

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA
İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

HİLAL ÜNLÜ-AKALIN

Tezi Yöneten

Doç. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kayseri
Mart 2003

I

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA
İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hilal ÜNLÜ-AKALIN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
Tez Yürütme MERKEZİ

Doç. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu

Tarafından 01-11-03 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kayseri
Mart 2003

Bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

26...05/2003

JÜRİ:

Üye: Prof. Dr. Halil Demirtaş *H. Demirtaş*

Üye: Prof. Dr. Yahya Karaman *Y. Karaman*

Üye: Doç. Dr. Hamiyet Akkurtay *H. Akkurtay*

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

02/05/2003

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Sami AYDOĞAN

Enstitü Müdürü

Mühür ve imza



ÖZET

ALZHEİMER HASTALARININ LENFOSİTLERİNDE rRNA İFADELENMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Alzheimer hastalığı (AH), orta ve geç yaşlarda görülen, genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleri (nücleolar organizasyon bölgeleri=NORs), akrosentrik kromozomların sekonder darlık bölgelerinde bulunan ribozomal genleri ifade ederler. Alzheimer ve Down sendromlu hastaların beyinde β -amiloid birikiminde artış vardır. β -amiloid geni, ribozomal DNA senteziyle ilgili akrosentrik bir kromozom olan 21. kromozomda bulunmaktadır. Ayrıca, ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel durumu ve gümüş boyanabilmesi arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Böylece, AH ile akrosentrik kromozomlardaki ribozomal genler arasında bir ilişkinin bulunması muhtemeldir.

Çalışmamızda, AH hastaları ve kontroller arasında ribozomal genlerin aktivitesinin karşılaştırılması amacıyla, 20 Alzheimer hastası ve 20 sağlıklı kontrol (10 genç ve 10 yaşlı) kişinin lenfosit kültürleri yapılmış ve interfaz alanlarındaki total çekirdek ve NOR alan oranları ile metafaz alanlarındaki akrosentrik kromozomların Ag+ NOR dağılımları ve satellit asosiasyonları (SA) değerlendirilmiştir.

Bu değerlendirmelere göre AH hastalarının interfaz çekirdeklerindeki NOR alan oranlarının, yaşlı kontrol grubuna göre daha az olduğu bulunmuştur ($P=0.035$). Alzheimer hastaları ile kontrol gruplarının akrosentrik kromozomlarının Ag+ NOR'ların segment büyüklükleri karşılaştırıldığında, AH hastalarında 22. kromozomun Ag+ NOR 1 segment derecesinin genç kontrollere göre arttığı bulunmuştur ($P=0.018$). Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarının Ag+ total kromozomlar, Ag+ 21. kromozomlar ve SA sıklıkları ve dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark bulunamamış ($P>0.05$), ancak SA'daki total kromozom sayısının Alzheimer hastalarında yaşlı kontrollere göre arttığı bulunmuştur ($P=0.05$).

Sonuç olarak, Alzheimer hastalarında NOR alan oranlarının azalması, ribozomal genlerin aktivitesinde bir azalma olduğunu bize gösterebilir. Bununla birlikte, AH hastalarındaki ribozomal genlerin aktivitelerindeki değişiklikler üzerine destekleyici ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı; çekirdekçik oluşturan bölgeler; kromozom 21; satellit birleşmesi.

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF THE rRNA EXPRESSION IN LYMPHOCYTES OF ALZHEIMER PATIENTS

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder occurring with effects of genetic and environmental factors in middle or late life. DNA regions forming nucleolus (nucleolar organizer regions=NORs) expresses ribosomal genes present in secondary constriction regions of acrocentric chromosomes. There are increased deposits of β -amyloid in brain of the patients with AD and Down's syndrome. β -amyloid gene is located in acrocentric chromosome 21 which is related to for ribosomal DNA synthesis. Also, there seems to be a correlation between active transcriptional state and silver stainability. Therefore, it is possible that there is a relation between AD and ribosomal genes which were located in acrocentric chromosomes.

In our study, In order to compare activities of ribosomal genes in patients with AD and controls, lymphocytes of 20 AD patients and 20 healthy controls (10 young and 10 older) were cultivated. In addition to total nucleus and NOR surface proportions in interphase nucleus and silver stainability and satellite association (SA) of acrocentric chromosomes in metaphases were evaluated.

According to these evaluations the decrease in NOR surface proportions have been observed in interphase nucleus of AD patients compared with elderly controls ($P=0.035$). When are compared with those of the sizes of Ag⁺ segments of acrocentric chromosomes of AD patients and control groups the Ag staining size 1 of the chromosome 22 from AD patients was found be increased in young controls ($P=0.018$). There was no statistically significant difference between AD patients and control groups in terms of Ag⁺ acrocentric chromosomes, Ag⁺ chromosome 21 and SA frequency ($P>0.05$). However, it has been shown that there is a significant increase of the total number of chromosome in SA from AD patients when compared with elderly controls ($P=0.05$).

As a result, the decrease of NOR surface proportions in AD patients may show us a decrease in activity of ribosomal genes. However, further studies are required to support alterations on the activities of ribosomal genes in AD patients.

Key Words: Alzheimer's disease; nucleolus organizer regions; chromosome 21; satellite association.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın planlanmasında ve gerçekleşmesinde değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Yüksek lisans eğitimimin yanı sıra her türlü konuda destek ve yakınlığını gördüğüm, değerli hocam Doç. Dr. Hamiyet Altuntaş'a, tez konumun belirlenmesinde ve materyallerimin toplanmasında bana yardımcı olan hocam Prof.Dr. Halil Demirtaş ve Nöroloji A.B.D öğretim üyesi Prof.Dr. Yahya Karaman'a, sürekli bir şekilde çalışmalarımı izleyip değerli zamanlarını ayırarak, maddi ve manevi katkılarını esirgemeyen başta hocam Prof.Dr.Yusuf Özkul'a ve hocam Prof.Dr. Munis Dünder'a, tez çalışmalarımın her aşamasında destek ve ilgilerini gördüğüm Uz.Dr. Çetin Saatçi, Arş.Gör.Nalan İmamoğlu ve Arş.Gör. Zuhale Hamurcu'ya keder arkadaşım Serpil Tekin'e teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yapılması ve tezin hazırlanması sırasında, her aşamada maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve yoğun çalışma dönemlerimde beni anlayışla karşılayan, eşim Mehmet Akalın'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	sayfa
İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY SAYFASI.....	II
ÖZET.....	III
SUMMARY.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
TABLO LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri.....	3
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Tanısı.....	4
2.1.3. Alzheimer Hastalığında Risk Faktörleri.....	5
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	6
2.1.5. Alzheimer Hastalığının Histopatolojik Tanısı.....	7
2.1.6. Alzheimer Hastalığının Genetiği.....	8
2.1.7. Alzheimer Hastalığı ile Down sendromu arasındaki ilişkiler.....	13
2.2. İnsan Lenfosit Çekirdeklerinin (Nükleolus) Yapısı.....	14
2.3. İnsanda NOR Bölgelerinin Genel Özellikleri.....	16
2.4. NOR' ların Gümüş Nitrat İle Boyanması.....	17
2.4.1. NOR Proteinleri (AgNOR proteinleri).....	18
3. YÖNTEMLER.....	20
3.1. Gereçler.....	20
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Periferik Kandan Lenfosit Kültürü.....	23
3.2.2. NOR Boyama.....	25
3.2.3. İnterfaz Çekirdeklerindeki NOR Alanlarının Bilgisayar Programı İle Ölçülmesi.....	31
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA – SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
6. KAYNAKLAR.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
APP	: Amiloid Prekürsör Protein
APO E	: Apolipoprotein E
AgNO₃	: Gümüş Nitrat
ASG	: Asetik Saline Giemsa
βA	: Beta Amiloid
BOS	: Beyin Omirilik Sıvısı
°C	: Santigrat derece
DS	: Down Sendromu
GTP	: Guanozintrifosfat
HSPA 2	: Heat-Shock Protein
KD	: Kilo Dalton
MR	: Manyetik Rezonans
MMSE	: Mini Mental State Exam
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
NFD	: Nörofibriler Yumak
NP	: Nörotik Plak
NOR	: Nucleolus Organizer Region
PS	: Presenilin
RNAP I	: Ribonükleik Asit Polimeraz I
r(DNA)	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
SA	: Satellit Assosiasyon
SSC	: Sodium Saline Citrat

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil Listesi</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1 : NOR boyama uygulanmış lenfosit çekirdeği.....	27
Şekil 3.2 : Alzheimer hastasına (a) ve yaşlı kontrole (b) ait ASG ile bantlanmış ve AgNO ₃ ile boyanmış akrosentrik kromozomlar ve satellit assosiasyonu.....	30
Şekil 3.3 : Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan lenfosit çekirdeği.....	32
Şekil 3.4 : NOR Bölgeleri Belirlenmiş bir lenfosit Çekirdeği.....	33
Şekil 3.5 : NOR bölgeleri hesaplanmış lenfosit çekirdeği.....	33
Şekil 3.6 : Çekirdek ve NOR alan bölgeleri belirlenmiş bir lenfosit çekirdeği.....	34

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo Listesi</u>	<u>sayfa</u>
Tablo 4.1 : Alzheimer Hastaları ve Kontrol Gruplarındaki NOR alanı Ortalama Değerleri.....	37
Tablo 4.2 : Hasta ve Kontrollerdeki Akrosentrik Kromozomların Ag+ NOR Segment Büyüklüklerine Göre Aldıkları Değerler.....	38
Tablo 4.3 : Tablo 4.2'deki Hasta ve Kontrollere Ait Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	39
Tablo 4.4 : Hasta ve Kontrol Gruplarındaki Ag+ Kromozom Sayıları, Metafaz Alanları ve Satellit Assosiasyonu Yapan Kromozomların Durumlarını Gösteren Değerler.....	40
Tablo 4.5 : Tablo 4.4'deki Hasta ve Kontrollere Ait Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	41
Tablo 4.6 : Hasta ve Kontrollerdeki Ag+ Kromozom Sayısına Göre Metafaz Sayılarının Ortalama Değerleri.....	41

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), orta ve ileri yaşlarda görülen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı, beyinde yaygın olarak saptanan nörotik plaklar (NP) ve nörofibriler düğümlerle (NFD) karakterizedir. AH'nın genetik incelemelerinde değişik genler tanımlanmıştır. Bunlar β amiloid prekürsör protein (APP), presenilin-1 (PS-1), presenilin-2 (PS-2) ve apolipoprotein E (ApoE) olarak sıralanabilir. PS-1 geni 14 nolu kromozomda, PS-2 geni 1 nolu kromozomda, ApoE geni 19 nolu kromozomda ve β -amiloid prekürsör protein geni 21 nolu kromozomda yer almaktadır. β -amiloid geninin 21. kromozomda bulunuyor olması, Alzheimer hastalarında ve yaşlı Down Sendromlu hastalarda β -amiloid depositlerinin artması ve 40 yaş sonrası Down sendromu ile AH hastalarında nöropatolojik benzerliklerin bulunmuş olması AH ile DS arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (1-4). Ayrıca 21 nolu kromozom ribozomal DNA (rDNA) taşıyan akrosentrik bir kromozomdur. İnsanlarda beş çift akrosentrik kromozom vardır ve Nükleolar Organizer Regionlar (NORs) bu kromozomların sekonder darlık olarak bilinen satellit köklerinde yer alırlar ve 18S ve 28S rRNA için kodlayıcı genler içermektedirler. NOR insanda ve diğer ökaryotlarda kromozom üstünde "çekirdekçik oluşturan DNA bölgeleri" ni ifade eder (4). Genetik olarak aktif olan NOR'ların gümüş ile boyanabildiği belirlenmiştir ve ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel durumu ile gümüş boyanabilmesi arasında bir korelasyon vardır. NOR boyama, çeşitli bitki ve hayvan dokularında interfaz yada hücre döngüsünün herhangi bir evresinde nükleolus (çekirdekçik) oluşturan bölgeleri görülebilir hale getirmek için kullanılan bir boyama tekniğidir. Bir adı da "gümüş boyama" (silver staining) dır. NOR'larda bulunan proteinler gümüş boyama ile ayırt

edilebilir. Gümüş boyama tekniğinin sonuçları; ribozomal genlerin fonksiyonel yapısının stabil olup olmadığını ve onların mendeliyen kalıtsal geçişini gösterir. Çalışmadaki amacımız, AH hastalarında ve kontrol gruplarında (genç ve yaşlı kontrol grupları) NOR'ların aktivitesini gümüş boyama tekniği kullanarak karşılaştırmak ve AH hastalarında ribozomal genlerin aktivitesi ve gen regulasyonunu araştırmaktır.

Alzheimer hastalarında ribozomal genlerin aktivitesinin, karşılaştırılan genç ve yaşlı kontrollere göre azaldığı daha önce gösterilmiştir (1). Ancak bu çalışmada, sadece metafaz alanlarında kromozom 21'in gümüş boyanması ve satellit assosiasyonu (SA) açısından değerlendirmesi yapılmıştır. Bizim çalışmamızda ise, daha önceki çalışmalarımızla standardize ettiğimiz NOR boyama teknikleri (5, 6) kullanılarak, mitojenle uyarılmış insan lenfositlerinde hem interfaz alanlarında total nükleus ve NOR alanları bilgisayarda ölçülecek hem de metafaz alanlarındaki akrosentrik kromozomların gümüş boyanması ve SA dereceleri karşılaştırılacaktır. AH hastaları ile genç ve yaşlı kontrolleri arasında ribozomal genlerin aktivitesi açısından fark olup olmadığı konusunda elde edeceğimiz bulguların, AH'daki rRNA gen regulasyonunun anlaşılmasına katkıda bulunacağını düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ALZHEİMER HASTALIĞI

Alman psikiyatr Aloist Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmış olan Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılardaki primer dejeneratif demansın en sık görülen formudur. Demans, bilinci açık bir insanın günlük yaşamını etkileyecek derecede zihinsel ve sosyal uyum yeteneğinin azalması durumudur (7). Alzheimer hastalığının tanısından sonra yaşam beklentisi değişken olup, ortalama 8-12 yıldır (8). Hastalığa ait yayınlanan ilk olgu 51 yaşında işitsel hallüsinasyonlar ve kognitif defektlere sahip olan bir kadındır (7). Hastalığın erken veya geç görülmesi konusunda, yaş çok önemlidir ve belirgin yaş sınırı 60-65 yaşları olarak gösterilmektedir. Alzheimer hastalığı soy ağacında demans görülmemesi ve geç yaşta demansın ortaya çıkmasına bağlı olarak sporadik AH ve erken yaşta demans, soy ağacında 1. derecede akrabalarda AH görülmesiyle ailesel AH olarak da ikiye ayrılır (9).

2.1.1. Alzheimer hastalığının klinik özelliği

Alzheimer hastalığında en erken semptom, genellikle ani başlangıç ve hafıza kaybının progresyonudur. Başlangıçta bu hafıza kaybını yaşlılığa bağlı unutkanlıktan ayırt etmek güç olabilir. Ancak unutkanlığı olanlar bu durumun farkındadır ve günlük yaşam aktiviteleri minimal düzeyde etkilenir.

Hastalıkta özellikle isimler ve kelimelerin unutulması ilk bulgulardandır. Yeni bilgilerin hemen unutulması yakın geçmişi hatırlayamamak, buna karşın uzak geçmişi çok iyi hatırlamak önemli bir özelliktir. Alzheimer hastalarının konuşma bozukluğu siktir, cümle kuramazlar. Hastalık ilerledikçe bellek problemleri artar. Objelerin isimleri unutulur veya yanlış isimler söylenir. Sağ sol ayrımı yapamazlar, bildikleri yerlerde kaybolurlar. Zamanla özel bakım işleri bozulur, daha sonra yürüme ve postür bozukluğu gelişir. Halisünasyon, paranoya gibi psikiyatrik semptomlar başlar. Sonunda hasta yatağa bağımlı kalır (7, 10).

AH'nın seyri kendi içinde belirgin farklılıklar göstermektedir. Progresif olmakla birlikte hastalığın seyrinde platolar olabilir. Özellikle ileri evrelerde depresyon, insomnia, inkontinans, delüzyon, illüzyon, hallüsinasyon, ajitasyon, iştah bozukluğu, myoklonus, felç ve yürüyüş bozuklukları gibi kognitif olmayan semptomlar gözlenebilmektedir (11).

Aslında AH'nın sıkıntı veren semptomlarının çoğu kognitif bozukluk değildir. Ajitasyon, emosyonel patlamalar, şiddet, oldukça düzensiz uyku seyri hasta yakınları ve bakıcılar için sıklıkla problem yaratmaktadır. Delüzyonlar ve hallüsinasyonlar gibi diğer psikomotik davranışlar yanısıra yemek yeme bozuklukları da sıkıntı veren diğer semptomlardır (12).

2.1.2. Alzheimer hastalığının Tanısı

AH'nın kesin tanısı çoğunlukla problem yaratmaktadır. Durumun klinik olarak yapılan tanısı senil plaklar ve nörofibriler yumaklar tarzındaki histopatolojik bulgularla doğrulanmalıdır. Alzheimer hastalarında biyokimyasal çalışmalar, kortekste pek çok nöromediatörün ve özellikle asetil kolinin azaldığını göstermiştir. Kolin asetiltransferaz enzim aktivitesi, kolin geri alınımı, asetil kolin salınımı hasta beyinde azalmıştır. Kortekste serotonerjik ve nöroadrenarjik yetmezliğin de geliştiği bilinmekte ve hastalığın depresyon gibi davranışsal semptomları ile ilişkilendirilmektedir. Tanıya yardımcı olan laboratuvar tetkiklerinin hiçbiri %100 duyarlılık ve özgünlüğe sahip değildir.

Bilgisayarlı beyin tomografisi (CT), yapısal lezyonların belirlenmesi için kullanılır ve tanıyı destekleyicidir. MR'da hipokampus atrofinin görülmesi tanı için önemlidir. BOS incelemesinde BA azlığı ve Tau proteinlerinin azlığı görülür. Her yıl yaklaşık

100.000 kişi Alzheimer hastalığı nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Hastaların ölüm nedeni ise sepsis, aspirasyon pnomonisi, beslenme yetersizliği ve travmadır (7, 10, 13)

2.1.3. Alzheimer hastalığında risk faktörleri

Dejeneratif değişiklikler için yaş bir risk faktörü olmakla birlikte, AH için bir çok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunların arasında, genetik predispozisyon-yatkınlık (Kromozom 21, 14 ve 19), kafa travmaları, toksik maddeler (alüminyum), vasküler nedenler (serebrovasküler amiloidozis), inflamatuvar (akut faz reaksiyonları), metabolik (metobolizmanın yavaşlaması, mitokondriyal lezyon), enfeksiyöz (atipik ajanlar- yavaş virüslara benzer) faktörler sayılabilir (7, 10, 13,). Ayrıca değişik çalışmalarda sigara içme, konsepsiyon sırasındaki parental yaş, alüminyum, çinko, hipotiroidizm, düşük eğitim düzeyi ile ailede Parkinson hastalığı ve depresyon hikayesi AH için risk faktörü olarak gösterilmiştir (7, 14, 15). Annesi 15-19 yaşları arasında olan kişilerde AH riskinde artış olduğuna dair kanıtlar olmakla birlikte ileri maternal yaş ve AH riski arasında ilişki daha kuvvetlidir (3). Epidemiyolojik incelemeler yaşın artması ile hastalık insidansının belirgin olarak arttığı şeklindedir, 65-85 yaş arası her beş yılda bir demans prevalansı iki katına çıkmaktadır (7). AH'da ırk ve seks farkı yoktur. Ancak kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görüldüğü belirtilmektedir (16) ve ABD'de AH'nın siyahlarda daha fazla görüldüğü konusunda çalışmalar vardır (17). Bazı araştırmalarda AH'nın kadınlarda erkeklerden daha fazla görülmesinin sebebinin X-linked dominant geçişten dolayı olduğu ve piruvat dehidrogenaz kompleks proteinin AH'da az olduğu ve bunun X kromozomunda şifrelendiği belirtilmektedir. Bu da kadınlarda AH'nın fazla görülmesiyle ilgili olabilir (18).

Sigara ve alkol kullanımı AH'da risk olarak gösterilmiş, ancak AH'dan çok vasküler demanslarda önemli risk faktörüdür. Alzheimer hastalığında, nikotidik reseptör kaybı, nikotin tedavisini gündeme getirmiştir. İntravenöz ya da subkutan nikotin uygulanmasının kognitif fonksiyonlarda düzelmeye yol açtığı bildirilmektedir (10,13). Sigaranın Alzheimer hastalığına karşı koruyucu etkisi saptanmış, ancak pek çok hastalık için yüksek risk oluşturduğundan önerilmemiştir (10).

Depresyon, özellikle de kronik depresyon risk faktörü olarak gösterilmektedir (10, 19-22). Son yıllarda, sosyokültürel seviyesi yüksek olanlarda AH'nın daha az oranda görüldüğü ve düşük eğitim seviyesinin ileri yaşlarda hem AH, hem vasküler demans gelişmesi için risk faktörü olduğu gösterilmiştir (10, 23, 24).

Bunların dışında, östrojen alan kadınlarda AH riskinin, östrojen kullanmayanlara göre 1/2 oranında azaldığı bulunmuştur. Östrojenin asetil kolin ve sinir growth faktör regülasyonunda biyolojik etkileri olduğu belirtilmektedir (25-27). Östrojenlerin β -amiloid (β A) peptid üretimini in vitro baskıladığı bildirilmektedir. Menopozdan sonra östrojenlerin yokluğu ya da düşük düzeyde olması, Alzheimer hastalığının kadınlarda daha fazla görülmesini açıklayabilir (10).

Alzheimer hastalarının beyinlerinde alüminyum birikimi dikkat çekmiş ve alüminyum alımının AH için risk faktörü oluşturduğu öne sürülmüştür (10). Beyinde alüminyum içeriğinin yüksek olması, öğrenme yeteneklerinin ve kolinerjik aktivitelerinin azalmasına yol açmıştır (7, 10).

AH'larının çeşitli beyin bölgelerinde, asetilkolin sentezinden sorumlu enzim kolin asetiltransferaz aktivitesinde, kolinerjik nöronların dejenerasyonuna bağlanan belirgin bir azalma rastlanmıştır. Kolinerjik sistemi aktivitesindeki azalmanın derecesi, kognitif fonksiyon kayıplarının şiddeti ile uyumlu bulunmuştur (10).

2.1.4. Alzheimer hastalığının epidemiyolojisi

Yapılan son yayınların bir çoğunda "Çağın hastalığı" olarak nitelendirilen AH, diğer demanslardan farklı olarak progresif bir seyir göstermekte olup tüm demans sendromlarının %50 ile 60'ını oluşturmaktadır (11). AH'nın insidansı açısından ülkeden ülkeye gösterdiği varyasyonlar tam olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın insidansı 1952 yılında Sjögren ve arkadaşları tarafından % 0.1, 1985 yılında ise Sulkava ve Schoenberg tarafından % 0.03-% 0.05 olarak saptanmıştır (28). İskoçya'da yapılan bir başka araştırmada olası Alzheimer hastalığının insidansı 40-60 yaş arasındaki riskli popülasyonda 22/100.000, hastalık için sınırda olan olgularda ise 4/10.000 olarak bulunmuştur (29). Bildirilen en genç hasta 28 yaş olarak yaş sınırı tanımamasına rağmen Alzheimer hastalığı, yaşa dayalı bir hastalık olarak sınıflandırılır. Hastalık 65 yaş üstündeki insanların %5 kadarının şiddetli, %10 kadarının hafif ve orta şiddetli demansa sahip olduğu gözlenirken, 80 yaş üstündeki insanların %10-20 kadarının hastalıktan etkilenmesi, hastalığın prevalansının ilerleyen yaşla birlikte arttığını göstermektedir (11, 30).

2.1.5. Alzheimer hastalığının histopatolojik tanısı:

AH'nın kesin tanısı çoğunlukla problem yaratmaktadır. Durumun klinik olarak yapılan tanısı senil (nörotik) plaklar ve nörofibriler yumaklar tarzındaki histopatolojik bulgularla doğrulanmalıdır (11). AH'ındaki patolojik değişiklikler, nöronların dejenerasyonları ve kaybı nedeniyle meydana gelen serebral kortikal atrofi yanı sıra nöronların hücre cisimleri içinde ve etrafında anormal protein yapılarının birikimi ile karakterizedir (31). Otopsiler aracılığıyla amiloid proteinlerle ilişkili üç ana histopatolojik lezyon tanımlanmıştır. Bu lezyonlar, senil plaklarda beta amiloid proteinin (Beta/A4 veya A Beta da denilmektedir) ekstra sellüler olarak birikmesi, nörofibriler yumakları oluşturan mikrotübüllerle ilişkili tau proteini'nin intrasellüler birikimi ve beyin kapillerine bitişik olan, kognifilik anjiyopati de denen beta amiloid depozitleridir (32).

Nörotik plaklar (NP) amiloid birikimi sonucu oluşur. Hücre dışında bulunup, amiloid prekürsör protein (APP)' den kaynaklanan 40-42 aminoasitlik santral yerleşimli β -amyloid (β A) peptid çekirdeğinden oluşur. Vasküler yapıda biriken β -amiloidi sağlam görünüşlü birkaç presinaptik vezikülle, sinaptik uçlar ve pek çok lizozom, anormal mitokondri içeren hem dentritik hem de aksonal dejenere sinir uçları, çevrelemektedir (10). NP oluşumunda, β A'nın mononükleer fagositler için kemotaktik olmasının rolü tartışılmaktadır (10). Nörotik plaklar kesin tanı için de en önemli bulguların başında gelmektedir. Çapı 15-200 nm arasında olan bu oluşumların ortasında alüminyum ve silikat içeren amorf bir çekirdek ve çevresinde anormal şişerek genişlemiş akson ve dentritik elemanlar, glial uzantıların oluşturduğu taç gibi tabaka halinde bulunurlar. Amiloid plakların olmadığı durumlarda atrofi ve nörofibriler yumakların varlığı halinde bile kesin tanı şüphelidir (33, 34).

AH'ın ikinci önemli patolojik özelliği nörofibriler yumaklardır. Dejeneratif beyin hastalıklarında nörofibriler yumaklar çift heliksler ve düz filamentler şeklindedir. Yumaklar genelde çift iplikçikler halinde heliksler çizen filamentler şeklindedir (7). Genellikle hücre içi yerleşim gösterirler. Nöronların sitoplazmasında anormal filamentler şeklindedir. Çift sarmallı filamentler deyimi Alzheimer hastalığındaki nörofibriler yumakların eşanlamlı sözcüğü olarak kabul edilmektedir (35, 36).

Normal beyin yapısında da bulunan tau proteininin, çözünmeyen anormal fosforillenmiş kısmı nörofibriler ağı oluşturur (10).

Tau proteini, ekspresyonu ve fosforilasyonu gelişimsel olarak düzenlenmiş bir nöronal fosfoproteindir. AH'ında tau, anormal olarak fosforillenmekte ve çift helikal filamentleri oluşturmaktadır. Temel histopatolojik lezyonlardan biri olan nörofibriler yumaklar, bu helikal filamentlerden meydana gelmektedir (7, 37, 11). Tau proteinleri mikrotübül ile birlikte bulunan protein grubuna aittir ve fosforilasyonun bir kısmından sorumludurlar. Polimerize tubulin ile birlikte ve mikrotübüllerin özelliklerini değiştirebilir. Uzun sinir hücre aksonlarında teşekkül edebilir. Normal beyinde tau proteinler aksonlarda yüksek konsantrasyonlarda olabilir. İmmüno kimyasal olarak tau proteinlerinin miyelin kılıfı zincirine benzedikleri belirtilmektedir. Hipokampus ve parietal ve frontal kortekste seçici olarak tau proteinlerinin anormal fosforilasyonunu ve çift sarımlı heliksel filamentlere dönüşmesini kolaylaştırır. AH'da fosforile olmuş tau proteinlerinin A68 protein oldukları, yüksek moleküler ağırlığa sahip oldukları belirtilmektedir (38, 39).

2.1.6. Alzheimer hastalığının genetiği

AH'de son araştırmalarda aile insidansının % 35-40 olduğu, hastalık tespit edilenlerde vakaların en az yarısında geçişin otozomal dominant olduğu belirtilmiştir (40). En sık görülen genetik anormallik 14 nolu kromozomda (14 q23.3) lokus gösterdiği tespit edilmiştir (41). Son yıllarda AH genetik incelemeleri kromozom anomalileri ile proteinler arasındaki ilişkiler üzerinde ağırlık kazanmış, değişik genler tanımlanmıştır. Bunlar β -amiloid prekürsör protein, presenilin 1 (PS-1) ve presenilin 2 (PS-2) dir. Bunlar ailesel formlarda gösterildiği gibi sporadik vakalarda da izole edilmiştir. Ailesel ve sporadik formlarda % 50' den fazla izole edilen apolipoprotein E (Apo E), AH için daha spesifik görülmektedir (26, 42). Son 5-6 yıldır yapılan genetik çalışmalarda, özellikle 60 yaştan önce hastalığı başlayanlarda otozomal dominant geçişin önemli olduğu ve bu vakaların %100'e yakınının genetik geçişle ilgili olabileceği vurgulanmaktadır. Ailesel Alzheimer hastalığı otozomal geçişlidir ve bu hastalarda üç farklı gende (Amiloid prekürsör protein, Presenilin-1, Presenilin-2) mutasyon vardır. Ailesel olgularda hastalığın başlama yaşının daha küçük olduğu görülmüştür (28). AH'nın başlama yaşı aileler arasında farklı olmakla birlikte, otozomal dominant AH gözlenen birçok geniş ailede başlama yaşının benzer olduğu bildirilmiştir (43). Geç başlangıçlı AH olanlarda genetik geçişin otozomal dominant olduğu tam

olarak yaygın değildir. Bütün bunlar AH'ın heterojenik özelliklerini desteklemektedir (40).

Alzheimer hastalığında β -Amiloidin rolü

Alzheimer hastalığı, beyinde yaygın olarak saptanan nörotik plaklar ve nörofibriler düğümlerle karakterizedir. Alzheimer hastalarının beyinde bulunan nörotik plaklar, merkezdeki amiloid proteinin çevresini dejenere olan nöronların sarmasıyla oluşmaktadır. Amiloid çeşitli klinik bozukluklarda vücudun bir çok doku ve organlarında hücreler arasında depolanan anormal bir proteindir. Bu protein dallanmayan fibrillerden yapılmıştır ve beta kıvrımlı tabaka yapısı gösterir. β -amiloid 21. kromozomda kodlanan transmembran protein olan APP (Amiloid Prekürsör Protein)'nin sekretaz enzimiyle kesilmesi sonucu oluşur. APP aminoasit diziliminde valin yerine izolösin, glisin yerine fenilalanin değişiminden dolayı mutasyona sebep olmakta bu da β -amiloid depolanmasında etkili olmaktadır (33, 44, 45). APP metabolizmasında üç enzim rol oynamaktadır. Bu enzimler, α sekretaz, β sekretaz, γ sekretaz enzimleridir. β -amiloid hücre dışında bulunup, amiloid prekürsör protein' den kaynaklanan 40-42 amino asitlik santral yerleşimli peptid çekirdeği içerir (10, 46) ve nörotoksiktir. Hastalıkta α ve β sekretaz enzim aktiviteleri arasındaki dengenin β sekretaz lehine gelişmesinin nöronal dejenerasyona yol açtığı düşünülmektedir (46).

Genetik geçiş düşünülen ailelerin bir kısmında APP geni tanımlanmıştır (47, 48). Ailesel AH için pek spesifik olmadığı ve nadir oranlarda bulunduğu da belirtilmiştir (% 5-20). B-amyloid protein 21 nolu kromozomun uzun kolunda lokalize APP geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gendeki birkaç mutasyonun hastalığa sebep olduğu düşünülmektedir (49).

Down sendromu ile nöropatolojik benzerlik bu genin tespitiyle 40 yaş sonrası Down sendromunun AH'a benzer kognitif değişiklikler göstermesi sonucu önemli aşama kaydetmiştir. Erken başlangıçlı AH vakalarında APP geninde mutasyonun daha fazla olduğu gösterilmiştir (3, 50, 51).

AH' nin patolojik tanısı için gerekli olan senil plaklarda biriken β -amiloid proteinin öncül maddesi olan β -amiloid prekürsör proteini tipik olarak bir hücre yüzey proteinine sahiptir. Bu protein beyinde ve hemen hemen tüm periferel dokularda bulunan normal bir hücresel gen ürünü olup amiloid benzeri fibriller şeklinde

toplanır ve nörotoksik etki göstermektedir (52). 21. kromozomda lokalize olan APP geninin evölüsyon boyunca korunmuş olması APP 'nin önemli bir housekeeping fonksiyonuna sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda APP ekspresyonunda ve beta A4 peptid birikimindeki artışların AH'ında gözlenen tipik amiloidozise neden olduğu bildirilmektedir (52-56). Forbolesterler tarafından protein kinaz C'nin aktivasyonu yanı sıra AH'nda değişim gösteren asetilkolin ve interlökin 1' de beta / A4 amiloid protein prekürsörlerinin sekresyonunu ve işlenmesini artırmaktadır (57). APP'deki ailesel Alzheimer hastalığı mutasyonları β -amiloid 42'in oranında göreceli bir artışa yol açar. β -amiloid 42'in APP'nin intraselüler dağılımını değiştirdiği gösterilmiştir. Presenil'lerdeki ailesel alzheimer mutasyonları aynı zamanda APP fonksiyonunu ve trafiğini etkileyebilir. Son çalışmalar β -amiloid X42- β amiloid X43'ün ekstrasellüler seviyelerinin, Presenilin'lerdeki (PS-1 ve PS-2) mutasyona sahip olan ailesel alzheimer hastalarından alınan plazma ve fibroblastlarda arttığı gösterilmiştir (58, 59).

Presenilin genler

Ailesel Alzheimer hastalığı için 14. kromozomun uzun kolunda (14q23.3) yer alan 467 aminoasit içeren bir gen sorumlu görülmüştür, bu gen Presenilin-1 dir (60). Ayrıca 1. kromozomda yer alan 448 aminoasit içeren presenilin-2' nin de AH'nın oluşmasında söz konusu olduğu söylenmektedir. Presenilin-2'nin erken yaşta aktive olan AH geninin tanımı italyan kökenli ailelerde doğrulanmıştır. APP ve PS-1, PS-2'deki ailesel Alzheimer hastalığı mutasyonları erken yaşta aktive olmuş ailesel Alzheimer vakalarının büyük bölümünde görülmüştür (10, 13). Bununla birlikte APP, PS-1, PS-2 'leri kodlayan bölgelerdeki mutasyonlara sahip olmadıkları görülen erken yaşta aktive olmuş Alzheimer hastalarının akrabalarının varlığı en az bir veya daha fazla genin etkili olduğu fakat bilinmediğini gösterir. PS-1 ve PS-2'nin her yerde ifadelendiği görülür. Bununla birlikte PS-2 transkriptleri, PS-1 transkriptlerine göre beyinde daha az bulunur. Fare beyindeki in situ hibridizasyonu göstermiştir ki; PS-1 baskın şekilde nöronlarda ifadelenir. Hipokampus, serebral granül, koroid pleksus yüksek oranda PS-1 mesajı içerir. Beyaz maddedeki glialarda PS-1 ve PS-2 çekirdek zarında, endoplazmik retikulumda, insan nöroglia hücrelerinde saptanmıştır (59).

İnsan beynindeki PS-1, APP 695 benzer nöronal boyama özelliği gösterir. APP 695 'in fazla bulunduğu bölgeler Alzheimer hastalığı değişimlerine duyarlıdır. Ailesel Alzheimer hastalığı, ilişkili mutasyonların patolojik mekanizmasının ailesel Alzheimer hastalığına sebep olduğu kesin değildir. 50'in üstünde ailesel soyağacında PS-1'de 35 tane belirgin patojenik duyarsız mutasyon tanımlanmıştır. 8 tane PS-2 ailesel soyağacında, 2 tane mutasyon saptanmıştır. PS-2 proteini proteolitik mekanizmayla 2 parçaya ayrıldığı (35 KD'luk N terminal parçası ve 20 KD'luk C terminal parçası) ve ubiquitlenerek proteozom yoluyla yıkıldığı gösterilmiştir. Ailesel Alzheimer hastalığındaki mutasyonlarda Presenil-2'nin normal PS-2'den daha yavaş yenileniyor olması, büyük bir ihtimalle ubiquitin proteozom yoluyla yetersiz yıkımının sonucudur (59).

PS-1 proteini 45-50 KD'luk uzun bir polipeptiddir. Bu proteinin proteolitik mekanizmayla parçalanması sonucu 28 KD'luk N terminal parçası ve 19 KD'luk C terminal parçası oluşur. Presenilinlerin bu parçaları hücre iskeletiyle bağlantılıdır. 14. kromozomun uzun kolunun ortalarında yer aldığı düşünülen PS-1 geninin ürünü, bir stres proteini şeklinde fonksiyon göstererek, APP geni veya metabolizması üzerinde doğrudan etki edip gen ekspresyonunu veya APP'nin işlemlerini düzenleyebilmektedir. Ayrıca bu protein amiloid patolojisine sekonder olarak etki ederek, nörofibriller yumak oluşumunu bozup, nöronal ölüme yol açabilmektedir (29, 60). Bununla birlikte 14. kromozomun uzun kolunun ortalarında bulunan heat-shock protein geninin (HSPA2) ve c-fos onkogeninin muhtemelen nöronal strese cevap veren ve teorik olarak APP geninin promoter bölgesine bağlanıp ekspresyonunu arttırabilen faktörler olabileceği düşünülmektedir (29). PS-1 geni hücrelerin transmembran bölgesinde % 63 ile % 95 oranlarında izole olurlar (61). PS-1 geninin 35 farklı mutasyonu gösterilmiştir. Farklı etnik orjinlerde görülme sıklığı değişmekle birlikte AH vakalarının % 70 inde vardır. Erken başlangıçlı ailesel vakalarda % 50 oranında PS-1 geninin olduğu kabul edilmektedir (62). PS-1' in fonksiyonu iyi bilinmemekle birlikte beyinin değişik bölgelerinde, kalp, plasenta, akciğer, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve pankreasta bu protein bulunmaktadır. Sonuç olarak 14. kromozomdaki mutasyonların erken başlayan dominant AH'nin büyük bölümünden sorumlu olduğu görülmektedir (29). Geç başlayan AH'nin genetiği daha komplike olup bu hastalık etyolojik ve genetik olarak heterojendir (49, 63-65). Kompleks segregasyon analizleri poligenik multifaktöriyel bir zeminde etki gösteren bir veya iki genin olma olasılığını göstermektedir (66). Geç başlayan AH için

APP geni, kromozom 14 (PS 1) ve kromozom 1 (PS 2) deki olası genler, ana neden olarak görülmemektedir (67, 68).

Apolipoprotein-E geni

Ailesel ve sporadik geç başlangıçlı AH için 19. kromozomun uzun kolunda (19q13.2) lokalize olan Apolipoprotein E geninin tip 3 alleli arasında güçlü bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir (29, 66-69). Apolipoprotein E, hepatik Apo e reseptörleri ve düşük dansiteli reseptörleriyle etkileşerek spesifik lipitlerin ve kolesterolün transportunda görev alan plazma proteinlerinden birisidir. ApoE geninin Epsilon 2 ($\epsilon 2$), Epsilon 3 ($\epsilon 3$), Epsilon 4 ($\epsilon 4$) olmak üzere üç alleli vardır. Bu allellerin sağlıklı populasyonda rölatif sıklığı Apo E- $\epsilon 2$ % 8, Apo E- $\epsilon 3$ % 78, Apo E- $\epsilon 4$ % 14 tür ve altı fenotipi vardır (13, 70, 71). Birçok bulgu ApoE'nin lipit transportunda ve sinir sisteminin dejenerasyon ve rejenerasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir. ApoE mRNA'sı vücutta en çok beyin dokusunda ve karaciğer parenkim hücrelerinde bulunmaktadır (1). Apo E- $\epsilon 2$, Apo E- $\epsilon 3$ kan-beyin bariyerini geçemez. Astrositler tarafından sentez edilir. Apo E- $\epsilon 4$ daha kolay geçer, Apo E senil plakta, nörofibriller yumakta ve BOS 'da bulunmuştur. Apo E- $\epsilon 2$ izoformu Apo E'nin mikrotübüllere bağlı tau proteine bağlantısını artırır ve nörofibriler yumak yapan çift sarmallı filamentlerin yapımını engeller, dolayısıyla AH riskini azaltır. Erken ve geç başlayan ailesel alzheimer olgularında yapılan bir çalışmada da Apo E- $\epsilon 2$ allelinin sıklığında önemli oranda azalma olduğu gözlenmiştir (68).

Apo E- $\epsilon 4$ alleli amiloid birikimini artırır, aynı zamanda amiloid oluşturan izo enzimleri ve öncü maddeleri de artırır. Bu allel AH riskini arttırmakta ve başlangıç yaşını da düşürmektedir (72). Apo E- $\epsilon 4$ (-) olanlara karşın Apo E- $\epsilon 4$ (+) taşıyan Alzheimer hastalarında amiloid birikiminin arttığı gözlenmiştir. ApoE'nin AH ile genetik ilişkisini ortaya koyan bir çok hipotez vardır. Bu hipotezler Apo E'nin lipit transport proteinlerinin amiloid veya Tau 11, Tau 13'ün plak veya sarmal oluşumu ile ilişkili olduğunu ileri sürer. Diğer bir hipotez ise Apo E'nin nöronal hasarı izleyen rejenerasyonun ilerlemesindeki rolüne dayandırılmıştır. Gerçekten $\epsilon 3$ izoformunun sinir iltihabının çabuk büyümesini desteklediği $\epsilon 4$ izoformunun ise doku kültüründe sinir iltihabının fazla büyümesini sağlamadığı gösterilmiştir. ApoE' nin proteolitik parçalanmasıyla 2 ana parça oluşur. Bunlar 10 KD'luk parça ve 22 KD'luk parçadır. 10

KD'luk C terminal domaini, 22 KD'luk N terminal domaini içerir. C terminal domaini Apo E'nin lipoprotein partiküllerini ve amiloidi içerir, N terminal domaini reseptör bağlayıcı ve benzer yapılı aminoasitleri içerir ve beyinde bulunur (73). Apo E-ε4 izoformu olan parçaların ε3 türeviden oluşan parçalardan 10 kat daha toksik olduğu gösterilmiştir. Apo E'nin kalıtımı, hastalığın başlama yaşının düşmesi ve hastalık riskinin artmasına neden olsa da doğrudan hastalık nedeni değildir (74). Son birkaç yıl içinde 12 ve 3 nolu kromozomlarda defekt olduğunu belirten çalışmalar vardır. 1, 14 ve 21 nolu kromozomlarda defekt kromozomların uzun kolunda lokalize edilmiştir. 3 ve 12 nolu kromozomlar için bu spesifik değildir (51, 75).

2.1.7. Alzheimer hastalığı ile Down sendromu arasındaki ilişki

AH ve Down sendromu (DS) arasında yakın bir ilişki olduğu bir çok klinik ve nöropatolojik çalışmalarla doğrulanmıştır. DS hastaların çoğunda AH benzeri semptomlar gelişmektedir. Diğer taraftan hem AH hem de DS olan hastalarda senil plaklar ve nörofibriler yumaklar şeklinde benzer iki karakteristik nöropatolojik değişiklikler görülmektedir. Bu benzerlik, hastalıklar arasında etyolojik ilişki olması bakımından ilgi çekmiş ve ortaya değişik hipotezler atılmasına neden olmuştur. Kromozom 21'de lokalize olan bazı genlerin trizomisinin RNA sentezinin artmasına ve sonuç olarak AH'na neden olabilen proteinlerin artmasına ve birikmesine yol açabileceği düşünülmektedir (30, 53). β-amiloid geninin 21 nolu kromozomda bulunuyor olması Alzheimer hastalığı ile Down sendromu arasındaki bir ilişkiyi artırmaktadır. Kromozom 21'in proksimal uzun kolundaki polimorfik DNA markırları (lokuslar D21S1/S11 ve D21S16) ve FAH arasında genetik bağlantı olduğu gösterilmiş ve AH'nın patolojik değişikliklerin moleküler bazının açıklanmasına yardımcı olacağı düşünülmüştür. β-amiloid üretimindeki artış orta yaşlı Down sendromlu hastalarda gözlenmektedir. 40 yaş üstündeki Down sendromlu bireylerde serebral korteksde, sıklıkla çok sayıda amiloid plakların ve nörofibriler düğümlerin bulunuyor olması ve buna demansın eşlik etmesi AH'da sorumlu olan genetik defektin 21. kromozom üzerinde olduğunu düşündürmektedir (50, 76, 77).

Ailesel çalışmalar, AH'li bireylerin akrabalarında DS sıklığında artış olduğunu ve DS'li bireylerin akrabalarında da AH sıklığında artış olduğunu göstermektedir. DS trizomilerini % 95 indeki non-disjunction olayı maternal orjinlidir (12, 15). Böylece

eğer DS ve AH 'na karşı paylaşılmış bir genetik duyarlılık mevcut ise, AH frekansının DS' lu bireylerin annelerinde artmış olması gerekir. Bu nedenle şu hipotez ileri atılmıştır: DS' lu çocuk doğuran annelerde AH frekansı artmış olmalıdır (3). Erken başlayan AH'na sahip olan probandların 1. ve 2. derece akrabalarında DS'lu olguların sayısının populasyon geneline göre 5 kat fazla olduğu gözlenmiştir (14, 78, 79). AH olgularının doğumlarında ileri maternal yaş öyküsü, DS ve AH arasındaki ortak bir defekt olma ihtimalini artırmaktadır. Ancak yapılan bir çalışmada DS' nun tipik olarak doğum düzenini etkilemediği, ebeveynlerdeki azalmış fertilitenin ileri maternal yaşın olası bir nedeni olduğu gözlenmiştir. Bir başka çalışmada AH probandlarının doğumda anne ve baba yaşının normal olduğu belirtilmiştir (7).

Bazı araştırmalar, PS-1 ve PS-2 proteinlerinin nükleer mebranda bulunabileceğini ve hücre siklusu sırasında kromozom ayrılması ve organizasyonuna katıldığını ileri sürerler. Bir çok hücre tipinde presenilin proteinlerinin nükleer lokalizasyonu son zamanlarda bir çok laboratuvarlarda doğrulanmıştır. PS-2'nin, p-53 tümör süpresör proteinin hücre siklusunun regülasyonuna yardım ettiği, hücre siklusu sırasında sentrozom ve nukleusda lokalize olduğu ileri sürülmekte ve bundan dolayı da PS-2'de meydana gelen mutasyon kromozomların hatalı ayrımına neden olmaktadır (58).

2.2. İNSAN LENFOSİT ÇEKİRDEKÇİKLERİNİN (NÜKLEOLUS) YAPISI:

Çekirdekçik, hücre çekirdeği içerisinde düzenlenmiştir ve çekirdek sıvısından herhangi bir zarla ayrılmaz. Canlı hücrelerinde ışığı çok kıran yapılar olarak ayırtedilirler ve ışık mikroskopunda homojen olarak görülürler. Genellikle protein sentezi fazla olan hücrelerde büyük yapılar halinde olan nükleoluslar protein sentezi düşük olan hücrelerde küçük olurlar veya bulunmayabilirler. Büyüklükleri canlının türüne ve hücresine göre değişir. Nükleolus RNA ve proteinden yapılmıştır. Nükleolus RNA'sının baz yapısı ribozom RNA'sının baz yapısının aynıdır. Ribozom yapılarına giren maddeler nükleolusda oluşmaktadır. Protein miktarı çok olmakla beraber histonlar bulunmamaktadır. Enzim olarak asit fosfataz, nükleosit fosforilaz, NAD sentaz enzimlerinin var olduğu görülmüştür. Aktif bir şekilde protein sentezleyen hücrelerde ribozom ihtiyacı daha fazla olacağı için bu hücrelerin nükleolusları daha büyük olur ve sayıları da daha fazladır. Bölünen hücrede protein sentezi düşeceği için ribozom

meydana getirilmesi de durdurulur. Bu sebeple bölünme sırasında, metafazda, nükleolusu görebilmek mümkün olmaz. Hücre bölünmesi sırasında nükleolus devirsel değişiklikler gösterir. Işık mikroskobu incelemeleri, nükleolusun, profaz başlarken kaybolduğunu ve bölünme tekrarlanınca tekrar ortaya çıktığını göstermektedir. Her bir nükleolus sadece bir çift kromozomla temas halindedir. Bu kromozomlara nükleolus kromozomları ve temas yerine nükleolus organizatörü denir. Telofazda bu nükleolus kromozomlarının nükleolus organizatörü olan bölgelerinden nükleoluslar oluşmaktadır. Nükleolus organizatörü bölgeleri rRNA transkripsiyonu yapan genlere sahiptir. Bu bölgelerin çevresindeki yoğun nükleolus lifleri küçük ribonükleoprotein tanecikleri ile birlikte bulunur ve çoğunlukla buradan olgun ribozomlar çıkarılırlar. Çekirdekçikler, ökaryotik hücrelerin ribozom üreten merkezleridir (80).

Nükleolus içten dışa doğru İpliksi merkez (Fibrillar center), Yoğun ipliksi bölge (Dense fibrillar component), Granüllü bölge (Granular component) olmak üzere üç kısma ayrılır (81, 82). İpliksi merkez; DNA, RNAP I ve diğer proteinleri içeren ve açık boyanan transkripsiyon bölgeleridir (82). Yoğun ipliksi bölge; Gümüşle boyanabilen proteinlerin yanısıra, DNA ve RNA'nın her ikisini de içeren ipliksi merkezin çevresinde, yoğun boyanan bir bölgedir. Bu bölge RNA sentez bölgesidir (81). Granüllü bölge; nükleolusun en dış çevresinde ribonükleer protein partiküllerini toplayan ve rRNA transkriptlerinin olgun bir biçime hazırlandığı bölgedir (82).

İnterfaz çekirdeğinde, gümüş granüllerinin çökmesinin en fazla nükleolusun ipliksi merkezi üzerinde meydana geldiği ileri sürülmektedir (81).

Bir hücrede nükleolus sayısı bazı faktörlere bağlıdır;

1. Bir hücrede aktif NOR sayısı ne kadarsa o hücrede en fazla gözlenebilen nükleolus sayısı da o kadar olabilir.
2. Nükleolusun sayısı hücrenin fonksiyonel değişiklikleri ile ilişkilidir. Önceden inaktif olan NOR'ların aktivasyonu ile artabilir, ya da uzun süreli interfazda aktif NOR'ların birleşmesi sonucu azalabilir.
3. Nükleolusun sayısı, sık meydana gelen mitotik bölünmelerden dolayı NOR'ların birleşmesindeki bir ayrılma nedeni ile artabilir (83).

2.3. İNSANDA NOR BÖLGELERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Çekirdekçik oluşturan bölgeler (nucleolar organizer regions = NORs), insanda akrosentrik kromozomların (13., 14., 15., 21., ve 22. kromozomlar) ikincil boğum (secondary construction) olarak adlandırılan satellit saplarında bulunan ribozomal DNA'ları (rDNA) ifade ederler (83-85). NOR'lar rDNA'nın çok sayıda kopyalarını içeren kromozomal bölgeler olup, NOR başına rDNA kopyalarının sayısı farklıdır (83, 86, 87). Bu bölgelerde rDNA yüksek miktarda GC (guanin-sitozin) içeriğine sahiptir (86).

Akrosentrik kromozomların kısa kollarında rDNA bulunur fakat hepsinde transkripsiyonel olarak aktif değildir (83). Transkripsiyonel olarak inaktif olan NOR'lar, aktif olan NOR' lardan belirli bir uzaklıkta bulunur. Çekirdekçik içinde bulunan rDNA transkripsiyonel olarak aktiftir (83, 88).

İnsan akrosentrik kromozomlarında ikincil boğum bölgeleri (NORs), 18S ve 28 S rRNA için kodlayıcı genler içermektedir. Genetik olarak aktif NOR bölgelerinin Ag ile seçici olarak boyanabildiği belirlenmiştir. Ag boyama tekniğinin sonuçları ribozomal genlerin fonksiyonel yapısının stabillliğini ve onların mendeliyel kalıtsal geçişini gösterir. Ag pozitif NOR'ların sayısı bir kişiden diğerine farklıdır fakat bireyler için sabittir (1).

İnsandaki 10 akrosentrik kromozomun kısa kollarının saplar taşıdığı ve yumru şeklinde satellitleri olduğu 1961'den beri kabul edilmektedir. Bu bölgeler çekirdekçiğin yapımında işe karıştıkları için sitogenetik öneme sahiptirler (89). NOR taşıyan akrosentrik kromozomların kısa kolları, insan hücrelerinin metafazlarında sık sık bir arada bulunurlar. Buna "satellit assosiasyonu (SA) " adı verilir. Satellit assosiasyonuna daha fazla miktarda rDNA içeren NOR'ların daha sık olarak katıldıkları ve yine aynı şekilde aktif NOR' ların inaktif olanlardan çok daha fazla sıklıkta bu birleşmelere katıldıkları ileri sürülmüştür (90). İnsan lenfositleri kültüründe NOR taşıyan D veG grubu akrosentrik kromozomların kısa kolları gümüşle boyandığı zaman tek ve çok sayıda satellit birleşmeleri gösterir (89). Aktif NOR'ları boyamak için kullanılan gümüş metodu, NOR'un aktivitesine bağlı olarak gümüş boyamanın şiddeti ile pozitif orantılı olan insan lenfosit kültürlerindeki satellit birleşme sıklığını göstermektedir. Satellit assosiasyonunda yer alan akrosentrik kromozomların materyali daima gümüş pozitifdir (90). Satellit assosiasyonu aktif NOR'ları gösterir. Akrosentrik

kromozomların satellit assosiasyonu yapmalarının ve 21. kromozomun SA'na katılmasının, Alzheimer hastalığı ve yaşa bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. NOR'larda bulunan proteinler gümüş-nitrat boyama ile ayırt edilebilir (1).

2.4. NOR' LARIN GÜMÜŞ NİTRAT İLE BOYANMASI

Gümüş nitrat, sitolojik bir boya olarak 1800'lü yılların sonlarından beri kullanılmaktadır. İlk olarak AgNOR boyama kromozom preparatlarında Carleton tarafından gösterilmiştir (91). Bloom ve Goodpasture sitogenetik preparatlarda çekirdekçik oluşturan bölgeleri ortaya çıkarmak için AgNOR boyama tekniğini geliştirmişlerdir (4). Bu tekniğin ışık ve elektron mikroskobu alanlarında uygulanması da Howell ve Black tarafından basitleştirilerek gerçekleştirilmiştir (92, 93). Tanskripsiyonel olarak aktif olan NOR'ların pozisyonu interfazda ya da mitoz sırasında gümüş boyama ile gösterilebilmektedir (83, 91, 94, 95). Ribozomal genlerin aktif transkripsiyonel bölgesi ile gümüş boyanırılıığı arasında doğrudan ilişki vardır (80, 85, 90, 95). NOR boyama aktif rDNA bölgelerini boyayıp, inaktif (rRNA sentezlemeyen) bölgeleri boyamama özelliğine sahiptir (95).

18S ve 28S rRNA oluşturan genler insan akrosentrik kromozomlarının kısa kollarına lokalize olmuş durumdadır. Onun için gümüş boyama bu bölgeleri selektif olarak ortaya çıkarır, fakat bununla beraber tüm akrosentrikler boyanmaz ve içeriğine bağlı olarak kromozomlar kişiden kişiye değişmek üzere daha koyu ve daha açık boyanırlar. O nedenle her birey için spesifik bir boyama örneği ortaya çıkar ve bu polimorfizmin kalıtsal bir özelliğidir (1, 96). Maksimum olarak aktive edilmiş yani kültürü yapılmış lenfosit hücrelerinde NOR'ların gümüşle boyanabilirliği belirli sınırlar içerisinde kalıtılabilir bir özelliktir. Başka bir ifade ile örneğin anne ve babada 13. kromozomlardaki rDNA'lar rRNA sentezlemiyorlarsa yani $AgNO_3$ ile boyanmıyorlarsa bu özellik çocuklarında da aynen görülecektir. Her zaman tüm akrosentrikler eşit boyanmaz çünkü farklı bireylerin akrosentrik kromozomlarında boyanma farklı derecede olur (84, 85, 94).

NOR kromatinin hücre döngüsünün bir önceki interfazında transkripsiyonel olarak aktif olması, mitotik NOR'ların gümüşle boyanabilmesi için gerekli olduğu ileri sürülmektedir (84, 85, 95).

Gümüş boyama tekniği, asidik bir ortamda, NOR merkezlerinde gümüş nitratin, NOR proteinleri tarafından metalik gümüş indirgenmesine dayanır (88). Gümüş nitrati metalik gümüşe indirgeyen asıl madde, bu bölgelere özgü proteinler (NOR proteinleri) dir. NOR boyama pronase, tripsin, ve papain gibi proteolitik enzimlerden etkilenmektedir (84, 86, 88, 91, 92, 94, 97). Bu da, gümüş iyonlarının, asidik olan proteinlere bağlandığını göstermektedir (84, 85, 92, 95, 97). İnterfaz boyunca üretilen ve profaz'da NOR'ların etrafında biriken materyal, ribonükleoproteinin asidik bir protein bileşenidir ve gümüşle boyanabilmektedir (84, 85). Akrosentrik kromozomların kısa kollarında ve satellitlerinde bulunan nucleolar organizatör bölgeler gümüş nitrat ile boyandığında koyu kahverengi veya siyah tonunda boya almaktadır.

Gümüşe bağlanan proteinlerin bir kısmı, çekirdek ekstraktlarından elde edilen jel elektroforezinde gösterilmiştir. Gümüşe proteinlerin bağlanma reaksiyonu sülfidril grubları vasıtasıyla meydana geliyor gibi görünmektedir. rDNA'ların rRNA'lara transkripsiyonunu katalizleyen RNAP I bu şekilde tanımlanan ilk proteindir (89). Fosfat grubları da gümüş boyamada işe karışabilmektedirler. Gümüşe bağlanan iki major AgNOR proteinleri, nükleolin (C23) ve B23'dür. C23 ve B23, çekirdekçiğin fosforile edilen ana asidik fosfoproteinleridir. Bu proteinlerin küçük birimleri olan fosfoserin ve fosfotreonin gümüş boyamada işe karışabilmektedir (89). Bunun yanı sıra, nükleolin'in amino terminal bölgesindeki asidik aminoasitlerin konsantrasyonu, gümüş iyonlarının indirgenmesinden sorumludur (92). Nükleolin'in, amplifiye edilen çekirdekçik ve nükleoplazma arasında bir set oluşturarak bu iki bölgeyi birbirinden ayırdığı ileri sürülmektedir (97).

2.4.1. NOR proteinleri (AgNOR proteinleri)

İnterfaz boyunca çekirdekçikte bulunan ve metafaz boyunca NOR'larla birleşmiş olarak kalan NOR proteinleri aktif ribozomal genlerin işaretleridir (88, 92). NOR proteinleri, asidik şartlar altında gümüşü indirgeme yetenekleri ve gümüş için spesifik affinitelerinin var olması ile ayırt edilirler (88).

AgNOR proteinleri, elektron mikroskobu ile özellikle çekirdekçiğin ipliksi merkez ve yoğun ipliksi bölgelerinde bulunurlar ve interfaz çekirdeğinde granüllü bölgeden dışarı atılırlar ve farklı miktarlardaki AgNOR proteinleri ince bir filament ile oluşan granüllere bağlanırlar (88).

Ayrıca, AgNOR boyama tekniği tümörlerin erken tanısında, kısmi olarak malign tümörlerden benign tümörleri ayırt etmede ve benign tümörün şiddetini değerlendirmede de kullanılır. AgNOR boyama prosedürünün spesifikliği ve kolaylığı bu tekniğin, insan patolojisinde, hücre biyolojisinde geniş bir kullanım alanı sağlanmaktadır (92).



2. YÖNTEMLER

3.1.GEREÇLER

Demirbaş malzemeler

- 1.Etöv (Sanyo, MCD17A)
- 2.Santrifüj (Juan, B4-11175600)
- 3.Su banyosu (Memmert)
- 4.Vortex (MS1 Minishake 1KA)
- 5.Mikroskop (Nikon Eclipse, E800)
- 6.Fotomikroskop (Olympus, BX50 F4)
- 7.Hassas terazi (Shimadzu, Libror AEG-220)
- 8.Derin dondurucu (Sanyo – MDF-U6086S)
- 9.Buzdolabı (Profilo)
- 10.Zaman ayarlayıcı (Superior W-Germany)
- 11.pH metre (Ph 320/set-1, Nr.100740)
- 12.Hot- plate (Janke & Kunkel Gmbh &Co.kg)
13. Tri distile su cihazı (Elix)
- 14.Mikroskop ataşmanlı video kamera (Sony CCD- IRIS siyah-beyaz video kamera SSC-M370CE)
- 15.Bilgisayar (Escort pentium II)
- 16.Bilgisayar yazıcısı (Epson stylus Color 640)
- 17.Kamera adaptör (Sony YS-W130P)

Sarf Malzemeler

- 1.Hams F10 Medium-Sıvı (Biological Industries, 01-090-1B)
- 2.Periferel Blood Medium-Sıvı (Sigma)
- 3.Fetal Calf Serum (=FCS, Biological Industries, 04-001-1B)
- 4.L-Glutamin (Seromed, K 0282)
- 5.Heparin (Nevparin , Mustafa Nevzat İlaç Sanayi)
- 6.Antibiyotik (Penisilin-Streptomisin, Biological Industries, 03-031-1C)
- 7.Kolşisin (Sigma, D1925)
- 8.Giemsal (Merck, 540040512)
- 9.Gurr Buffer
- 10.KH₂PO₄ (Merck, 9021622)
- 11.Na₂HPO₄.H₂O (Merck, K1690176)
- 12.Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
- 13.Metanol (Merck, 502K 5275408)
- 14.Lamel yapıştırıcı (Entellan, Merck, 640171987)
- 15.İmmersion yağı (İmmersiol, Merck, 09403569)
- 16.Alkol (%96'lık saf alkol, tekel)
- 17.Ksilol (Merck, 207K 03755385)
- 18.NaCl (Merck, 2448989)
- 19.Na₃-sitrata. 2H₂O (Merck, K22028732 527)
- 19.KCl (Merck, 340TA611835)
- 20.AgNO₃ (Carlo Erba)
- 21.Etanol (Merck, K21078586)
- 22.Jelatin (Merck, 5214525)
- 23.Formik asit (Merck)
- 24.Distile su
- 25.Çeşitli cam laboratuvar malzemeleri
- 26.Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü (Greiner, polystrene)
- 27.Filtre kağıdı (Whatman Filter Papers 25mm)
- 28.Enjektör (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml, 50ml, Sterijen)
- 29.Pastör pipeti
- 30.Lam (Objekttrager)

31.Lamel (Menzel-Glasser, 24x32mm)

32.Alüminyum Folyo

33.Fotoğraf filmi (Ilford 50 ASA siyah-beyaz, Fuji100 ASA renkli)

34.Fotoğraf kartı (Ilford siyah-beyaz, Fuji Color Paper renkli)

3.2.YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ile Nöroloji Anabilim Dalı'nda beraber yürütüldü.

Çalışma, 20 Alzheimer'lı hasta ve 10 genç ve 10 yaşlı sağlıklı kontrol üzerinde yapılmıştır. Genç kontrol grubunun yaş aralığı 18-25, yaşlı kontrol grubunun yaş aralığı ise çalışmamıza katılan Alzheimer hastalarıyla paralel yaşlarda tutulmuştur.

Hasta ve kontrol grupları

Çalışmamıza katılan Alzheimer hastalarının kesin tanısı için Nöroloji Anabilim Dalı polikliniğine başvuran hastalara mini mental test uygulanmıştır (Mini- Mental State Exam: MMSE). Mini -Mental Test 1975 yılında Folstein ve arkadaşları tarafından hastaların kognitif durumlarının derecelendirilmesi amacıyla oluşturulmuştur (98). Bu test sonrasında verilen puanlar değerlendirilerek hastaların Kognitif Bozulma sınırları bulunmuştur. Bu sınırlar şöyledir: 24-30 Normal sınır, 20-23 Hafif kognitif bozukluk, 10-19 Orta kognitif bozukluk, 0-9 Ağır kognitif bozukluk (7). Ayrıca yaşlı kontrol grubundaki bireylere de Mini Mental test yapılmış kognitif bozuklukları normal bulunmuştur.

Çalışmamıza katılan alzheimer hastaları'nın ve kontrol gruplarının yaşları, cinsiyetleri, sigara ve alkol kullanıp kullanmadığı, Alzheimer'lı aile öyküsü, hastanın başka bir rahatsızlığı olup olmadığı ve bu rahatsızlıktan dolayı ilaç kullanıp kullanmadığı, dikkate alınmıştır.

Periferik kan örnekleri alınan Alzheimer hastalarının en az 6 ay-3 yıl hastalığa sahip olması gerektiğine dikkat edilmiştir.

3.2.1.Periferik Kandan Lenfosit Kültürü

Kullanılan kültür ortamı ve solüsyonlar:

Malzeme	Miktarı
Ham's F10	100 ml
Fetal Calf Serum (FCS)	33 ml
L-Glutamin	2ml
Fitohemaglutinin (PHA)	2.5 ml
Penisilin-Streptomisin	1 ml
Heparin	1 ml

Yukardaki malzemeler steril ortamda birbirine eklenerek kültür ortamı hazırlanmış ve 5'er ml olacak şekilde steril kültür tüplerine ayrılmıştır. Ayrıca hazır kültür ortamı (Periferal Blood Medium), steril şartlarda 6'şar ml olacak şekilde steril kültür tüplerine bölünmüştür. Sonra kültür tüpleri -20 °C'de saklanmıştır.

Hipotonik solüsyonu:

0.075 M KCl

1.398 g KCl tartılarak üzeri distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Fiksatif solüsyonu:

3:1 oranında metanol: asetik asit karışımı: Kullanımdan en fazla yarım saat önce hazırlanarak -8 °C'ye kaldırılmış ve soğuk olarak kullanılmıştır.

İbrainov solüsyonu:

5 ml asetik asit, 3 ml metanol, üzerine 92 ml distile su konularak hazırlanır. Oda ısısında muhafaza edilir ve en fazla bir gün içinde kullanılır.

Kültür İşleminin Uygulanması:

Çalışmamızda T-lenfositlerin üremesi için uygulanan kültür işleminde aşağıdaki basamaklar sırasıyla takip edilmiştir.

1. Steril şartlarda 1\10 –1\20 oranında heparinize edilmiş yaklaşık 5ml periferik kan enjektöre alınıp, oda sıcaklığında yaklaşık 3-4 saat bekletilmiştir..
2. Steril ortamda her iki (5ml ve 6ml) kültür ortamına, enjektör içindeki heparinize kanın yaklaşık 0.3-0.5 ml'si dışarı atıldıktan sonra 8'er damla (~ 0.3 ml) ekim yapılarak kültür tüpleri inkübasyon için 37 °C'lik etüve konulmuştur.
3. Tüplere 70'inci saatte 1'er damla final konsantrasyonu 0.1 µg/ml olacak şekilde kolşisin eklenerek iyice karışincaya kadar çalkalanıp etüve yeniden konulmuştur.
4. 71'inci saatte tüpler etüvden çıkartılarak 4 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir..
5. Süpernatantı atılarak üzerine 37 °C'deki hipotonik çözeltiden 7 ml ilave edilerek 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak pellet pipetle karıştırılmıştır.
7. Pellet üzerine oda sıcaklığındaki ibrainov solusyonundan 5ml hızlı bir şekilde konmuş, ve hemen sonra 4 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
8. Süpernatant atılarak pellet karıştırılıp üzerine 5 ml metanol eklenip, 4 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

9. Süpernatant atılarak, pellet üzerine 5 ml soğuk fiksatif eklenmiş en az 30 dakika +4°C de bekletilmiştir.

10. 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra dipte kalan hücre süspansiyonundan preparatların hazırlanmasına geçilmiştir.

11. Preparatlar, -8 °C sıcaklıkta % 70'lik etanol içinde saklanan lamlar gazlı bezle silindikten sonra, üzerine 7-8 damla hücre süspansiyonundan lama damlatılması ve havada kurutulmasıyla hazırlanmıştır.

3.2.2. NOR Boyama

Kullanılan Çözeltiler:

% 50'lik AgNO₃ çözeltisi (Ağırlık / ağırlık olarak, ~%33'lük):

1g AgNO₃'ın 2 ml bidistile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.
Çözelti +4 °C'de ve karanlıkta saklanmıştır.

%1 'lik Formik asit çözeltisi:

1ml formik asitin üzeri distile su ile 100ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

% 2'lik Jelatinli Formik asit çözeltisi:

Oda sıcaklığında 98 ml %1'lik Formik asit içinde 2 g jelatinin çözülmesiyle, % 2'lik jelatin elde edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kağıdından süzölmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Gümüş Boyama Solüsyonu:

% 50 'lik AgNO₃'den 1ml (iki hacim)
% 2'lik Jelatinli Formik asit'den 0.5ml (bir hacim) alınarak,
ışık görmeyen etrafi alüminyum folyo ile kaplanmış bir tüp içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır. Gümüş boyama solüsyonu her kullanımda yeniden hazırlanmıştır.

% 2'lik Giemsa Çözeltisi:

KH₂PO₄ çözeltisinden 49ml, Na₂HPO₄ çözeltisinden 51ml alınarak elde edilen 100 ml'lik çözeltinin 2 ml'si atılıp, üzerine 2ml Giemsa eklenip, kurutma kağıdıyla süzülerek hazırlanmıştır.

2 x SSC (sodyum-salin sitrat) tamponu (pH=7.0) :

NaCl'den 17.53g,
Na₃-sitrat 2H₂O'den 8.82 g,
Tartılıp 1000 ml distile suda çözülmüştür.

Sorensan Tamponu (pH=6.8):

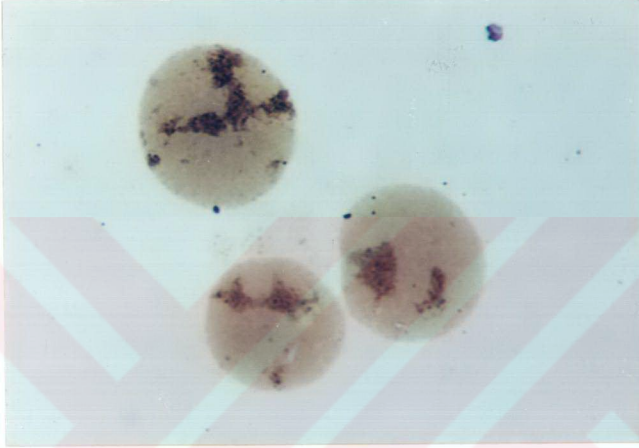
Na₂HPO₄'den 11.88 g,
KH₂PO₄'den 9.08 g,
Tartılıp 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

NOR Boyama İşlemi

Kültür işlemi sonucunda elde edilen preparatlar, ilk önce 1-2 dakika distile suda bekletilip üzerindeki asetik asit dilüe edilmiş ve daha sonra havada kurutulmuştur. Havada kurutulan preparatlar daha sonra içinde distile su ile ıslatılmış kurutma kağıdının bulunduğu petri kabının içerisine yerleştirilmiştir. Preparatların üzerine pastör pipeti ile % 50'lik AgNO₃ ve % 2'lik Jelatin / Formik asit karışımından oluşan gümüş boyama solusyonundan 3-4 damla damlatılmış ve üzerleri lamelle kapatılmıştır. Sonra hızlı bir şekilde petri kabının kapağı kapatılarak, etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılıp 37 °C'deki etüvde 15 dakika bekletilmiştir. 15 dakikanın sonunda etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller düşünceye kadar distile su

ile yıkanmış preparatların bir veya iki tanesi % 2'lik giemsa solusyonunda 10 saniye süreyle boyanmış bir kısmı da G-Bantlanma için ayrılmıştır (6).

Sonuçta, tüm preparat üzerindeki bölgelerde hedeflediğimiz kalitede homojen NOR boyamalar elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. NOR boyama uygulanmış lenfosit çekirdeği.

G-Bantlama İşlemi:

Çalışmamızda uygulanan NOR boyama işleminden sonra elde edilen preparatların metafaz alanlarının gümüşle boyanmış akrosentrik kromozomlarının ayır edilebilmesi için öncelikle bantlama işlemi standardize edilmiştir. Standardizasyon işlemi, bir takım ön denemeler yapıp elde edilen sonuçlar değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir.

I.Deneme

-80 derecedeki derin dondurucuda saklanan lenfosit kültür rezervlerinden preparatlar hazırlandı. Preparatlar, 37 derecedeki kuru etüvde 3 gün bekletilerek eskitildi.

Eskitilmiş preparatlar bantlama işlemlerine göre değişen sürelerle göre tripsin solüsyonunda tutulmuşlardır. Preparatlar tripsin solüsyonundan çıkarılır çıkarılmaz 2-3 sn söransan tamponunda (0.06 M, KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4) çalkalanmışlardır. Söransan tamponundan çıkarılan preparatların bir kaçı % 5'lik Giemsa boyasında, 6 dakika boyandıktan sonra, hava da kurutulup mikroskopta bantlanmış metafaz alanları tespit edilmiştir. D ve G grubu kromozomlara bakılmış kordinatları not edilmiştir. Aynı preparat üzerine daha sonra NOR boyama yapılmıştır.

Sonuçta önceden kordinatları alınmış metafaz alanlarındaki D ve G grubu kromozomlarının bantlama işlemi yapılmamış preparatlardaki akrosentrik kromozomlara göre çok daha az NOR aldığı gözlenmiştir.

Preparatların bir kaçı da bantlandıktan sonra Giemsa ile boyanmadan NOR boyama yapıldı ve daha sonra %5 lik Giemsa'da 5 sn. boyandı, preparatlar distile sudan geçirilip kuruduktan sonra mikroskopta incelendi. Preparattaki kromozomların çok kötü ve NOR almadığı ve ayrıca kromozomların çok şişmiş oldukları gözlenmiştir.

II. Deneme

Rutin periferik kan kültürü sonucunda hazırlanan ve eskitilen preparatlara NOR boyama tekniği uygulanmıştır. Mikroskopta NOR almış metafaz alanları tespit edilmiştir. Preparatlarda NOR boyası % 4 'lik Potasyum dikromat : % 10 'lık HCl : distile su (10:10:5) karışımıyla hazırlanan çözeltiden geçirilerek uzaklaştırılmıştır (95). NOR boyası uzaklaştırılan preparatlar tripsinle bantlandıktan sonra, Giemsa ile boyanmıştır. Ardından önceden koordinatları alınmış olan metafazlar incelendiğinde kromozomlarda herhangi bir bantlamanın olmadığı gözlenmiştir.

NOR boyası alınmayan preparatlar, tripsinle bantlama yapılmış daha sonra Giemsa ile boyanmıştır. Bu işlemin sonunda da preparatlardaki kromozomların bant almadığı gözlenmiştir.

III.Deneme

Daha önce NOR boyama tekniği ile boyanan preparatlardan 2 sinin NOR boyası (10:10:5; % 4 Potasyum dikromat: %10'luk HCl: distile sudan oluşan karışım ile) alınmıştır. Preparatın 1'i distile suda, diğeri fiksatifte (3 birim metanol 1 birim asetik asit) 10 dakika bekletildi. Fiksatiften çıkarılan preparat distile suda çalkalandıktan sonra her iki preparat tripsinde 10 dk. bekletilmiştir. Daha sonra preparatlar % 5 lik Giemsa'da 10 dk. boyandıktan sonra distile sudan geçirilerek kurutuldu ve mikroskopta incelendi (95). Her iki preparatta çok kirliydi. Sonuç olarak, kromozomlarda NOR boyanması ve G-bantlanması gözlenmemiştir ve preparatlar arasında herhangi bir fark bulunamamıştır.

IV.Deneme

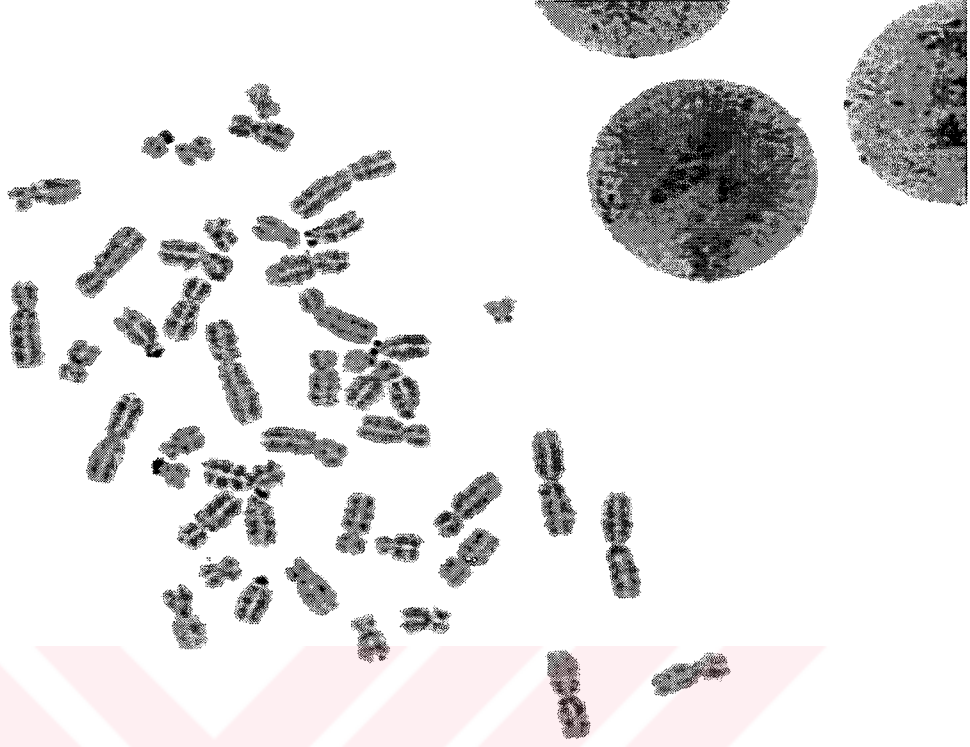
Daha önceki denemelerde hem NOR boyalı hem de bantlı metafaz alanları elde edemeyince tripsin bantlama yöntemi yerine ASG (Asetik-Saline-Giemsa) yöntemi kullanılmıştır (99).

Bir şale içerisinde 2 x SSC (0,03 M tri sodyum sitrat ve 0.3 M NaCl) tamponunun ısısı 60 ° C ye getirildikten sonra, rutin periferik kan kültürü sonucu hazırlanan ve eskitilen preparatların bir kısmı bu tampon içerisinde 60 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra preparatlar distile sudan geçirilerek 2'lik Giemsa boyasında 60 (ve 90, 120) dk. boyandı. Boyanma zamanına paralel olarak kromozomların daha iyi boya aldığı görülmüştür. Ancak 60 dk. boyamanın az olduğu 120 dk. boyamada ise açık bantların da boyandığı ve bantlar arasında kontrastlığın azaldığı gözlenmiştir.

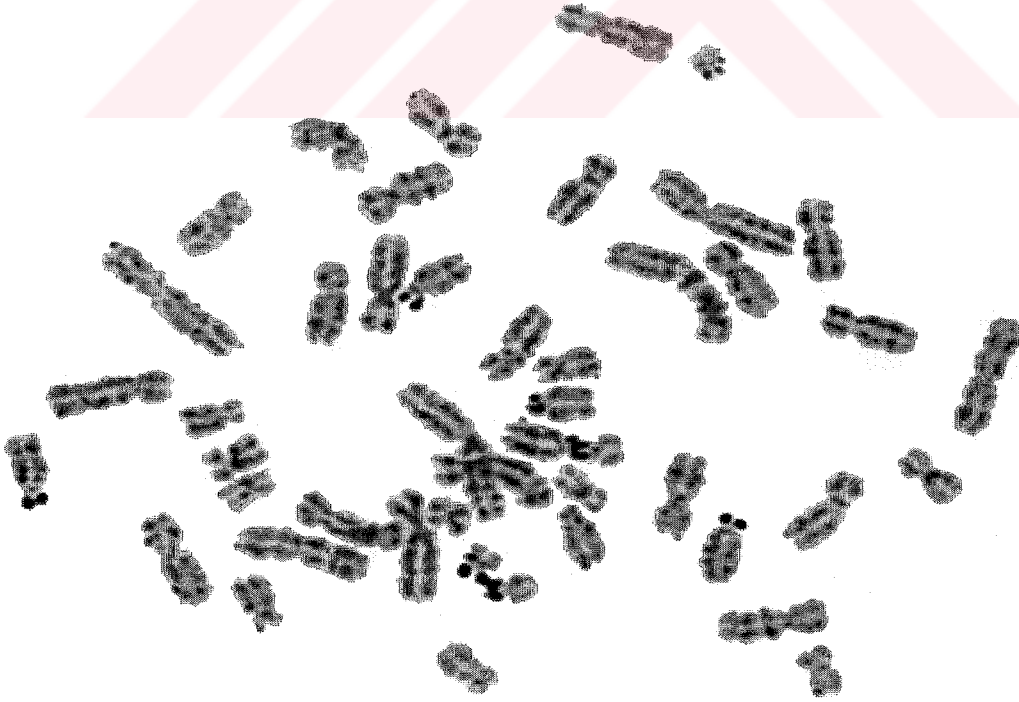
Daha önce de hazırlanan preparatların bir kısmında da inkübasyon aşaması değiştirildi. Preparatların boyanma zamanı (90 dk.) sabit tutularak, 2 x SSC tamponu etkileşim zamanı 60 dk'dan 90 dk'ya çıkarıldı. Bu denemenin sonucunda kromozomlarda aşırı etkileşim nedeni ile bantlar gözlenmedi.

Sonuç olarak; NOR boyanması yapılmış preparatlar, 2 x SSC tamponunda 60° C' de 60 dk inkübe edilerek distile sudan geçirildi ve % 2'lik Giemsa ile 90 dk. boyandı ve kaliteli G- bantlar elde edildi (şekil 3.2.).

a)



b)



Şekil 3.2. Alzheimer hastasına (a) ve yaşlı kontrole (b) ait ASG ile bantlanmış ve AgNO_3 ile boyanmış akrosentrik kromozomlar ve satellit assosiasyonu.

3.2.3. İnterfaz Çekirdeklerindeki NOR Alanlarının Bilgisayar Programı ile Ölçülmesi

Hasta ve kontrollere ait interfaz çekirdeklerindeki NOR alanları, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda daha önceden kondanse kromatin ve NOR alanı ölçüm çalışmalarında kullanılmış olan bilgisayar programı yardımıyla ölçülmüştür (5, 6)

Görüntülerin Elde Edilmesi:

Analiz işleminde kullanılacak olan lenfosit çekirdeklerinin görüntüleri, ışık mikroskobundan (100x10 büyütme) bilgisayar ortamına bir video kamera (Sony SSC-M370CE) aracılığı ile aktarılmıştır. Kameradan alınan görüntüler, analizi yapılmak üzere bitmap türü resim formatında bilgisayarda saklanmıştır.

Görüntülerin Standardizasyonu:

Görüntülerin analizi için Delphi dilinde yazılan bir bilgisayar programı kullanılmıştır. Analiz işlemine başlamadan önce elde edilen resimlerdeki ışık yoğunluğunun birbirlerinden farklı olduğu göz önünde bulundurularak görüntü yoğunluğunun standardizasyonu için eşitlik 3.1 uygun bir algoritma ile resim üzerindeki bütün noktalara uygulanmıştır.

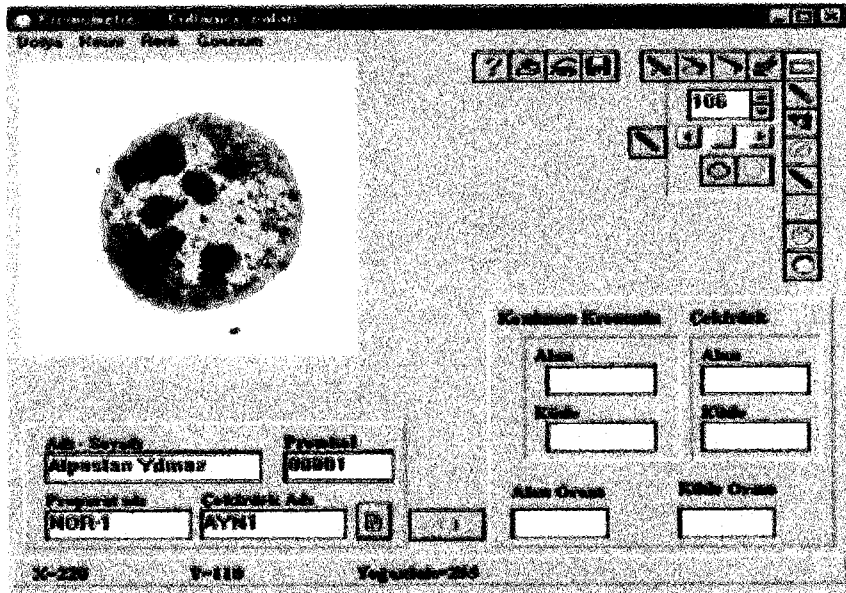
$$P_s = [(P_o - P_{min}) / (P_{max} - P_{min})] \times 255 \quad 3.1$$

Eşitlikte P_s noktanın standardize edilmiş değerini, P_o noktanın asıl değerini, P_{max} resim üzerinde en yüksek parlaklık değerine sahip noktanın değerini, P_{min} resim üzerinde en düşük parlaklık değerine sahip noktanın değerini göstermektedir.

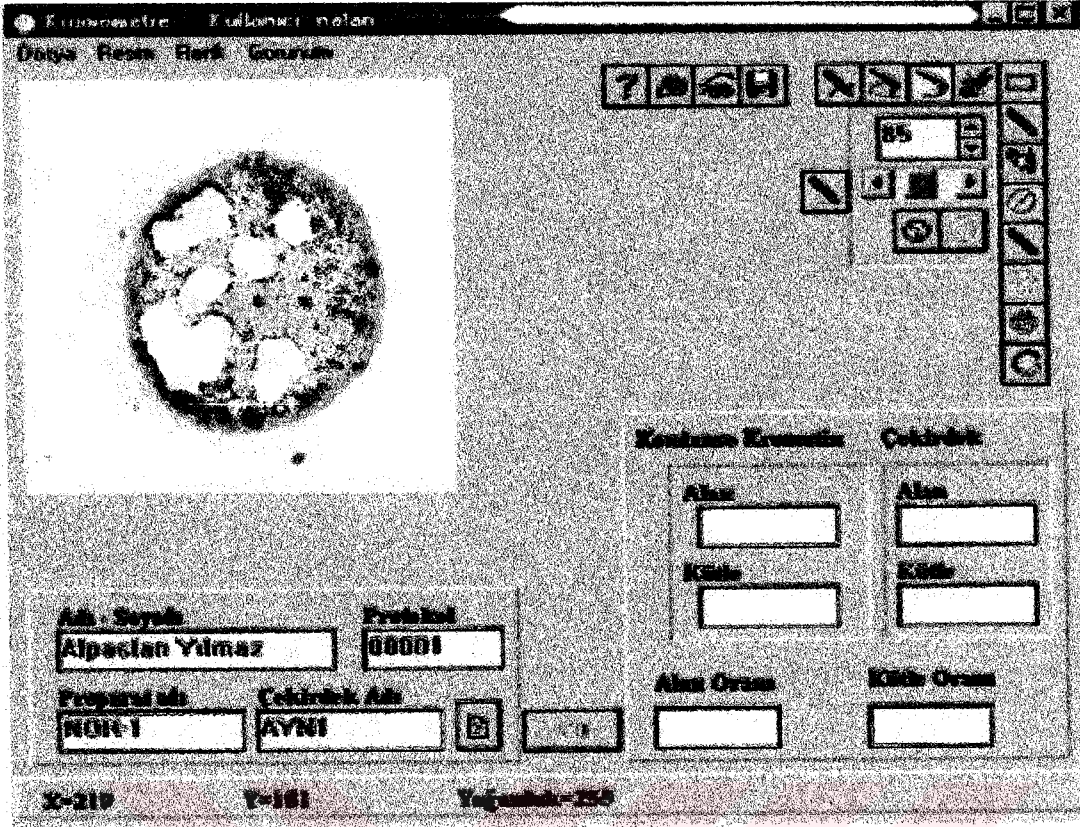
Görüntülerin Analizi:

Standardize edilen görüntüler aynı programla analiz edildi (Şekil 3.3). Analiz programı yardımı ile siyah-beyaz görüntü üzerinde ton ayarı yapıldıktan sonra NOR alanı içeren bölgelerin seçimi için bir eşik değeri girilerek bu eşik şiddetine uygun bir şekilde çevresindeki noktalardan daha yoğun olarak ayrılan noktaların belirlenmesi sağlandı. Bu bölge bilgisayarın faresi kullanılarak kırmızıya boyandı. Bu yolla seçilen bölgeler dışında NOR alanı olduğu düşünülen bölgeler ise programda bulunan çeşitli araçlar kullanılarak seçilen bölgeye dahil edildi ve bu bölgelerde kırmızıya boyandı (Şekil 3.4) veya fazla seçilmiş olan bölgelerde yine programdaki araçlar yardımıyla seçim dışında bırakıldı. Program yardımıyla kırmızıya boyanan bölge yeşile boyandı ve NOR alan değeri bulundu (Şekil 3.5). Sonra çekirdeğin sınırları bilgisayarın faresi yardımıyla çizilerek belirlendi. Programda sınırlanan yer boya tuşuna basılarak kırmızıya boyandı ve programın çekirdeği görmesi sağlandı. Programdaki çekirdek tuşuna basarak NOR alanının toplam çekirdek yüzey alanına (NOR alanı bölgesinin de dahil olduğu) yüzde oranı hesaplandı (Şekil 3.6).

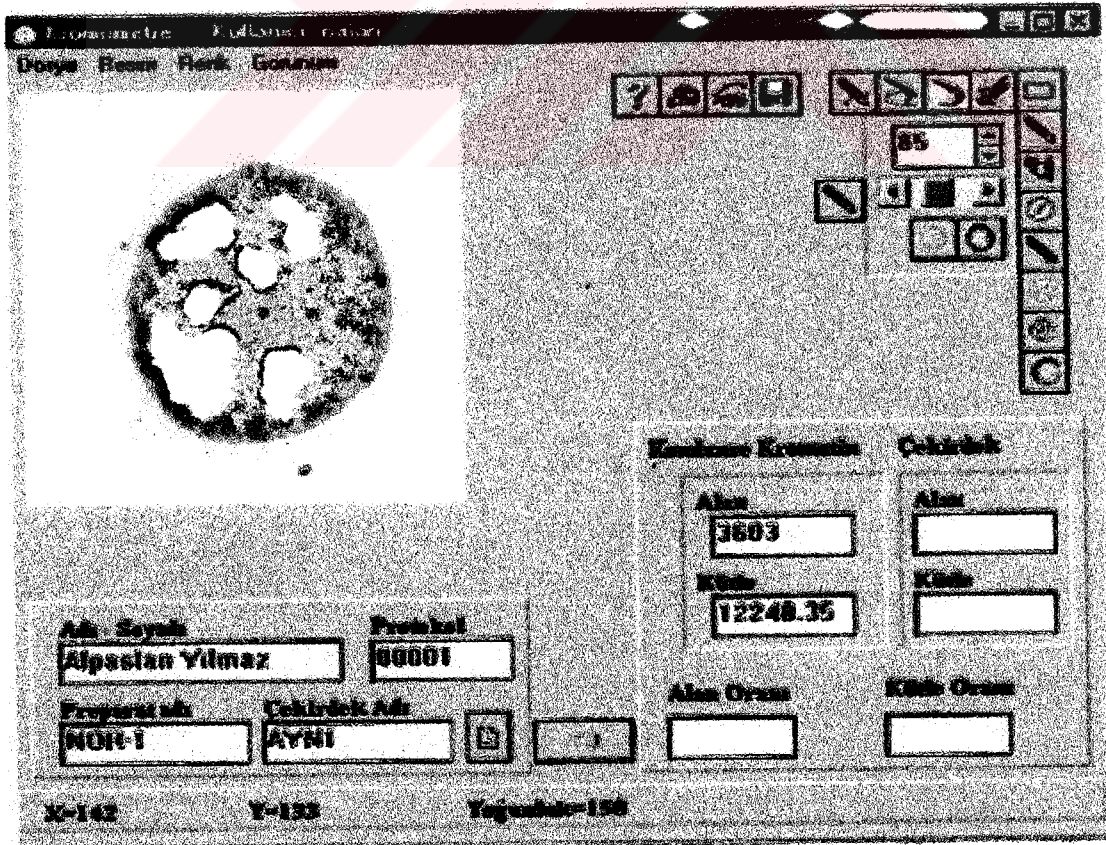
Her bir hasta ve kontrol için 50 interfaz çekirdeği değerlendirildi. Değerlendirme için büyüklüğü 17 μm den 26 μm 'ye kadar olan düzgün çekirdekler ölçülmüştür.



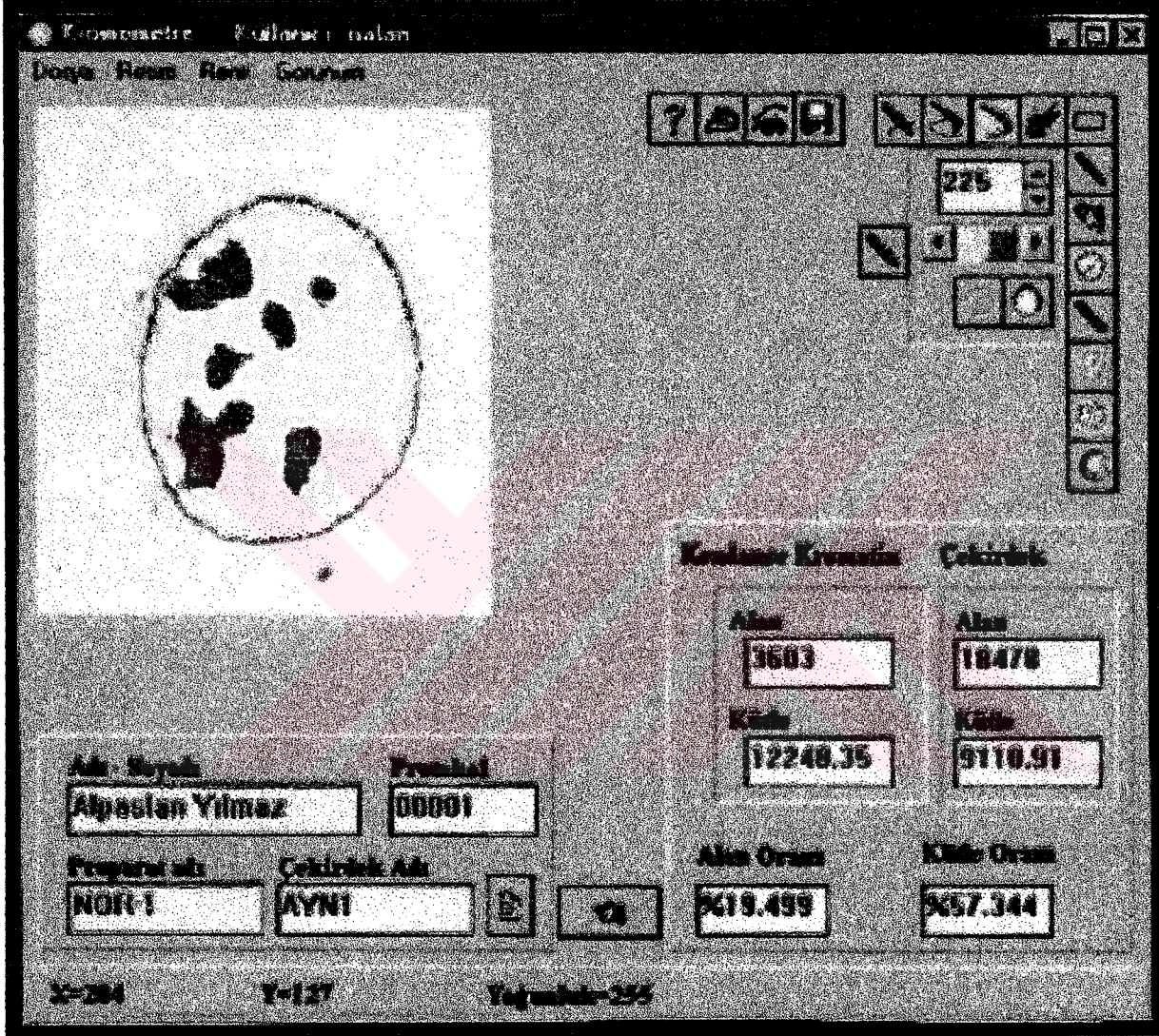
Şekil 3.3 : Analiz işleminde kullanılan program ve analiz edilecek olan lenfosit çekirdeği.



Şekil 3.4 : NOR Bölgeleri Belirlenmiş bir lenfosit Çekirdeği.



Şekil 3.5 : NOR bölgeleri hesaplanmış lenfosit çekirdeği.



Şekil 3.6 : Çekirdek ve NOR alan bölgeleri belirlenmiş bir lenfosit çekirdeği.

4. BULGULAR

Çalışmamıza 20 Alzheimer hastası (15 kadın, 5 erkek), 10 sağlıklı genç kontrol (6 kadın, 4 erkek) ve 10 sağlıklı yaşlı kontrol (5 kadın, 5 erkek) grubu katılmıştır. Hasta gruplarının yaşları 42 ile 84 yılları arasında (yaş ortalaması: 68.25 ± 11.23), genç kontrol grubunun yaşları 18 ile 25 yılları arasında (yaş ortalaması: 22.10 ± 2.51), ve yaşlı kontrol grubunun yaşları 55 ile 87 yılları arasında (yaş ortalaması: 66.90 ± 9.77) değişmektedir. Bu grublardaki kişilerin her birinin 50 interfaz çekirdeğinde NOR alanlarının bilgisayarlı ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümler içerisinde NOR bölgeleri alanı, toplam çekirdek yüzey alanları ile karşılaştırılarak NOR bölgeleri alan oranları bulunmuştur. Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarının NOR alan oranlarının ölçümlerine ait ortalama değerler Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Hasta ve kontrollere ait NOR alanı değerleri Kruskal-Wallis testi uygulanarak karşılaştırıldığında $P = 0.054$ değeri bulunmuştur. Bu değer 0.05'e çok yakın olduğundan, gruplar arasında Mann-Withney U testi yapılmıştır. Buna göre hasta ve yaşlı kontroller arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P = 0.035$).

Çalışmamızda Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarının, metafaz alanlarında akrosentrik kromozomlardaki Ag+ NOR'ların büyüklüklerine göre dağılımı Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Tüm grublardaki her bir kişi için 20 metafaz alanı değerlendirilmiştir. Akrosentrik kromozomların Ag+ segmentlerinin büyüklükleri aşağıdaki kriterlere göre sınıflandırılmıştır (1, 2).

0 = Gümüş boyası olmayan

1 = Az gümüş boyanan (Kromatid genişliğinden daha az)

2 = İyi gümüş boyanan (Kromatid genişliğine eşit ve daha büyük)

Akrosentrik kromozomların Ag+ büyüklüklerine ait ortalama değerler Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarına ait değerler Kruskal-Wallis istatistik testi ile karşılaştırıldığında metafaz alanlarındaki 22 (1) nolu akrosentrik kromozomun Ag+ NOR alması anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($P < 0.05$). Mann-Withney U testine göre de hasta ve genç kontrol grupları arasında 22 (1).

kromozom için Ag+ 'lik açısından fark bulunmuştur ($P = 0.018$). Diğer akrosentrik kromozomların Ag+ NOR büyüklüklerinin değerleri açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Çalışmamızda hasta, genç kontrol ve yaşlı kontrol gruplarının metafaz alanlarında AgNO₃ ile boyanan total kromozomlar ve 21. kromozomlar sayılmıştır. Ayrıca satellit assosiasyonu (SA) yapanlar belirtilerek onlar da sayılıp her bir hasta için toplu değerler Tablo 4.4 'de verilmiştir. Her bir kişi için 20 metafaz alanı değerlendirilmiştir. Hasta, genç kontrol ve yaşlı kontrol grupları arasında 21. kromozomun ve total kromozomların AgNO₃ ile boyanmaları ve assosiasyon sıklıkları açısından ortalama ve standart sapmaları Tablo 4.5. 'de gösterilmiştir. Kruskal-Wallis istatistiksel testi uygulanarak yapılan karşılaştırma sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$). Ancak, SA'daki total kromozom sayısı açısından gruplar karşılaştırıldığında $P = 0.062$ değeri bulunmuştur. Bu değer 0.05 'e yakın olduğu için, gruplar arasında Mann-Withney U testi yapılmıştır. Bu sonuca göre, hasta ile yaşlı kontrol arasında ($P = 0.05$) ve hasta ile genç kontrol arasında ($P = 0.061$) anlamlı farklılık bulunmuştur.

Ag+ NOR'lu akrosentrik kromozomların metafaz başına sayıları, hasta, genç ve yaşlı kontrol grupları arasında Kruskal-Wallis istatistik testi uygulanarak karşılaştırıldığında, akrosentrik kromozomların 5 NOR almaları açısından P değeri 0.05'e yakın olduğu için ($P = 0.065$), gruplar arasında Mann-Withney U testi yapılmıştır. Bu test sonucuna göre de hasta ile genç kontrol ($P = 0.024$), genç kontrol ile yaşlı kontrol arasındaki ($P = 0.030$) farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Tablo 4.6).

AH hastaları içerisinde, dört hastanın ailelerinde AH olduğu görülmüştür (Tablo 4.1). NOR alan oranları açısından AH aile öyküsü olanlar (14.62 ± 2.15) ve olmayanlar (13.61 ± 2.17) Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur ($P > 0.05$). Akrosentrik kromozomlardaki Ag+ NOR'ların büyüklük dereceleri de, aile öyküsü olanlar ve olmayanlar arasında Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. O dereceli 21. kromozom sayısının AH aile öyküsü olanlarda (3.00 ± 4.00) olmayanlara göre (9.69 ± 6.71) azaldığı ($P = 0.058$), diğer taraftan 2 dereceli 21. kromozom sayısının da AH aile öyküsü olanlarda (35.25 ± 3.78) olmayanlara göre (29.00 ± 7.03) arttığı ($P = 0.072$) söylenebilir. Diğer kromozomlardaki Ag+ NOR'ların büyüklük dereceleri açısından AH aile öyküsü

olanlarla olmayanlar arasında fark bulunamamıştır ($P > 0.05$). Ag+ total kromozom sayısı, SA'lu 21. kromozom sayısı, SA'lu metafaz sayısı, SA'lu kromozom grup sayısı ve SA'daki total kromozom sayısı açılarından AH aile öyküsü olanlar ve olmayanlar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur ($P > 0.05$). Ancak Ag+ 21. kromozom sayısının AH aile öyküsü olmayanlara (30.31 ± 6.71) göre olanlarda (37.00 ± 4.00) daha fazla olduğu söylenebilir ($P=0.058$).

Tablo 4.1 Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarındaki NOR alanı ortalama değerleri.

Hasta adı	NOR alanı	genç kontrol	NOR Alanı	Yaşlı kontrol	NOR Alanı
S. Z.	14.66±3.47	K.K.	16.82±3.55	K.A.	11.24±4.32
F. Y.	11.16±3.30	H.A.	14.25±4.10	H.İ.	18.88±5.10
F. G.	16.29±4.40	İ.K.	17.57±6.27	M.İ.	14.61±5.01
M. Ç.	18.80±4.50	N:D.	14.84±4.06	A.İ.	16.33±4.55
M. Ö.	12.73±4.57	Ü.U.	18.13±4.33	Z.T.	13.70±4.03
Ş. K.	12.27±3.25	H.Ü.	11.93±2.71	D.Ü.	18.55±4.19
R. G.*	13.41±3.94	N.U.	16.05±4.15	Y.Ü.	16.39±4.21
A. Ç.	12.45±4.24	A.Y.	14.46±3.57	H.Ü.	16.12±3.77
N. A.	15.26±3.79	F.E.	14.92±3.56	A.Ş.	14.68±4.67
H. Ç.	11.91±3.61	A.Y.	13.27±3.48	İ.K.	14.96±3.77
H. İ. Y.	14.35±5.08				
H. S. Ş.	14.50±4.11				
A. Ö.*	17.03±4.51				
H. Y.*	12.31±3.33				
H. S.	14.17±4.61				
Ş. U.	10.37±4.04				
O. K.	13.91±3.99				
F. K.*	15.71±5.47				
A. K.	14.06±3.70				
H. K.	10.91±3.38				
Ortalama±S.S.**	13.81±2.15		15.22±1.93		15.55±2.25

* AH aile öyküsü olan hastalar.

** $P = 0.054$ (Kruskal-Wallis Test)

Tablo 4.2.Hasta ve kontrollerdeki Akrosentrik kromozomların Ag+ NOR büyüklüklerine göre ortalama değerleri

Alzheimer hastası	13.kromozom			14.kromozom			15.kromozom			21.kromozom			22.kromozom		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
S. Z.	10	8	22	8	3	29	25	4	11	8	9	23	3	6	31
F. G.	19	0	21	5	6	29	13	7	20	7	3	30	7	1	32
R. G.	6	0	34	5	0	35	11	1	28	6	0	34	7	0	33
H. S.	7	2	31	3	0	37	4	2	34	12	0	28	10	2	28
A. K.	12	0	28	13	0	27	11	0	29	14	0	26	9	0	31
N. A.	5	3	32	0	4	36	5	0	35	0	1	39	4	2	34
H. K.	8	4	28	11	2	27	24	2	14	1	1	38	3	2	35
M. Ö.	4	0	36	2	3	35	3	1	36	7	1	32	7	2	31
H.İ.Y.	8	3	29	19	0	21	6	2	32	4	0	36	20	0	20
A. Ö.	12	2	26	3	1	36	7	1	32	12	1	27	9	1	30
Ş. K.	7	0	33	8	0	32	14	0	26	3	0	37	5	0	35
M. Ç.	13	3	24	12	3	25	18	1	21	6	0	34	13	3	24
F. K.	5	0	35	4	0	36	8	0	32	1	1	38	2	0	38
O. K.	11	0	29	12	1	27	16	0	24	9	1	30	8	1	31
Ş. U.	9	4	27	9	1	30	3	2	35	3	2	35	3	2	35
H.S.Ş.	1	1	38	7	1	32	2	0	38	13	1	26	10	1	29
A. Ç.	7	1	32	3	2	35	18	0	22	22	3	15	13	0	27
F. Y.	20	3	17	9	6	25	9	1	30	1	4	35	19	1	20
H. Y.	20	1	19	4	0	36	8	3	29	24	0	16	23	1	16
H. Ç.	14	0	26	14	1	25	14	1	25	14	0	26	22	1	17
Yaşlı Kontrol															
H.İ.	6	2	32	6	1	33	9	3	28	14	0	26	13	0	27
A.İ.	13	0	27	8	1	31	12	3	25	5	1	34	8	0	32
H. Ü.	19	0	21	9	0	31	10	0	30	16	1	23	19	1	20
Y. Ü.	13	1	26	15	2	23	21	1	18	4	0	36	7	1	32
D. Ü.	15	2	23	5	1	34	19	1	20	19	0	21	8	0	32
Z. T.	9	1	30	11	1	28	10	2	28	2	1	37	5	0	35
K.A.	9	0	31	13	0	27	10	0	30	14	3	23	12	0	28
İ. K.	9	0	31	1	0	39	10	2	28	8	3	29	19	0	21
M.İ.	2	0	38	14	1	25	8	0	32	2	3	35	2	2	36
A.Ş.	8	1	31	2	0	38	1	2	37	0	0	40	14	1	25
Genç Kontrol															
A.Y.	1	0	39	1	1	38	3	1	36	1	1	38	0	0	40
K.K.	12	3	25	7	1	32	15	1	24	2	0	38	2	0	38
F.E.	4	1	35	5	1	34	10	3	27	2	1	37	3	0	37
H.A.	0	0	40	17	0	23	4	0	36	11	1	28	19	0	21
H.A.	8	1	31	17	0	23	16	1	23	8	2	30	12	0	28
A.Y.	5	0	35	17	1	22	1	0	39	4	1	35	14	0	26
Ü.U.	8	0	32	11	1	28	7	0	33	0	3	37	6	1	33
N.D.	6	1	33	10	3	27	15	2	23	5	1	34	13	1	26
N.U.	14	0	26	8	0	32	13	0	27	1	1	38	3	1	36
İ.K.	8	0	32	10	2	28	9	0	31	3	0	37	9	0	31

Tablo 4.3. Tablo 4.2'deki hasta ve kontrollere ait ortalama ve standart sapma değerleri.

	Alzheimer Hasta (ortalama±S.S.)	Genç kontrol (ortalama±S.S.)	Yaşlı kontrol (ortalama±S.S.)
13.kromozom (0)	9.90±5.30	6.60±4.40	10.30±4.83
13.kromozom (1)	1.75±2.07	0.60±0.97	0.70±0.82
13.kromozom (2)	28.35±5.74	32.80±4.85	29.00±4.90
14.kromozom (0)	7.55±4.85	10.30±5.44	8.40±4.90
14.kromozom (1)	1.70±1.92	1.00±0.94	0.70±0.68
14.kromozom (2)	30.75±4.87	28.70±5.27	30.90±5.28
15.kromozom (0)	10.95±6.76	9.30±5.44	11.00±5.60
15.kromozom (1)	1.40±1.73	0.80±1.03	1.40±1.17
15.kromozom (2)	27.65±7.30	29.90±5.92	27.60±5.54
21.kromozom (0)	8.35±6.75	3.70±3.47	8.40±6.80
21.kromozom (1)	1.40±2.14	1.10±0.88	1.20±1.32
21.kromozom (2)	30.25±6.92	35.20±3.55	30.40±6.84
22.kromozom (0)	9.85±6.56	8.10±6.26	10.70±5.70
22.kromozom (1)*	1.30±1.42	0.30±0.48	0.50±0.71
22.kromozom (2)	28.85±6.33	31.60±6.24	28.80±5.55

* P=0.031 (Kruskal-Wallis Test)

Tablo 4.4. Hasta ve kontrol grublarındaki Ag+ kromozom sayıları, metafaz alanları ve satellit assosiasyonu yapan kromozomların durumlarını gösteren değerler.

	Ag + kromozom sayısı		Metafaz başına Ag+ kromozom sayısı							SA (satellit assosiasyonu)			
	21.krm	Total	4	5	6	7	8	9	10	SA'lu 21.krom sayısı	SA' lu metafaz sayısı	SA yapan kromozom grup sayısı	SA'daki total kromozom sayısı
S.Z.	32	146	-	-	3	9	7	1	-	5	14	17	39
F.G.	33	149	-	2	3	5	5	4	1	7	13	19	39
R.G.	34	165	-	-	-	7	4	6	3	14	16	22	54
H.S.	28	164	-	-	3	2	6	6	3	8	13	20	43
A.K.	26	141	-	2	6	3	7	2	-	2	9	12	27
N.A.	40	186	-	-	-	1	2	7	10	13	14	24	58
H.K.	39	153	-	1	2	2	13	2	-	14	15	21	47
M.Ö.	33	177	-	1	1	2	1	6	9	12	18	22	55
H.İ.Y.	36	143	-	3	3	4	8	2	-	10	13	17	38
A.Ö.	28	157	-	-	-	8	7	5	-	10	14	20	46
Ş.K.	37	163	-	-	2	3	6	8	1	17	17	27	60
M.Ç.	34	138	-	2	5	8	3	2	-	8	10	16	35
F.K.	39	180	-	-	-	-	2	16	2	11	16	21	49
O.K.	31	144	-	-	2	1	6	-	-	7	9	10	23
Ş.U.	37	173	-	-	-	1	8	8	3	15	15	21	50
H.S.Ş.	27	167	-	-	-	4	6	9	1	10	14	22	48
A.Ç.	18	137	1	-	6	7	6	-	-	3	13	14	34
F.Y.	39	142	-	-	5	1	4	-	1	18	18	24	58
H.Y.	16	121	-	5	9	6	-	-	-	7	13	13	27
H.Ç.	26	122	-	5	9	5	1	-	-	9	11	12	29
Yaşlı kontrol													
H. İ.	26	152	-	-	3	6	7	4	-	3	10	12	27
A. İ.	35	154	-	-	1	8	7	4	-	5	10	11	24
H. Ü.	24	127	-	1	12	6	1	-	-	2	7	11	23
Y. Ü.	36	140	-	-	4	12	4	-	-	11	11	15	32
D. Ü.	21	134	-	3	3	11	3	-	-	13	12	14	36
Z. T.	38	163	-	1	2	5	1	7	4	12	17	25	60
K. A.	26	142	-	1	4	7	8	-	-	6	11	13	28
İ. K.	32	153	-	-	2	9	4	4	1	6	12	15	31
M. İ.	38	172	-	-	-	2	4	14	-	4	12	13	27
A. Ş.	40	175	-	-	-	1	8	6	5	12	14	23	49
Genç Kontrol													
A. Y.	39	194	-	-	1	-	-	2	17	16	18	33	75
K. K.	38	162	-	-	-	6	7	6	1	13	16	21	43
F. E.	38	176	-	-	2	2	2	6	8	10	16	23	48
H. A.	29	149	-	-	1	10	8	1	-	2	7	9	20
H. A.	32	139	-	-	6	10	3	1	-	8	11	13	30
A.Y.	36	159	-	-	1	3	12	4	-	11	10	18	38
Ü. U.	40	168	-	-	-	3	8	7	2	6	9	11	22
N. D.	35	151	-	-	3	6	8	3	-	6	13	15	30
N. U.	39	161	-	-	1	3	10	6	-	6	8	10	21
İ. K.	37	161	-	-	1	3	10	6	-	6	10	12	26

Tablo 4.5. Tablo 4.4'deki hasta ve kontrollere ait ortalama ve standart sapma değerleri.

	Alzheimer Hasta (ortalama \pm S.S.)	Genç kontrol (ortalama \pm S.S.)	Yaşlı kontrol (ortalama \pm S.S.)
Ag+ 21.kromozom	31.65 \pm 6.75	36.30 \pm 3.47	31.60 \pm 6.80
Ag+ total kromozom	153.40 \pm 18.27	162.00 \pm 15.22	151.20 \pm 15.78
SA'lu 21. kromozom	10.00 \pm 4.34	8.40 \pm 4.12	7.40 \pm 4.17
SA'lu metafaz sayısı	13.75 \pm 2.61	11.80 \pm 3.77	11.60 \pm 2.63
SA 'lu kromozom grup sayısı	18.70 \pm 4.65	16.50 \pm 7.46	15.20 \pm 4.87
SA'daki total kromozom sayısı*	42.95 \pm 11.35	35.30 \pm 16.87	33.70 \pm 11.89

*P= 0.062 (Kruskal-Wallis Test)

Tablo 4. 6. Hasta ve kontrollerdeki Ag+ kromozom sayısına göre metafaz sayılarının ortalama değerleri. (4, 5, 6, 7, 8, 9, ve 10 adet Ag+ kromozomlu metafaz sayısı / kişi sayısı)

Metafaz başına Ag+ kromozom sayısı	Alzheimer hasta	Genç kontrol	Yaşlı kontrol
4	1/20=0.05	0/10=0	0/10=0
5	21/20=1.05	0/10=0	6/10=0.6
6	59/20=2.95	16/10=1.6	31/10=3.1
7	99/20=4.95	46/10=4.6	67/10=6.7
8	102/20=5.1	68/10=6.8	47/10=4.7
9	84/20=4.2	42/10=4.2	39/10=3.9
10	34/20=1.7	28/10=2.8	10/10=1.0

5. TARTIŞMA - SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, araştırma grubunu oluşturan 20 Alzheimer hastası ile kontrol grubunu oluşturan 20 sağlıklı bireyde (10 genç ve 10 yaşlı kişi), ribozomal genlerin aktivitesinin değerlendirilmesi için interfaz alanlarında total çekirdekçik NOR alanları ile metafaz alanlarındaki akrosentrik kromozomların Ag+ NOR'larının dağılımı ve satellit assosiasyon dereceleri karşılaştırılmıştır.

Alzheimer hastaları ile kontrol gruplarının interfaz nükleusunun, NOR bölgeleri alan oranları karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarında NOR alan oranlarının yaşlı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($P=0.035$) bulunmuştur. Şu anki bilgilerimize göre, Alzheimer hastalarında NOR alan karşılaştırılması hiç yapılmamıştır. Alzheimer hastalarında yaşlı kontrollere göre az da olsa NOR alan oranlarında azalma bulmamız, aktif NOR bölgeleri gümüşle boyandığı için Alzheimer hastalarındaki aktif NOR bölgelerinde kısmen de olsa bir azalma olduğunu bize gösterebilir.

Alzheimer hastaları ile kontrol gruplarının metafaz alanları, akrosentrik kromozomların Ag+ NOR'larının segment büyüklüklerine ve sıklıklarına göre karşılaştırıldığında, Mann-Withney U testine göre Alzheimer hastalarının 22. kromozomunun Ag+ NOR 1 segment derecesi açısından genç kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ($P=0.018$) bulunmuştur. Payão ve arkadaşları, Alzheimer hastalarında sadece kromozom 21'in Ag+ NOR'larının segment büyüklüklerini karşılaştırmışlar ve genç kontrollere göre 2 segment derecesinin daha fazla olduğunu bulmuşlardır (1). Biz ise bu çalışmada tüm akrosentrik kromozomların Ag+ NOR

segment büyüklüklerini karşılaştırdık ve 22. kromozomun Ag+ NOR 1 segment derecesinde genç kontrollere göre arttığını bulduk. Akrosentrik kromozomların Ag+ NOR'larının segment büyüklük derecelerine göre karşılaştırma yapılması, bu iki çalışmadaki AH hastaları için tam karşılaştırmayı göstermeyebilir. Çünkü, akrosentrik kromozomların Ag+ segmentlerinin büyüklüklerinin tanımlanma kriterleri her iki çalışmada aynı olsa da, kullanılan NOR boyama yöntemleri ve kromozom bantlama yöntemleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bundan dolayı akrosentrik kromozomlardaki Ag+ NOR'ların segment büyüklük dereceleri açısından heriki çalışmada farklı sonuçlar bulunmuş olabilir (1).

Çalışmamızda hasta, genç kontrol ve yaşlı kontrol grublarının metafaz alanlarında, gümüş nitratla boyanan total kromozomlar ve 21. kromozomlar sayılmış, assosiasyon yapanlar belirtilerek onlar da sayılmış ve total kromozomların AgNO₃ ile boyanmaları ve SA sıklıkları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Ancak satellit assosiasyondaki total kromozom sayısı açısından gruplar karşılaştırıldığında P=0.062 değerinin anlam ifade ettiği düşünülerek yapılan Mann-Withney U testine göre Alzheimer hastalarında SA'daki total kromozom sayısının yaşlı kontrol grubundaki bireylere göre arttığı bulunmuştur (P =0.05) . Ag+ NOR alan total akrosentrik kromozom sayıları açısından, Alzheimer hastaları ile genç ve yaşlı kontroller arasında bir fark gözlemedik. Bu bulgularımıza zıt olarak Alzheimer hastalarında genç ve yaşlı kontrollere göre Ag+ NOR alan total akrosentrik kromozom sayısının daha az olduğu bulunmuştur (1). Yine, SA'daki total kromozom sayısının Alzheimer hastalarında arttığı yönündeki bulgularımız, Payão ve arkadaşlarının çalışmasında azaldığı yönündeki bulgulara ters düşmektedir (1).

Hasta, genç ve yaşlı kontrol gruplarının metafaz başına Ag+ NOR'lu akrosentrik kromozomlarının sayılarına göre yapılan istatistiksel karşılaştırmada metafaz başına akrosentrik kromozomların 5 NOR almaları açısından P değeri 0.05' e yakın olduğu için gruplar arasında Mann-Withney U testi yapılmış ve hasta ile genç kontrol (P=0.024) , genç kontrol ile yaşlı kontrol arasında (P=0.030) anlamlı fark bulunmuştur, bu farka göre Alzheimer hastalarının akrosentrik kromozomlarının 5 NOR almalarının genç kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Böyle bir karşılaştırma şimdiye kadar hiç yapılmamıştır. Lezhava, yaşa bağlı olarak 13. ve 21. kromozomlardaki Ag+ NOR sayılarında azalma olduğunu göstermiştir (2). Bizim çalışmamızda ise yaşlı ve

genç kontrollerdeki 21. kromozom ve total akrosentrik kromozomların Ag+ NOR sayılarında farklılık bulunamamıştır.

NOR alanı üzerine olan karşılaştırmalara göre Alzheimer hastalarındaki ribozomal genlerin aktivitesinde bir azalma olduğunu söyleyebiliriz. Ancak akrosentrik kromozomların Ag+ NOR almalarına göre ve kromozom 21'in NOR almasına göre Alzheimer hastaları ve kontroller arasında bir fark gözleyemememiz, bulgularımızda uyumsuzluk ortaya çıkartabilir. Yada AH'nın ribozomal genlerle ilgili olmadığını akla getirebilir. Ayrıca, Payão ve arkadaşlarının sonuçlarıyla bizim bulgularımızın korelasyon göstermemesi her iki çalışmadaki Alzheimer hastalarının ileri yaşlarda olması ile belki açıklanabilir. Geç başlangıçlı AH ailesel yada sporadik olabilir. Genç yaşta başlayan AH ise aileseldir ve 3 genle (APP, PS-1, PS-2) bağlantılıdır. NOR'ların aktifliği yada inaktifliği kalıtsallık gösterdiği için ailesel AH hastalarındaki NOR bulguları daha değerli olabilir.

Çalışmamızdaki Alzheimer hastalarının 4'ünde AH öyküsü bulunmaktadır. AH aile öyküsü olan ve olmayan hastalarda NOR alan oranları açısından farklılık bulunamamıştır ($P > 0.05$). Akrosentrik kromozomlardaki Ag+ NOR'ların büyüklük dereceleri de, aile öyküsü olanlar ve olmayanlar arasında Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. O dereceli 21. kromozom sayısının AH aile öyküsü olanlarda (3.00 ± 4.00) olmayanlara göre (9.69 ± 6.71) azaldığı ($P=0.058$), diğer taraftan 2 dereceli 21. kromozom sayısının da AH aile öyküsü olanlarda (35.25 ± 3.78) olmayanlara göre (29.00 ± 7.03) arttığı ($P=0.072$) söylenebilir. Diğer kromozomlardaki Ag+ NOR'ların büyüklük dereceleri açısından AH aile öyküsü olanlarla olmayanlar arasında fark bulunamamıştır ($P > 0.05$). Akrosentrik kromozomlardaki Ag+ NOR'ların büyüklük derecelerine ait sonuçlara göre, O dereceli 21. kromozom sayısının AH aile öyküsü olanlarda oldukça azaldığı sonucuna varılabilir. Ag+ total kromozom sayısı, SA'lu 21. kromozom sayısı, SA'lu metafaz sayısı, SA'lu kromozom grup sayısı ve SA'daki total kromozom sayısı açılarından AH aile öyküsü olanlar ve olmayanlar Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur ($P > 0.05$). Ancak Ag+ 21. kromozom sayısının AH aile öyküsü olmayanlara (30.31 ± 6.71) göre olanlarda (37.00 ± 4.00) daha fazla olduğu söylenebilir ($P=0.058$).

Ancak, çalışmamızdaki ailesel Alzheimer hasta sayısı oldukça azdır. Belki ailesel Alzheimer hasta sayılarının artırılmasıyla yapılacak ileri çalışmalarla daha doğru sonuçlar elde edilebilir ve kesin yorumlar yapılabilir.

Bununla birlikte, ribozomal genlerdeki aktivitenin azalması (yada değişmesi), rDNA genlerinin regülasyonu ve ekspresyonundaki değişimler yüzünden olabilir. AH ile ilgili olduğu düşünölen genlerden akrosentrik kromozomlarda yer alanların (PS-1 ve APP gibi) rDNA genleri ile ilişkisi üzerine olan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. Payão SLM, Smith MAC, Kormann-Bortolotto MH, Toniolo J. Investigation of the Nucleolar Organizer Regions in Alzheimer's Disease. *Gerontology* 1994; 40: 13-17
2. Lezhava TA. The Activity of Nucleolar Organizer Regions of Human Chromosomes in Extreme Old age. *Gerontology* 1984; 30: 94-99
3. Schupf N, Kapell D, Lee JH, Ottman R, Mayeux R. Increased risk of Alzheimer's disease in mothers of adults with Down' syndrome. *Lancet* 1994; 344: 353-356
4. Bloom SE, Goodpasture C. An Improved Technique for Selective Staining of Nucleolar Organizer Regions in human Chromosomes. *Hum Genet* 1976; 34: 199-206
5. Demirtaş H, İmamoğlu N, Dönmez H, Cücer N, Yılmaz A, Candemir Z. Condensed chromatin surface and NORs surface enhancement in mitogen stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Ann Genet*, 2000; 4: 77-82
6. İmamoğlu N, T-Lenfosit İnterfaz Çekirdeklerinde NOR Boyama Yöntemini Optimize Etme Çalışmaları ve Down Sendromlu Hastalara Uygulanması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 1999.
7. Karaman Y. Alzheimer Hastalığı ve Diğer Demanslar. *Kayseri* 2002; 90-210
8. Gambert SR. Alzheimer Hastalığı mı? *Sendrom* 1998; 10: 64-77

9. Henderson AS, Jorm AF, Korten AE, Creasey H, et al. Environmental risk factors for Alzheimer's disease: Their relationship to age of onset and familial or sporadic types. *Psychological Medicine* 1992; 22: 429-436
10. Yamantürk P. Alzheimer Hastalığı. *Sendrom* 2000; 12: 72-81
11. Kaplan HI, Sadock BJ. *Textbook of Psychiatry V*. Williams and Wilkins, Baltimore 1989; pp: 612-617.
12. Farrer LA, Myers RH, Conner LA, Cupples A. Segregation analysis reveals evidence of a major gene for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1026-1033
13. Purke JR, Morgenlander JC. Alzheimer Hastalığı ile ilgili güncel bilgiler.. *Sendrom* 2000; 12: 65-73
14. Kay DWK. Genetics, Alzheimer's disease and senile dementia. *Br J Psychiatry* 1989, 154: 311-320.
15. Farrer LA, Cupples LA. Estimating the probability for major gene Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 374-83
16. Chandra V, Ganguli M, Ratcliff G, et al. Studies of the epidemiology of dementia: Comparisons between developed and developing countries. *Aging Clin Exp Res* 1994; 6: 307-32
17. Rubin EH, Morris JC, Grant E A et al. Very mild senil demential of the Alzheimer type. Clinical assessment. *Arch Neurol* 1989; 46: 379-382
18. Hendrie HC. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Geriatrics* 1997; 52 (suppl 2): 4-8
19. Larson EB. Illnesses causing dementia in the very elderly. *N Eng J Med* 1993; 328: 203-205

20. Morris JC, McKeel DW, Storandt M, et al. Very mild Alzheimer's disease: informant based clinical, psychometric, and pathologic distinction from normal aging. *Neurology* 1999; 4: 469-478
21. Sterkstein SE, Labe L, Vazquez S, et al. Neuropsychological, psychiatric and cerebral perfusion correlates of leukoariosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg and Psychiatry* 1997; 63: 66-73.
22. Zubenko GS, Moosy J, Kopp U. Neurochemical correlates of depression in primary dementia. *Arch Neurol* 1990; 47: 209-214
23. Bonaiuto S, Rocca WA, Lippi A, et al. Education and occupation as risk factors for dementia: A population-based case-control study. *Neuroepidemiology* 1995; 14: 101-109
24. Filley CM, Brownell HH, Albert ML. Education provides no protection against Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 35: 1781-1784
25. Brenner DE, Kukull WA, Stergachis A, et al. Postmenopausal estrogen replacement therapy and the risk of Alzheimer's disease: A population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 1994; 140: 262-267
26. Henderson VW. The epidemiology of estrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 48: 27-S35
27. Jacobs DM, Tang MX, Stern Y, et al. Cognitive function in nondemented older women who took estrogen after menopause. *Neurology* 1998; 50: 368-373
28. Emery AEH, Vassilopovlos D. The presenile dementias. *Principles and Practice of Medical Genetic* 1990; 1: 473-77
29. Clair D. Genetics of Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry* 1994;164:151-156

30. Percy ME, Marlović VD, McLachlan DRC, Berg J M. Family with 22-derived marker chromosome and late-onset dementia of the Alzheimer type. *J Am Med Genet* 1991; 39: 307-313
31. Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7789-7793
32. Unterbeck A. Deciphering the molecular mechanisms of Alzheimer's disease. Uluslararası Alzheimer Hastalığı ve İlgili Bozukluklar Satellit Sempozyumu 30 Eylül-1 Ekim 1993, Program ve Bildiri Özetleri.
33. Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1997; 325: 733-736
34. Busch C, Bohl J, Ohm TG. Spatial temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 401-406
35. Lue L F, Brachova L, Civin WH, Rogers J. Inflammation, Ab deposition and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropath Exp Neurol* 1996; 55: 1083-1088
36. Morris J, Cyrus P, Orazem J. Metrifonate: Potential therapy for Alzheimers disease. *Neurology* 1997; 48: 1730
37. Goedert M., Jakes R, Crowther RA., Six J, Lubke U. The abnormal phosphorylation of tau protein at ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5066-5070
38. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer disease. *Neurology* 1992; 42: 631-639

39. Koss E, Patterson MB, Ownby R, et al. Memory evaluation in Alzheimer's disease, Caregivers appraisals and objective testing. *Arch Neurol* 1993; 50: 92-97
40. Lendon CL, Ashall F, Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. *JAMA* 1997; 277: 835-831
41. Morris JC, Cole M, Banker BQ. Hereditary dysphasic dementia and the Pick Alzheimer spectrum. *Ann Neurol* 1984; 16: 455-466
42. Farrer LA. Effects of age sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. Apoe and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997; 278: 1349-1356
43. Van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Hady JA, Goate A M, Martin JJ. Evidence for a allelic heterogeneity in familial early-onset Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry* 1991; 158: 471-474
44. Tanzi RE, George-Hyslop PS, Gusella JF. Molecular genetics of Alzheimer's disease amyloid. *J Biol Chem* 199; 266: 20579-20582
45. Yankner BA, Mesulam MM. Beta-amyloid and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *N Eng J Med* 1991; 325: 1849-1857
46. Lovestone Simon. Alzheimer Hastalığında Erken Tanı ve Tedavi. Novartis. İstanbul 2001; 1-74
47. Davies TA, Long HJ, Sgro K, et al. Activated Alzheimer's disease Platelets retain more beta amyloid precursor protein. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 147-153
48. Games D, Adams D, Alessandrini R, et al. Alzheimer-type neuroptahology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523-527

49. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349: 704-706
50. Potter H. Review and Hypothesis: Alzheimer Disease and Down Syndrome-Chromosome 21 Nondisjunction May Underlie Both Disorders. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1192-2000
51. Gearing M, Mirra SS, Hedreen JC, Sumi S, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part X. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45: 461-466
52. Ledoux S, Rebai N, Dagenais A, Shaw I T, Nalbantoğlu J, Sekaly R. Amyloid precursor protein in peripheral mononuclear cells is up-regulated with cell activation. *J Immunol* 1993; 150: 5566-75
53. Haass C, Koo EH, Teplow DB, Selkoe DS. Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1564-81
54. Buxbaum JD, Christensen JL, Ruefli AA, Greengard P, Loring JF. Expression of APP in brains of transgenic mice containing the entire human APP gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 639-45
55. Heinonen O, Joininen H, Syrjanen S, Neittaanmäki H. B-Amyloid protein immunoreactivity in skin is not a reliable marker of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1994; 51: 799-804
56. Kammesheidt A, Boyce FM, Spanoyannis AF, Cummings BJ, Ortegon M, Coyman C. Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10857-10861

57. Buxbaum JD, Dishy M, Chen HI, Pinkas R, Jaffe EA, Gandy SE. Cholinergic agonists and interleukin1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10075-10078
58. Geller LN, Potter H, Chromosome Missegregation and Trisomy 21 Mosaicism in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 167-179
59. Rudolph TE, Kim T-W, Kovacs DM., Guenette SY, Moir RD, Hyman BT, Wasco W. The Genes Responsible for Familial Alzheimer's Disease. Toward Common Etiological Pathway. In: Iqbal K, Winblad B, Nishimura T, Takeda M, Wisniewski HM (eds), *Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics*. John Wiley & Sons Ltd, 1997; 63-69
60. Wong L, Liang Y, Jiang L, Tsvda T, Fong Q, Galway G. Mutation of the gene for the human lysosomal serine protease cathepsin G is not the cause aberrant APP processing in familial Alzheimer disease. *Neuro Lett* 1993; 152: 96-98
61. Braak H, Braak E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 85-88
62. Samuel W, Galasko D, Thal LJ. Alzheimer disease. Cognitive neuropsychological aspect. In: Feinberg TE, Farah MJ(eds). *Behavioral Neurology and Neuropsychology*. McGraw-Hill. New York, 1997; pp 545-551.
63. Goate AM, Hardy JA, Owen MJ, Haynes A, James L, Farrall M. Genetics of Alzheimer's disease. *Adv Neurol* 1990; 51: 197-198
64. Warren ST, Nelson DL. Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. *JAMA* 1994; 271: 536-542
65. Schellenberg GD, Payami H, Wijsman EM, Crr HT, Goddard K A. Chromosome 14 and late-onset familial Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 619-628

66. Yu C, Payami H., Olson JM, Boehnke M, Wijsmar EM, Orr H T, Kukull WA, Goddard KA B, Nemes E. The Apolipoprotein E/CI/CII gene cluster and late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 631-642
67. Locke PA, Conneally PA, Tanzi RE, Gusella JF. Apolipoprotein E4 allele and Alzheimer disease: Examination of allelic association and effect on age at onset in both early and late-onset cases. *Genetic Epidemiol* 1995; 12: 83-92
68. Gafvels ME, Caired M, Britt D, Jakson CL, Patterson D, Strauss JF. Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein / apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9pter- p23. *Somat. Cell Mol Genet* 1993; 19: 557-569
69. Liddell M, Williams J, Bayer A, Kaiser F, Owen M. Confirmation of association between the e4 allele of apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *J Med Genet* 1994; 3: 197-200
70. Tsai MS, Tangalos EG, Peterson RC, Smith GE, Schaid DJ, Kökmen E. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 643-649
71. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schemchel D, Petricak-Vance M, Enghild J, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1977-1981
72. Farlow MR. Alzheimer's disease: clinical implications of the apolipoprotein E genotype. *Neurology* 1997; 48: 30-34

73. Crutcher KA., Tolar M, Harmony JAK, Marques M A. A new Hypothesis for the role of Apolipoprotein E in Alzheimer 's Disease Pathology. In:Iqbal K, Winblad B, Nishimura T, Takeda M, Wisniewski HM (eds), Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics. John Wiley & Sons Ltd, 1997; 543-552
74. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders A M, Huang D. Hypothesis: microtubule instability and paried helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol* 1994; 125: 163-171
75. Refolo LM, Wittenberg IS, Friedrich L, et al.The Alzheimer amyloid precursor is associated with the detergent-insoluble cytoskeleton. *J Neurosci* 1991; 11: 3888-3897
76. Goate AM, Owen MJ, James LA, Mullan MJ et al. Predisposing locus for Alzheimer's disease on Chromosome 21. *The lancet* 1989; 18: 352-355
77. Watkins P, Tanzi RE, Cheng SV, Gusella J F. Molecular genetics of human chromosome 21. *J Genetics* 1987; 24: 257-270
78. Rowe JF, Ridler MAC, Gibberd FB. Presenile dementia associated with mosaic trisomy 21 in a patient with a Down syndrome child. *Lancet* 1989; 22: 229
79. Kay DWK. The genetics of Alzheimer's disease. *Br Med Bull* 1986; 42: 19-23
80. Karol S, Ayvalı C, Suludere Z. Hücre Biyolojisi. Gözde Repro Ofset yayını, üçüncü baskı, Ankara 1995; 439-443
81. Jordan EG. Interpreting nuclear structure: where are the transcribing genes? *J Cell Sci* 1991; 98: 437-442.
82. Hilliker AJ, Appels R. The arrangement of interphase chromosomes: Structural and functional aspects. *Exp. Cell Res.* 1989; 185: 297-318

83. Wachtler F, Hopman AHN, Wiegant J, Schwarzacher HG. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. *Exp Cell Res* 1986; 167: 227-240
84. Schwarzacher HG, Mikelsaar AV, Schnedl W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 20: 24-39
85. Mikelsaar AV, Schwarzacher HG. Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. *Hum Genet* 1978; 42: 292-299
86. Pendás AM, Morán P, Garcia-Vázquez E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63: 128-130
87. Mikelsaar AV, Schmid M, Krone W, Schwarzacher HG, Schnedl W. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Hum Genet* 1977; 37: 73-77.
88. Robert-Fortel I, Junera HR, Geraud G, Hernandez-Verdun D. Threedimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microcopy. *Chromosoma* 1993; 102: 146-157.
89. Denton TE, Howell WM, Barrett JV. Human nucleolar organizer chromosomes: Satellite Associations. *Chromosoma* 1976; 55: 81-84.
90. Sigmund J, Schwarzacher HG, Mikelsaar AV. Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR activity. *Hum Gen* 1979; 50: 81-91.
91. Hubbell HR. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology* 1985; 60: 285-294.

92. Bilinski SM, Blinska B. A new version of the Ag-NOR technique: A combination with DAPI staining. *J Histochem.* 1996; 28: 651-656
93. Howel WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizers regions with a protective colloidal developer: A1 step method. *Experimentia* 1980; 36: 1014-1015
94. Borsatto B, Smith M, De AC. Reduction of the activity of ribozomal genes with age in Down's syndrome. *Gerontology* 1996; 42: 147-154.
95. Jimènez R, Burgos M, Diaz de la Guardia R. A study of the Ag-stainig sinificance in mitotic NOR's. *Heredity* 1988; 60: 125-127
96. Başaran N. Tıbbi Genetik Ders kitabı, Güneş & Nobel Tıp Kitabevi, 7. Baskı Bursa, 1999; 191
97. Scheer U, Xia B, Merkert H, Weisenberger D. Looking at Christmas tree in the nucleolus. *Chromosoma* 1997; 105: 470-480
98. Folstein MF, Folstein S, Mc Hugh PR. " Mini Mental State " A practical method for grading the cognitive state of patient for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198
99. Sumner AT, Evans HJ, Buckland KA. New Technigue for Distinguishing between Human Chromosomes. *Nat New Bio* 1971; 232: 31-32

ÖZGEÇMİŞ

Hilal Ünlü Akalın 24. 08. 1976 yılında Kayseri’de doğdu.1988 yılında Servet Akaydın İlkokulundan, 1991’de 50. Yıl Dedeman Ortaokulun’dan mezun oldu. 1994 yılında Kayseri Lisesini bitirdikten sonra 1995’de Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 1999 yılında aynı bölümden mezun oldu. 1999 yılı güz döneminde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nın açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazandı. Şu anda Yüksek Lisans tez dönemine devam etmektedir.