



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA DAVRANIŞSAL SEMPTOMLAR
VE MİKROBİYOTA İLİŞKİSİ**

FATMA BETÜL ERCAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. SÜLEYMAN YILDIRIM

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. LÜTFÜ HANOĞLU

İSTANBUL – 2018



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALZHEIMER HASTALIĞINDA DAVRANIŞSAL SEMPTOMLAR
VE MİKROBİYOTA İLİŞKİSİ**

FATMA BETÜL ERCAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. SÜLEYMAN YILDIRIM

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. LÜTFÜ HANOĞLU

İSTANBUL – 2018

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Fatma Betül ERCAN
Tez Başlığı : Alzheimer Hastalığında Davranışsal Semptomlar ve
Mikrobiyota İlişkisi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 09.01.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç.Dr.Süleyman YILDIRIM

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

[Handwritten signature of Süleyman Yıldırım]

2.Danışman

Prof.Dr.Lütfü HANOĞLU

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Temel TOMBUL

Medeniyet Üniversitesi

Prof.Dr.Bahar GÜNTEKİN

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç.Dr.Burak YULUĞ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 17/01/2018 tarih ve 2018/03-14 sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmamın kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışım olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Fatma Betül ERCAN



TEŞEKKÜR

Kainattaki her mahlukat gibi insan da her an yeniden varoluşa muhataptır. Her yeni adım yeni pencereler açmakta, açılan her pencere de insanı yepyeni bir yola sevk etmektedir. İşte, insan hayatı yolda iken şahit olduklarından ibarettir. Hocalarımla mihmandarlığında hazırladığım bu tez de bu yolun bir parçası. Bu yolda şahit olduklarımı iki kapak arasına sığdırmak mümkün olmasa da birkaç paragraf ile beni yalnız bırakmayanları zikretmek istiyorum.

Evvvela yolumu açan, aydınlatan, güven veren, beni yolda hür kılan Allah'a hamd ederim; şüphesiz hamd O'nadır.

Tez çalışmalarına başladığım andan itibaren "hocalıklarımı" her daim hissettiğim danışmalarım Prof. Dr. Lütfü Hanoğlu ve Doç. Dr. Süleyman Yıldırım Hocalarımla. Onlar olmasaydı ben böyle bir çalışma yapamazdım. Sabırla ve sükûnetle bana rehberlik ettiler. Her iki hocama da minnettarım, teşekkürlerimi arz ederim.

Tez projemizde birlikte çalıştığımız yol arkadaşlarımla da bu çalışmanın ortaya çıkmasında emekleri var. Verileri toplarken desteklerini esirgemeyen ve benim projeye dahil olmamdan önce çalışmaya başlamış olan Kübra Kadak ve Halil Aziz Velioğlu'na; deneyleri birlikte yaptığımız Damla Korkmaz ve Fatma Koç'a ayrı ayrı teşekkür ederim.

Tüm yollarımın vesileleri, haklarını ne yaparsam yapıyım ödeyemeyeceğim muhterem annem ve babam; iyi ki varlar. Onlara ne kadar teşekkür etsem, onlarla olan şahitliğimi ne kadar zikretsem az. Allah onlardan ebeden razı olsun. Abim, yengem ve kardeşim; onlar yolumda ışığım azaldığında varlıklarıyla yolumu aydınlattılar, "kardeşlik" ettiler. Teşekkür ederim.

Son olarak tanıştığımız günden beri bana destek olan, hayatımı güzelleştiren ve beni yapabileceklerim konusunda teşvik eden kocam Mehmet'e de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Alzheimer Hastalığı	5
4.1.1. Epidemiyolojisi	5
4.1.2. Etiyolojisi.....	6
4.1.3. Davranışsal semptomlar.....	6
4.1.3.1. Bakım veren yükü	7
4.1.3.2. Tedavisi.....	7
4.2. Mikrobiyota.....	9
4.2.1. Bağırsak mikrobiyotası – beyin aksı.....	10
4.2.2. Bağırsak mikrobiyotası ve nörolojik hastalıklar	11
4.2.2.1. Bağırsak mikrobiyotası ve Alzheimer hastalığı ile ilişkisi	12
5. GEREÇ VE YÖNTEM	15
5.1. Etik Beyan, Deney Dizaynı ve Örneklem.....	15
5.2. Veri Toplama ve Analiz.....	15
5.2.1. Nöropsikometrik testler	16
5.2.1.1. Nöropsikiyatrik envanter (NPI)	16
5.2.1.2. Geriyatrik depresyon ölçeği (GDÖ).....	17
5.2.1.3. Standardize mini mental durum testi (MMSE).....	17
5.2.1.4. Klinik demans evreleme ölçeği (CDR).....	17
5.2.2. Fekal örnekler	18
5.2.2.1. Örneklerin toplanması.....	18

5.2.2.2.	DNA izolasyonu.....	18
5.2.2.3.	DNA konsantrasyon ölçümü.....	19
5.2.2.4.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	19
5.2.2.5.	Sekanslama işlemi, kümeleme ve taksonomik sınıflandırma	19
5.2.2.6.	Topluluk yapılarının ve çeşitliliğin çok değişkenli analizi	20
6.	BULGULAR.....	22
6.1.	Katılımcıların Demografik ve Klinik Verisi	22
6.2.	Biyoinformatik Analiz	22
6.2.1.	Alfa çeşitlilik.....	23
6.2.2.	Beta çeşitlilik	25
7.	TARTIŞMA VE SONUÇ	38
8.	KAYNAKLAR	42
9.	EKLER	50
10.	ETİK KURUL ONAYI.....	53
11.	ÖZGEÇMİŞ	56

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AH	:	Alzheimer Hastalığı
NFY	:	Nörofibriler Yumaklar
APP	:	Amiloid Prekürsor Proteini
OTU	:	Operasyonel Taksonomik Ünite
DS	:	Davranışsal Semptomlar
HPA	:	Hipotalamus – Hipofiz – Adrenal
RBD	:	Rem Uykusu Davranış Bozukluğu
APOE4	:	Apolipoprotein E4
LPS	:	Lipopolisakkarit
CDR	:	Klinik Demans Evrelendirme Ölçeği
NPI	:	Nöropsikiyatrik Envanter
GDÖ	:	Geriyatrik Depresyon Ölçeği
MMSE	:	Standardize Mini Mental Durum Testi
µl	:	mikrolitre
ml	:	mililitre
ng	:	nanogram
mm	:	milimetre
C	:	celcius
rpm	:	dakikadaki devir sayısı
sn	:	saniye
bp	:	baz çifti

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 6.2.1. Gruplardan elde edilen örneklerde Chao1 indisi ile hesaplanan alfa çeşitliliği.....	24
Şekil 6.2.2. Gruplardan elde edilen örneklerde Shannon indisi ile hesaplanan alfa çeşitliliği.....	24
Şekil 6.2.2.1. Grupların elde edilen örneklerdeki mikrobiyotanın Bray-Curtis indisine göre benzerliklerinin temel koordinat analizi (PCoA)'ni gösteren bi-plot.....	25
Şekil 6.2.2.2. Grupların elde edilen örneklerdeki mikrobiyotanın Jaccard indisine göre benzerliklerinin temel koordinat analizi (PCoA)'ni gösteren bi-plot.....	26
Şekil 6.2.3. Örneklerdeki mikrobiyotanın Jensen-Shannon Divergence indisine göre benzerliklerinin temel koordinat analizi sonuçları dendogramla gösterilmesi.....	27
Şekil 6.2.4. Bakterilerin filum seviyesinde örneklerdeki relatif oranları. Farklı filumlar renk farklı renklerle bar-plotta gösterilmiştir.....	28
Şekil 6.2.5. Bakterilerin filum seviyesinde örneklerdeki relatif oranları. Farklı filumlar renk farklı renklerle bar-plot olarak gösterilmiştir.....	28
Şekil 6.2.6. Negatif binomiyal Wald testi (DESeq2 analizi) ile aile seviyesinde gruplar arası Enterobacteriaceae ailesinin relatif oranı farkı istatistiksel olarak farklı anlamlı bulunmuştur ($q < 0,05$).....	29
Şekil 6.2.7. Random-forest değişken önemlilik derecelerinin grafiği.....	30
Şekil 6.2.8. Cins seviyesinde OTU'ların iki grup arasında farklılaşması.....	31
Şekil 6.2.9.ab Mesafe temelli tekrarlamalı uyum ordinasyon analizi (db-RDA).....	32
Şekil 6.2.10.ab Multivariate Linear Regresyon Modeli. Mikrobiyota değişiminin klinik verilerle korelasyonu Alfa çeşitlilik indisleri.....	35
Şekil 6.2.11.ab Multivariate Linear Regresyon Modeli. Mikrobiyota değişiminin klinik verilerle korelasyonu Beta çeşitlilik indisleri.....	36

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 6.1.1. Katılımcıların demografik ve davranış verisi.....	22
Tablo 6.1.2. Katılımcıların NPI alt alan skorlarının karşılaştırılması.....	23
Tablo 6.2.1. PCO analizi.....	32
Tablo 6.2.2. RDA analizi.....	33



1. ÖZET

ALZHEIMER HASTALIĞINDA DAVRANIŞSAL SEMPTOMLAR VE MİKROBIYOTA İLİŞKİSİ

Alzheimer bellekteki yıkımla seyreden bir demans türüdür. En önemli semptom kognitif yıkım olmakla birlikte hastalıkla artan davranış bozuklukları bakım verenler için daha yorucu bir hale gelebilmektedir. Bu nedenle, davranışsal semptomların tedavisi daha önceliklidir. Son zamanlarda nörolojik hastalıkların insan mikrobiyotasıyla ilişkili olduğunu gösterir yayınlar artmaktadır. Mikrobiyota kaynaklı tedavi yaklaşımlarının davranışsal semptomların tedavisinde de yer edinmesi kaçınılmazdır fakat öncelikle nörolojik hastalık olan Alzheimer ile mikrobiyota arasındaki ilişkinin detaylı şekilde incelenmesi gerekmektedir. Bildiğimiz kadarıyla Alzheimer hastalığında davranışsal semptomlar ile mikrobiyotanın ilişkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu ilişkiye ışık tutmak amacıyla yapılan bu pilot çalışmaya 13 Alzheimer hastası ile demografik olarak eşleştirilmiş 9 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Tüm katılımcılara Nöropsikiyatrik Envanter, Geriyatrik Depresyon Ölçeği ve Standardize Mini Mental Durum Testi uygulanmıştır. Fekal örnek alınıp 16S rRNA Next Generation Sekanslama analizi yapılmış, mikrobiyota kompozisyonu ile davranış skorlarının korelasyonuna bakılmıştır. Hasta grubunda davranışsal bozukluklar anlamlı derecede yüksek çıkarken korelasyon sonuçlarına bakıldığında davranış skorlarının mikrobiyota kompozisyonundaki değişimle kısmen korele olduğu görülmüştür. Bu, Alzheimer'da davranış bozukluklarının bakterilerle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, ileri çalışmalarla altta yatan mekanizmaların bulunup yeni ve invaziv olmayan tedavi yöntemlerinin bulunması için basamak oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: alzheimer, davranışsal semptomlar, mikrobiyota, NPI, sekanslama

Bu tez çalışmasında TÜBİTAK 'Comparative Analysis of Gut Microbiome Between Patients of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease.' adlı ve İMU-34810-002 protokol numaralı projesi çerçevesinde toplanan data kullanılmıştır.

2. ABSTRACT

RELATION BETWEEN BEHAVIORAL SYMPTOMS AND MICROBIOTA IN ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer is the type of dementia causing problems with memory, cognitive skills, and behaviors. Although the most important symptom is memory loss, adverse behavioral symptoms are challenging to deal with for caregivers. Therefore, disease modifying interventions must urgently be developed. Recently many studies published investigating the relationship between microbiota and neurodegenerative diseases. Microbiota approach is surely going to take place in treatment of behavioral symptoms but first it is needed to get clear how behavior is related to microbiota. To our knowledge, there is no study reporting on relationship between behavioral symptoms and microbiota in Alzheimer's disease. To shed light on the potential relationship, a cohort of 22 people (13 Alzheimer patients and 9 healthy controls) were recruited into the study. Neuropsychiatric Inventory, Geriatric Depression Scale and Mini Mental State Examination tests were applied to all participants. Fecal samples were also collected to profile bacterial microbiota by sequencing 16S rRNA. Results suggest that there is a correlation between behavioral symptoms and alterations in microbiota composition. This pilot study opens a previously uncharted field of research for the treatment and the management of the disease. The study also is expected to lead to more comprehensive clinical studies in search of non-invasive treatment options for behavioral symptoms in Alzheimer's disease.

Keywords: alzheimer's disease, behavioral symptoms, microbiota, NPI, sequencing

In this thesis statement, data from TÜBİTAK Project (prot. no: İMU-34810-002) called 'Comparative Analysis of Gut Microbiome Between Patients of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease.' were used.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH) ön planda bellek işlevindeki yıkım ile ortaya çıkan bir demans türüdür. Mevcut demans vakalarının %60-90 kadarını oluşturduğu düşünülmektedir [1]. Büyük oranda 65 yaş üstü kişilerde görülmesi bu hastalıkta en önemli risk faktörünün yaş olduğunu düşündürmektedir [2]. Ortalama yaşam süresindeki artış ve bir tedavisinin olmaması hasta sayısının gittikçe artmasına sebep olmaktadır. Henüz bir tedavi yönteminin geliştirilememiş olması semptomlara yönelik tedaviyi daha da önemli hale getirmektedir. Temel semptom bellek bozukluğu olmasına rağmen hastalık ilerledikçe davranışsal semptomlar da ortaya çıkar ve bu semptomlarla mücadele etmek bakım verenler için zorlayıcı bir etkene dönüşür. Hatta bu etken kimi zaman bakım verene düşen yükün ve hasta bakımının en önemli bileşeni olan kognitif yıkımın önüne geçebilmektedir. Mevcut tedavi yöntemlerinin davranışsal semptomların önüne geçmek için yeterli olmaması davranışsal semptomların altında yatan sebeplerin daha iyi anlaşılmasını gerektirmektedir.

Alzheimer bir beyin hastalığı olmasına rağmen yapılan araştırmalar hastalığın bedene uzanan yönlerinin de olabileceğini düşündürmektedir. Patolojinin altında yatan mekanizmaların anlaşılabilmesi için beyni araştırmalarına ek olarak hastalıkla ilgisi olabileceği düşünülen sistemleri de içeren çok yönlü araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu noktada davranışsal semptomların da kognitif yıkıma benzer şekilde beyin odağının dışında etkenlerle ilişkisi olabileceği düşünülebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar mikrobiyotanın beyinle ilişkili etkenlerden biri olabileceğini göstermiştir [3]. Mikrobiyotanın nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirildiği çalışmaların sayısındaki artış, yine bu hastalıklardan kaynaklı davranışsal semptomların da kişinin mikrobiyomundaki değişikliklerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Aralarındaki nedensellik ilişkisi tam olarak bilinmemekle birlikte davranış değişiklikleriyle mikrobiyota arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmalar bu ilişkinin çift yönlü olduğunu düşündürmektedir [4, 5].

Bağırsak (mikrobiyotası)-beyin aksı olarak adlandırılan bu ilişkinin Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda da davranışı etkileyip etkilemediğini araştıran bir

Çalışma bildiğimiz kadarıyla bulunmamaktadır. Mevcut çalışmanın amacı AH'li hastalara bakım veren kişiler üzerinde önemli bir yıkıcı etkiye sahip olan davranışsal semptomların mikrobiyota ile ilişkisini araştırmak ve bu semptomların mikrobiyota gibi hızlı/kolay değişebilen bir etken üzerinden invazif olmayan yöntemlerle hafifletilebileceğini gosterecek çalışmalara olanak sağlayacak on bilgiyi elde ederek literature katkı sağlamaktır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı ilerleyici, tedavi edilemeyen ve kronik nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. Başta bellek ve öğrenme becerilerini etkileyen bilişsel bozulmayla karakterize olan bu hastalık demansın en sık rastlanan türüdür [1]. Beyinde temelde hafıza ile ilgili bölgelerdeki nöronların hasar görmesi sonucu temel semptom olarak bellek bozukluğu ile karakterize olan bu hastalıkta diğer bilişsel işlev bozuklukları hasarın yayıldığı bölgelere göre değişiklik gösterebilir [6]. Daha çok apati, ajitasyon, depresyon, agresiflik, anksiyete, halüsinasyon ve hezeyanlar gibi davranış problemleri önde gelen semptomlardan bir tanesidir [7]. Kişiden kişiye farklılık gösteren semptomların şiddeti hastalık ilerledikçe artar ve hasta günlük işlerini yapamamaya başlar. Daha ileri evrelerde ise bakıma muhtaç hale gelir. Yeme, tuvalete gitme, iletişim kurma hatta hareket etme becerilerini tümüyle kaybeder. Bu durum hastayı enfeksiyonlara daha yatkın hale getirir ve yapılan araştırmalara göre AH'de zatürre sebepli ölüm oranı oldukça yüksektir [8].

4.1.1. Epidemiyolojisi

2013 yılında Alzheimer hastalığının yaygınlığını belirlemek amacıyla Amerika'da yayınlanan bir çalışmada 2018 yılında Alzheimer hastalarının sayısının 5,5 milyona ulaşacağı öngörülmüştür. Bu hastalık 65 yaş üstünde her 10 kişiden birinde görülürken 85 yaş üstünde her 3 kişiden birinde görülmektedir. Dolayısıyla yaş AH için en önemli risk faktörlerinden biri olarak değerlendirilmektedir [9]. Hastalığın kadınlarda görülme oranı erkeklerin yaklaşık iki katıdır. Bu da kadınların erkeklerden daha uzun yaşamasıyla ve yaşam süresindeki uzunluğun AH'nin en önemli risk faktörlerinden biri olmasıyla açıklanmaktadır. Türkiye'de AH için yapılan yaygınlık çalışmaları azdır. En son 2008 yılında Gürvit ve arkadaşlarının yaptığı yaygınlık çalışmasında 70 yaş üzeri kişilerde AH görülme sıklığının %7-11 oranında olduğu görülmüştür [10].

4.1.2. Etiyolojisi

Tüm demans türleri arasında en yaygını olarak bilinen AH, klinik olarak kabaca birbirinden ayırt edilebilen üç evrede değerlendirilir; erken, orta ve ileri. Bununla birlikte hastalığın etiyolojisi ve gelişimsel süreci tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Genetik bozuklukların da etkili olduğu söylenmekle birlikte bunun AH hastalarının %5'ini oluşturduğu ve geri kalan %95'in idiyopatik olduğu bilinmektedir (referans). Aksini iddia eden yayınlar olmakla birlikte [11] literatürün geneline bakıldığında AH oluşumu hücre dışında biriken amiloid plaklar ve hücre içerisinde oluşan nörofibriler yumaklar (NFY – tau proteinleri) ile karakterizedir [12].

Amiloid plaklar bir transmembran proteini olan APP'nin yanlış katlanması sonucu oluşur. Bu yanlış katlanmayla meydana gelen yeni form yıkılmaz ve hücre dışında kümeleşerek nöronların zarar görmesine sebep olur. Hipokampus başta olmak üzere beynin çeşitli bölgelerinde oluşan bu birikme bilişsel işlevleri bozmakta ve hastalığın ilerlemesine sebep olmaktadır [13]. Vücutta en çok merkezi sinir sisteminde bulunan tau proteinleri ise hücre içerisinde önemli işlevlere sahiptir. Bu proteinin normalden fazla fosforlanmasıyla oluşan NFY hücre içinde birikerek hücrenin işlevini bozar ve hücrede hasara sebep olur [14]. Yapılan bazı çalışmalar NFY'nin beyin omurilik sıvısındaki artışının AH için biyobelirteç olabileceğini göstermektedir [15].

4.1.3. Davranışsal semptomlar

Alzheimer hastalığında davranışsal semptomlar (DS) oldukça yaygın görülmektedir. AH için önemli risk faktörlerinden biri olarak bilinen hafif bilişsel bozukluk evresindeki kişilerde dahi DS 35-75% oranında görülmektedir. Dahası DS gösteren hafif bilişsel bozukluk hastalarında AH gelişme olasılığının daha yüksek olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur [16]. Bulgular nedensellik ilişkisi bilinmemekle birlikte DS'nin Alzheimer'da hem teşhis evresinde hem de hastalık sürecinde önemli bir gösterge olduğunu düşündürmektedir. Davranış bozuklukları arasından en sık görülenler başta apati (%72), sonrasında ise ajitasyon (%60), depresyon (%50), anksiyete (%48), irritabilite (%42), disfori ve anormal motor davranış (%38), disinhibisyon (%36), hezeyan (%22) ve halüsinasyondur (%10) [17, 18].

4.1.3.1. Bakım veren yükü

Alzheimer hastaları hastalık ilerledikçe günlük aktivitelerini yapamaz duruma gelirler. Bu sebeple bakıma ihtiyaç duyarlar. Hastalığın esas semptomu kognitif bozulma olmakla birlikte bakım veren kişiler için davranışsal değişiklikler daha önemli hale gelmeye başlar. Yapılan birçok çalışmada bakım veren yükünün hastalık ilerledikçe artan DS'ye paralel olarak değiştiği gösterilmiştir [19, 20]. Kognitif bozulma seviyesi benzer olan hastalarla yapılan bir çalışmada DS'deki artış ile bakım veren yükü arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş ve bakım veren yükünün hastalığın kendisinden çok DS ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır [21]. DS azaldıkça bakım veren yükünün azalması hasta yakınları için DS'nin tedavisini daha önemli hale getirmektedir.

4.1.3.2. Tedavisi

Hali hazırda DS için ilaçlı ve ilaçsız tedavi yöntemleri uygulanmakla birlikte henüz yaygın şekilde kabul gören, etkili ve zararsız bir tedavi yöntemi yoktur. Etiyolojisi tam olarak bilinmeyen bir hastalığın semptomlarının da tedavisi tam anlamıyla mümkün değildir. Davranışsal bozuklukların karakter, eğitim seviyesi, aile geçmişi, hastalığa yatkınlık gibi farklı etkenlerin birleşimiyle ortaya çıktığı düşünülmekte [6], dolayısıyla her hastada aynı oranda işe yarayan bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bakım verenlere psikoeğitim verilmesi ve hastalara uygun yaşam alanı sağlanması gibi ilaçsız uygulamaların DS'yi azalttığı görülmüştür [22]. Bununla birlikte çoğunlukla antipsikotikler, antidepresanlar, antikonvulsanlar ve kolinesteraz inhibitörleri gibi ilaçlı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Gauthier ve arkadaşları davranışsal semptomlar ile başa çıkma yöntemleri üzerine derledikleri çalışmada öncelikli seçeneğin ilaçsız tedaviler olması gerektiğini vurgulamışlardır [22] fakat hastalarla iletişim kurmakta yaşanan problem yapılacak tedavilerin bakım verenler üzerinden olmasını gerektirmektedir. Bu da kişiler üzerinde fazladan yük oluşturmaktadır.

Alzheimer hastalığı bir beyin hastalığı olmakla birlikte son zamanlarda hastalığın beyin dışı odaklarla olan ilişkisi de gündeme gelmiştir. Patojenezi tam olarak bilinmeyen bu hastalığın bedene uzanan yönlerinin bilinmesi bağlantılı oldukları vücut

sistemlerini (endokrin sistemi, gastrointestinal sistem vs.) anlamak ve hastalığı tüm yönleriyle değerlendirebilmek için önemlidir. Bu bilgi hastalığın altta yatan mekanizmalarını ve bunlardaki bozuklukları daha iyi anlamamıza olanak sağlayacak ve mevcut yöntemlerden daha etkili ve kapsamlı tedaviler bulmak için veya fayda sağlayacak ek tedavi yöntemleri geliştirmek için gerekli olan ön bilgiyi sunacaktır. Merkezi sinir sistemi dışında ve fakat hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülen alanlardan birisi mikrobiyotadır.

4.1.3.3. Fizyopatolojisi

Davranışsal semptomların beyinde pek çok bölge ile ilişkili olduğu söylenebilir. AH'de en sık görülen davranış problemlerinden biri olan apatinin beyin duyu düzenlemeyle ilgili bazı bölgelerindeki yapısal ve işlevsel bozulmayla ilgili olduğu düşünülmektedir. Anterior singulat korteks (ACC) bunların başında gelmekle birlikte posterior singulat korteks ve frontal korteksin de bağlantılı olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur [23]. Bu bölgelerde görülen gri madde hacmindeki azalma ile korelasyon gösteren apati aynı zamanda inferior temporal korteksteeki incelmeye de ilişkili bulunmuştur. AH'nin en önemli semptomlarından olan amiloid plaklar ve nörofibriler yumakların oluşmasında rol alan tau proteinlerinin apati ile ilişkisine bakıldığında ise plaklardan ziyade tau proteinlerinin etkili olduğu düşünülmüştür [23]. Ajitasyon'un da birçok durumda hezeyan ile birlikte ortaya çıktığı ve apatiye benzer bir patolojiye sahip olduğuna dair çalışmalar vardır [24]. Depresyonun AH'de ortaya çıkmasında da yine ACC'de hacim düşüklüğü ile birlikte entorinal kortekste incelmenin etkili olduğu söylenmektedir [25]. Bunlarla birlikte davranışsal problemlerin altta yatan sebepleri henüz tam olarak bilinmemektedir.

GABA beyindeki en önemli inhibitör nörotransmitterlerden birisidir. Yapılan çalışmalar kolinerjik, GABAerjik ve dopaminerjik işlevlerdeki bozulmaların da davranış problemleriyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir [26]. Aynı şekilde depresyon görülen AH'li hastalarda serotonin reseptörü ve taşıyıcısında ciddi azalma görülmektedir [27]. Bu durum davranış problemlerinde nörotransmitterlerin önemli olduğunu gösterir.

Vücudumuzdaki bakterilerin büyük çoğunluğunun bağırsaklarda yaşadığı ve kolondaki enterokromofin hücrelerini etkileyerek serotonin biyosentezine sebep olduğunu gösteren çalışmalar vardır [28]. Stres, apati, anksiyete gibi davranış problemlerinde önemli rolü olan GABA'nın da çoğunlukla *Lactobacilli* gibi laktik asit bakterileri tarafından üretildiği bilinmektedir [29]. Bunlar daha çok depresyonla ilişkilendirilen serotoninin ve önemli inhibitörlerden olan GABA'nın AH'deki davranış bozukluklarında etkili olabileceği ve patofizyolojisinde bakterilerin de rolü olabileceğini göstermektedir.

4.2. Mikrobiyota

İnsan vücudundaki deri, bazı iç organlar ve cinsel bölgelerde yaşayan simbiyotik, kommensal ve patojenik mikroorganizmaların tümüne birden insan mikrobiyotası denir. İnsan sağlığını doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği düşünülen mikrobiyota insanların kendi genomlarının uzantısı olarak görülmektedir. İnsan vücudunda önemli katkıları olan mikrobiyota vücutta bulunmayan enzimleri salgılayarak besinlerin sindirimine yardımcı olur ve ihtiyaç duyduğumuz vitamin, kısa zincirli yağ asitleri gibi esansiyel metabolitlerin üretilmesine katkı sağlar. Bunlarla birlikte mikrobiyota insanların bağışıklık sisteminin güçlenmesinde ve patojenlerin kontrolünde de önemli rol oynar.

Son zamanlarda biyoinformatik alanındaki teknolojik gelişmeler ve yeni nesil DNA dizinleme gibi moleküler yöntemler insan mikrobiyomunun ne olduğunu ve sağlığımızı nasıl ve ne derece etkilediğinin daha iyi anlaşılmasına kapı aralamıştır. Bu yöntemler dünya genelinde büyük çaplı mikrobiyom projelerinin yapılmasına da ön ayak olmuştur. Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından desteklenen insan mikrobiyom projesi (Human Microbiome Project) ve Avrupa'da yürütülen insan bağırsağının metagenomik analizi (MetaHit) bu projelere örnektir. Her iki proje de metagenomik yöntemlerle insan bağırsak mikrobiyomunun hastalıkla ve sağlıklı olma durumuyla nasıl bir ilişki içerisinde olduğunu araştırmayı amaçlamaktadır. Bu projeler insan mikrobiyomunun tıbbi ve işlevsel öneminin kavranmasına yol açmış ve yeni teşhis ve tedavi yöntemleri için fırsat oluşturmuştur.

Bu temel çalışmalara ek olarak son zamanlarda sağlıklı ve hasta bireylerde bu tür yöntemlerle yapılan karşılaştırmalı mikrobiyota analizleri insan mikrobiyomunun insan sağlığı üzerinde ne denli etkili olduğunun anlaşılmasını sağlamıştır. İnsan mikrobiyomu bedende bazı dokularla etkileşime girebilir ve hatta mikrobiyom tarafından üretilen metabolitler kan dolaşımına karışabilir. Mikropsuz ortamda yetiştirilen farelerle (germ-free) yapılan deneyler kanda dolaşan metabolitlerin büyük bir kısmının mikrobiyota tarafından üretildiğini göstermiştir [30]. Karşılaştırmalı çalışmalar mikrobiyomun popülasyonunun hastalık durumunda anlamlı oranda değiştiğini göstermiştir [31-33].

4.2.1. Bağırsak mikrobiyotası – beyin aksı

Bağırsak mikrobiyotası-beyin ilişkisi göreceli olarak yeni bir alandır. Çift yönlü olduğu düşünülen bu ilişkinin kişinin psikolojik durumundan mental rahatsızlıklarına kadar etkili olabileceğini söyleyen çeşitli yayınlar mevcuttur. Garaeu ve arkadaşları (2011) yine bakteriyel enfeksiyonun hafıza üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarında enfekte olan farelerin daha fazla hafıza disfonksiyonu yaşadıklarını, dahası enfeksiyon öncesi ve sırasında uygulanan probiyotik tedavisinin disfonksiyon gelişimini engellediğini göstermişlerdir [5]. Desbonnet'nin (2010) yaptığı başka bir çalışmada ise probiyotiklerin depresyon kaynaklı davranışsal ve bağışıklık sistemi problemleri için tedavi edici bir etkisi olduğu sonucuna ulaşmıştır [4]. Magnezyum eksikliğinin farelerin bağırsak mikrobiyotasında değişikliğe ve depresyon benzeri davranışların ortaya çıkmasına neden olduğu ve mikrobiyotadaki değişimle davranıştaki değişimin birbiriyle nedensellik ilişkisi içinde olabileceğine dair de kanıtlar mevcuttur [34]. Beyin ve bağırsak arasında öngörülen ilişkinin hormonal sistem üzerindeki etkisini anlamak için yapılan bir diğer çalışmada germ-free farelerde HPA (hipotalamus-hipofiz-adrenal) aksında anlamlı ölçüde bir aktivite artışı, bağışıklık sisteminde zayıflama, ve mikrobiyotası olan farelerden germ-free farelere yapılan mikrobiyota aktarımı (kolonizasyon) sonrasında anksiyete benzeri davranışlarda azalma görülmüştür [35]. Bu bilgiler komensal bağırsak mikrobiyotasının beyin hastalıkları için alternatif bir tedavi olabileceğini

göstermektedir. Buna rağmen beyin-bağırsak ilişkisinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Bakterilerin beyni ve davranışı etkilemesinin 3 farklı yol ile olduğu düşünülmektedir: bağışıklık sistemi, endokrin sistem ve vagal sinir. Bağırsak yüzeyinde villuslar bulunur. Bunların en önemli görevi besinlerin emilmesidir. Bununla birlikte vücuttaki bağışıklık hücrelerinin çoğu da villuslarda ve altındaki dokuda bulunurlar. Villusların içerisinde bulunan damarlar emilen besinlerin vücuda dağılması işlevini görür. Bağırsağın dış yüzü epitel dokuyla çevrilidir ve bu doku mikrobiyal infüzyonu engeller. Bu yapılar çoğunlukla mikrobiyotanın diğer organlarda ilişkisinde rol alan yapılardır. Stres durumunda üretilen kortizol hem enterik kaslar aracılığıyla bağırsak hareketlerini hem de bağırsaktaki bağışıklık hücrelerini etkiler. Aynı zamanda bağırsak lümeninde bulunan mikroorganizmalar bağışıklık sistemi hücrelerini etkileyerek kana karışan sitokin miktarını değiştirebilirler. Vagal sinir tüm organlardan aldığı bilgiyi beyine iletir. Aynı zamanda bağışıklık sistemi, enterik kaslar ve direkt olarak bağırsak duvarındaki epitel hücreler tarafından uyarılabilirler. Bu durum vagal sinirin beyin-bağırsak ilişkisinde hayli önemli olduğunun göstergesidir. Tryptophan metabolizması ise direkt olarak bağırsak bakterilerinden etkilenecek hem sirkülasyona karışan metabolitlerde hem de vagal sinir üzerinde etki gösterirler. Bunlarla beraber bağırsak mikrobiyotası direkt olarak kısa zincirli yağ asidi üretimini sağlayarak kanda dolaşan metabolitlerin kompozisyonunu değiştirir. Bütün bunlar mikrobiyota - beyin aksının çalışma mekanizmasına ışık tutmaktadır [36].

4.2.2. Bağırsak mikrobiyotası ve nörolojik hastalıklar

Nörolojik hastalıkların insan mikrobiyotasıyla ilişkili olduğuna dair yayınların sayısı gün geçtikçe artmaktadır [37, 38]. Otizm spektrum bozukluğunda intestinal ve davranışsal fenotipin mikrobiyal kolonizasyon ve aktivite ile alakalı olduğu bilinmektedir [39]. Hsiao yaptığı bir çalışmada otizimli farelerde gastrointestinal bariyerde bozulma olduğunu göstermiştir. Yine bu farelerin spesifik bakterilerle tedavi edilmesi sonrasında davranışsal problemlerde iyileşme gözlemlenmiştir [38]. Son zamanlarda nörodejeneratif hastalıkların mikrobiyota ile ilişkisi de gündem olmaya

başlamıştır. Huzursuz bağırsak sendromunun demansa yakalanma riskini artırdığı söylenmektedir [40]. Parkinson hastalığıyla ilgili çalışmalarda ise hastalığın şiddeti arttıkça mikrobiyota kompozisyonunun değiştiği gözlemlenmiştir [41]. Heintz-Buschart ve arkadaşları Parkinson hastalığında bağırsak mikrobiyotasında görülen bu değişimin Rem Uykusu Davranış Bozukluğu (RBD) olan kişilerle örtüştüğünü göstermiştir [42]. RBD Parkinson hastalığından en sık görülen davranış bozukluklarından bir tanesidir. Mikrobiyotanın iki rahatsızlık arasında bu denli benzeşmesi AH'li kişilerin mikrobiyotasındaki değişikliğin davranışlarıyla da ilişkili olduğu ve mikrobiyotaya yapılacak bir müdahalenin hem hastalığın patolojisi hem de davranışsal semptomları üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

4.2.2.1. Bağırsak mikrobiyotası ve Alzheimer hastalığı ile ilişkisi

Alzheimer hastalığında kognitif bozulmanın temel sebebinin beyinde amiloyid plakların birikimi olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte bu birikimin her zaman kognitif bozulmaya yol açmadığı da bilinmektedir. Bu farklılığın inflamasyon kaynaklı veya bağışıklık sisteminin mevcut duruma verdiği cevap ile ilişkili olduğu söylenebilir [43, 44]. Alzheimer hastalığı için en önemli risk faktörü olarak kabul edilen apolipoprotein E4'ün polimorfiziminin (APOE4) amiloyid plakların temizlenmesinde, inflamator cevapta ve kan beyin bariyeri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir [45]. Hastalığın erken evresinde nöroinflamasyonun da etkili olduğunu gösteren yayınlarla birlikte [46, 47] mikropların nöroinflamasyona sebep olduğuna dair kanıtlar da mevcuttur [48]. İnflamasyona ek olarak kanda dolaşan metabolitlerin de hastalık üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir [45]. Bağırsak bariyerin mukoza ile korunmakta ve mukoza mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [49]. Sosyal strese maruz kalan hayvanlarda bağırsak mukozası bozulmakta [50] fakat beslenme takviyesiyle iyileşme göstermektedir [51]. Yine mukozadaki bozulmanın sızıntılı bağırsak sendromuna yol açtığı ve lipopolisakkaritlerin (LPS) kan dolaşımına sızması sonucu depresyonun inflamatuvar patofizyolojisine sebep olduğu görülmüştür [52]. Yeni yapılan bir çalışma bakterilerin insanlardaki sinyalleşme moleküllerine benzeyen ve G protein reseptörlerine uygun ligand üretilip enzimatik reaksiyon başlatabildiğini göstermektedir [53]. Yine mikrobiyotanın ürettiği kısa zincirli yağ asitlerinin de ligand görevi gördükleri ve diğer

ligandlar ile birlikte kan dolaşımına karışan moleküllerin üretilmesinde etkili oldukları bilinmektedir [54]. Bu çalışmalar bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin kanda dolaşan metabolitleri etkilediğine ve inflamasyonu tetikleyebildiğine dair bir kanıt oluşturmaktadır. Germ-free farelerle yapılan deneylerde kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin de arttığı görülmüştür [55] ile Alzheimer'lı hastaların post-mortem beyinleri ile yapılan çalışmada hastaların beyin dokusundaki bakteri popülasyonunda görülen artış [56] mikrobiyotanın beyin hastalıklarına yol açabileceğine dair tezleri güçlendirmektedir. Bunlar, inflamasyon ve dolaşımdaki metabolitlerle ilişkili olduğu düşünülen Alzheimer hastalığının da mikroorganizmalardan etkilendiğini düşündürmektedir. İkisi arasında bulunacak bir nedensellik ilişkisi AH için yeni ve kolay tedavi yollarına kapı açabilir. Bakım verenler için hastalığın kendisinden daha fazla yük oluşturan davranışsal semptomlar da bu nedensellik bulgusu sonucu daha etkili yöntemlerle tedavi edilebilir.

Bununla birlikte tedavi çalışmalarından önce AH'de davranış bozukluklarının mikrobiyotayla ilişkisinin bilinmesi gerekmektedir. AH'li farelerde yapılan az sayıda çalışmada mikrobiyotanın hastalığın gelişimi süresince ve hastanın yaşına bağlı olarak farklılaştığı gösterilmiştir [57, 58]. Yine mikrobiyotanın davranış problemleriyle ilişkisini gösteren birçok çalışma mevcuttur [4, 38, 39]. Bunlara rağmen bildiğimiz kadarıyla insanlarla yapılan ve Alzheimer'da davranışsal bozukluklarla mikrobiyotadaki değişimin ilişkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı AH'li hastalara bakımveren kişilerde hastalığın kendisinden daha fazla yük oluşturan davranışsal semptomların mikrobiyota ile ilişkisinin araştırılması, bu semptomların mikrobiyota gibi kolay ve hızlı değişebilen ve invazif olmayan bir yöntemle tedavi edilebilmesi için yapılacak araştırmalara ön bilgi oluşturulması ve bakımveren kişilerin yükünü azaltmaya yönelik alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılmasına olanak sağlamaktır. Bu amaçla çalışmaya katılımcı olarak 15 AH'li hasta ve demografik olarak eşleştirilmiş 9 sağlıklı kontrol dahil edilmiş ve tüm katılımcılardan mikrobiyota analizleri için gaita örneği alınmış, mental durumları ile davranışsal işlevlerini ölçmek amacıyla da nöropsikolojik değerlendirme

testleri uygulanmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiş ve bulgular literatür ışığında tartışılmıştır.



5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Etik Beyan, Deney Dizaynı ve Örneklem

Bu çalışmanın protokolü İstanbul Medipol Üniversitesi'nin yerel etik kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmaya Medipol Üniversitesi Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı Unutkanlık Polikliniği'ne başvuran ayaktan hastalar arasından NINCDS-ADRDA (McKhann vd. 1984) kriterlerine göre erken veya orta evre Alzheimer tanısı almış, 55-88 yaş aralığında 13 Alzheimer hastası ile yaş ve eğitim açısından eşleştirilmiş, nörolojik veya psikiyatrik rahatsızlığı olmayan 9 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Demansın evrelenmesi için Klinik Demans Evreleme Ölçeği (Clinical Dementia Rating Scale - CDR) kullanılmış, 1 erken, 2 orta evre olarak değerlendirilmiştir. Tüm katılımcılar için son 1 ay içerisinde antibiyotik kullanmış olmak ve tümörü olmak, sağlıklı kontroller için geçmişinde kafa travması veya inme öyküsü olmak dışlama kriterleri olarak belirlenmiştir. Tüm katılımcılara çalışma öncesinde onam formu imzalatılmıştır. İki katılımcı eksik data sebebiyle çalışmaya dahil edilememiştir.

5.2. Veri Toplama ve Analiz

Bu çalışmada tüm katılımcıların yaş, eğitim ve cinsiyet bilgileri alınmış ve hepsine Nöropsikiyatrik Envanter (Neuropsychiatric Inventory - NPI) [59], Geriatrik Depresyon Ölçeği (Geriatric Depression Scale - GDÖ) [60] ve Standardize Mini Mental Test'in (MMSE) [50] Türkçe versiyonları uygulanarak davranış skorları ve mental durumları kaydedilmiştir. Fekal örnekler çoğunlukla aynı gün olmak üzere en geç 1 hafta içerisinde fekal örnek toplama kiti ile alınıp steril turuncu kapaklı standart gaita tüpüne aktarılmış ve analizlerin yapılacağı zamana kadar -80°C'ye kaldırılmıştır. Hasta grubundan 5 kişiden 1 yıl sonra tekrar örnek alınmış ve önceki örneklerle mikrobiyota karşılaştırması yapılmıştır.

5.2.1. Nöropsikometrik testler

5.2.1.1. Nöropsikiyatrik envanter (NPI)

Nöropsikiyatrik envanter demans hastalığında kişinin davranış değerlendirmesi için en sık kullanılan testler arasındadır [46]. Hasta yakını ile yapılan görüşme ile puanlanan bu ölçek toplamda 12 davranışın değerlendirmesini içerir: Hezeyanlar, halüsinasyonlar, ajitasyon/saldırganlık, depresyon/disfori, anksiyete, elasyon/öfori, apati/kayıtsızlık, disinhibisyon, iritabilite/labilite, anormal motor davranış, uyku/gece davranışları, iştah ve yeme değişimleri. Öncelikle her davranış tanımlanarak hastada olup olmadığı hasta yakınının beyanı ile tespit edilir. Hastada görülmeyen davranışlar ‘hayır’ olarak işaretlenir ve 0 ile puanlanır. Tarama sonucu doğrulanmış ve davranışın varlığı tespit edilmişse hasta yakınına o davranış için belirlenen “Hasta mevcut olmayan kişilerle konuşuyor mu?”, “Hasta inatçı ve dediğim dedik mi davranıyor?” gibi sorular sorularak ayrıntılı bilgi alınır. Bu bilgiler ışığında var olan davranışın sıklığı ve şiddetinin değerlendirilmesi istenir. Sıklık 1-4 arası (1- nadiren/haftada birden daha az, 4- çok sık/her gün) şiddet ise 1-3 (1- hafif, 3- ağır) arası puanla değerlendirilir. Sonrasında “Bu davranışı duygusal açıdan ne kadar sıkıntı verici buluyorsunuz?” sorusu sorularak mevcut problemin bakım verenleri ne kadar etkilediği 0-5 (0- hiç, 5- çok ağır veya aşırı derecede) arası bir puanlamayla değerlendirilir. Testin bitiminde hastanın davranış skoru her bir davranış için sıklık ve şiddet için puanlarının çarpılmasıyla (en az 0, en fazla 12 olarak) elde edilir. Toplam NPI puanı bunlar toplanarak hesaplanır ve 144 üzerinden değerlendirilir.

5.2.1.2. Geriyatrik depresyon ölçeği (GDÖ)

Geriyatrik depresyon ölçeği yaşı ve demanslı popülasyonda uygulanması amacıyla geliştirilmiş bir depresyon ölçeğidir [61]. Hastadan kendisine sorulan 30 sorudan her birine evet veya hayır cevabı vermesi istenerek depresyon belirtisi sayılan her cevap için 1 puan verilir. Diğer cevaplar 0 puan olarak değerlendirilir. Alınan puanlar toplanarak depresyon skoru elde edilir.

5.2.1.3. Standardize mini mental durum testi (MMSE)

Standardize Mini Mental Durum Testi yönelim, kayıt hafızası, hatırlama, dikkat ve hesap yapma, ve lisan alt alanlarından oluşan, kolay uygulanan ve hastanın ön tanısı için kullanılan bir bilişsel işlev ölçme testidir [51]. Bu testte tüm alanları doğru bir şekilde tamamlayan katılımcının alacağı toplam puan 30'dur. Türkiye'de hafif demans için yapılan geçerlilik güvenilirlik çalışmasında 23-24/30 puanın ileri tetkikler için sınır olduğu görülmüş ve bu puanın üstü sağlıklı kabul edilmiştir [50].

5.2.1.4. Klinik demans evreleme ölçeği (CDR)

Klinik Demans Evreleme Ölçeği içerdiği yarı yapılandırılmış sorular ile hastanın 6 alt alandaki bilişsel ve fiziksel işlevselliğinin değerlendirilmesini amaçlamaktadır [62]. Aile üyesi ve hastanın kendisiyle beraber yapılan görüşmede değerlendirilen 6 alt alan şunlardır: Bellek, oryantasyon, yargılama ve problem çözme, ev dışı faaliyet, ev ve hobiler, kişisel bakım. Her alan için 0-3 arası bir puan verilir ve değerlendirme sonunda alınan ortalama puan üzerinden hastanın demans evresi belirlenir. Sıfır sağlıklı, 0.5 şüpheli, 1 erken, 2 orta ve 3 ileri demans olarak değerlendirilir. Bu çalışmaya sadece erken ve orta evredeki Alzheimer hastaları dahil edilmiştir.

5.2.2. Fekal örnekler

5.2.2.1. Örneklerin toplanması

Örneklerin toplanması için katılımcılara Fecotainer gaita toplama kabı verilmiştir. Toplanan örnek laboratuvar ortamında turuncu kapaklı steril gaita tüpüne alınarak analizlerin yapılacağı zamana kadar -80 °C'ye kaldırılmıştır.

5.2.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu QIAamp DNA Mini Stool Kit kullanarak üreticinin protokolüne uygun şekilde yapılmıştır (Qiagen, Germany). Örnekler -80 °C'den çıkarılarak hassas terazide tartıldı. Ağırlığının 2 katı miktarda ASL tampon-Gliserol (50:50) karışımı eklendi. Vortex yardımıyla örneğin çözülmesi ve homojenize olması sağlandıktan sonra 450 µl'si 2ml'lik ve içerisinde 250 µl zirkonyum-bead (0.1 mm) olan mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 1000 µl ASL tampon eklenerek 15 saniye süreyle vortex ile homojenize edildi. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 3 sefer 30'ar saniye boyunca bead-bug homojenizer ile homojenize edildi. Her 30 saniye sonrasında 1 dakika buz üzerinde soğumaya bırakıldı. İşlem bittikten sonra InhibitEX tablet eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bırakılıp ve tabletin çözülmesini kolaylaştırmak amacıyla 200 µl ASL tampon eklendi. Ardından santrifüjde 13.2 rpm hızda 3 dakika çevrildi ve 200'er µl supernatant 2 ml'lik 2 mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Her birine 30 µl lizozom eklenerek 37 °C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Su banyosundan çıkarılan örneklerle 15'er µl proteinase K ve 20'şer µl RNAase A eklendi. Birkaç saniye vortexlendikten sonra 200'er µl AL tampon eklenip tekrar 15 sn vortexlenip 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 200'er µl EtOH (%96) eklenip 15 saniye vortexlenerek her iki tüpteki örnek de sırayla aynı QIAamp spin kolonuna aktarılıp 30'ar sn tam hızda (13.2 rpm) santrifüje edilerek tek kolonda toplandı. Kolondan süzülen supernatant atıldı ve kolona 500 µl AW1 tamponu eklenip altına takılan yeni tüp ile 1 dakika tam hızda santrifüje edildi. Sonrasında tüp içerisindeki supernatant atılarak yeni tüp takıldı ve 500 µl AW2 tamponu eklenerek 3 dakika tam hızda santrifüje edildi. AW2 kalıntılarının tamamen süzüldüğünden emin olmak için yeni bir tüple 1 dakika daha tam hızda santrifüje edildi. Alttaki tüp atılıp etiketlenmiş 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü takıldı. 50 µl 2 kere seyreltilmiş AE tampon

direkt olarak QIAamp yüzeyine eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. DNA'nın tüpe alınması için 1 dakika santrifüje edildi. AE basamağı tüm DNA'yı alabilmek için 2 kere tekrarlandı. İzole edilen DNA 1.5 ml'lik tüp ile PCR yapılarına kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

5.2.2.3. DNA konsantrasyon ölçümü

İzolasyon yapıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak olan DNA'nın konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) kiti kullanıldı. Bir ml Qubit dsDNA HS reaktifi (reagent) 199 ml tampon içerisine eklenerek 1:200 oranında solüsyon hazırlandı. Standartlar için 0.5 ml'lik Qubit tüpleri kullanıldı ve her birine 190 ml solüsyon ile 10 ml standart eklenip ölçümleri yapılarak DNA konsantrasyon tayini için alt ve üst sınır oluşturuldu. Ardından 197 ml solüsyon içerisine 3 µl DNA eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen karışım Qubit cihazına yerleştirildi ve DNA'nın konsantrasyonu (ng/µl) kaydedildi.

5.2.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Illumina kütüphane oluşturma protokolü kullanılarak toplamda 25 µl solüsyonla çalışıldı. V3-V4 bölgelerinin çoğaltılması için 0.3 ml'lik PCR tüpleri kullanılarak yapılan çalışmada tüplere her örnek için 12.5 µl 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Bisystems, MA, ABD) master karışım ile 0.5'er µl ileri ve geri primer eklendi. DNA konsantrasyonuna göre belirlenen template miktarı (20/konsantrasyon miktarı) da eklendikten sonra kalan miktar nükleazsız su ile tamamlandı. Hazırlanan karışım PCR cihazına yerleştirilerek termal döngü başlatıldı. İşlem sonunda bir sonraki işleme kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

5.2.2.5. Sekanslama işlemi, kümeleme ve taksonomik sınıflandırma

Çift-sonlu sekanslama verisinin analizi, Ulusal Alerji ve Enfeksiyöz Hastalıklar Enstitüsü'nün (NIAID, Bethesda, MD) Nephela platformu (v.1.6, 2016) kullanılarak Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v1.9.1) yazılımı ile yapıldı. Ham okumalar Nephela boru hattına aktarılmadan önce primerler cutadapt programı (Martin 2011) kullanılarak kesildi. Ardından Nephela boru hattı ortalama

kalite skorunun altında kalan ($q < 25$) ve uzunluğu 450 bp'den fazla olan okumaların dışlanması programlandı. Çift-sonlu okumaların birleşmesi sonrasında okumalar kapalı referanslı OTU seçme stratejisi kullanılarak operasyonel taksonomik üniteler (OTU) halinde kümelendi.

Boru hattından OTU tablosunu elde ettikten sonra, Mothur (v.1.39.5) programına (Schloss et al. 2009) entegre UCHIME (v.4.2) programı (<http://drive5.com/uchime>) kimerik okumaların kaldırılması için ayrı ayrı çalıştırıldı. Buna ek olarak, RDP sınıflandırıcısı (Wang ve ark. 2007) (v. 2.2) yerel olarak her OTU için taksonomiye %70'lik bir kesintiden daha fazla bir güvenle atamak için kullanıldı. Cins seviyesinde sınıflandırılmayan okumalar, sırayla alem düzeyine kadar daha yüksek sınıflandırma hiyerarşisine tayin edildi.

Tür zenginlikleri ve çeşitliliği QIIME tarafından aşağıdaki alfa çeşitlilik metrikleri ile tahmin edilmiştir: OTU zenginlikleri, Chao1, Shannon, Simpson E, Ters Simpson ve Faith'in filogenetik çeşitliliği (Phylogenetic Diversity - PD).

Alfa çeşitlilik verisinin normalliğini Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirdik ve eşlenmemiş iki-kuyruklu t-testi kullanarak Alzheimer'lı ve sağlıklı katılımcıların mikrobiyotalarının metriklerini karşılaştırdık.

5.2.2.6. Topluluk yapılarının ve çeşitliliğin çok değişkenli analizi

Sütun toplamları ile standardize edildikten ve veri transformasyonundan (karekök) sonra, Bray-Curtis benzerlik indeksi (Bray ve Curtis 1957) ve benzerliğin Jaccard indeksi (Jaccard, 1908) mesafe matrisi elde etmek için kullanıldı. Örnekler arasındaki mikrobiyal komünite yapılarındaki benzerlikler ilk önce ana koordinat analizi (principle coordinate analysis - PCO) (sınırlandırılmamış) kullanılarak gösterildi. Alzheimer ile ilgili topluluk yapısındaki farklılıklar gösterildi. Çok değişkenli dağılımların permütasyonel analizi (PERMDISP) (Anderson 2006), öncül gruplarda topluluk yapısının heterojenliğini test etmek için kullanıldı. PERMANOVA ve PERMDISP, 9999 permütasyon ile vegan paketi kullanılarak R ortamında gerçekleştirildi.

Alzheimer'lı ve sağlıklı kişiler arasındaki çok değişkenli paternlerden ve farklı derecede zenginleştirilmiş taksonlardan sorumlu bakteriel taksonu tanımlamak için DESeq2, negative Binomial Wald Testi (Love ve diğerleri 2014, McMurdie and Holmes 2014) kullanıldı. DESeq2 analiz sonuçları, MicrobiomeAnalyst (Dhariwal ve ark. 2017) kullanılarak ekirdek OTU ısı haritası, filum korelasyon ısı haritası ve okunan sayım rakamları ile birlikte elde edildi. Kutu grafiği, sütunlu grafik, ve ısı haritası, vegan, ggplot2, heatmap2, Heatplus, yeniden şekillendirme, renklendirme ve RcolorBrewer (R Core Team 2016, <http://www.r-project.org>) dahil olmak üzere R paketleri kullanılarak üretildi.



6. BULGULAR

6.1. Katılımcıların Demografik ve Klinik Verisi

Katılımcıların yaş ve eğitim durumları ile GDÖ, MMSE ve NPI toplam puanlarının ortalama ve standart sapmaları Tablo 6.1.1.'de gösterildi. Demografikler açısından iki grup arasında fark bulunmazken mental durum ölçeği olan MMSE skorları arasında anlamlı bir fark bulundu (Bağımsız Gruplar t testi, $p < .05$). Davranışsal semptomları gösterir NPI testi toplam puan karşılaştırmasında da AH'li grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık görüldü (Bağımsız Gruplar t testi, $p < .05$). NPI alt alanları özelinde yapılan analizde apati ($p = .104$), depresyon ($p = .416$) ve hezeyan ($p = .085$) dışındaki tüm alt alanlarda anlamlı bir farklılık bulundu (Bağımsız Gruplar t testi, $p < .05$) (Tablo 6.1.2.).

Tablo 6.1.1. Katılımcıların Demografik ve Davranış Verisi

	Alzheimer (Erkek = 6) (N=13)		Kontrol (Erkek = 4) (N=9)		p-değeri
	Ort.	SS	Ort.	SS	
Yaş	73,53	7,88	64,00	7,19	0,59
Eğitim	4,40	3,80	8,44	5,15	0,10
GDÖ	8,87	6,84	4,00	6,25	0,306
NPI Toplam	11,27	12,11	1,67	4,30	0,001*
MMSE	16,47	6,79	27,11	1,62	0,03*

Not. * $p < .05$

6.2. Biyoinformatik Analiz

16S rRNA geninin V3-V4 bölgelerinden ortalama 407 bp uzunluğunda yaklaşık 2,1 M okuma elde edildi. DNA dizinleri Operasyonel Taksonomik Birimi (OTU) kümeleme analizi ve mitokondri, kloroplast ile eşleşenlerin çıkarılması sonucunda 1359 tane OTU elde edildi ve örnek başına dizi sayısı (dizileme derinliği) ek şekilde gösterildi (EK-1 - Şekil 6.2.1., Şekil 6.2.2. ve EK-2 - Tablo 6.2.).

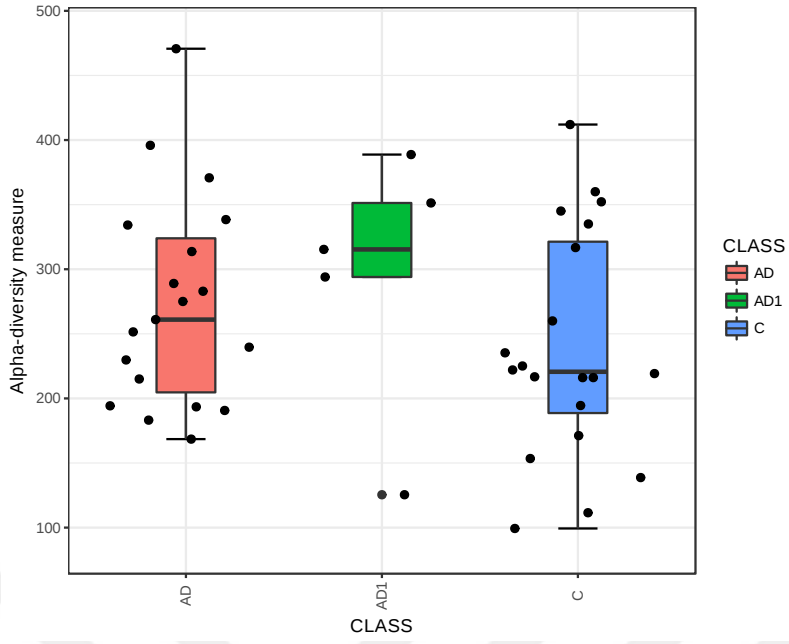
Tablo 6.1.2. Katılımcıların NPI Alt Alan Skorlarının Karşılaştırılması

	Alzheimer (N=13)		Kontrol (N=9)		<i>p</i> -değeri
	Ort.	Ss	Ort.	Ss	
NPI Toplam	11,27	12,11	1,67	4,30	0,001*
Hezeyan	1,07	3,08	0	0	0,085
Halusinasyon	0,47	1,06	0	0	0,006*
Ajitasyon	0,73	1,28	0	0	0,001*
Depresyon	1,40	2,56	0,89	2,03	0,416
Anksiyete	1,27	2,40	0	0	0,001*
Elastasyon	0,20	0,56	0	0	0,026*
Apati	1,20	2,37	0,44	1,33	0,104
Disinhibisyon	0,93	1,67	0,11	0,33	0,034*
İrritabilite	1,40	1,84	0	0	0*
Anormal Motor D.	0,93	2,49	0	0	0,016*
Uyku	0,40	1,12	0	0	0,026*
İştah ve Yeme Boz.	1,53	2,23	0,22	0,67	0,002*

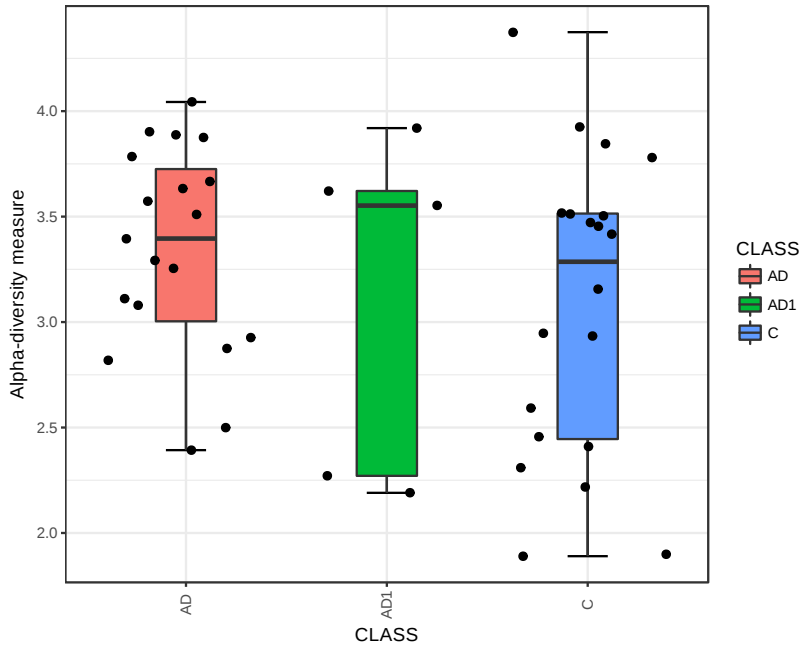
Not. MMSE: Standardize Mini Mental Durum Ölçeği; NPI Toplam: Nöropsikiyatrik Envanter'den alınan toplam davranış puanı; GDÖ: Geriyatrik Depresyon Ölçeği. * $p < .05$

6.2.1. Alfa çeşitlilik

Alzheimer (AD), bir yıl sonra ikinci defa örnek alınan Alzheimer (AD1) grubu ve Kontrol grubu (C) örneklerindeki bakteri türlerinin alfa çeşitlilik analizleri Chao1 ve Shannon çeşitlilik indisleri kullanılarak hesaplandı ve box-plot grafiği ile Şekil 6.2.1. ve 6.2.2.'de gösterildi. Hem Chao1 hem de Shannon indisleriyle yapılan karşılaştırmalarda gruplar arasında anlamlı farklar bulunmadı (Kruskal Wallis testi, $p < 0,05$).



Şekil 6.2.1. Gruplardan elde edilen örneklerde Chao1 indisi ile hesaplanan alfa çeşitliliği.

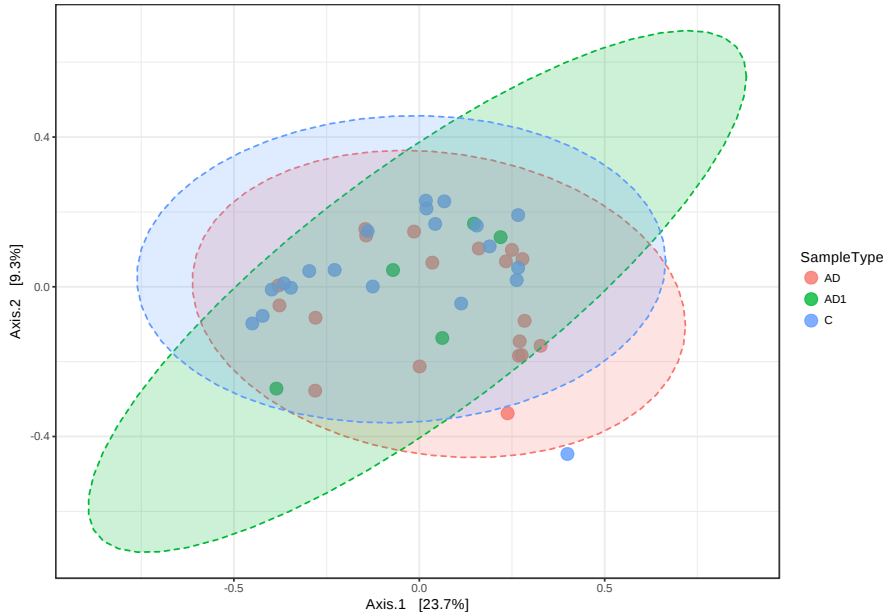


Şekil 6.2.2. Gruplardan elde edilen örneklerde Shannon indisi ile hesaplanan alfa çeşitliliği

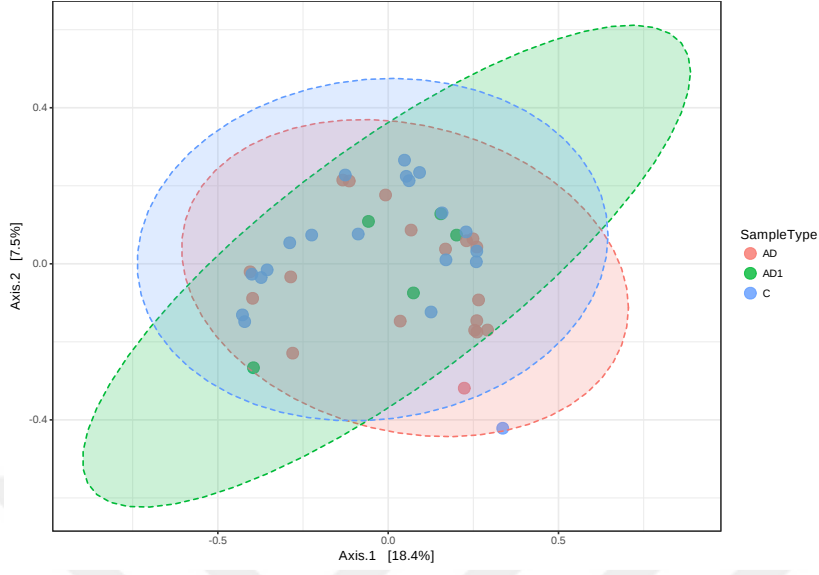
6.2.2. Beta çeşitlilik

Gruplardan toplanan örneklerdeki bakteri topluluklarının benzerlikleri Bray-Curtis, Jaccard indeksleri kullanılarak hesaplandı. Örnekler arası ayrışmalar Temel koordinatlar analizi (PCoA) ordinasyonu ile iki boyutlu grafiklerde gösterildi (sırasıyla Şekil 6.2.2.1. ve 6.2.2.2.). Gruplardan alınan örneklerin kendi içinde ve başka gruplara kıyasla farklılıklarındaki PERMANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. Buna göre hem Bray-Curtis hem de Jaccard indisleri ile grupları oluşturan örneklerin grup içi mesafe farklılıkları gruplar arası mesafelerden PERMANOVA testine göre anlamlı şekilde farklı olmadıkları bulundu ($R^2=0,0348$; $p=0,094$).

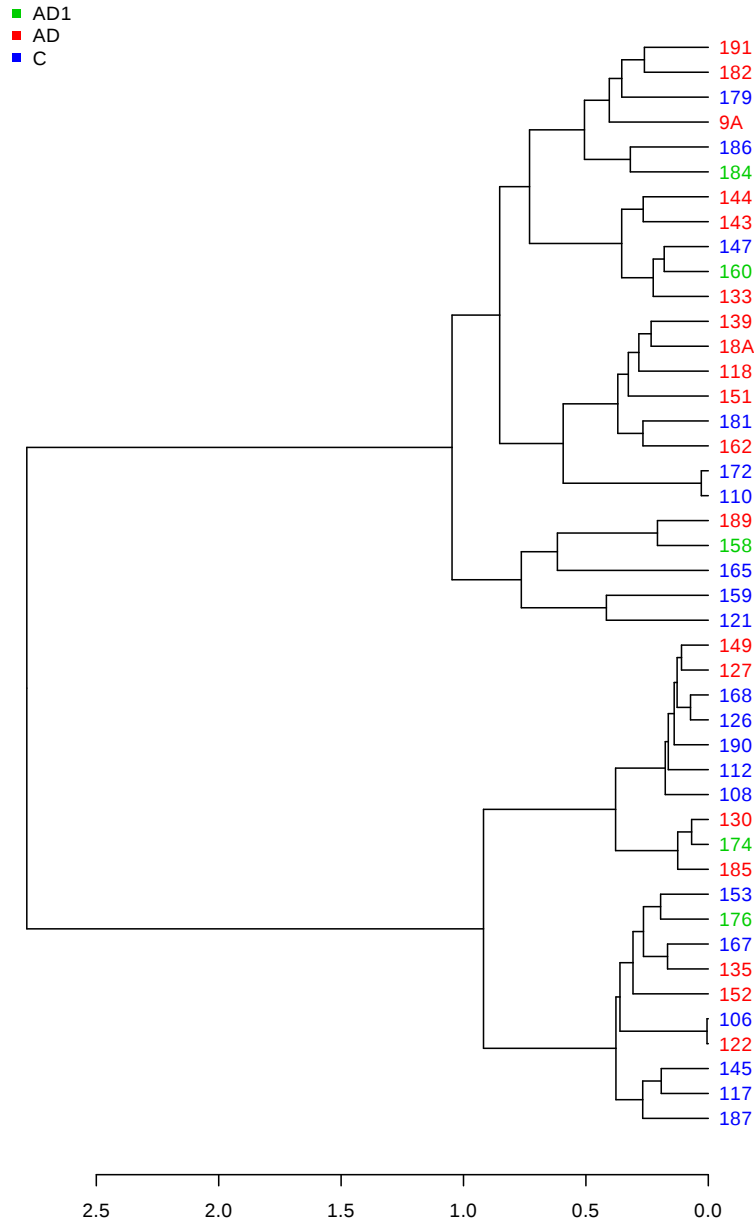
Yukarıdaki indislere ek olarak Jensen-Shannon ayrışma indeksi yardımıyla da bir yıl sonra alt grup Alzheimer hastalarından toplanan örneklerdeki bakteri topluluklarının diğer örneklere topluluğu oluşturan bakteri türleri bakımından yapısal benzerliği incelendi (Şekil 6.2.3).



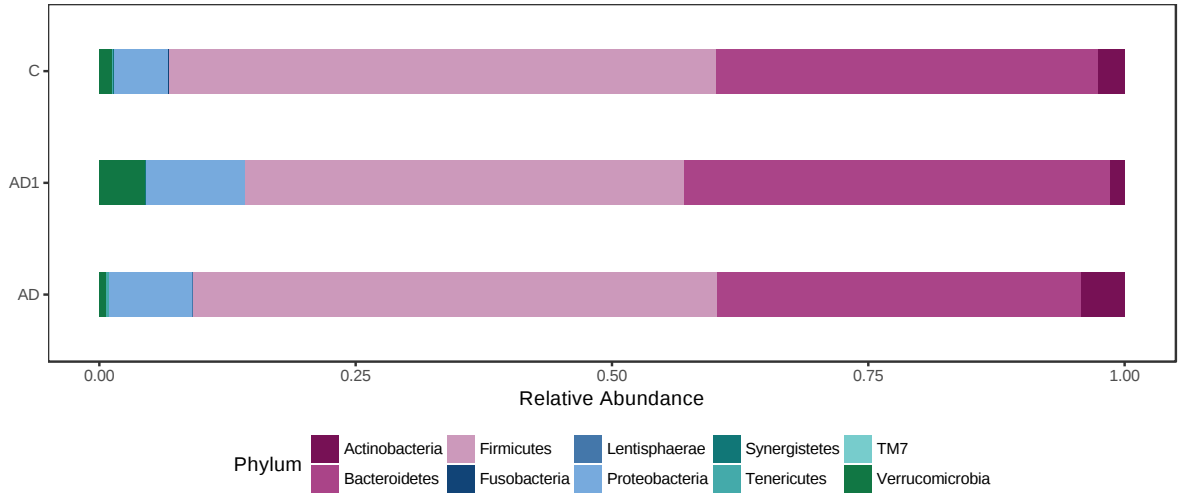
Şekil 6.2.2.1. Grupların elde edilen örneklerdeki mikrobiyotanın Bray-Curtis indisine göre benzerliklerinin temel koordinat analizi (PCoA)'ni gösteren bi-plot. Elipsler grup merkez noktalarının etrafındaki %95 güven aralıklarını gösteriyor.



Şekil 6.2.2.2. Grupların elde edilen örneklerdeki mikrobiyotanın Jaccard indisine göre benzerliklerinin temel koordinat analizi (PCoA)'ni gösteren bi-plot. Elipsler grup merkez noktalarının etrafındaki %95 güven aralıklarını gösteriyor.

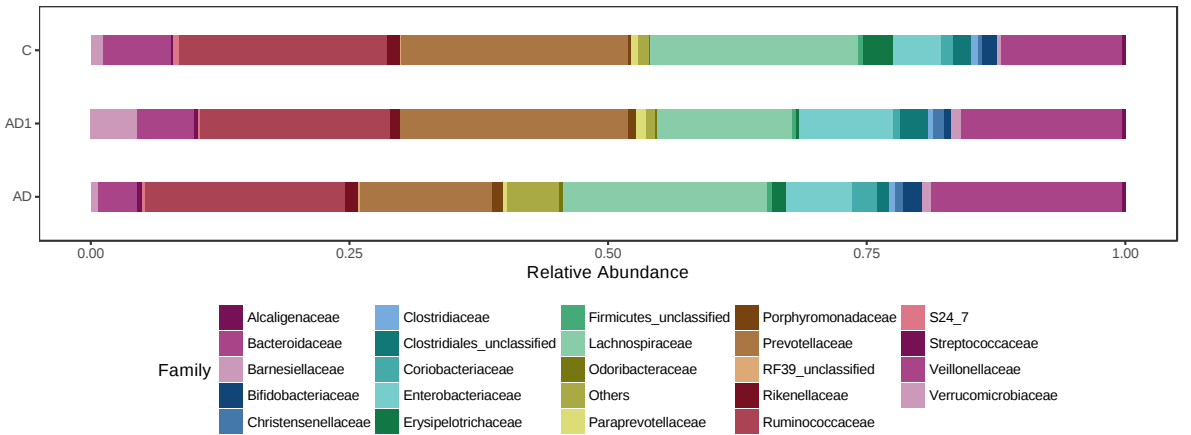


Şekil 6.2.3 Örneklerdeki mikrobiyotanın Jensen-Shannon Divergence indisine göre benzerliklerinin temel koordinat analizi sonuçları dendogramla gösterilmesi.



Şekil 6.2.4. Bakterilerin filum seviyesinde örneklerdeki relatif oranları. Farklı filumlar farklı renklerle bar-plotta gösterilmiştir.

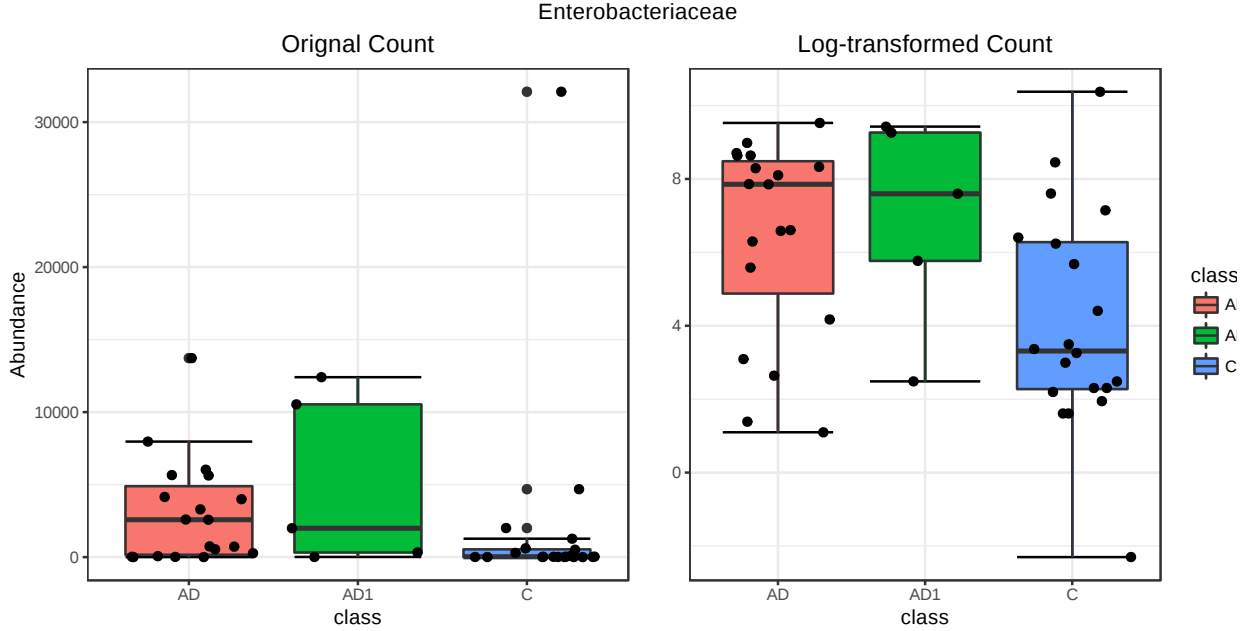
Örneklerdeki bakteri topluluklarının taksonomik olarak relatif (yüzde) oranları Şekil 6.2.4'de filum seviyesinde; Şekil 6.2.5'de ise aile seviyesinde relatif oranlar gösterilmiştir. Buna göre filum seviyesinde örneklerde en çok (ortalama %87) *Fimicutes* ve *Bacteroidetes* filumları olduğu bulunmuştur. *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve *Verrucomicrobia* filumları kalan yaklaşık %20 relatif oranı oluşturduğu bulunmuştur. Çok düşük oranlarda (toplamda %1 ya da daha az) varlığı tespit edilen diğer filumlar şöyledir: *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Synergistetes*, *Tenericutes*.



Şekil 6.2.5. Bakterilerin aile seviyesinde örneklerdeki relatif oranları. Farklı aileler farklı renklerle bar-plot olarak gösterilmiştir.

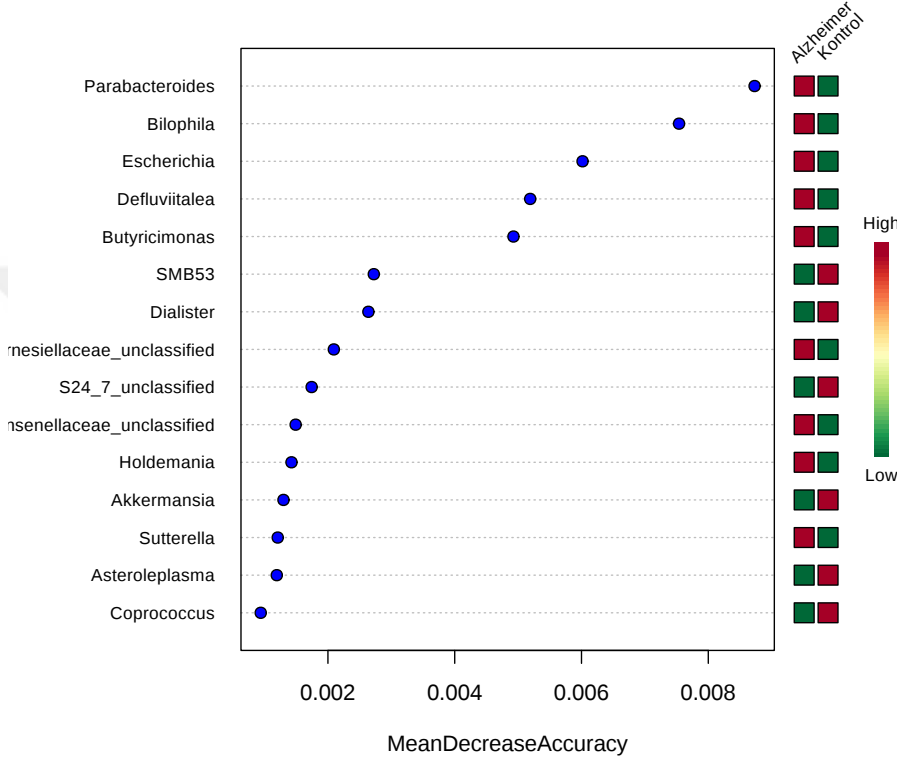
Şekil 6.2.5.'de gösterilen aile seviyesindeki relatif oranlara bakıldığında örneklerde en çok *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Ruminococaceae*, *Lachnospiraceae* ve *Verrucomicrobiaceae* ailelerinin ortalama $75 \pm 11,7$ relatif oranında oldukları görülmüştür. Toplamda 72 aile seviyesinde bakteri grupları olduğu bulunmuştur.

Aile relatif oranlarının Alzheimer ve kontrol grupları arasında relatif oranları karşılaştırıldığında anlamlı fark olup olmadıkları DESeq2 metodu kullanılarak (Love vd., 2014) ile analiz edildi. Ortalamalar arasındaki çoklu karşılaştırmalardan kaynaklanan yanlış bulgu oranları (FDR) Benjamini-Hochberg ile düzeltildikten sonra 72 aileden sadece *Enterobacteriaceae* ailesinin Alzheimer ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklı olduğu ($q < 0,05$) bulundu (Şekil 6.2.6.).



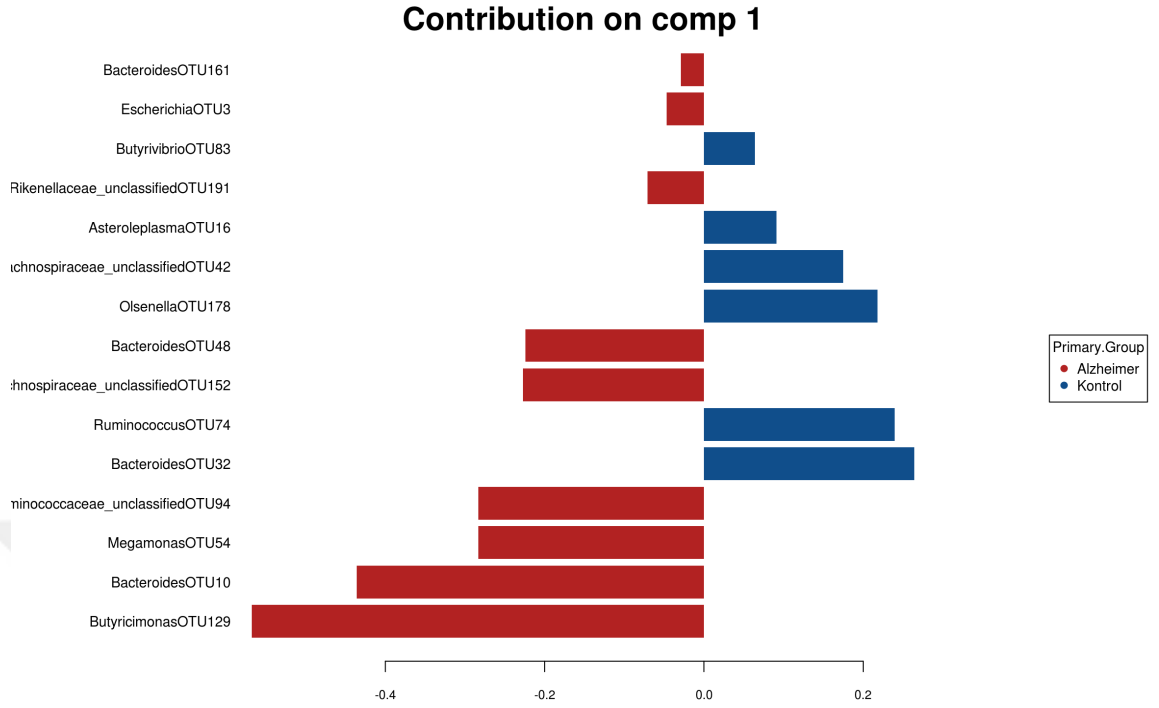
Şekil 6.2.6. Negatif binomiyal Wald testi (DESeq2 analizi) ile aile seviyesinde gruplar arası *Enterobacteriaceae* ailesinin relatif oranı farkı istatistiksel olarak farklı anlamlı bulunmuştur ($q < 0,05$).

Bir sonraki adımda Genus seviyesinde OTU'ların biyobelirteç olma potansiyeli araştırıldı. Bu amaçla Random forest klasifikasyon analiz metodu kullanıldı (Şekil 6.2.7.).



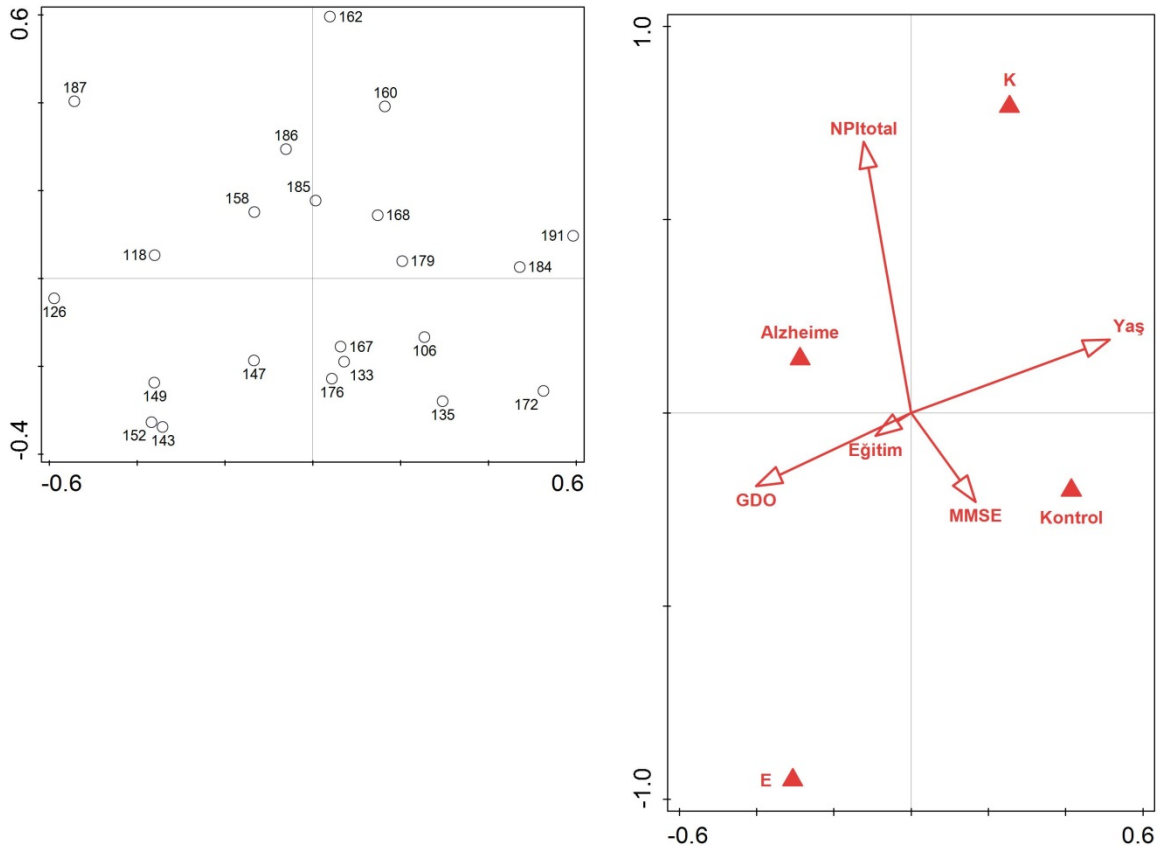
Şekil 6.2.7. Random-forest değişken önemlilik dereceleri grafiği.

Ortalama azalma doğruluğu gösterilen değişkeni çıkartığımızda modelin performansını yansıtmaktadır. Bu nedenle yüksek değerler gösterilen bakteri cinsinin biyobelirteç potansiyelini göstermektedir. Şekil 6.2.7.'de gösterildiği gibi Alzheimer hastalarını sağlıklı kontrollerden ayıran ve en yüksek klasifikasyon etkisine sahip bakteri cinsleri şunlar; *Parabacteriodes*, *Bilophila*, *Escherchia*, *Defluviitalea*, *Butyricimonas*.



Şekil 6.2.8’de yine cins seviyesinde OTU’ların hasta ve sağlıklı grupları arasında nasıl farklılaştığı analiz edildi.

Şekil 6.2.8’de cins seviyesinde yapılan OTU analizi sonucunda iki grup arasında anlamlı farklılık gösteren bakteri cinsleri görülmektedir. Bu 15 bakterinin şunlardır; *Bacteroides*, *Escherichia*, *Butyrivibrio*, *Rikenellaceae*, *Asteroleplasma*, *Lachnospiraceae*, *Olsenella*, *Bacteroides*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae*, *Megamonas*, *Bacteroides* ve *Butyricimonas*.



Şekil 6.2.9.ab Mesafe temelli tekrarlamalı uyum ordinasyon analizi (db-RDA). Gruplar arası benzerlik mesafeleri Bray-Curtis indisi temel alınarak hesaplandı ve örnekler arası mesafe temel komponent analizi ile gösterildi(a). Bakteri türleri kompozisyonundaki varyasyon ile klinik değişkenler arası ilişki vektörel olarak gösterildi. Vektörlerin uzunluğu ile varyasyonu açıklayan değişken doğru orantılı.

Tablo 6.2.2.1. PCO Analizi

	Eksen-1	Eksen-2	Eksen-3	Eksen-4	Eksen-5
Eigenvalues:	0.5761	0.4586	0.2533	0.2229	0.2051
Kümülatif açıklanan varyasyon oranı:	17.24	30.97	38.55	45.22	51.36

Tablo 6.2.2.2. RDA Analizi

Summary Table:				
Statistic	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4
Eigenvalues	0.1044	0.065	0.0575	0.0437
Explained variation (cumulative)	10.44	16.96	22.71	27.08
Pseudo-canonical correlation	0.8589	0.8456	0.8667	0.9385
Explained fitted variation (cumulative)	28.79	46.77	62.61	74.66

Analysis 'Distance-based-RDA', step 'Constrained PCO scores'			
Conditional Term Effects:			
İsim	Explains %	pseudo-F	P
Yaş	5.9	1.3	0.175
NPItotal	6.8	1.5	0.062
Cinsiyet.E	5.3	1.2	0.239
Cinsiyet.K	5.3	1.2	unknown
GDO	5.4	1.2	0.21
Eğitim	5.2	1.2	0.23
Grup.Alzheimer	4.3	1.0	0.5
Grup.Kontrol	4.3	1.0	unknown
MMSE	3.3	0.7	0.836

Şekil 6.2.9.a'da gösterilen PCA grafiği Öklit mesafesine göre Alzheimer ve Kontrol gruplarından toplanan örneklerdeki bakteri mikrobiyotasının benzerliklerini göstermektedir. Örnekler arası mesafe arttıkça mikrobiyota benzerliği azalmaktadır. PCA eksenlerinde açıklanan kümülatif varyasyon Tablo 6.2.2.1 'de gösterilmiştir. Buna göre ilk üç eksen toplam varyasyonun %38,6'nı açıklayabilmektedir.

Şekil 6.2.9.b’de gösterilen mesafe temelli RDA klinik faktörlerin mikrobiyota değişimleri ile korelasyonunu göstermektedir. Klinik faktörleri temsil eden vektörler arası açılar faktörler arası korelasyona işaret eder. Şekil 6.2.9.b’de görüldüğü gibi mikrobiyota kompozisyonu ile en fazla korelasyonu NPI faktörü (Toplam NPI skoru) daha sonra sırasıyla GDÖ, Yaş ve MMSE skoru takip etmektedir. NPI skoru ile MMSE; GDÖ ile Yaş değerleri yaklaşık olarak ters orantılıdır. Diğer yandan cinsiyet faktörü (K)adın ve (E)rkek; Alzheimer ve Kontrol grupları da ters orantılı olduğu görülmektedir. RDA analizinde ilk üç eksen (boyut) toplam varyasyonun %62.6’sını açıklayabilmektedir (Tablo 6.2.2.2 –RDA tablosu). Klinik faktörlerin tek başına toplam varyasyonu açıklama oranları Tablo 6.2.2.1.’de gösterilmiştir.



Multivariable linear regression model:
shannon ~ Egitim + Yas + MMSE + GDO +
NPItotal + hezeyan + halusinasyon + ajitasyon + depresyon + anksiyete + elasyon + apati + disinhibisyon + irritabilite + motor + uyku + istah

	Coefficient	P Signif
Egitim	-0.10001398	0.261
Yas	-0.06279162	0.248
MMSE	-0.06318716	0.235
GDO	-0.05160472	0.566
NPItotal	-0.09717864	0.714
hezeyan	-4.39144689	0.488
halusinasyon	-1.29739855	0.246
ajitasyon	5.63971965	0.486
depresyon	0.06389307	0.875
anksiyete	0.22965123	0.424
elasyon	-5.74024277	0.459
apati	-0.03465738	0.956
disinhibisyon	2.33746869	0.395
irritabilite	0.31805902	0.455
motor	0.17174179	0.803

Multivariable linear regression model:
chao1 ~ Egitim + Yas + MMSE + GDO + NP
Itotal + hezeyan + halusinasyon + ajitasyon + depresyon + anksiyete + elasyon + apati + disinhibisyon + irritabilite + motor + uyku + istah

	Coefficient	P Signif	
Egitim	0.10066464	0.8950	
Yas	0.68575543	0.1740	
MMSE	1.20653642	0.0320	*
GDO	0.06963214	0.9310	
NPItotal	4.19280098	0.1170	
hezeyan	-18.93654577	0.7370	
halusinasyon	1.52068000	0.8730	
ajitasyon	-25.14003052	0.7280	
depresyon	-9.96295234	0.0305	*
anksiyete	-3.45341485	0.2050	
elasyon	43.64973032	0.5310	
apati	0.33103836	0.9540	
disinhibisyon	-32.44483037	0.2100	
irritabilite	3.04070191	0.4320	
motor	-15.17256159	0.0443	*

Şekil 6.2.10.ab Multivariate Linear Regresyon Modeli. Mikrobiyotadaki değişimin klinik verilerle korelasyonu alfa çeşitlilik indisleri Shannon ve Chao temel alınarak hesaplandı. Shannon indisinde (a) bakteri türlerinin yoğunluğunun, Chao indisinde (b) ise bakteri sayısındaki değişimin klinik veri ile korelasyonuna bakılmıştır.

Şekil 6.2.10'da Multivariate Linear Regresyon kullanılarak klinik verilerdeki değişimle alfa çeşitlilik indisleri arasındaki korelasyona bakılmıştır. Şekil 6.2.10a'da Shannon indisi temel alınarak yapılan hesaplamada bakteri türlerinin yoğunluğunun klinik verideki değişimle korelasyonu bulunamazken Şekil 6.2.10b'de Chao indisinde MMSE, Depresyon ve Anormal Motor Davranış skorlarındaki değişim bakteri sayısındaki değişimle korele olduğu görülmüştür.

**Adonis OTU Jaccard
Model P-value: 0.0013**

	R2	P
Egitim	0.054	0.071
Yas	0.069	0.004
MMSE	0.057	0.044
GDO	0.083	0.0013 *
NPItotal	0.071	0.0033
hezeyan	0.03	0.78
halusinasyon	0.035	0.59
ajitasyon	0.067	0.0087
depresyon	0.061	0.024
anksiyete	0.049	0.14
elasyon	0.033	0.69
apati	0.034	0.66
disinhibisyon	0.043	0.29
irritabilite	0.05	0.061
motor	0.036	0.59

**Adonis OTU Bray-Curtis
Model P-value: 0.002**

	R2	P
Egitim	0.054	0.066
Yas	0.069	0.0033
MMSE	0.057	0.047
GDO	0.083	0.00067 *
NPItotal	0.071	0.0027
hezeyan	0.03	0.81
halusinasyon	0.035	0.59
ajitasyon	0.067	0.0067 *
depresyon	0.061	0.025
anksiyete	0.049	0.14
elasyon	0.033	0.67
apati	0.034	0.65
disinhibisyon	0.043	0.3
irritabilite	0.05	0.077
motor	0.036	0.59

Şekil 6.2.11.ab Multivariate Linear Regresyon Modeli. Mikrobiyotadaki değişimin klinik verilerle korelasyonu beta çeşitlilik indisleri Jaccard ve Bray-Curtis temel alınarak hesaplandı. Jaccard indisinde (a) var olan bakteri türlerinin, Bray-Curtis indisinde (b) ise var olan bakterilerin miktarının iki grup arasında ki değişim oranının klinik veri ile korelasyonuna bakılmıştır.

Şekil 6.2.11'da Multivariate Linear Regresyon kullanılarak klinik verilerdeki değişimle beta çeşitlilik indisleri arasındaki korelasyona bakılmıştır. Jaccard indisinde Geriatrik Depresyon Ölçeği (GDÖ) skorlarında bir korelasyon görülürken, Bray-Curtis indisinde hem GDÖ hem de ajitasyon skorlarında mikrobiyotadaki değişim ile bir korelasyon bulunmuştur.

Şekil 6.2.8’de görülen cins seviyesinde yapılan ve 15 bakteri türünde anlamlı farklılık bulunan analiz sonrasında bu türlerdeki değişimin NPI testi ve alt alanlarıyla korelasyonuna (Pearson’s Correlation) bakılmıştır (EK-3). Depresyon, irritabilite ve toplam NPI puanı dışındaki alanlar ile bakteri cinsleri arasında korelasyon bulunamamıştır. Depresyon ile *Ruminococcus* ($q = .019$), irritabilite ile *Lachnospiraceae* ($q = .00084$), *Dorea* ($q = .0012$), *Streptococcus* ($q = .002$), *Lactobacillus* ($q = .012$), *Streptococcus* ($q = .016$), *Prevotella* ($q = .027$) ve *Clostridiales* ($q = .029$), toplam NPI puanı ile ise *Bacteroides* ($q = .013$) ve iki farklı *Streptococcus* (sırasıyla; $q = .027$ ve $q = .042$) arasında korelasyon olduğu görülmüştür.



7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bağırsak mikrobiyotasının nörolojik hastalıklarla ilişkisini gösterir yayınların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Alzheimer hastalığı da üzerinde çalışılan hastalıklardan birisidir. Nöroinflamasyon ve kanda serbest halde dolaşan metabolitlerin bu ilişkide önemli payı olduğu düşünülmektedir. Bunlarla beraber davranış bozukluklarının da mikrobiyotayla bağlantılı olduğunu gösteren birçok yayın mevcuttur. Davranış bozukluklarının AH'nin en önemli semptomlarından biri olması hastalıkta görülen bu semptomların mikrobiyotayla bağlantısını da gündeme getirmektedir.

Bu çalışmada AH'de görülen davranışsal semptomlar ile mikrobiyotadaki değişim arasında bir korelasyon olup olmadığına bakılmıştır. Demografik açıdan eşleştirilmiş hasta ve kontrol grubunun mental durumlarındaki anlamlı farklılık (MMSE) hastalığın kognitif işlevlere etkisini göstermektedir. Hasta grubunda literatür ile uyumlu olarak kognitif işlevlerde belirgin bir azalma vardır. Aynı zamanda birçok davranış skorunda da anlamlı farklılıklar görülmüştür. İki grup arasında hem NPI alt alanlarından olan depresyon skorları hem de tüm katılımcılara ayrıyeten uygulanan Geriyatrik Depresyon Ölçeğinin skorları karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durum NPI testi ile elde edilen davranış skorlarının tutarlı olduğuna dair kanıt sunmaktadır. NPI skorlarında depresyon, hezeyan ve apati dışındaki tüm alt alanlarda (9 alt alan) anlamlı bir farklılık görülmüştür ($p < .05$).

Biyoinformatik analizlerde AH'deki mikrobiyota kompozisyonunun sağlıklı kontrollere göre değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Şekil 6.2.9.b'de gösterildiği gibi hasta ve kontrol grupları mikrobiyota kompozisyonu açısından birbirinden oldukça farklıdır. MMSE ile NPI skorları beklendiği üzere birbiriyle ters bir ilişki içerisinde gözükmemektedir (Şekil 6.2.9.b). Davranış skorlarının mikrobiyotadaki değişim ile ilişkisine bakıldığında ise toplam NPI skorunun mikrobiyota kompozisyonundaki değişim ile büyük oranda korelasyon gösterdiği görülmektedir.

Analizlerin sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık

oluşturan bakteri ailesinin gram-negatif bakterilerden *Enterobacteriaceae* olduğu görülmüştür. Daha önce Parkinson hastalarıyla yapılan bir çalışmada da aynı şekilde *Enterobacteriaceae* hasta grubunda anlamlı oranda yüksek bulunmuştur [41]. Amiloid beta plaklarının oluşumunun beyin dokusundaki mikrobiyal enfeksiyona karşı bağışıklık sisteminin bir cevabı olduğunu düşündüren bir çalışma vardır [64]. Yakın zamanda Alzheimer'lı hastaların beyin dokuları ile yapılan bir çalışmada ise en büyük gram-negatif bakteri filumu olan *Proteobacteria*'nın kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür [56]. Aynı zamanda yine AH'li kişilerin beyin dokusundan alınan örneklerde *Enterobacteriaceae* ailesinden *E.coli* moleküllerinin bulunması da hastalıkta bu bakteri türünün arttığı görüşünü desteklemektedir [65]. Serotonin üretimini etkilediği bilinen *Escherichia*'nın [66] dolaylı olarak davranışları da etkileyebileceği düşünülebilir. Aynı zamanda dopaminin *E.coli* üzerinde antimikrobiyal etkisi olması [67], dopaminin AH'de düşük olduğu iddialarını da doğrulayıcı niteliktedir [68]. Dopamindeki düşüş *E.coli* artışına sebep olmuş olabilir. Bu sonuçlar hem hastalığı hem de davranışsal semptomları bir yönden açıklayıcı niteliktedir.

Cins seviyesinde yapılan analizlerde ise iki grup arasında 15 farklı bakteri türünde anlamlı farklılık bulunmuştur. Bunlardan *Bacteroides* ve *Rikenellaceae*'nin literatürle uyumlu olarak hasta grubunda anlamlı oranda fazla olduğu görülmüştür [69]. *Rikenellaceae*'nin akut stres durumunda artış, *Bacteroides*'in ise kronik strese düşüş göstermesi davranış ile ilişkili olduklarını göstermektedir [3]. Bizim çalışmamızda hasta grubunda *Rikenellaceae*'da anlamlı bir artış olması davranış problemlerinde etkili olabileceğini düşündürmekle birlikte bu bakterinin spesifik olarak herhangi bir davranış problemiyle korelasyonu bulunamamıştır. *Bacteroides* türünde ise toplam NPI puanı ile anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür. NPI puanındaki artışın AH ile ilişkisi düşünüldüğünde hasta grubunda anlamlı oranda fazla olan *Bacteroides*'in NPI ile korelasyon göstermesi beklenen bir durumdur. Bu türün özellikle yüksek yağlı diyetle beslenen kişilerde artış gösterdiği bilinmektedir [70]. Bu durum hastalığın ve hastalığa bağlı olarak gelişen davranış problemlerinin tedavisinde diyetin önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Clostridium ailesinden olan *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* ailelerindeki bakteriler farklı türlerin KZYA fermentasyonunda katkıları vardır ve mikrobiyotanın dizbiyoz durumunda bu bakterilerin yoğunluğu değişir. Bu çalışmada hem hasta hem de kontrol grubunda anlamlı farklılıklar oluşturduğu görülmektedir (bkz. Şekil 6.2.8). Bu durum mikrobiyotanın karmaşık yapısını göstermektedir. Bu bilgi literatürde bulunan yayınlarla [71] tutarlıdır. Bununla birlikte irritabilite ile arasında yüksek korelasyon bulunan *Lachospiraceae* hasta grubunda yüksek bulunan OTU ile aynıdır. Hastalıkta artan irritabilite davranışıyla korele olarak artan *Lachospiraceae* (OTU152)'nin davranışla ilişkili olduğu düşünülebilir. *Ruminococcaceae*'nin literatürden farklı olarak hasta grubunda fazla olması [69] beklenmedik bir bulgudur. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı sonuçların çıkması katılımcıların yaşam şartları, diyetleri gibi etkenlerle açıklanabilir. Dolayısıyla en iyi değerlendirme yakın bölgelerde yapılan çalışmaların karşılaştırılmasıyla elde edilebilir. Bununla birlikte bu farklılığın olduğu bakteri türlerinin hastalıkla direkt ilişki içerisinde olmadığını, daha çok hastalıkla korelasyon gösterdiğini düşünülebilir. Hastalığın kültürden kültüre değişmeyen amiloyid plaklar, nörofibriller yumaklar gibi biyobelirteçleri vardır ve değişkenlik gösteren faktörlerin biyobelirteç olma olasılığı daha titizlikle incelenmelidir. Örneğin *Ruminococcus* bakterisi bizim çalışmamızda depresyon ile pozitif korelasyon içerisinde gözükmektedir. Başka bir ülkede yapılan bir çalışmada da bunu destekleyici nitelikte bir sonuç çıkması depresyonun gerçekten de bu bakteri türüyle bir ilişkisi olabileceğini göstermektedir [72].

Birçok çalışmada zararlı türleriyle gündeme gelen *Streptococcus* ile hem irritabilite hem de toplam NPI skoru arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Hastalıklarla beraber anılan bu bakteri türünün yine hastalığa bağlı gelişen semptomlarla ilişki içerisinde olması beklenebilecek bir durumdur.

Çalışmanın bazı kısıtlamaları mevcuttur. Öncelikle katılımcı sayısının düşük olması bulunan sonuçları genellemek konusunda tedbirli davranmayı gerektirmektedir. Hastaların ilaç kullanımlarının kontrol edilememesi de sonuçlar üzerinde karıştırıcı faktör olarak etkili olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte insanlarla yapılan bu tür çalışmalarda ilaç kullanımının kontrol edilmesi hiçbir

çalışmada mümkün olmamaktadır. Bu durum benzer tüm çalışmalarda aynı şartların geçerli olmasına, dolayısıyla sonuçların aslında kendi içerisinde tutarlı olmasına sebep olmaktadır. Mikrobiyota çalışmalarında bakteri kompozisyonunu etkileyen en önemli etken diyetdir. Dolayısıyla yapılan çalışmalarda diyetin kontrol edilmesi en doğru sonuçları verecektir. Bizim çalışmamızda katılımcılara diyet programı uygulanamamıştır. Katılımcıların yatan hasta olmaması diyet kontrolünü büyük oranda mümkün olmaktan çıkarmaktadır. Bu durumda yapılabilecek en iyi şey katılımcılardan diyetlerini rapor etmelerini istemek ve analizlerde bunu göz önünde bulundurmak olacaktır.

Bu çalışmada AH ile birlikte gelişen ve bakım verenler için önemli bir yük oluşturan davranış problemlerinin mikrobiyota faktörü ile ilişkili olup olmadığı incelenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu konuda yapılmış bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada elde edilen bilgiler AH'li kişilerde mikrobiyotada meydana gelen değişimin davranış problemleri ile bir ilişkisi olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak mikrobiyotaya yapılacak bir müdahalenin davranış problemlerine olumlu etki etmesi için bulunan bu korelasyonun sebepleri ve mekanizmaları ileriki çalışmalarla daha ayrıntılı olarak incelenmelidir. Böylelikle AH'de davranış problemlerinin önüne geçebilmek için yeni kolay ve invazif olmayan bir tedavi yönteminin kapısı açılacak ve hem hastalar hem de bakım verenler için umut ışığı doğacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM: Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007, 3(3):186-191.
2. Alzheimer's A: 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2013, 9(2):208-245.
3. Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF: Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry* 2014, 19(2):146-148.
4. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG: Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 2010, 170(4):1179-1188.
5. Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, Macqueen G, Sherman PM: Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 2011, 60(3):307-317.
6. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2017, 13(4):325-373.
7. Patterson MB, Whitehouse PJ: Behavioral symptoms in Alzheimer disease: a look ahead. In.: LWW; 1992.
8. Wada H, Nakajoh K, Satoh-Nakagawa T, Suzuki T, Ohru T, Arai H, Sasaki H: Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 2001, 47(5):271-276.
9. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA: Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 2013, 80(19):1778-1783.
10. Gurvit H, Emre M, Tinaz S, Bilgic B, Hanagasi H, Sahin H, Gurol E, Kvaloy JT, Harmanci H: The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2008, 23(1):67-76.
11. Swerdlow RH: Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging* 2007, 2(3):347.
12. Kumar A, Singh A, Ekavali: A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep* 2015, 67(2):195-203.

13. Association As: 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2017, 13(4):325-373.
14. Mudher A, Lovestone S: Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci* 2002, 25(1):22-26.
15. De Meyer G, Shapiro F, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Engelborghs S, De Deyn PP, Coart E, Hansson O, Minthon L, Zetterberg H *et al*: Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. *Arch Neurol* 2010, 67(8):949-956.
16. Apostolova LG, Cummings JL: Neuropsychiatric manifestations in mild cognitive impairment: a systematic review of the literature. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2008, 25(2):115-126.
17. Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J: The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 1996, 46(1):130-135.
18. Modrego PJ: Depression in Alzheimer's disease. Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Alzheimers Dis* 2010, 21(4):1077-1087.
19. Chen CT, Chang CC, Chang WN, Tsai NW, Huang CC, Chang YT, Wang HC, Kung CT, Su YJ, Lin WC *et al*: Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: associations with caregiver burden and treatment outcomes. *QJM* 2017, 110(9):565-570.
20. Mohamed S, Rosenheck R, Lyketsos CG, Schneider LS: Caregiver burden in Alzheimer disease: cross-sectional and longitudinal patient correlates. *Am J Geriatr Psychiatry* 2010, 18(10):917-927.
21. Kaufer DI, Cummings JL, Christine D, Bray T, Castellon S, Masterman D, MacMillan A, Ketchel P, DeKosky ST: Assessing the impact of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: the Neuropsychiatric Inventory Caregiver Distress Scale. *J Am Geriatr Soc* 1998, 46(2):210-215.
22. Gauthier S, Cummings J, Ballard C, Brodaty H, Grossberg G, Robert P, Lyketsos C: Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 2010, 22(3):346-372.
23. Rosenberg PB, Nowrangi MA, Lyketsos CG: Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits? *Mol Aspects Med* 2015, 43-44:25-37.

24. Koppel J, Sunday S, Goldberg TE, Davies P, Christen E, Greenwald BS, Alzheimer's Disease Neuroimaging I: Psychosis in Alzheimer's disease is associated with frontal metabolic impairment and accelerated decline in working memory: findings from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Am J Geriatr Psychiatry* 2014, 22(7):698-707.
25. Zahodne LB, Gongvatana A, Cohen RA, Ott BR, Tremont G, Alzheimer's Disease Neuroimaging I: Are apathy and depression independently associated with longitudinal trajectories of cortical atrophy in mild cognitive impairment? *Am J Geriatr Psychiatry* 2013, 21(11):1098-1106.
26. Lanctot KL, Amatniek J, Ancoli-Israel S, Arnold SE, Ballard C, Cohen-Mansfield J, Ismail Z, Lyketsos C, Miller DS, Musiek E *et al*: Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. *Alzheimers Dement (N Y)* 2017, 3(3):440-449.
27. Holmes C, Arranz M, Collier D, Powell J, Lovestone S: Depression in Alzheimer's disease: the effect of serotonin receptor gene variation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003, 119B(1):40-43.
28. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY: Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 2015, 161(2):264-276.
29. Dhakal R, Bajpai VK, Baek KH: Production of gaba (gamma - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz J Microbiol* 2012, 43(4):1230-1241.
30. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, Siuzdak G: Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(10):3698-3703.
31. Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M *et al*: Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS One* 2011, 6(10):e25792.
32. Eerola E, Mottonen T, Hannonen P, Luukkainen R, Kantola I, Vuori K, Tuominen J, Toivanen P: Intestinal flora in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1994, 33(11):1030-1038.

33. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(34):13780-13785.
34. Winther G, Pyndt Jorgensen BM, Elfving B, Nielsen DS, Kihl P, Lund S, Sorensen DB, Wegener G: Dietary magnesium deficiency alters gut microbiota and leads to depressive-like behaviour. *Acta Neuropsychiatr* 2015, 27(3):168-176.
35. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF: The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 2013, 18(6):666-673.
36. Cryan JF, Dinan TG: Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012, 13(10):701-712.
37. Fitzgerald P, Cassidy Eugene M, Clarke G, Scully P, Barry S, Quigley Eamonn MM, Shanahan F, Cryan J, Dinan Timothy G: Tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon-gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity. *Neurogastroenterol Motil* 2008, 20(12):1291-1297.
38. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF *et al*: Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013, 155(7):1451-1463.
39. de Theije CG, Wopereis H, Ramadan M, van Eijndthoven T, Lambert J, Knol J, Garssen J, Kraneveld AD, Oozeer R: Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 2014, 37:197-206.
40. Chen C-H, Lin C-L, Kao C-H: Irritable Bowel Syndrome Is Associated with an Increased Risk of Dementia: A Nationwide Population-Based Study. *PLOS ONE* 2016, 11(1):e0144589.
41. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M *et al*: Gut microbiota are

- related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015, 30(3):350-358.
42. Heintz-Buschart A, Pandey U, Wicke T, Sixel-Doring F, Janzen A, Sittig-Wiegand E, Trenkwalder C, Oertel WH, Mollenhauer B, Wilmes P: The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov Disord* 2017.
 43. Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL: Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol* 2013, 73(1):104-119.
 44. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR *et al*: Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol* 2008, 65(11):1509-1517.
 45. Bell RD: The imbalance of vascular molecules in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012, 32(3):699-709.
 46. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL *et al*: Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000, 21(3):383-421.
 47. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry VH: Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 2009, 73(10):768-774.
 48. Hill JM, Clement C, Pogue AI, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ: Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Frontiers in Aging Neuroscience* 2014, 6(127).
 49. Wang HX, Wang YP: Gut Microbiota-brain Axis. *Chin Med J (Engl)* 2016, 129(19):2373-2380.
 50. Galley JD, Nelson MC, Yu Z, Dowd SE, Walter J, Kumar PS, Lyte M, Bailey MT: Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. *BMC Microbiol* 2014, 14:189.
 51. Garcia-Rodenas CL, Bergonzelli GE, Nutten S, Schumann A, Cherbut C, Turini M, Ornstein K, Rochat F, Corthesy-Theulaz I: Nutritional approach to

- restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006, 43(1):16-24.
52. Maes M, Kubera M, Leunis JC: The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett* 2008, 29(1):117-124.
53. Cohen LJ, Esterhazy D, Kim SH, Lemetre C, Aguilar RR, Gordon EA, Pickard AJ, Cross JR, Emiliano AB, Han SM *et al*: Commensal bacteria make GPCR ligands that mimic human signalling molecules. *Nature* 2017, 549(7670):48-53.
54. Morrison DJ, Preston T: Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 2016, 7(3):189-200.
55. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Toth M, Korecka A, Bakocevic N, Ng LG, Kundu P *et al*: The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 2014, 6(263):263ra158.
56. Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Cerajewska TL, Davies M, West NX, Allen SJ: 16S rRNA Next Generation Sequencing Analysis Shows Bacteria in Alzheimer's Post-Mortem Brain. *Front Aging Neurosci* 2017, 9:195.
57. Harach T, Marungruang N, Dutilleul N, Cheatham V, Mc Coy K, Neher J, Jucker M, Fåk F, Bolmont T: Reduction of Alzheimer's disease beta-amyloid pathology in the absence of gut microbiota. *arXiv preprint arXiv:150902273* 2015.
58. Shen L, Liu L, Ji HF: Alzheimer's Disease Histological and Behavioral Manifestations in Transgenic Mice Correlate with Specific Gut Microbiome State. *J Alzheimers Dis* 2016.
59. ŞAHİN Cankurtaran E, DanişMan M, Tutar H, Ulusoy Kaymak S: The reliability and validity of the Turkish version of the Neuropsychiatric Inventory-Clinician. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2015, 45:1087-1093.

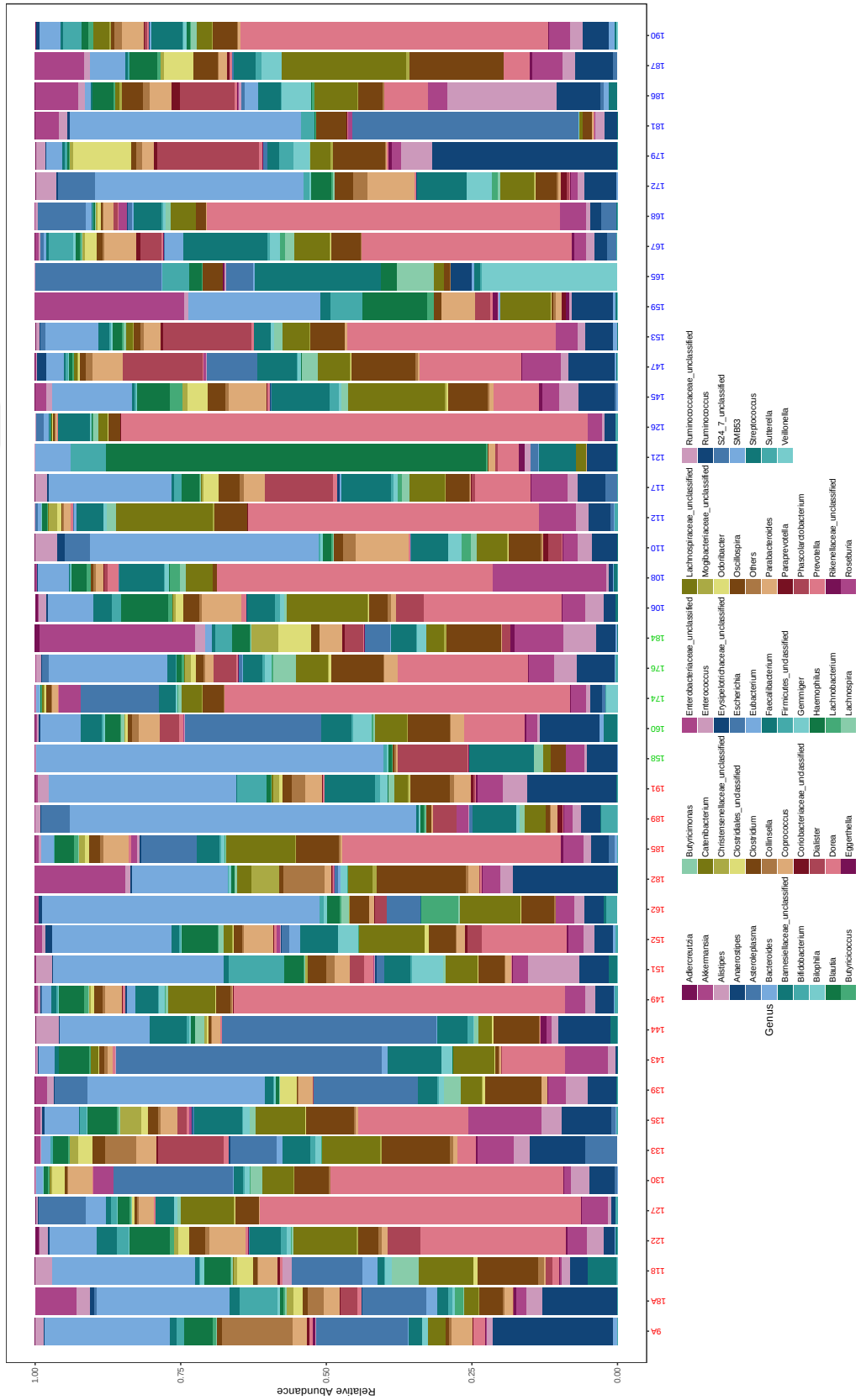
60. Ertan T, Eker E: Reliability, Validity, and Factor Structure of the Geriatric Depression Scale in Turkish Elderly: Are There Different Factor Structures for Different Cultures? *International Psychogeriatrics* 2000, 12(2):163-172.
61. Yesavage: <10.1016@0022-39568290033-4.pdf>.
62. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL: A new clinical scale for the staging of dementia. *The British Journal of Psychiatry* 1982, 140(6):566-572.
63. Landes AM, Sperry SD, Strauss ME, Geldmacher DS: Apathy in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 2001, 49(12):1700-1707.
64. Kumar DK, Choi SH, Washicosky KJ, Eimer WA, Tucker S, Ghofrani J, Lefkowitz A, McColl G, Goldstein LE, Tanzi RE *et al*: Amyloid-beta peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 2016, 8(340):340ra372.
65. Zhan X, Stamova B, Jin LW, DeCarli C, Phinney B, Sharp FR: Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology. *Neurology* 2016, 87(22):2324-2332.
66. Esmaili A, Nazir SF, Borthakur A, Yu D, Turner JR, Saksena S, Singla A, Hecht GA, Alrefai WA, Gill RK: Enteropathogenic Escherichia coli infection inhibits intestinal serotonin transporter function and expression. *Gastroenterology* 2009, 137(6):2074-2083.
67. Iqbal Z, Lai EPC, Avis TJ: Antimicrobial effect of polydopamine coating on Escherichia coli. *Journal of Materials Chemistry* 2012, 22(40):21608.
68. Martorana A, Koch G: "Is dopamine involved in Alzheimer's disease?". *Front Aging Neurosci* 2014, 6:252.
69. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, Harding SJ, Merluzzi AP, Johnson SC, Carlsson CM, Asthana S, Zetterberg H, Blennow K *et al*: Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2017, 7(1):13537.
70. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R *et al*: Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011, 334(6052):105-108.

71. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard Et, Taylor CM, Welsh DA, Berthoud HR: Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry* 2015, 77(7):607-615.
72. Davis DJ, Hecht PM, Jasarevic E, Beversdorf DQ, Will MJ, Fritsche K, Gillespie CH: Sex-specific effects of docosahexaenoic acid (DHA) on the microbiome and behavior of socially-isolated mice. *Brain Behav Immun* 2017, 59:38-48.

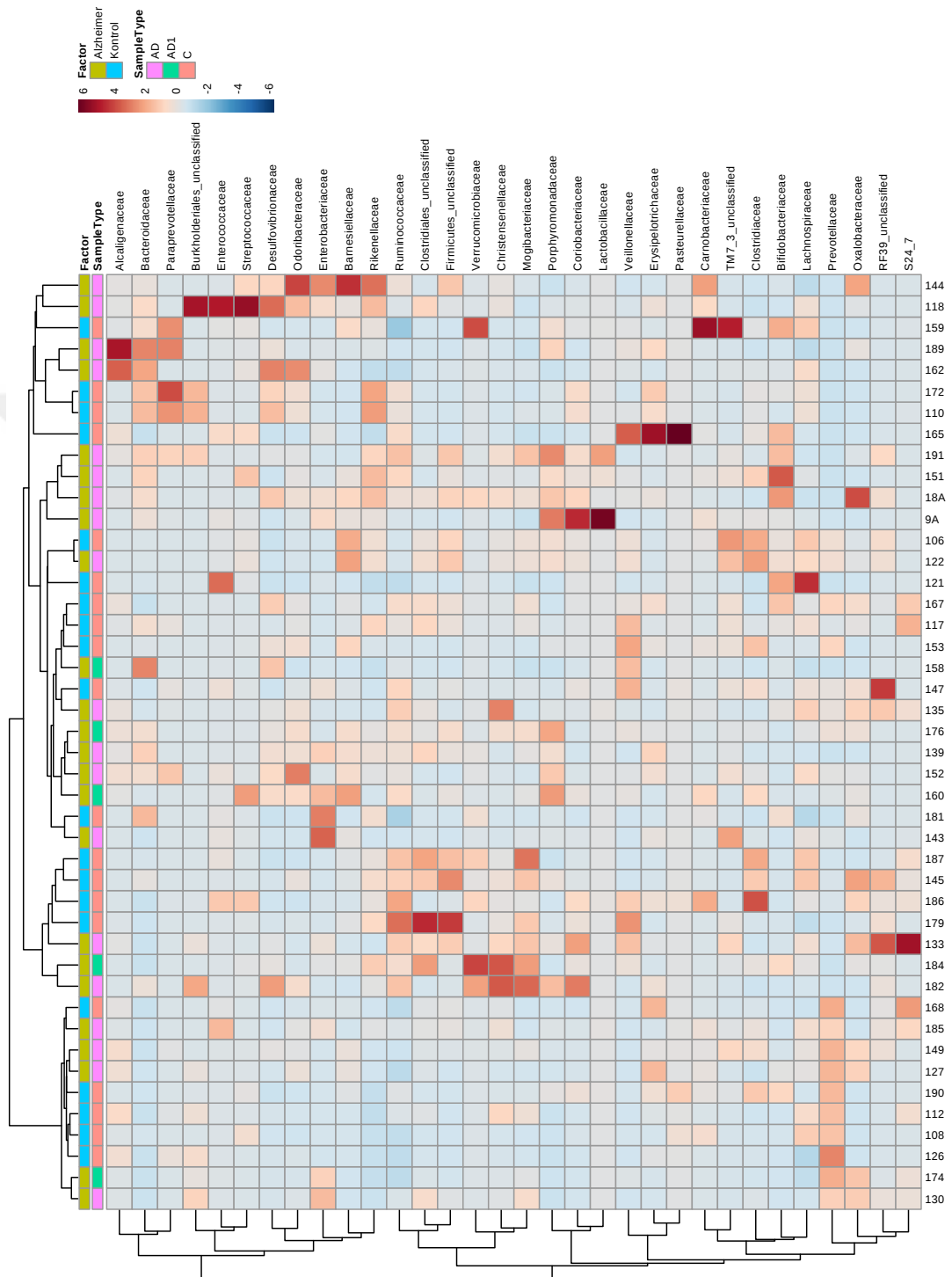


9. EKLER

EK-1



EK-2



10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.12587
Konu : Etik Kurulu Kararı

31/05/2017

Sayın Fatma Betül SEZGİN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Alzheimer Hastalığında Davranışsal Semptomlar ve Mikrobiyota İlişkisi” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 31.05.2017 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 18D82B21X4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

Etik Kurul Onayı (Devam)

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU






BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alzheimer Hastalığında Davranışsal Semptomlar ve Mikrobiyota İlişkisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Fatma Betül SEZGİN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Öğrenci			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Onayı (Devam)

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	21.05.2017		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGILENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	21.05.2017		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
Karar Bilgileri	Karar No: 195	Tarih: 31/05/2017				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma Betül	Soyadı	Sezgin
Doğum Yeri	Bayburt	Doğum Tarihi	17.01.1991
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	
E-mail	fatmabetulsezgin@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi	2014
Lise	Özel Akçınar Lisesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu[Ⓢ]

KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	90							

Ⓢ Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

Ⓢ KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	82	85	75
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
SPSS	iyi
Microsoft Office	iyi
Endnote	iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer