T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ALZHEİMER VE VASKÜLER DEMANS TANISINDA MİRNA-29A ve MİRNA-31'İN BİYOBELİRTEÇ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

AYŞEGÜL AKBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP

Eskişehir-2023

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ALZHEİMER VE VASKÜLER DEMANS TANISINDA MİRNA-29A VE MİRNA-31'İN BİYOBELİRTEÇ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

AYŞEGÜL AKBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP

Eskişehir-2023

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kuralar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifar yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Ebru ERZURUMLUOĞLU GÖKALP danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ayşegül AKBAŞ

ÖZET

Başlık: Alzheimer ve Vasküler Demans Tanısında miRNA-29a ve miRNA-31'in Biyobelirteç Olarak Değerlendirilmesi

Amaç: Alzheimer ve vasküler demans, en yaygın görülen iki demans türüdür ve ayırıcı tanısında klinik olarak zorluk yaşanmaktadır. Bu nedenle non-invaziv biyobelirteç arayışları sürmektedir. Farklı dokularda ifade edilebilen mikroRNA'ların sinaptik düzenin korunmasıyla nörodejenerasyon üzerindeki düzenleyici etkisinin anlaşılması nörodejeneratif hastalıklar için potansiyel tanı araçları olarak görülmektedir. miR-29a, sinaps oluşumu ve nörogenez üzerinde etki göstermektedir. miR-31, inflamasyon ve nöronların ölümüyle nörodejenerasyona sebep olmaktadır. Bu doğrultuda miR-29a ve miR-31'in vasküler demans, Alzheimer ve kontrol olgularında incelenmesi, farklılıklarının belirlenerek tanısal olarak kullanılabilirliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda, 30 Alzheimer Hastalığı, 30 vasküler demans tanısı almış ve yaşla uyumlu 30 kontrol bireyinden alınan serum örneklerinde Real Time PCR yöntemi ile miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda gruplar arasında serum örnekleri karşılaştırıldığında miR-29a ekspresyon seviyesinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). miR-31 ekspresyon seviyelerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p=0,01$). miR-31 ekspresyon seviyelerinin Alzheimer grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir ($p=0,017$, $p=0,046$). Vasküler demans ve kontrol grubu arasında ise miR-31 ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir ($p=1$).

Sonuç: Hasta grupları ve kontrol grubu bireyleri karşılaştırıldığında miR-29a ifadesi tek başına anlamlı bulunmazken, miR-31'in ifadesi anlamlı bulunmuştur. Bu iki miRNA'nın ifadeleri birlikte değerlendirildiğinde miR-29a ve miR31'in Alzheimer ve vasküler demans grubu aynı zamanda Alzheimer ve kontrol grupları arasında orta tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak kullanılabileceği fakat bu hastalıkların tanısında biyobelirteç olarak kullanılmak için henüz yeterli olmadıklarını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer, Vasküler demans, miRNA, Biyobelirteç

SUMMARY

Title: Evaluation of miRNA-29a and miRNA-31 as Biomarkers in the Diagnosis of Alzheimer's and Vascular Dementia

Objective: Alzheimer's and vascular dementia are the two most common types of dementia, and their differential diagnosis is clinically difficult. Therefore, the search for non-invasive biomarkers continues. miR-29a has effects on synapse formation, regulation and neurogenesis. miR-31 causes neurodegeneration with inflammation and death of neurons. In this direction, it was aimed to study miR-29a and MIR-31 in vascular dementia, Alzheimer's and control cases and to determine their differences and to determine their diagnostic usability.

Method: In our study, expression levels of miR-29a and miR-31 were examined by Real Time PCR method in serum samples taken from 30 Alzheimer's Disease, 30 vascular dementia and 30 age-matched control individuals, and their usability as biomarkers was evaluated.

Results: When the serum samples of the Alzheimer and vascular dementia patient group and the control group were compared, no significant difference was observed in the expression level of miR-29a ($p>0.05$). miR-31 expression levels were examined and statistically significant difference was observed between the groups ($p=0.01$). It was observed that miR-31 expression levels were significantly increased in Alzheimer's patient group compared to vascular dementia and control groups ($p=0.017$, $p=0.046$). No statistically significant difference was observed between the vascular dementia and control groups in terms of miR-31 expression level ($p=1$).

Conclusion: In the comparison of Alzheimer's disease, vascular dementia, and the control group, it was observed that the expression difference of miR-29a and miR-31 was detected and their ability to differentiation between the patient and control groups as biomarkers was low. This suggests that they are not sufficient to be used as a potential non-invasive biomarker in the diagnosis of diseases.

Keywords: Alzheimer, Vascular dementia, miRNA, Biomarker

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....

ETİK BEYAN.....

ÖZET.....i

SUMMARY iiii

TABLOLAR DİZİNİ viii

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ ix

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER.....3

2.1. Demans.....3

2.2. Alzheimer Hastalığı 3

2.2.1. Alzheimer hastalığı patolojisi/ patogenezi 4

2.2.1.1. Amiloid plaklar……5

2.2.1.2. Nörofibril yumaklar……6

2.2.1.3. Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayan diğer mekanizmalar……6

2.2.2. Alzheimer hastalığı risk faktörleri 8

2.2.3. Alzheimer hastalığında rol alan genetik faktörler.....9

2.2.3.1. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı……9

2.2.3.2. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı……11

2.3. Vasküler Demans 13

2.3.1. Vasküler demansın patolojisi 14

2.3.2. Vasküler demansın risk faktörleri 15

2.3.3. Vasküler demansta rol alan genetik faktörler.....17

2.3.3.1. CADASIL……17

2.3.3.2. CARASIL..……...…17
2.3.3.3. SVACH……...…..18
2.3.3.4. RVCL……...….18
2.2.3.5. Fabry hastalığı…….....18
2.2.3.6. Polimorfizmler……..19
2.4. Alzheimer Hastalığı ve Vasküler Demansın Tanısı 19
2.5. MikroRNA 20
2.5.1. MikroRNA biyogenezi 20
2.5.2. MikroRNA'ların nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi 21
2.5.3. miRNA-29a 25
2.5.4. miRNA-31 25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 27
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması 27
3.2. Gereçler 29
3.2.1. Kullanılan sarf malzemeler 29
3.2.2. Kullanılan cihazlar 30
3.2.3. Kullanılan primerler 31
3.3. Yöntem 31
3.3.1. Materyal alımı 31
3.3.2. Periferik kandan miRNA eldesi 31
3.3.3. miRNA ölçümü 32
3.3.4. cDNA sentezi 32
3.3.5. Real time PCR 34
3.3.6. Ekspresyon analizi 34
3.4. İstatiksel Analiz 36
4. BULGULAR 37

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi 37

4.2. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi 38

4.2.1. Alzheimer hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında miR-29a ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi 41

4.2.2. Alzheimer hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında miR-31 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi 42

4.3. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Korelasyon Analizi 46

4.4. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Biyobelirteç Olarak Değerlendirilmesi 46

4.4.1. Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak değerlendirilmesi 46

4.4.2. Vasküler demans hastaları ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31' in biyobelirteç olarak değerlendirilmesi 47

4.4.3. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak değerlendirilmesi 49

4.5. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Biyobelirteç Olarak Birlikte Değerlendirilmesi 50

4.5.1. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak birlikte değerlendirilmesi 50

4.5.2. Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak birlikte değerlendirilmesi 51

4.5.3. Vasküler demans hastaları ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak birlikte değerlendirilmesi 51

5. TARTIŞMA 52

5.1. miR-29a Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi 54

5.2. miR-31 Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi 57

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 60

7. KAYNAKLAR DİZİNİ 62

8. EKLER DİZİNİ……72

Ek-1. Etik Kurul Kararı

Ek-2. Benzerlik Raporu

9. ÖZGEÇMİŞ……...81

10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI..82

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. EBAH'da rol oynayan genler……..9

Tablo 2.2. Geç başlangıçlı Alzheimer Hastalığı ile ilişkili olan genler….…….13

Tablo 2.3. Vasküler demansın monogenik nedenleri…….16

Tablo 2.4. Alzheimer ve vasküler demans ile ilişkili olan miRNA'lar……..24

Tablo 3.1. cDNA Standart Reaksiyon (1 örnek için)…….33

Tablo 3.2. cDNA sentez PCR koşulları……...34

Tablo 3.3. Ekspresyon analizinde kullanılan primerler……..35

Tablo 3.4. Real Time PCR kurulum bileşenleri…….35

Tablo 3.5. RT-PCR protokolü……36

Tablo 4.1. Gruplara göre cinsiyet ve yaş grupları dağılımı……38

Tablo 4.2. Alzheimer Hastası, Vasküler Demans Hastası ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-29a Ekspresyon Seviyeleri…….……...42

Tablo 4.3. Alzheimer Hastası, Vasküler Demans Hastası ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-31 Ekspresyon Seviyeleri……..…….....43

Tablo 4.4. Alzheimer Hastası, Vasküler Demans Hastası ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-31 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması...……..44

Tablo 4.5. Alzheimer hastaları ve kontrol grubunda miR-29a ve miR-31'in ROC ve AUC değerleri ……..…….…….....47

Tablo 4.6. Vasküler demans hastaları ve kontrol grubunda miR-29a ve miR-31'in ROC ve AUC değerleri…….…..….....48

Tablo 4.7. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in ROC ve AUC değerleri……..……..……..…….49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Alzheimer Hastalığı Patogenezi……5

Şekil 2.2. Vasküler demans patolojisinde yer alan faktörler……15

Şekil 2.3. miRNA biyogenezi……..21

Şekil 4.1. Alzheimer hasta, vasküler demans hasta ve sağlıklı kontrol bireylerinin gruplara dağılımı…….……..…….37

Şekil 4.2. U6 (kontrol) genine ait amplifikasyon görüntüsü……39

Şekil 4.3. miR-29a ekpresyonuna ait amplifikasyon görüntüsü…….40

Şekil 4.4. mir31 ekspresyonuna ait amplifikasyon görüntüsü…….40

Şekil 4.5. Alzheimer Hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-29a ekspresyon seviyelerinin grafiği……..41

Şekil 4.6. Alzheimer hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda miR-31 ekspresyon seviyelerinin grafiği ……. .43

Şekil 4.7. Alzheimer hastası, vasküler demans hastası ve kontrol grubu bireylerinin miR-29a ve miR-31 ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelenmesi……...……. 45

Şekil 4.8. Alzheimer hastaları ve kontrol grubunda miR-29a ve miR-31'in ROC eğrileri……...……47

Şekil 4.9. Vasküler demans hastaları ve kontrol grubunda miR-29a ve miR-31 'in ROC eğrileri……..……...48

Şekil 4.10. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in ROC eğrileri……..…….....50

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ago-2 : Argonaute-2

ALS : Amyotrofik Lateral Skleroz

angII : Anjiyotensin II

APOE : Apolipoprotein E

APP : Amiloid Prekürsör Protein

A*β* : Amiloid Beta Protein

BACE1 : Beta- Sekretaz 1

BOS : Beyin Omurilik Sıvısı

CRH : Kortikotrofin Salgılayan Hormon

CRV : Serebroretinal Vaskülopati

Ct : Döngü Eşiği

DGCR8 : Di-George Kritik Bölge 8

EBAH : Erken Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

GABA : Gama Aminobütirik Asit

Gb3 : Globotriaosilseramid

GBAH : Geç Başlangıçlı Alzheimer Hastalığı

GLA : Lizozomal Galaktosidaz A

GWAS : Genom Çapında İlişkili Çalışmaları

HERNS : Kalıtsal Endotelopati, Retinopati, Nefropati ve İnme

HVR : Kalıtsal Vasküler Retinopati

KBB : Kan- Beyin Bariyeri

KKH : Kronik Serebral Hipoperfüzyon

MAPT : Mikrotübül İlişkili Tau Proteini

MetS : Metabolik Sendromlar

miRNA : MikroRNA

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

ml : Mililitre

mm : Milimetre

NF-κB : Nükleer faktör-kappa B

ng : Nanogram

PACT : PKR Aktive Edici Protein

PSEN1 : Presenilin 1

PSEN2 : Presenilin 2

RISC : RNA ile indüklenen susturma kompleksi

RNP : Ribonükleoprotein

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

RT-PCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RVCL : Serebral Lökoensafalopati ilişkili Retinal Vaskülopati

SVACH : Hemorajik İnme İlişkili Küçük Damar Hastalığı

SVD : Serebral Küçük Damar Hastalığı

Tgf-b : Dönüştürücü Büyüme Faktörü

TRBP : Transaktivasyondan Sorumlu RNA Bağlanma Proteini

VaD : Vasküler Demans

µl : Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer; bilişsel bozukluk, bellek kaybı, dil sorunları semptomları ile karakterize olan ileri yaşlarda görülen demansların en sık formudur. Tüm demans vakalarının % 50-70'ni oluşturmaktadır. Hastalığın prevalansı 60 yaş üzerinde % 6-10, 80 yaş üzerinde %30-47'dir. Hastalığın patolojisinde nörofibriler yumaklar ve amiloid plaklar rol oynamaktadır. Bu iki temel patolojik bulgu, sinaps ve nöron kaybına yol açarak beyinde belirgin bir atrofi oluşturmaktadır. Nörofibriler yumakların temel bileşeni hiperfosforile tau proteinidir. Bağlanma yeteneği bozulan mikrotübüller zaman içerisinde nörofibriler yumaklar halinde birikmeye başlamaktadır ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Amiloid plaklar ise amiloid prekürsör protein (APP)' nin proteolitik kesimi ile oluşmaktadır. Erken başlangıçlı Alzheimer otozomal dominant olarak kalıtılır ve ilişkili genler *APP, PSEN1* ve *PSEN2*'dir. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında risk faktörleri etkilidir ve başta *APOE* olmak üzere *PICALM, CLU, CR1, BIN, ABCA7, MS4A, EPHA1, CD33, CD2AP, SORL1* gibi bir çok gen rol oynar. Alzheimer hastalığının % 85-90 oranında klinik tanısını koymak mümkündür. Henüz kesin bir tedavisi yoktur, bunun için etkin ilaçlar geliştirilmektedir (Özpak vd., 2017).

Vasküler demans; beyinde kan dolaşımı bozukluğundan dolayı beyin dokularının hasar görmesi ve ölmesiyle oluşan demans türüdür. Alzheimer'dan sonra en sık görülen demans tipidir. Genellikle 65-75 yaş arasında ortaya çıkar fakat daha genç yaşta da görülebilmektedir. Hastalığın patolojisinde, vasoregülatör mekanizmalarda meydana gelen kan akışı artışı ve hemodinamik değişiklikler yer almaktadır. Bu faktörler, bazal ön beyini etkileyerek nöral aktivasyonun değişmesine neden olmaktadır. Vasküler demansın genetik temeli ile ilgili yapılan çalışmalar azdır. Genetik temeli konusunda yapılan çalışmalar tek gen işlev bozukluklarının vasküler demansın gelişmesinde rol oynadığını bulmuşlardır. Bu tek gen işlev bozuklukları *NOTCH3, GLA, COL4A1-A2, HTRA1, TREX1* genlerinde meydana gelmektedir. Hasar görmüş beyin bölgelerinin onarılması mümkün olmasa da hedefli bir tedavinin hastalık sürecine olumlu etkileri vardır (Ikram vd., 2017).

MikroRNA (miRNA), gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan 19-23 nükleotid içeren küçük protein kodlamayan RNA'lardır. miRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre farklılaşması gibi birçok biyolojik süreci düzenleme

potansiyeli bulunmaktadır. Hücre içinde ve serum, plazma, idrar, süt gibi diğer vücut sıvılarında bulunmaktadır (Gareev vd., 2021). miRNA'lar, beyinde bol miktarda eksprese edilmekte ve nöronal farklılaşma, nöronal plastisitede kilit rol oynamaktadır. Bazı miRNA'lar daha çok hipokampus ve kortekste eksprese edilir, bu da özellikle sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunda rol oynayan düzenleyici ağa dahil olabileceğini düşündürmektedir (Viswambharan vd., 2017). Bu düzenlemelerde yer alan miRNA'lar ve ifadelerindeki herhangi bir değişiklik demans patoloji üzerinde önemli etkilere neden olabilmektedir. Özellikle sinaptik fonksiyonlardaki bozukluklar tüm demans vakalarında en yaygın etkendir ve belirli miRNA'ların bu fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Ramakrishna vd., 2019). miR-29a'nın ifadesi nörit kök hücreleri etkilemektedir ve sinaps oluşumu, sinapsların düzeni üzerinde etki göstermektedir (Ma vd, 2020). miR-31 ifadesi, inflamasyon ile oksidatif stresin ortaya çıkmasında ve nörodejenerasyon sonucu nöronların ölümü ile ilişkilidir. miR-31'in ifadesinin yüksek olması Aβ proteinlerinin hücre içi birikimi azalttığı böylece nöropatoloji üzerinde iyileştici etkisinin olduğu görülmektedir (Barros- Viegas vd., 2020).

Alzheimer hastalığı ve vasküler demans ile ilgili ayrı çalışmalarda biyobelirteç olarak kullanılabilecek çok sayıda miRNA tanımlanmış olsa da, bu iki hastalığı tanısal olarak ayırabilen bir biyobelirteç olabilecek miRNA arayışı son dönemlerde önem kazanmıştır. Literatürde şimdiye kadar yapılan çalışmalar tarandığında miR-29a ve miR-31'in Alzheimer ve vasküler demans ekspresyon farklılığı gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda miR-29a ve miR-31'in vasküler demans, Alzheimer ve kontrol olgularının serum örneklerinde incelenmesi ve ekspresyon farklılıklarının belirlenerek tanısal olarak kullanılabilirliğinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demans

Demans; Latince ‘’*mens*’’ kökünden gelen bellek kaybı, öğrenme güçlüğü, akıl yürütme, yargılamada problemler ile karakterize olan ve zihinsel becerilerde giderek artan bozulmayla birlikte kişinin günlük hayatını bağımsız yürütmede güçlük yaşaması halidir (Gustafson vd.,1996). Yaşa bağlı ilerleyen demans, epidemiyolojik tahminlere göre her geçen yıl popülasyonda katlanarak artmaktadır ve dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (Livingston vd., 2020). Demansa yol açabilecek çok sayıda çevresel ve genetik risk faktörü mevcuttur (Kua vd., 2014).

2.2. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları nedeniyle ortaya çıkan, yüksek entelektüel işlevin giderek bozulması, öz bakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile kendini gösteren progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (Khan vd., 2020).

İlk olarak; bilişsel düzensizlik, halüsinasyonlar ve değişken davranışlara sahip Aguste Deter’in 1901 yılında hastaneye başvurusu ve ardından 1906 yılındaki ölümüyle birlikte Alois Alzheimer’ın bu süreçte yapmış olduğu çalışmalarla tanımlanmıştır. Alois Alzheimer, postmortem çalışmalarının nöropatolojik değerlendirmesi sonucunda kortikal hücre kümelerinde belirli değişiklikler olduğunu gözlemlemiş ve ‘serebral korteksin kendine özgü bir hastalığı’ olarak bulgularını bildirmiştir (Lopez vd., 2019).

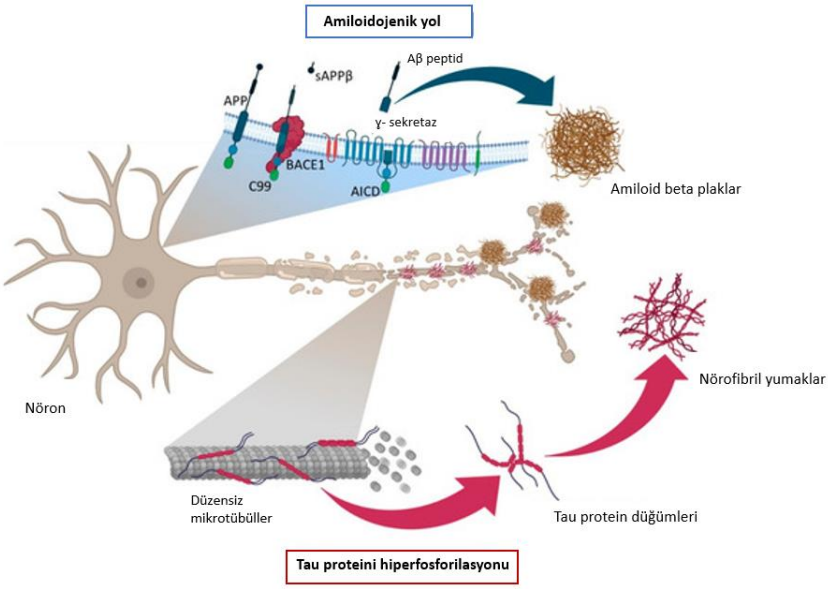
Alzheimer hastalığı demansın en yaygın türü olup tüm demans vakalarının yaklaşık % 60-70’ini oluşturmaktadır. Alzheimer hastalığı prevelansı dünya genelinde oldukça yüksektir ve mevcut tahminler yıllar içinde nüfusun yaşlanmasıyla birlikte bu oranların artacağı ve 2050’li yıllarda üç katından fazla olacağı yönündedir. Kadınlarda erkeklere göre daha yaygın görülmektedir ve yaklaşık iki katı prevelansa sahiptir. Hastalık ilk olarak sözel hafızada eksiklik ile ortaya çıkmaktadır. Ardından görsel-uzamsal beceri, yürütücü işlev yeteneklerinde azalma ile ilerlemektedir. Bu bilişsel bozulma evreleri ve ilerleme süreleri bireylerde farklılık göstermektedir (Zhang vd., 2021).

2.2.1. Alzheimer hastalığı patolojisi/ patogenezi

Alzheimer hastalığı, patogenezini pek çok faktörün etkileyebildiği multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalığın patogenezinde rol oynayan en önemli etiyolojik faktörler yaş ve genetik yatkınlıktır. İnflamasyon, toksik maruziyet, travmatik beyin hasarı da bilinen diğer etiyolojik faktörler arasında yer almaktadır. Bunun yanı sıra vasküler, psikolojik, psikososyal ve demografik risk faktörlerinin hastalığın patogenezi ve sonuçlarının klinik yansıması üzerinde etkili oldukları bilinmektedir (Tiwari vd., 2019).

Alzheimer hastalığı patolojisini oluşturan iki önemli mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bunlar; intraselüler alanda biriken Aβ plakları ve ekstraselüler alanda biriken hiperfosforile Tau proteinidir (Şekil 2.1.). Normal yaşlanma sürecinde beynin neokorteks bölgesinde plaklar, limbik sistemde nörofibril yumakların oluşumu gözlenmektedir. Alzheimer hastalığında ise bu yapılar amigdala, hipokampus ve neokorteks başta olmak üzere beynin çeşitli bölgelerine ilerlemektedir ve böylece normal yaşlılık süreci hafif bilişsel bozukluk ve Alzheimer hastalığı ile sonuçlanması beklenmektedir (Lane vd., 2018).

Nörofibril yumaklar ve amiloid plaklar, sinapslar arası bağlantının bozulması, nöron kaybı ve ölümüne sebep olmaktadır. 1992 yılında Hardy-Higgins, ‘’amiloid kaskad hipotezini’’ öne sürmüştür. Bu hipoteze göre; Alzheimer hastalığı beyinde amiloid birikimi ile başlamaktadır. Aβ peptidler, nörotoksik amiloid fibriller halinde birikmektedirler ve amiloid plakları oluşturmaktadırlar. Ayrıca tau proteini birikimi görülmektedir. Bu birikimler sinaptik kayıp ve bilişsel gerileme ile sonuçlanmaktadır. Bu hipotez hala güncelliğini korumaktadır (Riscado vd., 2021).



Şekil 2.1. Alzheimer Hastalığı Patogenezi (Riscado vd., 2021)

2.2.1.1. Amiloid plaklar

İlk olarak 1984 yılında tanımlanan amiloid plaklar, beynin farklı bölgelerinde birikerek nörodejenerasyon ve hücre ölümüne sebep olmaktadır (Long vd.,2019). Amiloid plakların ana bileşeni olan Aβ (amiloid beta protein), β-amiloid öncü proteininin (APP) proteolitik kesimi sonucu oluşmaktadır. Amiloid 40-42 aminoasitten oluşan Aβ, α, β ve γ sekretaz olmak üzere farklı proteolitik enzimlerle kesime uğramaktadır (Öztürk vd., 2009).

APP, normal bölünme sürecinde α-sekretaz ile kesilmektedir. α-sekretaz APP'yi orta kısmından kesmektedir. Bu kesimden sonra ekstraselüler protein olan sAPPα salınmaktadır. sAPPα'nın nöral kök hücre çoğalması, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalığında α- sekretaz ile kesimin inhibe edildiği ve yörüngenin değişerek β ve γ-sekretaz yollarına ayrıldığı düşünülmektedir (Šerý vd., 2013).

Alzheimer hastalığının oluşumunda ise β-sekretaz ve γ sekretaz ile kesim gerçekleşmektedir. APP, C terminaline yakın transmembran alana sahip β-sekretaz 1 (BACE1) tarafından parçalanmaktır ve C99 fragmanı serbest hale gelerek sAPPβ fragmanı oluşmaktadır. β-sekretaz ile kesim Aβ'nın N terminusunda gerçekleşen hız sınırlayıcı bir basamaktır (Tiwari vd., 2019).

Bir sonraki basamakta γ sekretaz kompleksi C99 fragmanına bağlanmakta ve kesimi gerçekleşmektedir. γ sekretaz kesimi ile C terminalde değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişiklikler sonucu normal form Aβ-40 ve izolösin ile alaninin dahil edildiği Aβ-42 oluşmaktadır. Bu polimerler plak oluşumu ve nörotoksiteye sebep olmaktadırlar. Aβ-40, 40. pozisyondaki bölünmeye denk gelmektedir ve en çok bulunan formdur. Aβ-42, 42. pozisyondaki bölünmeye denk gelmektedir ve Aβ-40'a göre daha uzun, hidrofobik ve daha az miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle daha nörotoksik özellik göstermektedir ve Alzheimer hastalığına sahip bireylerde daha sık gözlenmektedir (Tiwari vd., 2019).

2.2.1.2. Nörofibril yumaklar

Nörofibril yumaklar, Tau proteinin hiperfosforilasyonu sonucu oluşan yapılardır. Tau, mikrotübül ilişkili protein (MAP) ailesindendir ve *MAPT* geni tarafından kodlanır. Mikrotübül polimerizasyonu ve stabilizasyonu, hücre iskeletinin korunması ve aksonal transportu düzenlemektedir. Tau proteini mikrotübül oluşumu amacıyla sahip olduğu mikrotübül bağlayıcı alana tübilin bağlamaktadır ve mikrotübüller arasında köprü görevi görerek bir ağ oluşturmaktadır (Šerý vd., 2013).

Tau proteini; fosforilasyon, asetilasyon, glikolizasyon vb. pek çok post-translasyonel süreçten geçmektedir. Normal beyin işleyişinde Tau proteinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu bir denge içinde gerçekleşmektedir. Bu denge hiperaktif kinazlar veya hipoaktif fosfatazların aktivitelerinin değişmesiyle bozulmakta ve artmış fosforilasyonla sonuçlanmaktadır (Harrington vd., 2012).

Hiperfosforilasyon sonucu mikrotübüllerin bağlanma yetenekleri bozulmaya başlamaktadır. Normalde oligomerler ve fibriller halinde toplanan Tau proteini çözülemeyen çift sarmallı filamentlere polimerize olarak nörofibril yumakları oluşturmaktadırlar. Oluşan bu yumaklar sitozolde birikmekte ve sinaptik iletişim, aksonal transport, nöral plastisiteyi etkileyerek hücrenin kademeli olarak dejenerasyonuna neden olmaktadır. Tau patolojisinin uzun süreli birikimi tek bir bölgeye sınırlı kalmadan entorinal kortekse yayılmış halde gözlenmektedir. Braak evrelemesinin temelini oluşturmaktadır (Khan vd., 2020).

2.2.1.3. Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayan diğer mekanizmalar

Amiloid plak ve nörofibril yumakların oluşumunda veya progresyonunda etkili olduğu düşünülen pek çok mekanizma mevcuttur.

Sinaptik plastisitenin korunmasında nörotransmitterler kilit rol oynamaktadır ve bunların başında da glutamat gelmektedir. Glutamat/glutamin metabolizmasında meydana gelebilecek bir düzensizlik, nöronların depolarizasyonuyla sonuçlanmaktadır. Astrositlerde yer alan noradrenerjik reseptörler öğrenme ve hafızayı geliştirmektedir. Alzheimer hastalığı olan bireylerde serotonerjik nöron kaybı gözlenmektedir. Ayrıca GABAerjik nöronların düzensizliği sinaptik hasarla sonuçlanarak Alzheimer hastalığının oluşumunda etkinlik göstermektedir (Khan vd., 2020).

Çoğu hormonun bu süreçlerin oluşumunda etkili olduğu görülmektedir. Örneğin, düşük kortikotrofin salgılayan hormon (CRH) seviyelerinin değişikliği ve buna bağlı ilişkili olduğu Anjiyotensin II seviyelerinin yüksekliği APP'nin etkinliğini bozarak düzensiz bölünmeye sebep olabilmektedir. Düzensiz bölünmeler sonucu biriken Aβ ve tau proteinleri sinaptik plastisitenin bozulması ve nöronların ölümünde rol oynamaktadırlar (Rehman vd., 2002).

Mikroglialar, nöronal plastisitenin kurulması ve sinapsların yeniden şekillenmesinden sorumludurlar. Etkinlikleri immün yanıt oluşturan proteinlerin birikimiyle gerçekleşmektedir. İnflamatuar sinyalizasyonun düzenlenmesinde rol almaktadırlar. Mikroglial aracılı fagositozun azalmasıyla, amiloid proteinlerin etkinliğinin arttığı ve birikerek plaklar oluşturduğu gözlenmektedir. Akut inflamasyonun ise koruyucu etkisi gözlenmektedir. Mikrogliaların olgunlaşması gibi düzenlemelerden sorumlu olan mikrobiyomun da bağırsak ve beyin arasındaki etkileşimlerin Alzheimer hastalığı patogenezinde yer aldığı bildirilmektedir (Abdel-Haq vd., 2019). Bağırsak mikroflorası kan beyin bariyerini geçebilmekte ve serotonin, GABA oluşumlarında rol almaktadır. Aynı zamanda beyinde birikerek inflamatuar kaskatın başlamasına sebep olmaktadır. İnflamatuar kaskadın başlamasıyla amiloid birikimi ve Alzheimer hastalığı oluşumu görülmektedir (Heneka vd., 2015).

Metal iyonlarının Aβ plaklarına bağlanması, oksidatif strese yol açmaktadır. Bunun sonucunda ROS (reaktif oksijen türleri) aşırı ifade edilmektedir. Mitokondrinin geçirgenliği değişikliğe uğrayarak inflamasyon ve dejenerasyon sonucu Alzheimer hastalığı gözlenmektedir (Armstrong, 2019).

DNA metilasyonu, histon asetilasyonu, kodlamayan RNA'ların oluşturduğu epigenetik mekanizmalar da hafıza oluşumu ve korunmasında rol oynamaktadırlar. Bu

mekanizmalarda meydana gelen ifade değişiklikleri nöronal plastisitenin bozulmasına sebep olmaktadır (Landgrave-Gomez vd., 2015).

Uyku bozukluğunda, beyin omurilik sıvısında artmış Aβ42 ifadesi ve artmış amiloid plak birikimi gözlenmektedir. Uyku bozukluğu sonucunda oluşan dikkat eksikliği, bellek bozulması gibi semptomların varlığı da Alzheimer hastalığı patolojisinde etkili olduğunu göstermektedir (Ju vd., 2014).

Serebrovasküler hastalıklar, beyaz cevherde protein birikimiyle bilişsel bozukluğa sebep olabildiğinden önemli bir vasküler risk faktörüdür (de Bruijin vd., 2014).

2.2.2. Alzheimer hastalığı risk faktörleri

Alzheimer hastalığı patolojisi üzerine pek çok risk faktörü etki etmektedir. Risk faktörlerini bilmek ve anlamak hastaların klinik takibi ve tedavinin belirlenmesi bakımından önemlidir (Armstrong, 2019).

Vasküler risk faktörleri: Sigara ve alkol tüketimi, Alzheimer hastalığı riskini artırmaktadır. Özellikle fazla alkol tüketiminin hastalık riskini üç kat artırdığı bilinmektedir (Eratne vd., 2018). Kilo kontrolü ve obezite, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için yüksek risk taşımaktadır. Antioksidanlar bakımından zengin olan Akdeniz diyeti uygulamanın hastalık üzerinde koruyucu etkisinin olduğu gözlenmektedir (Alford vd., 2018). Hipertansiyon ve yüksek kolesterol, Alzheimer hastalığı riskini oldukça arttırmaktadır ve antihipertansif tedavi sonucunda AD nöropatolojisi üzerinde olumlu etkiler görülmektedir (Girouard vd., 2006). Diyabet, glukoz toleransının bozulması sonucu nörodejeneratif farklılıklar gözlenmekte ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Alford vd., 2018). Serebral ve kardiyovasküler hastalıklar, beyinde meydana gelen enfarktüsler ve beyaz cevher düzensizliğinin sonucudur ve Alzheimer hastalık riskini önemli ölçüde artırmaktadır (de Bruijin vd., 2014).

Psikososyal risk faktörleri: Yüksek eğitim düzeyi ve sosyoekonomik statü, sosyal çevre ile etkileşim, düzenli fiziksel ve zihinsel aktivite gibi faktörlerin Alzheimer hastalığı üzerinde olumlu etkisi bulunmaktadır (Eratne vd., 2018). Depresyon, Alzheimer hastalığı geliştirme de oldukça risk taşıyan bir faktördür (Armstrong, 2019)

Genetik faktörler: Yaş ile ilişkili olarak pek çok genetik faktörün Alzheimer hastalığının patolojisinde etkili olduğu bilinmektedir (Reitz vd., 2011).

2.2.3. Alzheimer hastalığında rol alan genetik faktörler

Alzheimer hastalığı yaşa bağlı olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. 65 yaşından önce görülen türü 'erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı', 65 yaşından sonra görülen türü 'geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı' olarak adlandırılmaktadır (Reitz vd., 2011).

2.2.3.1. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı

Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı (EBAH) tüm Alzheimer hastalığı vakalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır. EBAH da ilk semptomlar 30-40'lı yaşlarda hafıza bozukluğuna eşlik eden afazi, apraksi, motor disfonksiyon gibi klinik özelliklerle ortaya çıkmaktadır. Görsel ve dil disfonksiyon fenotipleri EBAH'da daha yaygın görülmektedir. EBAH'ın genetik formu mendel kalıtım paterniyle uyumludur ve otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. EBAH temelde *APP* (amiloid prekürsör protein), *PSEN1* (presenilin 1), *PSEN2* (presenilin 2)' de meydana gelen mutasyonlarla ortaya çıkmaktadır (Ayodele vd., 2021). EBAH'da rol oynayan genler Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. EBAH'da rol oynayan genler

Gen Sembolü	**Kromozom Lokusu**	**Kalıtım Tipi**	**Başlangıç Yaşı**
APP (Amiloid Prekürsör Protein)	21q21.1- 21q21.3	Otozomal Dominant	45- 60
PSEN1 (Presenilin1)	14q24.3	Otozomal Dominant	30- 50
PSEN2 (Presenilin2)	1q31- q42	Otozomal Dominant	35-70

***APP* (Amiloid Prekürsör Protein):** Alzheimer hastalığı ile ilişkisi tanımlanan ilk gen olan *APP* geni, kromozom 21q21.1- 21q21.3 bölgelerine lokalize 18 ekzon içeren tip I transmembran bir proteindir. Ekson 16 ve 17 tarafından Aβ proteini kodlanmaktadır. Aβ, farklı sekretazlar (α-, β- ve γ-sekretazlar) tarafından sırayla bölünme işlemlerinin ardından oluşturulmaktadır (Giri vd., 2016; König vd., 2021).

APP geninde meydana gelen mutasyonlar, APP'nin farklı sekretazlar tarafından kesimine sebep olarak Aβ proteinin hatalı işlenmesine neden olmaktadır. Hatalı işlenme, 40 ya da 42 aminoaside sahip Aβ proteinlerinin hücre dışında birikimine neden olmakta ve Alzheimer hastalığının temel patolojisini oluşturmaktadır (Ayodele vd., 2021). Çoğunluğunu yanlış anlamlı mutasyonların oluşturduğu 120'den fazla APP mutasyonu tanımlanmaktadır. Bu mutasyonlar genel olarak Aβ dizisinde veya çevresindeki bölünme bölgelerinde gerçekleşmektedir ve sinapslara zarar vermektedir. APP mutasyonuna sahip bireyler çoğunlukla 45-60 yaşlarında klinik semptom göstermektedir (Cacace vd., 2016).

PSEN1 (*Presenilin 1*): Alzheimer hastalığı ile ilişkisi tanımlanan diğer bir gen olan *PSEN1,* kromozom 14q24.3'e lokalize 467 aminoasitten oluşan transmembran bir protein olan PSEN1'i kodlamaktadır. γ-sekretaz kompleksinin kilit üyesi olan PSEN1'in N-terminal bölgesi hidrofiliktir ve C-terminal bölgesi hücre dışı alandadır. APP'nin kesimi ve Aβ fragmanlarının oluşumunda görevlidir. APP'nin işlenmesinde β-sekretaza eşlik eden γ-sekretaz ile Aβ40 ve Aβ42'nin birikmesine neden olmaktadır. *PSEN1* fonksiyonu, mutasyonlar sonucunda değişerek farklı amiloid peptid oluşumuna ve birikimine neden olmaktadır. Normalde Aβ40/42 belirli bir oranda üretilirken meydana gelen mutasyonlarla bu oran değişmektedir. Aβ42 seviyesi normalden fazla üretilirken Aβ40 seviyesi normalden daha az üretilmekte ve denge bozulmaktadır (Bagaria vd., 2022; Giri vd., 2022). Şimdiye kadar 200'den fazla patojenik mutasyon tanımlanmaktadır. Bu mutasyonların birkaçı delesyon-insersiyon olmak üzere büyük çoğunluğu yanlış anlamlı mutasyonlardır ve yarısından fazlası 5, 6, 7 ve 8. ekzonlarda meydana gelmektedir (Cruts vd., 2012). *PSEN1* mutasyonlarına sahip bireylerde klinik semptomlar 30-50 yaşlarında kendilerini göstermeye başlamaktadır ve normal Alzheimer hastalığında görülen semptomlara ek olarak konuşma bozukluğu, sanrı, ilgisizlik, davranışsal semptomlar daha sık görülmektedir (Cacace vd.,2016; Bagaria vd., 2022).

PSEN2 (*Presenilin 2*): Presenilin 2 (*PSEN2*) geni, kromozom 1q31- q42 üzerine lokalize 448 aminoasitten oluşan bir transmembran protein olan PSEN2'yi kodlamaktadır. γ-sekretaz kompleksinin önemli bir diğer komponentidir. PSEN1 geniyle % 66 oranında homolojiye sahiptir. PSEN2 mutasyonu da PSEN1 mutasyonları gibi Aβ40/42 arasındaki dengenin bozulmasına neden olmaktadır. PSEN2 tarafından daha az amiloid peptid üretildiği gözlenmektedir. PSEN2

mutasyonları daha nadir görülmektedir, şimdiye kadar 80'den fazla patolojik mutasyon tanımlanmaktadır. PSEN2 ayrıca ekstraselüler sinyalleri düzenleyen kinazlara bağlanarak ROS aracığıyla β-sekretaz aktivitesini artırmaktadır. PSEN2 mutasyonuna sahip bireylerin klinik semptom gösterme yaşı 35-70 arasında geniş bir yelpazeye sahiptir, bu nedenle spektrumu belirlemek zorlaşmaktadır (Cacace vd., 2016; Giri vd., 2022).

2.2.3.2. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı

Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı (GBAH) Alzheimer hastalığına sahip vakaların yaklaşık % 95'ini oluşturmaktadır. GBAH'ın klinik özelliklerinde en sık epizodik hafızada belirgin bir zayıflama görülmektedir. Bununla birlikte akıl yürütme işlevinde bozukluk, dil ve görsel uzamsal yeteneklerin kaybı da diğer belirgin klinik özellikleri arasında yer almaktadır. Hastalığa ayrıca sinirlilik hali, depresyon, anksiyete gibi duygu durum bozuklukları da eşlik edebilmektedir (Rabinovici, 2019). GBAH genetik ve çevresel faktörlerin etkisinin görüldüğü multifaktöriyel bir hastalıktır. Aile öyküsü bu bireylerde çoğunlukla negatiftir ve olgular sporadiktir. Çoklu genlerin etkisi heterojenlik göstermektedir bu nedenle EBAH'dan daha karmaşık bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir (Ridge vd., 2016). GBAH'nın majör genetik risk faktörü olarak tanımlanan ilk gen *APOE* genidir. *APOE* geninin yanı sıra genomiks teknolojilerin gelişmesi ile GBAH ile ilişkisi keşfedilen çok sayıda gen tanımlanmaktadır (Van Cauwenberghe vd., 2016). *TREM2, BIN1, PICALM, ABCA7, CLU, SORL1* başta olmak üzere *CD33, CR1,EPHA1, DSG2, CD2AP, MEF2C, MS4A, HLA-DRB5/HLA-DRB1, INPP5D* genlerinde gözlenen bazı varyantların hastalık yatkınlığı oluşturduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Son yıllarda yapılan bir GWAS çalışmasında Alzheimer hastalığı ile ilişkili 40 lokus tanımlanmıştır ve *APOE, CR1, BIN1, TREM2, CLU, SORL1, ADAM10, ABCA7, CD33, SPI1, PILRA* hastalıkla ilişkili daha olası nedensel genler olarak düşünülmektedir. Alzheimer hastalığı riski yaklaşık %70 genetik faktörlere bağlıdır bu da multifaktoriyel hastalıklar arasında en yüksek kalıtımsallık oranına sahip olduğunu göstermektedir (Karch vd., 2015; Bellenguez vd., 2020; Andrews vd., 2020).

***APOE* (Apolipoprotein E):** 1993 yılında GBAH ile ilişkisi tanımlanan ilk risk faktörü olan APOE geni kromozom 19q13.2 üzerinde lokalize 299 aminoaside sahip bir lipoproteindir. Kolestrol metabolizmasında kilit rol oynayan APOE aynı zamanda beyinde astrositler ve mikroglialar tarafından ifade edilmekte ve APP'nin işlenmesi,

sinaptik fonksiyon, nörogenez gibi süreçlerde etki gösterdiği bilinmektedir. APOE'nin ε2, ε3, ε4 olmak üzere üç alleli bulunmaktadır (Van Cauwenberghe vd., 2016). APOE'nin 4. ekzonunda iki nükleotid polimorfizmiyle ortaya çıkan bu üç allel (ε2, ε3, ε4), üç farklı (E2, E3, E4) izoform oluşturmaktadır. En sık bulunan APOE3 izoformudur (Özpak vd., 2017).

APOE 'nin izoformlarının Aβ oluşumu ve birikimi üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. Alzheimer hastalığı patolojisiyle ilişkisi tanımlanmış olan bu izoformlardan ε4'ün varlığı hastalık riskini 3 kat arttırmaktadır. Homozigot APOE ε4 aleli için ise bu risk 12 kat artmaktadır. APOE4 daha fazla Aβ birikimine neden olmaktadır ve sinaptik plastisite, nörovasküler fonksiyonlar, nöroinflamasyon üzerinde etki göstermektedir. APOE4'ün varlığı hastalığın başlangıç yaşını da etkilediği ve APOE4 varlığında hastalığın yaklaşık 10 yıl daha erken başladığı tespit edilmiştir (St GeorgeHyslop, 2000).

Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkili diğer genler: Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığının oluşumunda rol oynadığı bilinen genler Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkili olan genler

AD patogenezinde rol oynayan genlerin potansiyel yolları	**AD patogenezinde rol oynayan genler**
Aβ Metabolizması	*APOE, CD33, CLU, CR1, SORL1, PICALM, BIN1, ABCA7, CASS4*
Lipid Metabolizması	*APOE, CLU, ABCA7*
İnflamatuar Yanıt	*CLU, CRI, BIN1, ABCA7, CD33, CD2AP, EPHA1, MS4A6A-MAS4A4E, TREM2, HLA-DRB5-CDRD1, INPP5D, MECF2C*
Hücre sinyalizasyonu	*PICALM, BIN1, CD2AP, CD33, SORL1, CLU, EPHA1, MS4A6A-MAS4A4E*
Hipokampal sinaptik fonksiyon	*MECF2C, PTK2B*
Hücre iskeleti işlevi ve aksonal transport	*CELF1, NME8, CASS4*
Gen ekspresyonu, post-translasyonel düzenleme ve mikroglial işlev	*INPP5D*

2.3. Vasküler Demans

Vasküler demans, ilk olarak 1672 yılında Thomas Willis tarafından beyne giden kan akışının bozulması ve inme sonrasında yaşanan kognitif kayıp ile tanımlanmıştır. Demans kavramının anlaşılmasıyla birlikte 1894 yılında Otto Binswanger çalışmalarıyla ‘’Binswanger rahatsızlığı’’ olarak bilinen hastalığı tanımlamıştır. Bu hastalık subkortikal vasküler demans olarak bilinmektedir ve subkortikal bölgelerdeki vasküler hasar ile beyaz madde hasarı ile ilişkisi bulunmaktadır (Sullivan vd., 2015). Binswanger ve Alzheimer’ın çalışmalarıyla demans formlarının birbirinden ayrılması, demansta modern tarihin başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Yang vd., 2016)

Günümüzde ise vasküler demans (VaD) beyinde meydana gelen vasküler birçok hasarla doğrudan ilişkili, çoklu büyük alanlar ya da laküner infarktlara bağlı

serabral kan akımında azalma ile karakterize olan ilerleyici ve klinik olarak anlamlı bilişsel bozukluğu kapsayan nörodejeneratif bir bozukluktur (Kumral vd., 2017). Beyinde meydana gelen vasküler hasarlar; inme, ateroskleroz, beyin enfarktüsü, iskemi olarak görülmektedir ve kişide unutkanlık, yavaş düşünme, akıl yürütme ve yargılamada yavaşlık, görev planlanması ve yürütmenin kaybı, depresyon ve anksiyete gibi belirtilerle kendini göstermektedir (Plassman vd.,2007).

Vasküler demans, tüm demans vakalarının yaklaşık % 20'sini oluşturan en yaygın ikinci demans türüdür (Plassman vd.,2007). Diğer demans türlerinde de olduğu gibi vasküler demans da yaşla birlikte ilerlemektedir ve tahmini prevelansının 65 yaşın üzerinde % 1.5 olduğu bilinmektedir (Sullivan vd., 2015). Vasküler demans için yaşa bağlı serebrovasküler faktörler ayırt edici özellikler arasındadır ve gelişmekte olan ülkelerde yaşlı nüfusun artmasıyla birlikte oranın % 30'larda olması tahmin edilmektedir (Zhai vd., 2022).

Vasküler demansın pek çok alt tipi bulunmaktadır. Bunlar; orta vasküler bilişsel bozukluk, çoklu enfarktüs demans, stratejik tek enfarktüs ile oluşan vasküler demans, laküner lezyonlarla oluşan vasküler demans, hemorajik lezyonlarla oluşan vasküler demans, Binswanger hastalığı, subkortikal vasküler demans, miks demans (Alzheimer ve vasküler demansın kombinasyonu) olarak sıralanmaktadır (Vijayan vd., 2020).

2.3.1. Vasküler demansın patolojisi

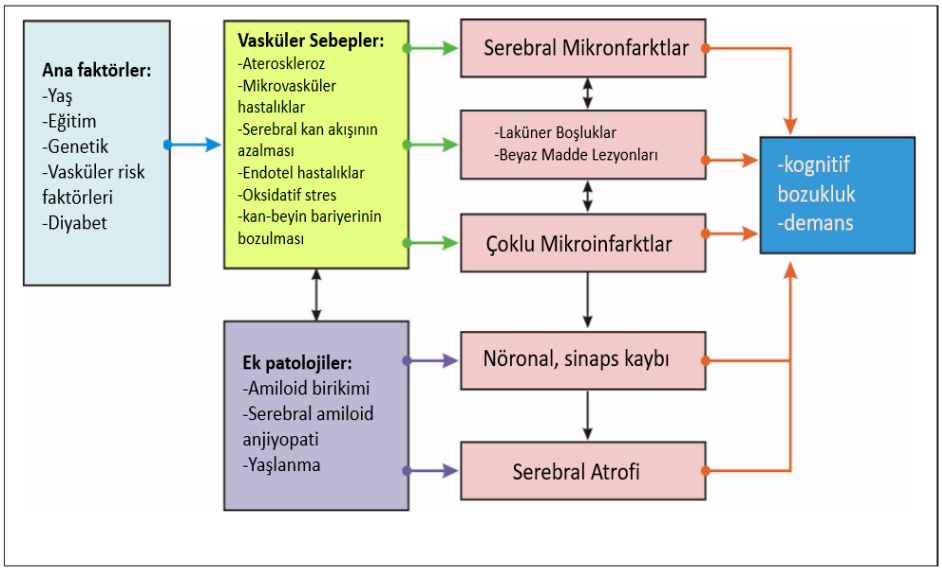
Vasküler demansın patolojisi, diğer vasküler ilişkili nöropatolojilerle ilişkilidir (Şekil 2.2.). Serebral kan damarlarında meydana gelen değişiklikler ve lezyonlar, bilişsel kayıp ve vasküler demans patolojisini oluşturmaktadır. Serebral küçük damar hastalığı (SVD), ateroskleroz (AS) ve serebral amiloid anjiyopati (SAA) en yaygın görülen vasküler demans patolojileridir. Vasküler demans, ilerleyen yaşlarda ortaya çıkmaktadır ve yaşla birlikte şiddeti artmaktadır (Jellinger, 2013).

Serebral küçük damar hastalığı (SVD), beyinde yer alan küçük arter lezyonlarıyla ilişkilidir. Lakunar infarktlar, mikrokanamalar vb. gözlenmektedir. Bazal gangliyonlara hasar veren bu lezyonlar sonucunda beyaz cevher etkilenerek vasküler demans patolojisini oluşturmaktadır (Hachinski vd., 2006).

Ateroskleroz, yağ birikimi sonucu damarların kalınlaşması ve aterosklerotik plakların oluşumu ile karakterize bir hastalıktır. Bu plaklar oksidatif stres ile birlikte

kan-beyin bariyeri (KBB) bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadırlar ve vasküler demans ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Grinberg vd., 2010).

Serebral amiloid anjiyopati, beyinde yer alan kan damarlarında amiloid β proteinin birikmesiyle karakterizedir. Amiloid β'nın bilişsel işlevi bozduğu bilinmektedir. Bu nedenle vasküler demansın patolojisinde serebral amiloid anjiyopatinin önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Iadecola, 2013).



Şekil 2.2. Vasküler demans patolojisinde yer alan faktörler (Jellinger, 2013)

2.3.2. Vasküler demansın risk faktörleri

Vasküler demans için ileri yaş, düşük eğitim, cinsiyet, vasküler risk faktörleri, inme varlığı ve inmenin nerede meydana geldiği gibi pek çok risk faktörü bulunmaktadır (T O'Brien vd., 2015). Bunlar arasında vasküler yaşlanmayı hızlandıran ve sonucunda serebral kan damarlarının aşınmasına yol açan risk faktörleri vasküler demans için önem taşımaktadır (Bir vd., 2021).

Diyabet: Dolaşımda yer alan glikozda meydana gelen değişiklikler, oksidatif stres oluşumunda yer alan reaktif oksijen türlerinin seviyelerini etkilemektedir (Bir vd., 2021). Genel olarak 65 yaş ve altında ortaya çıkan diyabet, nöroinflamasyon karakteristiğine etki ederek inme riskini artırmaktadır ve laküner enfarktüs, inme sonrası geniş vasküler hasarlara yol açmaktadır. Bunların sonucunda da vasküler demans riski önemli ölçüde artmaktadır (Xu vd., 2009).

Hipertansiyon: İnme, vasküler demans için önemli bir risk faktörüdür ve 60'lı yaşlarda gerçekleşen inmenin yaklaşık % 40'ı hipertansiyona bağlı olarak meydana gelmektedir (Rönnemaa vd., 2011). Anjiyotensin II (AngII) hipertansiyonda önemli bir role sahiptir. AngII, ROS düzeylerini arttırmaktadır ve sonucunda endotel hasarı, disfonksiyon gibi durumlar meydana gelmektedir (Romay vd., 2019).

Metabolik Sendromlar (MetS): Obezite, yüksek tansiyon gibi kardiyovaskülerite için risk faktörü olan etkenlerden en az üçünün bir araya gelmesiyle etki oluşturan metabolik sendromların, bilişsel bozulma üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. 60'lı yaşlarda metabolik sendromlara sahip bireylerdeki serebral kan akışındaki azalma, artmış inflamasyon ile ilişkili olarak vasküler demans riskini arttırmaktadır (Rouch vd., 2014).

Genetik Faktörler: Pek çok monogenik hastalığın vasküler demansla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında en iyi tanımlanan monogenik nedenler olarak *CADASIL (NOTCH3), CARASIL (HTRA1),* küçük damar arteriyopatisi ve beyin kanaması *(COL4A1/ COL4A2),* Serebro- Retinal vaskülopati *(TREX1)* ve Fabry hastalığı *(GLA)* sayılabilir (Romay vd., 2019). Bu monogenik hastalıklar ve ilişkili genler Tablo 2.3.'de yer özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Vasküler demansın monogenik nedenleri

Hastalık	**Gen**	**Bilinen Fonksiyonları**
CADASIL	*NOTCH3*	Vasküler yumuşak kas hücrelerinde reseptör
CARASIL	*HTRA1*	Hücre dışı matriksi degrede eden serin peptidaz
SVACH	*COL4A1*	Bazal membranın yapısal bileşeni
RVCL	*TREX1*	DNA'yı degrede eden ekzonükleaz
Fabry	*GLA*	Glikosfingolipidlerin degredasyonu

2.3.3. Vasküler demansta rol alan genetik faktörler

2.3.3.1. CADASIL (subkortikal enfarktüsler ve lökoensefalopati ile serebral otozomal dominant arteriyopati)

Subkortikal enfarktüsler ve lökoensefalopati ile serebral otozomal dominant arteriyopatiyi tanımlayan CADASIL; 19. kromozomda lokalize *NOTCH3* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Otozomal dominant geçişli olan CADASIL, beş ana semptom ile ilişkilidir. Bunlar; auralı migren, subkortikal iskemik olaylar, ilgisizlik gibi duygudurum bozuklukları, bilişsel bozukluk ve diğer klinik bulgular şeklindedir. Auralı migren 30'lu yaşlarda başlar ve görülen ilk semptomdur. Auralı migren, CADASIL'e sahip olguların %20-40'ında genel populasyondan beş kat daha fazla görülmektedir. Subkortikal iskemik olaylar oldukça sık gözlenir ve ortalama 45 yaşlarında başlamaktadır. İskemik olaylar, çoğunlukla subkortikaldir ve hastaların yaklaşık %65'inde lakunar sendromlar olarak görülmektedir. Bu hastalıkla ilişkili yaklaşık 150'den fazla mutasyon tanımlanmıştır ve tüm CADASIL mutasyonları, EGFR 2-5'i kodlayan ekzon 3-4'de güçlü kümelenmeler şeklinde gerçekleşmektedir (Chabriat vd., 2009).

2.3.3.2. CARASIL (subkortikal enfarktüsler ve lökoensefalopati ile serebral otozomal resesif arteriyopati)

Subkortikal enfarktlar ve lökoensefalopati ile serebral otozomal resesif arteriyopati (CARASIL); kromozom 10q26'da lokalize *HTRA1* geninde meydana gelen biallellik mutasyonların sebep olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Klinik olarak inme, demans, alopesi ile karakterizedir. *HTRA1*'in işlevinin azalması ya da tamamen ortadan kalkması ile HTRA1 enzimi TGF-β ailesine ait sinyalleri inhibe edememektedir, bunun sonucunda oluşan TGF-β'nın aşırı sinyalizasyonu ile beyindeki küçük kan damarları yapısal değişikliğe uğramaktadır. Beyinde meydana gelen bu kan- damar anormallikleri nöronların ölümüne neden olmakta, inme ve demans riskini artırmaktadır. CADASIL'e göre daha nadir görülmektedir ve CARASIL' e sahip olan hastaların çoğunluğu lakunar tipte tekrarlayan iskemik inmeler yaşamaktadırlar. Beyin fonksiyonlarının progresif bozulmaları ile 30-40 yaşları arasında demans ortaya çıkabilmektedir. Bilişsel bozulmalar CADASIL'den daha şiddetli görülmektedir (Tikka vd., 2014; Fukutake, 2011).

2.3.3.3. SVACH (hemorajik inme ilişkili küçük damar hastalığı)

Tip-IV kollajenler bazal membran proteinleridir ve tüm dokularda eksprese halde bulunmaktadırlar. *COL4A1* ve *COL4A2* genleri tarafından kollajen tip IV alfa1 ve 2 zincirleri kodlanır. *COL4A1* 52, *COL4A2* 48 ekzona sahiptir ve kromozom 13'ün 13q34 bölgesinde lokalizedirler. *COL4A1*'de meydana gelen heterozigot mutasyonlar prenatal serebral kanama, konjenital pronsefali, hemorajik inme ilişkili serebral küçük damar hastalığı ile ilişkili olup çoğunlukla otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır. *COL4A2* de *COL4A1* ile yüksek homoloji göstermektedir. Hastalıkta gözlenen patojenik mutasyonlar genellikle glisin kalıntılarını içeren missense mutasyonlardır. Klinik olarak bu genlerde meydana gelen mutasyonlar özellikle serebral anevrizmalar, küçük damar beyin hastalığı, inme açısından önemlidir. Bunun yanında katarakt, Axenfeld-Rieger sendromu, böbrek tutulumu, kramplar, kardiyak aritmi olmak üzere geniş bir anomali yelpazesine sahiptir (Kuo vd., 2012; Guey vd., 2022).

2.3.3.4. RVCL (serebral lökoensafalopati ilişkili retinal vaskülopati)

TREX1, kromozom 3p21 üzerinde lokalize tek ekzon tarafından kodlanan, 314 aminoaside sahip bir gendir. Bu genin C-terminal bölgesinde meydana gelen frameshift mutasyonlar sonucu RVCL (serebroretinal vaskülopati (CRV), kalıtsal vasküler retinopati (HVR) ve kalıtsal endotelopati, retinopati, nefropati ve inme (HERNS)) oluşmaktadır. Frameshift varyantlar, işlev disfonksiyonu ve toksik etki oluşturmaktadır. RVCL, yetişkin başlangıçlı, belirli immünolojik bulguları olmayan nörolojik bir hastalıktır. Serebral beyaz cevher lezyonları yaygın olarak görülmektedir (Saito vd., 2019; Weerasekare vd., 2021).

2.3.3.5. Fabry hastalığı

Fabry hastalığı; globotriaosilseramid (Gb3) katabolizmasında rol alan lizozomal galaktosidaz A'nın (GLA) azalmış aktivitesi ile ilişkili X'e bağlı bir hastalıktır. Lizozomal galaktosidaz A, Xq22'de lokalize yedi ekzona sahip *GLA* geni tarafından kodlanmaktadır ve insersiyon, delesyon, missense, nonsense mutasyonlar gibi çeşitli mutasyonların meydana gelmesiyle Fabry hastalığı oluşmaktadır. Hastalık ile ilişkili 900'den fazla mutasyon bilinmektedir. Prevelansı 1/3100 ile 1/117.000 arasında değişmektedir. X'e bağlı kalıtıma sahip olduğundan erkek hastalar ciddi şekilde etkilenir, kadınlar ise asemptomatiktir. Nöropatik ağrı, gastrointestinal

anormallikler, böbrek ve kardiyak fonksiyonların bozulması, serebrovasküler tutulum gibi belirgin klinik özelliklere sahiptir (Li vd., 2019; Amodio vd., 2022)).

2.3.3.6. Polimorfizmler

Monogenik nedenlerine ek olarak yapılan pek çok GWAS çalışması ile çoklu risk allelleri de tanımlanmıştır. *CLDN1*'in polimorfizmleri küçük damar vasküler demansı ile ilişkili bulunmuştur. Kan-beyin bariyerini oluşturmaya katkıda bulunan *CLDN1*, aynı zamanda endotel hücreler arasındaki akışın düzenlenmesinde de görev almaktadır. Lipid metabolizmasında yer alan *APOE, PON1, CLU, ABCA7* gibi bazı genler de vasküler demans için risk oluşturmaktadır. *FOXF2* varyantının beyaz cevher hiperintensitesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve inme riskini önemli ölçüde artırmaktadır. İnflamasyonla ilişkili düzenleyici görevleri bulunan *TNF-alfa* ve *TGF-beta1* polimorfizmleri ile vasküler demans arasında yüksek oranda ilişkili bulunmaktadır. Bunlara ek olarak; *TSPAN2, PITX2, ZFHX3, ADAMTS2, RIM29, LSLR, SMARCA4, PTPRF, FGA, ALDH2, CDK6, TWIST1, MMP12, WNT2B, NEDD4, ZFHX3, CLDN17, ATG7, KNG1, CACNB2, HDAC9* polimorfizmlerinin büyük arter ateroskleroz inme ve *ALDH2* polimorfizmlerinin küçük arter inme ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Vasküler bütünlüğe etki etmedeki rolleri düşünüldüğünde yapısal bileşke proteinlerinde daha fazla polimorfizm veya mutasyonun genetik risk faktörü olarak ortaya çıkması muhtemeldir (Romay vd., 2019).

2.4. Alzheimer Hastalığı ve Vasküler Demansın Tanısı

Günümüzde demans tiplerinin tanısında klinik semptomlar ve beyin lezyonlarının korelasyonuna bakılmaktadır. Bunun için de yaygın olarak görüntüleme yöntemleri ve biyobelirteçler kullanılmaktadır. Farklı demans türleri arasında yalnızca Alzheimer hastalığı için biyobelirteçlerden yararlanılmaktadır. Alzheimer hastalığı için beyin omurilik sıvısı kullanılarak β-amiloid ve tau proteinleri biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir. Bu biyobelirteçlerin değişmiş seviyeleri Alzheimer hastalığında ayırıcı tanısında yararlı olmaktadır (Idda vd., 2018). Vasküler demansta ise daha çok görüntüleme yöntemleriyle vasküleriteye bakılarak tanı konulmaktadır (Bir vd., 2021). Tanıda, demansların monogenik formları için yeni nesil sekans teknolojileri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır.

Demans türlerinin tanısında invaziv yöntemlerin kullanılması hasta için ağrılı ve zor olabilmektedir ve demans türlerinin kesin tanısı postmortem incelemeler ile

mümkün olmaktadır. Bunun için farklı demans tipleri arasında ayırıcı gücü yüksek, spesifik non-invaziv biyobelirteçlerin kullanımı gündeme gelmiştir. Tanıda kullanılabilir olması için biyobelirteçlerin; hastalıkların patolojisiyle direkt ilişkili olması, erken evrelerde pozitif olması, tanı ve tedavi için aydınlatıcı, klinik bulgularla korele, non invaziv, ucuz ve tekrar örnek alımına uygun olması gerekmektedir. Bu özelliklere en iyi uyum sağlayan kaynak serum ve plazmadır. Dolaşımda yer alan miRNA'ların kararlı yapıları ve farklı patolojilerde etkin rol oynamaları ile biyobelirteç olarak kullanılabilirliği son yıllarda ivme kazanan araştırma konularından biridir. (Wu vd., 2016).

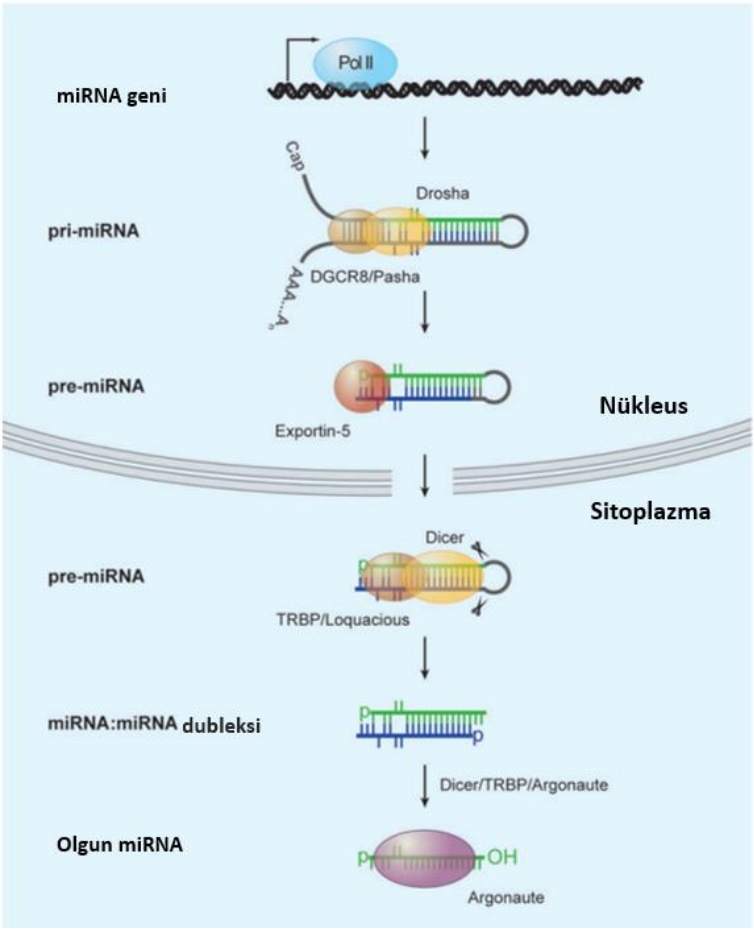
2.5. MikroRNA

MikroRNA'lar; 19-23 nükleotid uzunluğunda fonksiyonel, küçük, kodlamayan RNA moleküleridir. İlk olarak, 1990'lı yıllarda Lee. ve ark. tarafından *C. elegans* üzerinde yapılan çalışmalarla keşfedilmiştir. MikroRNA'lar memeli genomunun yaklaşık %1-3'ünü oluşturmaktadır. miRNA dizileri çeşitli organizmalarda güçlü biçimde korunmaktadır. miRNA'lar belli bir substratı hedef almak yerine bir dizi mRNA'nın translasyonunu düzenlemektedirler. mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanarak, translasyonu baskılama ya da degredasyonu düzenlemeyi kontrol ederek gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görevlidirler. Tüm doku ve hücrelerde ifade edilirler ve çok sayıda hücresel sürecin epigenetik düzenleyicileridir. Hücresel gelişim, çoğalma, farklılaşma, homeostaz, apoptoz gibi biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır (Huang vd., 2017; Wang vd., 2021; Boccardi vd., 2023).

2.5.1. MikroRNA biyogenezi

Nükleusta, miRNA genlerinden RNA polimeraz II enzimleri aracılığıyla 3-4 kb uzunluğunda, 5'cap ve poliA içeren karmaşık yapılı primer mikroRNA (pri-miRNA) sentezlenmektedir. pri-miRNA bir sonraki adımda, RNAz III üyesi olan Drosha ve DGCR8 proteinlerinin oluşturduğu kompleks ile 5'ucunda monofostat, 3'ucunda hidroksil uzantısı bulunan pre-miRNA'ya dönüşmektedir. DGCR8 RNA yapısını tanımaktadır. Drosha çift iplikli saç tokası yapısındaki molekülü keserek katalitik birim olarak görev almaktadır. Pre-miRNA'lar exportin-5 aracılığıyla yıkımdan korunarak sitoplazmaya taşınır. Taşınma işleminin ardından başka bir RNaz III enzimi olan Dicer ile 22 nükleotidlik matür miRNA dönüşümü gerçekleşmektedir ve dubleks halde bulunan miRNA açılarak komplementer zincir açığa çıkmaktadır. Bir

sonraki aşamada termodinamik özelliklerine göre bu ipliklerden biri degrede olurken diğeri, transaktivasyondan sorumlu RNA bağlanma proteini (TRBP), PKR aktive edici protein (PACT) ve Argonaute-2 (Ago-2) proteinlerinden oluşan bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksine katılarak RISC kompleksini oluşturmaktadır. Oluşan miRISC kompleksi hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak mRNA kesimi, translasyonel baskılama ve hedef genin aktivasyonu, kromatin yapısının düzenlenmesi gibi fonksiyonları yönlendirmektedir (Bushati vd., 2007) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. miRNA biyogenezi (Bushati vd., 2007)

2.5.2. MikroRNA'ların nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi

MikroRNA'ların büyük bir kısmı nöronlara özgü olup özellikle aksonlarda ve sinapslarda zengindir. miRNA'ların yaklaşık %70'i beyinde ifade edilmektedir. MikroRNA'ların ifadelerinde değişikliklerin meydana gelmesi ile nöronların farklılaşması, sinapsların bütünlüğü bozulması, nöronların ölümü ve nihayetinde

anormal beyin gelişimi ve farklı nörodejeneratif hastalıkların oluşumu gözlenmektedir (Silvestro vd., 2019).

Yapılan çalışmaların pek çoğunda nörogenez ile ilişkili olarak miR-9, miR-132 ve miR-134'e rastlanılmış ve ifadelerindeki değişimlerin bilişsel bozukluk ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Ma vd., 2020; Van der Berf vd., 2020; Siedlecki- Wullich vd., 2021). miR-155'in immünite için önemli olduğu bilinmekte ve ekspresyon düzeyinin artışıyla miyeloid hücre çoğalması baskılanarak oksidatif stres ve kan beyin bariyerinin bozulmasına yol açmaktadır (Silvestro vd., 2019). miR-124 ifadesi nöron oluşumu, nöron farklılaşması, akson oluşumu ve apoptozu etkilemektedir (Siedlecki-Wullich vd., 2021). miR-223'ün glutamat eksitotoksitesi ve akson gelişimi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Nguyen vd., 2022).

MikroRNA'lar, sinaptik düzenin korunması ve nörodejenerasyon üzerindeki düzenleyici rolleri nedeniyle karmaşık yapıya sahip ve mekanizmaları henüz tam olarak çözümlenememiş pek çok nörodejeneratif hastalık için potansiyel tanı araçları olarak görülmüştür. Mevcut tanıların invaziv bir yöntem olan BOS biyobelirteçleri ya da pahalı ve zor ulaşılabilir yöntemler olan nükleer tıp yöntemleri ile konması non-invaziv, kolay ulaşılabilir ve daha ucuz yöntem arayışına yönlenilmesine sebep olmuştur. Dolaşımda yer alan ve kararlı olan mikroRNA'ların ifadelerindeki değişikler demans türleri arasında farklılık göstermektedir ve ayırıcı tanı için önemli hale gelmektedir. Spesifik mikroRNA'ların tanımlanması; demans türlerinin erken evrelerde tespitininin sağlanması, prognostik sürecinin takibi, potansiyel tedaviler geliştirilmesi ve daha iyi terapötik sonuçlar elde etme olasılıkları bakımından önem taşımaktadır (Siedlecki- Wullich vd., 2021; Nguyen vd., 2022).

Farklı dokularda ifade edilebilen mikroRNA'ların hipokampus, serebellum ve orta frontal girustaki değişimlerinin Alzheimer hastalığının oluşumunda etkisi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda miRNA'ların Alzheimer hastalığının oluşumundaki rolüne yönelik pek çok miRNA tanımlanmıştır. Alzheimer hastalığının patolojisinde rol oynayan ve farklı moleküler patolojileri hedef alan miRNA'lara yönelik çalışmalarda, Aβ düzenlenmesinde; miR-149, miR-128, miR-126, tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ve birikiminde; miR-483, miR-15, miR-101'in artan ifadeleriyle birlikte, miR-29, miR-206, miR-299, miR-10 ifadelerindeki azalma sonucu sinaptik düzenlemenin bozulması, nöroinflamasyon ve otofajinin bozulmasında önemli rolleri olduğu tespit edilmiştir (Patel vd., 2008, Kou vd., 2020;

Nguyen vd., 2022). miR-125 ve miR-146 ifadesinin artması inflamatuar transkripsiyon faktörü olan NF-kB'yi artırarak nöroinflamasyonda etkili olmaktadır. miR-26, mir-34, miR-107 ifadelerinin nöronlarda hücre döngüsü ve apoptoz da değişiklik göstererek bellekte bozulmaya yol açmaktadır (Swarbrick vd., 2019).

Kronik serebral hipoperfüzyon, vasküler demans için önemli bir risk faktörüdür (Vijayan vd., 2020). miR-195'in baskılanması amiloid oluşumu ve düzenlenmesini bozarak kronik serebral hipoperfüzyon (KKH) kaynaklı bilişsel kayba yol açabileceği bildirilmiştir. miR-9'unda KKH patogenezinde yer aldığı tespit edilmiştir. miR-9'un hipokampus ve serebral kortekste artışıyla BACE1'in ekspresyonunu baskılayarak vasküler demansa yatkınlık oluşturduğu rapor edilmiştir. miR-9'un antogomirleri kullanılarak yapılan çalışmada, kolinerjik nöral fonksiyonların iyileştirilebildiği, oksidatif stresin azaltılabileceği ve böylece nöral kayıpların önlenebileceği bildirilmiştir (Wei vd., 2017; Xie vd., 2017). miR-96'nın mTOR'un düzenlenmesine katkısıyla birlikte KKH'ın otofajisi üzerinde de iyileştirici etkisi bulunmuştur. Vasküler demansın patolojisinde yer alan beyaz cevher lezyonları ve biliş bozulmalarında miR-501'in yüksek ifadesine rastlanılmış ve sıkı bağlantı noktalarının hasar alması ile birlikte kan beyin bariyerinin bozulmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte antagomiR-21'in kan beyin bariyeri üzerinde onarıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir. miR-126 ifadesi mikroglial/astrosit aktivasyonunu artırarak nöroinflamasyonu teşvik etmekte, miR-181'in ise sinaptik bağların oluşumunu baskılayarak vasküler demansa yatkınlık oluşturduğu düşünülmektedir (Vijayan vd., 2020; Zhang vd., 2020). Literatürde farklı mekanizmalar yoluyla hastalıkla ilişkili olabilecek diğer bazı miRNA'lar Tablo 2.4.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Alzheimer ve vasküler demans ile ilişkili olan miRNA'lar

miRNAlar	**Hedef**	**İlişkili Fonksiyonlar**	**Referans**
miR-9, miR-107, miR29a/b	BACE1	TNF-α, ephrin-A2 ve APP'nin kesimi	Hebert vd., 2008, Schonrock vd., 2012, Wang vd., 2008
miR-23a, miR-34a, miR-107, miR-451	ADAM10	Amiloidojenik olmayan APP süreci	Sarkar vd., 2019, Cohen vd., 2011, Wang vd., 2008
miR-26b, miR-206	IGF1	Sinaps olgunlaşmasında rol oynayan büyüme faktörü	Liu vd., 2016
miR-132, miR-206	BDNF	Sinaptik plastisitede rol oynayan nörotrofik faktör	Lee vd., 2012
miR-31	APP, BACE1	APP ve BACE1'in aktivitesi	Barros-Viegas vd., 2020
miR-200b/c	APP	Aβ salgılanması ve Aβ kaynaklı bilişsel bozuklukta azalma	Liu vd.,2014
miR-124	BACE1	Aβ oluşumunu engeller.	Zhang vd., 2017
miR-93	TLR4	İnflamatuar yanıtı artırır.	Shang vd., 2019, Liu vd., 2018
miR-181c	TRIM2, NR1	Uzun süreli iskemiye adaptasyonu artırır.	Fang vd., 2017

Vasküler demanslar ve Alzheimer hastalığı ile ilgili ayrı çalışmalarda biyobelirteç olarak kullanılabilecek çok sayıda miRNA tanımlanmış olsa da, bu iki hastalığı tanısal olarak ayırabilen bir biyobelirteç olabilecek miRNA arayışı son dönemlerde önem kazanmıştır. Literatür verileri değerlendirildiğinde bu demans tipleri arasında miR-29a, miR-31 ve hedefledikleri genlerde farklı ekspresyon seviyeleri bildirilmiştir (Dong vd., 2015; Ragusa vd., 2016).

2.5.3. miRNA-29a

miR-29 ailesi, merkezi sinir sisteminde bulunan, nörodejenerasyon ve nöronal sağ kalımla ilişkisi iyi tanımlanan bir miRNA kümesidir. Bu aile, miR-29a, miR-29b ve miR-29c'den oluşmaktadır. Beynin hipokampus bölümünde yüksek oranda ifade edilmektedirler. Hücre dışı matriksde görev alan genlerin bazılarını baskılayarak hücre dışı matriksin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadırlar (Ma vd., 2020).

miR-29a, tüm hücre döngülerinde yapısal olarak ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda miR-29a'nın normal dokularda yüksek oranda eksprese edildiği fakat bunun yanında nöroblastom, sarkomlar, beyin tümörleri ve tümör hücre dizileri de dahil olmak üzere tümör spektrumunda ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir. miR-29a- p53 ilişkişi apoptozu baskılamaktadır, pek çok kanser türünde antitümör özellikleri göstermektedir. Kalp, karaciğer gibi organların fibrozunda yer almaktadır. İnflamasyon, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerde de etkin rol oynamaktadır (Hebert vd., 2008).

miR-29a ifadesi, nöral kök hücreleri etkilemektedir. Kendilerini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahip olan nöral kök hücreler, nörogenez için çok önemlidir. miR-29a'nın ifadesinin artması ile nöral kök hücrelerin nörit büyümesini baskıladığı tespit edilmiştir. Hedeflediği genlerle sinaps oluşumu ve regülasyonu üzerinde etki gösteren miR-29a'nın, aktinlerin iskelet yapılarının oluşumu ve hipokampal nöronal hücre ölümü üzerinde etkileri bulunmaktadır (Roshan vd., 2014).

miR-29a'nın ifadesinin değişmesi, *BACE1* genini modüle ederek APP ekspresyonu üzerinde etki göstermektedir. Sporadik AH olgularının %30'unda BACE1 protein ekspresyonunun arttığı gözlenmektedir. miR-29a'nın azalan ifadesinin, beyinde BACE1'in ifadesinin artmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Kiko vd., 2014)

2.5.4. miRNA-31

miR-31 evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuştur. Embriyonik gelişim, inflamasyon, hücre apoptozisi, fibroz gibi pek çok farklı süreçte yer almaktadır (Makhas vd., 2010).

miR-31 testislerde ifade edilirken, yumurtalıklarda eksprese edilmemektedir. Bu nedenle spermatogenez süreci üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır.

Embriyogenezin düzenlenmesi ve özellikle vasküler gelişimde hedefledikleri genler üzerinde ifade değişimlerinin doğrudan etkileri bulunmaktadır. miR-31 ayrıca kemik oluşumu ve gelişiminde mezenkimal hücrelerde ifade edilmektedir. Hücrelerin çoğalması ve apoptoz arasında rol alan miR-31'in ekspresyon paternindeki değişiklikler pek çok kanser türünde gözlenmektedir. Özellikle glioblastoma üzerinde tümör baskılayıcı özellikte olduğu bildirilmiştir (Stepicheva vd., 2016).

İnflamasyon, oksidatif stresin ortaya çıkmasıyla gerçekleşmekte ve nörodejenerasyona sebep olmaktadır. mir-31'in aşırı ifade edilmesi hedef geni olan BACE1 ve APP'nin aktivitesine doğrudan etki ederek baskılamaktadır. Hipokampuste gerçekleşen bu olayda hem BACE1 hem APP ifadelerini aynı anda azaltabilme özelliğindedir. Bu nadir özellik ile miR-31'in, Aβ proteinlerinin hücre içi birikimini azalttığı gözlenmektedir. Böylece nöropatolojiyi hafifleterek hafıza ve biliş üzerinde iyileştirici ve koruyucu rolü bulunmaktadır. Alzheimer hastalarının serumunda azaldığı bildirilen miR-31, hastalığın ilerlemesini önlemek açısından önemlidir. Vasküler demansta ise miR-31'in artmış ifadelerine rastlanmaktadır. miR-31 hem biyobelirteç hem de terapötik hedef olabilecek bir nitelikte olduğu düşünülmektedir (Barros- Viegas vd., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Alzheimer hastalığı ve vasküler demans tanısı almış olgulardaki miR-29a ve miR-31'in ekspresyon profillerinin değerlendirildiği çalışmamız, Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı işbirliğinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız ESOGÜ BAP 2372 nolu proje kodu ile desteklenmiştir.

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışma için ESOGÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun, 31.03.2021 tarih ve 41 numaralı kararıyla onay alınmıştır.

Çalışmamızın güç analizleri ile yüksek güvenirliği olan verilere ulaşabilecek hasta ve kontrol gruplarının sayılarını belirlemek için Dong ve ark. ile Ragusa ve ark. çalışma verileri temel alınmıştır (Dong vd., 2015; Ragusa vd., 2016). Hasta ve kontrol grupları için etki büyüklüğü yaklaşımı ile yapılan güç analizinde tip I hata oranı % 5, yüksek düzeyde etki büyüklüğü (EB=0.40) ve güç oranı %80 kabul edilerek yapılan hesaplamalar sonucunda çalışmaya grup başına 22 kişi olmak üzere toplamda en az 66 kişinin dahil edilmesi önerilmiştir. Güç analizinde G Power 3.1.9.2 programı kullanılmıştır.

Hasta grubu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı demans polikliniğine başvuran ve Alzheimer hastalığı veya vasküler demans tanısı alan bireylerden oluşturulmuştur. Sağlıklı kontrol grubuna ise kognitif yakınması olmayan, yaş-eğitim-cinsiyete göre belirlenmiş normlar aralığında nöropsikolojik değerlendirme skorları normal aralıkta olan nörolojik veya ciddi psikiyatrik hastalık öyküsü olmayan bireyler dahil edilmiştir. Bu çalışmaya, hasta grubu olarak Alzheimer hastalığı tanısı almış 30 kişi, vasküler demans tanısı almış 30 kişi ve herhangi bir nörodejeneratif hastalığı bulunmayan 30 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 90 bireyin periferik kan örnekleri dahil edilmiştir. Hem hasta hem de kontrol grubu olmak üzere gönüllü olan bireylerden aydınlatıcı onam formu alınmıştır. Her bireyden 5 ml periferik kan örneği alınmıştır. Hasta ve kontrol örneklerine ait moleküler analizler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında hasta ve kontrol gruplarının oluşturulmasında dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıda verilmiştir.

Hasta gruplarına ilişkin örneklerin dahil edime kriterleri:

Alzheimer hastaları için;

-NINCDS-ARDRA (National Instute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer Disease and Related Disorders Association) tanı kriterlerine göre olası Alzheimer tipi demans tanısı almış olması

-Klinik Demans Derecelendirme Ölçeği 1 (hafif evre Alzheimer hastalığı) ya da 2 (orta evre Alzheimer hastalığı) puan almış olması

-Fazekas MR beyaz cevher lezyonlarını derecelendirme skorunun 0 veya 1 olması

-Kognitif değerlendirmeyi bozabilecek başka bir nörolojik ve psikiyatrik hastalığı olmaması (iskemik ya da hemorajik serebrovasküler olay, entelektüel düzey yetersizliği, epilepsi, Parkinson hastalığı, depresyon Alzheimer dışı demans tipleri, motor nöron hastalığı, demiyelinizan hastalıklar, duygudurum bozuklukları, alkol ve madde bağımlılığı vb.)

Vasküler demans hastaları için;

-National Institute of Neurological Disorders and Stroke an International Workshop with support from the Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN) tanı kriterlerine göre vasküler demans tanısı almış olması

-Fazekas MR beyaz cevher lezyonlarını derecelendirme skorunun > = 2 olması

-Kognitif değerlendirmeyi bozabilecek başka bir nörolojik ve psikiyatrik hastalığı olmaması (entelektüel düzey yetersizliği, epilepsi, Parkinson hastalığı, depresyon Alzheimer ve diğer nörodejeneratif demans tipleri, motor nöron hastalığı, demiyelinizan hastalıklar, duygudurum bozuklukları, alkol ve madde bağımlılığı vb.)

Hasta grubu dışlanma kriterleri:

Alzheimer hastaları için;

-Fazekas MR beyaz cevher lezyonlarını derecelendirme skorunun 0 veya 1'den farklı olması

-Kognitif değerlendirmeyi bozabilecek başka bir nörolojik ve psikiyatrik hastalığı olması (iskemik ya da hemorajik serebrovasküler olay, entelektüel düzey yetersizliği,

epilepsi, Parkinson hastalığı, depresyon, Alzheimer dışı demans tipleri, motor nöron hastalığı, demiyelinizan hastalıklar, duygudurum bozuklukları, alkol ve madde bağımlılığı vb.)

Vasküler demans hastaları için;

-Fazekas MR beyaz cevher lezyonlarını derecelendirme skorunun <=2 olması

-Kognitif değerlendirmeyi bozabilecek başka bir nörolojik ve psikiyatrik hastalığı olması (entelektüel düzey yetersizliği, epilepsi, Parkinson hastalığı, depresyon, Alzheimer ve diğer nörodejeneratif demans tipleri, motor nöron hastalığı, demiyelizan hastalıklar, duygudurum bozuklukları, alkol ve madde bağımlılığı vb.)

Kontrol grubu dahil edilme kriterleri:

-Kognitif herhangi bir yakınması olmaması

-Objektif testler ile kognitif bozukluğunun olmadığının gösterilmiş olması

-Kognitif değerlendirmeyi bozabilecek bir nörolojik ve psikiyatrik hastalığı olmaması (iskemik ya da hemorajik serebrovasküler olay, entelektüel düzey yetersizliği, epilepsi, Parkinson hastalığı, depresyon Alzheimer dışı demans tipleri, motor nöron hastalığı, demiyelinizan hastalıklar, duygudurum bozuklukları, alkol ve madde bağımlılığı vb.)

-Klinik Demans Derecelendirme Ölçeği 0 (sıfır) olması

Hasta ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in ekspresyonlarını belirlemek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan sarf malzemeler

-Rna İzolasyon Kiti (San Prep Column MicroRNA Mini-Prep Kit, cat no: SK8811)

-Beta Merkaptoetanol (M3148 Sigma-Aldrich 2-Mercaptoethanol, cat no: CAS Number 60-24-2)

-Proteinaz K (Thermo Scientific™ Proteinase K, recombinant, PCR grade, cat no: EO0491)

-Kloroform İzoamilalkol (Merck Isoamyl Alcohol, cat no: 516726)

-Nükleaz Free, Ultra Distile Su (Biochrom AGUltra Pure Water, Sterile, Suitable for HPLC, cat no: L0015-BC)

-cDNA Kiti (MiRNA All-In-One Cdna Synthesis Kit, cat no: G898)

-Real Time PCR Master Mix (Blastag 2X qPCR Master Mix, cat no: G891)

-Distile su (Thermo Scientific™ Water, Nuclease-free, Molecular Biology Grade, Ultrapure, cat no: 7732-18-5)

-MicroAmp™ Optical Adhesive Film

-MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 Ml

-Spin kolonu filtreler ve toplama tüpleri (2ml)

-Eppendorf tüp 1,5 ml

-Vascusera EDTA'lı tüp 9 ml (Disera)

-Steril mikropipet uçları (10-100-1000 µl)

3.2.2. Kullanılan cihazlar

- -80°C buzdolabı (Panosonic MDF-U5386S-PE, Ultra- Low Tempature Freezer, -Panosonic Healthcare Co, Ltd)

- -20°C buzdolabı (Arçelik)

- +4°C buzdolabı (Arçelik)

-Soğutmalı santrifüj (AllegraX-30R Centrifuge, Beckman Coulter)

-Mikrosantrifüj (ISOLAB/LW5E001778)

-Vorteks (Heidolph Reax Control)

-Thermal Block (Bio TDB-120 BIOSAN)

-Florometer (Denovix, cat no: D-11-FX)

-PCR (Applied Biosystems™ MiniAmp™ Thermal Cycler, cat no: A37834)

-Real Time PCR (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System, cat no: 4376600)

-Sanrifüj (Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio)

-Mikropipet seti (10-100-1000 µl)

3.2.3. Kullanılan primerler

-U6 (kontrol) CAT: MPH00001 (Applied Biological Materials, ABM)

-hsa miR-29a CAT: MPH01310 (Applied Biological Materials, ABM)

-hsa miR-31 CAT: MPH01329 ((Applied Biological Materials, ABM)

3.3. Yöntem

3.3.1. Materyal alımı

Alzheimer hastalığı, vasküler demans tanısı alan ve kontrol grubunu oluşturacak örneklerin seçimi, alınması Nöroloji Anabilim Dalı Demans Polikliniği araştırma ekibi içerisinde yer alan klinisyenler tarafından yapılmıştır. Bütün çalışma ve kontrol grubu bireyleri ile görüşülmüş, çalışmanın amaç ve aşamaları anlatılarak gönüllü olanlardan onam formu alınmıştır.

3.3.2. Periferik kandan miRNA eldesi

Hasta ve kontrol gruplarından 5 ml periferik kan örneği, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere alınmıştır. Kan örnekleri, 6°C 1400g'de 10dk santrifüj edilmiştir. Serum 1,5ml'lik ependorf tüpe aktarılmış ve RNA elde edilene kadar -80°C'de saklanmıştır. RNA izolasyonunda San Prep Column MicroRNA Mini-Prep Kit kullanılmış ve aşağıdaki işlemler takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

1- 2'lik ependorf tüp içerisine 500 µl serum örneği alınmıştır, üzerine 500 µl miRNA eksraktör eklenip vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.

2- Üzerine 200 µl kloroform eklenip vortekslenmiştir, 12x000x g 10dk 4º santrifüj edilmiştir.

3- Üst faz temiz bir tüpe alınarak üzerine 1/3 Ethanol eklenmiştir. Pipetaj yapılmıştır.

4- Spin Column TR üzerine örnek yüklemesi yapılmıştır. 12x000x g 2 dk santrifüj edilmiştir.

5- Alt sıvı alınıp üzerine 2/3 ethanol eklenmiştir. Spin Column MR'a aktarılıp 12x000x g 2 dk santrifüj edilmiştir.

6- MikroRNA'ların bulunduğu spin column üzerine 500 µl yıkama bufferı RPE solüsyonu eklenmiştir. 12x000xg 30 sn santrifüj edilip alt sıvı atılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.

7- Spin kolon üzerine ekleme yapmadan boş bir şekilde 12x000xg 30 sn santrifüj edilmiştir.

8- 1,5 ml tüp üzerine kolon yerleştirilip kolon merkezine 20µl Rnase-Free su eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2dk beklenmiştir.

9- 12x000xg 30 sn santrifüj edilip elde edilen miRNA kullanılmak üzere -20 kaldırılmıştır.

3.3.3. miRNA ölçümü

1-Protein miktarı ölçümü için Qubit Buffer Mixi hazırlanmıştır. (Qubit™ microRNA Assay Kit Cat: Q32880)

2- 1 Örnek için 199 µl Qubit microRNA Buffer + 1 µl Qubit microRNA Reagent hazırlanmıştır.

3-Ölçüm için 0,5 'lik Qubit ölçüm ependorfuna 198 µl Qubit Buffer Mixi + 2 µl miRNA örneği eklenmiştir.

4- 2 dk inkübasyon sonrası ölçüm alınmıştır.

5- Örneklerin, Qubit miRNA Assay kite uygun şekilde miRNA'ya özgü daha hassas ölçüm yapabilen florometre ölçüm cihazında (Denovix, Cat: D-11-FX) miktarları ng/µl cinsinden ölçülmüştür.

3.3.4. cDNA sentezi

Elde edilen RNA'ların cihazda ölçülen değerleri ng/µl cinsinden olduğu için reaksiyon 5 ng'dan kurulmuştur. Gerekli hesaplamalar yapılmıştır ve Tablo 3.1.'de 1 örnek için cDNA standart reaksiyon değerleri verilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA Standart Reaksiyon (1 örnek için);

2X miRNA cDNA Sentez Süper Miks	10 µl
Enzim Miks	2 µl
RNA Tabakası	5 ng
dH2O	20 µl

-Reaksiyon kaç örnekse yukarıdaki birim değer o sayıya çarpılmıştır. 1.5 mL'lik ependorf tüpe konulmuştur.

-Hazırlanan miks eşit bir şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır.

-1 örnek başına miks karışımı totalde 10 µl olduğundan her bir örneğin RNA'sı eklenerek total hacim 20 µl'den çıkarılmıştır. Su miktarları bulunup miktarları eşitlenen tüm örneklerle cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur.

- Tablo 3.1.'de belirtilen koşullara göre sıcaklık ve süre değerleri Thermocycle cihazına (Applied Biosystems™ MiniAmp™ Thermal Cycler, cat: A37834) girilmiştir.

Tablo 3.2. cDNA sentez PCR koşulları

Ayarlar	**Adım 1**	**Adım 2**	**Adım 3**	**Adım 4**
Sıcaklık	37°C	50°C	85°C	4°C
Süre	30 dakika	15 dakika	5 dakika	∞

Örnekler 4°C adımına geldiğinde buz üzerine alınır**.**

3.3.5. Real time PCR

Kullanılacak her primer için standart real time PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Örnekler kuyucuklara dağıtılmıştır. Kuyucukların üzeri şeffaf optik okuyucu ile kapatılmıştır. Real Time PCR cihazına (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System, cat: 4376600) yüklenmiştir.

3.3.6. Ekspresyon analizi

cDNA eldesi yapılan örneklerde ekpresyon analizleri RT-PCR (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System) cihazında gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon analizinde kullanılan primer dizileri Tablo 3.2.'de gösterilmiştir. Ekspresyon çalışmasında izlenen protokol Tablo 3.3.'da anlatıldığı gibi her bir örnek için 20 µl miks hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plate konularak üzeri sealing ile kapatılmıştır. Sonrasında Tablo 3.4.'te gösterildiği şekilde PCR koşulları cihaza tanımlanarak reaksiyon başlatılmıştır. RT-PCR çalışması 40 döngü tekrarı ile yapılmıştır. Her bir örnek, belirlenen iki mikroRNA (miR-29a, miR-31) ve U6 (kontrol) açısından değerlendirilmeye alınmıştır. miRNA ekspresyon durumları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplama yöntemine göre yapılmıştır.

Tablo 3.3. Ekspresyon analizinde kullanılan primerler

miRNA Adı	Forward Primer Dizisi (5'→3')	Reverse Primer Dizisi (5'→3')
hsa-mir-29a	ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
hsa-mir-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU

Tablo 3.4. Real Time PCR kurulum bileşenleri

Reaktif	Miktar (µl)
Blastag 2X qPCR Master Miks	10 µl
cDNA	2,5 µl
Primerler (forward+ reverse)	2 µl
dH2O	5,5 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.5. RT-PCR protokolü

Sıcaklık	**Süre (dakika/saniye)**	**Döngü Tekrarı**
95°C	4 dk	40
95°C	15 sn	40
60°C	30 sn	40
72°C	30 sn	40

3.4. İstatiksel Analiz

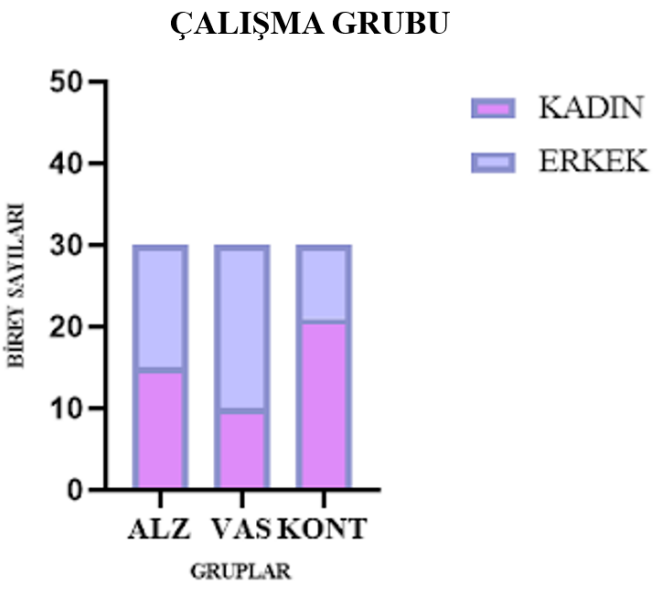
Verilerin analizi IBM SPSS 21 paket programı ile yapılmıştır. Nicel değişkenler ortalama, standart sapma ve ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılan değişkenlerde üç grup karşılaştırması Oneway ANOVA ile, dağılmayan durumlarda ise iki grup Mann Whitney U testi, üç grup Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin birbirleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde Spearman's Korelasyon analizi kullanılmıştır. IBM SPSS Statistics ver.25 programı ile Receiver operating characteristic (ROC) eğrileri oluşturulmuş ve her bir aday miRNA için eğri altında kalan alan (AUC), hassaslık ve özgüllük değerlendirilmiştir. Analiz sonucu istatistiksel olarak $p<0,05$ olan durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya ESOGÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalına başvuran Alzheimer hastalığı tanısı almış 30 hasta, vasküler demans tanısı almış 30 hasta ve 30 kontrol dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol olmak üzere toplamda 90 bireyde serum miR-29a ve miR-31'in ekspresyon profilleri değerlendirilmiştir.

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamıza tanı almış 30 Alzheimer hastası (%33,3), 30 vasküler demans hastası (%33,3) ve 30 sağlıklı kontrol grubu (%33,3) olmak üzere toplam 90 birey dahil edilmiştir. Alzheimer hastalığı tanılı 30 hastanın 15'i kadın (%50), 15'i erkek (%50); vasküler demans tanılı 30 hastanın 10'u kadın (%33,3), 20'si erkek (%66,6); sağlıklı 30 kontrollerin ise 21'i kadın (%70), 9'u erkektir (%30). Hasta ve kontrol bireylerinin gruplara ve cinsiyetlere göre dağılımları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Alzheimer hasta, vasküler demans hasta ve sağlıklı kontrol bireylerinin cinsiyete göre dağılımı

Alzheimer hasta grubunun yaş ortalaması 72,4 ± 7,56, vasküler demans hasta grubunun yaş ortalaması 69,6 ± 10,45 ve sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması 65,26 ± 8,01 olarak belirlenmiştir. Çalışmamıza dahil edilen Alzheimer hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik verileri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

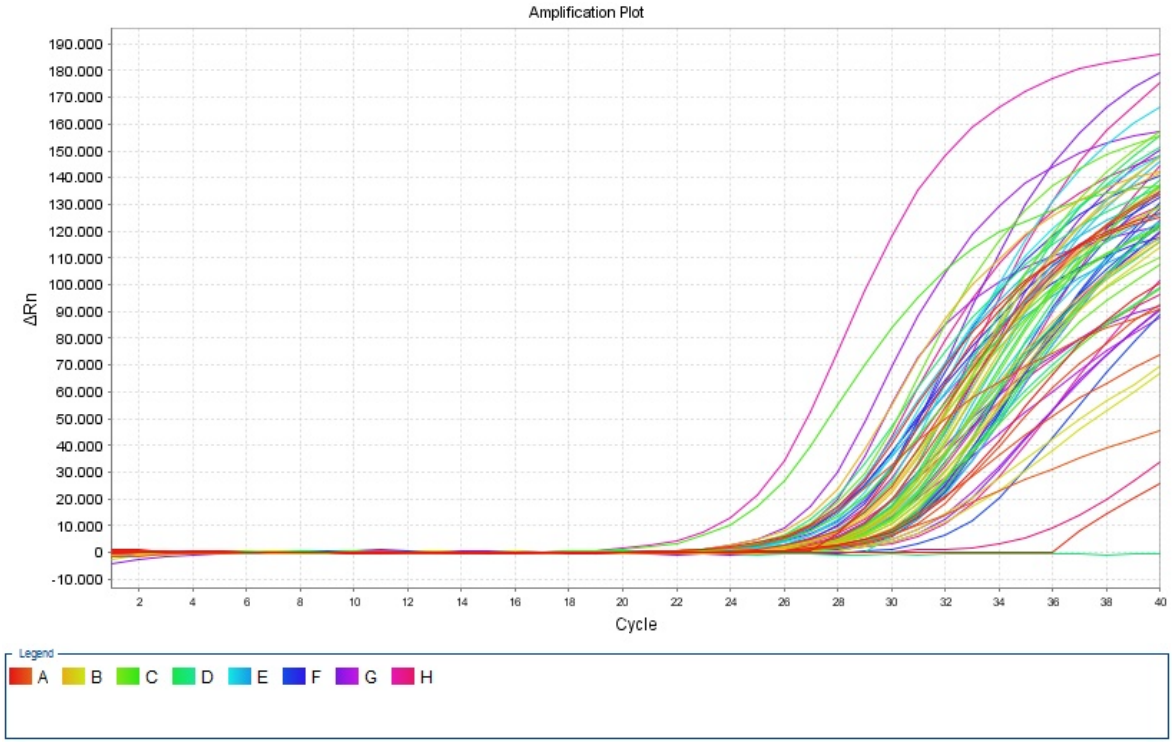
Tablo 4.1. Gruplara göre cinsiyet ve yaş grupları dağılımı

Özellik	**Alzheimer Hastaları**	**Vasküler Demans Hastaları**	**Sağlıklı Kontrol Grubu**	**Toplam**
Sayı (n)	30	30	30	90
Yaş (en düşük- en yüksek)	58-84	41-89	50-82	41-89
Yaş (Ort. ± SS)	72,4 ± 7,56	69,6 ± 10,45	65,26 ±8,01	69,08 ±9,15
Cinsiyet				
Kadın	15	10	21	46
Erkek	15	20	9	44

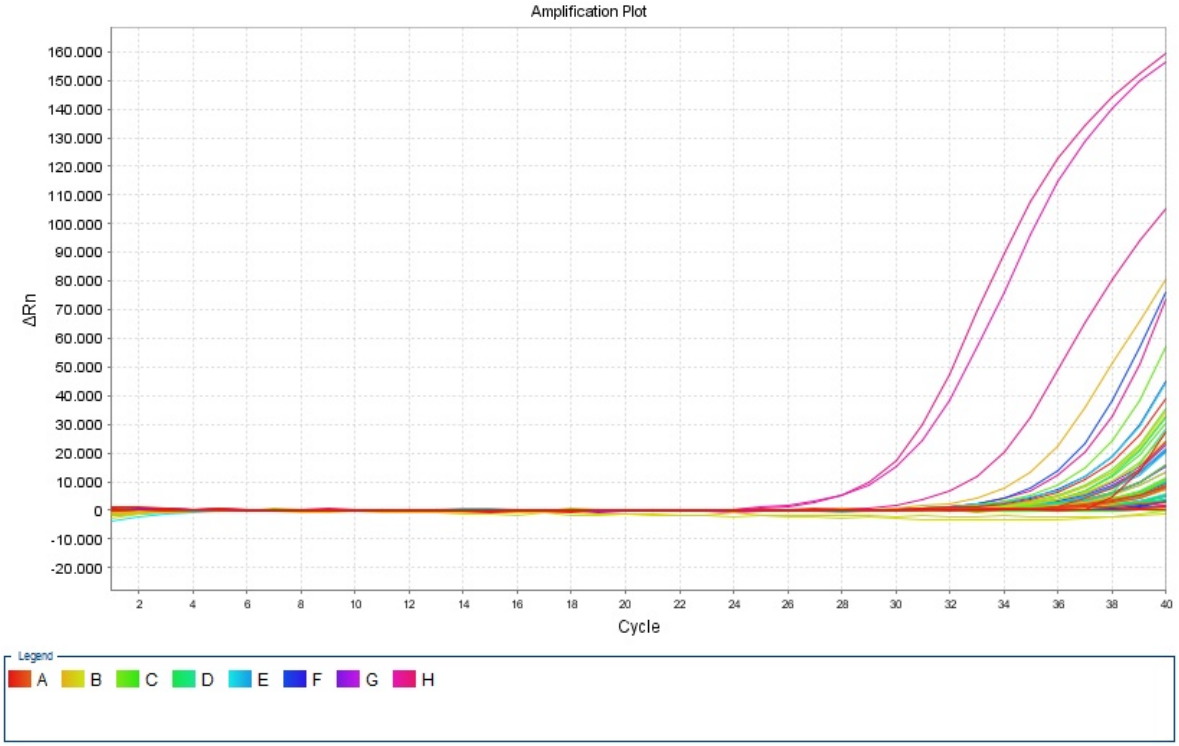
4.2. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Tüm olgularda EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden serum elde edilmiş ve miRNA izolasyonu gerçekleştirilmiş. Örneklerden elde edilen cDNA'lar aracılığıyla miRNA-29a ve miRNA-31'in ekspresyon profilleri 7500 Real-Time PCR cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyeleri belirlenirken RT-PCR'da elde edilen Ct değerleri 2^-ΔΔCt olarak hesaplanmıştır. 2^-ΔΔCt hesaplanmasında U6 kontrol geni ile kıyaslanarak miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. U6, miR-29a ve miR-31 ekspresyonlarını

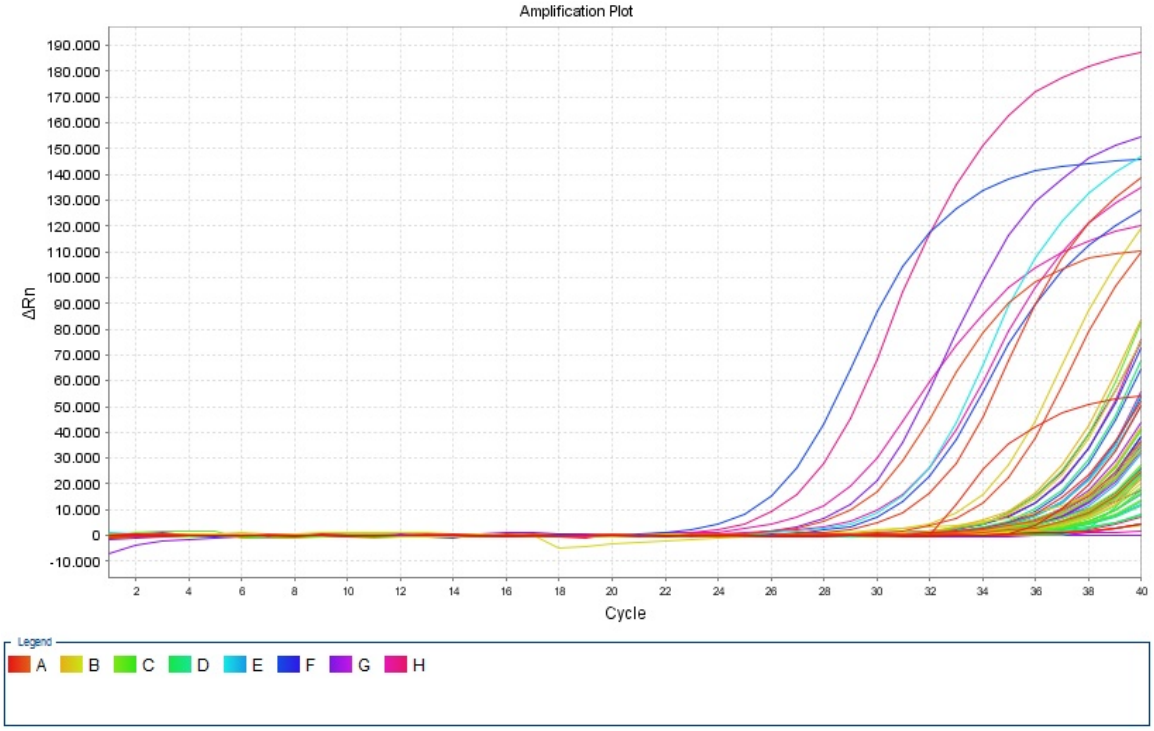
gösteren amplifikasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de yer almaktadır.



Şekil 4.2. U6 (kontrol) genine ait amplifikasyon görüntüsü



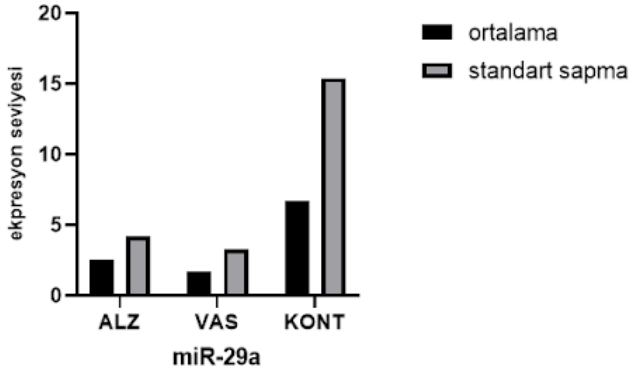
Şekil 4.3. miR-29a ekpresyonuna ait amplifikasyon görüntüsü



Şekil 4.4. miR-31 ekspresyonuna ait amplifikasyon görüntüsü

4.2.1. Alzheimer hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında miR-29a ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi

miR-29a'nın ekspresyon seviyelerinin ortalaması Alzheimer hasta grubunda 2,51±4,1, vasküler demans hastalarında 1,6±3,2, sağlıklı kontrol grubunda 6,7±15,38 olarak saptanmıştır. Hasta gruplarının ve kontrol grubunun miR-29a ekspresyon seviyelerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Alzheimer Hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-29a ekspresyon seviyelerinin grafiği (ortalama±standart sapma)

Hasta grupları ve kontrol grubu karşılaştırıldığında miR-29a ekspresyon seviyesinin hasta gruplarında kontrol grubuna kıyasla azaldığı saptanmıştır fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0,05$). Hasta ve kontrol gruplarının miR-29a ekspresyon seviyeleri Tablo 4,2.'de verilmiştir.

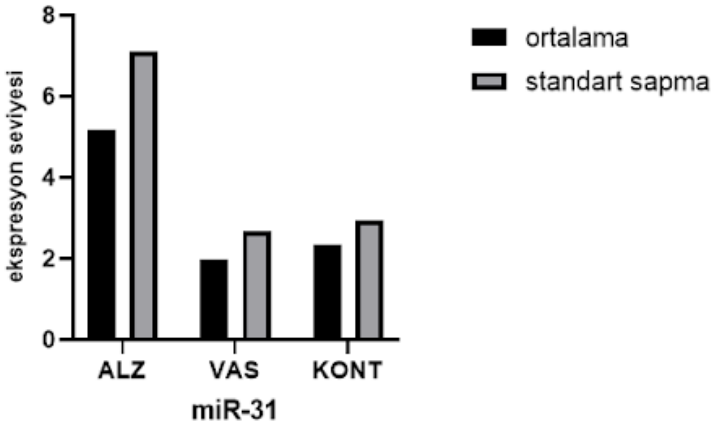
Tablo 4.2. Alzheimer hastası, vasküler demans hastası ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-29a ekspresyon seviyeleri

miRNA	**Gruplar**	**Örnek Sayısı**	**Ortalama**	**Standart Sapma**	**Standart Hata**	**min.max değer**	**P Değeri**
miR-29a	Alzheimer	30	2,5100	4,19577	0,76604	0,19-22,74	0,105
	Vasküler Demans	30	1,6710	3,28347	0,59948	0,03-15,17	
	Kontrol	30	6,7387	15,38356	2,80864	0,07-75,95	

*****İstatiksel olarak anlamlılık düzeyi $p<0.05$ kabul edilmiştir.

4.2.2. Alzheimer hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında miR-31 ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi

miR-31'in ekspresyon seviyelerinin ortalaması Alzheimer hasta grubunda 5,18±7,1, vasküler demans hastalarında 1,99±2,67, sağlıklı kontrol grubunda 2,35±2,94 olarak saptanmıştır. Hasta gruplarının ve kontrol grubunun miR-31 ekspresyon seviyelerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Alzheimer hastaları, vasküler demans hastaları ve sağlıklı kontrol grubunda miR-31 ekspresyon seviyelerinin grafiği (ortalama±standart sapma)

Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında miR-31 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (p=0,01). Hasta ve kontrol gruplarının miR-31 ekspresyon seviyeleri Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Alzheimer hastası, vasküler demans hastası ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-31 ekspresyon seviyeleri

miRNA	**Gruplar**	**Örnek Sayısı**	**Ortalama**	**Standart Sapma**	**Standart Hata**	**max. min değer**	**P Değeri**
miR-31	Alzheimer	30	5,1893	7,10061	1,29639	0,13-29,21	0,01*
	Vasküler Demans	30	1,9920	2,67397	0,48820	0,04-12,53	
	Kontrol	30	2,3570	2,94322	0,53736	0,04-12,0	

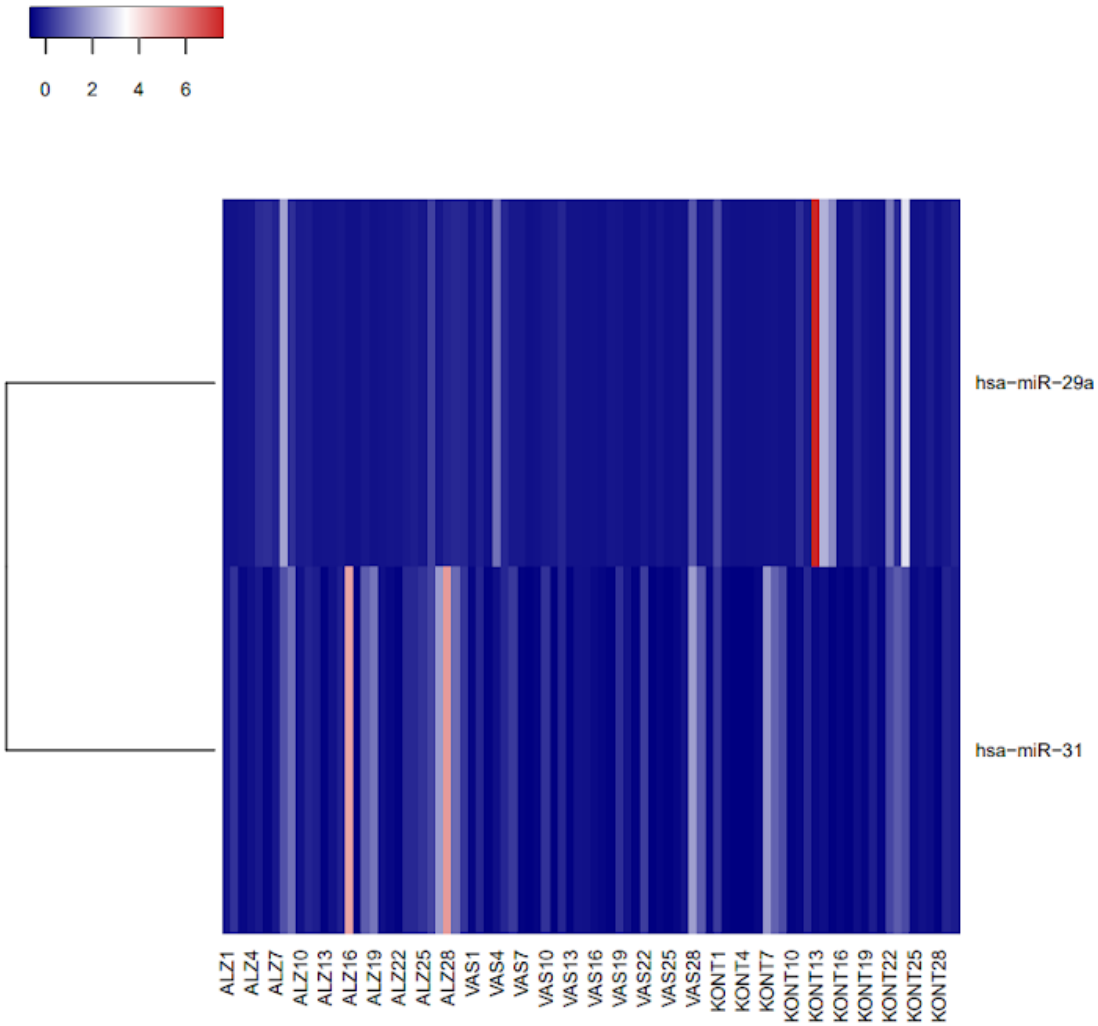
***İstatiksel olarak anlamlılık düzeyi p<0.05 kabul edildi.

Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını bulmak için Dunn çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Vasküler demans grubu Alzheimer hasta grubuna göre kıyaslandığında miR-31 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir (p=0,017). Alzheimer hastalarında ise kontrol grubuna göre miR-31 ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği gözlenmiştir (p=0,046). Vasküler demans ve kontrol grupları arasında miR-31 ekspresyon seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p> 0,05). Hasta grupları ve kontrol grubunun miR-31 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Alzheimer hastası, vasküler demans hastası ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-31 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Örnek1-Örnek2	p değeri	adj p değeri
Vasküler Demans-Kontrol	0,728	1,000
Vasküler Demans- Alzheimer	0,006	0,017*
Kontrol- Alzheimer	0,15	0,046*

Hasta ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in ekspresyonları heatmeap üzerinde grafiklendirilmiştir.



Şekil 4.7. Alzheimer, vasküler demans ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31 ekspresyonunun heatmap'i ve hiyerarşik kümelenmesi. Heatmap'te koyu mavi renk düşük ekspresyonu, koyu kırmızı renk yüksek ekspresyonu göstermektedir.

4.3. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Korelasyon Analizi

Hasta ve kontrol gruplarında, miR-29a ve miR-31 için korelasyon analizi yapılmıştır. Alzheimer hasta grubunda miR-29a ve miR-31 arasında korelasyon bulunmamıştır (p= 0,112). Vasküler demans hasta grubu ile kontrol grubunda miR-29a ve miR-31 arasında orta düzeyde pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır (gruplar için sırasıyla; p= 0,006, p= 0,014).

4.4. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Biyobelirteç Olarak Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grupları arasında miR-29a ve miR-31 açısından ROC ve AUC analizleri yapılmıştır. Bu analizlere göre miR-29a ve miR-31'in bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için testin özgüllük (spesivite) ve hassaslık (sensivite) değerleri hesaplanmıştır. Hasta ve kontrol gruplarına ilişkin miR-29a ve miR-31'in ekspresyonları kendi aralarında değerlendirilmiş ve ekspresyonlarına göre eşik (cutt-off) noktaları belirlenerek her birinin özgüllük ve hassaslık değerleri hesaplanmıştır ve ROC eğrisi çizilmiştir. miR-29a ve miR31'in doğruluğunu belirlemek için %95 güven sınırlarıyla (%95 CI) eğri altında kalan alan (AUC) ve standart hata hesaplanmıştır. AUC, 0-1 arasında değişmektedir. AUC doğruluğu 1'e yaklaştıkça artmaktadır.

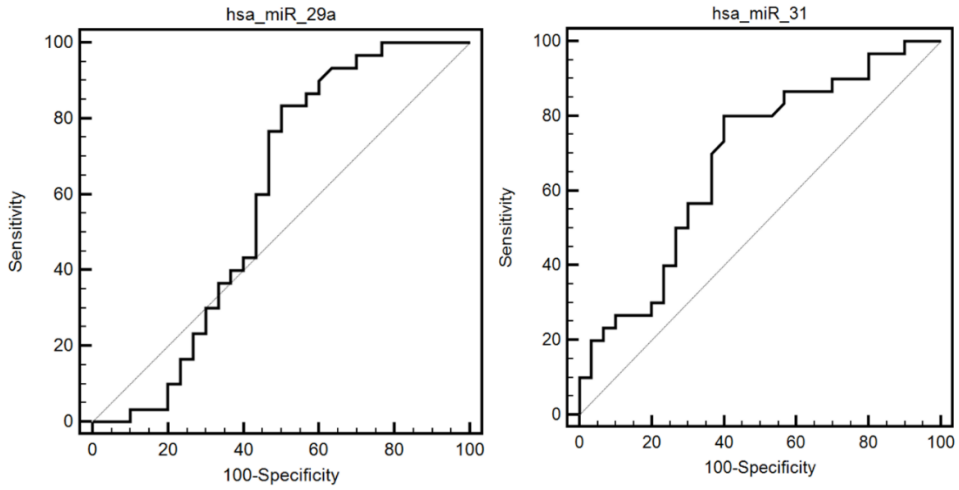
4.4.1. Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak değerlendirilmesi

Alzheimer hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubunda miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyelerinin Alzheimer hasta ve kontrol grupları arasındaki tanısal doğruluk açısından özgüllük ve hassaslık oranlarının hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizi yapılmış ve AUC değeri hesaplanmıştır. Alzheimer hasta ve kontrol grubu arasında miR-29a için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,591 olarak bulunmuştur ve miR-29a Alzheimer hastası ve sağlıklı kontrol grupları arasında ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilememiştir (p=0,2512). miR-31 için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,682 olarak bulunmuş ve miR-31 Alzheimer hasta grubu ve kontrol grubu arasında orta tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak

değerlendirilmiştir (p=0,0093). Elde edilen ROC ve AUC değerleri Tablo 4.5., Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Alzheimer hastaları ve kontrol grubunda miR-29a ve miR-31'in ROC ve AUC değerleri (*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri=p<0,05.)

miRNA	Hassalık	Özgüllük	AUC (%95 CI)	Cutt-off Değeri	p Değeri
miR-29a	83,33	50,00	0,591 (0,456-0,716)	>0,48	0,2512
miR-31	80,00	60,00	0,682 (0,549-0,796)	>1,24	0,0093*



Şekil 4.8. Alzheimer hasta ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in ROC eğrileri

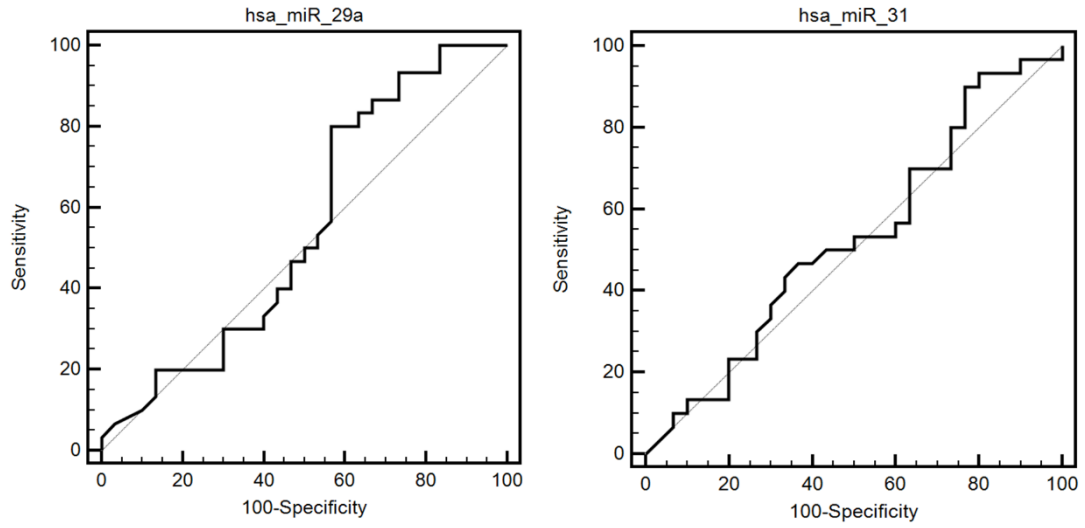
4.4.2. Vasküler demans ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak değerlendirilmesi

Vasküler demans hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyelerinin vasküler demans hasta ve kontrol grupları arasındaki tanısal doğruluk açısından özgüllük ve hassaslık oranlarının hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizi yapılmış ve AUC değeri hesaplanmıştır. Vasküler demans ve kontrol grupları arasında miR-29a için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,549 olarak bulunmuştur (p=0,5261). miR-31 için yapılan ROC eğrisi analizinde ise AUC değeri 0,527 olarak bulunmuştur (p=0,7261). Sonuç olarak her iki miRNA'nında vasküler demans ve sağlıklı kontrol grupları arasında

tanısal olarak ayırt edici bir özelliği olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen ROC ve AUC değerleri Tablo 4.6., Şekil 4.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Vasküler demans hastaları ve kontrol grubunda miR-29a ve miR-31'in ROC ve AUC değerleri (*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri=p<0,05.)

miRNA	Hassaslık	Özgüllük	AUC (%95 CI)	Cutt-off Değeri	p Değeri
miR-29a	80,00	43,33	0,549 (0,415-0,678)	<=1,25	0,5261
miR-31	93,33	20,00	0,527 (0,394-0,657)	<=4,85	0,7261



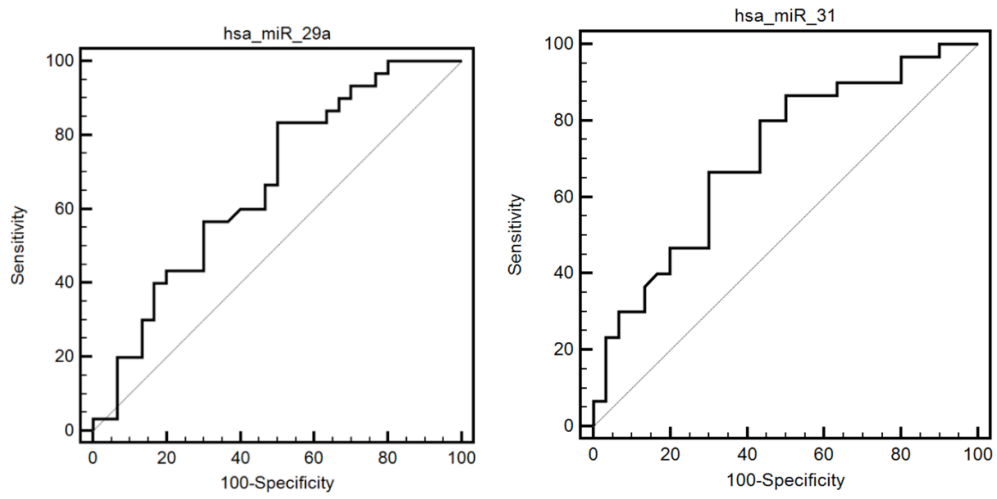
Şekil 4.9. Vasküler demans hastaları ve kontrol grubunda miR-29a ve miR-31'in ROC eğrileri

4.4.3. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak değerlendirilmesi

Alzheimer ve vasküler demans hasta grubunda miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyelerinin grupları arasındaki tanısal doğruluk açısından özgüllük ve hassaslık oranlarının hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizi yapılmış ve AUC değeri hesaplanmıştır. Alzheimer ve vasküler demans hasta grubu arasında miR-29a için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,666 olarak bulunmuştur (p=0,0189). miR-31 için yapılan ROC eğrisi analizinde ise AUC değeri 0,707 olarak bulunmuştur (p=0,0022). Bu iki hasta grubu arasında miR-29a düşük, miR-31 ise yüksek tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen ROC ve AUC değerleri Tablo 4.5., Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in ROC ve AUC değerleri (*CI=Confidence interval, AUC=Area Under the Curve, p Değeri=p<0,05.)

miRNA	Hassaslık	Özgüllük	AUC (%95 CI)	Cutt-off Değeri	p Değeri
miR-29a	83,33	50,00	0,666 (0,533-0,783)	>0,5	0,0189*
miR-31	86,67	50,00	0,707 (0,576-0,818)	>0,7	0,0022*



Şekil 4.10. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in ROC eğrileri

4.5. Alzheimer Hastaları, Vasküler Demans Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-29a ve miR-31'in Biyobelirteç Olarak Birlikte Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol grupları arasında miR-29a ve miR-31 açısından ROC ve AUC analizleri yapılmıştır. Bu analizlere göre miR-29a ve miR-31'in bir biyobelirteç olarak birlikte kullanılabilmesi için testin özgüllük (spesivite) ve hassaslık (sensivite) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen ROC ve AUC değerleri Tablo 4.8.'de verilmiştir.

4.5.1. Alzheimer hastaları ve vasküler demans hastalarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak birlikte değerlendirilmesi

Alzheimer ve vasküler demans hasta grupları arasında miR-29a ve miR-31'in ekspresyon değişimleri birlikte değerlendirilerek tanısal doğruluk açısından özgüllük ve hassaslık oranlarının hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizi yapılmış ve AUC değerleri hesaplanmıştır. Alzheimer hasta ve vasküler demans hasta grubu arasında miR-29a ve miR-31 için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,698 (0,566-0,810 p=0,0334) bulunmuştur. miR-29a ve miR-31'in birlikte değerlendirilmesi bu iki grup arasında orta tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

4.5.2. Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak birlikte değerlendirilmesi

Alzheimer hasta ve kontrol grupları arasında miR-29a ve miR-31'in ekspresyon değişimleri birlikte değerlendirilerek tanısal doğruluk açısından özgüllük ve hassaslık oranlarının hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizi yapılmış ve AUC değerleri hesaplanmıştır. Alzheimer hasta ve kontrol grubu arasında miR-29a ve miR-31 için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,702 (0,570-0,813 p=0,0217) bulunmuştur. miR-29a ve miR-31'in birlikte değerlendirilmesi bu iki grup arasında orta tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

4.5.3. Vasküler demans hastaları ve kontrol gruplarında miR-29a ve miR-31'in biyobelirteç olarak birlikte değerlendirilmesi

Vasküler demans hasta ve kontrol grupları arasında miR-29a ve miR-31'in ekspresyon değişimleri birlikte değerlendirilerek tanısal doğruluk açısından özgüllük ve hassaslık oranlarının hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizi yapılmış ve AUC değerleri hesaplanmıştır. Vasküler demans hasta ve kontrol grubu arasında miR-29a ve miR-31 için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,580 (0,446-0,706 p=0,1115) bulunmuştur. miR-29a ve miR-31'in birlikte değerlendirilmesinin, bu iki grup arasında tanısal olarak ayırt edici bir özelliği olmadığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Demans; Latince '*mens*' kökünden gelen bilişsel işlevlerin giderek bozulmasıyla karakterize yaşa bağlı ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır (Gustafson, 1996). Epidemiyolojik tahminlere göre her geçen yıl popülasyonda katlanarak artmakta ve dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir (Livingston vd., 2020). Demansa yol açabilecek çok sayıda çevresel ve genetik risk faktörü mevcuttur. Risk faktörlerinin demans patolojisi üzerine etki etmesiyle farklı demans türleri oluşmaktadır (Kua vd., 2014).

Alzheimer hastalığı, belirli nöropatolojilerin etkilediği yaşla ilişkili olarak bilişsel bozulma ile karakterize bir hastalıktır ve demansın en yaygın görülen türüdür (Lopez vd., 2019). Alzheimer hastalığının temelde amiloid plaklar ve nörofibril yumaklar olmak üzere iki patolojisi tanımlanmıştır. Amiloid plaklar, APP'nin (amiloid prekürsör protein) yanlış kesimi sonucunda Aβ birikmesi ile oluşur. Nörofibril yumaklar ise tau proteininin hiperfosforilasyonu sonucu oluşur. Alzheimer hastalığında yaş ile birlikte çevresel etkenler, yaşam tarzı, genetik faktörler gibi bazı risk faktörleri olduğu bilinmektedir (Monfared vd., 2022). Alzheimer hastalığına etki eden genetik faktörler erken başlangıçlı Alzheimer hastalığına ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalığına göre farklılık göstermektedir. Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı *APP, PSEN1* ve *PSEN2* genlerinin otozomal dominant kalıtımı ile ortaya çıkmaktadır. Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ise daha çok sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (Bellenguez vd., 2020).

Vasküler demans, beyne giden kan akışı dengesinin bozularak bilişsel yeteneklerde azalma, yavaş düşünme, yürütücü işlev kaybıyla karakterize yaşla birlikte ilerleyici bir hastalıktır. Demansın en yaygın görülen ikinci türüdür (Venkat vd., 2015). Vasküler demansın patolojisini ateroskleroz, küçük damar lezyonları, iskemi, mikroanjiyopatiler gibi serebral lezyonlar oluşturmaktadır. Bu patolojiler kan-beyin bariyeri dengesi bozulması, beyaz cevher lezyonları, astroglial yanıt ile nöronal kayıp oluşumuna sebep olur ve vasküler demans meydana gelir (Iemolo vd., 2009). Vasküler demansın oluşumunda yaşam tarzı, çevresel etkenler ve genetik faktörler olmak üzere pek çok risk faktörü belirlenmiştir. Vasküler demansa ait monogenik faktörler tanımlanmış, bununla birlikte poligenik faktörlerin de hastalık üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir. Monogenik faktörleri, *NOTH3, HTRA1, GLA, COL4A1-A2,*

TREX1 genlerinde meydana gelen mutasyonlar oluşturmaktadır. Bunun yanında daha az etkili olan sporadik formu, özellikle lipid metabolizmasında rol alan genlerle ortaya çıkmaktadır (Ikram vd., 2017).

MikroRNA (miRNA), gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynayan 19-23 nükleotid içeren küçük protein kodlamayan RNA'lardır. miRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre farklılaşması gibi birçok biyolojik süreci düzenleme potansiyeli bulunmaktadır. Hücre içinde ve serum, plazma, idrar, süt gibi diğer vücut sıvılarında bulunur. (Gareev vd., 2021). MikroRNA'ların neredeyse yarısının beyinde eksprese edilmesiyle nörogenez ve nöroplastisite düzenlenmektedir, bu nedenle beyin gelişimi ve nörodejeneratif hastalıkların patolojisinde kilit rol oynamaktadır (Kos vd., 2022).

MikroRNA'ların farklı vücut sıvılarında bulunma ve yüksek stabilitesi, dokuya özgü olmaları ve hastalık patogenezlerinde farklı ekspresyon seviyelerine sahip olmaları sirküle miRNA'ların ve non-invaziv potansiyel biyobelirteçler olarak kullanımının etkili olabileceğini düşündürmektedir (Szelenberger vd., 2019). Alzheimer hastalığı ve vasküler demans ile ilgili ayrı çalışmalarda biyobelirteç olarak kullanılabilecek çok sayıda miRNA tanımlanmış olsa da, bu iki hastalığı tanısal olarak ayırabilen bir biyobelirteç olabilecek miRNA arayışı son dönemlerde önem kazanmıştır. miR-29a'nın ifadesi nörit kök hücreleri etkilemektedir ve sinaps oluşumu, sinapsların düzeni üzerinde etki göstermektedir (Ma et., 2020). miR-31 ifadesi, inflamasyon ile birlikte oksidatif stresin ortaya çıkması ve nörodejenerasyon sonucu nöronların ölümü ile ilişkilidir. miR-31'in ifadesinin yüksek olması Aβ proteinlerinin hücre içi birikimi azalttığı böylece nöropatoloji üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu görülmektedir (Barros- Viegas vd., 2020). Bu yönleriyle miR-29a ve miR-31'in Alzheimer ve vasküler demanstaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi ve tanıda biyobelirteç olarak kullanılabilirliği oldukça önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda miR-29a ve miR-31'in Alzheimer ve vasküler demansta biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini değerlendirmek ve ayırıcı tanıda etkisini saptamak amacıyla, ESOGÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Ana Bilim Dalı tarafından tanı alan 30 Alzheimer hastası, 30 vasküler demans hastası ve 30 kontrol bireyinden alınan serum örneklerinde miR-29a ve miR-31'in ekspresyonları değerlendirilmiştir.

5.1. miR-29a Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Hébert ve ark. sporadik Alzheimer tanısı almış 34 hasta ve 21 kontrol ile hücre kültür modeli kullanarak yaptıkları çalışmada, beyinde *BACE1* ve *APP* protein ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. *BACE1*, Aβ peptidlerinin oluşumunda β-sekretaz kesimi ile *APP*'yi sınırlamaktadır, APP'nin proteolitik kesimi ile Aβ peptidlerini oluşturmaktadır. Bu peptidlerin birikimi Alzheimer patolojisini oluşturur. Western blot sonuçlarına göre kontrol gruplarında *APP* seviyelerinin değişkenlik gösterdiği buna karşın *BACE1* seviyelerinin Alzheimer hasta grubunda arttığını gözlemlemişler ve miR-29a ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisini bulmuşlardır (p= 0,0128). Alzheimer hastalarında artan *BACE1* ekspresyonu ile birlikte miR-29a ve -29b/1'in azaldığı bildirilmiş ve miR-29a/b-1 kümesini BACE1 protein ekspresyonunun potansiyel baskılayıcı olarak tanımlamışlardır (Hébert vd., 2008).

Shioya ve ark. nörodejeneratif hastalıklarda farklı ekspresyon gösteren miRNA'ları tanımlamak için beyin dokusunda yaptıkları genişletilmiş çalışmaya 7 Alzheimer hastası, 14 kontrol birey dahil etmişlerdir. miRNA ekspresyonlarını karşılaştırmak için bu gruplara ek olarak 4 Parkinson hastası ve 6 ALS hastası da dahil etmişlerdir. Real Time-PCR sonuçlarına göre miR-29a ekspresyonunun Alzheimer hastalarında kontrol grubuna ve diğer hasta gruplarına kıyasla önemli ölçüde azaldığını saptamışlar ve istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır (p=0,041) (Shioya vd., 2010).

Çalışmamızda Alzheimer grubunda kontrol grubuna kıyasla miR-29a ekspresyonunun yaklaşık 2.5 kat azaldığı gözlenmiştir ancak bu sonuç istatistiksel verilere yansımamıştır (p= 0,105). Hebert ve ark., Shioya ve ark. beyin dokusunda ve hücre kültüründe yaptıkları çalışmalar, elde ettiğimiz verilere paralel olarak miR-29a seviyelerinin Alzheimer vakalarında azaldığını tespit etmişlerdir. Ancak çalışmamızda bu kat farkının istatistiksel olarak anlamlı olmaması muhtemelen serum miR-29a ekspresyon seviyelerinin daha az olmasıyla açıklanabilir.

Kiko ve ark. Alzheimer hastalığı tanısında potansiyel biyobelirteç olarak kullanmak üzere plazma ve beyin omurilik sıvısında miRNA'ların ekspresyon seviyesi farklılıklarını incelemişlerdir. Çalışmaya 10 Alzheimer hastası ve 10 kontrol olgusu dahil etmişlerdir. Real Time-PCR sonuçlarına göre; Alzheimer ve kontrol grupları arasında plazmada miR-29a ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmamış,

beyin omurilik sıvısında ise Alzheimer hastalarında miR-29a ekspresyonunun daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Bunun sonucunda miR-29a'nın plazmada değişiklik olmazken beyin omurilik sıvısında serbest kaldığını düşünmüşler ve miR-29a seviyelerinin beyin omurilik sıvısında nasıl değiştiğinin mekanizması üzerine çalışılması gerektiğini önermişlerdir (Kiko vd., 2014).

Sorensen ve ark. Alzheimer ve diğer demans türlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada beyin omurilik sıvısı ve kandaki miRNA ekspresyon seviyelerini değerlendirerek potansiyel biyobelirteç adaylarını belirlemeyi hedeflemişlerdir. Bu amaç doğrultusunda 10 Alzheimer hastası, 4 vasküler demans, 4 frontotemporal demans ve 2 Lewy cisimcikli demans olmak üzere farklı demans tiplerinden toplam 20 hastayı çalışmaya dahil etmişlerdir. Real Time-PCR sonuçlarında göre incelenen beyin omurilik sıvısı ve kan örneklerinde miR-29a ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır ($p>0,05$) (Sorensen vd., 2016).

Alzheimer ve vasküler demans kıyaslandığında verilerimiz Kiko ve ark. ile Sorensen ve ark. verileri ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda her ne kadar istatistiksel verilere yansımasa da miR-29a ekspresyon seviyeleri vasküler demans vakalarında, kontrollere oranla 4 kat, Alzheimer hasta grubuna göre 1,5 kat azaldığı gözlenmiştir. Daha geniş hasta serileri ile yapılacak çalışmalarla birlikte daha net sonuçlar elde edilme potansiyeli bulunmaktadır.

Müller ve ark. Alzheimer hastalarında anormal seviyelere sahip miRNA'ları beyin omurilik sıvısında incelemişlerdir. Potansiyel biyobelirteçler olarak kullanımını değerlendirdikleri bu çalışmaya 18 Alzheimer hastası ve 20 sağlıklı birey dahil etmişlerdir. Real Time-PCR sonuçlarına göre kontrol grubuyla kıyaslandığında miR-29a ekspresyon seviyesinin yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır ($p=0,0001$). Biyobelirteç olarak kullanımı değerlendirildiğinde %89 hassaslık %70 özgüllük oranına sahip olup ayırt etme gücü AUC değeri 0,87 olarak saptamışlar ve tanıda iyi bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünmüşlerdir (Müller vd., 2016).

Barbagallo ve ark. nörodejeneratif hastalıkların ortak özellikler paylaştıkları ve bu nedenle tanı koymanın zor olduğuna değinerek bu hastalıklar için ayırıcı tanıda kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçler olarak farklı miRNA ekspresyonlarını hedeflemişlerdir. Çalışmaya 30 Alzheimer, 30 Parkinson, 24 vasküler demans, 25

vasküler parkinsonizme sahip birey ve 30 sağlıklı kontrol dahil edilmiş ve serum eksozom örnekleri incelenmiştir. Real Time-PCR sonuçlarına göre miR-29a ekspresyonlarının Alzheimer, vasküler demans ve kontrol grupları arasında farklılık gösterdiğini saptamışlardır. Alzheimer grubunda miR-29a ekspresyonunun vasküler demans ve kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksek olduğunu, vasküler demans grubunda ise kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğunu saptamışlardır. Biyobelirteç olarak değerlendirmek için yapılan ROC eğrisi analizine göre Alzheimer-kontrol grubu AUC değeri 0,71, vasküler demans-kontrol grubu AUC değeri 0,671 ve Alzheimer-vasküler demans AUC değeri 0,832 olarak bulunmuş ve bu gruplar arasında potansiyel biyobelirteç olarak kullanımının uygun olduğunu düşünmüşlerdir (Barbagallo vd., 2020).

Çalışmamızda miR-29a ekspresyonunun tanısal doğruluğunu belirlemek için yapılan ROC analizi sonucunda; Alzheimer ve kontrol grubu arasında miR-29'un hassaslığı %83,33, özgüllüğü %50 ve AUC değeri 0,591 (%95 CI: 0,456-0,716; p=0,2512); vasküler demans ve kontrol grubu arasında miR-29'un hassaslığı %80, özgüllüğü %43,33 ve AUC değeri 0,549 (%95 CI: 0,415-0,678; p= 0,5261); Alzheimer ve vasküler demans grupları arasında miR-29'un hassaslığı %83,33, özgüllüğü %50 ve AUC değeri 0,666 (%95 CI: 0,533-0,783; p=0,0189) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz veriler Barbagallo ve ark ile Müller ve ark. verileri ile uyuşmamaktadır. Her iki çalışmaya kıyasla çalışmamamızda Alzheimer vakalarında kontrollere oranla ekspresyonda azalma tespit edilmiş, çalışmamızda incelenen serum örneklerindeki bu azalma istatistiksel verilere yansımamıştır. Bu farklılığın temel nedeni Barbagallo ve ark. yaptıkları çalışmada serumdan izole edilen eksozomlar üzerinde inceleme yapmış olmalarından kaynaklanabilir. Eksozomal miRNA'lar bilindiği üzere kanda oldukça kararlı bir şekilde bulunabilmektedir. Bu nedenle sirküle ve serum eksozomal miRNA'lar arasında ekspresyon düzeyinde farklı sonuçlar elde edilmiş olabilir. Müller ve ark ise yaptıkları çalışmada BOS materyali kullanmışlardır. BOS biyobelirteçleri direkt beyin dokusu ile ilişkili olduğu için ekspresyon paternindeki farklılık beklenen bir durumdur.

Ragusa ve ark. heterojen bir nörodejeneratif hastalık olan vasküler demansı tanıda ayırt edebilmek için 38 vasküler demans, 40 Alzheimer hastası ve 40 sağlıklı kontrol bireyi çalışmaya dahil etmişler ve plazmada miRNA profillerini incelemişlerdir. Taqman analizlerine göre kontrol gruplarına kıyasla vasküler demans

hastalarında miR-29a'nın ekpresyonunun düşük olduğunu saptamışlar ve istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır (p=0,015). Alzheimer hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla miR-29a ekspresyonlarının daha düşük olduğunu saptamışlar ve istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır (p=0,041). Vasküler demans ve Alzheimer grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edememişlerdir. Biyobelirteç olarak kullanımını değerlendirirken ROC eğrileri kullanmışlar ve miR-29a'nın vasküler demans grubunda AUC değeri 0,63, %76 hassaslık, %41 özgüllük değerlerine, Alzheimer grubunda ise AUC değeri 0,64, %75 hassaslık, %41 özgüllük değerlerine sahip olduğunu saptamışlardır. Vasküler demans ve miR-29a arasında bilişsel bozukluk arttıkça ekspresyon seviyesinin azaldığı negatif bir korelasyon olduğunu gözlemlemişler ve vasküler demans ile Alzheimer tanısı için iyi bir biyobelirteç olduğunu düşünmüşlerdir (Ragusa vd., 2016).

Çalışma verilerimiz Ragusa et al.'un verileri ile paralellik göstermektedir ancak sonuçlarımız miR-29a'nın yalnızca Alzheimer ve vasküler demans arasında orta tanısal doğrulukta potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak geniş kohort çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

5.2. miR-31 Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Barros- Viegas ve ark. fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada Alzheimer hastalığı patolojisinde rol oynayan miRNA ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Çalışmada APP ve BACE1 proteinlerinin azalan ekspresyonu ve bunun sonucunda Aβ peptid birikimin artmasında rol alan miRNA'ları hedeflemişlerdir. Fareler üzerinde yaptıkları bir dizi analiz sonucunda hipokampüste miR-31'in yüksek ekspresyon göstermesi ile plak yükünü azalttığını ve bilişsel kaybı önlediğini gözlemlemişlerdir (Barros- Viegas vd., 2020). Çalışma verilerimiz Barros- Viegas ve ark. verileri ile uyuşmamaktadır. Bu farklılığın temel nedeni model organizma üzerinde incelenmesi ve incelenen örneğin farklılık göstermesi olabilir.

Dong ve ark. Alzheimer hastalığını erken evrelerde tanımlamak için spesifik bir biyobelirteç eksikliğini vurgulayarak miRNA'ların Alzheimer hastalığında biyobelirteç olarak potansiyelini değerlendirmişlerdir. Çalışmaya 127 Alzheimer hastası ve 123 sağlıklı kontrol bireyi ile birlikte 30 hafif kognitif bozukluk, 30 vasküler demans hastası dahil edilmiş ve serum örnekleri incelenmiştir. Böylece demans türleri arasındaki biyobelirteç potansiyeli de değerlendirilmiştir. Real Time-PCR sonuçlarına

göre miR-31 ekspresyonlarının Alzheimer hastalarında kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiş ve her iki set için de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Tanısal değerini değerlendirmek için yapılan ROC eğrisi analizinde eğitim seti için AUC değeri 0,717, doğrulama seti AUC değeri 0,720 bulunmuş ve diğer miRNA'larla birlikte değerlendirildiğinde daha spesifik non invaziv bir biyobelirteç olarak Alzheimer tanısında kullanılabileceğini düşünmüşlerdir. Hafif kognitif bozukluk ve kontrol grubu kıyaslandığında miR-31 ekspresyonlarında belirgin bir fark tespit edememişlerdir. Vasküler demans ve kontrol grubu kıyaslandığında miR-31 ekspresyon seviyelerinin vasküler demans hastalarında daha yüksek olduğunu saptamışlar ve istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır ($p<0,05$). miR-31'in Alzheimer ve vasküler demanstaki bu farklı ekspresyon seviyelerinin demans türlerinin tanısında spesifik biyobelirteç olarak kullanılabilir olduğunu düşünmüşlerdir (Dong vd., 2015).

Çalışmamızda Alzheimer, vasküler demans ve kontrol gruplarının serum karşılaştırıldığında miR-31'in ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p= 0,010$). Alzheimer ve kontrol grubu karşılaştırılmasında miR-31'in Alzheimer grubunda daha yüksek ekspresyona sahip olduğu saptanmıştır ($p=0,046$). Alzheimer ve vasküler demans grubu karşılaştırılmasında miR-31'in Alzheimer grubunda daha yüksek ekspresyona sahip olduğu saptanmıştır ($p=0,017$). Vasküler demans ve kontrol grubu karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Çalışmamızda miR-31 ekspresyonunun tanısal doğruluğunu belirlemek için yapılan ROC analizi sonucunda; Alzheimer ve kontrol grubu arasında miR-31'in hassaslığı %80, özgüllüğü %60 ve AUC değeri 0,682 (%95 CI: 0,549-0,796; $p=0,0093$); vasküler demans ve kontrol grubu arasında miR-31'in hassaslığı %93,33, özgüllüğü %20 ve AUC değeri 0,527 (%95 CI: 0,394-0,657; $p= 0,7261$); Alzheimer ve vasküler demans grupları arasında miR-31'in hassaslığı %86,67, özgüllüğü %50 ve AUC değeri 0,707 (%95 CI: 0,576-0,818; $p=0,0022$) olarak saptanmıştır ve miR-31 Alzheimer hastalığının tanısında potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Çalışma verilerimiz Dong ve ark.'nın Alzheimer ve vasküler demans hastaları ile yaptıkları çalışma ile uyumlu bulunmamıştır. Bu farklılığın temel sebeplerinden birisi olguların klinik özellikleri arasındaki farklar olabilir. Dong ve arkadaşları aynı çalışmada hafif bilişsel bozukluk vakalarında mir-31'in artmış ekspresyonunu tespit etmişlerdir. Temel mekanizma hala belirsizliğini korumakla

birlikte muhtemelen olgularda bilişsel düzeyin azalmasıyla birlikte ekspresyon düzeyleri arasındaki fark belirgin hale gelmektedir. Her ne kadar tam mekanizma belirlenenemiş olsa da hastalığın başlangıcından itibaren ortaya çıkan farklı mekanizmaların etkisiyle miR-31'in ekspresyon seviyesinde farklı süreçlerde artış ya da azalışlar gözlenebilir. Çalışmamızda Alzheimer vakalarımızın büyük çoğunluğunun erken evre olması sebebiyle ekspresyon seviyelerinde dramatik bir düşüş yaşanmamış olabilir. Bu konuda daha kesin sonuçlar almak adına hem erken evre hem ileri evre Alzheimer vakalarının birlikte çalışılması aynı zamanda diğer genetik faktörlerin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda ayrıca miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyelerini Alzheimer ve vasküler demans hastalarında birlikte değerlendirerek tanıda daha spesifik potansiyel biyobelirteçler olarak kullanımları değerlendirilmiştir. ROC analizi sonuçlarına göre; Alzheimer ve vasküler demans arasında miR-29a ve miR-31'in AUC değeri 0,698 (% 95 CI: 0,566- 0,810; p= 0,0334); Alzheimer ve kontrol grubu arasında miR-29a ve miR-31'in AUC değeri 0,702 (% 95 CI: 0,570- 0,813; p= 0,0217); vasküler demans ve kontrol grubu arasında miR-29a ve miR-31'in AUC değeri 0,580 (% 95 CI: 0,446- 0,706; p= 0,1115) olarak bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda gruplar arasında miR-29a ve miR-31'in birlikte değerlendirilmesinin ayırt etme gücünü artırdığı gözlenmiş. Bununla birlikte, miR-29a ve miR-31'in Alzheimer hastalığını vasküler demans ve kontrol gruplarından ayırt etme gücü nedeniyle potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabilirliği düşünülmüştür.

Bu bulgular eşliğinde çalışmamızda Alzheimer ve vasküler demans tanısında miR-29a ve miR-31'in potansiyel biyobelirteç olarak kullanımının yüksek yeterliliğe sahip olmadığı saptanmıştır. Ancak elde edilen sonuçlarla birlikte demans türleri arasında biyobelirteç olarak daha güçlü miRNA kombinasyonları kullanarak daha geniş olgu gruplarıyla doğrulama çalışması yapılması ile daha net sonuçlar elde edilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda tanı almış 30 Alzheimer hastası, 30 vasküler demans hastası ve 30 sağlıklı kontrol bireyi olmak üzere toplam 90 bireyden alınan serum örnekleri incelenmiştir. Real-Time PCR yöntemi kullanılarak miR-29a ve miR-31'in ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Hasta grupları ve kontrol grubu bireylerinde miR-29a ve miR-31 ekspresyon seviyesi açısından analiz edilmiş, Alzheimer ve vasküler demans tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar;

- Alzheimer, vasküler demans ve kontrol grubu bireylerinin serum örneklerinin karşılaştırılmasında miR-29a'nın ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0,105).
- Alzheimer, vasküler demans ve kontrol grubu bireylerinin serum örneklerinin karşılaştırılmasında miR-31'in ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p=0,01). Bu farkın Alzheimer- vasküler demans ve Alzheimer-kontrol grupları arasında olduğu tespit edilmiştir. miR-31 ekspresyon profilinin Alzheimer hastalarında ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu gözlenmiştir.
- miR-29a ve miR-31'in tanıda biyobelirteç olarak kullanılabilirliği değerlendirildiğinde,
- Alzheimer ve kontrol grupları arasında miR-29a ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilememiş, miR-31 ise orta tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilmiştir (sırasıyla AUC: 0,591(p=0,2512), 0,682 (p= 0,0093)).
- Vasküler demans ve kontrol grupları arasında her iki miRNA'nın da tanısal olarak ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilememiştir (sırasıyla AUC: 0,549 (p=0,5261), 0,527 (p=0,7261))
- Alzheimer ve vasküler demans hasta grupları arasında miR-29a düşük, miR-31 yüksek tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirilmiştir (sırasıyla AUC: 0,666 (p=0,0189), 0,707 (p=0,0022)).
- miR-29a ve miR-31'in tanıda biyobelirteç olarak kullanılabilirliği birlikte değerlendirildiğinde,
- Alzheimer ve vasküler demans hasta grupları arasında orta tanısal doğrulukta (AUC: 0,566 (p=0,0334)) bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

- Alzheimer hasta ve kontrol grupları arasında orta tanısal doğrulukta (AUC: 0,702 (p=0,0217)) bir parametre olarak değerlendirilmiştir.
- Vasküler demans hasta ve kontrol grupları arasında tanısal olarak ayırt edici bir özelliği olmadığı tespit edilmiştir (AUC: 0,580 (p=0,1115)).

Bu veriler doğrultusunda, miR-29a ve miR-31'in ekspresyon farklılıklarının Alzheimer ve vasküler demansın tanısında orta düzey güvenilirlikte biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri ancak daha geniş örneklem grupları ile ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra demans türlerinde miR-29a ve miR-31'in moleküler düzeydeki etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için hedef genlerin de çalışmalara dahil edilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Alford, S., Patel, D., Perakakis, N., & Mantzoros, C. S. (2018). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obesity reviews*, *19*(2), 269-280.

Amodio, F., Caiazza, M., Monda, E., Rubino, M., Capodicasa, L., Chiosi, F., ... & Limongelli, G. (2022). An Overview of Molecular Mechanisms in Fabry Disease. *Biomolecules*, *12*(10), 1460.

Andrews, S. J., Fulton-Howard, B., & Goate, A. (2020). Interpretation of risk loci from genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *19*(4), 326-335.

Armstrong, R. A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia neuropathologica*, *57*(2), 87-105.

Ayodele, T., Rogaeva, E., Kurup, J. T., Beecham, G., & Reitz, C. (2021). Early-onset Alzheimer's disease: what is missing in research?. *Current neurology and neuroscience reports*, *21*, 1-10.

Bagaria, J., Bagyinszky, E., & An, S. S. A. (2022). Genetics, Functions, and Clinical Impact of Presenilin-1 (PSEN1) Gene. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(18), 10970.

Barbagallo, C., Mostile, G., Baglieri, G., Giunta, F., Luca, A., Raciti, L., ... & Nicoletti, A. (2020). Specific signatures of serum miRNAs as potential biomarkers to discriminate clinically similar neurodegenerative and vascular-related diseases. Cellular and Molecular Neurobiology, 40, 531-546.

Barros-Viegas, A. T., Carmona, V., Ferreiro, E., Guedes, J., Cardoso, A. M., Cunha, P., ... & Cardoso, A. L. (2020). miRNA-31 improves cognition and abolishes amyloid-β pathology by targeting APP and BACE1 in an animal model of alzheimer's disease. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, *19*, 1219-1236.

Bellenguez, C., Grenier-Boley, B., & Lambert, J. C. (2020). Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. *Current opinion in neurobiology*, *61*, 40-48.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Bir, S. C., Khan, M. W., Javalkar, V., Toledo, E. G., & Kelley, R. E. (2021). Emerging concepts in vascular dementia: a review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *30*(8), 105864.

Boccardi, V., Poli, G., Cecchetti, R., Bastiani, P., Scamosci, M., Febo, M., ... & Mecocci, P. (2023). miRNAs and Alzheimer's Disease: Exploring the Role of Inflammation and Vitamin E in an Old-Age Population. *Nutrients*, *15*(3), 634.

Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *23*, 175-205.

Cacace, R., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & dementia*, *12*(6), 733-748.

Chabriat, H., Joutel, A., Dichgans, M., Tournier-Lasserve, E., & Bousser, M. G. (2009). Cadasil. *The Lancet Neurology*, *8*(7), 643-653.

Cruts, M., Theuns, J., & Van Broeckhoven, C. (2012). Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human mutation*, *33*(9), 1340-1344.

de Bruijn, R. F., & Ikram, M. A. (2014). Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease. *BMC medicine*, *12*, 1-9.

Dong, H., Li, J., Huang, L., Chen, X., Li, D., Wang, T., ... & Zhang, C. Y. (2015). Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Disease markers*, *2015*.

Eratne, D., Loi, S. M., Farrand, S., Kelso, W., Velakoulis, D., & Looi, J. C. (2018). Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australasian Psychiatry*, *26*(4), 347-357.

Fukutake, T. (2011). Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL): from discovery to gene identification. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *20*(2), 85-93.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Geekiyanage, H., Jicha, G. A., Nelson, P. T., & Chan, C. (2012). Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, *235*(2), 491-496.

Giri, M., Zhang, M., & Lü, Y. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clinical interventions in aging*, 665-681.

Girouard, H., & Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of applied physiology*, *100*(1), 328-335.

Grinberg, L. T., & Thal, D. R. (2010). Vascular pathology in the aged human brain. *Acta neuropathologica*, *119*, 277-290.

Guey, S., & Hervé, D. (2022). Main features of COL4A1-COL4A2 related cerebral microangiopathies. *Cerebral Circulation-Cognition and Behavior*, *3*, 100140.

Gustafson, L. (1996). What is dementia?. *Acta Neurologica Scandinavica*, *94*, 22-24.

Hachinski, V. C., Lassen, N. A., & Marshall, J. (1974). Multi-infarct dementia: a cause of mental deterioration in the elderly. *The Lancet*, *304*(7874), 207-209.

Harrington, C. R. (2012). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clinics*, *22*(1), 11-22.

Hébert, S. S., Horré, K., Nicolaï, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silahtaroglu, A. N., ... & De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/β-secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(17), 6415-6420.

Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature immunology*, *16*(3), 229-236.

Huang, W. (2017). MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics. *Bioinformatics in MicroRNA research*, 57-67.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, *80*(4), 844-866.

Idda, M. L., Munk, R., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2018). Noncoding RNAs in Alzheimer's disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *9*(2), e1463.

Iemolo, F., Duro, G., Rizzo, C., Castiglia, L., Hachinski, V., & Caruso, C. (2009). Pathophysiology of vascular dementia. *Immunity & Ageing*, *6*, 1-9.

Ikram, M. A., Bersano, A., Manso-Calderón, R., Jia, J. P., Schmidt, H., Middleton, L., ... & Adams, H. H. (2017). Genetics of vascular dementia–review from the ICVD working group. *BMC medicine*, *15*, 1-7.

Jellinger, K. A. (2013). Pathology and pathogenesis of vascular cognitive impairment—a critical update. *Frontiers in aging neuroscience*, 17.

Ju, Y. E. S., Lucey, B. P., & Holtzman, D. M. (2014). Sleep and Alzheimer disease pathology—a bidirectional relationship. *Nature Reviews Neurology*, *10*(2), 115-119.

Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry*, *77*(1), 43-51.

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.

Kiko, T., Nakagawa, K., Tsuduki, T., Furukawa, K., Arai, H., & Miyazawa, T. (2014). MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *39*(2), 253-259.

Kos, M. Z., Puppala, S., Cruz, D., Neary, J. L., Kumar, A., Dalan, E., ... & Carless, M. A. (2022). Blood-based miRNA biomarkers as correlates of brain-based miRNA expression. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 89.

Kou, X., Chen, D., & Chen, N. (2020). The regulation of microRNAs in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*, *11*, 288.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

König, T., & Stögmann, E. (2021). Genetik der Alzheimer-Demenz. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 1-8.

Kua, E. H., Ho, E., Tan, H. H., Tsoi, C., Thng, C., & Mahendran, R. (2014). The natural history of dementia. *Psychogeriatrics*, *14*(3), 196-201.

Kumral, E., & Özgören, O. (2017). Major Vascular Neurocognitive Disorder: A Reappraisal to Vascular Dementia. *Turkish Journal of Neurology/Turk Noroloji Dergisi*, *23*(1).

Kuo, D. S., Labelle-Dumais, C., & Gould, D. B. (2012). COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Human molecular genetics*, *21*(R1), R97-R110.

Landgrave-Gómez, J., Mercado-Gómez, O., & Guevara-Guzmán, R. (2015). Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, *9*, 58.

Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, *25*(1), 59-70.

Li, P., Zhang, L., Xiong, Q., Wang, Z., Cui, X., Zhou, Y. A., ... & Wu, C. (2019). Functional evaluation of a novel GLA causative mutation in Fabry disease. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *7*(9), e864.

Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., ... & Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet*, *396*(10248), 413-446.

Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*, *179*(2), 312-339.

Lopez, J. A. S., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of clinical neurology*, *167*, 231-255.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Ma, R., Wang, M., Gao, S., Zhu, L., Yu, L., Hu, D., ... & Han, X. (2020). miR-29a promotes the neurite outgrowth of rat neural stem cells by targeting extracellular matrix to repair brain injury. *Stem Cells and Development*, *29*(9), 599-614.

Malhas, A., Saunders, N. J., & Vaux, D. J. (2010). The nuclear envelope can control gene expression and cell cycle progression via miRNA regulation. *Cell cycle*, *9*(3), 531-539.

Müller, M., Jäkel, L., Bruinsma, I. B., Claassen, J. A., Kuiperij, H. B., & Verbeek, M. M. (2016). MicroRNA-29a is a candidate biomarker for Alzheimer's disease in cell-free cerebrospinal fluid. *Molecular Neurobiology*, *53*, 2894-2899.

Nguyen, T. N., Kumar, M., Fedele, E., Bonanno, G., & Bonifacino, T. (2022). MicroRNA alteration, application as biomarkers, and therapeutic approaches in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, *23*(9), 4718.

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

Öztürk, G. B., & Karan, M. A. (2009). Alzheimer hastalığının fizyopatolojisi. *Klinik gelişim*, *22*(3), 36-45.

Patel, N., Hoang, D., Miller, N., Ansaloni, S., Huang, Q., Rogers, J. T., ... & Saunders, A. J. (2008). MicroRNAs can regulate human APP levels. *Molecular neurodegeneration*, *3*, 1-6.

Rabinovici, G. D. (2019). Late-onset Alzheimer disease. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, *25*(1), 14.

Ragusa, M., Bosco, P., Tamburello, L., Barbagallo, C., Condorelli, A. G., Tornitore, M., ... & Purrello, M. (2016). miRNAs plasma profiles in vascular dementia: biomolecular data and biomedical implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*, 51.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Rehman, H. U. (2002). Role of CRH in the pathogenesis of dementia of Alzheimer's type and other dementias. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, *3*(11), 1637-1642.

Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, *7*(3), 137-152.

Ridge, P. G., Hoyt, K. B., Boehme, K., Mukherjee, S., Crane, P. K., Haines, J. L., ... & Reitz, C. (2016). Assessment of the genetic variance of late-onset Alzheimer's disease. Neurobiology of aging, 41, 200-e13.

Riscado, M., Baptista, B., & Sousa, F. (2021). New RNA-based breakthroughs in Alzheimer's disease diagnosis and therapeutics. *Pharmaceutics*, *13*(9), 1397.

Romay, M. C., Toro, C., & Iruela-Arispe, M. L. (2019). Emerging molecular mechanisms of vascular dementia. *Current opinion in hematology*, *26*(3), 199.

Roshan, R., Shridhar, S., Sarangdhar, M. A., Banik, A., Chawla, M., Garg, M., ... & Pillai, B. (2014). Brain-specific knockdown of miR-29 results in neuronal cell death and ataxia in mice. *Rna*, *20*(8), 1287-1297.

Rönnemaa, E., Zethelius, B., Lannfelt, L., & Kilander, L. (2011). Vascular risk factors and dementia: 40-year follow-up of a population-based cohort. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, *31*(6), 460-466.

Saito, R., Nozaki, H., Kato, T., Toyoshima, Y., Tanaka, H., Tsubata, Y., ... & Kakita, A. (2019). Retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy: clinicopathologic features of an autopsied patient with a heterozygous TREX 1 mutation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *78*(2), 181-186.

Šerý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., & Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia neuropathologica*, *51*(1), 1-9.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Shioya, M., Obayashi, S., Tabunoki, H., Arima, K., Saito, Y., Ishida, T., & Satoh, J. I. (2010). Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathology and applied neurobiology*, *36*(4), 320-330.

Siedlecki-Wullich, D., Miñano-Molina, A. J., & Rodríguez-Álvarez, J. (2021). microRNAs as early biomarkers of Alzheimer's disease: A synaptic perspective. *Cells*, *10*(1), 113.

Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). Role of miRNAs in Alzheimer's disease and possible fields of application. *International journal of molecular sciences*, *20*(16), 3979.

Sørensen, S. S., Nygaard, A. B., & Christensen, T. (2016). miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with Alzheimer's disease and other types of dementia–an exploratory study. *Translational neurodegeneration*, *5*, 1-12.

St GeorgeHyslop, P. H. (2000). Apolipoprotein E: High avidity binding to betaamyloid and increased frequency of type 4 allele in late onset familial Alzheimers disease. In *Proceedings of the National Academy of Science, USA* (Vol. 90, p. 197781).

Stepicheva, N. A., & Song, J. L. (2016). Function and regulation of microRNA-31 in development and disease. *Molecular reproduction and development*, *83*(8), 654-674.

Sullivan, K. J., & Elias, M. F. (2015). Vascular dementia. The Encyclopedia of Adulthood and Aging, 1-5.

Swarbrick, S., Wragg, N., Ghosh, S., & Stolzing, A. (2019). Systematic review of miRNA as biomarkers in Alzheimer's disease. *Molecular neurobiology*, *56*, 6156-6167.

Szelenberger, R., Kacprzak, M., Saluk-Bijak, J., Zielinska, M., & Bijak, M. (2019). Plasma MicroRNA as a novel diagnostic. *Clinica Chimica Acta*, *499*, 98-107.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

T O'Brien, J., & Thomas, A. (2015). Vascular dementia. *The Lancet*, *386*(10004), 1698-1706.

Tahami Monfared, A. A., Byrnes, M. J., White, L. A., & Zhang, Q. (2022). Alzheimer's disease: epidemiology and clinical progression. *Neurology and therapy*, *11*(2), 553-569.

Tikka, S., Baumann, M., Siitonen, M., Pasanen, P., Pöyhönen, M., Myllykangas, L., ... & Kalimo, H. (2014). cADAsIL and cARAsIL. *Brain Pathology*, *24*(5), 525-544.

Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine*, 5541-5554.

Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., & Sleegers, K. (2016). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genetics in Medicine*, *18*(5), 421-430.

Van den Berg, M. M. J., Krauskopf, J., Ramaekers, J. G., Kleinjans, J. C. S., Prickaerts, J., & Briedé, J. J. (2020). Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Progress in neurobiology*, *185*, 101732.

Venkat, P., Chopp, M., & Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Experimental neurology*, *272*, 97-108.

Venkat, P., Chopp, M., & Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Experimental neurology*, *272*, 97-108.

Vijayan, M., & Reddy, P. H. (2020). Non-coding RNAs based molecular links in type 2 diabetes, ischemic stroke, and vascular dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, *75*(2), 353-383.

Wang, H., Han, X., & Gao, S. (2021). Identification of potential biomarkers for pathogenesis of Alzheimer's disease. *Hereditas*, *158*(1), 1-8.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Weerasekare, J., Kassa, R., & Keegan, B. M. (2021). Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy due to TREX-1 mutation: an important mimicker of CNS inflammatory disease. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *47*, 102639.

Wei NA, Zheng K, Xue R, et al. Suppression of microRNA-9-5p rescues learning and memory in chronic cerebral hypoperfusion rats model. *Oncotarget*. 2017; 8(64): 107920- 107931.

Wu, H. Z. Y., Ong, K. L., Seeher, K., Armstrong, N. J., Thalamuthu, A., Brodaty, H., ... & Mather, K. (2016). Circulating microRNAs as biomarkers of Alzheimer's disease: a systematic review. *Journal of Alzheimer's Disease*, *49*(3), 755-766.

Xie H, Zhao Y, Zhou Y, et al. MiR-9 regulates the expression of BACE1 in dementia induced by chronic brain hypoperfusion in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42(3): 1213- 1226.

Xu, W., Qiu, C., Gatz, M., Pedersen, N. L., Johansson, B., & Fratiglioni, L. (2009). Mid-and late-life diabetes in relation to the risk of dementia: a population-based twin study. *Diabetes*, *58*(1), 71-77.

Yang, H. D., Lee, S. B., & Young, L. D. (2016). History of Alzheimer's disease. *Dementia and neurocognitive disorders*, *15*(4), 115-121.

Zhai, W., Zhao, M., Zhang, G., Wang, Z., Wei, C., & Sun, L. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapeutics for Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Frontiers in Neurology*, *13*.

Zhang, J., Sun, P., Zhou, C., Zhang, X., Ma, F., Xu, Y., ... & Yin, K. J. (2020). Regulatory microRNAs and vascular cognitive impairment and dementia. *CNS neuroscience & therapeutics*, *26*(12), 1207-1218.

Zhang, X. X., Tian, Y., Wang, Z. T., Ma, Y. H., Tan, L., & Yu, J. T. (2021). The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, *8*, 313-321.