

# Alzheimer Hastalığının Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, Folat ve Homosistein Düzeyleri ile Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmi ile İlişkisi

*Association of Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, Folate, Homocysteine levels and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) polymorphism with Alzheimer's Disease*

Ulaş Değirmenci<sup>1</sup>, Mustafa Serhan Sevim<sup>2</sup>, Okan Doğu<sup>2</sup>, Özgür Ünal<sup>3</sup>, Lülüfer Tamer<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya AD., Şanlıurfa, Türkiye

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji AD., Mersin, Türkiye

<sup>3</sup>Aydın Devlet Hastanesi, Nöroloji Bölümü, Aydın, Türkiye

<sup>4</sup>Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., Mersin, Türkiye

**Atf:** Değirmenci U, Sevim MS, Doğu O, Ünal Ö, Tamer L. (2023). Alzheimer hastalığının vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folat ve homosistein düzeyleri ile metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen polimorfizmi ile ilişkisi. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 16(3),254-261.

## ABSTRACT

**Objective:** Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder and the most frequent (50-60%) cause of dementia in the elderly population. It is characterized by amyloid deposits in selected regions of the brain. These deposits include amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Macroscopic features of the Alzheimer brain include widening of the sulci, cortical atrophy and ventricular dilatation, which affect regions of the brain associated with memory and language. Hyperhomocysteinemia is thought to contribute to Alzheimer's disease by induction of vascular changes. Homocysteine can be converted to methionine by the remethylation pathway. In this pathway, methylenetetrahydrofolate reductase catalyses the reaction methylenetetrahydrofolate to methyltetrahydrofolate. Vitamins like folate, B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> have also roles in the remethylation of homocysteine. In this study, we aimed to investigate the relationship between Alzheimer's disease and homocysteine, folate, vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> levels and methylenetetrahydrofolate reductase genotypes.

**Material and Method:** Blood samples were collected from 56 patients and 82 healthy volunteers. Folate and vitamin B<sub>12</sub> levels were detected on Modular E170 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) biochemistry otooanalyzer. Homocysteine and vitamin B<sub>6</sub> levels were detected with high pressure liquid chromatography method on Agilent 1100 Series (Germany) device.

**Results:** Although vitamin B<sub>12</sub> levels were higher in the patient group, and vitamin B<sub>6</sub> and folate levels were lower in the patient group, the differences were not statistically significant (p>0.05). Homocysteine levels were found to be statistically significantly higher in the patient group (p=0.016). It was determined that there was no difference between the groups in terms of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism 677CC, 677CT and 677TT genotypes and A1298C polymorphism 1298AA, 1298AC and 1298CC genotypes.

**Conclusion:** It is thought that homocysteine is a risk factor for Alzheimer's disease and studies involving other biomolecules and enzymes involved in homocysteine metabolism may reveal the relationship between Alzheimer's disease and homocysteine.

**Keywords:** *Alzheimer's disease, Homocysteine, Methylenetetrahydrofolate reductase, Gene polymorphism*

## ÖZET

**Giriş:** Alzheimer hastalığı nörodejeneratif bir hastalıktır ve yaşlı popülasyonda görülen demansın en sık çeşididir (%50-60). Hastalık beynin belirli bölgelerinde amiloid birikimi ile karakterizedir. Bu birikimler amiloid plak ve nörofibriller yumakları içermektedir. Alzheimer'lı beynin makroskopik özellikleri hafıza ve konuşma ile ilgili olan bölgeleri etkileyen sulcusların genişlemesi, kortikal atrofi ve ventriküler dilatasyondur. Hiperhomosisteineminin vasküler değişiklikleri indüklemeye vasıtasıyla Alzheimer hastalığı ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Homosistein remetilasyon yoluyla metiyonine çevrilmektedir. Bu yolda metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi metilentetrahidrofolatın metiltetrahidrofolata dönüşüm reaksiyonunu katalizlemektedir. Homosisteinin remetilasyonunda folat, B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> gibi vitaminler de görev almaktadır. Bu çalışmada Alzheimer hastalığı ile homosistein, folat, vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> düzeyleri ve metilentetrahidrofolat redüktaz genotiplerinin ilişkisini araştırmayı amaçladık

**Materyal ve Metot:** Kan örnekleri 56 Alzheimer hastasından ve 82 sağlıklı bireyden toplandı. Folat ve B<sub>12</sub> vitamini düzeyleri Modular E170 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) biyokimya otoanalizöründe, homosistein ve B<sub>6</sub> vitamini düzeyleri ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle Agilent 1100 Series (Germany) cihazında ölçüldü. Metilentetrahidrofolat redüktaz gen polimorfizmleri real time PCR yöntemiyle LightCycler (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) cihazında tespit edildi.

**Bulgular:** Vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri hasta grubunda daha yüksek, vitamin B<sub>6</sub> ve folat düzeyleri hasta grubunda daha düşük bulunmasına rağmen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05). Homosistein düzeyleri hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0.016). Metilentetrahidrofolat redüktaz C677T polimorfizminin 677CC, 677CT ve 677TT genotipleri ve A1298C polimorfizminin 1298AA, 1298AC ve 1298CC genotipleri bakımından gruplar arasında farklılık olmadığı tespit edildi.

**Sonuç:** Homosisteinin Alzheimer hastalığı için risk faktörü olduğu ve homosistein metabolizmasında görev alan diğer biyomoleküller ve enzimleri de kapsayan çalışmaların Alzheimer hastalığı ve homosistein ilişkisini ortaya çıkarabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Alzheimer hastalığı, Homosistein, Metilentetrahidrofolat redüktaz, Gen polimorfizmi*

\* Sorumlu yazar: Ulaş Değirmenci. E-mail: [ulas\\_degirmenci@yahoo.com](mailto:ulas_degirmenci@yahoo.com).

ORCID: Ulaş Değirmenci: 0000-0001-5208-6430, Mustafa Serhan Sevim: 0000-0002-0518-3374, Okan Doğu: 0000-0002-2126-9792, Özcan Ünal: 0009-0001-5921-1174, Lülüfer Tamer: 0000-0003-2092-6604

Geliş: 12.05.2023, Kabul: 01.11.2023 ve Basım: 30.12.2023



## GİRİŞ

Heterojen ve çok faktörlü nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH) dünya genelindeki demans vakalarının yarısından fazlasının nedenidir. Hastalık, beyinde amiloid plak ve nörofibriler yumak birikimine eşlik eden ve zamanla ilerleyen bilişsel gerilemeyle karakterizedir. Patogenezi ile ilgili merkezi hipotez; beta amiloid protein birikiminin patolojik olayları başlattığını öne süren amiloid kaskad hipotezidir (Šerý ve ark., 2013). Birçok klinik ve epidemiyolojik çalışma vasküler bozukluklar ve geç başlangıçlı AH arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Diyabet, hiperlipidemi, hipertansiyon, kalp hastalıkları ve yüksek serum homosistein düzeyleri gibi vasküler risk faktörleri de AH için bildirilen risk faktörleridir (Ott ve ark., 1999; Jick ve ark., 2000). Homosistein esansiyel bir amino asit olan metiyoninden sistein amino asidi sentezlenmesi esnasında meydana gelen bir ara üründür. Bir süüfidril grubu taşımasından dolayı bu iki amino aside benzerlik gösterir ve sisteine benzerliğinden dolayı homosistein adını almıştır (Hoffbrand ve Weir, 2001). Plazmada oksidasyona uğrayan homosistein; homosistin, homosistein tiyolaktan ve proteine bağlı homosisteine dönüşmektedir. Bu oksidasyon sırasında süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikal gibi oksijen radikalleri meydana gelir. Hidrojen peroksit düz kas proliferasyonu, platelet ve lökosit aktivasyonuna neden olur (Burner ve ark., 1999). Süper oksitten oluşan hidroksil radikal lipid peroksidasyonunu artırır. Lipid peroksidasyonu hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun yanında düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) de okside olmasıyla sonuçlanabilmektedir. Okside LDL subendotelial bölgeye geçer, makrofajlar tarafından fagosite edilir ve köpük hücreleri halinde birikerek ateroskleroz oluşumuna katkı sağlar (Prasad, 1999). Homosistein gibi metabolitlerin proapoptotik protein aktivasyonu yoluyla N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerine toksik etki göstererek hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Porter ve Roberts, 1993; Smirnova ve ark., 1993). Bir diğer metabolit olan S-adenozil homosisteinin metilasyon reaksiyonlarını inhibe ederek nörotoksositeye neden olmaktadır (Schatz ve ark., 1981). Homosistein transsülfürasyonla sisteine, remetilasyonla da metiyonine dönüşür. Bu dönüşümlerde metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), metiyonin sentaz ve sistatyonin sentaz gibi enzimler görev almaktadırlar. Remetilasyon yolağında folat, B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> gibi B grubu vitaminler de görev almaktadırlar (Aleman ve ark., 2001). Folat, tek karbon

metabolizmasında bir kofaktördür ve homosisteinin remetilasyonunda rolü vardır. Çok sayıda epidemiyolojik ve deneysel çalışma folat eksikliğini ve buna bağlı olarak artan homosistein düzeylerini AH ile ilişkilendirmiştir (Seshadri ve ark., 2002). B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> vitaminleri, beyinde monoamin nörotransmitterler, fosfolipidler ve nükleotidlerin üretiminde elzem olan metilasyon gibi tek karbon transfer reaksiyonlarında gereklidirler. B<sub>12</sub> vitamini, insan vücudunda sentezlenemediğinden et, süt ve yumurta gibi hayvansal gıdalardan alınmalıdır (Ural Ulucan ve ark., 2023). Bu B vitaminlerinin düşük seviyeleri, artmış homosistein düzeyleri ile de ilişkilendirilmiştir (Quadri ve ark., 2004). MTHFR homosisteinin folat bağımlı metabolizmasında önemli bir enzimdir. MTHFR enzimi 5, 10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata dönüşüm reaksiyonunu katalizlemektedir (Choi ve Mason, 2000). Bu nedenle çalışmamızda vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, folat ve homosistein düzeyleri ile MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin Alzheimer hastalığı ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

## MATERYAL ve METOT

### Çalışma Grubu

Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak yürütüldü ve çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. Analiz sonuçlarına göre Biyoistatistik Anabilim Dalı'nın görüşü alınarak en az 90 kişinin bu çalışmaya dahil edilmesi planlandı. Çalışma grubumuzu 01.09.2003-01.12.2004 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji polikliniğinde Alzheimer tipi demans tanısı konulmuş 37'si kadın ve 19'u erkek toplam 56 hasta, demansı ve sistemik bir hastalığı bulunmayan, vitamin tableti ve homosistein düzeyine etki edecek ilaç kullanmayan 47'si kadın ve 35'i erkek olmak üzere toplam 82 kontrol birey oluşturmaktadır. Kan örnekleri içeriksiz cam tüplere ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'lı tüplere alındı. İçeriksiz cam tüplerdeki kanların 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek ayrılan serumlarında folat, vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> düzeyleri, plazma örneklerinde ise homosistein düzeyleri aynı gün içerisinde çalışıldı. EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri çalışma gününe kadar +4 °C'de muhafaza edilerek çalışmalar haftalık yürütüldü.

### DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için high pure PCR template kiti (Cat no. 1 796 828, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) prospektüsüne uygun şekilde kullanıldı. Kit içeriği Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo1.** DNA izolasyon kit içeriği

Kimyasal	Miktarı	İçeriği
Binding tampon	20 mL	6 M guanidine-HCl, 10 mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH:4.4
Proteinaz K	90 mg	Liyofilize proteinaz K
İnhibitör uzaklaştırıcı tampon	33 mL	5 M guanidine HCl, 20 mM Tris-HCl, pH: 6.6
Yıkama tamponu	20 mL	20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH: 7.5
Elüsyon tamponu	40 mL	10 nM Tris, pH: 8.5

### MTHFR C677T ve A1298C Genotiplerinin Belirlenmesi

PCR ve mutasyon görüntüleme için LightCycler-MTHFR C677T ve A1298C Mutation Detection kitleri (MTHFR C677T: Cat no. 2 015 012, Roche Diagnostics

GmbH Mannheim, Germany) (MTHFR A1298C: Cat no. 2 015 012, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) kullanıldı. Kit içeriği, örnek başına kullanılan miktarlar ve uygulanan PCR protokolü Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 2.** MTHFR C677T/A1298C mutasyon çalışması için kit içeriği ve kullanılan miktarlar

Karışımlar	İçerikleri	Bir örnek için harcanan miktar (µL)
Mutasyon belirleme karışımı	Primer, hibridizasyon probu	2.8
Reaksiyon karışımı	FastStart Taq polimeraz reaksiyon karışımı, MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3.6
Enzim solüsyonu	FastStart Taq polimeraz	0.1
Kontrol templat	Heterozigot plazmit DNA'sı	4
Steril su	PCR grade steril distile su	9.6

**Tablo 3.** MTHFR C677T/A1298C mutasyon çalışması için PCR protokolü

	Siklus	1		
Denatürasyon	Hedef sıcaklık (°C)	95		
	İnkübasyon süresi (sn)	60		
	Sıcaklık değişim oranı (°C/sn)	20		
	Siklus	50		
Amplifikasyon	Sıcaklık ayarları	Segment 1	Segment 2	Segment 3
	Hedef sıcaklık(°C)	95	57	72
	İnkübasyon süresi(sn)	1	5	3
	Sıcaklık değişim oranı (°C/sn)	20	20	3
	Siklus	1		
Melting Analizi	Sıcaklık ayarları	Segment 1	Segment 2	Segment 3
	Hedef sıcaklık (°C)	95	40	80
	İnkübasyon süresi (sn)	60	60	0
	Sıcaklık değişim oranı (°C/sn)	20	20	0,1
	Siklus	1		
Cooling	Hedef sıcaklık (°C)	40		
	İnkübasyon süresi (sn)	30		
	Sıcaklık değişim oranı (°C/sn)	20		

### Homosistein ve Vitamin B<sub>6</sub> Düzeylerinin Ölçülmesi

Homosistein (plazma) ve vitamin B<sub>6</sub> (serum) düzeyleri Agilent 1100 Series (Germany) yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazında floresan dedektör ile tespit edildi. Homosistein ölçümü için 100 µL plazmaya 25 µL reduction reagent ile 25 µL internal standart eklenerek vortekslendi. Karışım oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra 100 µL precipitation reagent eklenerek 30 sn vortekslendi. 5-7 dk boyunca 9000 g'de santrifüjlenen karışımın süpernatanı ayrıldı. 50 µL süpernatan 100 µL derivatisation karışımına (2 mL derivatisation reagent 2 + 2 mL derivatisation 1 olacak şekilde

hazırlandı) eklenerek 50-55 °C'lik su banyosunda 10 dk bekletildi ve oda sıcaklığına geldikten sonra sisteme enjekte edildi. Vitamin B<sub>6</sub> ölçümü için ışık geçirmeyen bir eppendorf tüpüne 200 µL serum üzerine 300 µL precipitation reagent eklenerek 30 sn vortekslendi. +4 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra 5 dk boyunca 13000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatanın 250 µL'si yeni bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Ayrılan süpernatanın üzerine 250 µL neutralisation reagent ve 100 µL derivatisation reagent eklenerek karıştırıldı. Karışım 20 dk 60 °C'lik su banyosunda bekletildikten sonra +4 °C'de 10 dk soğutuldu. 13000 rpm'de 2 dk santrifüjlenen karışımın süpernatan kısmından 40 µL örnek sisteme

enjekte edildi. Homosistein ve B<sub>6</sub> vitamini için HPLC çalışma koşulları Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 4.** Homosistein ve vitamin B<sub>6</sub> için HPLC çalışma koşulları

Örnek	Homosistein	Vitamin B <sub>6</sub>
Enjeksiyon hacmi	40 µL	40 µL
Akış hızı	1.7 mL/dk	1-1.2 mL/dk
Deteksiyon dalga boyları	Eksitasyon: 385 nm Emisyon: 515 nm	Eksitasyon: 320 nm Emisyon: 415 nm
Kolon sıcaklığı	25 °C	25 °C
Çalışma süresi	5 dk	8 dk

Folat ve vitamin B<sub>12</sub> serum düzeyleri Modular E170 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) biyokimya otoanalizöründe kit (Folat: Cat no. 1182761, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) (Vitamin B<sub>12</sub>: Cat no. 11820869322, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) kullanılarak ölçüldü.

#### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 11.5) paket programı kullanıldı. Çalışmadaki homosistein, folat, B<sub>6</sub> ve

B<sub>12</sub> vitaminlerinin hasta ve kontrol gruplarındaki değişkenleri için tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında farklılık olup olmadığı, normal dağılım gösteren ve yaştan etkilendiği düşünülen homosistein için Covariance analiziyle, normal dağılım göstermeyen B<sub>6</sub> vitamini için Mann Whitney-U testiyle, normal dağılım gösteren folat ve B<sub>12</sub> vitaminleri için ise student t testi ile değerlendirildi. MTHFR gen polimorfizmleriyle Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki binary logistic regression analizi ile değerlendirildi. MTHFR genindeki bu mutasyonların homosistein düzeyine etkisi olup olmadığı polimorfizmler açısından normal dağılım göstermediği için Mann Whitney-U testiyle değerlendirildi.

#### BULGULAR

Bu çalışmada Alzheimer hastalığı ile folat, vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> ve homosistein düzeyleriyle MTHFR C677T ve A1298C nokta mutasyonlarının ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla 56 Alzheimer hastası ve 82 sağlıklı birey araştırmaya dahil edildi.

#### Folat, Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> ve Homosistein Sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarının homosistein, folat, vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri ile vitamin B<sub>6</sub> ortanca değer (median) ve 1.-3. çeyreklik [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>] değerleri Tablo 5’de verilmiştir.

**Tablo 5.** Hasta ve kontrol grubunda homosistein, folat, vitamin B<sub>12</sub> düzeyleri ile vitamin B<sub>6</sub> median [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>] değerleri

Grup	n	Homosistein Ortalama±SD (µmol/L)	Vitamin B <sub>12</sub> Ortalama ±SD (pg/mL)	Folat Ortalama ±SD (ng/mL)	Vitamin B <sub>6</sub> Median [Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ]
Hasta	56	24.63±14.92	310.6±200.5	8.35±3.9	9.30 [4.065-14.5]
Kontrol	82	15.58±7.77	264.9±151.6	9.03±4	7.92 [4.84-15.6]
p		0.016	0.151	0.327	0.805

n: birey sayısı, SD: standart sapma, median: ortanca değer, Q<sub>1</sub>: 1. Çeyreklik, Q<sub>3</sub>: 3. çeyreklik

Elde ettiğimiz sonuçlara göre homosistein düzeylerinin hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu (p=0.016). Hasta grubunda vitamin B<sub>12</sub> düzeylerinin yüksek, vitamin B<sub>6</sub> ve folat düzeylerinin ise düşük olduğu bulunmasına rağmen farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (p>0.05).

#### MTHFR C677T ve A1298C Polimorfizmlerinin Alzheimer Hastalığı için Risk Değerlendirmesi

MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları, odds oranları ve %95 güven aralığı değerleri Tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 6.** MTHFR polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubundaki frekansları ve risk hesaplamaları

Genotip	Hasta n (%)	Kontrol n (%)	OR	%95 CI
MTHFR 677 C/C	21 (%37.5)	35 (%42.7)	1 (referans)	-
MTHFR 677 C/T	30 (%53.6)	33 (%40.2)	0.66	0.31-1.37
MTHFR 677 T/T	5 (%8.9)	14 (%17.1)	1.68	0.5-5.3
MTHFR 1298 A/A	19 (%33.9)	33 (%40.2)	1 (referans)	-
MTHFR 1298 A/C	29 (%51.8)	41 (%50)	0.81	0.38-1.7
MTHFR 1298 C/C	8 (%14.8)	8 (%9.8)	0.57	0.18-1.78

n: birey sayısı, OR: odds oranı, CI: güven aralığı

MTHFR polimorfizmlerinin istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptandı (C677T için  $p=0.21$ , A1298C için  $p=0.618$ ). Mutasyonlar genotipik açıdan binary logistic regresyon analizi ile incelendiğinde MTHFR 677 T/T genotipine sahip bireylerin 677 C/T genotipine sahip bireylere göre Alzheimer hastalığına maruz kalma riskinin 1.68 kat daha fazla olduğunun tespit edilmesine rağmen risk artışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ( $p=0.37$ ).

### MTHFR Genotiplerine Göre Homosistein Düzeyleri

MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmlerinin grup ayrımı yapılmadan tüm genotipler için (MTHFR 677 C/C, MTHFR 1298 A/A) homosistein median ve 1.-3. çeyreklik değerleri Tablo 7'de verilmiştir.

**Tablo 7.** MTHFR 677 ve 1298 genotiplerinde homosistein median [Q1-Q3] değerleri

Genotip	n	Homosistein Median [Q1-Q3]	p
MTHFR 677 C/C	56	15.025 [11.92-23.36]	0.905
MTHFR 677 C/T	63	15.67 [11.97-20.95]	
MTHFR 677 T/T	19	18.57 [13.5-27.93]	0.276
MTHFR 1298 A/A	52	15.72 [11.97-22.54]	0.564
MTHFR 1298 A/C	70	15.01 [11.55-21]	
MTHFR 1298 C/C	16	19.21 [13.21-35.17]	0.219

n: birey sayısı, median: ortanca değer, Q<sub>1</sub>: 1. Çeyreklik, Q<sub>3</sub>: 3. çeyreklik

MTHFR 677 ve 1298 genotiplerine sahip bireylerdeki homosistein düzeylerinin farklılık göstermediği saptandı ( $p>0.05$ ).

### TARTIŞMA

McCully'nin 30 yıl önceki ilk hipotezinden bu yana, 12.000'den fazla hastayı içeren 100'den fazla çalışmayı kapsayan prospektif kohort, kesitsel ve vaka kontrol çalışmalarından elde edilen birçok epidemiyolojik kanıt, yüksek homosistein düzeyleri ile vasküler hastalık arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır (Welch ve ark., 1998; Hankey ve ark., 1999). Kesin patofizyolojik bağlantı henüz aydınlatılmamış olmasına rağmen, hiperhomosisteineminin koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik vasküler hastalık ve venöz tromboz için bağımsız bir risk faktörü olduğu açıktır (Sacco ve ark., 1998; Selhub ve ark., 1997). Homosisteinin nörotoksik etkisini N-metil-D-aspartat reseptörünü aktive ederek ya da nöron hücreleri üzerinde eksitotoksik etkisi olan homosisteik aside dönüşerek gösterdiği düşünülmektedir (Lipton ve ark., 1997; Beal ve ark., 1991). Homosisteinin AH ile ilişkisini inceleyen birçok araştırma yapılmıştır. Pacheco-Quinto ve ark.

farelerde homosisteinin beta amiloid protein düzeylerini yükseltebileceğini göstermişlerdir (Pacheco-Quinto ve ark., 2006). Ho ve ark. homosisteinin hipokampusta DNA onarımını olumsuz etkilediğini ve hipokampal nöronları beta amiloid toksisitesine duyarlı hale getirdiğini tespit etmişlerdir (Ho ve ark., 2010). Zhang ve ark. ratlarda homosistein düzeylerindeki artışın beyinde beta amiloid birikimine ve tau proteinlerinin hiperfosforilasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2008). Ayrıca Seshadri ve ark. yapmış olduğu çalışmada plazma homosistein düzeylerindeki artışın AH hastalığı için güçlü bir risk faktörü olduğu sonucuna varılmıştır (Seshadri ve ark., 2002). Çalışmamızda söz konusu verileri destekleyici şekilde Alzheimer'lı bireylerde homosistein düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu.

Folat eksikliğinin çeşitli patofizyolojik değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. AH'da da oksidatif hasara yol açan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, kalsiyum regülasyonunun kaybı, nöronal ve sinaptik hiperfosforile tau ve  $\beta$ -amiloid birikimi gibi nedenlerden dolayı folat eksikliğinin patojenik olduğu düşünülmektedir (Querfurth ve ark., 2010). Homosisteinin metiyonine remetilasyonunda folat, B6 ve B12 gibi B grubu vitaminler görev almaktadırlar (Aleman ve ark., 2001). Bu vitaminlerin düşük seviyeleri, artmış homosistein düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir (Quadri ve ark., 2004). Yapılan çalışmalar yüksek doz folat, B6 ve B12 vitamin takviyesi ile homosistein düzeylerinin düşürülmesinin AH hastalığı için bir strateji olabileceğini düşündürmektedir (Aisen ve ark., 2003; Linnebank ve ark., 2010). Ancak çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz veriler ışığında vitamin B6 ve folat düzeylerinin hasta grubunda düşük olduğu bulunmasına rağmen farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

Remetilasyon yolağında 5,10-metilentetrahidrofolatın 5-metiltetrahidrofolata dönüşümü reaksiyonunu katalizleyen metilentetrahidrofolat redüktaz (EC 1.5.1.20) geni 1. kromozomda (1p36.3) bulunmaktadır. MTHFR aktivitesinde azalmayla sonuçlanan mutasyonlar metiyonin üretimini etkilemekle beraber, serebrospinal sıvıda S-adenozil metiyonin (SAM) düzeylerinde azalmaya da neden olmaktadır (Kirsch ve ark., 2013). SAM katekolamin nörotransmitterler, proteinler, nükleik asitler, fosfolipitler ve miyelin sentezi gibi nöronal metilasyon reaksiyonları için primer metil vericisidir (Zhuo ve ark., 2010). Hipometilasyonun amiloid anjiyopatisi ve tau patolojisi ile sonuçlanan AH ile ilişkili genlerin yukarı regülasyonunu indüklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Sunder ve Födinger, 2003; Li ve ark., 2014; Sontag ve ark., 2014; Li ve ark., 2015). En yaygın MTHFR mutasyonu MTHFR C677T olarak adlandırılmaktadır. Mutasyon belirli etnik ve coğrafi popülasyonlarda son derece yaygındır. Amerika Birleşik Devletleri'nde Beyaz ve

Hispanik bireylerin yaklaşık %20-%40'ı MTHFR C677T açısından heterozigottur. MTHFR C677T mutasyonu için heterozigot olan kişilerde enzim fonksiyonunun %65'e kadar azaldığı görülmektedir. MTHFR A1298C adı verilen başka bir mutasyon Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya popülasyonunda %7 ila %12 oranında bulunur ve İspanyol kökenliler (%4-%5), Çinliler (%1-%4) ve Asyalılar (%1-%4) arasında daha az yaygındır. MTHFR A1298C mutasyonu için homozigot olan bireylerde normal enzim fonksiyonunun %60'a kadar düştüğü bilinmektedir (Moll ve ark., 2015).

MTHFR enziminin 222. sırasındaki alanin amino asidinin yerine valinin geçmesine neden olan 677C-T mutasyonu ekzon 4'de, 429. sırasında bulunan glutamik asit amino asidinin yerine alaninin geçmesine neden olan 1298A-C mutasyonu ise ekzon 7'de oluşmaktadır. Söz konusu mutasyonların ayrı ayrı homozigot ya da ikisinin beraber heterozigot bulunması durumlarında enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Regland ve ark., 1999; Jiang ve ark., 2021). Jiang ve ark. (2021) Çin popülasyonunda yapmış olduğu çalışmada MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin AH hastalığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bouguerra ve ark. (2022) Cezayir popülasyonunda yaptığı çalışmada MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin AH ile ilişkisi olmadığı tespit edilmiştir. Rai (2017) meta analiz çalışmasında C677T polimorfizmlerinin AH hastalığı riskini arttırdığını tespit etmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre MTHFR 677 T/T genotipine sahip bireylerin 677 C/T genotipine sahip bireylere göre Alzheimer hastalığına maruz kalma riskinin 1.68 kat daha fazla olduğunun tespit edilmesine rağmen risk artışının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (p=0.37). MTHFR A1298C polimorfizmlerinin de AH ile ilişkili olmadığı saptandı. Ayrıca MTHFR 677 T/T ve 1298 C/C genotiplerinde daha yüksek plazma homosistein düzeyleri bulunmuş olsa da farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı.

Sonuç olarak homosisteinin AH hastalığında risk faktörü olarak değerlendirilebileceği, MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin risk teşkil edip etmediğinin anlaşılması için daha geniş çalışma grupları ile yapılacak araştırmalara ya da meta analiz çalışmalarına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Homosistein plazma düzeylerinin düşürülmesi için folat, B6 ve B12 gibi B grubu vitaminlerin AH hastalığının önlenmesinde ve ilerleyişinin yavaşlatılmasında kullanılması bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır..

**Tezin adı/Kabul Tarihi:** Alzheimer Tipi Demansı Olan Hastalarda Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, Folat Düzeyleri ile Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizminin Araştırılması (Yüksek Lisans tezi) / 29.06.2005

**Yazar katkısı:** U.D.; Fikir/kavram, tasarım, veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, kaynak

taraması, makalenin yazımı, malzemeler. M.S.S.; Veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, makalenin yazımı. O.D.; Veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, makalenin yazımı. Ö.Ü.; Fikir/kavram, tasarım, biyolojik materyal toplama, makalenin yazımı. L.T.; Fikir/kavram, tasarım, denetleme/danışmanlık, veri toplama veya işleme, analiz veya yorum, kaynak taraması, makalenin yazımı, eleştirel inceleme, kaynaklar ve fon sağlama, malzemeler.

**Çıkar çatışması:** Çıkar çatışması bulunmamaktadır. Bu çalışma Ulaş Değirmenci'nin Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılan "Alzheimer tipi demansı olan hastalarda Homosistein , Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> , Folat düzeyleri ile Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) gen polimorfizminin araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezinden üretilmiştir.

**Mali destek:** Bu çalışma, SBE-BK(UD)-2003-2YL numaralı proje kapsamında Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**Teşekkür:** SBE-BK(UD)-2003-2YL proje numaralı bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimince desteklenmiştir.

**Etik onay:** Bu çalışmanın etik onayı Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 12.04.2021 tarih ve 1632758 sayılı yazısıyla alınmıştır

#### KAYNAKLAR

- Aleman G, Tovar AR, Torres N. (2001). Homocysteine metabolism and risk of cardiovascular diseases: importance of the nutritional status on folic acid, vitamins B6 and B12. *La Revista de Investigation Clinica*, 53(2), 141-151.
- Aisen PS, Egelko S, Andrews H, Diaz-Arrastia R, Weiner M, DeCarli C, et al. (2003). A pilot study of vitamins to lower plasma homocysteine levels in Alzheimer disease. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, 11(2), 246-249.
- Beal MF, Swartz KJ, Finn SF, Mazurek MF, Kowall NW. (1991). Neurochemical characterization of excitoxin lesions in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 11, 147-158.
- Bouguerra K, Tazir M, Melouli H, Khelil M. (2022). The methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genetic polymorphisms and plasma homocysteine in Alzheimer's disease in an Algerian population. *International Journal of Neuroscience*, 29, 1-6.
- Burner U, Tantschanko W, Obinger C. (1999). Kinetics of oxidation of aliphatic and aromatic thiols by myeloperoxidase compounds I and II. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 443(3), 290-296.
- Choi SW, Mason JB. (2000). Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *The Journal of Nutrition*, 130, 129-132.

- Hankey GJ, Eikelenboom P. (1999). Homocysteine and vascular disease. *Lancet*, 354407-413.
- Ho YS, Yu MS, Yang XF, So KF, Yuen WH, Chang RC. (2010). Neuroprotective effects of polysaccharides from wolfberry, the fruits of *Lycium barbarum*, against homocysteine-induced toxicity in rat cortical neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19, 813-827.
- Hoffbrand AV, Weir DG. (2001). The history of folic acid. *British Journal of Haematology*, 113,579-589.
- Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. (1998). Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *British Medical Journal*, 316(7135), 894-898.
- Jiang Y, Xiao X, Wen Y, Wan M, Zhou L, Liu X, et al. (2021). Genetic effect of MTHFR C677T, A1298C, and A1793G polymorphisms on the age at onset, plasma homocysteine, and white matter lesions in Alzheimer's disease in the Chinese population. *Ageing*, 13(8), 11352-11362.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman D A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet*, 356, 1627-1631.
- Kirsch SH, Herrmann W, Obeid R. (2013). Genetic defects in folate and cobalamin pathways affecting the brain. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51, 139-155.
- Li JG, Chu J, Barrero C, Merali S, Pratico D. (2014). Homocysteine exacerbates amyloid pathology, tau pathology, and cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer disease with plaques and tangles. *Annals of Neurology*, 75, 851-863.
- Li JG, Pratico D. (2015). High levels of homocysteine results in cerebral amyloid angiopathy in mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 43, 29-35.
- Linnebank M, Popp J, Smulders Y, Smith D, Semmler A, Farkas M, et al. (2010). S-adenosylmethionine is decreased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 7, 373-378.
- Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, et al. (1997). Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 5923-5928.
- Moll S, Varga EA. (2015). Homocysteine and MTHFR mutations. *Circulation*, 132(1), e6-e9.
- Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols H A, Hofman A, Breteler MM. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Neurology*, 53, 1937-1942.
- Pacheco-Quinto J, Rodriguez de Turco EB, DeRosa S, Howard A, Cruz-Sanchez F, Sambamurti K, et al. (2006). Hyperhomocysteinemic Alzheimer's mouse model of amyloidosis shows increased brain amyloid beta peptide levels. *Neurobiology of Disease*. 22, 651-656.
- Porter RH, Roberts PJ. (1993). Glutamate metabotropic receptor activation in neonatal rat cerebral cortex by sulphur-containing excitatory amino acids. *Neuroscience Letters*, 154, 78-80.
- Prasad K. (1999). Homocysteine, a risk factor for Cardiovascular Disease. *International Journal of Angiology*, 8, 76-86.
- Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Forloni G, Tettamanti M, et al. (2004). Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 114-122.
- Querfurth HW, LaFerla FM. (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 362, 329-344
- Rai V. (2017). Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and Alzheimer disease risk: A meta-analysis. *Molecular Neurobiology*, 54(2), 1173-1186.
- Regland B, Blennow K, Gergard T, Schmidt ACK, Gottfries CG. (1999). The role of the polymorphic genes apolipoprotein E and methylene tetrahydrofolate reductase in the development of dementia of the Alzheimer type. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 10, 245-254.
- Sacco RL, Roberts JK, Jacobs BS. (1998). Homocysteine as a risk factor for ischemic stroke: an epidemiological story in evolution. *Neuroepidemiology*, 17, 167-173.
- Schatz RA, Wilens TE, Sellinger OZ. (1981). Decreased transmethylation of biogenic amines after in vivo elevation of brain S-adenosyl-I-homocysteine. *Journal of Neurochemistry*, 36(5), 1739-1748.
- Selhub J, D'Angelo G. (1997). Hyperhomocysteinemia and thrombosis: acquired conditions. *Thrombosis and Haemostasis*, 78, 527-531
- Šerý O, Povová J, Míšek I, Pešák L, Janout V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathologica*, 51(1), 1-9.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 346, 476-483.
- Smirnova T, Skinnakre J, Malet J. (1993). Characterization of a presynaptic glutamate receptor. *Science*, 262(5132), 430-433.
- Sontag JM, Wasek B, Taleski G, Smith J, Arning E, Sontag E et al. (2014). Altered protein

- phosphatase 2A methylation and Tau phosphorylation in the young and aged brain of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficient mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 214.
- Sunder G, Födinger M. (2003). Genetic determinants of the homocysteine level. *Kidney International*, 63, 141-144.
- Ural Ulucan H, Yılmaz D, Özdemir F, Acar EB, Keçeci E. (2023). Comparison of vitamin B12 values and kidney function tests in patients diagnosed with FMF and Gout under colchicine treatment. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 16 (1), 94-99.
- Zhang CE, Tian Q, Wei W, Liu GP, Zhou XW, Wang Q, et al. (2008). Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 29, 1654-1665.
- Welch GN, Loscalzo J. (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*. 338, 1042-1050.
- Zhuo JM, Pratico D. (2010). Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet. *Experimental Gerontology*, 45, 195-201.