aktif olduğu üç alanın hipokampus, korteks ve bazal ön beyin olduğu belirtilmiştir. Hem dolaşımında hem de CNS dokularında değişen BDNF düzeylerinin, Alzheimer, Parkinson (PD), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde yer aldığı bilinir. BDNF ekspresyon düzeyi AD hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha düşüktür ve benzer sonuçlar AD hayvan modellerinde de bulunmuştur. Önceki çalışmalar göstermiştir ki BDNF, TrkB ve ERK1/2 sinyalini aktive ederek A β peptidinin nörotoksitesine karşı koruyucu bir etki sağlar ve A β peptidinin neden olduğu hasarı onarır (Li ve diğeri, 2017). Bu nedenle, BDNF sinyalinin manipüle edilmesi, çeşitli nörolojik bozuklukları tedavi etmek için uygun bir yaklaşım sunabilir (Eyileten ve diğeri, 2021).

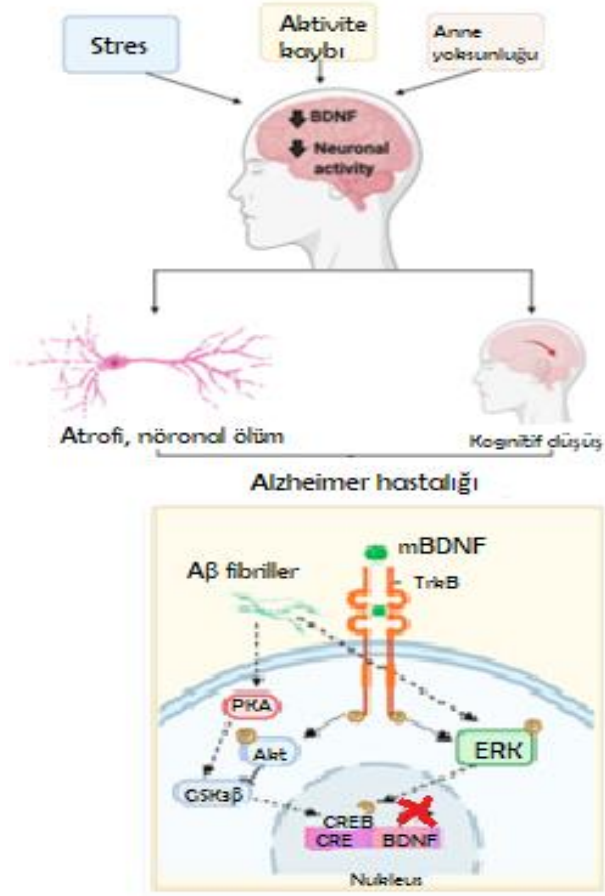
BDNF proteini ayrıca sinir sisteminin dışında, endotelial hücreler, kardiyomyositler, karaciğerde ve yağ dokularında keşfedilmiştir. Daha sonra lenfositler ve monositler gibi bağışıklık hücrelerinde de bulunmuş. Bu nedenle, kanser, anjiyogenez, karaciğerden glikoz üretiminin azalması ve periferik dokularda glikoz alımında da yer alabilir (Colucci-D'Amato ve diğeri, 2020).

NGF, BDNF ve NT-3 gibi nörotrofik faktörler, nöronların yenilenmesini, hayatta kalmasını ve korunmasını desteklediğinden, bu proteinleri kodlayan genlerin polimorfizmi, AD'de olduğu gibi nörodejeneratif değişikliklere duyarlılık kazandırabilir. BDNF proteini için, AD'li hastaların ölüm sonrası hipokampusunda ve temporal korteksinde azalmış mRNA ekspresyonu gözlemlendi. İmmünohistokimya ve Western blot çalışmaları, AD'de frontal korteks

ve hipokampusta BDNF/TrkB nörotrofik sinyal yolunda seçici bir düşüş olduğunu ortaya koydu. Entorhinal kortekste daha düşük BDNF seviyeleri de AD'de tespit edilmiştir. BDNF'nin AD ve diğer nörodejeneratif hastalıklar üzerinde terapötik etkileri olduğu öne sürülmüştür. Bu birçok kanıt, BDNF genini AD için önemli bir aday gen yapar (Kunugi ve diğerleri, 2001).

2.13. BDNF'nin Alzheimer Tipi Demansta Nöroprotektif Rolü

Nörodejeneratif Alzheimer hastalığı için şu anda etkin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. BDNF düzeylerinin de yaşam tarzı faktörlerinden (diyet, fiziksel aktivite vb.), ilaçlardan ve hormonlar gibi cinsiyete özgü faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. (Piancatelli ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, fiziksel egzersizin, zenginleştirilmiş bir ortama maruz kalmanın, metabolik değişikliklerin, beslenme ve bilişsel müdahalenin, hastalığın başlangıcını geciktirerek veya seyrini frenleyerek nörodejenerasyon üzerinde koruyucu bir rol oynayabileceğini gösteren deneysel bulgular, AD'nin klinik uygulamasında yararlı olabileceği konusunda umudu artırmaktadır. BDNF, yukarıda belirtilen çevresel uyaranların nöroprotektif etkilerine aracılık etmek için çok önemli veya hatta bazı durumlarda gerekli görünmektedir (Şekil 14). Özellikle, BDNF'nin zenginleştirilmiş çevre, hormonal denge (kortizol ve testosteron gibi steroid hormonlar) ve BDNF seviyesini artırabilen beslenme müdahalesi (aç kalma, düşük kalorili alım, düşük karbonhidratlı diyet, seçici besin alımları) gibi bir dizi koşulla uyarılabilen hipokampal yetişkin nörojenezinden sorumlu olduğu iyi bilinmektedir (Colucci-D'Amato ve diğerleri, 2020).



Şekil 14. AD ile ilgili BDNF'nin aracılık ettiği moleküler mekanizmalar. Epigenetik düzenleme süreçlerine etken olan dış uyaranlar (stres, anne yoksunluğu veya aktivite eksikliği), BDNF ekspresyonu düzeyinde ve nöronal aktivitede bir azalmaya neden olabilir. Bu, AD'ye katkıda bulunabilecek atrofi, nöronal ölüm ve bilişsel gerileme ile sonuçlanır. Bu patolojide, downstream Akt ve ERK sinyalinin aktive eden BDNF/TrkB sinyali değiştirilir. Bu nedenle, bu tür değişiklikler CREB sinyalinin bozulmasına neden olarak BDNF aşağı regülasyonuna neden olur. Fosforilasyonun (P) değiştirilmesi, transkripsiyonel makineyi inhibe eder. (Colucci-D'Amato ve diğerleri, 2020).

Nörotrofinler, nörodejeneratif bozukluklara karşı koruyucu işlevlere sahip oldukları ve geç evrelerde ve daha ciddi hastalıklarda azaldıkları bulunduğu için, AD'nin patogenezinde ve ilerlemesinde yer alabilirler. Bunun yanında Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklardan etkilenen hastalarda azalmış bir BDNF seviyesi bulunmuştur. Bu seviye hafıza, düşünme ve muhakeme becerileri dahil olmak üzere bilişsel yeteneklerde hafif bir düşüş ile karakterize edilen AD'nin prodromal aşamasıdır. Bazı durumlarda, BDNF seviyesi, BDNF ile AD arasında patogenetik bir bağlantıya işaret ederek, hastalığın ciddiyeti ile ilişkilidir. Serumda veya ölüm sonrası beyinde BDNF'nin arttığını bildiren bazı makaleler olmasına rağmen, bunun

nedeni immün hücrelerden salınması veya BDNF'yi yükselttiği bilinen antidepresanlar gibi farmakolojik tedaviler olabilir (Piancatelli ve diğerleri, 2022).

AD'nin hayvan modellerinde, viral vektörlerin kullanıldığı oldukça invaziv BDNF gen terapisi, gelişmiş sinaptik protein ekspresyonu, nöronların proliferasyonu ve amiloidojenik süreçlerin zayıflamasını başarılı bir şekilde göstermiştir (Arora ve diğerleri, 2022).

Yetişkin hipokampal nörojenezinin, yalnızca BDNF ile kombine halde AD hafıza bozukluğunu önleyebildiğine, oysa nörojenez deneysel olarak bloke edilirse, BDNF'nin yararlı etkiler göstermediğine dair bulgular elde edilmiştir. Nihayet bu nedenle, hem BDNF sinyalini hem de nörojenez destekleyen ajanlar, AD'yi önlemenin veya iyileştirmenin anahtarı olabilir (Colucci-D'Amato ve diğerleri, 2020).

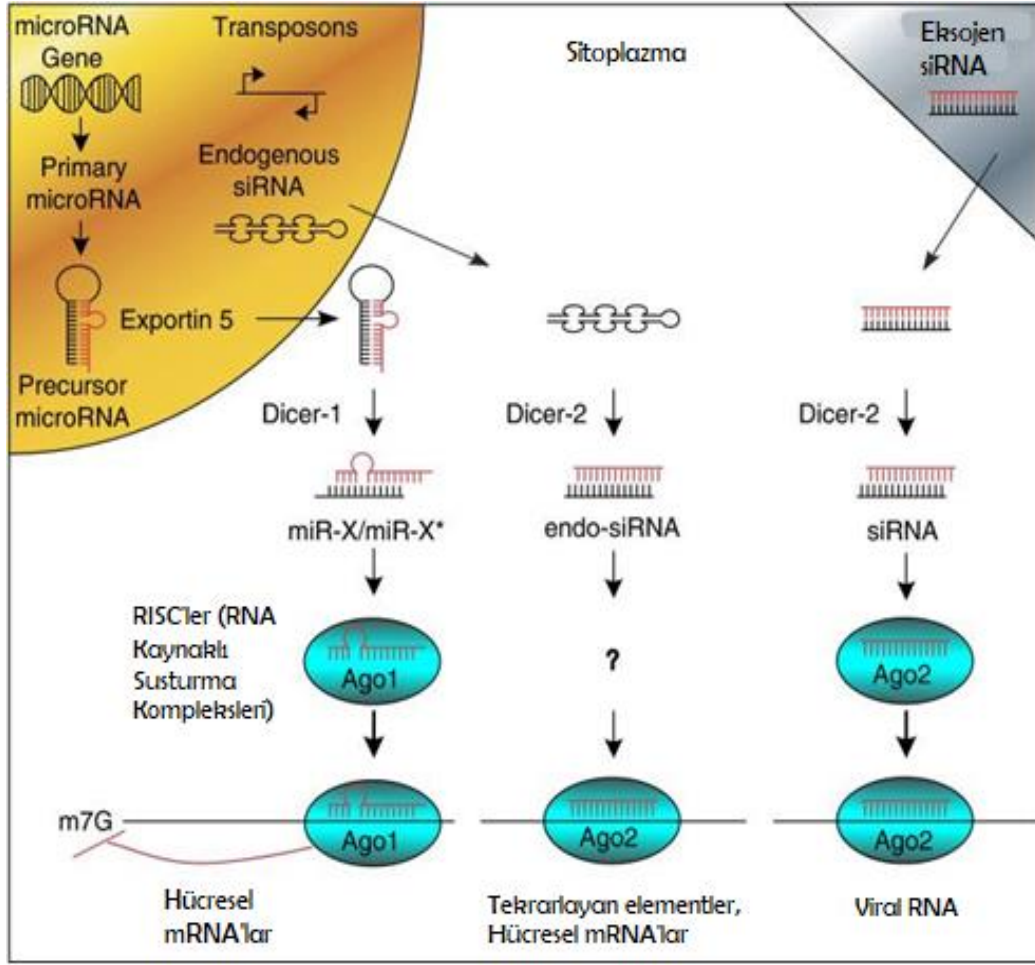
2.14. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenleyicileridir. Hedef mRNA'ların 3' UTR bölgelerine bağlanarak ve bunların degradasyonunu teşvik edebilen veya translasyonunu baskılayabilen, 18-25 nükleotid uzunluğunda, evrimsel olarak korunmuş küçük, kodlayıcı olmayan tek sarmallı RNA molekülleridir (Eyileten ve diğerleri, 2021).

Ökaryotik hücreler, virüsler tarafından aktarılan çift zincirli RNA'nın (dsRNA) enfeksiyonuna karşı hücrel bir bağışıklık tepkisi oluştururlar. Eksojen dsRNA ile enfekte olmuş hücreler, dsRNA'yı, eşleşen endojen mRNA dizilerine bağlanan siRNA'lara (small interfering RNA) dönüştürür. Böylece viral replikasyon için gerekli proteinlerin mRNA'larına komplementer siRNA'lar oluşturularak mRNA'ların bozulmasını sağlar. Bu hücrel sürecin adı RNA interferansıdır; bilim insanları Fire ve Mello, RNAi'yi keşfettikleri için 2006 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür (Saugstad, 2010).

2.14.1. MiRNA Biyogenezi

RNA interferansı; genomdan transkribe edilen mikroRNA'lar, transpozonlardan türeyen endojen siRNA'lar, dsRNA virüsleri veya deneysel manipülasyonlarla enfeksiyondan kaynaklanan eksojen siRNA'lar gibi faktörleri içerir (Şekil 15).



Şekil 15. RNA interferans; miRNA ve siRNA Biyogenezi (Saugstad, 2010).

MiRNA'lar, intragenik veya intergenik DNA bölgelerinden genellikle RNA polimeraz II tarafından kopyalanan birincil transkriptler (pri-miRNA'lar) adı verilen farklı uzunluklardaki daha uzun transkriptlerden üretilir. Pri-miRNA'lar çekirdekte, bir RNase III enzimi olan Drosha ve onun kofaktörü tarafından oluşturulan mikro işlemci kompleksi tarafından işlenir. Süreçte pre-miRNA'lar olarak adlandırılan 70-100 nt'lik küçük hairpin yapısı taşıyan transkriptlerin üretilmesine yol açar (Fontana ve diğerleri, 2015).

Pre-miRNA olgunlaştırılması için Exportin-5 aracılığıyla sitoplazmaya ihraç edilir. Dicer daha sonra pre-miRNA'yı, 20 ila 25 nükleotidlik olgun miRNA'ya ayırır. Bazı durumlarda olgun mikroRNA'lar her iki sarmaldan üretilir ve miR-X/miR-X * olarak adlandırılır ve yıldız işareti daha az baskın olarak ifade edilen transkripti gösterir. Dicer tarafından kesilen tek zincirli miRNA'lar daha sonra Argonaute (Ago) proteinlerine bağlanarak RNA Kaynaklı Susturma Komplekslerini (RISC'ler) oluşturur. Paralel yollar, endojen veya eksojen dsRNA'lardan

siRNA'lar oluşturur, ancak Dicer ve Ago proteinlerinin farklı izoformlarını kullanır (Saugstad, 2010).

2.14.2. MiRNA'nın mRNA Hedeflerini Düzenlemesi

RISC'lerdeki mikroRNA'lar, çoğunlukla mRNA hedeflerinin 3'-UTR'sindeki dizilimlerle Watson-Crick baz çiftleri oluştururlar. mRNA hedef seçimi için temel özgüllük belirleyicisi, mikroRNA içindeki sınırlı bir bölge olan 'seed' dizisidir. Ancak, mikroRNA'ya bağlı proteinler veya onların mRNA hedefleri arasındaki etkileşimler de hedef seçimini etkileyebilir. MikroRNA'lar, öncelikle posttranskripsiyonel gen ekspresyonunu, mRNA hedeflerinin translasyonel baskılama veya degradasyonu yoluyla düzenler.

Translasyonun başlaması, Eukaryotik Başlatma Faktörü 4E ile olgun mRNA'daki 7-metilguanozin dizisi arasında doğrudan bir etkileşimi gerektirir. MikroRNA'lar mRNA'nın 3'-UTR'sine bağlandığında, RISC'teki Ago proteinleri mRNA'nın 7-metilguanozin başlığı ile etkileşime girer, bu da Eukaryotik Başlatma Faktörü 4E'nin mRNA'ya bağlanmasını ve translasyonunu bloke eder. Bu, mikroRNA'lar tarafından düzenlendiği bilinen en eski olaydır, ancak daha fazla mRNA bozulması, mRNA susturulmasını güçlendirmeye hizmet edebilir (Saugstad, 2010).

MikroRNA fonksiyonu, mRNA'nın belirli bir bölgesine bağlı olmadığı için, çalışmalar, mikroRNA-ribonükleoprotein birlikteliğinin hedef mRNA'da (3'-UTR veya 5'-UTR) herhangi bir konumda, başlatmadan sonraki bazı adımlarda translasyon baskılama için yeterli olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, mikroRNA'ların mRNA kodlama bölgelerindeki dizilimleri hedeflediğini gösteren çoklu bağımsız çalışmalarla da uyumludur, ancak etkileri 3'-UTR'deki bölgelere göre daha zayıf olmasına rağmen, mRNA kodlama bölgelerindeki dizileri hedef aldığını gösteren çok sayıda bağımsız çalışma ile tutarlıdır (Fontana ve diğerleri, 2015).

MikroRNA'lar ve bunlarla ilişkili RISC'ler bir mRNA hedefine bağlandıktan sonra, tüm kompleks işleme organlarına ayrılabilir. İşleme organlarında RISC'ye bağlı mRNA'ların tutulması sinapslarda da meydana gelir, bu mekanizmanın sinaptik aktiviteye yanıt olarak mRNA translasyonunun önemli bir düzenleyicisi olduğunu öne sürülür (Saugstad, 2010).

2.14.3. Nörodejeneratif Bozukluklarda miRNA'lar

MiRNA'lar sinir sisteminde bol miktarda dokuya özgü bir şekilde eksprese edilir ve nörojenez, nöronal olgunlaşma, sinaps oluşumu, akson rehberliği, nörit büyümesi ve nöronal plastisite dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde gen ekspresyonunu düzenlerler (Eyileten ve diğerleri, 2021).

Nörodejeneratif bozuklukların nedeni olarak farklı mekanizmalar rol oynasa da, son çalışmalar RNA işlemlerindeki anormalliklerin artan kanıtlarını göstermekte ve nörodejenerasyon sürecinde ekspresyonu değiştirdiği için RNA'nın olası rolünü vurgulamaktadır. Bazı nörodejeneratif hastalıklar için, mRNA toksik-fonksiyon kazanımı önerilirken, diğer nörodejeneratif bozukluklar ise değişmiş veya kayıp olan kodlamayan RNA ve RNA bağlama aktiviteleri yoluyla etkilenmektedir (Fontana ve diğerleri, 2015).

Hayvan modellerinde ve hastalardan alınan ölüm sonrası beyinlerde yürütülen araştırmalar, birçoğu nöroprotektif/nörodejeneratif süreçlerde yer alan ve anahtar hastalık genlerini hedef alan çeşitli miRNA'ların seviyelerinde bir düzensizlik olduğunu göstermiştir. MiRNA'lar hücrelerde üretilmelerinin yanı sıra, BOS'ta, kan ve türevleri (plazma ve serum) dahil olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında da salınır (Maffioletti ve diğerleri, 2020).

Kümülatif kanıtlar, mikroRNA'ların CNS bozuklukları için yeni terapötik hedefler olarak ortaya çıktığını göstermiştir. MiRNA'lar, hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolizması, apoptoz, bağışıklık tepkileri ve diğer patofizyolojik süreçler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelerde yer alır (Shao ve Xu, 2022).

Birçok araştırma, miRNA profilinin patolojik koşullarda değiştiğini göstermektedir. Bu bağlamda, hastalıklar ile miRNA'lar arasındaki ilişkiler, özellikle miRNA'ların çoklu hedefleri düzenleme yeteneği gibi önemli özellikleri sayesinde Alzheimer gibi çok faktörlü hastalıkların anlaşılması ve araştırılması açısından umut vericidir (Lee ve diğerleri, 2021). Dolaşımdaki miRNA'lardaki AD ile ilişkili değişiklikler, birkaç çalışma tarafından tanımlanmış ve AD'nin hem teşhisinde hem de prognozunda yardımcı olabilecek invaziv olmayan ve hassas biyobelirteçler olarak önerilmiştir (Maffioletti ve diğerleri, 2020).

2.14.4. BDNF'yi Düzenleyen miRNA'ların AD'deki Etkileri

Çeşitli BDNF transkriptlerinin farklı fonksiyonlarını anlamak, spesifik eksonların ekspresyonunun modülasyonunu ve BDNF ile ilişkili miRNA'ların fonksiyonunu araştırmak, çevresel hareketlere cevaben gen ekspresyonundaki kalıcı değişiklikleri eski haline getirmek için umut verici bir yol sunabilir. Bu da, nörodejeneratif bozuklukların tedavisi için yeni terapötik perspektifler açabilir (Colucci-D'Amato ve diğerleri, 2020).

Biriken veriler, BDNF sentezinin miRNA'lardan etkilenebileceğini, aslında BDNF ve miRNA'lar arasında düzenleyici bir negatif geri besleme döngüsü olduğunu göstermektedir. BDNF tedavisi, nöronal miRNA ekspresyonunu uyarırken, miRNA'lar genellikle BDNF ekspresyonunu inhibe eder. Bu negatif geri besleme döngüsü, normal hücrelerde bir denge durumunda tutulur. miRNA'lardaki veya BDNF'deki değişiklikler, nörodejeneratif hastalıklar veya nöropsikiyatrik bozukluklarda yer alan patojenik mekanizmalara katkıda bulunur (Colucci-D'Amato ve diğerleri, 2020).

Yapılan alışmalar, BDNF ve miRNA'lar arasındaki etkileşimin AD'nin patofizyolojisinde anahtar rol oynayabileceğini göstermiştir. miRNA'lar, BDNF'nin ekspresyonunu düzenleyebilir ve bu etkileşim, AD'nin patolojisinde rol oynayarak potansiyel olarak yeni tedavilere aracılık edebilir. Literatürde Alzheimer hastalığında BDNF gen polimorfizmleri ve BDNF ekspresyon çalışmaları yer alırken, BDNF'yi düzenleyen miRNA polimorfizmleri ile ilgili ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcut değildir.

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) insan popülasyonunun en az %1'inde bulunan ve genom boyunca ortaya çıkan nokta varyasyonlarıdır. İnsan popülasyonunda bulunan SNP'ler, hastalıkların gelişimi ve hastaların ilaçlara tepkisi ile ilişkilendirilmiştir (Emahazion ve diğerleri, 2001). Bu sebeple miRNA SNP'lerinin BDNF'ye bağlanan transkripsiyon faktörlerini ve transkripsiyonel yanıtı etkileyerek AD'nin patofizyolojisini etkileyebileceğini düşündük. Araştırmamızda, Alzheimer hastalığında BDNF genini düzenleyen miRNA polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelemek için Genom apında İlişkilendirme alışmaları (GWAS) verilerinde tanımlanmış olan bölgelerde yer alan ve Alzheimer riski ile bağlantılı olduğu bilinen 5 miRNA hedef bölgelerindeki polimorfizmleri ele aldık. BDNF'yi düzenleyen miRNA'lara dair daha fazla araştırma, AD'nin patofizyolojisini daha iyi anlamamıza ve yeni tedaviler geliştirmemize yardımcı olabilir. Bu sebeple çalışmamızda miRNA bağlanmasını modüle etmesi muhtemel olan fonksiyonel miRNA SNP'lerini tanımlamayı amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Gereçleri

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- ✓ Mikropipet Seti (Eppendorf)
- ✓ Otomatik Pipet (Viaflo Voyager Digital Pipet)
- ✓ Sıcak Su Banyosu (ISOLAB Su ve Yağ Banyosu)
- ✓ Derin Dondurucu (Nüve FR 290)
- ✓ Buzdolabı (Beko 754140)
- ✓ Class II Biogüvenlik Kabini (Nüve LN 120)
- ✓ Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5702)
- ✓ Plate Santrifüj (EcoMate 2500 rpm)
- ✓ Çalkalamalı Isıtıcı (PhileKorea Heating Block Shaker)
- ✓ Plate Karıştırıcı (PhileKorea Multi Shaker)
- ✓ Mikrosantrifüj Cihazı (ISOLAB Santrifüj Mini 7000 rpm)
- ✓ Vorteks (ISOLAB Laborgerate)
- ✓ Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 1000 V3.7)
- ✓ PCR (BIOER Gene-Pro Thermal Cycle)
- ✓ Entegre Akışkan Devre (Fluidigm Integrated Fluidic Circuit (IFC))
- ✓ Real-Time PCR (Fluidigm BioMark HD)

3.1.2. Kullanılan Yazılımlar

- ✓ G-Power Meta Analiz Programı
- ✓ Fluidigm Primer Tasarlama Platformu D3 Testi
- ✓ Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

- ✓ EDTA'lı Tüpler
- ✓ Buz Aküsü
- ✓ Filtreli DNase-RNase Free Mikropipet Uçları
- ✓ 96'lık Piko Plate
- ✓ 96 kuyulu Well Plate
- ✓ 8'li Strip Tüpler
- ✓ PCR Tüpü ve Santrifüj Tüpü
- ✓ Ependorf Tüpler (1,5 ml, 2 ml)
- ✓ Spin Kolonlar
- ✓ Collection Tüpleri (1,5 ml, 2 ml)
- ✓ Seal
- ✓ Seal Kapatıcı

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar

- ✓ Hasta ve Kontrol EDTA'lı Kan Numuneleri
- ✓ %96-100 Absolute Etanol (Analitik olarak saf)
- ✓ Moleküler Sınıf dH_2O
- ✓ Proteinaz K
- ✓ Binding Buffer
- ✓ Wash Buffer W1
- ✓ Wash Buffer W2
- ✓ Elüsyon Buffer
- ✓ Lokus Spesifik Primer (LSP) (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)
- ✓ Spesific Target Amplifikasyon (STA) Primer (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)
- ✓ Allel Spesifik Primer 1/ Allel Spesifik Primer 2 (ASP1/ASP2) Karışımı (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)
- ✓ DNA Suspension Buffer (Teknova, Cat.No: T0223)
- ✓ 10X SNPType STA Primer Pool
- ✓ Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Cat.No: 206143)

- ✓ 10X SNPtype STA Primer Pool (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)
- ✓ RNase-DNase Free Water (Qiagen, Cat.No: 129114)
- ✓ 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, Cat.No: 100-7611)
- ✓ 2X Fast Probe Master Mix (Biotium, Cat.No: 31005)
- ✓ 20X SNPtype Sample Loading Reagent (Fluidigm, Cat.No: 100-7608)
- ✓ 60X SNPtype Reagent (Fluidigm, Cat.No:100-7607)
- ✓ ROX (Biotium, Cat.No: 29052)

3.1.5. Kullanılan Kitler

- ✓ Genomik DNA İzolasyon Kiti (Diagnovital RTA)

3.1.6. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

▪ Proteinaz K Hazırlanması

İlk kullanımdan önce Proteinaz K tüpüne, tüpün üstünde ve aşağıdaki tabloda belirtildiği miktarlarda dH_2O eklendi ve vorteks yapılarak iyice çözüldü (Tablo 2). Daha sonra 2–8 °C 'de saklandı. Uzun süreli kullanım için ise enzim tercih edilen miktarlarda alıquotlanarak –20 °C 'de saklandı.

Tablo 2. Proteinaz K için gerekli bileşenler.

Proteinaz K	
Test sayısı	Eklenecek dH_2O
50 test	1,1 ml
100 test	2,2 ml

▪ Wash Bufferların Hazırlanması

Wash Buffer W1 ve Wash Buffer W2 kit içerisinde konsantre halde geldi. İlk kullanımdan önce şişenin üstünde ve aşağıdaki tabloda belirtildiği miktarlarda etanol (%96 –100) eklendi (Tablo 3, Tablo 4).

Tablo 3. Wash Buffer W1 için gerekli bileşenler.

Wash Buffer W1		
Test Sayısı	Orjinal Miktar	Eklenecek Etanol
50 test	19 ml	19 ml
100 test	38 ml	38 ml

Tablo 4. Wash Buffer W2 için gerekli bileşenler.

Wash Buffer W2		
Test Sayısı	Orjinal Miktar	Eklenecek Etanol
50 test	28,5 ml	9,5 ml
100 test	57 ml	19 ml

3.2. Deneysel Çalışma Tasarımı

Aydın Devlet Hastanesi Psikiyatri polikliniğine başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden Alzheimer Tipi Demans hastaları ile yine Psikiyatri polikliniğine başvuran ve Alzheimer tipi Demans ile başka nörodejeneratif hastalığı bulunmayan aynı yaş grubunda kontrol grubu bireyleri Etik Kurul onayından sonra çalışmaya dahil edildi. Dahil edilen Alzheimer tipi Demans hastaları çeşitli sosyodemografik özellikler, klinik değişkenler açısından karşılaştırılarak ve kontrol grubuna göre miRNA polimorfizmleri açısından fark olup olmadığının araştırılması planlanmıştır.

Çalışma için etik onay (Protokol No: 2022\174), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Kurumsal Etik Kurulundan 27 Kasım 2022'de alınmıştır. Çalışmadan önce hasta ve kontrol grubu katılımcılarından Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu imzalı bir şekilde alınmıştır.

Hasta ve sağlıklı bireylerin rutinde yapılan kan tetkiklerinden elde edilen numuneler ile Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakóltesinde miRNA gen polimorfizmleri çalışılmıştır.

3.2.1. Araştırmanın Örneklem Büyüklüğü

Çalışmamız için gereken örneklem büyüklüğünün tespitinde güç analizi, G-Power kullanılarak yapılmıştır. Alzheimer tipi Demans ile ilişkili BDNF genini düzenleyen miRNA'lar hakkında literatürde benzer bir çalışma bulunamadığı için orta etki büyüklüğü düşünülerek 0,05 tip 1 hata ile her iki gruba en az 64 denek alınması gerekmektedir. Araştırma sürecinde deneye 70 hasta ve 70 kontrol grubu dahil edilmiştir.

3.2.2. Kontrol ve Hasta Grubunun Klinik Değerlendirme Ölçekleri

Olguların klinik değerlendirmesi ve ölçekler birer kez uygulanmıştır. Yapılandırılmış klinik görüşmesi tamamlanan hasta ve kontrol grubuna psikometrik testler verilmiştir. Hasta ve kontrol grubuna uygulanacak psikometrik testler şunlardır;

- ✓ DSM-IV Eksen I Bozuklukları için Yapılandırılmış Klinik Görüşme (SCID-I)
- ✓ Hamilton Depresyon Ölçeği (HDDÖ)
- ✓ Yale Brown Obsesif Kompulsif Bozukluk Ölçeği (Y-BOKÖ)
- ✓ Mini-Mental Durum Muayenesi (MMSE)
- ✓ Hamilton Anksiyete Değerlendirme Ölçeği (HADÖ)
- ✓ DSM-III-R-Kişilik Envanteri (SCID-II).

3.2.3. Kontrol ve Hasta Gruplarının Oluşturulması

3.2.3.1. Olguların alışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Alzheimer Tipi Demans Grubu

- ✓ Aydın Devlet Hastanesi Psikiyatri polikliniğine başvuran Nöroloji tarafından değerlendirilmiş demans tanısı konulmuş ya da araştırmanın başlangıç tarihinden

itibaren yapılan inceleme ve değerlendirme sonucunda demans tanısı alan hastalar arasından klinik olarak Alzheimer tipi Demans tanısı konulan

- ✓ Birinci dereceden akrabalarında herhangi bir nörodejeneratif hastalığı olmayan
- ✓ 40-90 yaş aralığında
- ✓ Eşit sayıda erkek ve kadın hastalar
- ✓ Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu okuyup çalışmaya katılmayı kabul eden hasta ve yakınları araştırmaya hasta grubu olarak dahil edilmiştir.

Kontrol Grubu

- ✓ Alzheimer tipi Demans hastalarıyla klinik değerler yönünden karşılaştırma yapmak için yaş (40-90 yaş) ve cinsiyet yönünden eşleştirilmiş Demans tanısı olmayan
- ✓ Birinci derecede akrabalarında herhangi bir nörodejeneratif hastalığı olmayan
- ✓ SCID-I klinik değerlendirme ölçeğine göre majör psikopatolojisi olmayan
- ✓ Gönüllü olur formunu okuyup imzalayan sağlıklı kontrol hastası çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2.3.2. Olguların Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

Alzheimer Tipi Demans Grubu

- ✓ Alzheimer tipi demans dışındaki diğer demans tanısı olanlar
- ✓ Nörolojik hastalığı olanlar (Multi-enfarkt demans, Kafa travması, Diffüz Lewy Cisimcikli Demans, Hipotiroidizm, Parkinson, B-12 eksikliği vb.)
- ✓ Nöropskiyatrik hastalığı olan olgular
- ✓ Hasta ve kontrol grubunun 40-90 yaş aralığının dışında olması
- ✓ Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu okuyup imzalayamayacak hastalar
- ✓ Bilgilendirilmiş gönüllü olur formuna ve ayrıntılı açıklamalara rağmen çalışmaya katılmayı kabul etmeyen hastalar

Kontrol Grubu

- ✓ Demans tanısı olan; SCID-II, HDDÖ, HADÖ, MMSE uygulanarak, bu testlerin eşik değerlerini geçen kişiler

- ✓ Şizofreni ve Bipolar bozukluk tanısı almış
- ✓ Zeka geriliği ve madde kullanım bozukluğu öyküsü olan hastalar
- ✓ İnme geçirmiş ve diyabeti olan bireyler
- ✓ Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamayan olgular çalışma dışı bırakılmıştır.

Çalışmaya dışlanma ve dahil edilme kriterlerine göre seçilen hasta ve kontrol grubu klinik değişkenler, yaş ve cinsiyet yönünden karşılaştırılarak değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmaya katılmayı kabul eden sağlıklı kontrol grubu SCID-I klinik değerlendirme ölçeğine göre majör psikopatolojisi olmayan kişilerden oluşur. Bu kişilerin aynı zamanda SCID-II, HDDÖ, HADÖ, MMSE uygulanmış ve skorları kaydedilmiştir.

Çalışmaya katılmayı kabul eden Alzheimer tipi demans hastalarına, klinisyen tarafından oluşturulmuş sosyodemografik veri formu, MMSE, SCID-I, SCID-II, Y-BOKÖ, HDDÖ, HADÖ uygulanmıştır. Çalışmaya katılanların rutin tahlilleri için alınmış kanları aynı zamanda bu çalışma için de kullanılmış ve DNA ekstraksiyonu yapılmaya kadar -20 °C 'de saklanmıştır.

3.2.4. Alzheimer Tipi Demansta BDNF İlişkili miRNA'ların Seçilmesi

Alzheimer tipi demansta BDNF genini regüle eden daha önce çalışılmamış olan ancak ilişkisi olabileceği düşünülen miRNA polimorfizmleri;

- ✓ miRBase (<https://www.mirbase.org/>)
- ✓ miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)
- ✓ miRNAMap (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>)
- ✓ TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) veritabanları kullanılarak seçilmiştir.

3.2.5. Genotipleme için miRNA Polimorfizmlerinin Seçilmesi

Araştırmada 5 adet *miRNA* gen polimorfizmleri *miR-206* (*rs16882131*), *miR-30e* (*rs112439044*), *miR-30e* (*rs10489167*), *miR-26b* (*rs188612260*), *miR-124* (*rs5315564*) üzerine bir çalışma tasarlanmıştır.

3.2.6. miRNA Polimorfizmleri İçin SNPType Assay Yöntemine Uygun Primer Tasarımı

Örneklerin genotip profillerinin belirlenmesi için SNPType Assay (Single Nucleotide Polymorphism Typing Assay) yöntemi kullanıldı. Yöntem için primer tasarlarken hedef SNP dizisine primerlerin benzersiz bir tanımlayıcılığı belirli kriterlerle sağlandı. Gerekli primer özellikleri aşağıda maddelenmiştir:

- ✓ Hedef dizi uzunluğu upstream ve downstream dizileride dahil olmak üzere 60bp-250bp arasında olmalı
- ✓ İnsersiyon/ delesyon (In/dels) bölgeleri hedef dizide 10 bp'den az olmalı
- ✓ Hedef dizi CNV bölgeleri içermemeli
- ✓ Hedef dizi salt tek SNP içermeli
- ✓ Hedef dizinin G/C içeriği %65'ten az olmalı
- ✓ Hedef dizide üçten fazla tekrar eden baz olmamalı
- ✓ Hairpin katlanmaları oluşturmaması için oligonükleotit kendi içinde karşılıklı eşleşen diziler içermemeli
- ✓ Primer çiftleri dimer oluşumuna neden olacak şekilde birbirleri ile eşlenik olmamalı
- ✓ Primer çiftlerinin T_m 'leri birbirine denk veya yakın olmalı

Primerler SNPType Assay yönteminde, Fluidigm platformu D3 Testi kullanılarak allele özgü oluşturulmuştur (<https://d3.fluidigm.com/>; Fluidigm, South San Francisco, CA, ABD). Teste özgü üç tür primer SNP'ler için pre-amplifikasyon ve Real-Time PCR basamaklarında kullanılır.

Bunlar; Spesifik Hedef Amplifikasyon (STA) Primeri

Lokusa Özgü (LS) Primer

Allelik Spesifik (AS) Primerdir.

Aşağıda yer alan Tablo 5'de dizayn edilen üç tür Primer dizileri belirtilmiştir.

Tablo 5. SNP' ler için Real-Time PCR Primer Dizilerinin Sentezlenmesi.

miRNA	Referans sekans	Alleller	ASP1 hedefi	ASP2 hedefi	SNP dizisi	Primer Yönu	STA Primeri	LSP Primeri	ASP1 Primeri	ASP2 Primeri
<i>miR-206</i>	<i>rs16882131</i>	CT	C	T	TTTTAATTTTCCTTCACTGGATCCCAACATTAATAAAAA GAATCACATTCAAAATGCACAAAAACAGCAGCAGTGAA TTAATTAGTAGTAATAACAAGGACTGGATAGACTGTA GCTGCACAAGAATAAGCCAGGAAAACGTGGTGCTG[C/T]TTATCTGTGAACAAACAGTAGGAAGGATTGGTCCCAA GCAGCACTGCCATTCTCACMACAGATTTATTTAGCAT GATTTGGTCGGGCGGGGGGATTTAGGATGAGTTGAGA TCCAGTGATCTTCTCGCTAAGAGTTTCTGCCTG	Forward	TAGCTGCACAAG AATAAGCCAG	GCTGCTTGGGAC CAATCCT	GGGAAACGTGGT GCTGC	AGGGAAACGTGGT GCTGT
<i>miR-30e</i>	<i>rs112439044</i>	CT	C	T	ATTTGTAATTCTGACCTGCATGAGGGCCTTTGGATTAG CAAGCCTCTGTACCTCCTTACTAGAGTAGGGTGTGCC TCACTGCGTCTCCGTTCTTTCTGGGCAGTCTTTGCTACTG TAAACATCCTTGACTGGAAGCTGTAAGGTGTT[C/T]AGA GGAGCTTTCAGTCGGATGTTTACAGCGGCAGGCTGCCA CGGTCTGCCAGCTACGCACCGGCTTTGAAACATTGC AGGTTTGTGCCACAGGCTCAATTCCTCTTTGGGGGT CCTTCCCTCTCTCAGAAGTCAACAAGA	Forward	CAGTCTTTGCTAC TGTAACATCCT	GCCTGCCGCTGT AAACATCC	TGACTGGAAGCT GTAAGGTGTTT	TGACTGGAAGCTGT AAGGTGTTT
<i>miR-30e</i>	<i>rs10489167</i>	AG	A	G	AGTCTCTGGGTACGGAAAAGGAGCAGGCCCTATTAGAG GAGAAGTTTCGAGGGTGTCTGATTGCTTCCCTAGCTTC CCYTCTAATAAAGGATTTACCTTAGAGGACTGATAGGA TTTAGATTCGGGGCTCTTGGAGTTGTAATGATATA[A/G] CAAGTCAAAGTTCTGGATGCAGGCCTCTGTCGTTGCTT GCAAAAAGTGACCTTGAAAAACTGCTGGGGAGTTGAAA ATTGAAGGACAAAGTTTGTATACAGATTTGGACTGA AAAGCTCTATTTAAGATGAAAAGAGACTGTACTTC	Revers	CTTTTGCAAGCA ACGACAGAG	ATTCGGGGCTCTT GGAGTTGTA	TGCATCCAGGAA CTTTGACTTGT	GCATCCAGGAACCTT TGACTTGC
<i>miR-26b</i>	<i>rs188612260</i>	CT	C	T	GAGACTTGTCCCAAAGTCACACAGAACCTCAAGGGCTT GTGCTGACTCCAAGCCTGCAGAGTGGGCTCCTCCTTAG GCTCCCCGTGTGTGCTCCCTCGCCCCACCCTGCCCGG GACCCAGTTCAAGTAATTCAGGATAGGTTGTGTG[C/T]T GTCCAGCCTGTTCTCATTACTTGGCTCGGGGACCGGTG CCCTGCAGCCTTGGGGTGAGGGGGCTGCCCTGGATTTC CTGCACTAGGCTGAGGTTGAGGCAGGGGAAGGGATTGG GAATTAGGGACCTCGTGAGGTAGGACTGGCCAGT	Revers	GGTCCCCGAGCC AAGT	TGCCCCGGACCC AGTTC	ATGGAGAACAGG CTGGACAG	AATGGAGAACAGG CTGGACAA
<i>miR-124</i>	<i>rs5315564</i>	CG	C	G	CCGAGCCAGGCGCCTCCCGAGACCTCYGCGCAGCGGC CGCGGGCGGAGGGGAGGGGTCTGGAGCTCCCTCCGGC TGCCTGTCCCGCACCGGAGCCCGTGGGGTGGGAGGTG TGCAGCCTGTGACAGACAGGGGCTTAGAGATGCAAA[C/ G]AGACTCAGGGAGAGAAAACAGAAGCTGATTCTGTGAC AGAAGCAGATCTGTGCAGCACAGATGCGGTGTGCGTGG GGAGGGGGTCGCCTGGGAGCGCATTGCGGAGTGCTTGT GTGTGCAGATTTTCTCTGGGCTCAGGACTCATTGTAT	Revers	GCTTCTGTACAG AATCAGCT	TGTGCAGCCTGT GACAGACA	CTTCTGTTTCTCT CCCTGAGTCTG	CTTCTGTTTCTCTCC CTGAGTCTC

3.3. Çalışma Yöntemi

3.3.1. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Araştırma için EDTA'lı tüplerde toplanan periferik kanlar çalışma başlangıcına kadar -20 °C'de dondurularak saklandı. Örnekler yeterli sayıya ulaştığında ticari olarak sağlanan kit (RTA Genomic DNA Isolation kit, Türkiye) ile DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon Protokolünün aşağıda belirtilen basamakları her bir hasta ve kontrol örneği için uygulandı.

1. Donmuş kan numuneleri sıcak su banyosunda 37 °C'de çözdürüldü. Numuneler çözülünce optimum verimin korunması için beklemeden izolasyon akışına girildi.
2. 1,5 ml'lik bir eppendorf tüpüne önceden hazırladığımız 20 µl Proteinaz K eklendi ve üzerine 200 µl kan örneği ilave edildi.
3. Tüpe 200 µl Binding Buffer (1x için) eklendi ve 20-25 saniye vurum-vorteks yapılarak karıştırıldı (Resim 1). Vorteks sonrası örneklerin tüpün dibine düşmesi için tüpler kısa süre santrifüjlendi (Resim 2). Her tüp 3 dakikada bir vortekslenerek ısı bloğunda 65 °C'de 15 dakika boyunca Proteinaz K aktivasyonu için inkübasyona bırakıldı (Resim 3).
4. Alınan tüpler üzerine 260 µl etanol (absolute %96-100) eklendi ve 20 saniye vurum-vorteks yapıldı ve santrifüjlendi
5. Tüp içerisindeki karışım, collection tüplerine yerleştirilen spin kolonlara aktarıldı.
6. Spin kolon 5,000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.
7. Santrifüjden alınan spin kolon yeni bir collection tüpüne takıldı ve tüple birlikte altta kalan artefaktlar atıldı.
8. Kolona 700 µl Wash Buffer 1 eklendi ve 5,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Collection tüpü atıkla birlikte atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
9. Kolona 700 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 16,000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi. Collection tüpü atıkla birlikte atılıp kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
10. DNA'yı kalan alkollerden uzaklaştırmak için boş kolon collection tüpünde 16,000 x g'de 3 dakika santrifüjlendi.
11. Spin kolon, steril 1.5 ml'lik bir eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl 70 °C'ye ısıtılan Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. 5,000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.
13. 16,000 x g'de 30 saniye daha santrifüjlendi.
14. Son adımda spin kolon atıldı ve elüsyon tamponunda genomik DNA saflaştırıldı.



Resim 1. Minisantrifüj ve ISOLAB Laborgerate Vorteks Cihazı.



Resim 2. Eppendorf Centrifuge 5702-Santrifüj Cihazı.



Resim 3. PhileKorea Heating Block Shaker-Çalkalamalı Isıtıcı.

Genomik DNA saflaştırma protokolünün ardından DNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Bunun için NanoDrop 1000 Spektrofotometre V3.7 (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak absorbans metodolojisi ile değerlendirildi (Resim 4). Elüe edilen DNA'nın saflığı 260 nm/280 nm absorbans ölçüm oranı 1,8-1,9 arasında elde edildi. Bu saflık oranı hassas moleküler ve tanı çalışmaları için DNA'nın yeterince saf olduğunu gösterdi. Reaksiyon başına 5-50 ng DNA varlığının SNP tespitinde yeterli olacağı bilinmektedir.



Resim 4. Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spektrofotometre.

3.3.2. SNP Genotipleme Testi: SNPTyping Assay

Tek nükleotid polimorfizmleri, insan genomlarında yüksek yoğunlukları, nispeten eşit dağılımları, hastalık lokuslarının haritalanması ve aday gen ilişkilendirme çalışmaları nedeniyle tercih edilen biomarker olmuştur. Genotipleme sistemlerinde çok sayıda örnek için verimli, uygun maliyetle üretilebilen esnek bir platforma ihtiyaç vardır. Araştırma kapsamında buna uygun, nanolitre hacimlerinde reaktifleri Entegre Akışkan Devre (Integrated Fluidic Circuit (IFC)) tabanlı bir “Genotyping Flex-Six Chip (Dinamik Array)” üzerinde işleyen bir BioMark teknolojisi kullanıldı. BioMark sisteminin avantajı tek chip mimarisi üzerinde ≥ 96 örnekte ≥ 96 SNP analizi yapılabilir ve bu işlemleri daha az pipetleme ve daha fazla reaksiyon sayısını hatasız karıştırarak gerçekleştirir.

Fluidigm (Advanta, Sample ID Genotyping Panel) tarafından geliştirilen “SNPType Paneli”, 70 hasta ve 70 kontrol grubu DNA’ları ile beş ilişkili miRNA bölgesi Fluidigm BioMark HD Real-Time PCR platformu ile incelenir. SNPType kimyası (Fluidigm Corp., South San Francisco, CA, ABD) kullanarak üretici firmanın hazırladığı problemler tekli baz değişimlerini saptayabilir ve böylece polimorfizmlerin analizi mümkün kılınır. Etiketli problemler, allele spesifik PCR primerleri ve ortak bir revers primer kullanır. Her reaksiyonda universal bir prob seti kullanılır ve floresan sinyali üretilir. Amplifikasyon sonunda SNP’ler bir erime eğrisi (melting curve) üzerinden hesaplanır (Wang ve diğerleri, 2009).

Tüm SNPType assayde:

Primerler, numune başına üç ayrı oligo plakasında sağlanır (ve tüm oligolar nükleaz içermeyen sudadır)

- Lokusa Özgü Primer (LSP): Her primer, 100 μ M’ye (primer başına) normalize edildi.
- Spesifik Target Amplifikasyon (STA) Primer: Her primer 100 μ M’ye (primer başına) normalize edildi.
- Allele Spesifik Primerler (ASP1 ve ASP2): Her primer, 100 μ M’lik nihai konsantrasyona (primer başına) eşit molar oranlarda karıştırıldı.

3.3.3. SNPType Assay Flex Six Chip Protokolü

3.3.3.1. 10X SNPType Spesifik Target Amplifikasyon (STA) Primer Havuzunun Hazırlanması

Protokole başlamadan önce Spesifik Target Amplifikasyon (STA) adımı için kullanılacak olan primer havuzu hazırlandı. Primer hazırlığı beş farklı hedef sekans için hazırlanmış konsantre gelen primerlerden LSP ve STA primerleri kullanıldı (Tablo 6). Bu adımda ve sonraki adımlarda hazırlanan karışımlar Klas II sınıfı Biyogüvenlik Kabininde gerçekleştirildi (Resim 5).

Tablo 6. STA primer havuzu için gerekli bileşenler.

Specific Target Amplifikasyon (STA) Primer Havuzu	1 primer	12 primer
Lokus spesifik primer (LSP) (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)	2 µl	24 µl
STA primer (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)	2 µl	24 µl
DNA suspension buffer (Teknova, Cat.No: T0223)	396 µl	352 µl
Toplam	400 µl	400 µl

Her referans dizi için hazırlanmış primer havuzuna vorteks-spin atıldı ve preamplifikasyon adımına kadar -20/-80°C' de saklandı.



Resim 5. Nüve LN 120 Klas II Biyogüvenlik Kabini.

3.3.3.2. Spesifik Target Amplifikasyon (STA) Adımı

Giriş DNA miktarı ve/veya kalitesi ideal olmadığında hedeflenen SNP dizilerini zenginleştirmek için bir spesifik hedef amplifikasyonu gerçekleştirilebilir. Forward ve Revers STA primerleri ön amplifikasyon adımını hedef diziyeye yönelik özgüllüğü sağlamak için kullanılır. 60 nanogramın üzerindeki DNA konsantrasyonuna sahip örnekler için bu adım atlanabilir. Aşağıda 72 örneğin STA reaksiyonu için gerekli bileşenlerinin karışımı hazırlandı. 10X SNPtype STA Primer Pool, önceki basamakta hazırlanan primer havuzudur. Pipetleme kayıpları için ekstra hacimler hesaplandı (Tablo 7).

Karışım hazırlanmaya başlamadan $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' den bileşenler çıkarıldı ve buz aküsü üzerinde çözünmeye bırakıldı. DNA örnekleride çözüldükten sonra shakerda (PhileKorea Multi-Shaker) 10 dk aralıklı çalkalandı (Resim 6).

Tablo 7. STA karışımı için gerekli bileşenler.

STA karışımı	1 Örnek	x85 örnek (72 örnek+)
Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Cat.No: 206143)	2,5 µl	212,5 µl
10X SNPtype STA Primer Pool (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)	0,5 µl	42,5 µl
RNase-DNase free water (Qiagen, Cat.No: 129114)	0,75 µl	63,75 µl
Toplam	3,75 µl	378,75 µl



Resim 6. PhileKorea Multi Shaker-Well Plate/Piko Plate Karıştırıcı.

Hazırlanan STA PCR karışımı 8'li strip tüpün, ilk sırasından başlayarak 6 kuyusuna 53 μ l olarak pay edildi. Buradan kanallı otomatik pipet (Viaflo Voyager Digital Pipet) ile **3,75 μ l** alınarak 96'lık piko plate'in tüm kuyularına dağıtıldı. Tüm kuyulara mixin dağıtılması termal döngü için önemlidir.

Bu karışım üzerine her bir kuyucuğa sırayla DNA örnekleri, pozitif ve negatif kontroller **1,25 μ l** olarak pipetlendi. PreAmp ana karışımı protokole göre toplamda **5 μ l**'lik numune karışımı ve tahlil karışımları bir reaksiyonda gerçekleşir. Piko plate seal ile kaplandı, plate santrifüjünde 2000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi (Resim 7).



Resim 7. EcoMate 2500 rpm Plate Santrifüjü.

Sonrasında dokunup çekerek 3 sn nazikçe vortekslendi. Burada plate içindeki karışımın seal'e sıçramamasına dikkat edildi. Bu santrifüjleme ve vorteksleme 3 tur gerçekleştirildikten sonra 1 dk son santrifüjleme yapılır ve piko plate thermal cycle (BIOER Gene Pro Thermal Cycle) cihazına yerleştirildi (Resim 8). PCR cihazındaki boşluklar boş piko plateler ile doldurularak döngü başlatıldı. Aşağıda belirtilen sıcaklık döngülerinde preamplifikasyon gerçekleştirildi.



Resim 8. Piko plateler BIOER Gene-Pro Thermal Cycle cihazına yerleştirilmiş.

STA Thermal Cycle protokolü

95 °C	15 dakika		
95 °C	15 saniye	}	14 cycle
60 °C	4 dakika		
4 °C	∞		

Termal döngünün sonunda piko plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Örnekler Plate santrifüjünde 1 dk santrifüjlendi. Sonraki adımda kullanmak üzere STA DNA örnekleri 1:100 oranında DNA suspension buffer ile dilüe edildi. 72 STA DNA örneği 96'lık well plate'e her bir örnekten 1 µl olmak üzere dağıtıldı ve her bir örneğin üzerine 99 µl DNA suspension buffer eklenip, seal ile üzeri kapatıldı. Örnekler shakerda 10 dk çalkalandı ve son adımda 1 dk süresince santrifüjlendi. Dilüe STA DNA'lar -20 °C' de saklandı.

3.3.3.2.1. SNPtype Primer Karışımının Hazırlanması

Bu adımda Real-Time PCR basamağında kullanılacak primer havuzları oluşturulur. Her primer için aşağıdaki karışımlar hazırlanır (Tablo 8).

Tablo 8. SNPtype Primer karışımı için gerekli bileşenler.

SNPtype Primer Karışımı	1 primer
ASP 1 /ASP 2 primer karışımı (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)	3,0 µl
LSP Primer (Fluidigm, Cat.No: ASY-GT-XS)	8,0 µl
DNA suspension buffer (Teknova, Cat.No: T0223)	29,0 µl
TOPLAM	40 µl

SNPtype primer karışımı hazırlanırken 2 tane 8’li strip tüpün ilk altışar sırası sıralı bir şekilde etiketlendi. Her bir hedef sekans için ayrı hazırlanmış ASP 1/ASP 2 primerleri ile 12 tüp SNPtype primer karışımı hazırlandı.

3.3.3.2.2. 10X Assay Karışımının Hazırlanması

Real-Time PCR basamağında kullanılacak assay karışımı aşağıdaki gibi hazırlanır (Tablo 9).

Tablo 9. 10X Assay karışımı için gerekli bileşenler.

10X Assay Karışımı	1 örnek	x 80 örnek (72 örnek+)
2x Assay Loading Reagent (Fluidigm, Cat.No: 100-7611)	2,5 µl	200 µl
RNase-DNase free water (Qiagen, Cat.No: 129114)	1,5 µl	120 µl
TOPLAM	4,0 µl	320 µl

10x Assay karışımı, Assay Loading Reagent tek tüp içerisinde moleküler saflıkta su ile hazırlandı ve vorteks-spin atıldı. Örnek başına 4 µl 10x Assay karışımı ve üzerine bir önceki basamakta hazırlanan her SNPtype primer karışımından 1 µl eklendi. Örnek dağıtımın kanallı otomatik pipete uygunluğu için 10x Assay karışımı 2 adet 8’li strip tüpün ilk 6 kuyusuna 24 µl olarak dağıtıldı. Strip tüpler üzerine her biri 6 µl SNPtype primer eklendi. Burada 4 µl assay /1 µl primer oranı korunarak hacim ayarlanmıştır. Strip tüplerin kapakları kapatıldı ve plate karıştırıcı üzerinde el ile bastırılarak 10 saniye vortekslendi. İşlem 3 kez her seferinde 4-5 saniye ara verilerek tekrarlandı ve sonda 2 dakika spin atıldı.

3.3.3.2.3. Örnekler için Mix Hazırlanması

Real-Time PCR adımıında kullanılacak örnek mix karışımı aşağıdaki gibi 72 örnek (1 set) için hazırlanır (Tablo 10).

Tablo 10. Örnek Mixi için gerekli bileşenler.

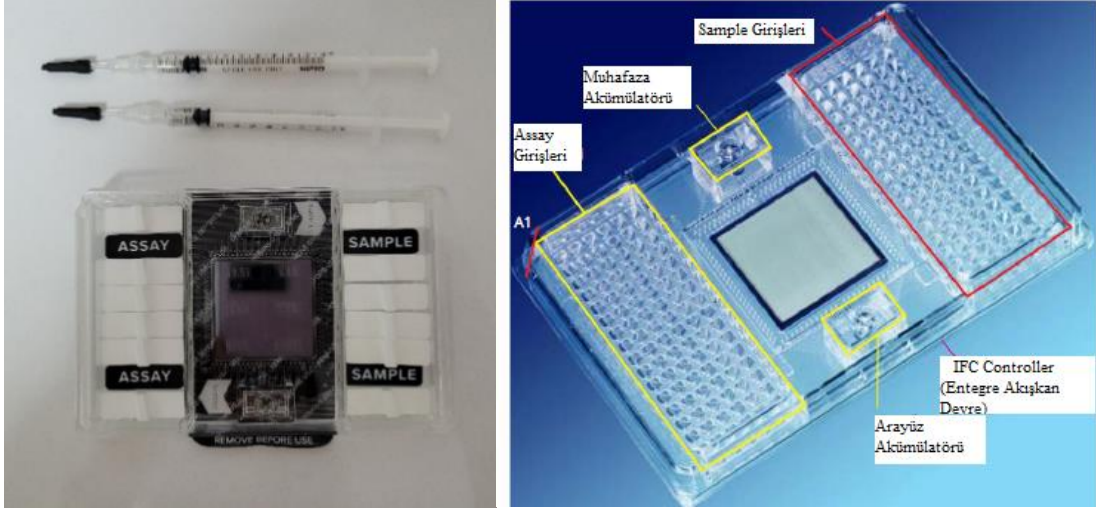
Örnekler için Mix Hazırlanması	1 Örnek	x 85 Örnek (72Örnek+)
2X Fast Probe Master Mix (Biotium, Cat.No: 31005)	3 µl	255 µl
20X SNPtype Sample Loading Reagent (Fluidigm, Cat.No: 100-7608)	0,3 µl	25,5 µl
60X SNPtype Reagent (Fluidigm, Cat.No: 100-7607)	0,1 µl	8,5 µl
ROX (Biotium, Cat.No: 29052)	0,036 µl	3,06 µl
RNase-DNase free water	0,064 µl	5,44 µl
TOPLAM	3,5 µl	297,5 µl

Biyogüvenlik kabiniinde mix bir ependorf tüpünde hazırlandı vorteks-spin atıldı. Kanallı otomatik pipetle mixin Piko plate'e dağıtılmasını kolaylaştırmak adına 8'li strip tüpün 6 kuyusuna 49,5 µl olarak pay edildi. Strip tüplerden 96'lık piko plate'lere otomatik pipetle 3,5 µl hacimler transfer edildi. Her bir STA DNA'lar 2,5 µl kuyulara eklendi. Piko plate üzeri seal ile kapatılarak 2000 rpm de 3 dakika shakerda karıştırıldı. Plate santrifüjde 1 dk boyunca santrifüjlendi.

3.3.3.3. IFC Controllerda Genotyping Flex-Six Chip' in Prime Adımı

Önceki adımlardaki primer ve örnek mix karışımları hazırlandıktan sonra işlem IFC Controllerde prime adımına geçilir. "Biomark Fluidigm Genotyping Flex-Six Chip" üreticinin SNP polimorfizmlerinin saptanması için geliştirdiği bir dynamic arraydir (Resim 9). Chip oda sıcaklığında ışıktan ve nemden korunarak muhafaza edilir. Bu adımda Genotyping Flex-Six Chip' in Assay ve Sample karşılaşma kanalları reaksiyona izin vermemek için IFC cihazındaki işlemle kapatılır (Resim 10). IFC Controller cihazı çalıştırılır ve chipin yanında gelen kontrol

kanal sıvıları (Control Line Fluid) chipin iki akümülatör kısmından nazikçe dolduruldu. Chip IFC cihazına barkod kısmı dışarı bakacak şekilde yüklendi ve prime adımı seçildi.



Resim 9. 96x96 Dynamic Array; Genotyping Flex-Six Chip.



Resim 10. Fluidigm IFC Controller (Integrated Fluidic Circuit; Entegre Akışkan Devre).

3.3.3.3.1. Genotyping Flex-Six Chip'e Pipetlemelerin Yapılması

IFC Prime adından alınan Flex-Six chipin artık assay ve sample buluşma kanalları kapalıdır. Flex-Six Chip' in sample kısmına hasta örnekleri (sample mix+Hasta DNA' ları); Chip' in assay kısmına ise hazırlanan primer-prob karışımı yüklendi. Strip tüplerde hazırlanan assayler (12 tip assay) 4 µl olarak 6 set halinde Flex-Six Chipe yüklendi. Piko platedeki 72 örneğin her birinden 5 µl olarak Flex-Six Chipin sample kısmına pipetlendi.

3.3.3.4. IFC Controller da Genotyping Flex-Six Chip' in Load Adımı

Genotyping Flex-Six Chipe örnekler yükledikten sonra IFC Controller'a yerleştirildi. IFC Controller arayüzünden ejecte basılır chip yerleştirilir "Load Chipe" tıklandı. Sonra "Load Mix Protokolü" seçildi. Bu adımda örnekler ve primer-problar basınç ile reaksiyon odalarına yüklendi (Resim 11).

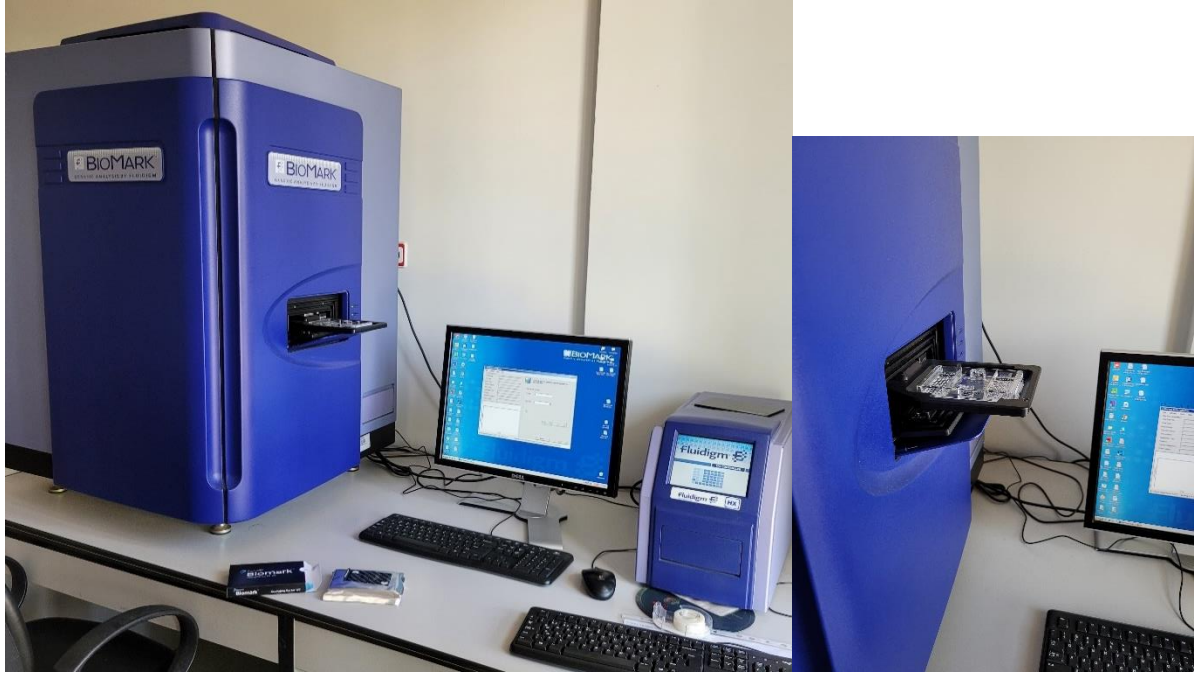


Resim 11. Fluidigm IFC Controller'de Flex-Six Chip'in mix ve assayların reaksiyon kanallarına yüklenmesi.

BioMark cihazının açılması ve lambanın yanması zaman alacağından işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection yazılımı seçilerek "Double Click to Turn Lamp On" kısmından BioMark lambası çalıştırıldı.

3.3.3.5. Genotyping Flex-Six Chip' in BioMark' da Real-Time PCR Yöntemi ile Genotip Analizi

Load adımı bittikten sonra Genotyping Flex-Six Chip IFC Controllerden alındı. Flex-Six Chip yüzeyinde herhangi bir şey olup olmadığı ve filmin çıkarıldığı kontrol edildi. BioMark HD'a barkod kısmı dışarı yönde olacak şekilde chip yerleştirildi (Resim 12).



Resim 12. BioMark HD Real-Time PCR cihazına Genotyping Flex-Six Chip' in yüklenmesi

BioMark Data Collection yazılımı ile BioMark HD cihazı çalıştırıldı. Arayüzde verilerin kaydedileceği yer ve dosya adı belirlendikten sonra “Genotyping” işlemi seçildi. Passive Reference Dye olarak “ROX” seçildi. “Probe Type” kısmında “SNPtype-FAM” ve “SNPtype-HEX” seçildi. Sonraki ekranda protokoller arasından “SNPtype E FLEXsix v1.” seçildi ve program başlatıldı. Real-Time PCR döngü sıcaklıkları aşağıdaki tabloda belirtildiği gibidir (Tablo 11).

Tablo 11. BioMark HD' de SNPtype Flex-Six için Real-Time PCR termal döngüleri.

Type			Sıcaklık	Zaman
Thermal Mix			25 °C	30 dk
			70 °C	60 dk
Hot Start			95 °C	5 dk
PCR Cycle	1 cycle	Denatürasyon	95 °C	15 sn
		Annealing	64 °C	45 sn
		Extension	72 °C	15 sn
PCR Cycle	1 cycle	Denatürasyon	95 °C	15 sn
		Annealing	63 °C	45 sn
		Extension	72 °C	15 sn
PCR Cycle	1 cycle	Denatürasyon	95 °C	15 sn
		Annealing	62 °C	45 sn
		Extension	72 °C	15 sn
PCR Cycle	1 cycle	Denatürasyon	95 °C	15 sn
		Annealing	61 °C	45 sn
		Extension	72 °C	15 sn
PCR Cycle	34 cycle	Denatürasyon	95 °C	15 sn
		Annealing	60 °C	45 sn
		Extension	72 °C	15 sn
End Point		Capture	20 °C	30 sn

IFC görüntüleri BioMark HD cihazı ile yakalanıp işlenir. PCR döngülerinin floresan küme profilleri ve genotipleme performansı üzerindeki etkilerini incelemek için özel konfigürasyonu BioMark Real-Time PCR sistemi kullanıldı. Biomark HD görüntüleyici chip'in son nokta floresan görüntülerini yakalamak için dört döngüden sonra 20 °C'de 30 sn boyunca tutulur.

3.3.4. AD ve BDNF İlişkili miRNA Genlerine Ait SNP'lerin Data Analizi

Her SNPtype Assayda 2 tip floresan FAM (red, Y axis) ile HEX (green, X axis) kullanıldı. Floresanların her biri SNP'ye bağlandı. Veriler, MGB-VIC ve MGB-FAM boya ayarlarına sahip Fluidigm SNP Genotyping Analysis Versiyon 4.5.1 (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) Software kullanılarak analiz edildi. Analiz sonucunda 3 farklı genotip A, H, ve B saptandı. Genotipleme sisteminde A ve B spesifik homozigotları, H ise spesifik heterozigotları temsil etmektedir.

3.4. İstatistiksel ve Analitik Olarak Çalışmanın Değerlendirilmesi

Veriler, Fluidigm Genotyping Analysis Software Versiyon 4.5.1 kullanılarak analiz edildi. Çalışmanın istatistiksel anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak belirlendi. Araştırmada kullanılan istatistiksel işlemler: Sıklık analizleri, ki-kare analizi, sayısal değişkenler için student's t-test korelasyon analizleri, lineer regresyon testleridir. MiRNA polimorfizmleri ve cinsiyetler arasındaki etkileşimler bağımsızlık testi (Test of Independence) ile analiz edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada Alzheimer tipi demans grubunda 41 kadın (%58,57) ve 29 erkek (%41,43) olgu, kontrol grubunda 45 kadın (64,29) ve 25 erkek (%35,71) sağlıklı birey mevcuttu. Gruplar cinsiyet açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,487363$).

Alzheimer tipi demans grubunun yaş ortalaması $64\pm34,23$, kontrol grubunun yaş ortalaması $60\pm12,67$ idi. Gruplar yaş ortalaması açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,841245$).

Gruplardaki miRNA polimorfizmlerinin genotip ve allel dağılımı Tablo 12 ve 13'de gösterilmiştir. *MiR-206 16882131* polimorfizmi için genotip dağılımı Alzheimer tipi demans grubunda %55,71 CC, %28,57 CT, %15,71 TT; kontrol grubunda %58,57 CC, %40 CT, %1,43 TT gözlemlendi. Aynı polimorfizm için allel frekans dağılımına baktığımızda Alzheimer tipi demans grubunda %70 C; %30 T; kontrol grubunda %78,57 C ve %21,43 T alleli saptandı. Gruplar genotip ve allel frekans dağılımı açısından karşılaştırıldığında 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı genotip dağılımı saptanırken ($p=0,000968$), istatistiksel olarak anlamlı olmayan allel frekans dağılımı saptandı ($p=0,165592$).

MiR-30e rs112439044 polimorfizmi için genotip dağılımı Alzheimer tipi demans grubunda %52,86 CC, %24,20 CT, %22,86 TT; kontrol grubunda %75,71 CC, %22,86 CT, %1,43 TT gözlemlendi. Aynı polimorfizm için allel frekans dağılımına baktığımızda Alzheimer tipi demans grubunda %65 C; %35 T; kontrol grubunda %87,14 C ve %12,86 T alleli saptandı. Gruplar genotip ve allel frekans dağılımı açısından karşılaştırıldığında 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı genotip ve allel frekans dağılımı saptandı (sırasıyla $p=0,000318$ ve $p=0,000243$).

MiR-30e rs10489167 polimorfizmi için genotip dağılımı Alzheimer tipi demans grubunda %1,43 AA, %20 AG, %78,57 GG; kontrol grubunda %1,43 AA, %18,57 AG, %80 GG gözlemlendi. Yine aynı polimorfizm için Alzheimer tipi demans grubunda %11,43 A; %88,57 G; kontrol grubunda %10,715 A ve %89,285 G allel frekans dağılımı saptandı. Gruplar genotip ve allel frekans dağılımı açısından karşılaştırıldığında 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı genotip ve allel frekans dağılımı bulunmadı (sırasıyla $p=0,967645$ ve $p=0,871999$).

MiR-26b rs188612260 polimorfizmi için genotip dağılımı Alzheimer tipi demans grubunda %41,43 CC, %51,43 CT, %7,14 TT; kontrol grubunda %32,86 CC, %20 CT, %47,14 TT gözlemlendi. Aynı polimorfizm için allel frekans dağılımına baktığımızda Alzheimer tipi demans grubunda %67,145 C; %32,855 T; kontrol grubunda %42,86 C ve %57,14 T alleli saptandı. Gruplar genotip ve allel frekans dağılımı açısından karşılaştırıldığında 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı genotip ve allel frekans dağılımı saptandı (sırasıyla $p=0,00000$ ve $p=0,000558$).

MiR-124 rs5315564 polimorfizmi için genotip dağılımı Alzheimer tipi demans grubunda %84,29 CC, %14,29 CT, %1,43 TT; kontrol grubunda %81,43 CC, %17,14 CT, %1,43 TT gözlemlendi. Aynı polimorfizm için allel frekans dağılımına baktığımızda Alzheimer tipi demans grubunda %91,435 C; %90T; kontrol grubunda %8,575 C ve %10 T alleli saptandı. Gruplar genotip ve allel frekans dağılımı açısından karşılaştırıldığında 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı genotip ve allel frekans dağılımı bulunmadı (sırasıyla $p=0,8568429$ ve $p=0,728309$).

Tablo 12. Alzheimer tipi demans ve kontrol grubunun miRNA genotip dağılımının karşılaştırılması.

miRNA Genotipler	Alzheimer Tipi Demans Grubu	Kontrol Grubu	Df	p	X²
<i>miR-206</i>					
<i>rs16882131</i>					
CC	39 (%55,71)	41(%58,57)	2	0,000968*	13,88095
CT	20(%28,57)	28(%40)			
TT	11(%15,71)	1(%1,43)			
<i>miR-30e</i>					
<i>rs112439044</i>					
CC	37(%52,86)	53(%75,71)	2	0,000318*	16,11004
CT	17(%24,20)	16(%22,86)			
TT	16(%22,86)	1(%1,43)			
<i>miR-30e</i>					
<i>rs10489167</i>					
AA	1 (%1,43)	1(%1,43)	2	0,967645	0,006578
AG	14(%20)	13(%18,57)			
GG	55(%78,57)	56(%80)			
<i>miR-26b</i>					
<i>rs188612260</i>					
CC	29(%41,43)	23(%32,86)	2	0.000000*	44,29126
CT	36(%51,43)	14(%20)			
TT	5 (%7,14)	33(%47,14)			
<i>miR-124</i>					
<i>rs5315564</i>					
CC	59(%84,29)	57(%81,43)	2	0,8568429	0,309001
CT	10(%14,29)	12(%17,14)			
TT	1(%1,43)	1(%1,43)			

* : istatistiksel olarak anlamlı bulgular

Tablo 13. Alzheimer tipi demans ve kontrol grubunun miRNA allel frekans dağılımının karşılaştırılması.

miRNA Allel Frekansları	Alzheimer Tipi Demans Grubu	Kontrol Grubu	Df	p	X ²
miR-206 rs16882131					
C	%70	%78,57	1	0,165592	1,922401
T	%30	%21,43			
miR-30e rs112439044					
C	%65	%87,14	1	0,000243*	13,46385
T	%35	%12,86			
miR-30e rs10489167					
A	%11,43	%10,715	1	0,871999	0,02596
G	%88,57	%89,285			
miR-26b rs188612260					
C	%67,145	%42,86	1	0,000558*	11,90981
T	%32,855	%57,14			
miR-124 rs5315564					
C	%91,435	%8,575	1	0,728309	0,120669
G	%90	%10			

* : istatistiksel olarak anlamlı bulgular

5. TARTIŞMA

Alzheimer tipi demans kadınlarda daha yüksek oranda cinsiyete özgü bir yapıya sahiptir (2017 Alzheimer's disease facts and figures). Bizim çalışmamızda da Alzheimer tipi demans grubumuz literatüre benzer şekilde %58,7 oranında kadın cinsiyete sahiptir.

BDNF, mevcut nöronların hayatta kalmasını destekleyen ve nörojenezi başlatan sinir sisteminin gelişiminde çok önemli bir rol oynayan nörotrofin büyüme faktörleri ailesinin bir üyesidir. Hem dolaşımında hem de CNS'de değişen BDNF düzeylerinin, AD, Parkinson hastalığı (PD), Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) dahil olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde yer aldığı bildirilmiştir. miRNA'lar, periferik kan ve beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarında bulunan bir kodlayıcı olmayan RNA sınıfıdır. Birkaç farklı miRNA ve bunların hedef genleri, nörodejeneratif ve nörovasküler hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığı kabul edilmektedir. Bu nedenle, umut verici biyobelirteçler ve CNS bozuklukları için yeni bir tedavi yaklaşımı sunarlar. Şu anda, sınırlı çalışmalar, BDNF'nin miRNA aracılı transkripsiyon sonrası düzenlemesine dair geçerli kanıtlar sunmaktadır (Eyileten ve diğerleri, 2021). Bu sebeple çalışmamızda Alzheimer tipi demans hastalarında BDNF genini düzenleyen miRNA polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmada yer alan beş miRNA gen polimorfizmi: *miR-206* (*rs16882131*), *miR-124* (*rs5315564*), *miR-30e* (*rs112439044*), *miR-30e* (*rs10489167*) ve *miR-26b* (*rs188612260*) literatürdeki diğer çalışmalarla birlikte değerlendirilir.

miR-206 rs16882131

İlk kez, Lee ve diğerleri *miR-206*'nın Alzheimer hastalığı farelerinde BDNF'yi ve hafıza fonksiyonunu modüle ettiğini ve Tg2576 farelerinde bir antagomir *miR-206*'nın (bir *miR-206* inhibitörü) intraserebral uygulamasını gösterdi. *miR-206*'nın inhibisyonu, hipokampal sinaptik yoğunluğun ve nörojenezin iyileştirilmesi dahil olmak üzere gelişmiş BDNF seviyeleri ve hafıza performansı gösterdi. Antagomir *miR-206* tedavi olarak kullanıldı ve intranazal olarak uygulandı. AD hayvan modelinde antagomir *miR-206*'nın intranazal uygulaması beyne ulaştı ve BDNF seviyelerini arttırdı ve hafıza bozukluğunu iyileştirdi. Toplu olarak, bu sonuçlar *miR-206*'nın BDNF ekspresyonunu inhibe ederek AD'nin patogenezinde rol oynayabileceğini

gösterdi (Lee ve diğerleri, 2012). Aynı araştırma grubu sonuçlarını daha da doğruladı ve koku alma mukozal *miR-206* seviyesinin belirlenebileceğini ve MCI dahil olmak üzere erken AD için tanısal bir biyobelirteç olarak sağlayabileceğini gösterdi (Moon ve diğerleri, 2016; Tian ve diğerleri, 2014). Ayrıca, Tian ve arkadaşları *miR-206*'nın AD patogenezi sürecinde BDNF'yi değiştirip değiştiremeyeceğini değerlendirmeyi amaçladı. İlginç bir şekilde *miR-206* ekspresyonu, yabancıl tip (WT) farelere kıyasla APP/PS1 farelerinin hipokampusunda, plazmasında ve CSF'sinde daha yüksekken, APP/PS1'in hipokampal dokusunda, plazmasında ve BOS'unda BDNF seviyesi daha düşüktü. Çalışma, *miR-206*'nın 3'UTR'yi bağlayarak doğrudan BDNF'yi hedefleyebileceğini bildirdi. *MiR-206* uygulama taklidi BDNF düzeylerini düşürürken, antagomir-206 kullanımı hem hücre içi hem de salgılanan BDNF düzeylerini artırmıştır (Tian ve diğerleri, 2014). Hafıza bozukluğu olan transgenik APP/PS1 fareleri, WT kontrolüne kıyasla hem hipokampusta hem de kortekste önemli ölçüde artmış *miR-206* seviyeleri gösterdi. Donepezilin kronik kullanımı, *miR-206* ekspresyonunu aşağı doğru düzenlerken hafıza fonksiyonunu ve BDNF fonksiyon bozukluğunu iyileştirmiştir. Buna karşılık, *miR-206* antagonisti (antagomiR-206-3p), donepezilin anti-demans etkilerini önemli ölçüde zayıflattı. Bu bulgular, BDNF fonksiyonunun donepezil tedavisi ile yakından ilişkili olduğunu ve *miR-206* seviyeleri ile ters ilişkili olduğunu göstermektedir (Wang ve diğerleri, 2017). Daha sonra *miR-206*, amnestik hafif bilişsel bozukluğun (aMCI) AD'ye ilerlemesinin potansiyel bir prognostik belirtecini bulmak için değerlendirildi. Çalışma, MASHB çalışmasından (Heibei eyaletindeki hafif bilişsel bozukluk ve Alzheimer hastalığı çalışması) alınan 458 hastanın iki kez toplanan klinik verilerini başlangıçta ve 5 yıllık takipte analiz etti. AD konversiyonu olan hastalarda *miR-206* düzeylerinin daha yüksek, BDNF düzeylerinin daha düşük olduğu saptandı. Çok değişkenli regresyon analizine göre, *miR-206*'nın daha yüksek konsantrasyonları ve daha düşük BDNF seviyeleri, aMCI'den AD'ye dönüşümle önemli ölçüde ilişkiliydi; bu nedenle, bağımsız bir prognostik biyobelirteç olarak hareket edebilirler (Xie ve diğerleri, 2016). *MiR-206* AD'de en iyi çalışılan miRNA'lardan biridir. Birkaç rapor, *miR-206*'nın beyindeki BDNF ekspresyonunun baskılanması nedeniyle AD'nin patofizyolojisine dahil olduğunu göstermiştir. Çalışmalar, AD ve AD hayvan modellerine sahip hastaların beyin dokusunda artmış *miR-206* seviyelerine sahip olduğunu bulmuştur, bu da hem BDNF protein seviyelerini hem de CNS'deki gen ekspresyonunu azaltarak hafıza kaybına neden olur (Moon ve diğerleri, 2016; Tian ve diğerleri, 2014; Xie ve diğerleri, 2016). Bizim çalışmamızda da araştırılan *miR-206 16882131* polimorfizmi literatüre benzer Alzheimer hastalığı ile ilişkili bulunmuştur. Muhtemelen bu polimorfizm literatürdeki bilgiler ışığında

hastalarda BDNF seviyesini düşürerek AD patogenizinde rol alabileceğini bize düşündürmüştür.

miR-124 rs5315564

MiR-124, beyinde en çok korunan ve bol miktarda eksprese edilen nöronal sinapsa özgü miRNA'lardan biridir (Schratt ve diğerleri, 2006). *MiR-124* CREB ekspresyonunu (Rajasethupathy ve diğerleri, 2009; Preethi vd. 2012) yani erken genlerin aktivasyonunu düzenlediği ve sinaptik plastisiteyi kolaylaştırıldığı bildirilmiştir. Resvaratrolün (RSV) öğrenme ve hafıza gelişimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Resvaratrolün hafıza ve öğrenme üzerindeki pozitif etkilerine muhtemelen *miR-134* ve *miR-124*'ün azaltılmış ifadeleri aracılığıyla aracılık ettiği ve bunun da daha sonra BDNF sentezini teşvik etmek için CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) seviyelerini yukarı regüle edebildiğini gösterildi. Bu bulgular, RSV'nin bilişteki rolünü ve RSV'nin bu süreçleri düzenlediği bir miRNA-CREB-BDNF mekanizması ortaya kondu (Zhao ve diğerleri, 2013). Bizim çalışmamızda da Alzheimer tipi demans hastalarında *miR-124 rs5315564* polimorfizmi ile bir ilişki saptanamamıştır. Bu durum çalışılan olgu sayısının yeterli olmayaşından kaynaklanabilir. Sonuçlar *miR-124*'ün ekspresyon çalışması ile desteklenebilir.

miR-30e rs112439044 ve miR-30e rs10489167

miR-30e' nin aşağı regülasyonu, MPTP (dopaminerjik nöronları etkileyerek beyinde dopamin üretimini azaltan nörotoksin) ile indüklenen Parkinson hastalığı hayvan modelinin Substantia Nigra Pars Compacta'sında (SNpc) bulundu. *miR-30e* uygulamasının Antagomir'i, özellikle protein kodlayan gen olan NLRP 3'ün iltihaplanma aktivitesini hedefleyerek ve azaltarak ve COX-2, TNF-a ve iNOS dahil olmak üzere iltihaplı sitokinleri artırarak motor işlevi önemli ölçüde iyileştirdi ve dopaminerjik nöronların tükenmesini iyileştirdi. Bu, *miR-30e*' nin MPTP ile indüklenen PD hayvan modelinde nöroprotektif olabileceğini düşündürmektedir. Daha da önemlisi, çalışma *miR-30e* antagomir tedavisinin SNpc'de azalan BDNF üretimini iyileştirdiğini gösterdi (Li ve diğerleri, 2018).

Başka bir çalışma, melatoninin *miR-30e* ekspresyonunu artırabildiğini ve *miR-30e*'nin yukarı regülasyonunun NLRP3 iltihaplanma yolunu önemli ölçüde engelleyebildiğini, buna karşın melatoninin pozitif etkisinin *miR-30e* inhibitörü tarafından nötralize edildiğini gösterdi. Böylece, melatonin ile *miR-30e/NLRP3* inflamasyon sinyal kaskadı arasındaki ilişkiyi gösterdi (Wu ve diğerleri, 2019). Alzheimer hastalığını NLRP3 inflamazomunun aşırı aktivasyonu ile ilişkili bir durumu karakterize etmek için yapılan çalışmalarda NLRP3 iltihaplanmasının aktivasyonunun, miRNA'lar tarafından da modüle edilebileceğini ve *miR-7-5p*, *miR-22-3p*, *miR-30e* ve *miR-223-3p*'nin özellikle *NLRP3* mRNA'nın 3'UTR'sinin yüksek oranda korunmuş bir bölgesine bağlandığı ve protein translasyonuna müdahale ettiği gösterilmiştir (Lewis ve diğerleri, 2005). Böylece NLRP3 aktivasyonunu azalttığı bulundu. Bizim çalışmamızda da bu sonuçlara benzer şekilde Alzheimer hastalarında *mir30e rs112439044* polimorfizmi ilişkili bulunmuş ancak *miR-30e rs10489167* polimorfizmi ile Alzheimer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. *miR-30e rs112439044* polimorfizminin Alzheimer hastalarında NLRP3 iltihaplanmasının aktivasyonuna sebep olup, BDNF üretimini azaltarak hastalık patofizyolojisinde rol alabileceğini bize düşündürmüştür.

miR-26b rs188612260

Absalon ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada nöronlarda *miR-26b*'nin yukarı regülasyonun, AD'de de gözlenen pleiotropik fenotiplere neden olduğunu ve yüksek *miR-26b* seviyelerinin bu nedenle AD nöronal patolojisine katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir. Numouro ve Perry yazdıkları derlemede yukarı regüle edilen *mir26b* nin de dahil olduğu yedi miRNA (*miR-125b*, *miR-146a*, *miR-200c*, *miR-26b*, *miR-30e*, *miR-34a*, *miR-34c*) ve üç aşağı doğru düzenlenmiş miRNA ları (*miR-107*, *miR-210*, *miR-485*) AD patomekanizmalarından bir olan oksidatif stresle alaklı olduğunu vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda literatürle paralel olarak *miR-26b rs188612260* polimorfizminin genotip ve allel frekans dağılımı AD hastalarında kontrol vakalarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Literatürde BDNF'yi düzenleyen miRNA polimorfizmlerinin AD patofizyolojisindeki rolünü gösteren bir çalışma yoktur. Sonuç olarak bu çalışmada bulgularımız literatürdeki ekspresyon çalışmalarıyla örtüşmüş olup, AD gelişiminde *miR-26b rs188612260*, *miR-30e rs112439044* ve *miR-206 16882131* polimorfizmlerinin BDNF aracılı olarak rol alabileceğini

ve daha fazla vaka çalışmalarıyla bu polimorfizmlerin bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hastalık biyobelirteçleri olarak hem dolaşımdaki hem de hücre dışı miRNA'ların kullanımının sunduğu avantajlardan biri, nörodejeneratif ve nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere birçok farklı hastalığın farklı etiyojilerini ayırt etme yetenekleridir. Ayrıca, çalışmalar BDNF'nin nörodejeneratif bozukluklarda çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte, kısıtlı araştırmalar BDNF miRNA arasındaki ilişkiyi ve miRNA'lar tarafından BDNF'nin nasıl regüle edildiğini göstermiştir. Ki bu ilişkinin öğrenme, hafıza ve bilişteki rollerini anlamak ve periferik sinir sistemindeki sinir dokusunun yeniden büyümesini veya onarımını nasıl regüle ettiğini saptamak faydalı olacaktır. Her miRNA'nın çok sayıda hedefi nedeniyle, yalnızca ıslak laboratuvar biyolojik deneylerine güvenmek gerçekçi değildir. Dahası, hesaplamalı yaklaşımlar, miRNA'nın düzenleyici rolünü anlamada ve hedeflerinin belirlenmesinde önemli bir adımdır. Nörodejeneratif hastalıklar için BDNF'yi hedef alan yeni miRNA'ları tahmin etmek için in silico analizi yapılmalıdır; tahmin analizinin doğrulanması için daha fazla sayıda deneysel analize ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Absalon, S., Kochanek, D. M., Raghavan, V., & Krichevsky, A. M. (2013). MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. *Journal of Neuroscience*, *33*(37), 14645-14659. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1327-13.2013
- Alzheimer's Association Report, (2023). Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's Dementia The Journal Of The Alzheimer's Association*, *19*(4), 1598-1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Amin, A. M., Mostafa, H., Khojah, H. M. J. (2023). Insulin resistance in Alzheimer's disease: The genetics and metabolomics. *Clinica Chimica Acta*, *539*, 215-236. doi.org/10.1016/j.cca.2022.12.016
- Armstrong R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, *57*(2), 87-105. doi: 10.5114/fn.2019.85929
- Arora S., Kanekiyo T., Singh J. (2022). Functionalized nanoparticles for brain targeted BDNF gene therapy to rescue Alzheimer's disease pathology in transgenic mouse model. *International Journal of Biological Macromolecules*, *208*, 901-911. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.203
- Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E. (2011). Alzheimer's disease. *The Lancet*, *377*(9770), 1019-1031. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9
- Briggs R., Kennelly S. P., O'Neill D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine Journal*, *16*(3), 247-53. doi: 10.7861/clinmedicine.16-3-247
- Centers for Disease Control and Prevention. (2023). Alzheimer's Disease and Healthy Aging. <https://www.cdc.gov/aging/aginginfo/alzheimers.htm#AlzheimersDisease>
- Chen Z. R., Huang J. B., Yang S. L., Hong F. F. (2022). Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. *Molecules*, *27*(6), 1816. doi: 10.3390/molecules27061816
- Chow R., Wessels J. M., Foster W. G. (2020). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and function in the mammalian reproductive Tract. *Human Reproduction Update*, *26*(4), 545–564. doi.org/10.1093/humupd/dmaa008

- Colucci-D'Amato L., Speranza L., Volpicelli F. (2020). Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7777. doi: 10.3390/ijms21207777
- Dodel, R. (2023). Parkinson's disease and Alzheimer type dementia-Pathophysiology and drug treatment approaches. *Die Innere Medizin*, 64, 113–120. doi: 10.1007/s00108-022-01463-0
- Emahazion, T., Feuk, L., Jobs, M., Sawyer, S. L., Fredman, D., St Clair, D., Prince, J. A., & Brookes, A. J. (2001). SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends in Genetics*, 17(7), 407-413. doi: 10.1016/s0168-9525(01)02342-3.
- Esvald, E. E., Tuvikene, J., Moistus, A., Rannaste, K., Kõomägi, S., Timmusk, T. (2022). Differential regulation of the BDNF gene in cortical and hippocampal neurons, *Journal of Neuroscience*, 42(49), 9110-9128. doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2535-21.2022
- Eyileten, C., Sharif, L., Wicik, Z., Jakubik, D., Jarosz-Popek, J., Soplinska, A., ... Mirowska-Guzel, D. (2021). The relation of the brain-derived neurotrophic factor with microRNAs in neurodegenerative diseases and ischemic stroke. *Molecular Neurobiology*, 58(1), 329-347. doi: 10.1007/s12035-020-02101-2
- Fessel, J. (2018). Alzheimer's disease combination treatment. *Neurobiology of Aging*, 63, 165. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.022
- Fontana, F., Siva, K., Denti, M. A. (2015). A network of RNA and protein interactions in Fronto Temporal Dementia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8(9). doi: 10.3389/fnmol.2015.00009
- Hong, C.J., Liou, Y.J., & Tsai, S.J. (2011). Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Research Bulletin*, 86(5-6), 287-297. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.08.019
- James, B.D., & Bennett, D.A. (2019). Causes and patterns of dementia: An update in the era of redefining Alzheimer's disease. *Annual Review of Public Health*, 40, 65-84. doi: 10.1146/annurev-publhealth-040218-043758
- Katta, M., Aksa Mathew, B., Chaturvedi, P., Ludhiadch, A., Munshi, A. (2023). Advanced molecular therapies for neurological diseases: focus on stroke, Alzheimer's disease, and

Parkinson's disease. *Neurological Sciences*, 44, 19-36. doi: 10.1007/s10072-022-06356-6

- Kloske, C.M., Barnum, C.J., Batista, A.F., Bradshaw, E., Brickman, A.M., Bu, G., Carrillo, M.C. (2023). APOE and immunity: Research highlights. *Alzheimer's & Dementia The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(6), 2677-2696. doi: 10.1002/alz.13020
- Klyucherev, T.O., Olszewski, P., Shalimova, A.A., Chubarev, V.N., Tarasov, V.V., Attwood, M.M., Syvänen, S., Schiöth, H.B. (2022). Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, 11(1), 25. doi: 10.1186/s40035-022-00296-z
- Kunugi, H., Ueki, A., Otsuka, M., Isse, K., Hirasawa, H., Kato, N., Nabika, T., Kobayashi, S., Nanko, S. (2001). A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 83-86. doi: 10.1038/sj.mp.4000792
- Leal, G., Comprido, D., & Duarte, C.B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76, 639-656. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005
- Lee, C. Y., Ryu, I. S., Ryu, J. H., & Cho, H. J. (2021). miRNAs as therapeutic tools in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13012. <https://doi.org/10.3390/ijms222313012>
- Lee, S.-T., Chu, K., Jung, K.-H., Kim, J.H., Huh, J.-Y., ...Roh, J.-K. (2012, August). miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Annals of Neurology*, 72(2), 269-277. doi: 10.1002/ana.23588
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
- Li, D., Yang, H., Ma, J., Luo, S., Chen, S., Gu, Q. (2018). MicroRNA-30e regulates neuroinflammation in MPTP model of Parkinson's disease by targeting Nlrp3. *Human Cell*, 31, 106-115. doi: 10.1007/s13577-017-0187-5
- Li, G.D., Bi, R., Zhang, D.F., Xu, M., Luo, R., Wang, D., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), Fang, Y., Li, T., Zhang, C., & Yao, Y.G. (2017). Female-specific effect

of the BDNF gene on Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 53, 192.e11-192.e19. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.023

Maffioletti, E., Milanesi, E., Ansari, A., Zanetti, O., Galluzzi, S., Geroldi, C., Gennarelli, M., Bocchio-Chiavetto, L. (2020). miR-146a plasma levels are not altered in Alzheimer's disease but correlate with age and illness severity. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 17(11), 366. doi: 10.3389/fnagi.2019.00366.

Malik, R., Kalra, S., Bhatia, S., Al Harrasi, A., Singh, G., Mohan, S., ... Tambuwala, M.M. (2022). Overview of therapeutic targets in management of dementia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 152, 113168. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113168

Moon, J., Lee, S.-T., Kong, I.G., Byun, J.-I., Sunwoo, J.-S., Shin, J.-W., ... Chu, K. (2016). Early diagnosis of Alzheimer's disease from elevated olfactory mucosal miR-206 level. *Science Report*. 4(6), 20364. doi: 10.1038/srep20364

Murdock, M.H., & Tsai, L.-H. (2023). Insights into Alzheimer's disease from single-cell genomic approaches. *Nature Neuroscience*, 26(2), 181-195. doi: 10.1038/s41593-022-01222-2.

Nagata, T., Shinagawa, S., Nukariya, K., Ochiai, Y., Kawamura, S., Agawa-Ohta, M., ... Yamada, H. (2011, September). Association between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms and executive function in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics: The Official Journal of the Japanese Psychogeriatric Society*. 11(3), 141-149. doi: 10.1111/j.1479-8301.2011.00364.x

Nunomura, A., & Perry, G. (2020, November). RNA and oxidative stress in Alzheimer's disease: focus on microRNAs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. doi: 10.1155/2020/2638130

Passeri E, Elkhoury K, Morsink M, Broersen K, Linder M, Tamayol A, Malaplate C, Yen FT, Arab-Tehrany E. Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 12;23(22):13954. doi: 10.3390/ijms232213954

Passeri, E., Elkhoury, K., Morsink, M., Broersen, K., Linder, M., Tamayol, A., ... Arab-Tehrany, E. (2022). Alzheimer's disease: treatment strategies and their limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13954. doi: 10.3390/ijms232213954

- Piancatelli, D., Aureli, A., Sebastiani, P., Colanardi, A., Del Beato, T., Del Cane, L., Sucapane, P., Marini, C., Di Loreto, S. (2022). Gene and gender-related decrease in serum BDNF levels in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14599. doi: 10.3390/ijms23231459
- Prajjwal, P., Asharaf, S., Makhanasa, D., Yamparala, A., Tariq, H., Aleti, S., & Vora, N. (2023). Association of Alzheimer's dementia with oral bacteria, vitamin B12, folate, homocysteine levels, and insulin resistance along with its pathophysiology, genetics, imaging, and biomarkers. *Disease-a-Month*, 69 (5), 101546. doi: 10.1016/j.disamonth.2023.101546
- Preethi, J., Singh, H.K., Charles, P.D., Emmanuvel Rajan, K. (2012). Participation of microRNA 124-CREB pathway: a parallel memory enhancing mechanism of standardised extract of Bacopa monniera (BESEB CDRI-08). *Neurochemical Research*, 37, 2167-2177. doi: 10.1007/s11064-012-0840-z
- Rajasethupathy, P., Fiumara, F., Sheridan, R., Betel, D., Puthanveetil, S.V., Russo, J.J., Sander, C., Tuschl, T., & Kandel, E. (2009). Characterization of small RNAs in aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron*, 63(6), 803-817. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.029
- Rao, R.V., Subramaniam, K.G., Gregory, J., Bredesen, A.L., Coward, C., Okada, S., ... Bredesen, D.E. (2023). Rationale for a multi-factorial approach for the reversal of cognitive decline in Alzheimer's disease and MCI: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1659. doi: 10.3390/ijms24021659.
- Raz, L., Knoefel, J., Bhaskar, K. (2016). The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(1), 172-186. doi: 10.1038/jcbfm.2015.164
- Saugstad, J.A. (2010). MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 30(9), 1564-1576. doi: 10.1038/jcbfm.2010.101
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., & Greenberg, M.E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439, 283-289. doi: 10.1038/nature04367

- Shao, Y., Xu, T. (2022). A study on the neuroprotective effect of miR-206-3p on Alzheimer's disease mice by regulating brain-derived neurotrophic factor. *Annals of Translational Medicine*, 10(2), 85. doi: 10.21037/atm-21-6601
- Shrestha, S., Phay, M., Kim, H. H., Pouladvand, P., Lee, S. J., & Yoo, S. (2019). Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in sensory neuron axons by miRNA-206. *Febs Press Science Publishing By Scientists*, 9(2). doi.org/10.1002/2211-5463.12581
- Srivastava, S., Ahmad, R., Khare, S.K. (2021). Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 15(216), 113320. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113320
- Tian, N., Cao, Z., & Zhang, Y. (2014). MiR-206 decreases brain-derived neurotrophic factor levels in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 191-197. doi: 10.1007/s12264-013-1419-7
- Van Oostveen, W.M., de Lange, E.C.M. (2021). Imaging techniques in Alzheimer's disease: A review of applications in early diagnosis and longitudinal monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2110. doi: 10.3390/ijms22042110
- Wang, C.N., Wang, Y.J., Wang, H., Song, L., Chen, Y., Wang, J.L., Ye, Y., Jiang, B. (2017). The Anti-dementia effects of Donepezil involve miR-206-3p in the Hippocampus and Cortex. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(4), 465-472. doi: 10.1248/bpb.b16-00898
- Wang, J., Lin, M., Crenshaw, A., Hutchinson, A., Hicks, B., Yeager, M., ... Ramakrishnan, R. (2009). High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics*, 10, 561. doi: 10.1186/1471-2164-10-561
- Wu, X., Ji, H., Wang, Y., et al. (2019). Melatonin alleviates radiation-induced lung injury via regulation of miR-30e/NLRP3 axis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 4087298. doi: 10.1155/2019/4087298
- Xie, B., Liu, Z., Jiang, L., et al. (2016). Increased serum miR-206 level predicts conversion from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: a 5-year follow-up study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(2), 509-520. doi: 10.3233/JAD-160468

- Yu, T.W., Lane, H.Y., Lin, C.H. (2021). Novel therapeutic approaches for Alzheimer's disease: An updated review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8208. doi: 10.3390/ijms22158208
- Zhao, Y. N., Li, W. F., Li, F., Zhang, Z., Dai, Y. D., Xu, A. L., ... & Gao, J. (2013). Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(4), 597-602. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.025

EK-1 (ADÜ-GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU)

ADÜ Evrak Tarih ve Sayısı: 02.11.2022-266678



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-53043469-050.04.04-266678
Konu : Kararlar

Sayın Doç. Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLU
Öğretim Üyesi

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 27.11.2022 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 09 nolu karar aşağıda sunulmuştur. Bilgilerinize sunarım.

KARAR: 09

Protokol No:2022/174

Sorumlu Yürütücü: Doç.Dr. Seda Örenay BOYACIOĞLU
Genetik Anabilim Dalı

Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doç.Dr. Seda Örenay BOYACIOĞLU'nun "Alzheimer tipi demans ile bdnf (beyin kaynaklı nörotrofik faktör) genini düzenleyen mikrorna polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması" konulu yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde taahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te), BGOF (Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu-gönüllüler tarafından bizzat kendilerinin kendi adı-soyadını yazması ve imzalamasının sağlanması ile adreslerinin eksiksiz olarak formlara yazılmasına dikkat edilmelidir.) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR
Kurul Başkanı

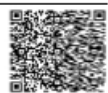
Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BS96YCEETV

Belge Takip Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5740&eD=BS96YCEETV&eS=266678>

Adres: ADÜ Merkez Kampüsü Aytepe Merkezi 09100 Efeler/AYDIN
Telefon:0256 220 4203 Faks:0256 220 4599
e-Posta: goetik@adu.edu.tr Web:akademik.adu.edu.tr/fakulte/med/
Kep Adresi:adnanmenderesuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Tuğba BOĞA
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Alzheimer Tipi Demans ile BDNF (Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör) Genini Düzenleyen mikroRNA Polimorfizmleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ayten Tuna

07 / 08 / 2023

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : TUNA Ayten
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Aydın/ 04.10.1993
Telefon : +90 546 798 15 17
E-posta : aytentuna09@gmail.com
Yabancı dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi (Moleküler Biyoloji ve Genetik)	2016

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/ Kurum	Ünvan
2021-2022	ADÜ Hastanesi-Moleküler Patoloji Laboratuvarı	Moleküler Biyolog
2022-2023	Genay Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi	Moleküler Biyolog

AKADEMİK YAYINLAR

BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler/ Sözlü Sunumlar

Covid-19 Tedavisinde Aptamerlerin Kullanımı (**Tuna A.** Boyacıoğlu Örenay S. Boyacıoğlu O.) (2022)

Helicobacter Pylori Aracılı Gastrik Kanser Gelişiminde LncRNA'ların Rolü (**Tuna A.** Boyacıoğlu Örenay S. Boyacıoğlu O.) (2022)