



**T.C.**

**HİTİT ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TÜRK POPÜLASYONUNDA ACAN GENİ VNTR POLİMORFİZMİ  
İLE ALZHEİMER HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tuğba KESKİN**

**Çorum-2022**



**TÜRK POPÜLASYONUNDA ACAN GENİ VNTR POLİMORFİZMİ İLE  
ALZHEİMER HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tuğba KESKİN**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**TEZ DANIŞMANI**

**Dr. Öğr. Üyesi Orçun AVŞAR**

**Çorum 2022**

Tuğba Keskin tarafından hazırlanan “Türk Popülasyonunda *ACAN* Geni VNTR Polimorfizmi ile Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması” adlı tez çalışması .../.../..... tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

(Prof. Dr. Menderes Suiçmez)\*

.....

(Dr. Öğr. Üyesi, Orçun AVŞAR)\*\*

.....

(Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Akbulut)

.....

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile Tuğba KESKİN' in Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans/Doktora derecesi alması onanmıştır.

Unvanı Adı SOYADI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

Tuğba KESKİN

# TÜRK POPÜLASYONUNDA *ACAN* GENİ VNTR POLİMORFİZMİ İLE ALZHEİMER HASTALIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuğba KESKİN

ORCID: 0000-0001-9609-0108

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans

Haziran 2022

## ÖZET

Alzheimer hastalığı, en yaygın demans türü olup nöronların dejenere olmasına neden olan multifaktöriyel bir hastalıktır. Giderek dünya nüfusunun büyük bir bölümünü etkileyen Alzheimer hastalığı sinsi bir şekilde ilerlemektedir. Hastalığın patolojisinde amiloid plaklar ve nörofibril yumaklar yer almaktadır. Genetik olarak *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* genlerindeki mutasyonlar ve *APOE* varyantları hastalığın ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Hastalığın kesin tanı ve tedavisi bulunmamaktadır. Ölüm sonrası beynin incelenmesi sonucu kesin tanı konulabilmektedir. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar sadece hastalığın semptomlarını hafifletmeye yöneliktir. Hâlihazırda kullanılan biyobelirteçler tanı ve tedavi için yeterli düzeyde değildir. Hastalığın patofizyolojisinde yer alan faktörlerin kapsamlı şekilde araştırılması hastalığın daha iyi anlaşılabilmesi, tanı ve tedavisinin daha sağlıklı yapılabilmesi için büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda *ACAN* genindeki VNTR polimorfizminin Alzheimer hastalığı ile ilişkisi araştırılmıştır. *ACAN* geninde bulunan VNTR polimorfizmi genellikle disk dejenerasyonları ile ilişkilendirilmiştir. Ancak *ACAN* geninin kodladığı agrekan proteini beyinde perinöral ağların (PN) yapısına katılmaktadır. Çalışmalarda PN'lerin, Alzheimer patogenezinde yer alan amiloid plaklar ve nörofibril yumakların nöronlara zarar vermesini engellediği görülmektedir. Çalışmamızda 102 Alzheimer hastası ve 101 sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri incelenmiştir. Alzheimer hastalığı ile *ACAN* VNTR polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p=0.000$ ). Hasta grubunda 30R ve 31R allelleri, kontrol grubunda ise 33R alleli en çok tekrar eden allellerdir. Aynı zamanda 13R, 21R, 24R gibi daha kısa alleller hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla tekrar etmektedir. Yaptığımız çalışma ile Alzheimer hastalığı ve *ACAN* genindeki VNTR polimorfizmi

arasındaki ilişki ilk defa araştırılmıştır. İlişkinin daha net anlaşılabilmesi iÇin farklı popölasyonlarda ve daha bÜyÜk örneklemlerle ilişkinin araştırılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Alzheimer hastalığı, agrekan, *ACAN* geni, polimorfizm.

**Bilim Kodu:** FBE19004.21.001



# INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN ACAN GENE VNTR POLYMOPHISM AND ALZHEIMER'S DISEASE IN TURKISH POPULATION

Tuğba KESKİN

ORCID: 0000-0001-9609-0108

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION

Master of Science Thesis

June 2022

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most common type of dementia and is a multifactorial disease that causes neurons to degenerate. Alzheimer's disease, which increasingly affects a large part of the world's population, progresses insidiously. The pathology of the disease includes amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Genetically, mutations in *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* genes and *APOE* variants play a role in the emergence of the disease. There is no definitive diagnosis and treatment of the disease. A definitive diagnosis can be made as a result of the examination of the brain after death. The drugs used in the treatment of Alzheimer's disease are only intended to alleviate the symptoms of the disease. Currently used biomarkers are not sufficient for diagnosis and treatment. Comprehensive investigation of the factors involved in the pathophysiology of the disease is of great importance for a better understanding of the disease and for a healthier diagnosis and treatment. In our study, the relationship between the VNTR polymorphism in the *ACAN* gene and Alzheimer's disease was investigated. The VNTR polymorphism in the *ACAN* gene has often been associated with disc degenerations. However, the aggrecan protein encoded by the *ACAN* gene participates in the structure of perineuronal networks (PN) in the brain. Studies show that PNs prevent amyloid plaques and neurofibrillary tangles, which are involved in the pathogenesis of Alzheimer's, from damaging neurons. In our study, blood samples taken from 102 Alzheimer's disease and 101 healthy individuals were examined. A significant correlation was found between Alzheimer's disease and VNTR polymorphism ( $p=0.000$ ). The 30R and 31R alleles in the patient group, and the 33R alleles in the control group were the most repeated alleles. At the same time, shorter alleles such as 13R, 21R, 24R repeat more in the patient group than in the control group. In our study, the



relationship between Alzheimer's disease and the *ACAN* VNTR polymorphism in the *ACAN* gene was investigated for the first time. In order to understand the relationship more clearly, it is necessary to conduct studies in different populations and with larger sample sizes.

**Keywords:** Alzheimer's disease, aggrecan, *ACAN* gene, polymorphism.

**Science Code:** FBE19004.21.001



## TEŐEKKÖR

Hem yüksek lisans eđitimim sűrecinde hem de tez alıřmamın yűrűtűlmesinde bana çok destek olan, bilgisi, anlayıřı ve sabrıyla bana çok Őey katan, iyi ki çalıřma fırsatı bulduđum dediđim çok sevgili danıřman hocam Dr. Őđr. Őyesi Orçun AVŐAR'a teŐekkűr ediyorum. Tez çalıřmam için numunelerin toplanmasına yardım eden Dr. Őđr. Őyesi Sinan ELİAÇIK'a, EMG laboratuvar çalıřanlarına ve her daim yanımda olduklarını bildiđim aileme teŐekkűr ederim. FBE19004.21.001 Proje No'lu tez çalıřmama vermiŐ oldukları desteklerinden dolayı BAP birimine de teŐekkűrlerimi sunarım.

Tuğba KESKİN

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
GİRİŞ.....	1

### 1. BÖLÜM

#### ALZHEİMER HASTALIĞININ ETİYOLOJİSİ

1.1. Alzheimer Hastalığında Etkili Olan Genler.....	3
1.1.1. Amiloid Prekürsör Protein (APP).....	3
1.1.2. Presenilin 1 (PSEN1).....	4
1.1.3. Presenilin 2 (PSEN2).....	4
1.1.4. APOE (Apolipoprotein E).....	4

### 2. BÖLÜM

#### ACAN GENİ

2.1. Beyin Hücre Dışı Matris (ECM) Bileşenleri ve Perinöral Ağlar.....	6
2.1.1. PN bileşenleri.....	9
2.1.1.1. Hyaluronan.....	9
2.1.1.2. Glikozaminoglikan.....	9
2.1.1.3. Kondroitin sülfat proteoglikanları.....	9
2.1.1.4. Tenasinler.....	10
2.1.1.5. Hapln proteinleri.....	10

2.2. Perinöral Ağlar (PN) ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi.....	10
--	----

### 3. BÖLÜM

#### ALZHEİMER HASTALIĞININ TANISI

### 4. BÖLÜM

#### ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİ

### 5. BÖLÜM

#### MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. DNA İzolasyonu.....	20
5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	21
5.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	23
5.4. İstatistiksel Analiz.....	24
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>25</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>49</b>
<b>EK-1.....</b>	<b>50</b>
<b>EK-2.....</b>	<b>51</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 3.1.</b> NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığının klinik tanı kriterleri.....	<b>13</b>
<b>Tablo 3.2.</b> Alzheimer tipi demans için DSM-V tanı kriterleri.....	<b>13</b>
<b>Tablo 4.1.</b> Alzheimer Hastalığının tedavisi için geliştirilmiş ilaçlar.....	<b>15</b>
<b>Tablo 5.1.</b> Hasta ve Kontrol grubunun çalışmaya dahil edilme ve edilmeme kriterleri.....	<b>18</b>
<b>Tablo 5.2.</b> ACAN geni VNTR polimorfizmine ait allel tekrar sayısı ve amplicon büyüklüğü.....	<b>19</b>
<b>Tablo 5.3.</b> DNA izolasyon kiti ile ilgili genel bilgiler.....	<b>20</b>
<b>Tablo 5.4.</b> PCR yönteminde kullanılan kit ile ilgili genel bilgiler.....	<b>21</b>
<b>Tablo 5.5.</b> PCR çalışmasında kullanılan mastermix bilgileri.....	<b>22</b>
<b>Tablo 5.6.</b> ACAN genindeki VNTR polimorfizminin analizi için kullanılan primerler.....	<b>22</b>
<b>Tablo 5.7.</b> PCR reaksiyonu döngü koşulları.....	<b>22</b>
<b>Tablo 5.8.</b> Agaroz Jel Elektroforezi için kullanılan materyal bilgisi.....	<b>23</b>
<b>Tablo 6.1.</b> Çalışmaya dahi edilen hasta ve kontrol gruplarının yaş karşılaştırması.....	<b>37</b>
<b>Tablo 6.2.</b> Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin cinsiyet karşılaştırması.....	<b>37</b>
<b>Tablo 6.3.</b> Hasta ve kontrol gruplarında tek değişkenli logistic regression analizi.....	<b>37</b>
<b>Tablo 6.4.</b> Hasta ve kontrol gruplarında çok değişkenli logistic regression analizi.....	<b>38</b>
<b>Tablo 6.5.</b> Hasta ve kontrol gruplarında Agrekan VNTR bölgesindeki allel dağılımının Karşılaştırılması.....	<b>38</b>
<b>Tablo 6.6.</b> Hasta ve kontrol gruplarında allel ve genotip karşılaştırılması.....	<b>40</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. APP'nin proteolitik yıkımı.....	3
Şekil 2.1. Agrekan proteininin yapısı.....	6
Şekil 2.1.1. PN'lerin yapısı.....	8
Şekil 6.1. Kontrol grubu; 1-19 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	25
Şekil 6.2. Kontrol grubu; 20-38 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	26
Şekil 6.3. Kontrol grubu; 39-57 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	27
Şekil 6.4. Kontrol grubu; 58-76 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	28
Şekil 6.5. Kontrol grubu; 77-95 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	29
Şekil 6.6. Kontrol grubu; 96-101 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	30
Şekil 6.7. Hasta grubu; 1-13 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	31
Şekil 6.8. Hasta grubu; 14-32 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	32
Şekil 6.9. Hasta grubu; 33-51 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	33
Şekil 6.10. Hasta grubu; 52-70 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	34
Şekil 6.11. Hasta grubu; 71-89 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	35
Şekil 6.12. Hasta grubu; 90-102 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....	36

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
bp	baz çifti
$^{\circ}\text{C}$	Celcius derece
ml	mili litre
$\mu\text{l}$	mikro litre
dk	dakika
sn	saniye
g	gram

### Kısaltmalar

ADRDA	Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Derneği
AH	Alzheimer Hastalığı
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Prekürsör Protein
A $\beta$	Amiloid Beta
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CS	Kondroitin Sülfat
CSPG	Kontroitin Sülfat Proteoglikanları
DMT	Hastalık Değiştirici Terapötikler
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSM-V	Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı V
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü

ECM	Ekstra Celluler Matris
EOAD	Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
GAG	Glikozaminoglikan
HA	Hyaluronan
HAPLN	Hyaluronan Bağlayıcı Bağlantı Proteinini
HAS	Hyaluronan Sentaz
Hp	Heparin
HS	Heparan Sülfat
KS	Keratan Sülfat
LOAD	Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı
MAPT	Mikrotübül ile İlişkili Protein Tau
MRI	Manyetik Rezonans
MS	Multiple Skleroz
NFT	Nörofibril Yumaklar
NINCDS	İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGC1-alfa	Peroksizom Proliferatörü ile Aktive Olan Reseptör Gama Koaktivatörü 1-alfa
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PN	Perinöral Ağ
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
PV	Parvalbumin
RNA	Ribo Nükleik Asit
SPSS	Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
UV	Ultraviyole
VNTR	Değişken Sayılı Bitişik Tekrar



## GİRİŞ

Alzheimer hastalığı ilk olarak 1907 yılında Alman nörolog Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Alzheimer, demans türleri içinde en yaygın olup nöronların dejenere olmasına neden olan nörodejeneratif bir bozukluktur. Belirtiler yaşla birlikte yavaş yavaş ortaya çıkmakta ve hastaların günlük aktivitelerini kısıtlamanın yanı sıra düşünce, davranış gibi faaliyetlerinde ilerleyici ve geriye dönüşsüz bozulmalara yol açmaktadır (Soylu ve Karalı, 2017). Alzheimer hastalığının nöropatolojik özelliği, sinaptik kayba neden olan beyinde biriken plakların (amiloid ve tau) ve nörofibriler yumakların oluşmasıdır (Kao ve ark., 2019). Bunlara ek olarak, granülovakuolar dejenerasyon, Meynertin bazal nükleusunda kolinerjik hücre kaybı ve arterosklerotik değişiklikler hastalığın patolojik bulguları içerisinde yer almaktadır (Selekler, 2010). Alzheimer hastalığının etiyojisi net olmamakla birlikte nöronal transmisyonunda gözlenen biyokimyasal bozukluklar, damar hastalıkları, enfeksiyonlar ve genetik olarak görülen *APOE4* varyantları ile amiloid prekürsör protein (*APP*), presenilin 1 (*PSEN1*) ve presenilin 2 (*PSEN2*) genlerinde meydana gelen mutasyonlar hastalık patogeneğinde rol oynar. Alzheimer hastalığında yaş önemli bir faktördür ve bu nedenle hastalığın prevalansını ve insidansını etkilemektedir. 65 yaşın altında ortaya çıkan Alzheimer hastalığı, Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (EOAD) olarak tanımlanmaktadır. Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığında genetik olarak en önemli risk faktörleri *APP*, *PSEN1* ve *PSEN2* genlerinde meydana gelen mutasyonlardır. 65 yaşın üzerinde ortaya çıkan Alzheimer hastalığı ise Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı (LOAD) olarak tanımlanır. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığına neden olan birden fazla gen ve çevresel etkenler olduğu için Erken Başlangıçlı Alzheimer hastalığına göre daha komplekstir. Geç Başlangıçlı Alzheimer hastalığında risk faktörü olarak tanımlanan gen *APOE*'dir. Alzheimer hastalığının her iki grubunda da amiloid betalar ve nörofibril yumaklar hastalığın patogeneğinde rol oynar (Özpak ve ark., 2017).

Hastalığın patogeneğinde ortaya çıkan amiloid beta ( $A\beta$ ), 21. kromozomdaki *APP* geni tarafından kodlanan amiloid prekürsör proteininin  $\alpha$  sekretaz,  $\beta$  sekretaz ve  $\gamma$  sekretaz enzimleri ile proteolitik yıkımı sonucu oluşur.  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretaz kesimi sonucunda hastalığın patogeneğinden sorumlu 40 ve 42 aminoasitlik  $A\beta$ 'ler oluşur (Öztürk ve Karan, 2009). Alzheimer hastalığında beyinde  $A\beta$  plaklarının yanı sıra nörofibril yumakların birikmesi de hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Nörofibril yumaklar (NFT) fosforile olmuş tau proteinlerinden oluşur. Tau, mikrotübül ile ilişkili protein tau (MAPT) ailesine ait aksonal lokalizasyona sahip nöronlar tarafından kodlanan bir proteindir. MAPT geni 17. kromozomun q kolunda 21 lokusunda bulunur ve 16 eksondan oluşur. Tau proteininin esas işlevi mikrotübüllerin oluşmasını ve stabilizasyonunu sağlamaktır (Laurent ve ark., 2018). Tau proteininin posttranslasyonel modifikasyonlarından olan fosforilasyonda tau protein kinazların ve fosfatazların aktivasyonu, fosforilasyonun dengesini belirler. Bu dengenin bozulması anormal tau fosforilasyonuna sebep olur. Tau'nun anormal şekilde

hiperfosforilasyonu tau proteininin bağlanma afinitesini azaltır ve aksonal taşınmasını etkiler. Bu durum NFT'lerde agregasyona sebep olarak mikrotübüllerin dengesini bozar. NFT'ler anormal olarak hiperfosforile olmuş tau proteinlerinden oluşur ve aşırı birikimi Alzheimer hastalığında önemli rol oynar (Liu ve ark., 2015).



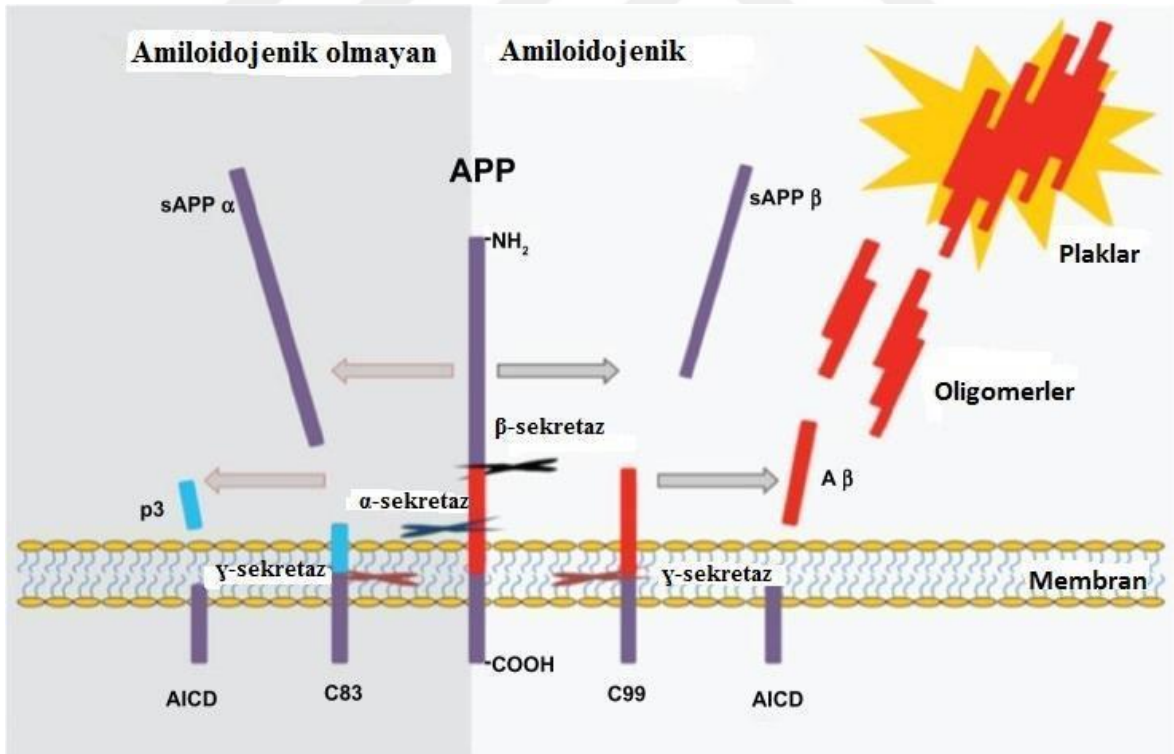
# 1. BÖLÜM

## ALZHEİMER HASTALIĞININ ETİYOLOJİSİ

### 1.1. Alzheimer Hastalığında Etkili olan Genler

#### 1.1.1. Amiloid Prekürsör Protein (APP)

APP 21. kromozomun q kolunda 21.3 lokusunda yer alan transmembran proteini olan amiloid prekürsör proteinini kodlayan genidir. Amiloid prekürsör proteininin fizyolojik işlevleri tam olarak bilinmemekle birlikte nöronal göç ve sinaptik formasyonda yer aldığı bildirilmiştir (Kenanoğlu, 2017). APP'nin  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  sekretaz enzimleri ile proteolitik yıkımı sonucunda A $\beta$  plakları oluşmaktadır. Şekil 1.1.'de gösterildiği gibi APP metabolizması amiloidojenik ve nonamiloidojenik olmak üzere iki farklı yol izlemektedir. Amiloidojenik yolda APP,  $\beta$  sekretaz ile çözülebilen plaklar oluşturur. Oluşan plakların  $\gamma$  sekretaz ile tekrar kesilmesi sonucunda A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 peptidleri oluşur. Nonamiloidojenik yolda ise APP,  $\alpha$  sekretaz tarafından kesildikten sonra  $\gamma$  sekretaz tarafından tekrar kesime uğrar. Nonamiloidojenik yolla oluşan p3 adı verilen parçalar zararsızdır ancak  $\gamma$  sekretazın kestiği  $\beta$  sekretaz ürünlerinden olan A $\beta$ 42 toksik etkiye sahiptir ve amiloid plaklarda birikme yapmaktadır (Çiftçi, 2011).



Şekil 1.1. APP'nin proteolitik kesimi (Chen ve ark., 2013).

### 1.1.2. Presenilin 1 (PSEN1)

Alzheimer hastalığında genetik olarak etkili olan *PSEN1* ve *PSEN2* genleri de A $\beta$ 'ların oluşması ile ilişkilidir. *PSEN1* geni 14. kromozomun q kolunda 24.3 lokusunda yer alır ve  $\gamma$  sekretaz kompleksinin bir bileşenidir (Giri ve ark.,2016). *PSEN1* geni 12 eksondan oluşur ve 467 aminoasitlik proteini kodlar. *PSEN1* geninde meydana gelen mutasyonlar  $\gamma$  sekretaz enziminin aktivitesini değiştirerek A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 oranlarının artmasına neden olur (Özpak ve ark., 2017).

### 1.1.3. Presenilin 2 (PSEN2)

*PSEN2* geni ise 1. kromozomun q kolunda 31 ve 42 lokusları arasında yer alır. Yapı ve işlevsel olarak *PSEN1* genine benzer ve *PSEN1* geni ile birlikte  $\gamma$  sekretaz kompleksinin ana bileşenidir (Giri ve ark., 2016). *PSEN2* geni 12 eksondan oluşur ve 448 aminoasitlik bir proteini kodlar (Kenanoğlu, 2017). *PSEN2* geninin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ancak A $\beta$  oluşumunun artmasına neden olduğu bilinmektedir. *PSEN2* geni *PSEN1* genine yakın homoloji göstermesine karşın *PSEN2* geni tarafından daha az amiloid peptid üretilir (Giri ve ark., 2016).

*APP*, *PSEN1* ve *PSEN2* genlerinde meydana gelen mutasyonlar  $\gamma$  sekretaz enzim aktivitesini değiştirerek A $\beta$ 40 ve A $\beta$ 42 oranlarının artmasına ve bu nedenle beyinde A $\beta$  plaklarının birikmesine yol açmaktadır (Özpak ve ark., 2017).

### 1.1.4. APOE (Apolipoprotein E)

Alzheimer hastalığına neden olan faktörlerden biri de APOE varyantlarıdır. APOE genellikle ileri yaşlarda görülen Geç Başlangıçlı Alzheimer hastalığında en önemli risk faktörüdür. *APOE* geni 19. kromozomun q kolunda 13.2 lokusunda bulunur ve 229 aminoasitten oluşan ApoE proteinini kodlamaktadır. ApoE proteini kolesterol taşıyıcısı olarak görev yapar (Giri ve ark., 2016). ApoE proteininin hücreler arasında kolesterolün hareketini sağlamak ve hücre içinde kolesterolü yeniden dağıtmak için önemli bir düzenleyici işlevi vardır. Bu işlevleri, periferik ve merkezi sinir sisteminde nöronal ve myelin zarlar içinde kritik etkiye sahiptir (Riedel ve ark., 2016).

APOE geni insanlarda polimorfiktir. E2, E3 ve E4 olmak üzere üç izoformu vardır. Bu proteinlerin kodlanmasında üç APOE alleli ( $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4) tanımlanmıştır. Bu allellerin farklı kombinasyonları ile altı farklı ( $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 4) genotip görülmektedir. En sık görülen genotip ise  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3'tür (Karaduman, 2014). Geç Başlangıçlı Alzheimer hastalığında APOE  $\epsilon$ 4 allelinin ailesel otozomal dominant Alzheimer hastalığından sorumlu olduğu bilinmektedir. APOE  $\epsilon$ 4 allelinin bulunması hastalık riskini tek kopya taşıyanlarda 3 kat, iki kopya taşıyanlarda 12 kat artırmaktadır. Ayrıca, APOE  $\epsilon$ 4 allelini taşıyan kişilerin taşımayanlara kıyasla hastalığa daha erken yaşlarda yakalandıkları tespit edilmiştir (Özpak ve ark., 2017).

APOE  $\epsilon$ 4 allelini taşıyan kişilerde A $\beta$  birikiminin arttığı gözlemlenmiştir. Lipoprotein reseptörünün APOE4 lipoproteinine bağlı A $\beta$ 'ye afinitesi düşük olduğu için bu durum A $\beta$  birikmesine neden olmaktadır. APOE2, APOE4'ün aksine yüksek afiniteye sahiptir. Bu yüzden APOE2 hücre dışı boşluktan A $\beta$  fragmentlerini temizleyerek birikmesine engel olur. APOE  $\epsilon$ 4 allelinin bulunması hastalık riskini artırırken  $\epsilon$ 2 allelinin bulunması koruyucu etkiye sahiptir (Giri ve ark., 2016).



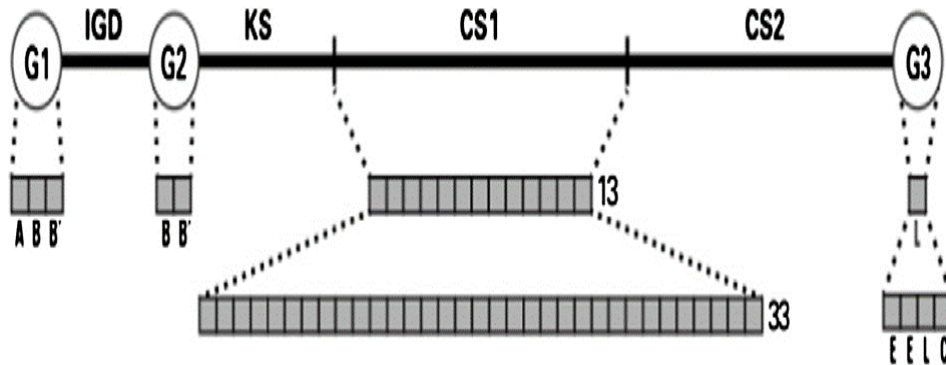
## 2. BÖLÜM

### ACAN GENİ

*ACAN* geni 15. kromozomun q kolunda 26 lokusunda yer almaktadır. Kıkırdağın ana yapısal bileşeni ve büyük toplayıcı proteoglikan olan agrekan proteinini kodlar (Öz ve ark., 2020). Agrekan hiyalin kıkırdağın hücre dışı matris bileşenidir ve ozmotik bir ortam oluşturarak su tutulmasını sağlar (Cong ve ark., 2014). *ACAN* geninde CS1 alanını kodlayan bölgede ekson 12'de 13 ile 33 arasında değişen, değişken sayılı bitişik tekrar (VNTR) polimorfizmi bulunmaktadır. VNTR polimorfizmi 19 aminoasit kodlayan 57 nükleotid tekrarı içermektedir (Öz ve ark., 2020). Az sayıda agrekan allel tekrarı olan kişiler disk dejenerasyonlarına daha duyarlıdır. Bu yüzden Lumber Disk Herniasyonu, otozomal dominant kısa boy ve İntervertebral Disk Dejenerasyonu bu gende bulunan VNTR polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir (Cong ve ark., 2014).

Agrekan proteini G1, G2 ve G3 olmak üzere üç küresel alandan ve glikozaminoglikan (GAG) bağlanma alanından oluşur (Şekil 2.1.). N terminalinde bulunan G1 ve G2 alanları hyaluronan (HA) ile etkileşime girerken, C terminalinde bulunan G3 alanı farklı hücre dışı proteoglikanlara bağlanır. GAG alanı ise keratan sülfat (KS) ve kondroitin sülfat (CS) bağlanma bölgesi görevi görerek negatif yüklü bir molekül oluşturur (Stavber ve ark., 2020).

G1, üç disülfid bağlı alanı olan A, B ve B' alanlardan oluşur. B ve B' alanları HA ile etkileşimden, A alanı ise HA ile etkileşimi stabilize etmekten sorumludur. G2 alanı G1 bölgesine benzeyen disülfid bağlı B ve B' alanlardan oluşur. G3 bölgesi lektin alanı içeren birkaç disülfid bağlı alandan oluşur. Keratan sülfattan zengin olan alanlar GAG bölgesinin ilk kısmını oluşturur ve prolin-serin içeren aminoasit tekrarlarından oluşur. Kondroitin sülfat alanları CS1 ve CS2 alanlarından oluşur. CS1 alanı glisin-serin içeren 19 aminoasitten meydana gelir. CS1 alanı insanlarda 13 ile 33 arasında değişen tekrar sayılarına sahiptir. Az sayıda tekrar agrekan proteininin fonksiyonunu olumsuz olarak etkilemektedir. CS2 alanı CS1 alanına göre daha çok değişen tekrar sayısına sahiptir (Sivan ve ark., 2014).



Şekil 2.1. Agrekan proteininin yapısı (Sivan ve ark., 2014).

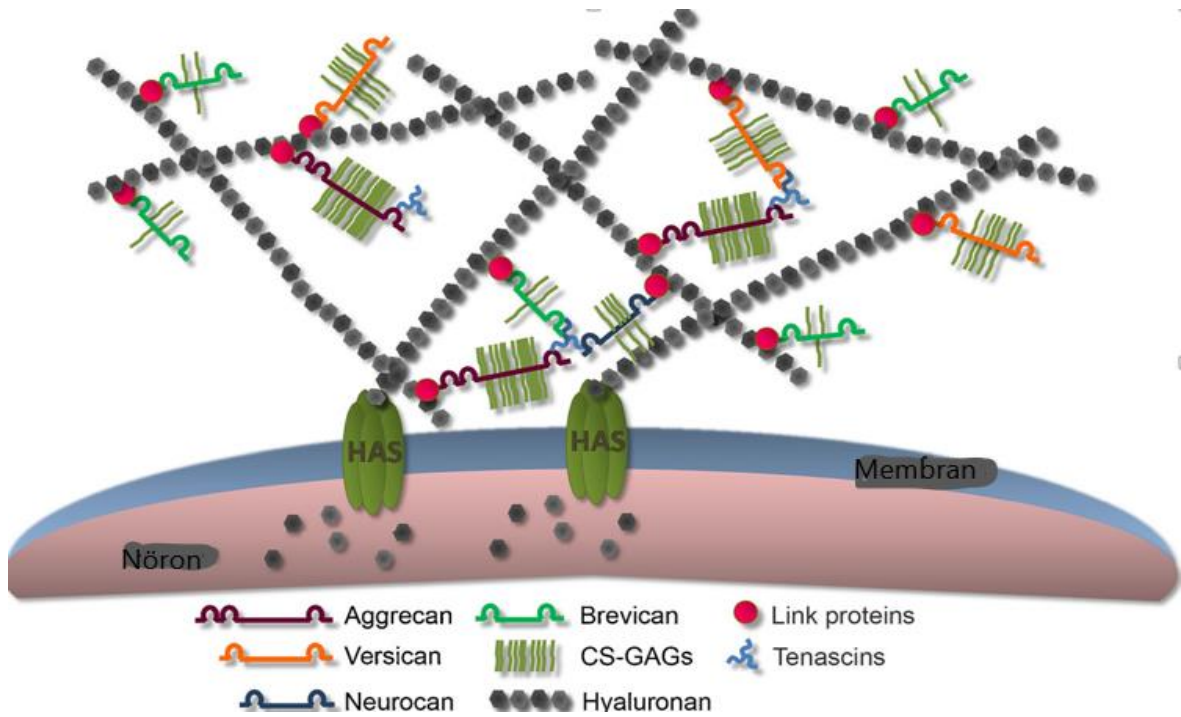
Agrekan proteini kıkırdak dahil olmak üzere beyinde, proksimal dentritik alanlarda, nöronların başlangıç segmentinde ve hücre dışı matris içerisinde perinöral ağların (PN) yapısında bulunur. Agrekan beyinde kıkırdak yapısında olduğu gibi polianyonik karakteri ile ozmotik bir basınç oluşturarak çevreden su çekmektedir. Agrekanın beyindeki işlevleri genel olarak; PN yapısına dahil olarak nöronlarda yüksek hızlı sinaptik iletim sağlamak, sinir sisteminde sinaptik plastisitenin stabilizasyonunu sağlamak ve oksidatif stresi azaltarak nöroprotektif eylemler gerçekleştirmektir (Morawski ve ark., 2012).

## **2.1. Beyin Hücre Dışı Matris (ECM) Bileşenleri ve Perinöral Ağlar**

Beyin hücre dışı matrisi (ECM) hücre için gerekli görevleri yerine getirmektedir ve yetişkin beyin hacminin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Dauth ve ark., 2020; Sethi ve Zaia, 2017). Hücre dışı matris, hücrenin hayatta kalması, farklı beyin bölgeleri ile organizasyon, beyin plastisitesi ve hasar yanıtı gibi pek çok işlevi gerçekleştirmek için mikro bir ortam sağlar. ECM içerisinde kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG) (agrekan, brevican, nörokan), glikozaminoglikanlar (GAG), hyaluronan (HA) ve glikoproteinler olmak üzere çeşitli moleküller bulunur (Dauth ve ark., 2016). ECM içerisinde bulunan bileşenler dokulara özgü olarak değişiklik gösterir ve ECM'nin yenilenmesi için gerekli enzimleri de içerisinde barındırır (Mohamedi ve ark., 2020). Alzheimer hastalığı, şizofreni, multiple skleroz (MS), Parkinson hastalığı gibi pek çok nörodejeneratif hastalıklar ECM bileşenlerindeki değişikliklerden etkilenmektedir (Sethi ve Zaia, 2017).

Hücre dışı matrisin en göze çarpan ve özel formu perinöral ağlardır (PN). PN'ler ECM yapısında bulunan hyaluronana (HA) bağlı genellikle agrekan olan kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG) ve bu proteoglikanların çapraz olarak bağlandığı bağlantı proteini ve tenascin-R bileşenlerinden oluşur (Şekil 2.1.1.) (Suttkus ve ark., 2012). PN'lerin moleküler omurgasını oluşturan hyaluronan diğer PN bileşenleri ile etkileşime girerek nöronların etrafında stabil bir yapı oluşturur. Negatif yüklü olan HA ve GAG'lar etkileşime girerek PN'lerin nöronların etrafında polianyonik bir ortam oluşturmalarını sağlar (Suttkus ve ark., 2014). PN'ler ilk olarak Camillo Golgi tarafından 1889'da gözlemlenmiştir. Daha sonraki yıllarda işlevleri ve yapıları daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır (Duncan ve ark., 2019). PN'ler beyinde nöronların gövdelerini, proksimal dentritleri, aksonların başlangıç segmentlerini ve parvalbumin (PV)+GABAerjik internöronların etrafını sarar (Suttkus ve ark., 2012; Wen ve ark., 2018). Genel olarak sinaptik stabilizasyondan ve nöroprotektif özelliklerden sorumlu olduğu bilinmektedir (Suttkus ve ark., 2012). PN'ler nöronlar arasındaki bağlantıyı düzenleyerek bir nöronun aksonu ile bir diğer nöronun gövdesi arasında bağlantı kurulmasına yardımcı olur ya da nöronlar arasındaki bağlantıyı engeller ve böylece sinaptik plastisiteye katkı sağlarlar (Bosiacki ve ark., 2019). Bunlara ek olarak diğer görevleri PN'lerin polianyonik yapıda olmasından kaynaklanmaktadır. Böylece PN'ler redoks aktif demiri bağlayabilir ve temizlenmesini sağlar. Bu durum nöronların oksidatif strese karşı PN'ler tarafından

korunduğunu göstermektedir (Suttkus ve ark., 2012). PN'lerin demir bağlama özelliği yapısında bulunan HA ve kondroitin sülfat moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Bu moleküller ve PN'nin diğer bileşenleri antioksidan özellik göstererek hidroksil (OH) radikali oluşumunu engeller ve böylece DNA hasarı ve protein oksidasyonları azalır (Cabungcal ve ark., 2013). Demir katalizli oksidatif stres ürünü olan lipofuscin birikimi PN kaplı ve PN kaplı olmayan hücrelerin her ikisinde de bulunmuştur. Ancak PN kaplı olmayan hücrelerin oksidatif stres sonucu oluşan hücre ölümüne karşı daha duyarlı hale geldiği gözlemlenmiştir (Wen ve ark., 2018).



Şekil 2.1.1. PN'lerin yapısı (Djrbal ve ark., 2017).

PN'ler genel olarak korteks, hipokampus, hipotalamus, amigdala, bazal ganglionlar olmak üzere beynin pek çok yerinde eksprese edilirler (Bozzelli ve ark., 2018). Oluştuktan sonra stres, öğrenme ve immün yanıt gibi değişikliklere duyarlı hale gelirler (Shen, 2018). PN'ler, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda, otizm, epilepsi, duygudurum bozuklukları gibi pek çok nöropsikiyatrik hastalıklarda rol oynamaktadır (Schmidt ve ark., 2020; Shen, 2018).



### 2.1.1. PN bileşenleri

PN bileşenlerinin sentezi nöronlar, astrositler ve oligodentrositler tarafından sağlanır. Temel bileşenleri; HA, agrekan, brevican, nörokan ve versican gibi CSPG'ler, tenasin ve bağlantı proteini HAPLN'dir (Bosiacki ve ark., 2019). PN'lerin omurgasını proteoglikanlarla etkileşime giren HA'lar sağlarken bağlantı proteinleri (HAPLN) ile uzun GAG zincirleri oluşur ve tenasin ailesi proteinleri ile yoğun bir ağ oluşturulur. PN bileşenleri beyin içinde değişiklik gösterir ve bundan dolayı oldukça heterojendir (Testa ve ark., 2018).

#### 2.1.1.1. Hyaluronan

Hyaluronan (HA) çok sayıda disakkarit alt birimlerinden oluşan bir polimerdir. HA'nın sentezi hücre dışı boşlukta hyaluronan sentaz (HAS) tarafından sağlanır. HAS1, HAS2 ve HAS3 olmak üzere üç izoformu vardır (Bosiacki ve ark., 2019). HAS3 hyaluronanu HAS1 ve HAS2'ye göre daha yavaş sentezler ve daha kısa polimerler oluşturur. HA'yı sentezleyen bu enzimler beyinde farklı yerlerde farklı düzeylerde dağılım göstermektedir. HAS1, HAS2 ve HAS3 hipokampal nöronlarda eksprese edilirken serebellum nöronlarda sadece HAS2 ve HAS3 eksprese edilir. HA'lar PN'leri düzenleyen en önemli bileşendir (Testa ve ark., 2018). PN'lerin ana iskeletini oluşturan HA'lar PN hidrasyonundan ve ECM viskozitesinden sorumludur (Bosiacki ve ark., 2019).

#### 2.1.1.2. Glikozaminoglikan

Glikozaminoglikanlar (GAG), N-asetilgalaktozamin içeren çok sayıda tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşur (Suttkus ve ark., 2014). GAG'lar bir çekirdek proteini ile birleşerek proteoglikanları (PG) oluşturur (Testa ve ark., 2018). GAG'lar çok sayıda proteinle etkileşime girerek hücre göçü, büyüme ve rehberlik gibi fizyolojik süreçlerde görev alırlar. GAG'ların birçoğu, heparin (Hp), heparan sülfat (HS), keratan sülfat (CS) ve kondroitin sülfat olmak üzere sülfatlanmış durumdadır (Djrbal ve ark., 2017).

#### 2.1.1.3. Kondroitin sülfat proteoglikanları

Kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG) bir ya da birden fazla kovalent bağlı CS zincirleri ve çekirdek proteinlerinden oluşur (Sorg ve ark., 2016). PN'lerin yapısında en belirgin bulunan lectican CSPG ailesidir. Bu CSPG'ler değişen çekirdek protein boyutuna ve GAG zincirlerinin bağlanma sayısına göre değişiklik gösteren, agrekan, brevican, nörokan ve versicanı içerir (Wen ve ark., 2018). Lecticanlar, hyaluronana bağlanabilen N-terminal ve diğer bileşenleri bağlayabilen C-terminal alana sahiptir. Bu özellikleri sayesinde ECM ve diğer hücreler arasında

köprü görevi görerek hücre dışı alanı düzenlerler (McRae ve Porter, 2012). Ayrıca CSPG'ler akson büyümesini, sinir rejenerasyonunu ve nöral plastisiteyi engeller (Lin ve ark., 2021).

#### 2.1.1.4. Tenasinler

Tenasin ailesi Tn-R, Tn-C, Tn-W ve Tn-X olmak üzere dört farklı glikoproteinden oluşur. Ancak şimdiye kadar beyinde, nöronlarda ve glial hücrelerde bunlardan sadece ikisi (Tn-R, Tn-C) gözlemlenebilmiştir. Tenasinler transkripsiyon sonrası görülen uç birleştirme ve katalitik mekanizmalarda görev yapan metalloproteinaz modifikasyonları nedeniyle heterojendir (Testa ve ark., 2018). Sinir sisteminde yüksek oranda eksprese edilen Tn-R tekrarlanan fibronektin III alanı aracılığı ile CSPG'lerin lektin alanı ile birleşir. Tenasin ailesinden özellikle Tn-R, PN'ler için çok önemlidir (Bosiacki ve ark., 2019; McRae ve Porter, 2012).

#### 2.1.1.5. Hapln proteinleri

HAPLN, PN ile sarılı nöronlar tarafından eksprese edilen, hyaluronan ve lecticanlar arasındaki etkileşimleri stabilize eden bağlantı proteindir (McRae ve Porter, 2012). HAPLN ailesi dört farklı proteinden oluşmaktadır ve bunların üçü beyinde bulunmaktadır. HAPLN ailesinin özellikle de tüm lectinler ile bağlantı kuran HAPLN1'in *in vivo* çalışmalarda PN'lerin oluşumu için önemli olduğu ve kaybının PN oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Bosiacki ve ark., 2019).

## 2.2. Perinöral Ağlar (PN) ve Alzheimer Hastalığı İlişkisi

Alzheimer hastalığı, tau proteinin hiperfosforile olarak nörofibril yumaklar şeklinde toplanması ve amiloid beta plaklarının birikerek nöron ölümüne sebep olması ile ortaya çıkmaktadır. Alzheimer hastalarının postmortem beyinlerinin incelenmesi sonucu PN'ler ile sarılı nöronların tau ve amiloid patolojisinden daha az etkilendiği görülmüştür (Schmidt ve ark., 2020). PN'lerin yapısının bozulması ve ortadan kalkması nöronları savunmasız hale getirerek nöronların nörotoksik saldırılara maruz kalmasına neden olur. Böylece Alzheimer hastalığının nedenlerinden olan hücre ölümü gerçekleşir (Reichelt, 2020). Bu çalışmalardan yola çıkarak PN'lerin amiloid beta ve nörotoksitesine karşı koruma sağladığı ve nöronları tau patolojisinden koruduğu ortaya çıkmıştır (Testa ve ark., 2019).

CSPG içeren PN'ler ile kaplı nöronlar amiloid betanın proteolitik kesimi sonucu oluşan A $\beta$ 42 peptitlerinin nörotoksitesine karşı dirençlidir. Bu nöroprotektif etki lipid peroksidasyonunu ve reaktif oksijen hasarını azaltmak için Ap peptitlerinin nöronal membranla etkileşiminin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Miyata ve ark., 2007).

PN'ler, hem hücre dışı tau proteinlerinin beyin dokusunda yayılmasını hem de hücre içi tau proteinlerinin nöronlarla etkileşim halinde olmasını önler. PN'lerin tau proteinine karşı bu etkileri PN'lerin güçlü anyonik yapısından kaynaklanmaktadır. PN'lerin anyonik yapısı, proteoglikanlar içerisinde bulunan yüksek sayıda kovalent bağlı negatif yüklü kondroitin sülfat glikozaminoglikan (CS-GAG) zincirlerinden kaynaklanır. Proteoglikanlar içerisinde en yüksek sayıda CS-GAG zincirine sahip olan agrekan, PN'lerin negatif yükü üzerinde en güçlü etkiye sahiptir. PN'ler negatif yükü sayesinde hücre dışı boşlukta bulunan moleküllerin difüzyonunu sağlar ve nörotoksik molekülleri bağlayarak bariyer görevi görür. (Schmidt ve ark., 2020).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda agrekanın azalmasının toplam tau proteininin artması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Çalışmalardan yola çıkarak agrekanın tau ekspresyonu ve tau fosforilasyonunu düzenleyen mekanizmalarda yer aldığı görülmektedir (Schmidt ve ark., 2020).

ECM ve PN'lerin ana bileşeni olan ve yaşa bağlı olarak ekspresyonu artan agrekanın PN'lerin nöroprotektif etkisine katkı sağladığı ve agrekan eksiliğinde PN'lerin nöroprotektif etkisinin ortadan kalktığı görülmekte ve yapılan deneylerle desteklenmektedir (Suttkus ve ark., 2014; Lin ve ark., 2021).

PN'ler beyinde pek çok yerde eksprese edilir ve bunlardan biri de PV internöronlardır. PN'lerin çevrelediği PV nöronları PN kaplı olmayan PV'lere göre daha fazla eksprese edilir ve daha yüksek uyarıcılığa sahiptir (Carceller ve ark., 2020). Ayrıca PN'ler PV hücrelerini oksidatif strese karşı korur ve böylece oksidatif stresin neden olduğu hücre kaybını engeller. Alzheimer hastalığında PN kaybı PV nöronlarının işleyişini etkiler ve düşük nöronal aktiviteye neden olur (Cattaud ve ark., 2018).

Parvalbumin (PV) kalsiyum bağlayıcı bir proteindir ve yüksek enerjili, hızlı hareket eden GABAerjik internöronların alt kümesidir (Brady ve Mutson, 1997). PV internöronlarının Alzheimer hastalığının patogenezinde yer alan amiloid  $\beta$  plaklarından etkilendiği ve Alzheimer hastalarında PV hücrelerinin bozulmuş aktivitesinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Verrent ve ark., 2012). Hem insan postmortem çalışmalarda hem de transgenik fare modellerinde PV nöronlarının kaybının, nörofibril yumaklar ve amiloid  $\beta$  plaklarının oluşumu ile korele olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle AH patolojisi düşük yoğunluklu PV nöronları ile ilişkilendirilmiştir (Ali ve ark., 2019).

### 3. BÖLÜM

#### ALZHEİMER HASTALIĞININ TANISI

Alzheimer hastalığı demansın en yaygın nedenidir ve dünya çapında 47 milyon kişiyi etkileyen nörodejeneratif bir bozukluktur. Günümüzde mevcut tanı araçları, klinik değerlendirme ve invaziv testlerdir. Alzheimer hastalığının kesin tanısı postmortem beyin incelenerek, hücre dışı Ap plakları ve NFT'lerin tespiti ile doğrulanır. Alzheimer hastalığının tanısında manyetik rezonans (MRI), pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme teknikleri ile kan bazlı ve beyin omurilik (BOS) sıvısı biyobelirteçleri kullanılarak önemli ilerlemeler kaydedilmektedir (Singh ve Verma, 2020). Yapılan bu incelemeler diğer demans türlerinin dışlanmasını sağlamaktadır (Adalı ve ark., 2020).

Alzheimer hastalığında ilk olarak ortaya çıkan semptom hafıza kaybıdır ve semptomlar yavaş yavaş ilerlemektedir. Hastalığın tanısı konmadan ortalama 3 yıl önce semptomlar fark edilmeye başlanmaktadır. Hastalığın ilk evrelerinde meydana gelen medial temporal lobdaki patolojik durumlar sonucunda epizodik hafızada bozulmalar başlamaktadır. Hastalığın ilerlemesi ile patoloji diğer bölgelere yayılmaktadır. Orta ve şiddetli evrelerde çoklu bilişsel alanlarda bozulma, işlevsellik, hareketlilik ve yutmada düşüş ile günlük temel aktiviteleri için başkalarına bağımlılık artmaktadır (Eratne ve ark., 2018).

Alzheimer hastalığı yavaş bir seyir göstermektedir ve bulgularına göre üç evreden oluşmaktadır.

**Erken Evre:** Bu evrede hafızada bozulmalar görülmektedir. Yakın zamanda öğrenilen bilgilerin unutulması, yeni bilgilerin öğrenilmesinde zorluk, isimlerin unutulması, konuşmada güçlük ve eşyaların yerini karıştırma bu evrenin en önemli özelliklerindedir (Adalı ve ark., 2020).

**Orta Evre:** Belirtilerin ağırlaşmasıyla günlük aktivitelerde ciddi bozulmalar başlamaktadır. Yeni bilgi öğrenmek imkânsız hale gelmektedir. Var olan bilgiler yakın zamandan başlayarak yavaş yavaş kaybolmaktadır. Dışarı çıktıklarında kaybolmalar, karşılıklı sohbetler gerçekleştiremeyecek kadar dilsel işlevlerde bozulmalar ve saat, tarih gibi zaman oryantasyonlarında bozukluklar gerçekleşmektedir. Bu evrede hastalarda saldırganlık, ajitasyon ve bazı psikiyatrik belirtiler ortaya çıkmaktadır (Adalı ve ark., 2020).

**İleri Evre:** Bu evrede hastalar anlamsız kelimeler konuşmaya başlar ve kelime bulmada zorluk yaşarlar (Özkay ve ark., 2011). En temel günlük aktivitelerin gerçekleştirilebilmesi için bile yardıma ihtiyaç duyarlar. Yakınlarındaki kişileri tanımamaya başlarlar. Bu evrenin ilerleyen zamanlarında hasta tamamen yatağa bağımlı hale gelir. Ölümler genellikle akciğer embolisi, üriner enfeksiyon ve yatak yarası enfeksiyonları gibi nedenlerden gerçekleşir (Adalı ve ark., 2020).

Alzheimer hastalığının tanı kriterleri için 1984 yılında Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü (NINCDS) ile Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Derneği (ADRDA), tarafından bir çalışma grubu oluşturuldu. Belirlenen tanı kriterleri Tablo 3.1’de de gösterildiği gibi; nöropsikolojik testler, İlerleyici hafıza kaybı, günlük yaşam aktivitesinde bozulma ve dil bozukluğu (afazi), motor beceri bozukluğu (apraksi) ve algı kaybı (agnozi) kriterlerini içermektedir. 2011 yılında ise Ulusal Yaşlanma Enstitüsü-Alzheimer Derneği, NINCDS ve ADRDA tarafından belirlenen kriterleri güncelleyerek klinik biyobelirteç ve patofizyolojik kanıtlarla ilgili birkaç değişiklik yapmıştır (Breijyeh ve Karaman, 2020).

**Tablo 3.1.** NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığının klinik tanı kriterleri (Canbolat ve Yardımcı, 2016).

1. Muayene ile gösterilen ve objektif testlerle dokümente edilen demans
2. İki veya daha fazla alanda kognitif bozukluk
3. Bellek ve diğer kognitif fonksiyonlarda ilerleyici kötüleşme
4. Bilinç bozukluğu yok
5. Başlangıç 40 ve 90 yaşları arasında
6. Kognisyonda ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik hastalıklar veya diğer beyin hastalıklarının bulunmaması
7. Aşağıdakilerle tanının desteklenmesi <ul style="list-style-type: none"> <li>• Afazi, apraksi, agnozi</li> <li>• Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış tarzlarında değişiklik</li> <li>• Benzer bozukluklara ilişkin aile öyküsü</li> <li>• Uyumlu laboratuvar bulguları (serebratrofi gibi)</li> </ul>

**Tablo 3.2.** Alzheimer tipi demans için DSM-V tanı kriterleri (Canbolat ve Yardımcı, 2016).

A. Ağır ya da hafif nörokognitif bozukluk için tanı kriterleri karşılanmalıdır
B. Bir ya da birden çok kognitif alanda, gizlice ve sessizce başlayan yavaş yavaş ilerleyen bir bozulma vardır
C. Olası ya da olabilir AH için tanı kriterleri şöyle karşılanmaktadır: <i>C1. Ağır nörokognitif bozukluk için:</i> Aşağıdakilerden 1’i varsa olası/muhtemel AH, yoksa olabilir/mümkün AH tanısı konmalıdır <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aile öyküsünden ya da kalıtsal ölçümlerden, neden olucu bir AH kalıtsal değişimini (genetik mutasyon) tanısı</li> <li>2. Aşağıdakilerden her üçü:</li> </ol>

- a. Bellek ve öğrenmede ve en az bir diğer kognitif alanda gerileme olduğunun açık kanıtı (ayrıntılı öykü ya da bir dizi nöropsikolojik ölçümlere göre)
- b. Kognitif fonksiyonlarda uzun süreli duraksama olmadan, sürekli ilerleyen, aşamalı gerileme
- c. Kognitif bozukluklara neden olabilecek başka karışık etkenler olduğuna dair kanıt olmaması (başka nörodejeneratif ya da serebrovasküler hastalık ya da başka sinirsel, ruhsal ya da sistemik hastalık ya da kognitif gerilemeye katkıda bulunabilecek bir durum)

*C2. Hafif nörokognitif bozukluk için:*

Aile öyküsünden ya da kalıtsal ölçümlerden, neden olucu bir AH kalıtsal değişimini (genetik mutasyon) kanıtı varsa olası/muhtemel AH tanısı konur. Bu kanıtın olmadığı durumlarda aşağıdakilerden her üçü varsa olabilir/mümkün AH tanısı konur

1. Bellek ve öğrenmede gerileme olduğunun açık kanıtı
2. Kognitif fonksiyonlarda uzun süreli duraksama olmadan, sürekli ilerleyen, aşamalı gerileme
3. Kognitif bozukluklara neden olabilecek başka karışık etkenler olduğuna dair kanıt olmaması (başka nörodejeneratif ya da serebrovasküler hastalık ya da başka sinirsel, ruhsal ya da sistemik hastalık ya da kognitif gerilemeye katkıda bulunabilecek bir durum)

**D.** Bu bozukluk, serebrovasküler hastalık, başka nörodejeneratif bir hastalık, madde ya da başka ruhsal, sinirsel ve sistemik bozukluğun etkileriyle açıklanamaz

Alzheimer tanısını koymak için yaygın olarak kullanılan klinik tanı kriterlerinden bir diğeri de Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabıdır (DSM-V) (Tablo 3.2) (Gazioğlu, 2017).

Alzheimer hastalığının erken teşhisi çok önemlidir. Hastalığın ilerlemesinin değerlendirilmesinde ve tespitinde biyobelirteçlerden yararlanılmaktadır. Alzheimer hastalığında doğrudan kullanılan biyobelirteçler A $\beta$  ve tau birikimi gibi Alzheimer hastalığının patolojisinde yer alan göstergelerdir. Yeni biyobelirteçlerin bulunmasının ve var olan biyobelirteçlerin geliştirilmesinin hastalığın erken tanı ve tedavisinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Hane ve ark., 2017).

## 4. BÖLÜM

### ALZHEİMER HASTALIĞININ TEDAVİSİ

Alzheimer hastalığı bir halk sağlığı sorunudur ve 2050 yılında Alzheimer hasta sayısının mevcut hasta sayısından 4 kat fazla olacağı öngörülmektedir. Günümüzde hastalığın tedavisi için onaylanmış sadece iki ilaç sınıfı vardır. Bunlar, kolinesteraz enzimi inhibitörleri ve N-metil D antagonistleridir (Breijyeh ve Karaman, 2020). Bunlar kolinerjik veya glutamaterjik sinir sistemini hedef alan ilaçlardır. Alzheimer hastası bireylere verilen ilaçlar sadece hastalığın semptomlarını hafifletmek için kullanılmaktadır. Klinik çalışması yapılmaya devam eden ilaçlar olmasına rağmen hiçbiri iyileştirici etkiye sahip değildir. Kolinesteraz inhibitörü olan ilaçlar hafif ve orta dereceli Alzheimer hastalığında kullanılmaktadır. Orta ve şiddetli Alzheimer hastalarında ise N-metil D antagonist grubundaki ilaçlar kullanılmaktadır. Tablo 4.1.'de Alzheimer hastalığı için geliştirilmiş en son ilaçlar verilmiştir. Bu ilaçlar klinik olarak başarısız oldukları için satışa sunulmamıştır (Khan ve ark., 2020).

**Tablo 4.1.** Alzheimer Hastalığının tedavisi için geliştirilmiş ilaçlar (Khan ve ark., 2020).

İlacın Adı	Şirket	Hareket Mekanizması	Klinik Çalışma	Başarısızlık Nedeni
Verubecestat	Merck	B bölgesi amiloid öncü protein parçalayıcı enzim 1 (BACE 1) inhibitörleri	EPOCH denemesi APECS denemesi	AH'nin ilerlemesini yavaşlatmaya etkisi yok
Lanabecestat	Astra Zenaca ve Eli Lilly	BACE 1 inhibitörleri	AMARANTH ve DAYBREAK-ALZ	Ara boşluk analizinin başarısızlığı
Atabecestat	Janssen	BACE 1 inhibitörleri	ERKEN	Karaciğer toksisitesi
Solanezumab	Eli Lilly	AB için monoklonal antikor	KEŞİF III (Aşama III)	Bilişsel gerileme üzerinde olumlu bir etkisi yoktur

Azeliragon	vTv Tedavileri	Gelişmiş Glikasyon son ürünleri (RAGE) inhibitörü için reseptör	STEADFAST (Aşama III)	Etkinlik eksikliği
Pioglitazon	Takeda ve Zinfandel İlaçları	Peroksizom Proliferatörle aktive edilen reseptör y (PPAR-y)	-	-
İdalopirdin	Lundbeck ve Otsuka	5HT6 antagonisti	STARSHINE, STARBEAM, STARBRIGHT (Aşama III)	Bilişi Geliştirmedi

Günümüzde Alzheimer hastalığı için piyasaya sürülmüş ve hâlihazırda kullanılan ilaçlardan bazıları; donepezil, rivastigmin, galantamin ve memantindir. Bu ilaçlar Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisi için kullanılmaktadır (Breijyeh ve Karaman, 2020).

Alzheimer hastalığını önlemek ve ilerlemesini azaltmak için geliştirilen hastalık değiştirici terapötikler (DMT) üzerinde çalışılmaktadır. İmmünoterapiler veya küçük moleküller olan DMT'ler oral yoldan uygulanır. Sentetik A $\beta$  peptidleri, anti-A $\beta$  antikorları,  $\gamma$ -sekretaz inhibitörleri ve  $\beta$ -sekretaz inhibitörleri gibi çeşitli DMT'ler geliştirilmiştir ve klinik deneylere girmiştir. Ancak klinik deneylerde, tedaviye geç başlanması, Alzheimer patofizyolojisinin yanlış anlaşılması ve uygun olmayan dozlarda ilaç kullanılması gibi nedenlerden dolayı başarısız olmuştur. Anti-amiloid ajanlara ek olarak tau agregasyon inhibitörleri de umut veren DMT tedavi yaklaşımlarındandır. Hem anti-amiloid ajanları hem de tau agregasyon inhibitörleri olan DMT'ler üzerinde klinik faz çalışmaları devam etmektedir (Breijyeh ve Karaman, 2020).

Alzheimer hastalığı için geliştirilmeye çalışılan bir başka tedavi yöntemi ise gen tedavisidir. Alzheimer hastalığına neden olan genlerin belirlenmesi ile özellikle adeno-ilişkili virüslerin kullanıldığı gen terapisi yöntemleri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda bilim insanları beyin hücrelerine PGC1-alfa (Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü 1-alfa) genini aktararak tedavi ettikleri farelerin daha iyi hafızaya sahip olduklarını ve daha az amiloid plak geliştirdiklerini görmüşlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise APOE4 genini APOE3 genine dönüştüren genetik kırpm tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmalar ilerde Alzheimer hastalığının tedavisi için umut vadetmektedir (Khan ve ark., 2020).

Bu çalışmada Alzheimer hastalığı ve *ACAN* genindeki VNTR polimorfizmi arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır. *ACAN* geninin kodladığı agrekan proteininin ekspresyonunun



değişmesi beyinde ECM'de bulunan perinöral ağların (PN) yapı bütünlüğünü bozarak (tau ve amiloid  $\beta$  birikimi gibi) Alzheimer patolojisini etkilemesi beklenmektedir. PN'lerin nöronların etrafını sarak nöroprotektif etki göstermesi ve tau, amiloid gibi plakların nöronlara zarar vermesini engellemesi Alzheimer hastalığında önemli bir yere sahiptir. PN'lerin oluşabilmesi için gerekli bileşenlerin ve özellikle PN yapısının oluşmasında önemli etkilere sahip agrekan proteinin ekspresyonunun değişmesine neden olan VNTR polimorfizminin araştırılması Alzheimer hastalığının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilecek potansiyeldedir. Yaptığımız bu çalışma ile Alzheimer patofizyolojisine katkı sağlayarak hastalığın aydınlatılmasında tanı ve tedavisine kolaylık sağlanacağı düşünülmektedir.



## 5. BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmaya dahil edilecek hastalar, Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji polikliniğinde takip edilen veya polikliniğe ilk kez başvuran hastalar arasından, Ulusal Nörolojik ve İletişimsel Bozukluklar ve İnme Enstitüsü (NINCDS) ile Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Bozukluklar Derneği (ARDRA) ve Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı V (DSM-V) tanı kriterlerine göre ve gönüllülük esasına dayalı olarak Alzheimer hastalığı tanısı almış hastalardan seçildi (n=102). Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir bulgusu olmayan 101 kontrol grubu katılımcısı çalışmaya dahil edildi.

Hasta grubundaki katılımcıların yeterlilikleri nöroloji hekimi tarafından değerlendirildi. Yeterliliği olmayan hastaların onam yetkisi hastanın yasal temsilcisinden alındı. Alzheimer hastası ve sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme ve edilmeme kriterleri Tablo 5.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.1.** Hasta ve Kontrol grubunun çalışmaya dahil edilme edilmeme kriterleri

<b>Hasta ve Kontrol Grubunun Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Gönüllü formunu imzalamış olmak</li><li>2. 40-100 yaş aralığında olmak</li><li>3. Ulusal nörolojik ve iletişimsel hastalıklar ve inme enstitüsü/Alzheimer hastalığı ve ilişkili bozukluklar derneği (NINCDS-ADRDA) kriterlerine göre Alzheimer hastalığı tanısı konmuş olmak (hasta grubu)</li><li>4. Ulusal nörolojik ve iletişimsel hastalıklar ve inme enstitüsü/Alzheimer hastalığı ve ilişkili bozukluklar derneği (NINCDS-ADRDA) kriterlerine göre Alzheimer hastalığı tanısı konmamış olmak (kontrol grubu)</li></ol>
<b>Hasta ve Kontrol Grubunun Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Ciddi karaciğer, kalp ve böbrek hastalığının olmaması</li><li>2. Ciddi inflamasyonunun olmaması</li><li>3. Geçmiş veya mevcut nörolojik ve/veya psikiyatrik rahatsızlığının olmaması</li><li>4. Bağımlılık yapıcı madde kullanımı geçmişinin olmaması</li><li>5. Kafa travması geçmişinin olmaması</li><li>6. Serebrovasküler hastalık geçmişinin olmaması</li><li>7. Felç, geçici istemik ataklar, kafa içi kanamasının olmaması</li><li>8. Kronik alkolik olmamak ve sigara kullanmama</li></ol>

Varyasyon analizi yapmak için 102 hasta ve 101 kontrol grubundaki bireylerden kan örnekleri alındı ve aşağıdaki materyal metot işlemleri uygulandı. İlk olarak katılımcılardan alınan kan örneklerinden DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izole edildi. Elde edilen DNA'nın spektrofotometrik yöntemlerle konsantrasyonu ve saflığı kontrol edildi. *ACAN* genindeki VNTR polimorfizmi için forward: 5'-TAGAGGGCTCTGCCTCTGGAGTTG-3' ve reverse 5'-AGGTCCCCTACCGCAGAGGTAGAA-3' primerler kullanıldı (Cong ve ark., 2014; Casa ve ark., 2016; Öz ve ark., 2020). VNTR polimorfizmi içeren bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildi. PCR sonrası amplifiye edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV ışık altında görüntülendi.

*ACAN* geni 15q26 kromozomu üzerinde lokalize olmuştur ve ekson 12'de 13 ile 33 arasında değişen, değişken sayılı bitişik tekrar polimorfizmi (VNTR) bulunmaktadır. VNTR polimorfizmi 19 aminoasit kodlayan 57 nükleotid tekrarları içermektedir (Öz ve ark., 2020). Kısa allellere sahip bireyler daha az tekrarlı agrekan üretirler ve bu durum agrekan molekülünün düşük sayıda Kontroitin Sülfat (CS) sayısına sahip olmasına neden olur. CS sayısının azalması da agrekan fonksiyonunun daha çabuk bozulması ile sonuçlanır (Casa ve ark., 2016). Solovieva ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma uzun allel taşıyanların disk dejenerasyonlarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde 25 ve daha fazla tekrar sayısına sahip olanlar daha düşük el ve diz osteoartriti riski ile ilişkilendirilmiştir (Solovieva ve ark., 2007). Allel tekrar sayısı ve amplikon büyüklüğü tablo 5.2.'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.2.** *ACAN* geni VNTR polimorfizmine ait allel tekrar sayısı ve amplikon büyüklüğü

Tekrar Sayısı	Amplikon büyüklüğü (bp)
13	775
14	832
15	889
16	946
17	1003
18	1060
19	1117
20	1174
21	1231
22	1288
23	1345
24	1402
25	1459
26	1516

27	1573
28	1630
29	1687
30	1744
31	1801
32	1858
33	1915

### 5.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu kimyasal yöntemler ve enzimler ile DNA'nın hücre içeriğinden ayrıştırılması işlemidir. DNA izolasyon yöntemi temel olarak üç aşamadan meydana gelmektedir. İlk olarak hücrenin parçalanması için izolasyon tamponlarının etkili hale getirilmesi gerekmektedir. Hücre parçalandıktan sonra ikinci olarak DNA-protein komplekslerinin birbirinden ayrılması için denatürasyon ile DNA'nın çözünür hale getirilmesi gerekmektedir. Son olarak da DNA'nın RNA ve diğer makro moleküllerden ayrılması için çöktürülmesi gerekmektedir (Altun, 2009). DNA izolasyon kitleri genomik ya da genomik olmayan DNA'nın saflaştırılması için kullanılır. DNA izolasyon kitleri deney aşamalarını kısaltarak daha etkili DNA izolasyonu yapılmasını sağlar.

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerine GenaAll markalı Clinic SV izolasyon kiti kullanıldı (Tablo 5.3.). Örnekler mikrosantrifüj tüplerine alınarak proteinlerin parçalanması ve DNAaz'ların inhibisyonu için Proteinaz K kullanıldı. Örneklerin üzerine buffer eklenerek DNA'nın stabil kalması ve pH değerinin korunması sağlandı. Böylece yüksek alkali ve asit durumlarında DNA yapısının bozulması engellenir. DNA'nın yıkanarak temizlenmesi için absolut etanol kullanıldı ve santrifüj edildi. Daha sonra DNA örneklerinin üzerine buffer eklenerek çözülmesi sağlandı ve belirli sürelerle santrifüj edildi. İzolasyon sonunda elde edilen DNA örneği -20 °C'de saklandı.

**Tablo 5.3.** DNA izolasyonu kiti ile ilgili genel bilgiler

<b>DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri</b>		
<b>Kullanılan Kitin Markası</b>	<b>Kitin Adı</b>	<b>Katalog No</b>
GeneAll	Clinic SV	108-101

DNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine 20 ul Proteinaz K pipetlendi.
2. 200 ul kan örnekleri tüpe aktarıldı.
3. 200 ul BL buffer eklenerek 56°C'de 10 dk. bekletildi.
4. Karışımın üzerine 200 ul %100 absolut etanol eklendi ve karışım G tipi kolona aktarıldı.
5. Kolona aktarılan karışım santrifüj edildi (8000 rpm, 1 dk.).
6. Kolon üzerine 600 ul Buffer BW eklenerek santrifüj edildi (8000 rpm, 30 sn.).
7. Kolon üzerine 700 ul Buffer TW eklenerek santrifüj edildi (8000 rpm, 30 sn.).
8. Kolon üzerine herhangi bir solüsyon eklemeyen santrifüj edildi (14000 rpm, 1 dk.).
9. Kolon yeni bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alınarak ve üzerine 200 ul Buffer AE eklenerek santrifüj edildi (14000 rpm, 1 dk.).
10. Elde edilen DNA örneği -20°C'de saklandı.

## 5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) aranması amacıyla keşfedilmiştir (Kâhya ve ark., 2013). PCR yöntemi istenilen DNA dizilerinin çoğaltılma esasına dayanmaktadır. Üç aşamadan meydana gelir. Bunlardan ilki çoğaltılacak DNA dizilerinin açılması (Denatürasyon) aşaması, ikincisi açılan DNA dizilerine tasarlanan primerlerin bağlanması (Annealing) aşaması, son olarak da primerlerin uzaması (Primer extesion) aşamasıdır (Yılmaz ve Devran, 2016). PCR yönteminde hedef DNA dizilerinin çoğaltılması 20-40 döngü arasında değişir (Okutucu ve Pehlivan, 2003).

DNA izolasyonu yapılan örneklerle PCR uygulandı. WizPure™ markalı PCR 2X Master kiti kullanıldı (Tablo 5.4.). PCR 2X Master kitinden 12.5 µl, reverse ve forward primerlerden 0.5 µl, kalıp DNA'dan 2 µl ve 9.5 µl su ile toplam hacmi 25 µl olan mix hazırlandı (Tablo 5.5.). PCR reaksiyonunda denatürasyona başlama 95 °C'de 4 dakika 1 devir, denatürasyon 94 °C'de 30 saniye 35 devir, primerlerin bağlanması 65 °C'de 1 dakika 35 devir, uzama 72 °C'de 30 saniye 35 devir ve son uzama 72 °C'de 3 dakika 1 devir olarak uygulandı (Tablo 5.7.).

**Tablo 5.4.** PCR yönteminde kullanılan kit ile ilgili genel bilgiler

PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri		
Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
WizPure™	PCR 2X Master	W1401

**Tablo 5.5.** PCR çalışmasında kullanılan mastermix bilgileri

<b>PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri</b>	
<b>MasterMix Bileşenleri</b>	<b>Hacim</b>
PCR 2X MasterMix	12.5 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
Kalıp DNA	2 µl
Su	9.5 µl
TOPLAM	25 µl

**Tablo 5.6.** ACAN genindeki VNTR polimorfizminin analizi için kullanılan primerler

<b>PCR Reaksiyonu İçin Kullanılan Primer Bilgileri</b>	
<b>Primer Adı</b>	<b>Primer Dizisi</b>
ACAN Forward Primer	TAGAGGGCTCTGCCTCTGGAGTTG
ACAN Reverse Primer	AGGTCCCCTACCGCAGAGGTAGAA

**Tablo 5.7.** PCR reaksiyonu döngü koşulları

<b>PCR Reaksiyon Koşulları</b>			
	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Zaman</b>	<b>Devir</b>
İlk Denatürasyon	95	4 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	35
Primerlerin Bağlanması	65	1 dk	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	3 dk	1

### 5.3. Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin analizinde kullanılan yöntemlerden biridir. Agaroz jel elektroforezi jeller ve elektroforez aygıtından oluşmaktadır. Kullanılan jellerden biri agaroz jeldir. Agaroz kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen bir polisakkarittir. Agaroz sıcak tamponda çözünür ve soğuduğunda karşılıklı hidrojen bağlarının bağlanması ile jel yapısı oluşur. Porlu bir yapıda olmasından dolayı DNA'nın hareket etmesini sağlar (Vasi ve ark., 2015).

Agaroz jel elektroforezinde %3'lük agaroz oluşturmak için 0.9 gram agaroz 30 µl 1xTBE Buffer kullanıldı. Berraklaşınca kadar ısıtıldı ve içerisine 3 µl GelGreen Nucleic Acid Gel Stain eklendi. Tanka dökülüp donması sağlandı ve jel içerisindeki kuyulara 10 µl PCR sonucu amplifiye edilen ürünler ve 4 µl DNA ladder yüklendi. 70 voltta 50 dakika yürütüldükten sonra ultraviyole ışık altında görüntüldü.

**Tablo 5.8.** Agaroz Jel Elektroforezi için kullanılan materyal bilgisi

Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Materyal Bilgisi		
GENEDIREX	Agarose Electrophoresis Grade, 100G	SA002-0100
A.B.T	A.B.T.™ TBE Buffer (Tris-borate-EDTA) 10X/1L	B03-10-01
BIOTIUM	GelGreen Nucleic Acid Gel Stain 10,000X in water	41005
GENEALL	GENESTA™ 100 bp DNA Ladder with 5X Loading Dye (500 µl)	GA-010
GENEDIREX	BLOOK LED TRANSİLLUMİNATOR	BK001

Agaroz Jel Elektroforezi aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

1. 0.9 g Agaroz tartıldı ve üzerine 30 µl 1xTBE buffer eklendi.
2. Karışım berraklaşınca dek ısı ile muamele edildikten sonra içerisine 3 µl GelGreen Nucleic Acid Gel Stain eklenip çalkalandı.
3. Donması için tanka döküldü. 16'lı geniş tarak kullanıldı.
4. Donduktan sonra elektrotlara bağlanan jel elektroforezine 10 µl PCR ürünü ve 4 µl DNA Ladder yüklendi.
5. 70 voltta 50 dk yürütüldü.
6. Blook Led Transillüminatör cihazında görüntüldü ve fotoğraflandı.

#### 5.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen bilgiler SPSS programında (versiyon 27.0) analiz edildi. Verilerin normal dağılıp dağılmadığını analiz etmek için Normallik testi yapıldı. Normallik analizindeki bilgilere göre hasta ve kontrol grupları arasındaki önemli farklılıkları karşılaştırmak için Student t testi uygulandı. Yaş, cinsiyet gibi bilgilerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Pearson's ki-kare ( $X^2$ ) testi ve Fisher's exact testi uygulandı. Hardy-Weinberg dengesi ile gruplar arasındaki allel frekansı ve genotip dağılımdaki farklılıkların ölçülmesinde ki-kare ( $X^2$ ) testi kullanıldı. Odds ratio (OR) değerleri ve %95 güven aralığı (%95 CI) Logistic regression ile hesaplandı.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



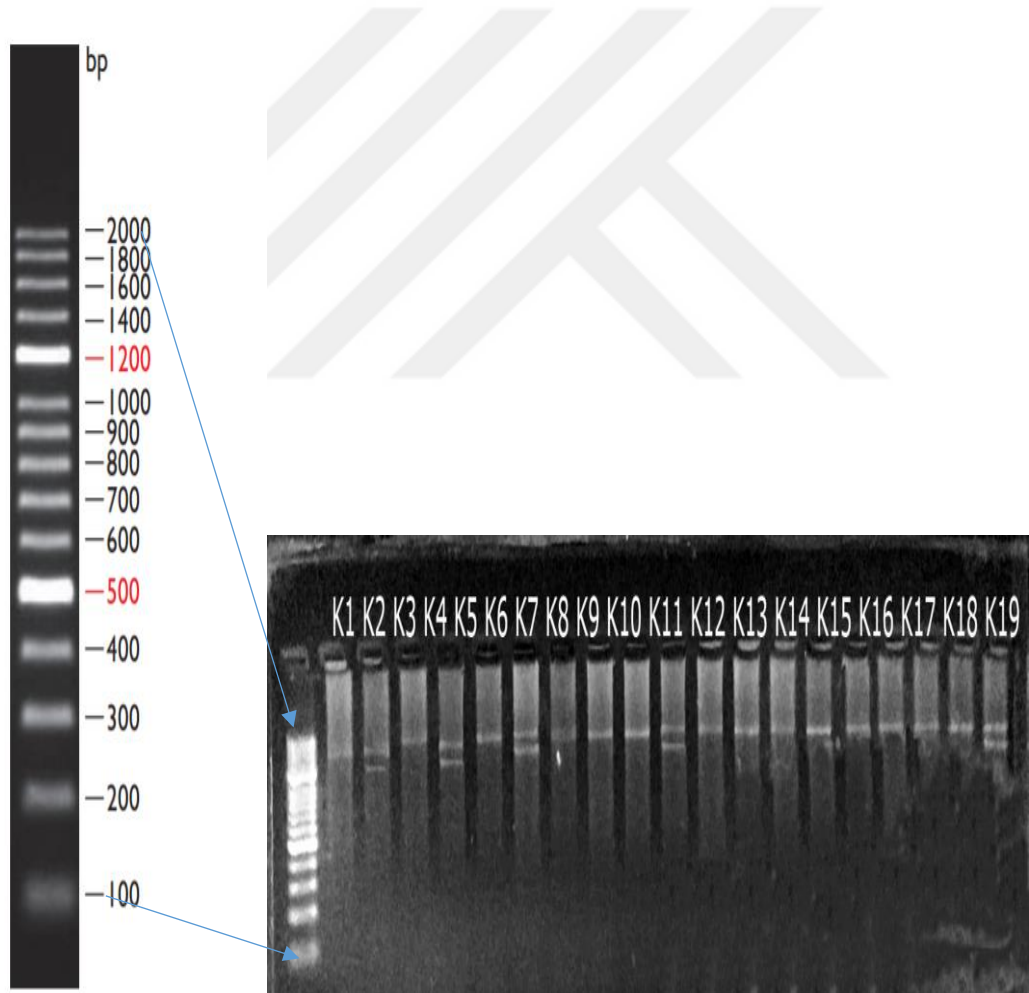


## SONUÇLAR

Çalışmamıza Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırması Hastanesi Nöroloji Polikliniğine gelen 102 Alzheimer hastası, 101 sağlıklı birey olmak üzere toplam 203 gönüllü katılmıştır. Katılımcılardan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu ve PCR analizi yapılmıştır. PCR sonucu amplifiye edilen ürünler %3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir. Görüntülenen örneklerde hasta ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinin büyüklükleri 100 bp DNA ladder ile karşılaştırılarak bulunmuştur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sonucu amplifiye edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrasındaki görüntüleri:

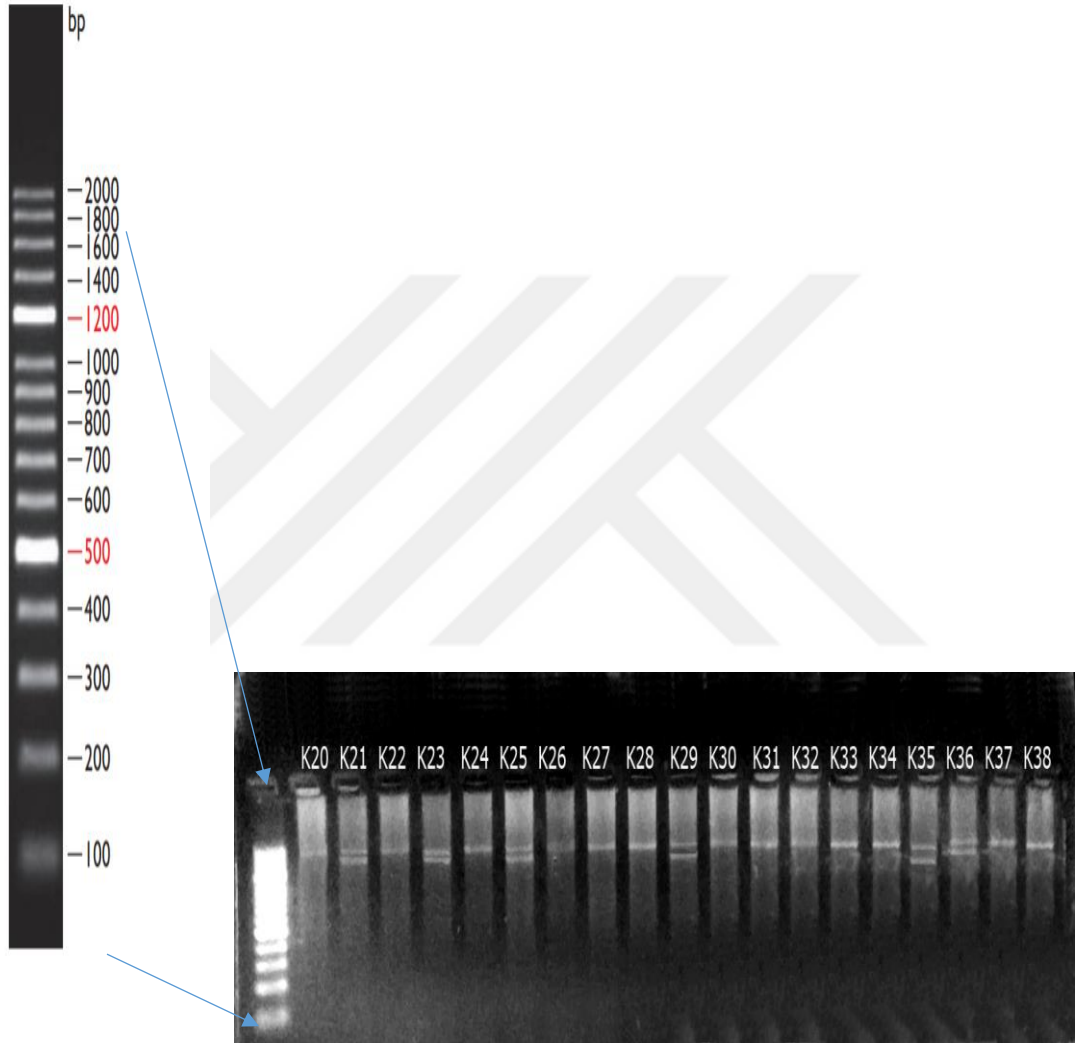
### GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



**Şekil 6.1.** Kontrol grubu; 1-19 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Kontrol 1: 28R/28R, Kontrol 2: 24R/28R, Kontrol 3: 31R/31R, Kontrol 4: 24R/28R, Kontrol 5: 31R/31R, Kontrol 6: 26R/31R, Kontrol 7: 30R/30R, Kontrol 8: 30R/30R, Kontrol 9: 30R/30R, Kontrol 10: 26R/30R, Kontrol 11: 30R/30R, Kontrol 12: 30R/30R, Kontrol 13: 30R/30R,

Kontrol 14: 30R/30R, Kontrol 15: 30R/30R, Kontrol 16: 30R/30R, Kontrol 17: 30R/30R,  
Kontrol 18: 30R/30R, Kontrol 19: 26R/30R. *ACAN* VNTR allelleri; 24R (1402bp), 26R  
(1516bp), 28R (1630bp), 30R (1744bp), 31R (1801bp).

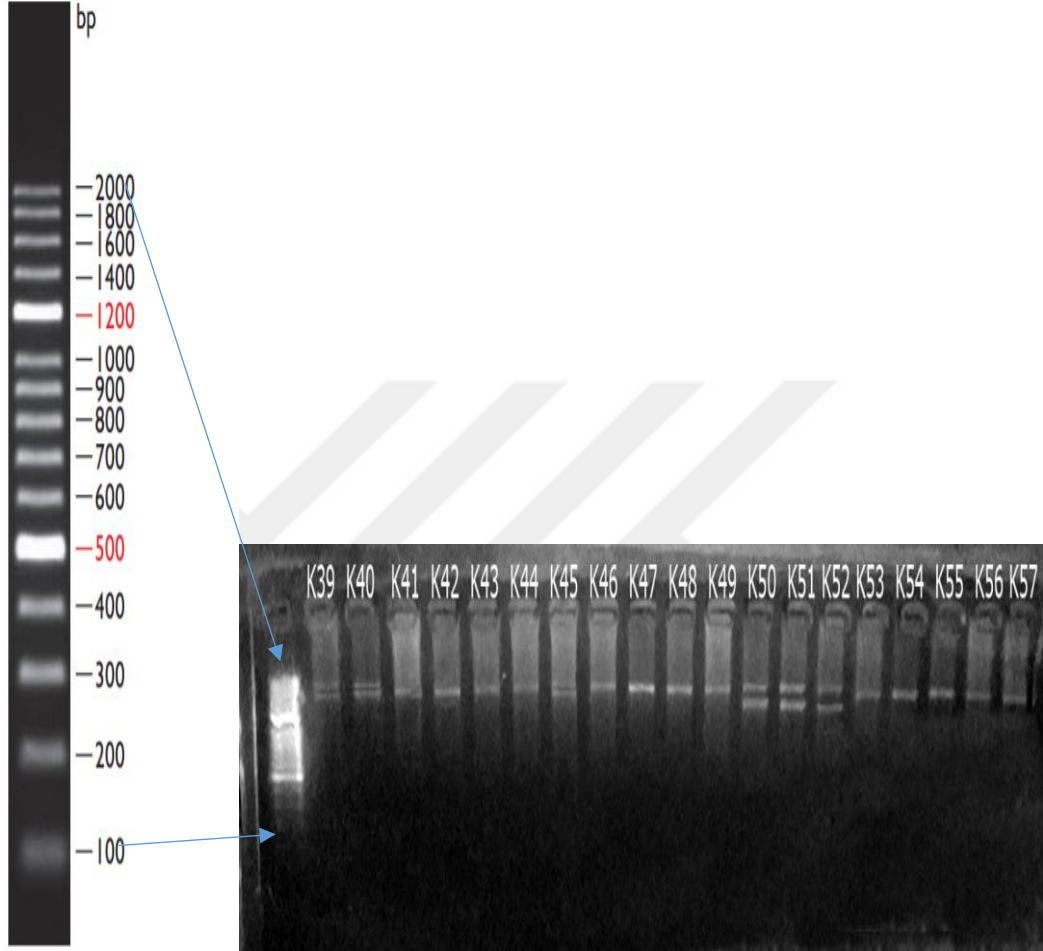
**GENESTA™ 100 bp DNA Ladder**



**Şekil 6.2.** Kontrol grubu; 20-38 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.

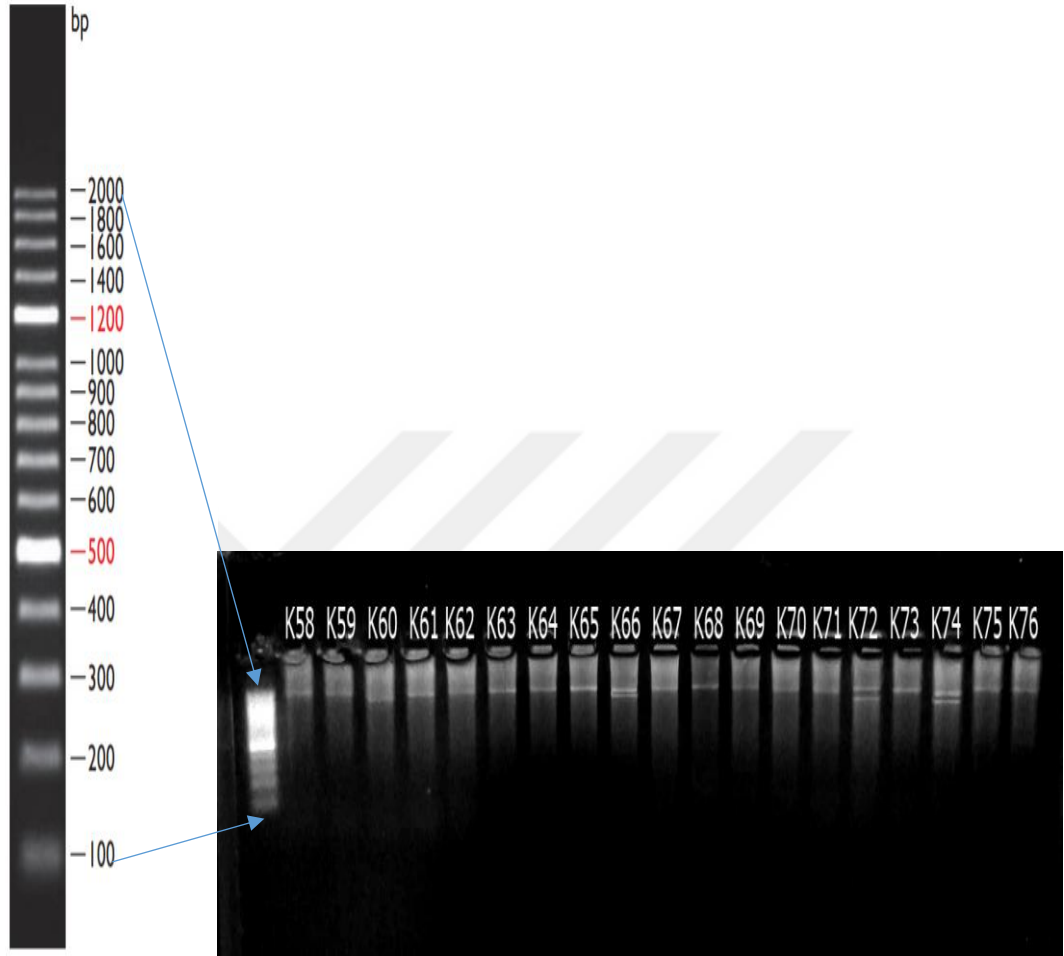
Kontrol 20: 31R/31R, Kontrol 21: 28R/31R, Kontrol 22: 31R/31R, Kontrol 23: 28R/30R,  
Kontrol 24: 31R/31R, Kontrol 25: 26R/31R, Kontrol 26: 31R/31R, Kontrol 27: 31R/31R,  
Kontrol 28: 31R/31R, Kontrol 29: 26R/31R, Kontrol 30: 31R/31R, Kontrol 31: 31R/31R,  
Kontrol 32: 31R/31R, Kontrol 33: 31R/31R, Kontrol 34: 31R/31R, Kontrol 35: 24R/30R,  
Kontrol 36: 28R/31R, Kontrol 37: 31R/31R, Kontrol 38: 30R/30R. *ACAN* VNTR allelleri; 24R  
(1402bp), 26R (1516bp), 28R (1630bp), 30R (1744bp), 31R (1801bp).

### GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



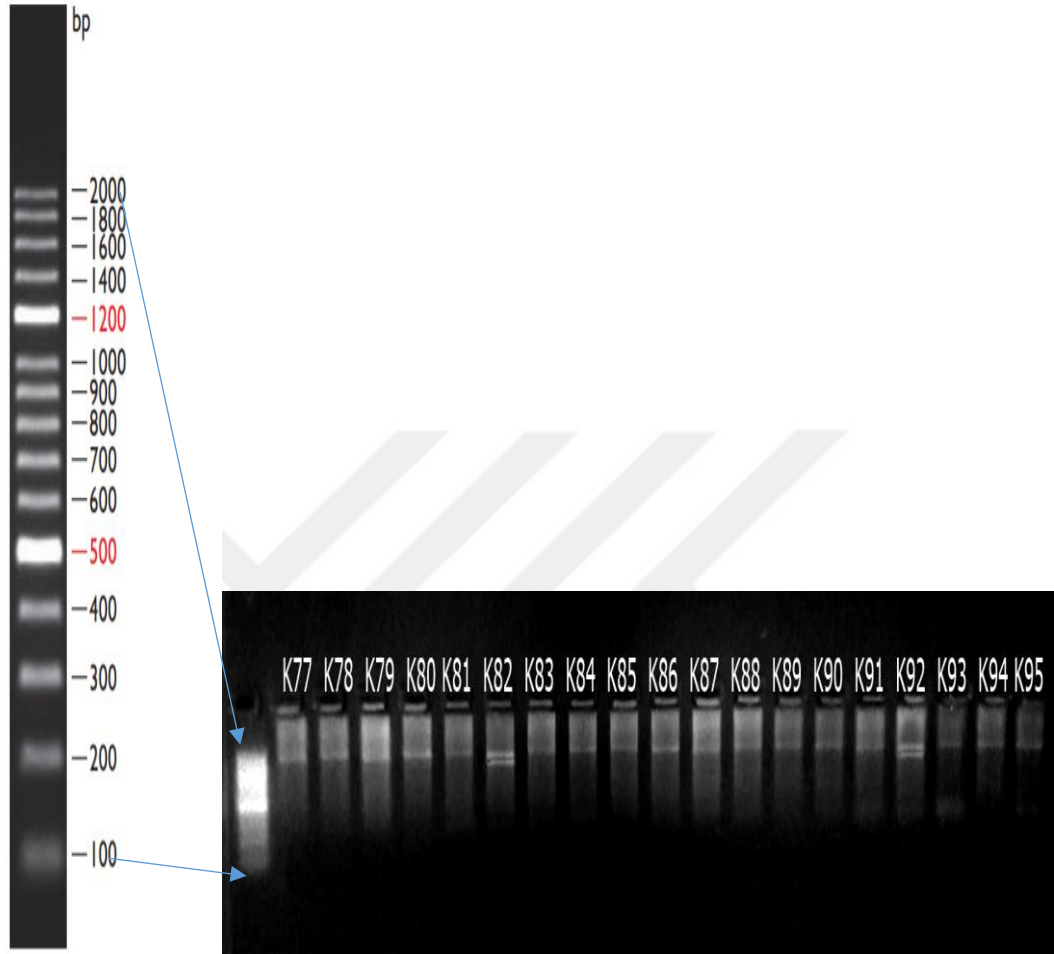
**Şekil 6.3.** Kontrol grubu; 39-57 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Kontrol 39: 28R/30R, Kontrol 40: 28R/30R, Kontrol 41: 28R/28R, Kontrol 42: 28R/28R, Kontrol 43: 28R/28R, Kontrol 44: 28R/28R, Kontrol 45: 26R/30R, Kontrol 46: 28R/28R, Kontrol 47: 28R/28R, Kontrol 48: 28R/28R, Kontrol 49: 28R/28R, Kontrol 50: 24R/30R, Kontrol 51: 24R/30R, Kontrol 52: 24R/30R, Kontrol 53: 28R/28R, Kontrol 54: 28R/28R, Kontrol 55: 28R/28R, Kontrol 56: 28R/28R, Kontrol 57: 28R/28R. *ACAN* VNTR allelleri; 24R (1402bp), 26R (1516bp), 28R (1630bp), 30R (1744bp).

## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



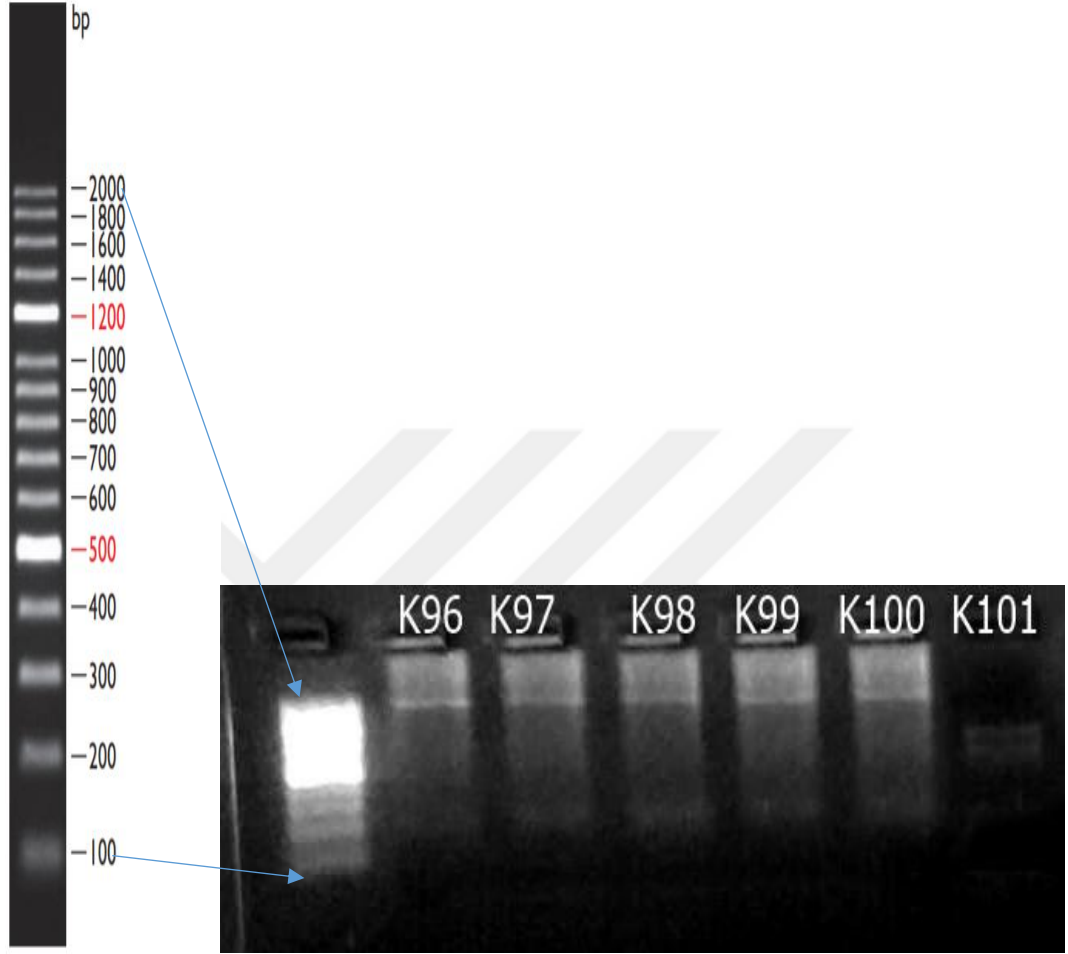
**Şekil 6.4.** Kontrol grubu; 58-76 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Kontrol 58: 33R/33R, Kontrol 59: 33R/33R, Kontrol 60: 31R/31R, Kontrol 61: 33R/33R, Kontrol 62: 33R/33R, Kontrol 63: 33R/33R, Kontrol 64: 33R/33R, Kontrol 65: 33R/33R, Kontrol 66: 31R/33R, Kontrol 67: 33R/33R, Kontrol 68: 33R/33R, Kontrol 69: 33R/33R, Kontrol 70: 33R/33R, Kontrol 71: 33R/33R, Kontrol 72: 30R/33R, Kontrol 73: 33R/33R, Kontrol 74: 30R/31R, Kontrol 75: 33R/33R, Kontrol 76: 33R/33R. *ACAN* VNTR allelleri; 30R (1744bp), 31R (1801bp), 33R (1915bp).

## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



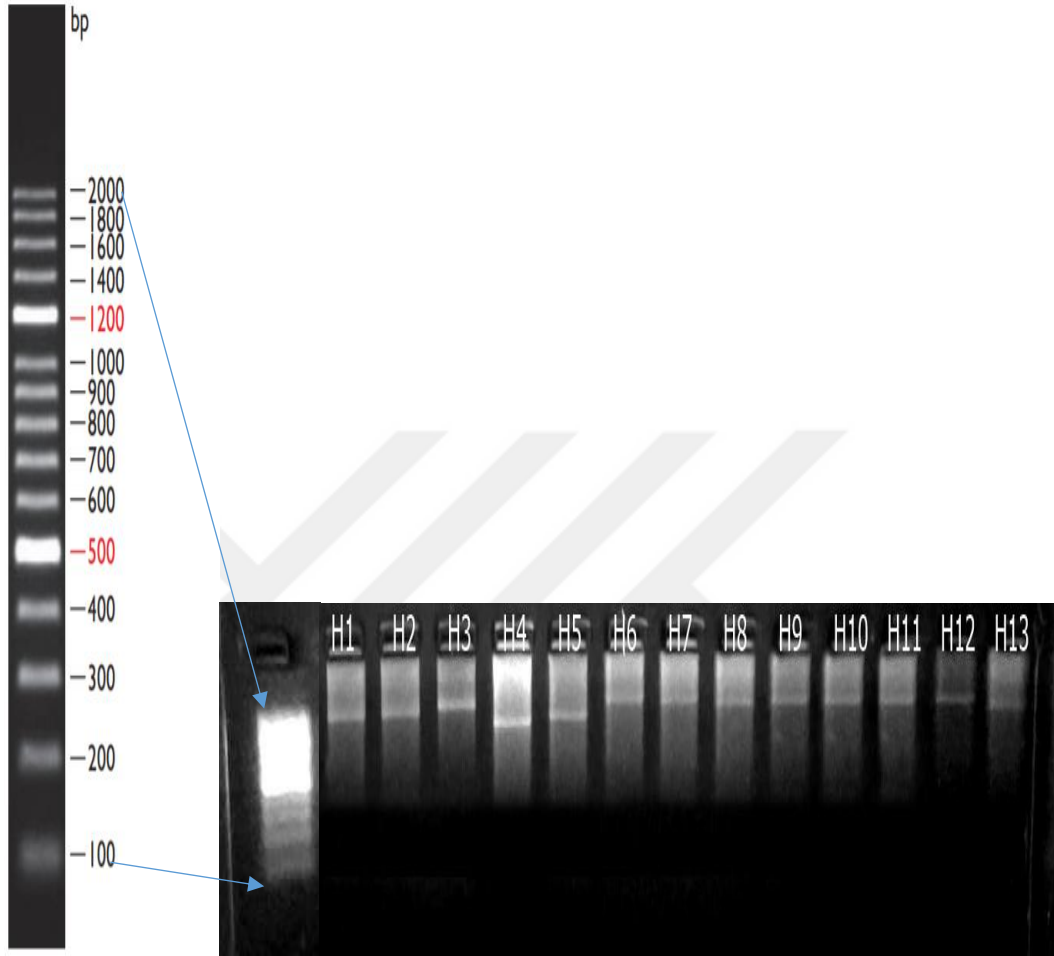
**Şekil 6.5.** Kontrol grubu; 77-95 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Kontrol 77: 33R/33R, Kontrol 78: 33R/33R, Kontrol 79: 31R/31R, Kontrol 80: 33R/33R, Kontrol 81: 33R/33R, Kontrol 82: 30R/33R, Kontrol 83: 33R/33R, Kontrol 84: 33R/33R, Kontrol 85: 33R/33R, Kontrol 86: 33R/33R, Kontrol 87: 33R/33R, Kontrol 88: 33R/33R, Kontrol 89: 33R/33R, Kontrol 90: 33R/33R, Kontrol 91: 33R/33R, Kontrol 92: 31R/33R, Kontrol 93: 33R/33R, Kontrol 94: 33R/33R, Kontrol 95: 33R/33R. *ACAN* VNTR allelleri; 30R (1744bp), 31R (1801bp), 33R (1915bp).

## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



**Şekil 6.6.** Kontrol grubu; 96-101 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Kontrol 96: 33R/33R, Kontrol 97: 33R/33R, Kontrol 98: 33R/33R, Kontrol 99: 33R/33R, Kontrol 100: 33R/33R, Kontrol 101: 24R/26R. *ACAN* VNTR allelleri; 24R (1402bp), 26R (1516bp), 33R (1915bp).

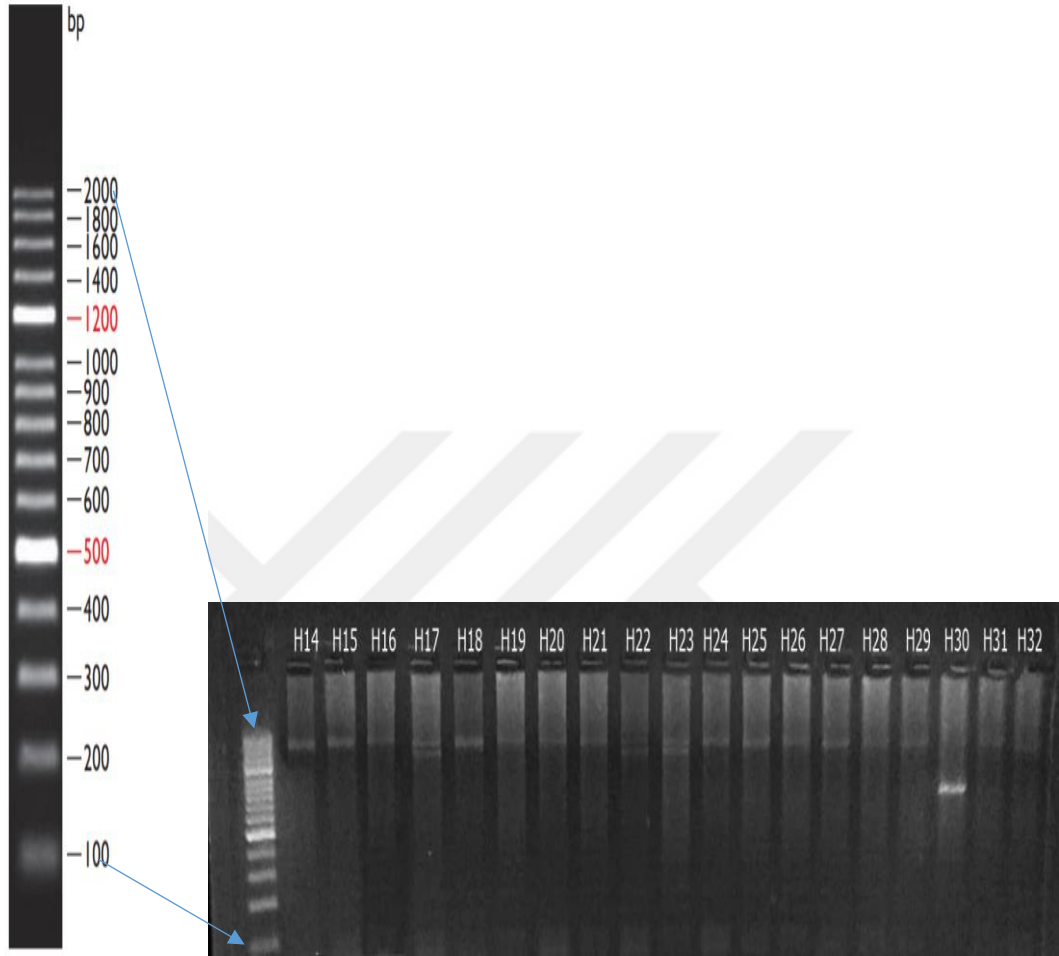
GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



**Şekil 6.7.** Hasta grubu; 1-13 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.

Hasta 1: 30R/30R, Hasta 2: 30R/30R, Hasta 3: 31R/31R, Hasta 4: 28R/28R, Hasta 5: 30R/30R, Hasta 6: 33R/33R, Hasta 7: 33R/33R, Hasta 8: 33R/33R, Hasta 9: 33R/33R, Hasta 10: 33R/33R, Hasta 11: 33R/33R, Hasta 12: 33R/33R, Hasta 13: 31R/31R. *ACAN* VNTR allelleri; 28R (1630bp), 30R (1744bp), 31R (1801bp), 33R (1915bp).

## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



**Şekil 6.8.** Hasta grubu; 14-32 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Hasta 14: 31R/31R, Hasta 15: 31R/31R, Hasta 16: 31R/31R, Hasta 17: 28R/30R, Hasta 18: 30R/30R, Hasta 19: 30R/30R, Hasta 20: 30R/30R, Hasta 21: 30R/30R, Hasta 22: 28R/30R, Hasta 23: 28R/30R, Hasta 24: 30R/30R, Hasta 25: 30R/30R, Hasta 26: 30R/30R, Hasta 27: 30R/30R, Hasta 28: 30R/30R, Hasta 29: 30R/30R, Hasta 30: 13R/13R, Hasta 31: 30R/30R, Hasta 32: 30R/30R. *ACAN* VNTR allelleri; 13R (775bp), 28R (1630bp), 30R (1744bp), 31R (1801bp).

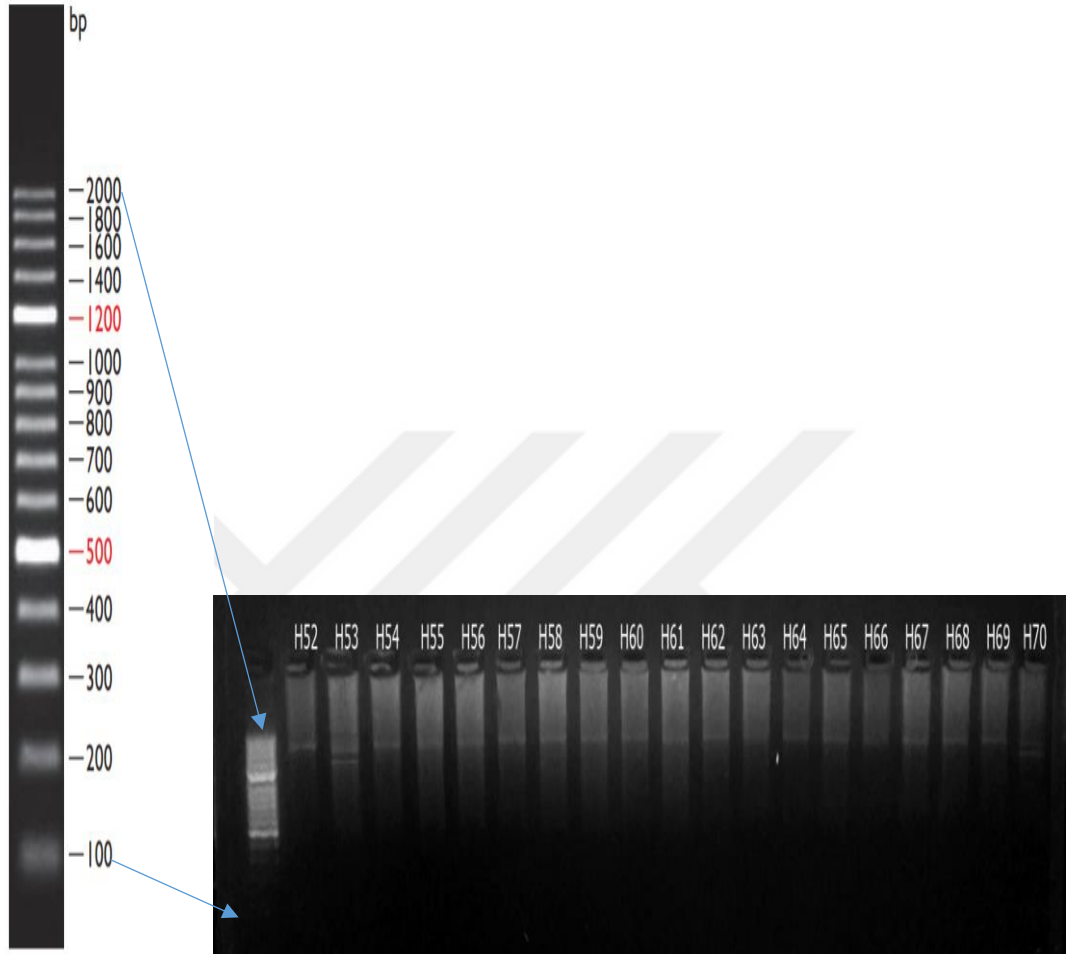


## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



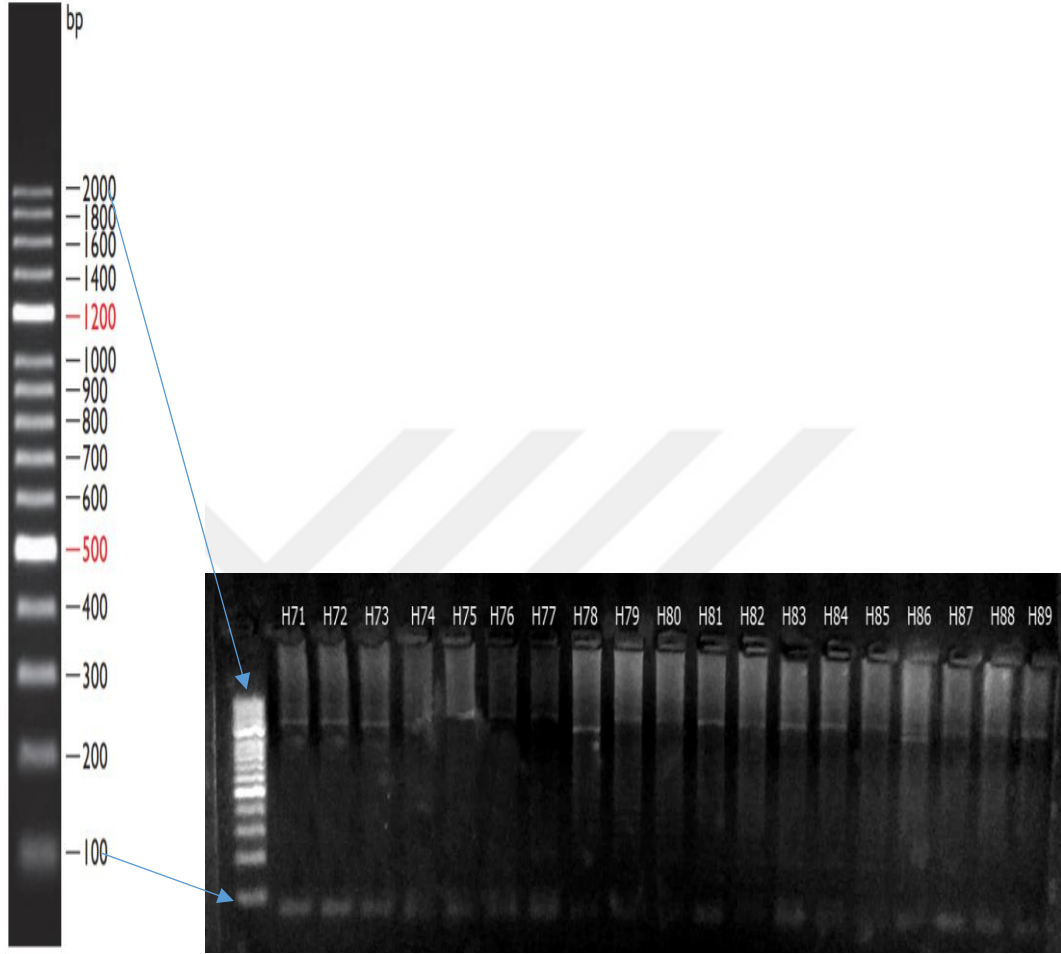
**Şekil 6.9.** Hasta grubu; 33-51 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Hasta 33: 30R/30R, Hasta 34: 30R/30R, Hasta 35: 26R/30R, Hasta 36: 30R/30R, Hasta 37: 30R/30R, Hasta 38: 30R/30R, Hasta 39: 30R/30R, Hasta 40: 28R/28R, Hasta 41: 30R/30R, Hasta 42: 30R/30R, Hasta 43: 30R/30R, Hasta 44: 30R/30R, Hasta 45: 30R/30R, Hasta 46: 30R/30R, Hasta 47: 28R/28R, Hasta 48: 28R/28R, Hasta 49: 30R/30R, Hasta 50: 30R/30R, Hasta 51: 30R/30R. *ACAN* VNTR allelleri; 26R (1516bp), 28R (1630bp), 30R (1744bp).

## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



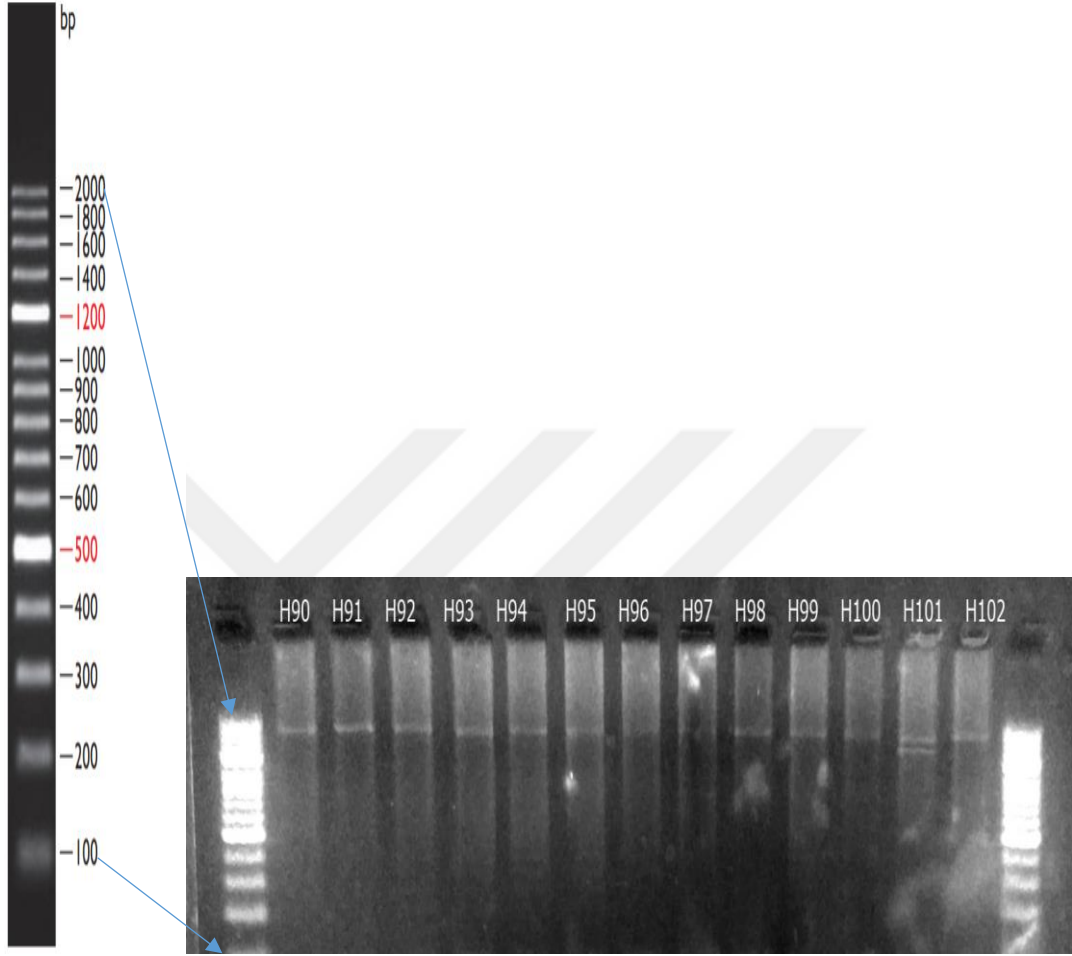
**Şekil 6.10.** Hasta grubu; 52-70 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Hasta 52: 31R/31R, Hasta 53: 26R/30R, Hasta 54: 31R/31R, Hasta 55: 31R/31R, Hasta 56: 31R/31R, Hasta 57: 31R/31R, Hasta 58: 31R/31R, Hasta 59: 31R/31R, Hasta 60: 31R/31R, Hasta 61: 31R/31R, Hasta 62: 33R/33R, Hasta 63: 33R/33R, Hasta 64: 33R/33R, Hasta 65: 31R/31R, Hasta 66: 31R/31R, Hasta 67: 31R/31R, Hasta 68: 31R/31R, Hasta 69: 31R/31R, Hasta 70: 30R/31R. *ACAN* VNTR allelleri; 26R (1516bp), 30R (1744bp), 31R (1801bp), 33R (1915bp).

## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



**Şekil 6.11.** Hasta grubu; 71-89 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Hasta 71: 24R/24R, Hasta 72: 24R/24R, Hasta 73: 24R/24R, Hasta 74: 24R/24R, Hasta 75: 28R/28R, Hasta 76: 28R/28R, Hasta 77: 28R/28R, Hasta 78: 21R/21R, Hasta 79: 24R/24R, Hasta 80: 24R/24R, Hasta 81: 24R/24R, Hasta 82: 24R/24R, Hasta 83: 24R/24R, Hasta 84: 26R/26R, Hasta 85: 26R/26R, Hasta 86: 23R/26R, Hasta 87: 26R/26R, Hasta 88: 26R/26R, Hasta 89: 26R/26R. *ACAN* VNTR allelleri; 21R (1231bp), 23R (1345bp), 24R (1402bp), 26R (1516bp), 28R (1630bp).

## GENESTA™ 100 bp DNA Ladder



**Şekil 6.12.** Hasta grubu; 90-102 bireylerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri. Hasta 90: 31R/31R, Hasta 91: 31R/31R, Hasta 92: 31R/31R, Hasta 93: 30R/30R, Hasta 94: 31R/31R, Hasta 95: 31R/31R, Hasta 96: 31R/31R, Hasta 97: 31R/31R, Hasta 98: 31R/31R, Hasta 99: 31R/31R, Hasta 100: 31R/31R, Hasta 101: 28R/30R, Hasta 102: 31R/31R. *ACAN* VNTR allelleri; 28R (1630bp), 30R (1744bp), 31R (1801bp).

### İstatistiksel Analiz Sonuçları

Çalışmamıza hasta grubundan 102, kontrol grubundan 101 olmak üzere toplam 203 gönüllü katıldı. Hasta grubundaki bireylerin 54'ünü (%52,94) kadın, 48'ini (%47,05) erkek, kontrol grubundaki bireylerin 52'sini (%51,48) kadın, 49'unu (%48,51) erkek bireyler oluşturmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarında yaş karşılaştırması için bağımsız gruplarda t testi kullanıldı ve  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve t testine göre hasta

ve kontrol grupları arasında yaş için  $p < 0.001$  olarak bulundu. Yaş için hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Tablo 6.1.).

**Tablo 6.1.** Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarının yaş karşılaştırması

Çalışma Grupları	Yaş	P değeri
	ort±ss	
Hasta	78,69±7.64	<0.001
Kontrol	72,77±9.58	
Total	75.74±9.13	

Çalışma grupları (hasta ve kontrol) ve cinsiyet bakımından kategorik iki değişken arasındaki ilişkinin araştırılması için Pearson's ki kare ( $X^2$ ) testi uygulandı ve  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Test sonucunda  $p = 0.835$  değeri elde edildi ve iki değişken arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 6.2.).

**Tablo 6.2.** Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin cinsiyet karşılaştırması

Çalışma Grupları	Cinsiyet		P değeri
	Kadın	Erkek	
Hasta	54 %52,94	48 %47,05	0,835
Kontrol	52 %51,48	49 %48,51	
Total	%52,20	%47,8	

**Tablo 6.3.** Hasta ve kontrol gruplarında tek değişkenli logistic regression analizi

	B	P değeri	OR	%95 Güven Aralığı	
				Aşağı Seviye	Yukarı Seviye
<b>Cinsiyet</b>	0,058	0,836	1,060	0,611	1,839
<b>Yaş</b>	-0,080	<b>&lt;0.001</b>	0,923	0,890	0,957
<b>Polimorfizm</b>	-0,577	<b>0,042</b>	0,562	0,322	0,981

**Tablo 6.4.** Hasta ve kontrol gruplarında çok değişkenli logistic regression analizi

	B	P değeri	OR	%95 Güven Aralığı	
				Aşağı Seviye	Yukarı Seviye
<b>Cinsiyet</b>	-0,065	0,830	0,937	0,517	1,697
<b>Yaş</b>	0,087	<b>&lt;0.001</b>	1,091	1,051	1,133
<b>Polimorfizm</b>	0,789	<b>0,011</b>	2,202	1,198	4,048

Hasta ve kontrol grupları arasındaki risk faktörünü belirlemek için Odds ratio (OR) ve %95 güven aralığı (95% Confidence Interval) kullanıldı. Gruplar arasındaki risk faktörünü belirlemek için Logistic Regression testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çok değişkenli analize geçmeden önce ilk aşamada iki durumlu iki bağımsız değişken ile her bir bağımsız değişken için ayrı ayrı yapılan tek değişkenli Logistic Regression analizine bakıldı. Tek değişkenli Logistic Regression testinde cinsiyet için  $p=0.899$ ; yaş için  $p=0.001$ ; polimorfizm için  $p=0.042$  olarak bulundu. Polimorfizm ve yaş için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken, cinsiyet için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 6.3.). Çok değişkenli Logistic Regression testinde cinsiyet için  $p=0.830$ ; yaş için  $p=0.001$ ; polimorfizm için  $p=0.011$  olarak bulundu. Polimorfizm ve yaş için tek değişkenli Logistic Regression testinde olduğu gibi anlamlı bir fark bulunurken, cinsiyet için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 6.4.).

**Tablo 6.5.** Hasta ve kontrol gruplarında Agrekan VNTR bölgesindeki allel dağılımının karşılaştırılması

Polimorfizm	Çalışma Grupları		P değeri
	Hasta	Kontrol	
<b>İki allel &gt;30 tekrar*</b>	40 %42,6	54 %57,4	0,042
<b>Bir ya da iki allel ≤30 tekrar**</b>	62 %56,9	47 %43,1	
<b>Total</b>	50,20%	49,80%	

\* İki allel >30 tekrar= 30'dan büyük iki allel taşıyanlar

\*\* Bir ya da iki allel ≤30 tekrar= 30'dan küçük ve 30, bir ya da iki allel taşıyanlar

Hasta ve kontrol gruplarında allel dağılımının karşılaştırılması için ki-kare ( $X^2$ ) testi kullanıldı ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Test sonucunda  $p = 0.042$  olarak bulundu. Hasta grubunda bir veya iki allel 30 ve 30'dan küçük allel taşıyanlar kontrol grubuna göre daha fazla iken iki allel 30'dan büyük allel taşıyanlar kontrol grubunda daha fazladır. (Tablo 6.5.). Hasta ve kontrol grubunda en fazla tekrar eden alleller büyük alleller (30R, 31R, 33R) olmuştur. Hasta grubunda 30R ve 31R daha fazla iken kontrol grubunda 33R alleli daha fazla görülmüştür. Bu sebeple 30'un üzerinde ve altında bir ya da iki allel taşıyanlar hastalık açısından değerlendirilmiştir.

Hardy-Weinberg dengesi ile genotip ve allel tutarlılığı için ki kare ( $X^2$ ) testi kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Test sonucunda  $p = 0.000$  olarak bulundu. Allel frekansının değerlendirilmesi için gen sayma (gene counting) yöntemi kullanıldı. Hasta grubundaki bireylerde en fazla tekrar eden alleller 30R ve 31R, kontrol grubunda en fazla tekrar eden allel 33R olarak bulundu. Hasta grubunda 30R/30R ve 31R/31R genotipleri daha sık görülürken kontrol grubunda 33R/33R genotipi daha sık görülmektedir (Tablo 6.6.).

**Tablo 6.6.** Hasta ve kontrol gruplarında allel ve genotip karşılaştırması

Genotip	Hasta Grubu (102)		Kontrol Grubu (101)		P değeri
	n (birey sayısı)	%	n (birey sayısı)	%	
13R/13R	1	1.0	0	0.0	0.000
21R/21R	1	1.0	0	0.0	
23R/26R	1	1.0	0	0.0	
24R/24R	9	8.8	0	0.0	
24R/26R	0	0.0	1	1.0	
24R/28R	0	0.0	2	2.0	
24R/30R	0	0.0	4	4.0	
26R/26R	5	4.9	0	0.0	
26R/30R	2	2.0	3	3.0	
26R/31R	0	0.0	3	3.0	
28R/28R	7	6.9	14	13.9	
28R/30R	4	3.9	3	3.0	
28R/31R	0	0.0	2	2.0	
30R/30R	31	30.4	12	11.9	
30R/31R	1	1.0	1	1.0	
30R/33R	0	0.0	2	2.0	
31R/31R	30	29.4	16	15.8	
31R/33R	0	0.0	2	2.0	
33R/33R	10	23.1	36	35.6	
<b>Allel</b>					
13R	2	2.0	0	0.0	-
21R	2	2.0	0	0.0	
23R	1	1.0	0	0.0	
24R	18	17.8	7	6.9	
26R	13	12.9	7	6.9	
28R	18	17.8	35	34.3	
30R	69	68.3	37	36.3	
31R	61	60.4	40	39.2	
33R	20	19.8	76	74.5	



## SONUÇ VE ÖNERİLER

Alzheimer hastalığı demansın en yaygın nedenlerinden olup hafıza kaybı, dil, düşünme ve problem çözme becerilerinde kayıp ile ortaya çıkan nörodejeneratif bir hastalıktır (Khan ve ark., 2020). Alzheimer hastalığının semptomlarının ortaya çıkmasından yıllar önce başladığı düşünülmektedir. Sinsi ve ilerleyici özellikte olan Alzheimer, beyindeki nöronları etkileyerek nöronların dejenere olmasına neden olmaktadır. Beyinde meydana gelen bu hasarlar sonucunda kişide hafıza, dil, düşünme ve motor beceriler ile ilgili bölgeler etkilenir ve ilerleyen zamanlarda kişi yatağa bağımlı hale gelir (2021 Alzheimer's Disease Facts and Figures, 2021: 327-406). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2013 yılında ortaya koyduğu verilere göre 2050 yılında dünya çapında Alzheimer hasta sayısının 3 katına çıkması beklenmektedir (Khan ve ark., 2020). Hasta sayısı ile birlikte hastalık hizmetleri için doğrudan ve dolaylı olarak harcanan maliyet de artmaktadır. Alzheimer hastalığı ile ilgili sağlık hizmetlerinin yıllık maliyetinin yaklaşık 500 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Weller ve Budson, 2018). Alzheimer hastalığının patolojisinde amiloid plaklar ve nörofibril yumaklar etkili olmaktadır. 21. kromozomun uzun kolunda bulunan *APP* geni tarafından kodlanan amiloid prekürsör proteininin kesimi sonucu oluşan amiloid plaklar beyinde birikerek nöronların dejenere olmasına neden olmaktadır (Mantzavinos ve Alexiou, 2017; Kao ve ark., 2019). Tau proteininin hiperfosforilasyonu sonucu oluşan nörofibril yumaklar da nöronlar etrafında birikerek hücre ölümüne yol açar ve nörofibril yumakların aşırı birikimi Alzheimer hastalığında rol oynar (Liu ve ark., 2015). Alzheimer hastalığının kesin tanısı postmortem beyin dokusu incelenerek konulabilmektedir. Beyin omurilik sıvısı (BOS), kan biyobelirteçleri ile manyetik rezonans (MRI) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) görüntüleme teknikleri gibi hastalığın teşhisine yardımcı yöntemler kullanılmaktadır (Weller ve Budson, 2018). Alzheimer hastalığının sinsi bir şekilde seyretmesi erken tanıyı zorlaştırmaktadır. Hastalığın kesin tanısı için gerekli olan nöron kaybı, granülovakuolar dejenerasyon, Lewy cisimcikleri gibi özelliklerinin ölümünden önce ölçülmesi zordur. Alzheimer hastalığının klinik öncesi teşhisinde biyobelirteçler önemli bir yer tutmaktadır. Bundan dolayı hastalığın tanı ve tedavisinin daha iyi anlaşılması için hastalıkla ilişkili biyobelirteçlerin araştırılması gerekmektedir (Hane ve ark., 2017). Bu çalışmada Alzheimer hastalığına neden olabileceğini düşündüğümüz *ACAN* geni VNTR polimorfizminin hastalıkla ilişkisi araştırılmıştır.

*ACAN* geninde değişken sayıda tekrar (VNTR) polimorfizmi bulunur ve 13 ila 33 arasında değişen allellere sahiptir (Gu ve ark, 2013). Agrekan geninin farklı allelleri, çeşitli sayıda kondroitin sülfat zincirinin proteoglikanlara bağlanmasını sağlar ve bu durum agrekan proteininin özelliklerini değiştirmektedir. Agrekan proteininin özelliklerinin değişmesi kırıkdağın yapısını değiştirerek dejenerasyonlara sebep olmaktadır. *ACAN* geninde bulunan VNTR polimorfizmi çeşitli disk dejenerasyonları ile ilişkilendirilmektedir. Farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar ile VNTR polimorfizmi ile disk dejenerasyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Çalışmalarda disk dejenerasyonu bulunan hastalarda genellikle allel 26, 27 ve 28'in daha çok tekrar ettiği görülmektedir (Solovieva ve ark., 2007).

Yapılan bazı çalışmalarda daha kısa allellerin de çeşitli disk dejenerasyonuna neden olan hasta bireylerde daha çok tekrar ettiği gösterilmiştir (Cong ve ark., 2014; Casa ve ark., 2016). İntervertebral disk dejenerasyonu ve Lumber disk dejenerasyonu olan hastalarda kısa alleller (13-25) ile ortak allellerin (26-27) hasta bireylerde kontrol bireylere kıyasla daha fazla görülmesi, bu allellerin agrekan fonksiyonunun bozulmasına neden olduğunu ve disk yapısını bozduğunu göstermektedir (Casa ve ark., 2016; Gu ve ark., 2013). Çünkü daha düşük tekrar sayısına sahip bireylerde proteoglikanlara bağlı düşük kontroitin sülfat sayısına sahip agrekan proteini bulunmaktadır. Elde edilen verilerden yola çıkarak kısa allellere sahip bireylerin disk dejenerasyonu geliştirme riskinin daha fazla olduğu ve hastalığı daha şiddetli geçirdikleri görülmektedir (Casa ve ark., 2016). Çalışmamızda Alzheimer hastalığı ile *ACAN* geni VNTR polimorfizmi arasındaki ilişkisi araştırıldı ve aralarında anlamlı bir ilişki bulundu ( $p=0.000$ ). 30R, 31R ve 33R allelleri en çok tekrar eden alleller oldu. Hasta grubunda 30R ve 31R daha fazla tekrar ederken, kontrol grubunda 33R daha fazla tekrar eden allel oldu. Daha kısa alleller de (13R, 21R, 23R, 24R) çalışmamızdaki hasta grubunda daha fazla görülmektedir.

Agrekan proteini sadece kıkırdak da değil beyinde de pek çok yerde eksprese edilmektedir. Bunların başında proksimal dendrit alanları, nöronların başlangıç segmentleri ve hücre dışı matris (ECM) gelmektedir (Morawski ve ark., 2012). Beyin hücre dışı matrisi hücreler için önemli işlevlere sahiptir. Beyin plastisitesi, hasar yanıtı gibi hücrenin hayatta kalması için mikro bir ortam sağlamaktadır (Dauth ve ark., 2016). ECM içerisinde perinöral ağ (PN) olarak adlandırılan özel bir yapı bulunmaktadır. PN'ler içerisinde tenasinler, hyaluronan, proteoglikanlar ve bağlantı proteinleri gibi özel bileşenler bulunmaktadır. Proteoglikanlar içerisinde özellikle agrekan proteini önemli bir yer tutmaktadır. PN'lerin yapı bütünlüğü için önemli olan agrekan, nöronların yüksek hızlı sinaptik iletimini sağlamak, oksidatif stresi azaltmak, sinaptik plastisitenin stabilizasyonu gibi nöroprotektif işlevleri gerçekleştirmektedir (Suttkus ve ark., 2012; Morawski ve ark., 2012).

Agrekan proteini beyinde önemli düzeylerde eksprese edilmektedir. Yapılan çalışmalar beyinde agrekan proteininin nöronlar için ve ECM stabilizasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar agrekan bazlı PN'lerde agrekan eksikliğinin PN'lerin nöroprotektif özelliklerini kaybetmesine neden olduğunu göstermektedir (Suttkus ve ark., 2014). PN'lerin nöroprotektif etkisi nöronları amiloid plaklar ve tau patolojisine karşı korumasından kaynaklanmaktadır. PN kaplı nöronların amiloid ve tau patolojisinden daha az etkilendiği ve hücre ölümünün daha az gerçekleştiği hem insan postmortem hem de hayvan çalışmalarında görülmektedir (Schmidt ve ark., 2020). PN bileşenlerinin PN'ler için nasıl önemli olduğu ve PN yapıların kurulmasında ne gibi etkileri olduğu hayvan modelleri ile araştırılmaktadır. Yapısında bulunan tenasin, hyaluronan ve proteoglikanlar PN yapımında önemli bir yere sahiptir. Çalışmalar agrekanın diğer proteoglikanlardan daha fazla gerekli olduğunu göstermektedir. Agrekan PN'lerin güçlü polianyonik yapı kazanmasını sağlar ve bu sayede demiri bağlayarak oksidatif stresin azalmasına yardımcı olur. Hem oksidatif stres hem de amiloid ve tau birikimi Alzheimer

hastalığının patogeneğinde yer alan patolojik durumlardır. Nöronların dejenere olmasına neden olan bu durumlar PN yapıları ile azalmakta ve PN'ler oksidatif strese, tau ve amiloid birikimine karşı koruyucu etkisi ile ECM içerisinde stabil bir ortam sağlamaktadır (Suttkus ve ark., 2012; Schmidt ve ark., 2020).

Alzheimer hastalığı birden fazla mekanizmanın etki ettiği multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalığın asıl nedeni olarak beyinde amiloid plakların ve nörofibril yumakların birikmesi gösterilmektedir. Alzheimer patolojisinde yer alan amiloid plaklar amiloid betanın proteolitik yıkımı sonucu oluşur. Amiloid beta  $\alpha$  sekretaz enzimi ile kesildikten sonra tekrar  $\gamma$  sekretaz enzimi ile kesilerek zararsız olan p3 plakları ortaya çıkar. Amiloid beta  $\beta$  sekretaz ve ardından  $\gamma$  sekretaz enzimi ile kesilirse Ap40 ve Ap42 plaklarını oluşturur (Çiftçi, 2011). Oluşan bu plaklar nöronların etrafında birikme yaparak hücre ölümüne neden olmaktadır. PN kaplı nöronlar oluşan zararlı amiloid plaklar tarafından sarılmaya karşı dirençli hale gelmektedir. Çalışmalar PN kaplı nöronların PN kaplı olmayan nöronlara göre amiloid patolojisinden daha az zarar gördüğünü ortaya koymaktadır (Miyata ve ark., 2007).

Alzheimer patolojinde yer alan bir diğer faktör de tau birikimidir. Tau'nun anormal hiperfosforilasyonu nörofibril yumaklar halinde birikmesine neden olur. Yine çalışmalar göstermektedir ki PN kaplı nöronlar nörofibril yumaklardan daha az etkilenmektedir. Fare modellerinde yapılan çalışmalar, agrekan bazlı PN'lerin güçlü bir anyonik yapıya sahip olması ile tau proteinin birikmesini ve nöronların etrafını sarmasını engellediğini göstermektedir. PN yapısında bulunan agrekan hem PN yapılarının koruyucu etkiye sahip olmasını sağlar hem de tau proteinin fosforilasyonunu ve ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalarda yer alır (Schmidt ve ark., 2020).

Cattaud ve arkadaşlarının fare modeli üzerinde yaptığı çalışma parvalbumin (PV) nöronlarını saran PN'lerin PV hücrelerini oksidatif strese karşı koruduğunu göstermiştir. Çalışmada PN'lerdeki bir azalmanın PV hücrelerinin de azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Bu durumda düşük nöronal aktiviteye neden olduğu sonucuna varılmaktadır (Cattaud ve ark., 2018). PV hücrelerinin kaybının amiloid plakların ve nörofibril yumakların artması ile ilişkili olduğu görülmektedir. Yapılan çeşitli çalışma sonuçlarından yola çıkarak Alzheimer patolojisi düşük yoğunluklu PV nöronları ile ilişkilendirilmiştir (Ali ve ark., 2019).

Literatürde Alzheimer hastalığı ile *ACAN* genindeki VNTR polimorfizmi ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki çalışmalar Alzheimer hastalığı ve PN'ler arasındaki ilişkinin araştırılmasına yöneliktir. PN yapısına katılan agrekanın PN'ler için önemli olduğu yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir. Bu çalışmada *ACAN* geninde bulunan VNTR polimorfizminin agrekan proteininin ekspresyonunu etkilemesinden yola çıkarak PN'lerin yapı bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir. *ACAN* geni VNTR polimorfizmi ile ilgili yapılan çalışmalar disk dejenerasyonları ile ilişkilendirmiştir. Disk dejenerasyonu olan kişilerde 26R, 27R ve 28R allelleri daha sık görülürken kısa allel (13R-25R) görülen kişilerin hastalığının daha ağır seyrettiğini ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmamızda 30R, 31R ve 33R allelleri daha fazla görülmüştür. Bu allellerden 30R ve 31R hasta grubundaki bireylerde daha sık görülürken 33R alleli sağlıklı bireylerde daha sık görülmektedir. Özellikle hasta grubunda iki allel 30R ve 31R bulunma durumu, kontrol grubu bireylerde ise yine iki allel 33R bulunma durumu, her iki grupta tek allel 30R, 31R ve 33R bulunma durumundan daha fazla görülmektedir. Yaptığımız çalışmadan elde edilen verilerle *ACAN* geninde bulunan VNTR polimorfizminde 30R ve 31R allelleri Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilebilir. Bu çalışmadan yola çıkarak tek allel 30R ve 31R bulundurma durumunda Alzheimer hastalığı ile doğrudan bir ilişki kurulamaz. Ancak homozigot 30R/30R ve homozigot 31R/31R genotiplerinin olmasını Alzheimer hastalığı riski ile ilişkilendirebiliriz. Disk dejenerasyonlarında görülen kısa allellerin aksine Alzheimer hastalığında uzun allellerin hastalık ile ilişkisi bulunabilir. Yaptığımız çalışmada ayrıca hasta grubunda kısa alleller daha fazla görülmüştür. 30'dan küçük bir veya iki allele sahip olmak 30'dan büyük allele sahip olmaya göre hastalık riskini 2,202 kat artırmaktadır. Cong ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda kısa alleller disk dejenerasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Cong ve ark., 2014). Aynı şekilde Casa, Gu ve arkadaşlarının çalışmalarında da hasta grubunda kısa alleller daha fazla görülmektedir (Gu ve ark., 2013; Casa ve ark., 2016). Çalışmamızda 30R ve 31R allelleri hasta grubunda daha fazla görülmesine rağmen kısa alleller de hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla görülmektedir. Bu çalışmalardan yola çıkarak disk dejenerasyonu olan hastaların Alzheimer hastalığına yakalanma riski söz konusu olabilir. Disk dejenerasyonu ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi için detaylı ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İstatistiksel olarak Alzheimer hastalığı ve VNTR polimorfizmi arasında anlamlı bir fark bulunmasına rağmen kesin olarak ilişkilendirmek için eldeki veriler yetersizdir ve daha fazla çalışma gerektirmektedir. Alzheimer hastalığının genetik mekanizması hala tam olarak belirlenememiştir. Bu yüzden hastalığın genetik mekanizmasına dair aydınlatıcı çalışmalara ihtiyaç vardır. Böylece hastalığın erken tanısı için gerekli olan biyobelirteçler belirlenebilir. Ayrıca hastalığın tedavisi için de yeni yöntemler ve ilaçlar geliştirilebilir. Alzheimer hastalığı ile *ACAN* geninde bulunan VNTR polimorfizminin ilişkilendirilmesi Alzheimer patogenezinin aydınlatılması ve daha iyi anlaşılmasında önemli bir adım olabilir. Alzheimer hastalığının multifaktöriyel bir hastalık olmasından dolayı hastalığa dair yapılan her çalışma hastalığı anlama konusunda yardımcı olmaktadır. Bu zamana kadar *ACAN* genindeki VNTR polimorfizminin hastalık ile ilişkisi araştırılmamış olsa da *ACAN* geni tarafından kodlanan agrekan proteininin beyinde bulunan perinöral ağların (PN) yapısına katılmasından dolayı, agrekan ve Alzheimer hastalığı ilişkisi ile yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan yola çıkarak agrekanın ekspresyonunu etkileyen mutasyon ya da polimorfizmler, agrekanın beyindeki yapısının ve işlevinin anlaşılmasında önemlidir. Agrekanın Alzheimer patolojisindeki yerine dair yapılan çalışmalardan yola çıkarak bu proteini kodlayan gende meydana gelen VNTR polimorfizminin Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabileceğini yaptığımız çalışmayla ortaya koymaktayız. Böylece bu çalışma ile Alzheimer hastalığına ilişkin literatüre katkı sağlamayı ve yapılacak yeni çalışmalara ışık tutmayı öngörmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- 2021 Alzheimer's Disease Facts and Figures. (2021). *Alzheimer's Dement.*, 17, 327-406.
- Adalı, A., Yirün, A., Koçer Gümüşel, B., & Erkekoğlu, P. (2020). Alzheimer Hastalığının Gelişimde Biyolojik Ajanların Olası Etkileri. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 44(1), 167-187.
- Ali, F., Baringer, S. L., Neal, A., Choi, E. Y., & Kwan, A. C. (2019). Parvalbumin-Positive Neuron Loss and Amyloid-Beta Deposits in the Frontal Cortex of Alzheimer's Disease-Related Mice. 72(4), 1323-1339.
- Altun, A. (2009). *DNA izolasyonu ve Elektroforez Konuları İçin Rehber Materyal Geliştirilmesi*. Ankara: Gazi Üniversitesi.
- Bosiacki, M., Gaśsowska-Dobrowolska, M., Kojder, K., Fabianska, M., Jézewski, D., Gutowska, I., & Lubkowska, A. (2019). Perineuronal Nets and Their Role in Synaptic Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(4108), 2-22.
- Bozzelli, P. L., Alaiyed, S., Kim, E., Villapol, S., & Conant, K. (2018). Proteolytic Remodeling of Perineuronal Nets: Effects on Synaptic Plasticity and Neuronal Population Dynamics. *Neural Plasticity*, 2018, 1-13.
- Brady, D. R., & Mufson, E. J. (1997). Parvalbumin-Immunoreactive Neurons in the Hippocampal Formation of Alzheimer's Diseased Brain. 80(4), 1113-1125.
- Brejyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*(25), 2-28.
- Cabungcal, J.-H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., & Do, K. Q. (2013). Perineuronal Nets Protect Fast-Spiking Interneurons Against Oxidative Stress. *PNAS*, 110(22), 9130-9135.
- Canbolat, E., & Yardımcı, H. (2016). Alzheimer Hastalığı ve Koruyucu Besin Öğeleri. *DÜ Sağlık Bil Enst Derg.*, 6(2), 139-145.
- Carceller, H., Guirado, R., Campos, E. R., Marti, V. T., & Nacher, J. (2020). Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and y Activity in the Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 40(26), 5008-5018.
- Casa, N., Casa Junior, A., Melo, A., Teodoro, L., Nascimento, G., Sousa, A., . . . Curado, M. (2016). Association Between an ACAN Gene Variable Number Tandem Repeat Polymorphism and Lumbar Disc Herniation: a Case Control Study. *Genetics and Molecular Research*, 15(4), 1-10.
- Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C. C., Lejards, C., Dahan, L., & Verret, L. (2018). Early Disruption of Parvalbumin Expression and Perineuronal Nets in the Hippocampus of the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease Can Be Rescued by Enriched Environment. *Neurobiology of Aging*, 4580(18), 1-31.
- Chen, S., Ge, X., Chen, Y., Lv, N., Liu, Z., & Yuan, W. (2013). Advances with RNA İnterference in Alzheimer's Disease Research. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, 117-125.
- Cong, L., Zhu, Y., Pang, H., & GuanJun, T. U. (2014). The İnteraction Between Aggrecan Gene VNTR Polymorphism and Obesity in Predicting İncident Symptomatic Lumbar Disc Herniation. *Connect Tissue Research*, 55(5-6), 384-390.

- Çiftçi, R. (2011). *Yaşlı Erkek Olgularında Alzheimer Hastalığı ile Seks Steroidleri Düzeyinin İlişkisi*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
- Dauth, S., Grevesse, T., Pantazopoulos, H., Campbell, P. H., Maoz, B. M., Berretta, S., & Parker, K. K. (2016). Extracellular Matrix Protein Expression Is Brain Region Dependent. *J Comp Neurol*, 524(7), 1309-1336.
- Djerbal, L., Lortat-Jacob, H., & Kwok, J. (2017). Chondroitin Sulfates and Their Binding Molecules in the Central Nervous System. *Glycoconj J*, 34, 363-376.
- Duncan, J. A., Foster, R., & Kwok, J. C. (2019). The Potential of Memory Enhancement Through Modulation of Perineuronal Nets. *Br J Pharmacol*, 176(18), 3611-3621.
- Eratne, D., Loi, S. M., Farrand, S., Kelso, W., Velakoulis, D., & Looi, J. C. (2018). Alzheimer's Disease Paper 1: Clinical Update on Epidemiology, Pathophysiology and Diagnosis. *Australasian Psychiatry*, 1-11.
- Gazioğlu, H. (2017). *Alzheimer Hastalığı ile Apolipoprotein E Genotiplerine Üzerine Bir Çalışma*. İstanbul: Üsküdar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Giri, M., Zhang, M., & Lü, Y. (2016). Genes Associated with Alzheimer's Disease: An Overview and Current Status. *Clin Interv Aging*, 11, 665-681.
- Gu, J., Guan, F., Guan, G., Xu, G., Wang, X., Zhao, W., ... Yan, J. (2013). AggreCAN Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism and Lumbar Disc Degeneration. *Spine*, 38(25), 1600-1607.
- Hane, F. T., Robinson, M., Lee, B. Y., Bai, O., Leonenko, Z., & Albert, M. S. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *57*, 645-665.
- Kahya, S., Büyükcangaz, E., & Carlı, T. K. (2013). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.*, 32(1), 31-38.
- Kao, Y.-C., Ho, P.-C., Tu, Y.-K., Jou, I.-M., & Tsai, K.-J. (2019). Lipids and Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*(21), 2-37.
- Karaduman, T. (2014). *Alzheimer Hastalarında PSEN1 Geni Mutasyon Taraması ve APOE Genotiplendirmesi*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı.
- Kenanoğlu, S. (2017). *Alzheimer Hastalığında PARP1 ve DNA POL β miRNA Ekspresyonlarının Araştırılması*. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı.
- Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 18(11), 1106-1125.
- Laurent, C., Buée, L., & Blum, D. (2018, February). Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomedical Journal*, 41(1), 21-33.
- Lin, J.-z., Duan, M.-r., Li, N., & Zhao, W.-j. (2021). The Emerging Role of the Chondroitin Sulfate Proteoglycan Family in Neurodegenerative Diseases. *Rev. Neurosci*, 1-14.
- Liu, Z., Li, T., Li, P., Wei, N., Zhao, Z., Liang, H., ... Wei, J. (2015, June 15). The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-12.

- Mantzavinos, V., & Alexiou, A. (2017). Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Current Alzheimer Research*, 14, 1149-1154.
- McRae, P. A., & Porter, B. E. (2012). The Perineuronal Net Component of the Extracellular Matrix in Plasticity and Epilepsy. *Neurochem Int*, 61(7), 963-972.
- Miyata, S., Nishimura, Y., & Nakashima, T. (2007). Perineuronal Nets Protect Against Amyloid  $\beta$ -protein Neurotoxicity in Cultured Cortical Neurons. *BrainSearch*, 1150, 200 - 206.
- Mohamedi, Y., Fontanil, T., Cobo, T., Cal, S., & Obaya, A. J. (2020). New Insights into ADAMTS Metalloproteases in the Central Nervous System. *Biomolecules*, 10(403), 2-17.
- Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Matthews, R. T., & Arendt, T. (2012). Involvement of Perineuronal and Perisynaptic Extracellular Matrix in Alzheimer's Disease Neuropathology. *Brain Pathol*, 22(4), 547-561.
- Okutucu, B., & Pehlivan, S. (2003). Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv*, 12, 138-148.
- Öz, T., Kaya, İ., Nursal, A. F., Aydın, H. E., Demir, O., & Yiğit, S. (2020). ACAN Gene VNTR Polymorphism and Intervertebral Disc Degeneration in a Turkish Population. *Med Bull Haseki*, 58, 309-314.
- Özkay, D. Ü., Öztürk, Y., & Can, D. Ö. (2011). Yaşlanan Dünyanın Hastalığı: Alzheimer Hastalığı. *18(1)*, 35-42.
- Özpak, L., Pazarbaşı, A., & Keser, N. (2017). Alzheimer Hastalığının Genetiği ve Epigenetiği. *Archives Medical Review Journal*, 26(1), 34-49.
- Öztürk, G. B., & Karan, M. A. (2009). Alzheimer Hastalığının Fiziopatolojisi. *İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Geriatri B.D.*, 36-45.
- Reichelt, A. C. (2020). Is Loss of Perineuronal Nets a Critical Pathological Event in Alzheimer's Disease? *EBioMedicine*, 59, 2352-3964.
- Riedel, B. C., Thompson, P. M., & Brinton, R. D. (2016, June). Age, APOE and Sex: Triad of Risk of Alzheimer's Disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 160, 134-147.
- Schmidt, S., Stapf, C., Schmutzler, S., Lachmann, I., Arendt, T., Holzer, M., . . . Morawski, M. (2020). Aggrecan Modulates the Expression and Phosphorylation of Tau in a Novel Bigenic TauP301L - Acan Mouse Model. *Eur J Neurosci*, 1-15.
- Sethi, M. K., & Zaia, J. (2017). Extracellular Matrix Proteomics in Schizophrenia and Alzheimer's Disease. *Anal Bioanal Chem*, 409(2), 379-394.
- Shen, H. H. (2018). Perineuronal Nets Gain Prominence For Their Role in Learning, Memory and Plasticity. *PNAS*, 115(40), 9813-9815.
- Singh, A. K., & Verma, S. (2020). Use of Ocular Biomarkers as a Potential Tool for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *68(4)*, 555-561.

- Sivan, S. S., Wachtel, E., & Roughley, P. (2014). Structure, Function, Aging and Turnover of Aggrecan in the Intervertebral Disc. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840, 3181-3189.
- Solovieva, S., Noponen, N., Mannikkö, M., Leino-Arjas, P., Luoma, K., Raininko, R., . . . Riihimäki, H. (2007). Association Between the Aggrecan Gene Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism and Intervertebral Disc Degeneration. *Spine*, 32(16), 1700-1705.
- Sorg, B. A., Berretta, S., Blacktop, J. M., Fawcett, J. W., Kitagawa, H., Kwok, J. C., & Miquel, M. (2016). Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 36(45), 11459 – 11468.
- Soylu, Ö., & Karalı, N. (2017). Alzheimer Hastalığı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J Pharm Sci*, 6(2), 94-109.
- Stavber, L., Hovnik, T., Kotnik, P., Lovrečić, L., Kovač, J., Tesovnik, T., . . . Stefanija, A. A. (2020). High Frequency of Pathogenic ACAN Variants Including an Intragenic Deletion in Selected Individuals with Short Stature. *Clinical Study*, 182(3), 243-253.
- Suttkus, A., Rohn, S., Jäger, C., Arendt, T., & Morawski, M. (2012). Neuroprotection Against Iron-Induced Cell Death by Perineuronal Nets - an in vivo Analysis of Oxidative Stress. *Am J Neurodegener Dis*, 1(2), 122-129.
- Suttkus, A., Rohn, S., Weigel, S., Glöckner, P., Arendt, T., & Morawski, M. (2014). Aggrecan, Link Protein and Tenascin-R are Essential Components of the Perineuronal Net to Protect Neurons Against Iron-Induced Oxidative Stress. *Cell Death and Disease*, 5, 2-12.
- Testa, D., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2018). Perineuronal Nets in Brain Physiology and Disease. *Elsevier*, 1084-9521.
- Vasi, A., Marım, F., Demirbaş, U., & Yakıcı, G. O. (2015). *Agaroz Jel Elektroforez Tasarımı*. Lefkoşa: Yakın Doğu Üniversitesi.
- Verret, L., Mann, E. O., Hang, G. B., Barth, A. M., Cobos, I., Ho, K., . . . Palop, J. J. (2012). Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model. *149(3)*, 708-721.
- Weller, J., & Budson, A. (2018). Current Understanding of Alzheimer's Disease Diagnosis and Treatment [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, 7(1161), 1-19.
- Wen, T. H., Binder, D. K., Ethell, I. M., & Razak, K. A. (2018). The Perineuronal 'Safety' Net? Perineuronal Net Abnormalities in Neurological Disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(270), 1-17.
- Yılmaz, S., & Devran, Z. (2016). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. *Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü*, 1-12.



## EKLER



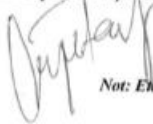
## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<b>Türk Popülasyonunda PLA2G6 Gen Mutasyonu ile Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması</b>
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Fen Edebiyat Yerleşkesi Ulukavak Mahallesi Çiftlik Çayırı Cad. No:45 Kat 1 19040 Merkez Çorum
	TELEFON	0364 2193000/ 3300
	FAKS	0364 222 11 02
	E-POSTA	etikkurultip@hitit.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Funda UYSAL TAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Nöroloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Hitit Üniversitesi			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkan Vekili  
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. İsmail Çağatay ÇAĞLAR  
İmza:



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

## KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<b>Türk Popülasyonunda PLA2G6 Gen Mutasyonu ile Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması</b>
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	18.08.2020	2	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	18.08.2020	2	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:299	Tarih: 08/09/2020					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Betül BOZKURT	GENEL CERRAHI	Hitt Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İsmail Çağatay ÇAĞLAR	GÖZ HASTALIKLARI	Hitt Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sertaç ARSLAN	GÖĞÜS HASTALIKLARI	Hitt Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yusuf KARAVELİOĞLU	KARDİYOLOJİ	Hitt Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İbrahim Tayfun ŞAHİN	GENEL CERRAHI	Hitt Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Havva Nur PELTEK KENDİRCİ	ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI	Hitt Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Üyesi Güven GÜNEY	TIBBİ PATOLOJİ	Hitt Ü.T.F.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Aynur KOÇ	FİZYOLOJİ	Hitt Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ece Yazla ASAFÖV	RUH SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI	Hitt Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Yaprak Dilber ŞİMAY	FARMAKOLOJİ	Hitt Ü.T.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkan Vekili

Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. İsmail Çağatay ÇAĞLAR

İmza:

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

## EK-2 Devam

### KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	<b>Türk Popülasyonunda PLA2G6 Gen Mutasyonu ile Alzheimer Hastalığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması</b>
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

Uzm. Dr. Emin RENÇBER	HALK SAĞLIĞI	Çorum Halk Sağlığı Merkezi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hukuk Mşv. Avukat Gülhan DURMUŞBAŞ	HUKUK	Hitit Üniversitesi Rektörlüğü	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Biyomedikal Müh. Anıl KARATAŞ	BIYOMEDİKAL	S.B. Çorum Eğitim Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Nail DEMİR	Y. Drama Bim Uzmanı	-	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkan Vekili  
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. İsmail Çağatay ÇAĞLAR  
İmza:

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

