

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER HASTALIĞINDA BEYİN OMURİLİK
SIVISINDA (BOS) BİYOLOJİK BELİRTEÇLER VE
BOS'UN PC 12 HÜCRE HATTI CANLILIĞI
ÜZERİNE İN VİTRO ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

NÖROLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr.Erdem YAKA

141705

Danışman Öğretim Üyesi
Doç.Dr.Görsev G. YENER

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	1
ŞEKİL LİSTESİ	2
KISALTMALAR.....	3
ÖNSÖZ	4
1.ÖZET	5
2.İNGİLİZCE ÖZET.....	7
3.GİRİŞ VE AMAÇ	9
4.GENEL BİLGİLER	11
4.1.Tanım.....	11
4.2.Klinik.....	13
4.3.Laboratuvar.....	15
4.4.Nöropatoloji.....	16
4.4.1.Nörofibriller yumaklar.....	16
4.4.2.Amiloyid plaklar.....	18
4.4.3.Gliyozis ve enflamasyon	20
4.4.4.Nöron ve sinaps kaybı	21
4.4.5.Kolinerjik inervasyon kaybı	21
4.4.6.Diğer nörotransmitter kayıpları	22
5.GEREÇ VE YÖNTEM	23
5.1.Araştırmanın tipi.....	23
5.2.Araştırmanın yeri ve araştırmanın zamanı	23
5.3.Araştırmanın değişkenleri.....	23
5.4.Verinin toplanması ve işlenmesi.....	24
5.4.1.Kültür kaplarının ve lamellerin polilizin ile kaplanması	25
5.4.2.İn Vitro Deneyler.....	25
5.4.3.MTT testi	26
5.5.Verinin çözümü.....	27
6.BULGULAR.....	28
7.TARTIŞMA.....	39
8.SONUÇ	44
9.KAYNAKLAR.....	45
10.EKLER	54

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığı Klinik Tanı Kriterleri

Tablo 2: Olgu ve kontrollerin demografik ve sigara kullanım özelliklerine göre dağılımı

Tablo 3: Olgu ve kontrollerin MMDT ve GBÖ skor ortalamaların göre karşılaştırılması

Tablo 4: Olgu ve kontrollerin BOS belirteçleri ve canlı kalan hücre sayısı ortalamalarına göre karşılaştırılması



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Nöropatolojik antiteler, en belirgin lezyonların anatomik dağılımı ve klinik sendrom arasındaki ilişkiler.

Şekil 2: β -amiloyid prekürsor proteininin (APP) çizimi.

Şekil 3: f-tau için ROC eğrisi

Şekil 4: $A\beta_{1-42}$ için ROC eğrisi

Şekil 5: $A\beta_{1-40}$ için ROC eğrisi

Şekil 6: Olgu ve kontrollerin f-tau değerleri

Şekil 7: Olgu ve kontrollerin $A\beta_{1-42}$ değerleri

Şekil 8: Olgu ve kontrollerin $A\beta_{1-40}$ değerleri

Şekil 9: Olgu ve kontrollerin MTT abzorban ortalamaları (450 nm'de)

Şekil 10: Olgu, kontrol ve örnek eklenmemiş saf hücre hattının MTT abzorban ortalamaları (450 nm'de)

Şekil 11: Olgu ve kontrol BOS örneklerini içeren hücre hattının canlı kalım yüzdeleri

KISALTMALAR

MSS: Merkezi sinir sistemi

AH: Alzheimer hastalığı

HKB: Hafif kognitif bozukluk

MCI: Mild cognitive impairment

AP: Amiloyid plak

NFY: Nörofibriller yumak

f-tau: Fosforile tau

t-tau: Toplam tau

AEİ: Asetilkolin esteraz inhibitörü

NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

BOS: Beyin omurilik sıvısı

ELISA:Enzym linked immunabsorbant assay

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

DSM-III:Diagnostic and Stastistical Manual of Mental Disorders, 3. versiyonu

MAH: Muhtemel Alzheimer hastalığı

MMDT: Mini mental durum testi

BDS-BHK: Blessed demans skalası-Bilgi hafız konsantrasyon alt grubu

GBÖ: Global Bozulma Ölçeği

DKEÖ: Demansın Klinik Evrelendirme Ölçeği

MAP: Mikrotübül asosiye proteinler

A β : Amiloyid beta protein

APP: Amiloyid prekürsör protein

AR-LAB: Araştırma laboratuvarı

f₁₈₁ tau: Threonin 181'de fosforile olmuş tau

PBS: Phosphorylated buffer solution (Fosforile edilmiş tampon çözelti)

JCH: Jakob-Creutzfeldt hastalığı

ALS: Amiyotrofik Lateral Skleroz

LCD: Lewy cisimcikli demans

ÖNSÖZ

Nöroloji'yi öğrenme çabama, bilgi ve deneyimleriyle yapmış oldukları katkılardan dolayı sevgili hocalarım Prof.Dr.Fethi İdiman, Prof.Dr.Egemen İdiman, Prof.Dr.Ahmet Genç, Prof.Dr.Kürşad Kutluk, Prof.Dr.Bariş Baklan, Prof.Dr.Raif Çakmur, Doç.Dr.Görsev G. Yener, Doç.Dr.Güliden Akdal, Doç.Dr.Vesile Öztürk, Yrd.Doç.Dr.İhsan Ş. Şengün, Yrd.Doç.Dr. İbrahim Öztura'ya, tezimin hazırlanmasındaki emek ve desteğini daima hatırlayacağım Doç.Dr.Görsev G. Yener'e, uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini her zaman gördüğüm Uzm.Dr.Serkan Özakbaş ve Uzm.Dr.Beril Dönmez'e, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Dr.Huriye Aydın, Dr.Müslüm Yılmaz, Dr.Burak Yuluğ, Dr.Fatma Küçük, Dr.Burak Paköz, Dr.Bülent Ünlü, Dr.Nazan Pekcan, Dr.Burcu Uğurel, Dr.Utku Uysal, Dr.Sevgi Sayın, Dr.Füsün Boyacıoğlu, Dr.Görkem S. Kösehasanoğulları, Dr.Gökhan Gürel, Dr.Ahmet Evlice ve tüm Nöroloji kliniği çalışanlarına, tez çalışmam sırasındaki yardımlarından dolayı Dr.Şermin Genç, Dr.Kemal Kürşad Genç, Yrd.Doç.Dr.Leyla İyilikçi'ye, AR-LAB'da çalışmam sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen tüm AR-LAB çalışanlarına, istatistiklerimi yaparken sorularımı sabırla yanıtlayan Dr.Pembe Keskin'e, bu çalışmada yer alan Alzheimer hastalarına ve kontrol grubunu oluşturanlara teşekkür ederim.

Dr.Erdem Yaka

İzmir - 2004

1. ÖZET

ALZHEİMER HASTALIĞINDA BEYİN OMURİLİK SIVISINDA (BOS) BİYOLOJİK BELİRTEÇLER VE BOS'UN PC 12 HÜCRE HATTI CANLILIĞI ÜZERİNE İN VİTRO ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Erdem Yaka

Giriş ve amaç: Günümüzde, Alzheimer hastalığının (AH) kesin tanısı ancak post-mortem beyin incelemesi ile konulabilmektedir. Yaşayan bir hastada kesin AH tanısı koyabilecek hiçbir laboratuvar incelemesi yoktur. Bu konuda özelleşmiş merkezlerde, AH tanısı klinik ölçütlerle % 90 doğrulukla konmakla birlikte, her sağlık merkezinde uygulanabilecek, kesin tanı koymayı hedefleyen laboratuvar belirteçlerine ulaşmak için çalışmalar devam etmektedir. Son bilgiler ışığında, duyarlılık ve özgüllükleriyle ön plana çıkan üç BOS belirteci vardır: $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ve f-tau. Çalışmamızda bu belirteçlerin olgu ve kontrollerde BOS düzeyleri, ELISA yöntemiyle belirlenmiş, klinik tanı esas alınarak özgüllük ve duyarlılıkları, laboratuvarımız için hesaplanmıştır. Ayrıca, 'Muhtemel Alzheimer hastalığı' (MAH) olgularının BOS'larının PC12 hücre hattına sitotoksik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla hücre hattına AH ve kontrol BOS'larının eklenmesinden sonra, hücre canlılığı, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testiyle değerlendirilmiş ve gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Yöntem: Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı Demans Polikliniği hastaları arasından seçilmiş 15 Alzheimer hastası ve nörolojik bir sorunu olmayan, herhangi bir cerrahi girişim nedeniyle spinal anestezi uygulanması gereken hastalar arasından seçilmiş 15 kontrol dahil edilmiştir. AH olgularının ve kontrollerin her birinden, lomber 4-5 aralığından lateral dekubit pozisyonunda 2.5 cc BOS alınmıştır. Örnekler, Araştırma Laboratuvarı'nda (AR-LAB) çalışılmıştır.

Bulgular: Alzheimerli olguların ve kontrollerin BOS belirteçleri ortalamaları karşılaştırıldığında, olguların $A\beta_{1-40}$ ortalamalarının kontrollerin ortalamalarından anlamlı olarak düşük olduğu ($p=0,014$), f-tau değer ortalamalarının olgularda anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,04$). Alzheimerli olguların $A\beta_{1-42}$ ortalamaları ise kontrollerden farklı bulunmamıştır ($p=0,054$). Olgularda, f-tau'nun ayrıca, hastalık süresi ile orta güçlükte pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Spearman $Rho=0,575$; $p=0,025$). Canlı kalan hücre sayısı ortalamaları değerlendirildiğinde, olguların canlı kalan hücre sayısı ortalamasının da kontrollerden farklı olmadığı izlenmiştir ($p=0,056$).

Sonuç: Bu çalışmada, f-tau'nun, klinik tanı ölçütleri esas alındığında, en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe ulaşan BOS belirteci olduğu saptanmıştır (duyarlılık %73.3, özgüllük %80). Olası başka bir çalışmada kullanılabilme üzere, AH'de BOS f-tau eşik değeri (74,34 pg/ml) laboratuvarımız için belirlenmiştir. AH'li BOS'ların PC12 hücre hattına sitotoksik etkisi gösterilememiştir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlar geniş olgu serilerinde bu sonucun değişebileceğini düşündürmüştür. Ayrıca sitotoksitenin serum ve idrar örneklerinde araştırılması uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, BOS belirteçleri, sitotoksite, PC 12 hücre hattı.

2. İNGİLİZCE ÖZET

BIOCHEMICAL MARKERS IN CEREBROSPINAL FLUID (CSF) AND EVALUATION OF THE EFFECT OF CSF ON PC 12 CELL LINE VIABILITY IN ALZHEIMER'S DISEASE

Dr.Erdem Yaka

Background and objectives: The definite diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is based on post mortem pathological examination. To date, there is no laboratory test that can discriminate patients with AD from healthy individuals. Although, there is a relatively high accuracy rate of the clinical diagnosis of AD (~ %90) in expert research academic centers, the studies which aim to find out pathognomonic laboratory markers available for AD still continue. In the perspective of recent knowledge, there are three CSF markers which have the highest sensitivity and specificity: $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ and p-tau. In this study, concentrations of these markers in CSF were quantified using the ELISA assays and the sensitivity and specificity for our laboratory were determined. Also, the effects of 'Probable Alzheimer's Disease' (PRAD) patients' CSF on the survival of PC12 cell line were assessed. For that purpose, cell line viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test and the results were compared between groups.

Method: In the present study, 15 PRAD patients and 15 control subjects were included. PRAD patients were selected from the patients of Dokuz Eylül University Neurology Department Dementia outpatient clinic and control subjects were selected from the patients who were undergone epidural anesthesia because of any surgical operation. The control subjects did not have any neurological complaint. Lumbar CSF samples, which were obtained using a standardized protocol, were studied in Research Laboratory (RES-LAB).

Results: There was a significant decrease of $A\beta_{1-40}$ ($p=0,014$) and increase of p-tau ($p=0,04$) in patients with AD when compared with controls. $A\beta_{1-42}$ concentration was not significantly different between groups ($p=0,054$) There was a positive correlation between duration of the

disease and CSF of p-tau concentration in patients with AD (Spearman $Rho=0,575$; $p=0,025$). There was no significant difference in cell line viability values between groups ($p=0,056$).

Conclusion: In this study, it is concluded that when the clinical diagnostic criteria is taken into consideration, the CSF marker which has the highest sensitivity and specificity is p-tau (%73.3, %80). CSF p-tau cut off value (74,34 pg/ml) for our laboratory is determined for further studies. The cytotoxic effect of PRAD patients' CSF on PC12 cell line is not demonstrated; but, in larger series this finding may change, since there is a trend to show toxicity of CSF in AD. Further studies on cytotoxicity in serum or urine are also needed to clarify possible peripheral toxic agents in AD.

Key words: Alzheimer's disease, CSF markers, cytotoxicity, PC 12 cell line



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Demans, erişkin MSS'nin edinsel nedenlerle hasarlanması sonucu, bilinç bulanıklığı olmaksızın, birden fazla kognitif alanın bozulmasına ve bununla ilintili olarak günlük yaşam aktivitelerinin eskisi düzeyinde sürdürülememesine neden olan, doğal seyri açısından kalıcı, sıklıkla da ilerleyici bir klinik tablodur (1). Demans sendromları içerisinde en sık görüleni Alzheimer hastalığıdır (AH) (2).

AH'nin tanısı konusunda klinik bulgulara dayanan ölçeklerin kullanımı, %80-90 (9-10) özgüllük ve duyarlılık sağlamaktadır. Kesin tanıyı koymayı hedefleyen biyolojik belirteçlerin duyarlılık ve özgüllüğü ancak bu düzeye ulaşmakta ya da biraz geçmektedir. Toplam tau, $A\beta_{1-40}$, ve $A\beta_{1-42}$ gibi bazı ölçeklerin kombine kullanımı (17,18,19) ya da son olarak bildirilen belirteç olan f-tau'nun tek başına (15,16) kullanımı bu oranları yükseltmektedir. Son yıllarda sözü edilen bu belirteçleri ($A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ve f-tau) birbirleriyle kıyaslayan bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Bu amaçla, bu çalışmada klinik ölçeklerle 'Muhtemel Alzheimer hastalığı' (MAH) tanısı almış olgularda biyolojik belirteç olan $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ve f-tau BOS düzeylerini ELISA yöntemiyle belirledik. Bu belirteçlerin laboratuvarımız için özgüllük ve duyarlılıklarını araştırdık.

Kesin tanısı histopatolojik kanıtlarla ortaya konan AH'de iki patolojik gösterge olan amiloid plak (AP) ve nörofibriller yumağın (NFY) nöronal hücrelere toksik etkileri bildirilmiştir (82). Ayrıca, Alzheimer hastalığında beyinde nörotoksik etkili ajanların varlığı bilinse de (18) bu konuda beyin omurilik sıvısı örneklerinin nöronal hücreler üzerine in vitro etkileri net değildir. Alzheimer hastalarının serum IgG örneklerinin sıçanlarda in vivo kolinerjik nöronlara toksik etkisi olduğu bildirilmiştir (21). Ancak beklenenin tersine Alzheimer hastalarının BOS ve beyin örneklerinin in vitro hücre canlılığı üzerine, arttırıcı etkisinden söz eden yayın da mevcuttur (22). Bunun dışında diğer nörolojik hastalıklarda da serum/BOS örneklerinin nöron gelişimini ve canlılığını azaltıcı etkisi olduğunu saptayan çalışmalar vardır. Parkinson hastalığında BOS örneklerinin sıçan dopaminerjik nöronlarına (23,24), multipl skleroz idrar örneklerinin in vitro

sıçan glia kültürlerine (25,26) ve nöropatisi olan diyabet hasta serum örneklerinin in vitro sıçan arka kök ganglion nöronlarına toksik etkisi (27) bildirilmiştir.

Bu çalışmanın ikinci bir amacı olarak da MAH olgularının BOS'larının PC12 hücre hattına sitotoksik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada, bu amaçla hücre hattına AH ve kontrol BOS'larının eklenmesinden sonra hücre canlılığı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testiyle değerlendirilmiş ve gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Bu sonuçlar ışığında, Alzheimer hastalarının BOS örneklerindeki biyolojik belirteçler kontrol BOS'larındaki değerler ile karşılaştırılmış, Alzheimerli bireylerin BOS'larının hücre hattına sitotoksik etkisinin olup olmadığı tartışılmıştır.

AH'de BOS sitotoksitesini araştıran bu araştırma, ayrıca $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ve f-tau gibi önemli üç belirteci karşılaştıran ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tanım

Alzheimer hastalığı (AH), bellek ve en azından bir diğer kognitif alandaki ilerleyici bozulmanın, demansın başka tanımlanabilir sebepleri olmaksızın, sosyal, profesyonel ve evle ilgili işlerde önceki düzeye göre yitimin olduğu klinik durumu tanımlamak için kullanılır (33). Günümüze kadar demansın tanı kriterleri farklılıklar göstermiştir (29,30). Demans sendromları içinde en sık görüleni olan AH'nin tanı kriteri olarak günümüzde yaygın biçimde NINCDS-ADRDA (Tablo 1) kullanılır. NINCDS-ADRDA kriterleri bellek veya lisan görsel-uzaysal yetiler veya yürütücü işlevler gibi bilişsel işlevlerde bozulmayı şart koşar (28). Kriterlerin gerçekleştirildiği tipik tabloya NINCDS-ADRDA ile 'Muhtemel Alzheimer hastalığı' (MAH) denmektedir. Özelleşmiş kliniklerde yapılmış olan postmortem çalışmalara göre, NINCDS-ADRDA tanı kriterine göre tanı doğruluğunun %90'a yaklaştığı görülmüştür (1,34,35,36).

AH'nin tanısını koymada işlevselliği ve davranış bozukluğunu yansıtan öykü ile kognitif baki çok önemlidir. İzlemde kullanılan birkaç standart test ve ölçek arasında en yaygın olanları 'Mini Mental Durum Testi' (MMDT) (31) ve 'Blessed Demans Ölçeği (Bilgi hafıza konsantrasyon alt grubu)' (BDÖ-BHK) (32), 'Global Bozulma Ölçeği' (GBÖ) dir (72). Bu testler, demans veya kognitif bozukluk için bir tarama aracı olabilir ve zaman içinde entelektüel durumdaki kötüleşmenin bir ölçütü olarak işlev görürler (28).

Tablo 1: NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığı Klinik Tanı Kriterleri

I. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri şunları içerir:

- klinik muayene ile saptanan, Mini-Mental Test, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dokümanite edilen ve nöropsikolojik testlerle de doğrulanan demans tablosu;
- iki ya da daha fazla bilişsel süreçte bozulma;
- bilinç bozukluğu yok;
- başlangıç 40-90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra;
- bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok.

II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:

- dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulma;
- günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme;
- ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa);
- laboratuvarında:
standart tekniklerle normal lomber ponksiyon,
EEG'nin normal olması ya da yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler,
BT'de serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi.

III. Alzheimer hastalığı dışındaki nedenler dışlandıktan sonra, MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı ile uyumlu olabilecek diğer klinik özellikler şunlardır:

- hastalığın seyirinde platolar;
- depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halüsinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik patlamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlikçi bulgular;
- bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, miyoklonus ya da yürüme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar;
- hastalığın ileri evresinde nöbetler;
- yaş için normal BT.

IV. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısını belirsizleştiren ya da ihtimal dışına çıkaran özellikler şunlardır:

- inme tarzında ani başlangıç;
- hemiparezi, duysal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi lokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerin de bulunması;
- nöbetler ya da yürüyüş bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması;

V. MÜMKÜN Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri şunlardır:

- demansa neden olabilecek diğer nörolojik, psikiyatrik ya da sistemik bozukluklar olmaksızın, başlangıç, prezentasyon ya da klinik seyirde varyasyonların bulunması durumunda konulabilir;
- demansa neden olabilecek, ancak demansın nedeni gibi görünmeyen ikinci bir sistemik ya da beyin hastalığının bulunması durumunda konulabilir;
- diğer belirlenebilir nedenlerinin dışlandığı, tek ve yavaş ilerleyici bir bilişsel bozukluğun bulunması durumunda, araştırma çalışması amaçlı olarak kullanılabilir.

VI. KESİN Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri şunlardır:

- muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri;
- biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar.

4.2. Klinik

AH ilerleyici bir hastalık olması nedeniyle, klinik bulgularının hastalığın seyrine bağlı olarak sınıflandırılması mantıklıdır. Günümüzde sık olarak kullanılan iki evrelendirme sistemi vardır. Bunlardan birincisi 'Global Bozulma Ölçeği' (GBÖ) dir. AH'ye özgüllüğü nedeniyle AH dışı demanslarda kullanılmaz. Evreleri 1-7 arasında değişir. GBÖ 1, yakınması ve muayene bulgusu olmayan, GBÖ 2 unutkanlıktan yakınan ancak testleri normal olan sağlıklı yaşlıya karşılık gelirken öznel yakınmaları olan ve testlerde bozukluk saptanan GBÖ 3 ise HKB'yi ifade eder. GBÖ 4 hafif, GBÖ 5 orta, GBÖ 6-7 ağır AH evrelerini belirtir (1).

Hafif evre AH'de hasta sözlerini tekrarlar; kelime bulmakta zorluk çeker; ev işlerini yapabilese de eski özenini gösteremez; yakından tanıdığı insanların isimlerini unuttur; eşyalarının yerlerini anımsayamaz; banka işleri gibi mali işlerde hatalar yapar; giyinmek, yıkanmak, temel hijyende henüz sorun yoktur; sosyal uygunluk korunmuştur. Bellekteki bozulma seçici olarak yakın geçmişteki olay ve deneyimleri kapsarken, buna kıyasla çocukluk ile ilgili uzak olaylar ve duygusal ağırlığı olan yeni olaylar göreceli olarak daha iyi hatırlanabilir. MMDT skoru kabaca 20-24 arasında olabilir. Bu hastaların heteromodal korteksinde NFY'ler, limbik sistemde nöritik AP'ler saptanır (1).

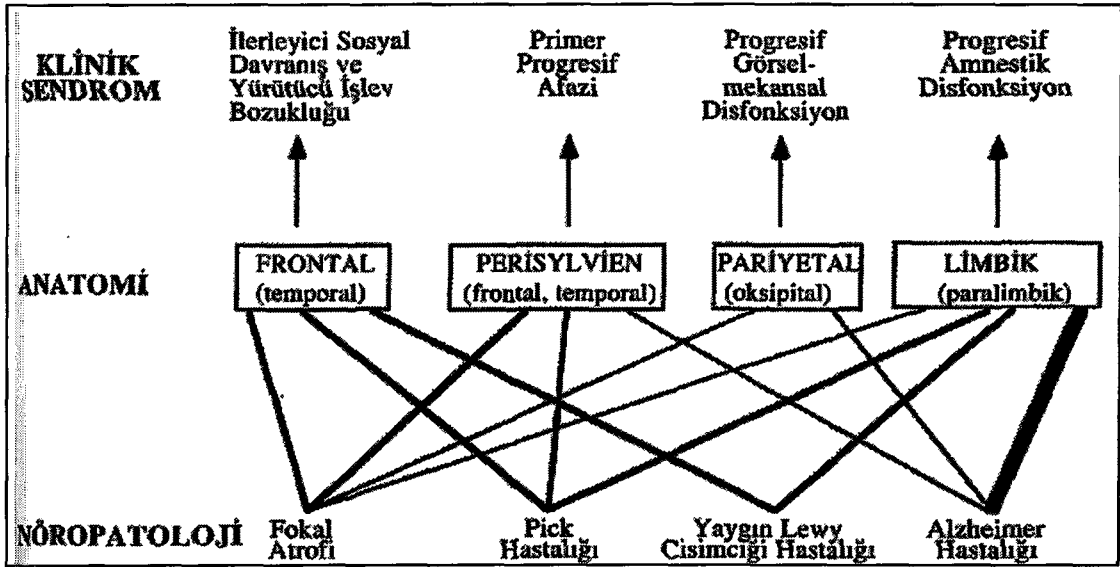
Hastalığın orta evresinde lisan, yargılama, mekan oryantasyonu ve yürütücü işlevler ile ilgili diğer bölgelerdeki kusurlar tam olarak ortaya çıkmaya başlar ve günlük yaşam aktivitelerini yürütmek konusunda zorluklar artar. Unutkanlığın şiddeti artmaya devam eder; yemek pişirme, ev işlerini görme, faturaları ödeme ve araba kullanmada bağımsızlık kademeli olarak bozulur. Yargılama ve içgörü bozulur. Genellikle uyku-uyanıklık döngüsünde bozulma, günün sonuna doğru kognitif ve davranışsal belirtilerde kötüleşme, genel görünüm ve hijyende bozulma ve hezeyanlar (genellikle eşlerin sadakati ve yanlış yere konulan eşyaların çalınması ile ilişkili), hallüsinasyonlar, ajitasyon gibi psikiyatrik belirtiler ortaya çıkabilir. Sağlıklı eşe (veya başka bir önemli kişiye) giderek daha yoğun bir şekilde bağımlı olma hastalığın bu evresinde oldukça tipiktir (33). MMDT skoru 10-19 arasında değişir.

Hastalığın son evresi inkontinans, aile bireylerini tanıyamama ve hareket etme ve beslenmede güçlük ile kendini belli eder. Kognitif, sosyal davranışta maksimum düzeyde bozulma

mevcuttur. Primer duysal ve motor işlevler hastalığın seyrinde geç dönemlere kadar göreceli olarak sağlam kalabilir ama miyokloni, rijidite, dişli çark, bradimimi ve dengesizlik gibi ekstrapiramidal bulgular giderek daha sık hale gelir. MMDT skoru 0-9 arasındadır. Ölüm genellikle enfeksiyona bağlı komplikasyonlardan olur.

AH'nin, bahsedildiği şekilde olan tipik seyrine uymayan, patolojik olarak AH'si kanıtlanmış hastalarda başka klinik şekiller de bildirilmiştir. Hastalığın 14. ya da 1. kromozomda mutasyonlar ile beraber görülen erken başlangıçlı şekillerinde, motor kusurlar ve kişilik değişikliği erken dönemde ortaya çıkabilir (37). Diğer hastalarda, olfaktor, görsel, işitsel şekillerde duysal kusurlar hastalığın ilk evresinde mevcut olabilir (38,39). Çok küçük bir hasta grubunda, AH'nin tipik nöropatolojisi ilerleyici yarı mekan ihmali, ilerleyici afazi ve hatta myoklonik epilepsi ile birlikte görülebilir. AH nadiren, kayda değer başka bir kognitif bozukluk eşlik etmeksizin yirmi yıl boyunca sinsiyirle ilerleyen izole bellek bozukluğuna sebep olabilir (40). Bu AH için olağan dışı klinik tablolar AH patolojisinin eşit derecede olağan dışı anatomik dağılımlarını temsil ediyor olabilir (Tablo 3) ya da AH tanısı bu hastalarda hatalı olabilir.

Nörodejeneratif hastalıklar, bilişsel işlevlerde hayati önem taşıyan limbik sistem ve asosiyasyon alanlarında nöron ve sinaps kaybıyla dejenerasyona yol açarlar. Nörodejenerasyon, AH'de olduğu gibi bahsedilen alanlara sınırlı kalırsa, ya klinik tablo ağırlıklı olarak demans ya da izole demans olarak kalır. Fakat dejenerasyon motor sistemi de etkilerse Lewy cisimcikli demansta olduğu gibi parkinsonizm, Huntington hastalığında olduğu gibi kore demansa eşlik edebilir ya da demans kliniğinden daha ağırlıklı bir klinik tablo yaratabilir. Klinik bulgular çok önemli olmakla birlikte bazen AH tanılı demans olgusu başka bir nörodejeneratif hastalığa sahip olabilir. Bununla beraber yaşadıkları süre içerisinde yakınları ve doktorları tarafından normal olarak nitelendirilen fakat postmortem incelemede AH'nin patolojik tanısını düşündürür bulguları olan olgu sunumları da bildirilmiştir (41,42).



Şekil 1: Nöropatolojik antiteler, en belirgin lezyonların anatomik dağılımı ve klinik sendrom arasındaki ilişkiler. Çizgilerin kalınlığı ile ilişkinin kuvveti orantılıdır. Sendromun çekirdeğini oluşturan anatomik alanlar büyük harflerle, daha az sıklıkla ama genellikle tutulan alanlar parantez içinde gösterilmiştir (33).

4.3. Laboratuvar

AH'nin kesin tanısı ancak post-mortem beyin incelemesi ile konulabilir. Henüz yaşayan bir hastada kesin AH tanısı koyabilecek hiçbir laboratuvar testi yoktur. Ancak yaşayan hastada AH tanısını kesinlikle koyabilecek biyolojik belirteçlerin araştırılması yoğun olarak sürmektedir. Daha önceden ileri sürülen aday belirteçler arasında, PET veya SPECT ile saptanan pariyetotemporal hipometabolizma (43), MR'da hipokampus hacminin azalması (44), tropikamid uygulamasına abartılı pupilla cevabını (45), apolipoprotein e4 alellerinin varlığı (46), belli A β amiloid parçacıklarının beyin omurilik sıvısında (BOS) azalması (11,47) ve nöronal ipliksi proteinlerin (48) veya BOS tau (11) düzeylerinin artması bulunmaktadır. Bu testlerin hiçbiri AH ile bire bir bir ilişki sağlamaz; pariyetotemporal hipometabolizma ve hippocampus atrofisinin başka sebepleri olabilir, demansı olmayan hastalar tropikamide anormal pupilla cevabı verebilir ya da AH e4 alelleri bulunmadan da gelişebilir ve demanslı ile demanssız bireyler arasında BOS tau, A β ve nöronal ipliksi protein düzeyleri arasında belirgin bir örtüşme vardır. AH'nin sporadik şekilleri için

güvenilir tanı testleri olmamasına rağmen, demans için kuvvetli aile öyküsü olan hastaların 1. ve 14. kromozomunda AH'ye sebep olan presenilin genlerine ait dominant olarak kalıtılmış mutasyonları saptamak artık mümkündür. Bu tür mutasyonların çocuklara geçişi hemen hemen tam olduğundan pozitif sonuç saptanması AH için tanı koydurucudur.

4.4. Nöropatoloji

AH için patognomonik bir belirteç yoktur (1). NINCDS-ADRDA tanı kriterlerine göre kesin AH tanısı için NFY ve AP'lerin patolojik olarak saptanması gerekli, ancak yeterli değildir. Her iki bulgu da sağlıklı yaşlılarda ve bazı nörodejeneratif hastalıklarda izlenebilmektedir. AH'nin kesin tanısı için gereken, bu iki bulgunun varlığından çok belli nöroanatomik lokalizasyonlarda ve belli miktarlarda bulunmalarıdır. Altmış yaşından sonra hemen herkeste neokortikal amiloyid plaklar ve limbik nörofibriler yumaklar gelişmeye başlar. Ancak son araştırmalar NFY'lerin neokorteks, AP'lerin limbik sistemde görünür olmalarının AH için %100'e yaklaşan duyarlılık ve özgüllük ortaya koyduğunu göstermiştir (1).

AH nöropatolojisini oluşturan değişiklikler arasında 1) NFY, 2) AP, 3) Gliyozis ve enflamasyon, 4) Nöron kaybı, 5) Sinaps kaybı, 6) Kolinerjik innervasyon kaybı, 7) Diğer nörotransmitterlerin kaybı yer alır.

4.4.1. Nörofibriler yumak (NFY)

NFY'lerin temel bileşeni hiperfosforile tau proteindir. Tau, 17. kromozom tarafından kodlanan mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ailesinden bir protein (1) olup mikrotübüllerin stabilizasyonu, hücre iskeleti bütünlüğü ve aksonal iletide önemli rol oynar. AH patogenezinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau çözülemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Bunlar zamanla sinir hücresi içinde NFY'ler şeklinde yoğunlaşırlar. NFY'ler sonunda hücre iskeleti bütünlüğünü ve aksonal iletici bozarak hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstrasellüler NFY'ye 'hayalet yumak' denir.

AH'de nörofibriler dejenerasyon belirli bazı bölgelere lokalizedir. NFY'ler 60 yaş civarında, Meynert'in bazal çekirdeğinde ve entorinal-transentorinal korteks, amigdala ve hipokampus gibi temporal lobun limbik bileşenlerinde belirir (33). AH'de NFY oluşumu, aksonal bağlantı yolları boyunca, önce diğer paralimbik ve komşu temporal alanlara, sonra daha uzaktaki neokortikal asosiasyon alanlarına ve sonra da primer duysal ve motor alanlara yayılmaktadır. AH'nin bütün seyri boyunca, çekirdek limbik alanlar yüksek miktarda NFY bulundurmaya devam ederler. Klinik olarak sessiz düşük limbik evreden, yüksek neokortikal evredeki son dönem demansa doğru seyir 50 yıl kadar uzun sürebilir (49).

Heteromodal neokortikal alanlarda, NFY'lerin varlığına rağmen demansı bulunmayan nadir hasta bildirimleri, NFY dağılımı ile kognitif durum arasında olduğu söylenen sıkı korelasyonla uyumsuzdur (33). Bunun için olası bir açıklama, bu hastaların hastalık öncesi istisnai derecede yüksek bir zihinsel işlevsellik düzeyinden, mutlaka demans kriterlerini doldurmaları gerekmeksizin, kayda değer bir düşüş göstermiş olabilecekleridir.

BOS'daki toplam tau (t-tau) proteinin yoğunluğunun artması, olasılıkla nöron harabiyetinin şiddetini belirtir. İskemik inme gibi akut etkilenmelerde BT'deki enfarkt alanının büyüklüğü ile doğru orantılı olacak şekilde BOS toplam tau protein konsantrasyonunda geçici bir artış olur (53). Jakob-Creutzfeldt hastalığında (JCH) olduğu gibi şiddetli nöron harabiyetinin olduğu hastalıklarda BOS'daki toplam tau protein yoğunluğu en yüksek düzeyine ulaşır (54). AH'deki yükselme orta düzeydedir. Depresyondaki hastalarda bakıldığında bunun normal değerlerde olduğu görülmüştür (55).

AH için son olarak tespit edilmiş biyolojik belirteç fosforile tau'dur (f-tau). Fosforile tau proteinin değişik epitoplarını (threonin 181 ve 231 (9), threonin 181 (56), threonin 231, serin 235 (57), serin 199 (57), serin 296 ve 404) saptamak için birkaç ELISA yöntemi geliştirilmiştir (58). Olasılıkla BOS'daki f-tau konsantrasyonu beyindeki f-tau miktarını belirtir. Toplam tau'nun aksine iskemik inmede f-tau miktarında bir değişiklik olmaz (59). Ayrıca Jakob-Creutzfeldt hastalığında da BOS toplam tau konsantrasyonunda artış olmasına rağmen f-tau miktarında bir değişiklik olmaz (60). Bütün bu bulgular, f tau'nun t-tau gibi

nöron harabiyetini gösteren bir belirteç olmadığını gösterir. F-tau, beyindeki tau'nun fosforile olmuş şeklinin, dolayısıyla AH'deki NFY'nin göstergesi olarak değerlendirilebilir.

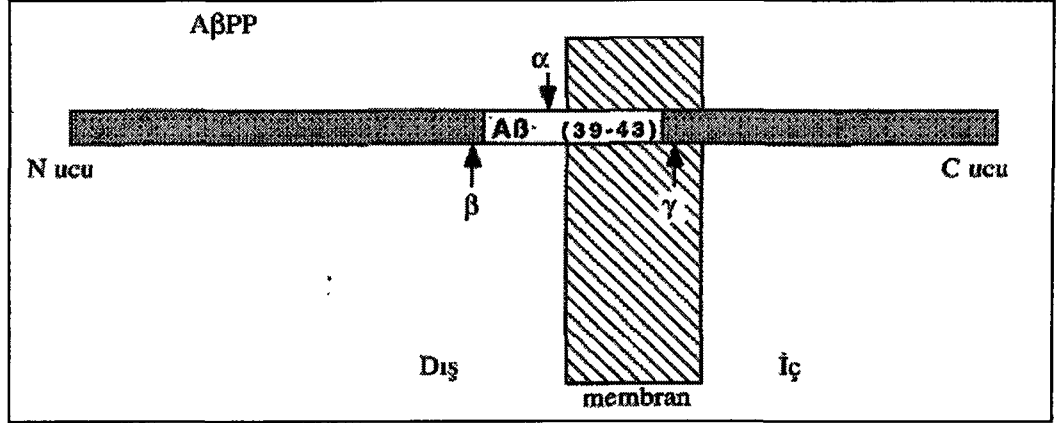
4.4.2. Amiloyid plak (AP)

Amiloyid plakların temel bileşeni amiloyid beta proteindir ($A\beta$) (67). $A\beta$, 19. kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak anlaşılammış bir transmembran protein olan amiloyid prekürsör proteinin (APP) metabolizma ürünlerindedir.

APP metabolizmasında α , β ve γ sekretazlar olarak adlandırılan üç proteaz iş görür (Şekil 1). α -sekretaz APP'yi, $A\beta$ bölgesinin ortalarına rastlayan ekstrasellüler bölgede keserek tam bir $A\beta$ parçasının oluşumunu olanaksız kılarken, β ve γ sekretazlar etkilerini, sırasıyla, $A\beta$ bölgesinin hemen dışındaki, N- ve C- uçlarında göstererek, bütün $A\beta$ 'yi içeren bölünme ürünleri ortaya çıkartırlar (Şekil 1). γ -sekretaz'ın etkinlik gösterdiği kesim bölgesine göre, oluşan $A\beta$ parçası, kısa (39-40 aminoasit) veya uzun (42-43 aminoasit) olabilir. Uzun $A\beta$, çözünürlüğü olmayan lifler oluşturmaya daha yatkındır ve nörotoksisite olasılığı daha yüksektir. Potansiyel olarak çözünürlüğü olmayan ve plaklara çökelebilen diğer bir APP parçası, α ve γ sekretazların ortak etkisiyle oluşan $A\beta$ 17-42 parçasıdır. Sonuç olarak, α sekretaz aktivitesiyle hücre kültürlerinde nöronlar üzerinde nörotrofik etkileri gösterilmiş olan çözünebilir APP oluşurken, β ve γ sekretazların aktiviteleri sonucunda belirgin derecede bölgesel nörotoksik etkiler çıkartan katı ve nöritik β kıvrımlı plaklar (agregatlar) oluşmaktadır (50). Bu β kıvrımlı plakların serebral neokortekste bol veya orta yoğunlukta gösterilmeleri AH'nin kesin tanısı için gerekmektedir (51).

Gerek BOS'ta çözünür durumda olan $A\beta$ 'ların gerekse beyin dokusunda bulunan $A\beta$ 'ların, karboksi ve amino uçlarındaki heterojeniteye bağlı olarak, farklı tipleri vardır (63). En çok bulunan tipi $A\beta_{1-40}$ olup (> % 60-70) daha sonraki $A\beta_{1-42}$ 'dir (~ %15). Bunların yanısıra $A\beta_{1-28}$, $A\beta_{1-33}$, $A\beta_{1-34}$, $A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$ gibi daha az oranda bulunan formları vardır (64). Genetik çalışmalarda $A\beta_{1-42}$ ile AH arasında bir bağ bulunmuş olmasına rağmen, $A\beta_{1-40}$ 'ın AH patogenezindeki rolü için o denli net bağlantılar saptanamamıştır (65). Bunun yanısıra yapılan bazı çalışmalarda ileri evre AH'lerin serebral damarlarında biriken amiloyidin büyük ölçüde

$A\beta_{1-40}$ peptidi olduğu gösterilmiştir (65,66). Sonuçta periferik dokularda biriken $A\beta_{1-40}$ peptidi bu nedenle BOS'ta azalıyor olabilir.



Şekil 2: β -amiloyid prekürsör proteininin (APP) çizimi. "Dış" ve "iç" hücre dışı ve hücre içi bölmeleri tanımlamak için kullanılıyor (33).

AH, genetik açıdan kompleks bir nörolojik hastalık olarak nitelenmektedir. Birden fazla kromozomdaki gen lokuslarının farklı mutasyonları aynı hastalığa yol açmaktadır. Otozomal dominant geçişten sorumlu bulunan üç gen: APP geni (21. kromozom), presenilin 1 geni (14. kromozom) ve presenilin 2 geni'dir (1. kromozom). Bu genlerdeki mutasyonlar her durumda APP'den metabolize edilen $A\beta$ proteinin atılmayıp amiloyid plaklar içinde biriken daha uzun bir şeklinin üretimine artışına yol açmaktadır. Bu gen mutasyonunu taşıyan ailelerin sayısı çok az olsa da, Down sendromuyla AH arasındaki ilişkiyi ortaya koyması, AH patogenezinin açıklığa kavuşturulması açısından önemlidir. Down sendromlular 21. kromozomun 3 kopyasını taşırlar (trizomi 21). Fazla kopya nedeniyle fazla sayıda APP üreten bu hastaların çoğu, 30'lu yaşlardan itibaren AH'nin nöropatolojik değişikliklerini göstermektedirler (1).

Doğrudan belirleyici olarak değil de, sporadik AH'de risk faktörü olarak bilinen, kolesterol taşınmasında rol oynayan bir enzim olan APOE'nin (19. kromozom) üç ayrı allelik formu vardır; ϵ_2 , ϵ_3 ve ϵ_4 . Toplumda ϵ_3 sıklığı %70 olarak görülürken, ϵ_4 sıklığı %20'dir. AH'de bu oran %40'a çıkmaktadır. ϵ_4 AH riskini doza bağlı bir şekilde artırır ve hastalık başlangıç yaşını azaltır (1). Her ne kadar $A\beta_{1-40}$ 'ın $A\beta_{1-42}$ 'ye oranla AH patogenezindeki rolü çok net değilse de (65,66); APOE'nin amiloyid birikimi üzerine etkisini araştıran çalışmalarda

APOε4'ün Aβ₁₋₄₂ birikiminden çok Aβ₁₋₄₀ birikimine yol açtığı saptanmıştır. APOε4'ün Aβ₁₋₄₀'ın fibrilizasyon eşiğini düşürerek etki gösterdiği düşünülmektedir (85,86).

AH BOS Aβ₁₋₄₂ konsantrasyonunda AH olmayan olgulara kıyasla belirgin azalma olmaktadır. AH'de BOS'da çözünebilir Aβ₁₋₄₂'nin neden azaldığı belirlenememiştir, ama bu bulgunun peptidin plaklar ve mikrovasküler birikintiler şeklinde kümelenmesine ve çözünürlüğünü kaybetmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Yani, Aβ₁₋₄₂'nin beyne ait hücre dışı sıvılardaki toplam çözünebilir kısmı, ilerleyici Aβ kümelenmesi ve depolanması sırasında belirgin derecede azalmakta ve bu değişiklik düşük BOS düzeyleri şeklinde yansımaktadır. BOS Aβ₁₋₄₂, düzeylerindeki azalma ile post-mortem beyindeki Aβ birikintilerinin derecesi arasındaki bağlantı henüz bilinmemektedir. Ancak eldeki çalışmalar, düşük BOS Aβ₁₋₄₂ düzeylerini yüksek BOS total tau düzeyleri ile karşılaştırmanın, AH'nin klinik tanısı için, her iki değişkeni tek başına ölçmekten daha duyarlı ve özgül olacağını düşündürmüştür (17, 18,19).

Amiloyid plakların ilk birikimi, NFY'lerin tersine limbik sistemde değil neokortekste ve gevşek plaklar şeklindedir. Başlangıçta selim olan bu Aβ birikintilerinin kademeli olarak patojenik nöritik plaklara dönüşmesinde pek çok etken yer alır. Bunlardan en önemlisi, tau proteindir. Tau proteini varlığında Aβ birikintilerinin kademeli olarak patojenik nöritik plaklara dönüştükleri gösterilmiştir (88). Bir diğer neden, Aβ birikintilerinin, selim plağın fiziksel olarak nöritik plağa dönüşmesini başlatan serbest radikal ve diğer reaktif oksijen türlerinin oluşmasını sağlıyor olabileceğidir. Bu olası oksidatif stres açıklaması, vitamin E, selegilin, melatonin ve ginkgo biloba gibi antioksidanların AH'ye yararlı etkileri olabileceğini öne süren hipotezlere bir dayanak oluşturmaktadır

4.4.3. Gliyozis ve enflamasyon

Gevşek plağın katı, nöritik plağa dönüşümü gliyozis ve enflamatuar yanıt eşliğinde limbik ve asosiyasyon neokorteksinde gerçekleşir. Örneğin serebellar gevşek plaklarda aynı dönüşüm olmaz. Mikroglial aktivasyon sitokinlerin salgılanmasını, akut faz yanıtları ve komplemanın aktive edilmesiyle enflamasyonu harekete geçirir. Enflamasyonun serbest radikallerin ortaya çıkışı, oksidatif stres, kalsiyum homeostazı ve mitokondriyal membranda bozulmalar ile birlikte gittiği düşünülmektedir (1).

4.4.4. Nöron ve sinaps kaybı

Demansın saptanabilir en erken evresinde bile entorinal korteksin II. tabaka nöronlarında %50 azalma olduğu, ancak superiyor temporal sulkus kıyılarındaki neokortikal nöronların göreceli olarak korunduğu gösterilmiştir (51). Demans ilerleyip lisan ve diğer kognitif işlevlerde bozukluklar belirmeye başladıkça, nöron kaybı superiyor temporal sulkusta da saptanmaya başlanır. Bu sonuçlar, nöron ölümü yatkınlığının, anatomik olarak NFY oluşumu yatkınlığına benzer bir yayılım gösterdiğini düşündürmektedir.

AH'de demansın ortaya çıkmasına katkıda bulunan diğer bir önemli etken kortikal sinapsların kaybıdır. Sinaps kaybının başlangıcı, doğası ve yerleşimi hakkında net bilgi yoktur. Hem nöron kaybı hem de NFY, Walleriyen dejenerasyon süreci yoluyla ikincil sinaps kaybına sebep olabilir. Ancak, neden sonuç ilişkisi bunun tam tersi yönde de olabilir, primer hasar sinapslardan başlayarak retrograd nöronun hücre gövdesine iletiliyor olabilir. Bu değişiklikler, sonuçta NFY oluşumuna ve/veya hücre ölümüne yol açabilir.

Nöron ve sinaps kaybı hakkında ileri evre AH'li olguların postmortem çalışmaları önemli sonuçlar vermiştir. BT ve MR ile yapılan nicel incelemelerle in vivo nöron kitlesi hakkında daha erken dönemde yaklaşık bir bilgi elde etmek mümkündür. Pek çok ders kitabı, AH'yi resimlerle örneklemek için çarpıcı bir şekilde büzüşmüş bir beyin kullanır ve bu şekilde ağır ve genel bir atrofinin hastalığın tipik bir bileşeni olduğu yönündeki yanlış izlenimi teşvik etmiş olur. Aslında, yaygın atrofi hastalığın son evrelerinde gelişir ve hafif ile orta dereceli demansta BT veya MR'nin yıllarca "belirtilen yaşla uyumlu" olması bir kuraldır (33).

4.4.5. Kolinerjik inervasyon kaybı

Serebral korteksin kolinerjik inervasyonu, limbik sistemin önemli bir bileşeni olan Meynert'in bazal çekirdeğinden başlar (33). Bu yol bellek ve dikkatin nöral kontrolünde önemli bir rol oynar. Sinaptik aralıktan difüzyonla ilerleyen asetilkolin postsinaptik membranda nikotinik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak ise G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir. Nikotinik etkiler hücrenin uyarılabilirliğini arttırarak dikkat tonusunun sağlanmasında rol oynar, muskarinik etkiler kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin depolanması şeklindeki nöroplastisite mekanizmalarına yol açar(1).

Meynert'in bazal çekirdeği, yaşlanma sırasında izole NFY oluşumunun ilk görüldüğü ve tau'nun aşırı fosforlandığı ilk alanlardan biridir. Korteksin kolinerjik inervasyonunda ılımlı bir yaşa bağlı azalma bildirilmiştir ve bu durum yaşa bağlı bellek bozukluklarının ortaya çıkışına katkıda bulunuyor olabilir. Alzheimer hastalığı bazal çekirdekte yaygın NFY oluşumu ve serebral kortekste ağır kolinerjik akson kaybı ile ilişkilidir. Kolinerjik inervasyondaki tükenme daha şiddetli olarak geliyor ve serebral korteksteki diğer nörotransmitterlere özgü sistemlerin azalmasından daha önce gerçekleşiyor gibi görünmektedir. AH'de görülen kolinerjik azalma en çarpıcı olarak limbik sistem ve temporal lobda, en az belirgin olarak primer duysal-motor alanlarda bulunmaktadır.

4.4.6. Diğer nörotransmitter kayıpları

AH'de beyin dokusunda 1970'lerin sonuna doğru ortaya çıkarılmaya başlanan çoğul nörotransmitter değişikliklerinin, ilk tanımlanan kolinerjik işlev kaybının ötesinde çeşitli monoaminerjik ve nöropeptid eksikliklerini içerdiği bilinmektedir (3). Bunlar serotonerjik, noradrenerjik ve dopaminerjik kayıplardır. Gerçekten de morfolojik çalışmalarda, amiloyid taşıyan herhangi bir nöritik plağın çoğul nörotransmitter özgüllüğü gösteren nöronlardan türemiş ve değişikliğe uğramış nöritler içerdiği ortaya konmuştur (3). Bu varsayımlar, asetilkolinesteraz inhibitörleri gibi kolinerjik tedavi uygulanan hastaların bazılarında, neden belirgin bir semptomatik iyileşme olmadığı konusunda bir açıklama sağlamaktadır.

Özetle en yaygın görülen nörodejeneratif hastalık olan AH'de yaygın histopatolojik ve nörokimyasal değişiklikler izlenir ve bu değişikliklerin yarattığı klinik tablo çarpıcıdır. AH'de nesnel ölçütlerin araştırılması ve patogeneze yönelik çalışmalar hastalığın önlenmesini hedefleyen çabaların temelini oluşturmaktadır. Bu çalışmada da, öncelikle Alzheimer hastalarının BOS belirteçlerinin klinik tanı esas alınarak duyarlılık ve özgüllükleri araştırılmış, ayrıca BOS'larının PC12 hücre hattına sitotoksitesisi incelenmiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Araştırmanın tipi: Karşılaştırmalı olgu serisi çalışması yapılmıştır.

5.2. Araştırmanın yapıldığı yer ve araştırmanın zamanı: Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Kliniğinde ve AR-LAB'da Haziran 2003-Ekim 2004 döneminde yapılmıştır. Örnekler Haziran 2003-Temmuz 2004 döneminde toplanmıştır. Araştırmada toplanan BOS örneklerinin laboratuvar incelemeleri Eylül-Ekim 2004 döneminde Araştırma Laboratuvarı'nda (AR-LAB) yapılmıştır. Verinin analizi ve tezin yazımı Ekim-Kasım 2004 döneminde tamamlanmıştır.

Olgular: NINCDS-ADRDA tanı kriterlerine göre 'muhtemel AH' tanısı almış olgular araştırmaya dahil edilmiştir.

Kontroller: Herhangi bir demansiyel semptomu olmayan, olgularla benzer yaş grubundan olan, bir cerrahi girişim için epidural anestezi uygulanan kişiler, kontrol grubu olarak araştırmaya dahil edilmiştir.

5.3. Araştırmanın değişkenleri:

Demografik değişkenler ve alışkanlıkları:

- Yaş: Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- Cins: Kadın ve erkek olarak belirtilmiştir.
- Eğitim yılı: Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- Sigara: Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı zamanki içicilik dikkate alınmıştır.
- Bilişsel durum: MMDT, GBÖ ile değerlendirilmiştir. MMDT skorları 26 ve üstü, işlevselliği tam olan ve GBÖ 1 olan sağlıklı bireyler kontrol grubunu oluşturmuşlardır. MMDT skorları 25 ve altında olan ve GBÖ 4 ile 7 arasında değişen DSM-IV kriterine

göre demans ve NINCDS-ADRDA tanı kriterine göre 'muhtemel AH' tanısını karşılayan olgular AH grubu olarak alınmıştır.

- BOS belirteçleri: A β_{1-40} , A β_{1-42} , f-tau BOS belirteçleri olarak değerlendirilmiştir.

Etik kurul onamı: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 12 Haziran 2003 tarihli 03/11/03 no'lu toplantısı sonucunda çalışmanın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığına dair onay alınmıştır.

5.4. Verinin Toplanması ve İşlenmesi: Olgu grubu, 01.06.2004 ve 01.07.2004 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı Demans Polikliniğinde muayene edilen Alzheimer hastaları arasından seçilmiştir. Olgular hafif, orta, ağır evre Alzheimer hastalarıdır. AH grubundaki olgulardan, lomber 4-5 aralığından lateral dekubit pozisyonda toplam 2.5 cc BOS alınmıştır. Biyokimya tüplerine konan BOS'lar, 1000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edildikten sonra, dipte çökelti halinde olan parçacıklardan arındırılarak AR-LAB'daki derin dondurucuya (-75°C 'de) kaldırılmıştır. Kontrol grubu nörolojik bir sorunu olmayan, herhangi bir cerrahi girişim nedeniyle spinal anestezi uygulanması gereken hastalar arasından seçilmiştir. Seçilen olgularla yüz yüze görüşme yapıp, onamları yazılı olarak alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik bakıyla demansı olmadığı tespit edilen bireylere MMDT uygulanmıştır. Kontrollerden, 2.5 cc BOS spinal anestezi amacıyla yapılan lomber ponksiyon sırasında Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalında çalışan yardımcı araştırmacı koordinasyonu ile alınmıştır. Örnekler, ameliyathaneden alındıktan hemen sonra laboratuvara götürülerek AH grubundaki olguların BOS'larına uygulanan işlemlerin aynısı uygulandıktan sonra AR-LAB'daki derin dondurucuya kaldırılmıştır. Çalışmanın yapıldığı güne kadar tüm örnekler derin dondurucuda korunmuştur. Örneklerin toplanmaya başlanmasından çalışmanın yapıldığı güne kadar geçen 16 aylık süre boyunca, örneklerin uygun koşullarda (- 75°C _ -70°C) saklandığından emin olmak için derin dondurucu kontrol edilmiştir (Elektrik kesintisi olduğunda jeneratörün devreye girdiğinden emin olunması gibi).

Çalışmada laboratuvar gereci olarak, karbondioksit enkübatörü, enkübatör, faz-kontrast mikroskopu, laminer flow kabinet, Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) plak okuyucusu, santrifüj, derin dondurucu (- 20 ve - 80°C), likid nitrojen tankı, buzdolabı, Pasteur fırını, otoklav, hot plate, pHmetre, hassas terazi kullanılmıştır. PC12 kültürlerinin sürdürülmesi

için 75 cm²'lik kültür flaskaları (Greiner), MTT testi için 96 kuyucuklu kültür plakları (Greiner) kullanılmıştır.

F-tau, A β ₁₋₄₂ ELISA kitleri (INNOTEST β amiloyid₍₁₋₄₂₎, Innogenetics, Gent, Belçika) ve A β ₁₋₄₀ ELISA kiti (Signal Select Human β amiloyid₍₁₋₄₀₎ Biosource International, California, USA) temin edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 15 AH'nin ve 15 kontrol olgusunun BOS'larını ELISA yöntemiyle f-tau, A β ₁₋₄₂ ve A β ₁₋₄₀ için değerlendirilmiştir.

5.4.1. Kültür Kaplarının ve Lamellerin Polilizin İle Kaplanması

Kültür kaplarının kaplanmasında poli-D-lizin (PDL) (Sigma) kullanıldı. 10 μ g/ml konsantrasyonda PDL eklenen kültür kapları laminer flow kabinet altında bir saat süreyle bekletildikten sonra kaplama malzemesi çekilerek kültür kapları birkaç kez steril, distile su (Biochrom KG) ile yıkandı. Ardından laminer flow kabinet altında kültür kaplarının kapakları açık bırakılarak kurutuldu ve ağızları parafilm ile sarılarak hücrelerin ekimine kadar saklandı.

PC12 hücre hattı Fransa'dan temin edildi. PC12 hücreleri % 10 oranında at serumu, % 5 oranında fetal inek serumu, 50 U/ml penisilin ve 100 μ g/ml streptomisin eklenen RPMI1640 kültür ortamı içinde PDL ile kaplanmış kültür kaplarına ekildi. Kültürler sıkışık duruma geldiklerinde (genellikle haftada bir) pipetleme işlemiyle mekanik olarak kültür kaplarından ayrılarak 1/4 oranında pasaj yapılarak kültürler sürdürüldü. Kültürler karbondioksit enkübatöründe (% 5 oranında karbondioksit içermektedir) ve 37°C sıcaklıkta tutuldu. PC12 kültürlerinin ortamı iki günde bir taze kültür ortamıyla 2/3 oranında tazelandı.

5.4.2. İn Vitro Deneyler

İn vitro deneyler için, 96 kuyucuklu ve PDL ile kaplanmış kültür kaplarına 50 000 hücre/kuyucuk/200 μ l kültür ortamı yoğunluğunda ve % 3 oranında serum (% 2 at serumu ve % 1 fetal inek serumu) içeren kültür ortamı içinde ekilmiş olan PC12 hücreleri kullanıldı. Deneylerde düşük serum içeren kültür ortamına geçilmesinin amacı, hücrelerin deneyler süresince çoğalmasını önlemek ve serumun içerebileceği koruyucu faktörlerin etkisinden kaçınmaktır (61). Deneylerde her bir koşul için en az üçlü eş örnekler çalışılarak deneyler aynı standart koşullarda en az üç kez tekrarlandı. Deney günü BOS örnekleri çözüldükten sonra 56°C

sıcaklıkta 30 dakika süreyle ısıtılarak inaktive edildi. Bu işlemin amacı BOS örneklerinin içerebileceği kompleman faktörlerinin inaktivasyonu yoluyla komplemana bağlı olabilecek hücre ölümü olasılığının dışlanmasıdır. Bu işlemler sonrası hasta ve kontrol BOS örnekleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 20 µl hacimde eklendi. Böylece, Alzheimer ve kontrol BOS'unun eklenmediği saf hücre hattı kuyucukları, AH grubunun BOS'larının olduğu kuyucuklar ve kontrol BOS'larının eklendiği kuyucuklar elde edildi. Kültürler daha sonra karbondioksit enkübatöründe 48 saat süresince enkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi.

5.4.3. MTT Testi

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (61,62). Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla enkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Ayrıntılı deney basamakları şu şekildedir:

1. 100 mg MTT (Sigma) maddesi 10 ml hacimde PBS (Phosphorylated buffer solution- Fosforile edilmiş tampon çözelti) içinde çözülerek % 0.5'lik (10 mg/ml konsantrasyonda) stok MTT solüsyonu steril ve karanlık koşullarda hazırlandı. Solüsyon 0.22 µm'lik filtre ile süzülerek debrisler uzaklaştırıldı. Bu solüsyon karanlık ortamda ve 4°C sıcaklıkta bir ay kadar bir süre saklanabilmektedir.

2. Deneylede herhangi bir toksik ya da koruyucu ajan eklenmeyen kültür koşulları kontrol olarak kullanıldı. Doksanaltı kuyucuklu kültür plaklarına ekilen ve değişik toksik ve/veya koruyucu ajanların değişik dozlarıyla karşılaştırılan kültürlerle hedeflenen enkübasyon süresinin sonunda 10 µl/kuyucuk hacimde MTT solüsyonu eklendi.

3. Kùltür plakları alùminyum folyo ile sarılarak % 5 karbondioksitli nemli hava içeren karbondioksit enkùbatöründe 37°C sıcaklıkta 4 saat süreyle tutuldu.
4. Enkùbasyon süresinin sonunda faz-kontrast “inverted” mikroskop altında canlı hücrelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu, ölü hücrelerin ise boyanmadığı saptandı.
5. Kùltür plağı, plak rotoru kullanılarak 1250 rpm hızda 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelti atıldı.
6. Formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için önceden hazırlanmış solubilizasyon solüsyonu 100 µl/kuyucuk hacimde eklendi. Bu solüsyon isopropanolol içinde hazırlanmış 0.04 N HCl solüsyonundan oluşmakta ve oda sıcaklığında saklanmaktadır.
7. Kùltür plağı DEÜTF Hematoloji laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusuna konularak absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 650 nm dalga boyu kullanıldı. Herhangi bir ajan eklenmeyen kontrol kùltürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması % 100 olarak kabul edildi. Değişik ajanlar eklenen kùltür koşullarından elde edilen absorbans değerlerinin her biri ortalama kontrol absorbans değerine oranlandı ve bu değerin yüzdesi olarak gösterildi.

5.5. Veri Çözümlemesi: SPSS 11.0 paket programı ve Epi-info 2000 programı kullanılarak, dağılımlar değerlendirilmiş, sayımla elde edilen değerşkenlerde (cins, yaş grubu, eğitim grubu, sigara içiciliği) arasındaki farklılığa Ki-kare (χ^2 Yates, Fisher-Exact test) analizi, ölçümle elde edilen veride ve sürekli değerşkenlerde (yaş ortalaması, eğitim yılı ortalaması, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, f-tau ve MTT absorbans ortalamaları) arasındaki farklılığa gruplar nonparametrik koşulları sağladığı için Mann Whitney U testi ile bakılmıştır. Klinik tanıya göre f-tau için kesim noktası belirleme amacıyla ROC eğrisi çizilmiş ve bu çalışmaya özgü f-tau kesim noktası belirlenmiştir. Çalışmada $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

Yukarıdaki olgu ve kontrol tanımlamasına uyacak şekilde 15 olgu, 15 kontrol çalışmaya alınmıştır. Araştırmaya katılması için teklif götürülen hastaların ancak onda biri araştırmaya katılmak için gönüllü olmuştur. Az sayıda hasta bu konuda kendi kararını verebilecek bilişsel yetiye sahip olduğundan, çalışmaya katılım için, hem hastalardan hem de hasta yakınlarından onay istenmiştir. Araştırmaya katılmayan hastaların katılmama nedenleri çoğunlukla; hasta yakınlarının ya da hastaların lomber ponksiyon işlemine rıza göstermemeleri olmuştur. Hasta yakınlarının ya da hastaların bildirdiği diğer bir neden de, bu işlemin kısa dönemde tedaviye bir katkısının olmamasıdır.

Olguların yaş ortalaması 69.7 ± 10.5 , kontrollerin yaş ortalaması 67.3 ± 11.3 bulunmuştur. Yaş ortalamaları arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.63$). Olguların eğitim ortalamaları 7.8 ± 4.7 yıl ve kontrollerin eğitim ortalamaları 7.5 ± 5.9 yıl olarak saptanmıştır. Eğitim sürelerinin ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.86$). Olguların hastalık süresi ortalaması 2.67 yıl (SS=1.76 yıl) bulunmuştur. Hastalık başlangıç yaşı ortalaması 67.07 (SS=10.86) saptanmıştır. Olgu ve kontrollerin bazı özelliklerine göre dağılımları Tablo 3'de özetlenmiştir.

Olgu ve kontrollerin, BOS belirteçleri ve yaş değişkenleri arasında, ayrı ayrı korelasyonlara bakılmıştır. Her iki grupta da sayı 30'un altında olduğu için Spearman korelasyonu ile birliktelik değerlendirilmiştir. Olgularda, yaş ve $A\beta_{1-40}$ belirteci arasında anlamlı, güçlü, pozitif bir korelasyon saptanmıştır (Spearman Rho = 0,709 $p=0,003$). Diğer belirteçlerle yaş arasında böyle bir anlamlılık saptanmamıştır. Kontrollerde, yaş ile $A\beta_{1-42}$ belirteci arasında anlamlı, güçlü, negatif bir korelasyon saptanmıştır (Spearman Rho = -0,617 $p=0,014$).

Olgularda, BOS belirteçleri ile hastalık süresi arasında korelasyonlara bakılmıştır. Grubun sayısı 15 olduğu için Spearman korelasyon sayısı ile değerlendirilmiştir. Yalnızca f-tau ve hastalık süresi arasında pozitif, orta düzeyde anlamlı bir birliktelik saptanmıştır (Spearman Rho = 0,575 $p=0,025$)

Tablo 3: Olgu ve kontrollerin demografik ve sigara kullanım özelliklerine göre dağılımı

Özellik	Olgu		Kontrol		Toplam		p
	Sayı	%*	Sayı	%*	Sayı	%*	
Yaş grup							
64 yaş ve altında	3	20.0	5	33.3	8	26.7	0.681***
64 yaş üzeri	12	80.0	10	66.7	22	73.3	
Cins							
Erkek	8	53.3	8	53.3	16	53.3	1.000**
Kadın	7	46.7	7	46.7	15	46.7	
Eğitim							
Okur-yazar değil, okur yazar	2	13.3	4	26.7	6	20.0	0.651***
İlkokul ve üzeri eğitim	13	86.7	11	73.3	23	80.0	
Sigara kullanım özellikleri							
İçiyor	2	13.3	4	26.7	6	20.0	0.651***
İçmiyor	13	86.7	11	73.3	23	80.0	

*sütun yüzdesi ** χ^2 Yates*** Fisher-Exact test

Olgu ve kontrollerin, 64 yaş sınır alındığında yaş grubuna göre dağılımı, cins, eğitim grubu ve sigara içicilik varlığına göre dağılımı benzer saptanmıştır (Tablo 3).

Tablo 4: Olgu ve kontrollerin MMDT ve GBÖ skor ortalamalarının göre karşılaştırılması

Özellik	Olgu		Kontrol		p*
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
MMDT	17.67	6.59	27.40	1.64	0.000
GBÖ	4.60	0.91	1.00	0.00	0.000

* Mann-Whitney U testi

Olgu ve kontrollerin kognitif yeterlilikleri MMDT ve GBÖ ile değerlendirildiğinde, MMDT skor ortalamasının olgularda anlamlı olarak düşük olduğu GBÖ ortalamasının ise olgularda anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır.

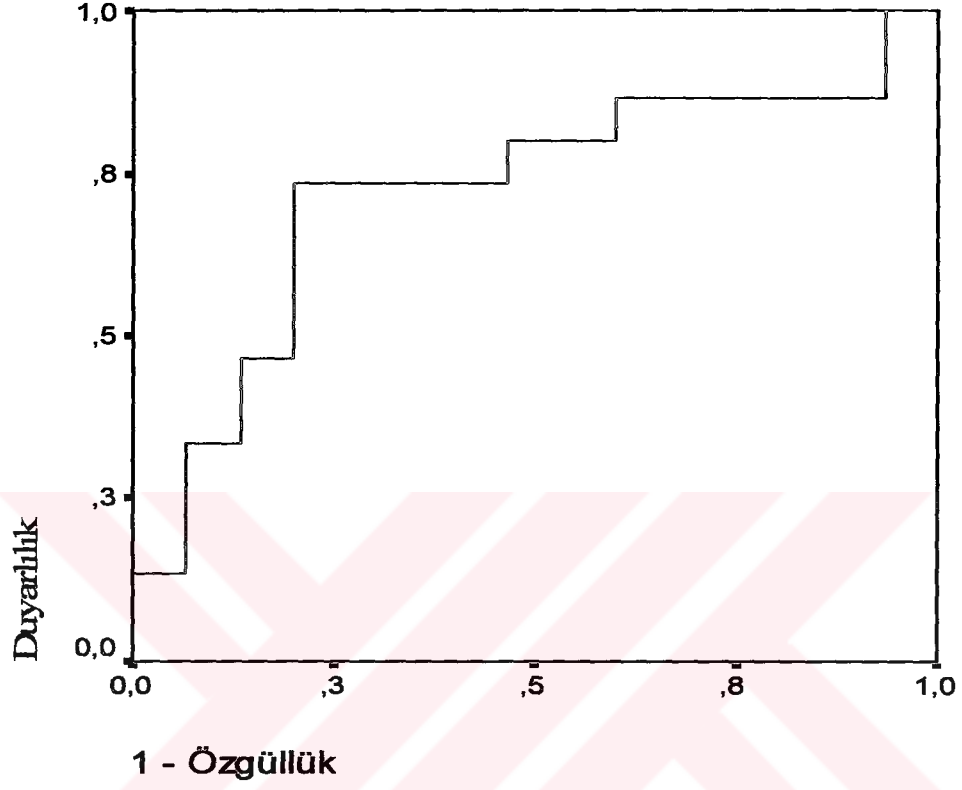
Tablo 5: Olgu ve kontrollerin BOS belirteçleri ve *canlı kalan hücre sayısı* ortalamalarına göre karşılaştırılması

Özellik	Olgu		Kontrol		p*
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
A β_{1-42} (pg/ml)	830.0	279.7	1086.6	409.9	0.054
A β_{1-40} (pg/ml)	7388.9	4103.9	12031.5	5297.9	0.014
f-tau (pg/ml)	97.1	41.4	66.9	30.1	0.04
MTT absorbans ortalaması	74.1	13.7	84.7	12.1	0.056

*Mann-Whitney U testi

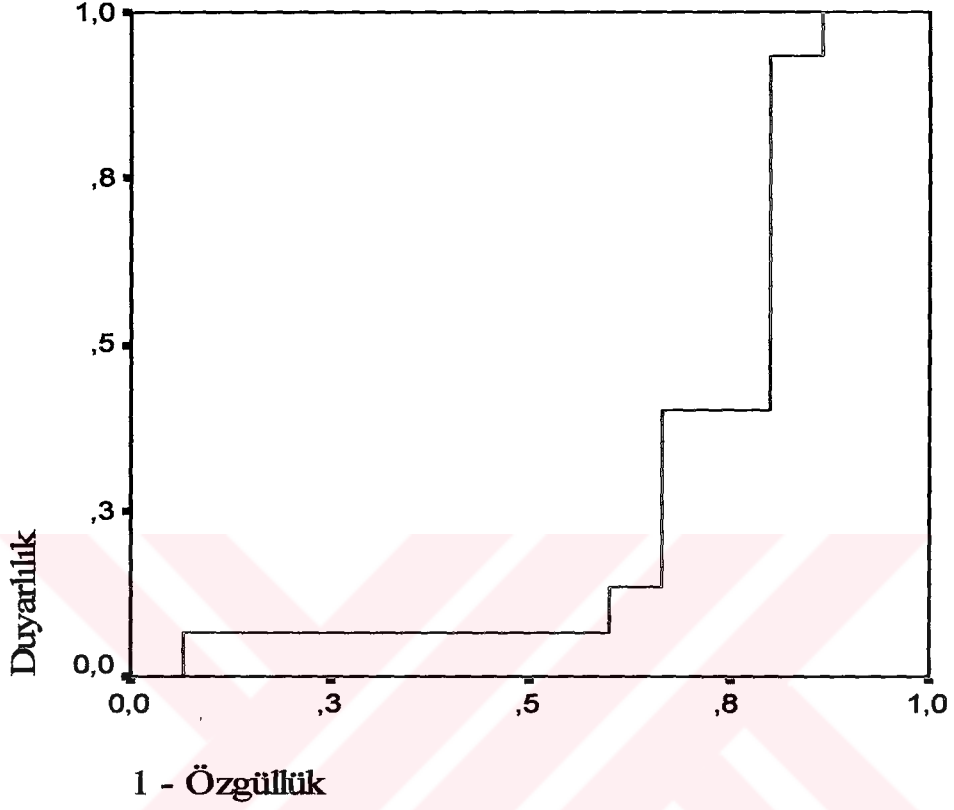
AH'li olguların ve kontrollerin BOS belirteçleri ortalamaları karşılaştırıldığında, olguların A β_{1-40} ortalamalarının kontrollerin ortalamalarından anlamlı olarak düşük olduğu (p=0,014) ve f-tau ortalamalarının ise anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,04). AH'li olguların A β_{1-42} ortalamaları kontrollerin ortalamalarından daha düşük izlenimi verse de, bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (p=0,054). Canlı kalan hücre sayısı ortalamaları değerlendirildiğinde, olguların canlı kalan hücre sayısı ortalamasının daha düşük olmaya eğilimli olduğu, ancak bu farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır (p=0.056).

Şekil 3: f-tau için ROC eğrisi



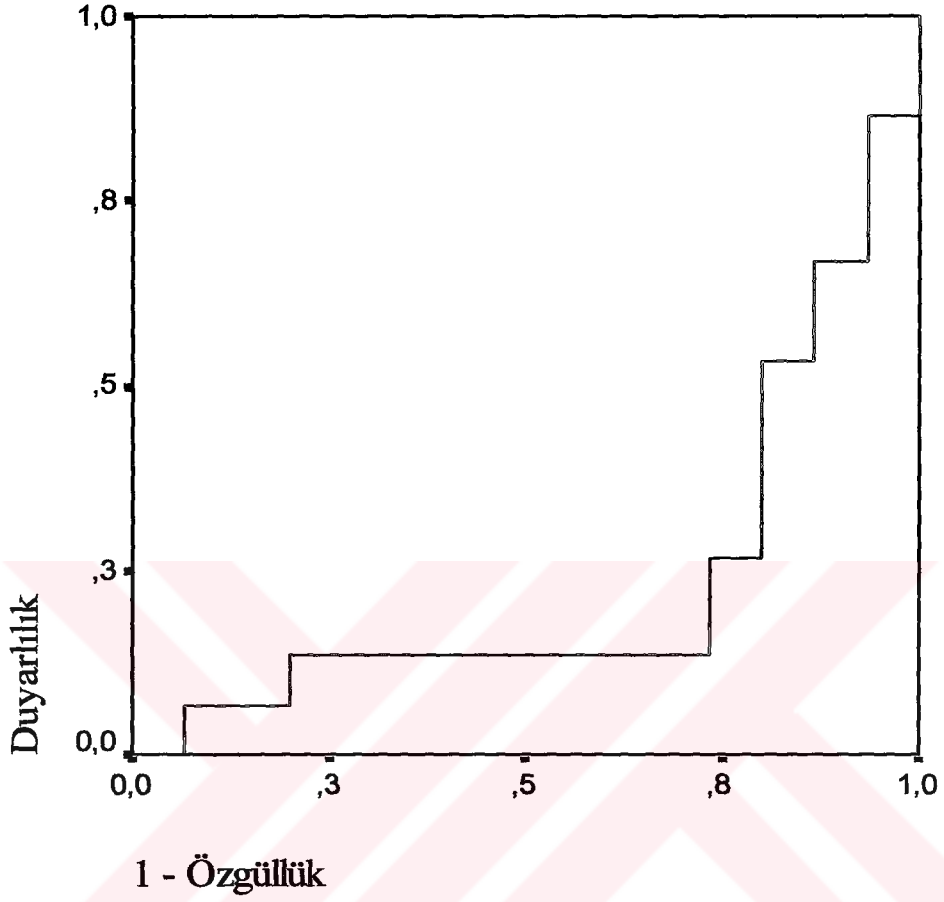
Klinik tanı esas alınarak f-tau için ROC eğrisi çizilmiştir. Buna göre f-tau'nun olguları kontrollerden ayırt etme eşik değeri 74.34 pg/ml ve bu değer için duyarlılık %73.3, özgüllük %80 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4: $A\beta_{1-42}$ için ROC eğrisi



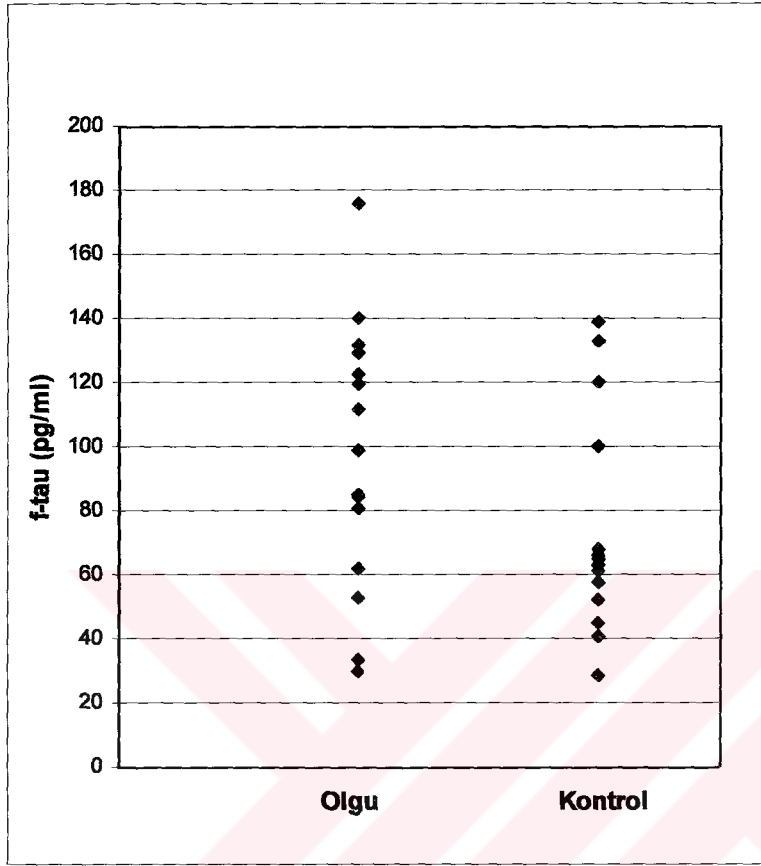
Klinik tanı esas alınarak $A\beta_{1-42}$ için ROC eğrisi çizilmiştir. Buna göre $A\beta_{1-42}$ 'nin olguları kontrollerden ayırt etme eşik değeri 931,25 pg/ml ve bu değer için duyarlılık %40, özgüllük %27 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 5: $A\beta_{1-40}$ için ROC eğrisi



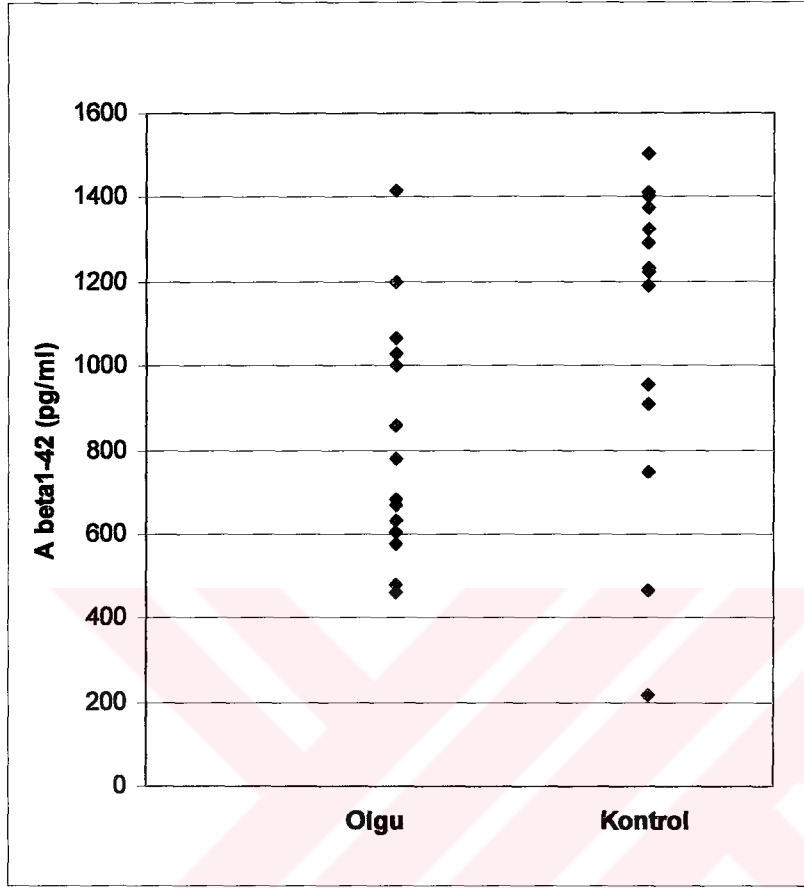
Klinik tanı esas alınarak $A\beta_{1-40}$ için ROC eğrisi çizilmiştir. Buna göre $A\beta_{1-40}$ 'ın olguları kontrollerden ayırt etme eşik değeri 6792 pg/ml ve bu değer için duyarlılık %53, özgüllük %20 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 6: Olgu ve kontrollerin f-tau değerleri



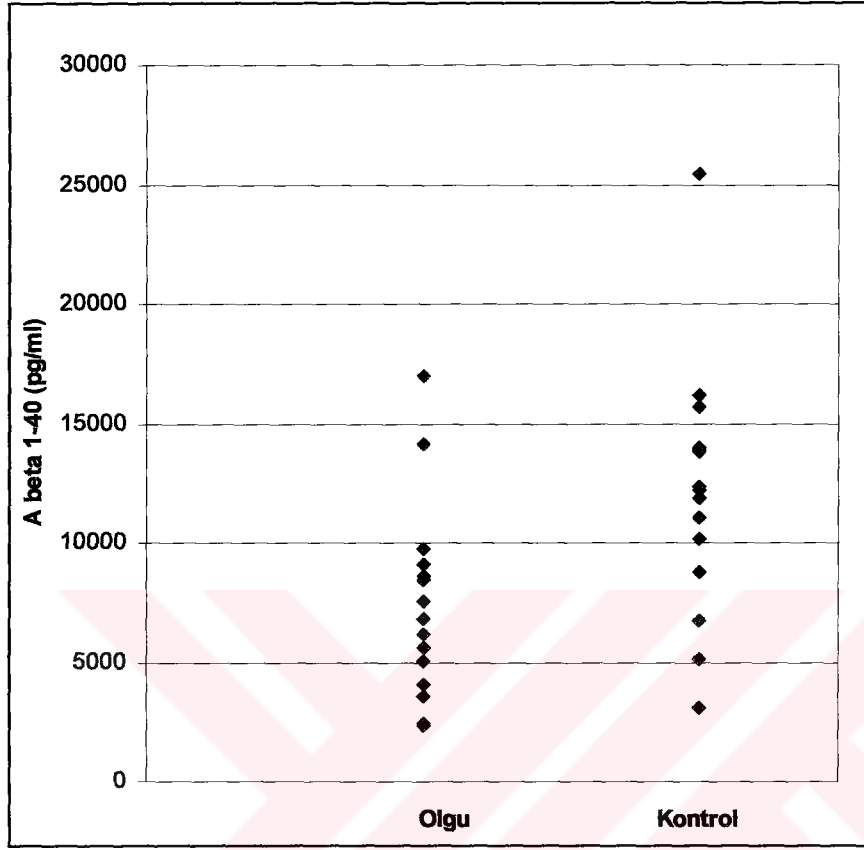
Şekil 6'da olgu ve kontrollerin f-tau değerlerinin dağılımı görülmektedir. Olguların f-tau değer ortalamaları 97.1 ± 41.1 pg/ml, kontrollerin f-tau değer ortalamaları 66.9 ± 30.1 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki f-tau değerlerindeki yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.04$)

Şekil 7: Olgu ve kontrollerin A β_{1-42} değerleri



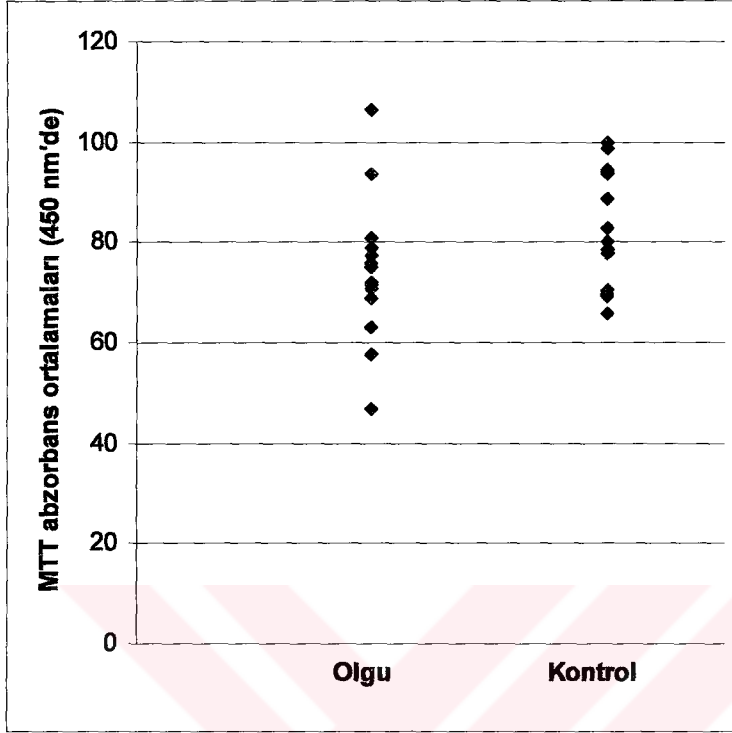
Şekil 7’de olgu ve kontrollerin A β_{1-42} değerlerinin dağılımı görülmektedir. Olguların A β_{1-42} değer ortalamaları 830 ± 279.7 pg/ml kontrollerin A β_{1-42} değer ortalamaları 1086.6 ± 409.9 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki A β_{1-42} değerlerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.054$).

Şekil 8: Olgu ve kontrollerin $A\beta_{1-40}$ değerleri



Şekil 8'de olgu ve kontrollerin $A\beta_{1-40}$ değerlerinin dağılımı görülmektedir. Olguların $A\beta_{1-40}$ değer ortalamaları 7388.9 ± 4103.9 pg/ml kontrollerin $A\beta_{1-40}$ değer ortalamaları 12031.5 ± 5297.9 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki $A\beta_{1-40}$ değerlerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0014$).

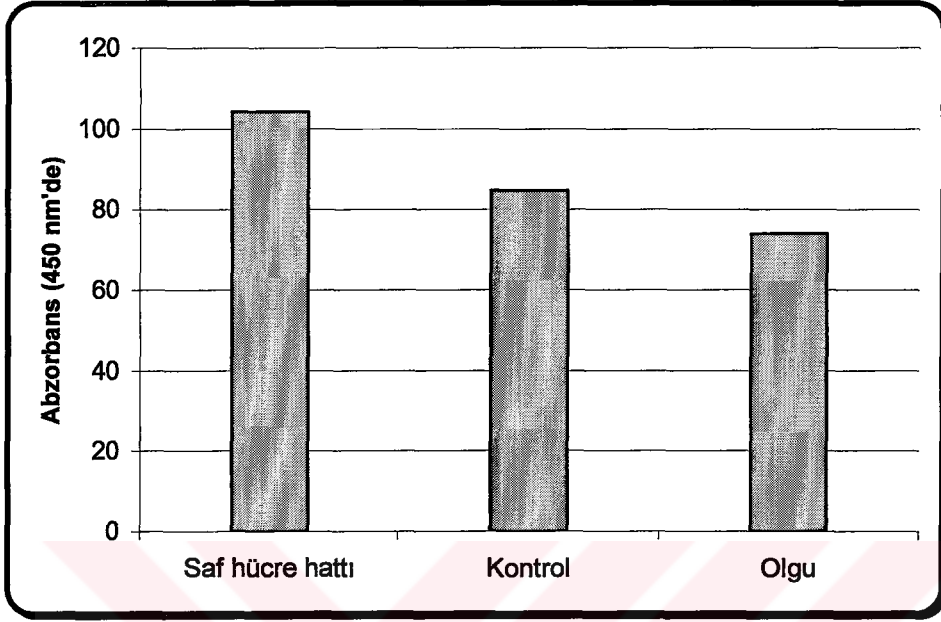
Şekil 9: Olgu ve kontrollerin MTT abzorban ortalamaları (450 nm’de)



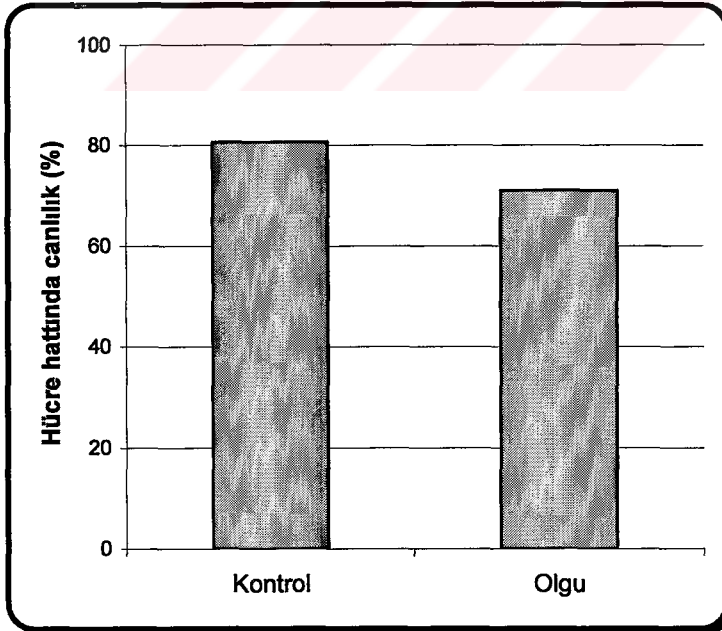
Şekil 9’da olgu ve kontrollerin MTT abzorban ortalamaları görülmektedir. Olguların MTT abzorban değer ortalamaları 74.1 ± 13.7 kontrollerin abzorban ortalamaları 84.7 ± 12.1 olarak hesaplanmıştır. MTT abzorban değerleri hesaplanırken; öncelikli olarak içinde hiçbir şeyin olmadığı ortamın abzorbanı ölçülmüştür (99×10^{-3}) Daha sonra saf hücre hattının abzorbanı ölçülmüş ve ortamın abzorban değeri bundan çıkartılmıştır (104×10^{-3}). En son olarak her bir olgunun ve kontrolün abzorban değerleri ölçülmüş, ortamın abzorban değeri düşülerek net sonuçlar alınmıştır. Olgulardaki MTT abzorban değer ortalamalarındaki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.056$)

Hücre hattında canlı kalan hücre sayısı, yüzde değerler olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, tüm olgu ve kontrollerin BOS abzorban değerlerinin, tek tek saf hücre hattı abzorban değerlerine bölünerek elde edilmiştir. Bu değerler, ortalama olarak şekil 9’da gösterilmiştir.

Şekil 10: Olgu, kontrol ve örnek eklenmemiş saf hücre hattının MTT abzorbans ortalamaları (450 nm'de)



Şekil 11: Olgu ve kontrol BOS örneklerini içeren hücre hattının canlı kalım yüzdeleri



7. TARTIŞMA

Günümüzde insanların ortalama yaşam süresinin uzamasına paralel olarak yaşlılarda görülen sağlık sorunlarının prevalansında artış gözlenmektedir. Alzheimer hastalığı da bu sağlık sorunlarından biridir. AH, nörodejeneratif hastalıklar içerisinde en sık görülen (2) ve bir kez kaybedildiği zaman yerine yenisi konamayan beyin hücrelerinin ölümüne neden olan ilerleyici bir hastalıktır (28). Günümüzde, bir hastaya klinik olarak AH tanısı konulduğunda, patolojik olarak geri dönüşsüz beyin hasarının olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, klinik bulgular ortaya çıkmadan 15 ile 20 yıl kadar önce nöron yıkımına neden olan patolojik sürecin başlamış olduğunu düşündürmektedir (68,69). AH'de saptanan patolojik bulgulardan (NFY, AP, nöron, sinaps kaybı) hangilerinin demansın şiddetiyle daha yakından ilişkili olduğu net olarak bilinmemektedir. Ancak hastalığın klinik olarak ortaya çıkmasından önce nöropatolojik anormalliklerin gelişmiş olduğu netleşmiştir (70). Parkinson hastalığında, tablo klinik olarak belirgin hale geldiğinde substantia nigra pars kompaktadaki pigmente nöronların %50-60'nın kaybedilmiş olması gibi (71), AH'de de klinik bulgular saptandığında, bellek işlevinde çok önemli rol oynayan entorinal korteksteki nöronların %50'si kaybedilmiş olmaktadır (52).

Her ne kadar AH'nin patolojik göstergeleri hakkındaki bilgiler netleşmiş olsa da; kognitif açıdan tamamen sağlıklı bir yaşlılık döneminden sonra yapılan otopsilerin bir kısmında, AH için kabul edilmiş patolojik tanı kriterlerini karşılayan bulguların bildirilmesi (41,42,68) kafa karıştırmaktadır. Belki de, AH'nin klinik olarak belirgin hale gelmesi için aşılması gereken patolojik eşik kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bu durumda AH klinik olarak ortaya çıkmadan önce belirteçlerini saptayıp, patolojiyi gelişmeden durduracak tedaviler geliştirmek gerekmektedir. Yakın zamanlarda buna ilişkin bir tedavi çabası beta amiloyid aşısı olmuş ve yararlı etkileri deneysel olarak gösterilmiştir. Bu aşının immünolojik yönden düzeltilmesi çabalarının önümüzdeki birkaç yılda sonuç vereceği düşünülmektedir (13). Tüm bu çabalar presemptomatik ya da semptomatik olguların belirlenmesine yönelik biyolojik belirteçlerin araştırılmasını haklı kılmaktadır. En iyi belirteçler patolojik süreç ile doğrudan ilişkili olanlar ya da sadece patolojinin sonucu olarak oluşanlardır. Ayrıca bu belirteçler ileri evre AH'ye yol açabilecek bir patolojinin varlığını, olabilecek en erken dönemde saptayabilmelidir.

Bu çalışmada, AH'li olguların BOS örneklerindeki biyolojik belirteçleri kontrollerin BOS'larındaki değerlerle karşılaştırmak ve AH'li bireylerin BOS'larının hücre hattına sitotoksik etkisinin olup olmadığını öğrenmek amaçlanmıştır. Bunun için, mevcut bilgiler ışığında duyarlılık ve özgüllüğü en üst düzeyde olduğu çeşitli çalışmalarda saptanan $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ve f-tau biyolojik belirteç olarak araştırılmıştır.

$A\beta$, amiloyid plakların ana bileşenidir (67). $A\beta$ 'nin AH'de biyolojik belirteç olarak kullanılabilmesine dair ilk çalışmaların sonuçları hayal kırıklığı yaratmıştır (75,76,77) $A\beta$ değerleri AH'lilerin BOS'larında hafif azalmış ya da değişmemiş olarak saptanmıştır. Bu çalışmalarda total $A\beta$ değerlerine bakılmıştır. Daha sonra $A\beta$ 'nin iki tane karboksil uçla sonlanan formu olduğu anlaşılmıştır: $A\beta_{1-40}$ ($A\beta$ 'nin 40 aminoasitli formu) ve $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$ 'nin 42 aminoasitli formu) (73,74). Ayrıca, $A\beta_{1-42}$ 'nin çökelmeye en eğilimli ve hızlıca amiloyid plak oluşturan form olduğu saptanmıştır. Bu forma yönelik ilk ELISA yöntemleri yayınlanmıştır (78, 79). Bizim çalışmamızda, AH vakalarındaki BOS $A\beta_{1-42}$ değer ortalamaları, kontrol olgularındaki BOS $A\beta_{1-42}$ değer ortalamalarına göre düşük izlenimi vermekle birlikte, aralarında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0.054$) (Tablo 5). Aynı şekilde, $A\beta_{1-42}$ 'nin AH'de ve kontrollerde anlamlı fark göstermediğini bulan başka çalışmalar da vardır (80, 81). Ancak, hem $A\beta_{1-42}$ hem de $A\beta_{1-40}$ 'ın kontrollerden daha düşük olduğu (66, 81) ve $A\beta_{1-42}$ 'nin patogenezele daha yakından ilintili olduğuna ait kanıtlar da vardır (11,66,81). Yapılmış bir metaanaliz çalışmasında $A\beta_{1-42}$ 'nin %90 oranında duyarlılığa ve %86 oranında özgüllüğe sahip olduğu belirtilmiştir. Fakat, bizim çalışmamızda klinik tanı esas alınarak, $A\beta_{1-42}$ için çizilen ROC eğrisinde bu düzeyde duyarlılık ve özgüllüğe ulaşılamamıştır. $A\beta_{1-42}$ 'nin yaşla ilgili olup olmadığı araştırıldığında ise kontrollerde, yaş ile $A\beta_{1-42}$ belirteçi arasında anlamlı, güçlü, negatif bir korelasyon saptanmıştır (Spearman Rho =-0,617 $p=0,014$). Bu bulgu, $A\beta$ plak birikintilerinin yaşla beraber artmak zorunda olmaması, bireyden bireye değişebilen, bir tür kişiye özel dağılım şekli gösteren bir madde olması ile açıklanabilir (33). Normal bireylerde yaş arttıkça BOS'ta $A\beta_{1-42}$ 'nin sabit kaldığını bildiren çalışma da mevcuttur (91).

AH'de BOS tau, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$ değerlerinin ne oranda tanısıl olduğunu anlamak için yapılan, üç yıllık bir çalışmada (66), 17 hastanın başlangıç ve 36. ay BOS'larında tau, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$

değerlerine bakılmış ve hastaların %82'nde $A\beta_{1-42}$ değerlerinde, % 88'nde $A\beta_{1-40}$ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. Onyeddi hastanın 9'unda tau değerleri yüksek çıkarken, 8 hastanınkinde düşük çıkmıştır. APOE'nin bir alleli olan $\epsilon 4$ 'ü yüksek oranda bulunduranlarda AH'nin gelişme yüzdesinin yüksek olduğu bilinmektedir (1). APOE'nin amiloyid birikimi üzerine etkisini araştıran çalışmalarda, APOE4'ün $A\beta_{1-42}$ birikiminden çok $A\beta_{1-40}$ birikimine yol açması (85,86), $A\beta_{1-40}$ 'ın gözden kaçırılmaması gereken bir belirteç olduğunu düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da, Alzheimer grubundaki $A\beta_{1-40}$ değerleri, kontrol grubuna göre, anlamlı oranda düşük bulunmuş ($p=0,014$) (Tablo 5) ve $A\beta_{1-40}$ 'ın önemli bir belirteç olduğunu desteklemiştir. Ayrıca, olguların yaşları ve $A\beta_{1-40}$ belirteç değerleri arasında anlamlı, güçlü, pozitif bir korelasyon saptanmıştır (Spearman Rho = 0,709 $p=0,003$). Bu istatistiksel değer her ne kadar nedenselliği ifade etmese de birlikteliği ortaya koyması açısından çarpıcıdır. Ancak, bu sonuç yaş arttıkça, BOS'ta $A\beta_{1-40}$ 'ın azaldığını belirten çalışmanın (91) tersine, ileri yaştaki AH olgularında kontrollerdekine benzer biçimde daha yüksek değerlerin görülmesini yordamaktadır. Bununla birlikte Mesulam'ın da belirttiği gibi (33) $A\beta_{1-40}$ 'ın yaşla birlikte değişkenlik göstermesi kişiden kişiye değişen bir durum olduğu için çalışmalarda farklı sonuçların çıkması beklenebilir.

AH'ye yönelik tanımlanmış en son biyolojik belirteç f-tau proteinidir. Fosforile tau proteinin değişik epitoplarını (threonin 181 ve 231, threonin 181, threonin 231, serin 235, serin 199, serin 296 ve 404) saptamak için ELISA yöntemleri geliştirilmiştir (9,56,57,58). Bu çalışmaların da dahil olduğu toplam 11 çalışmada 800 Alzheimer hastası, 370 kontrol olgusu çalışılmıştır. Sonuçta f-tau'nun %92 duyarlılık ve %80 özgüllükle AH'yi normal yaşlanmadan ayırt edebildiği saptanmıştır. BOS'da f-tau'nun -t-tau'nun aksine- iskemik inme ve JCH'de artmadığı gösterilmiştir (60,83). Ayrıca, depresyon gibi psikiyatrik hastalıklarda (55, 83), ALS ve parkinson hastalığı gibi kronik nörolojik hastalıklarda (15,55,84), vasküler, frontotemporal ve LCD'de f-tau'nun BOS'da normal düzeylerde, AH'de artmış değerlerde olduğunu tespit etmiş çalışmalar mevcuttur (15,84). Sonuç olarak f-tau'nun AH için duyarlılığı t-tau, $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ 'ye oranla daha yüksektir (11). Bizim çalışmamızda duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olarak düşünülen threonin 181'de fosforile olmuş tau kullanılmıştır. Alzheimer hastalarının BOS f-tau değer ortalamaları, kontrol grubunkine oranla anlamlı derecede artmış olarak bulunmuştur ($p=0.04$) (Tablo 5). Bu çalışmada f-tau'nun, AH'nin AH olmayanlardan

ayrıt edilmesinde $A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$ 'den daha duyarlı ve özgül biyolojik belirteç olduğunu göstermiştir (Grafik 1,2,3) Ayrıca, olgularda, BOS belirteçleri ile hastalık süresi arasında korelasyonlara bakıldığında yalnızca f-tau ile hastalık süresi arasında pozitif, orta düzeyde anlamlı bir birliktelik saptanmıştır (Spearman Rho = 0,575 p=0,025). Bu sonuç, hastalık süresi arttıkça f-tau düzeyinin artacağını öngörmekte ve Alzheimer hastalığı ile f-tau düzeyinin yüksekliğinin birlikteliğine işaret etmektedir.

Bu çalışmada ayrıca AH grubundan elde edilen BOS'ların sitotoksik olup olmadığı araştırılmıştır. Daha önce sıçan mezensefalik hücre kültürlerinde Parkinson hastalarından alınmış BOS örneklerinin, dopaminerjik nöronların fonksiyonlarını ve büyümelerini durdurdukları gösterilmiştir (23). Srinivasan ve ark (1998) tip II diabetik nöropatili hastaların serum örneklerinin nöron hücre kültüründe komplemandan bağımsız, kalsiyum bağımlı apoptozis yaptıklarını göstermişlerdir (27). Ayrıca multipl skleroz idrar örneklerinin in vitro sıçan glia kültürlerine toksik etkilerini bildiren çalışmalar da mevcuttur (25,26).

Pauwels ve ark (1992) tarafından yapılan çalışma, 7 Alzheimer hastasının ve 26 sağlıklı kontrolün BOS'u; ayrıca, frontal kortekste NFY tespit edilmiş 2 Alzheimer hastasının ve beyinlerinde NFY olmadığından emin olunan 2 kontrolün otopsi ile alınmış frontal korteks ve hipokampus örnekleri ile yapılmıştır. Bu örneklerin, 17 günlük bir sıçan embriyosunun oksipital korteksinden hazırlanmış hücre kültürü üzerine sitotoksitesine bakılmıştır. Sonuçta, kontrol ve AH grubu hipokampus örneklerinin hücre kültüründe yarattıkları etki arasında bir farklılık saptanmamıştır. Fakat AH grubunun BOS ve frontal korteks örneklerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda hücre canlılığını artırıcı etkileri olduğu tespit edilmiştir (22). Çalışmada, AH örneklerinin nöron koruyucu etkileri, AH 'nın beyinlerinde olmayıp, sağlıklı bireylerde olduğu Uchida ve ark'nın (1991) (87) yaptığı bir çalışmada gösterilen 'büyüme yok edici faktöre'[(BYF) growth inhibitory factor (GIF)] bağlanmıştır. BYF içeren örneklerin hücre hattında canlılığı azaltıcı yönde etki gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Bu protein, sağlıklı insanların beyinlerinde saptanmıştır, fakat AH kortekslerinde BYF-pozitif astrositlerin dramatik olarak azaldıkları tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda, eklediğimiz BOS'ların PC12 hücre hattında ne oranda sitotoksikite yarattığını anlamak için MTT absorbans değerlerine bakıldığında, AH grubunun MTT değer ortalamalarının kontrol grubuna oranla daha düşük olma eğiliminde olmakla beraber, aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p=0,056$) (Tablo 5). Sonuçlarımız Pauwels ve ark'nın yaptıkları çalışmayla uyuşmamaktadır. Bu durum, iki çalışmadaki olgu-kontrol sayılarındaki farktan ya da çalışmamızdaki hastaların çoğunda asetilkolinesteraz inhibitörü (AEİ) kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak, AEİ kullanımının, amiloyid beta (90) ve serbest radikallerle (89) yaratılan PC12 hücre hattındaki hasarlanmayı azaltıcı etkileri olduğunu bildiren çalışmalar vardır. AEİ'nin hücre koruyucu etkisinin gösteren bu çalışmalar, Pauwels ve ark' ile bizim çalışmamız arasındaki farkın, ilaç kullanımından bağımsız olduğunu düşündürmüş, bu iki çalışmada elde edilmiş farklı sonuçları açıklamada yardımcı olmamıştır.

Bütün bu kafa karıştırıcı sonuçlar Alzheimer hastalarının BOS'larında, koruyucu ya da toksik maddelerin araştırılmasını gerektirmektedir. Eğer AH'de BOS'ta sitotoksikiteye ait veri yoksa bu toksik etmenin periferden kaynaklanabileceği de düşünülebilir. Engelhardt ve ark'nın (2000) (21) yaptıkları çalışmada Alzheimer hastalarının serumlarından izole ettikleri IgG 'nin sıçan beyinlerindeki kolinerjik nöronları harap ettiklerini göstermiş olmaları, BOS dışında nörotoksik etken taşıyan vücut elemanları olabileceği görüşünü destekler niteliktedir. Bu çalışmaya dayanarak, koruyucu ve/veya toksik etkenlerin ortaya konması için, BOS'un yanı sıra, Alzheimer hastalarının serum ve idrar örneklerinin de hücre hattına toksik etkilerini araştıran çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

8. SONUÇ

1-Çalışmamız, AH'li olgular için biyolojik belirteçlerden f-tau ve A β ₁₋₄₀ BOS düzeylerinin kontrollerden farklı olduğunu, bunlardan da f-tau'nun, klinik tanı ölçütleri esas alındığında, en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe ulaştığını göstermiştir.

2-Çalışmamızda, olası başka bir çalışma için AH'de BOS f-tau eşik değeri (74.34 pg/ml) popülasyonumuz ve laboratuvarımız için saptanmıştır.

3-Çalışmamızda, AH'li BOS'ların PC12 hücre hattına sitotoksik etkisi gösterilememiştir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlar geniş olgu serilerinde bu sonucun değişebileceğini düşündürmüştür.

4-Çalışmamız sonucunda, AH'de koruyucu ve/veya toksik etkenlerin ortaya konması için, BOS'un yanı sıra, serum ve idrar örneklerinin de hücre hattına etkilerini araştıran çalışmaların yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

9. KAYNAKLAR

- 1- Öge AE, Nöroloji İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi temel ve klinik bilimler ders kitapları Nobel Tıp Kitabevleri 2004;369
- 2- Davis KL, Hachouturian V. Strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1995;43(Suppl 4):52–55
- 3- Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia SS, Gürvit İH. Alzheimer hastalığı1999
- 4- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ. Prevalance of Alzheimer's disease in a community population of older persons: higher than previously reported. *JAMA* 1989;262:2551–2556
- 5- Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH, Finkel SI, Gwyther LP, Khachaturian ZS, Lebowitz BD, McRae TD, Morris JC, Oakley F, Schneider LS, Streim JE, Sunderland T, Teri LA, Tune LE. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. *JAMA* 1997;278:1363–1371
- 6- Drachman DA. If we live long enough, will we be demented? *Neurology* 1994;44:1563–1565
- 7- DeCarli C, Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology and treatment. *Lancet Neurol* 2003; 15–21
- 8- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan Em. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34: 939–944
- 9- Galasko D, Hansen L.A, Katzman R. *et al.*, Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch Neurol* 1994; 51: 888–895
- 10- Jellinger K.A., Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a clinicopathological study. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 219–220
- 11- Blennow K, Harald H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease *The Lancet Neurology* 2003;2:10:605–613
- 12- The Ronald and Nancy Reagan research Institute of the Alzheimer's Association and the Nahen institute on Aging Working Group. Consensus report of the working group on molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998;19:109–116

- 13- Schenk D. Hopes remain for Alzheimer's vaccine. *Nature* 2004; Sep 23;431(7007):398
- 14- Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Tapiola T, Arai H, Blennow K et al Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of Tau protein phosphorylated at Threonine 231. *Arch Neurol* 2002;59:1267–1272
- 15- Sjogren M, Daviddson P, Tullberg M, et al. Both total and phosphorylated tau are increased in AD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70:624–630
- 16- Kolnken R, Buerger K, Zinkowski R et al. Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in CSF of AD patients. *Neurosci Lett*. 2000;287:187-190
- 17- Galasko D, Chang L, Motter R, et al. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta 42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 1998;55:937–945
- 18- Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, et al. Improved dicrimination of AD patients using beta-amyloid (1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 1999;52:1555–1562
- 19- Shoji M, Matsubara E, Kanai M, et al. Combination assay of CSF tau, A beta 1–40 and A beta 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1998;158:134–140
- 20- Knopman DS, De Kosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review) Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology *Neurology* 2001;56:1143–1153
- 21- Engelhardt JI, Le WD, Siklos L, Obal I, Boda K, Appel SH. Stereotaxic injection of IgG from patients with Alzheimer disease initiates injury of cholinergic neurons of the basal forebrain. *Arch Neurol* 2002;57:681–685
- 22- Pauwels PJ, Van AssouwHP, De Ryck M, Leysen JE, Dom R, Van Gool D. Towards an improved survival of rat brain neurons in culture by cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer's type . *Brain Res*. 1993; Apr 30;610(1):8–15
- 23- Hao R, Norgen RB Jr, Lau YS, Pfeiffer RF. Cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients inhibits the growth and function of dopaminergic neurons in culture. *Neurology* 1995;45:138–142

- 24- Yu SJ, Lo ES, Cochran EJ, Lin DH, Faselis CJ, Klawans HL, Carvey PM. Cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease alters the survival of dopamine neurons in mesencephalic culture. *Exp Neurol* 1994 Mar;126(1):15–24
- 25- Micoud F, Mandrand B, Malcus-Vocanson C. Comprasion of several techniques for the detection of apoptotic in vitro. *Cell Prolif* 2001; 34:99-113
- 26- Malcus-Vocanson C, Giraud P, Broussole E, Perron H, Mandrand B, Ghazot G. A urinary marker for multiple sclerosis *Lancet* 1998;351:1330
- 27- Srinivasan S, Stevens MJ, Sheng H, Hall KE, Wiley JW. Serum from patients with type 2 diabetes with neuropaty induces complement-independent, calsiium-dependent apoptosis in cultured neuronal cells. 1998;102:1454–1462
- 28- Scinto LFM., Daffner KR Early diagnosis of Alzheimer’s disease. *Humana press* 2000; 31
- 29- Council on Scientific Affairs., American Medical Association. Dementia. *JAMA* 1986;256:2234-2238
- 30- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 3rd Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association,1980
- 31- Folstein MF, Folstein SE, McHaugh ĞR, Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinican. *J. Psychiatr. Res.* 1975;12:189–198
- 32- Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the gray matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatr.* 1968;114:797–811
- 33- Mesulam MM. Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri *Yelkovan Yayınları* 2004 2. Baskı;465
- 34- Price BH, Gurvit H, Weintraub S, Geula C, Leimkuhler E, Mesulam MM. Neuropsychological patterns and language daficits in 20 consecutive cases of autopsy confirmed Alzheimer’s disease. *Arch Neurol* 1993;50:931-937
- 35- Rasmussen DX, Brasndt J, Steele C, Hedreen IC, Troncoso JC, Folstein MF. Accuracy of clinical diagnosis of Alzheimer disease and clinical features of patients with non-Alzheimer disease neuropathology. *Alzheimer Dis Related Discord* 1996;10:180-188
- 36- Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer’s disease. *Ann Rev Neurosci* 1996;19:53-77

- 37- Lewy-Lahad E and Bird TD. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 1996; 40:829–840
- 38- Gates GA, Karzon RK, Garcia P, Peterein J, Storandt M, Morris JC, Miller JP. Auditory dysfunction in aging and senile dementia of the Alzheimer type. *Arch Neurol* 1995;52:626–634
- 39- Nordin S, Almkvist O, Berglund B, Wahlund LO. Olfactory dysfunction for pyridine and dementia progression in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1997;54:993–998
- 40- Didic M, Cherif AA, Gamberelli D, Poncet M, Boudouresques J: A permanent pure amnesic syndrome of insidious onset related to Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1998;43:526–530
- 41- Haxby JV, Grady CL, Duara R, Schlageter N, Berg G, Rapoport SI. Neocortical metabolic abnormalities precede nonmemory cognitive defects in early Alzheimer type dementia. *Arch Neurol* 1986; 43:882–885
- 42- Katzman R, Aronson M, Fuld P, Kawas C, Brown T, Morgenstern H, Frishman W, Gides L, Eder H, Ooi WL. Development of dementing illness in an 80 year old volunteer cohort. *Ann Neurol* 1989;25:317–324
- 43- Jobst KA, Hindley NJ, King E, Smith AD. The diagnosis of Alzheimer 's disease: a question of image? *J of Clinical Psychiatry* 1994; 55:22–31
- 44- Jack CR, Peterson RC, Xu YC, Waring SC, O'Brien PC, Tangalos EG, Smith GE, Ivnik RJ, Kokmen E. Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;49:786–794
- 45- Scinto L, Daffner K, Dressler D, Ransil B, Rentz D, Weintraub S, Mesulam MM, Potter H. A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science* 1994;266:1051–1054
- 46- Saunders AM, Hulette C, Welsh Vohmer KA, Schmechel DE, Crain B, Burke JR, Alberts MJ, Strittmatter WJ, Breitner JCR, Rosenberg C, Scott SV, Gaskell PCJ, Pericak Vance MA, Roses AD: Specificity, sensitivity and predictive value of apolipoprotein-E genotyping for sporadic Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;348:90–93
- 47- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, Olson D, Southwick P, Wolfert R, Munroe B,

- Lieberburg I, Seubert P, Schenk D. Reduction of R-amyloid peptide-42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995;38:643-648
- 48- De la Monte SM, Ghanbari K, Frey WH, Beheshti I, Averbach P, Hauser SL, Wands JR. Characterisation of the AD7C-NTP cDNA expression in Alzheimer's disease and measurement of a 41-kD protein in cerebrospinal fluid. *J Clin Invest* 1997;100:3093-3104
- 49- Braak, H and Braak, E: Evaluation of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Act Neurol Scand* 1996;165:3-12
- 50- Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rudel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN,. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 1994;45:373-379
- 51- NIA: Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Age* 1997;18:S1-S2
- 52- Gomez Isla T, Price JL, McKeel Jr DW, Morris JC. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1996;16:4491-4500
- 53- Hesse C, Rosengren L., Vanmechelen E. et al., Cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease evaluated after acute ischemic stroke. *J Alzheimer Dis* 2000; 199-206.
- 54- Otto M., Wiltfang J., Tumani H. et al., Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 225 1997; 210-212.
- 55- Blennow K., Wallin A., Ågren H., Spenger C., Siegfried J. and Vanmechelen E., Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical diagnostic marker for axonal degeneration in Alzheimer's disease?. *Mol Chem Neuropathol* 26 1995; 231-245.
- 56- Vanmechelen E., Vanderstichele H., Davidsson P. et al., Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 285 2000; 49-52
- 57- Ishiguro K., Ohno H., Arai H. et al., Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 270 1999; 91-94
- 58- Hu Y., He S.S., Wang X. et al., Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Pathol* 160 2002; 1269-1278

- 59- Hesse C., Rosengren L., Andreasen N. et al., Transient increase in CSF total tau but not phospho-tau after acute stroke. *Neurosci Lett* 297 2001; 187–190.
- 60- Riemenschneider M., Wagenpfeil S., Vanderstichele H. et al., Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Mol Psychiatry* 8 2003; 343–347.
- 61- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahbaubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In “Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death”, LM Schwartz and BA Osborne (eds.), 1995;150-181, Academic Press, San Diego
- 62- Ying HS, Gottron FJ, Choi DW. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* 2000;7.18.1-7.18.17
- 63- Golde T.E., Younkin S.G. *Pathology of Alzheimer’s disease* . Academic press, New York, 1996;113
- 64- Wang R., Sweeney D., Gandy S.E., Sisodia S.S., *J.Biol. Chem.* 271, 1996; 31894–31902
- 65- Golde T.E, Eckman C.B., Younkin S.G. Biochemical detection of A β isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis and treatment of Alzheimer’s disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1502, 2000; 172–187
- 66- Tapiola T., Pirttila T., Mikkonen M, Mehta P. D., Alafuzoff I., Koivisto K., Soininen H. Three year follow up of cerebrospinal fluid tau, β -amyloid 42 and 40 concentrations in Alzheimer’s disease. *Neuroscience letters* 280, 2000; 119–122
- 67- Masters C.L., Simms G. , Weinman N.A. et al., Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1985; 4245–4249
- 68- Ulrich J. Alzheimer changes in nondemented patients younger than 65: possible early stages of Alzheimer’s disease and senile dementia of Alzheimer’s type. *Ann. Neurol.* 1985;17:273–277
- 69- Johanson K., Bogdanovic N., Kalimo H., Winblad B., Viitatenen M. Alzheimer’s disease and apolipoprotein E4 allele in older drivers who died in automobile accidents. *Lancet* 1997;349:1143–1144
- 70- Nagy Z., Esiri MM., Jobst KA., Morris JH., King EMF., McDonald B., Litchfield S., Smith A., Barnetson L., Smith AD. Relative roles of plaques and tangles in the dementia

- of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia* 1995;6:21–31
- 71- Gibb WRG., Lees AJ., Pathological clues to the cause of Parkinson's disease. *Movement disorders* 3. Oxford 1994;147-166
- 72- Reisberg B., Ferris SH., de Leon MJ., Crook T The Global Deterioration Scale (GDS) for assesment of primary degenerative dementia. *American Journal of Psychiatry* 139:1136-9
- 73- Miller D.L., Papayannopoulos I.A. , Styles J., Bobin S.A, Lin Y.Y., Biemann K. and Iqbal K., Peptide composition of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 301 1993, 41–52.
- 74- Roher A.E., Palmer K.C., Yurewicz E.C., Ball M.J., Greenberg B.D., Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue. *J Neurochem* 61 1993; 1916–1926
- 75- Van Nostrand W.E., Wagner S.L., Shankle W.R. et al., Decreased levels of soluble amyloid beta-protein precursor in cerebrospinal fluid of live Alzheimer disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 1992; 2551–2555.
- 76- Farlow M., Ghetti B., Benson M.D. et al., Low cerebrospinal-fluid concentrations of soluble amyloid beta-protein precursor in hereditary Alzheimer's disease. *Lancet* 340 1992; 453–454.
- 77- Van Gool W.A., Kuiper M.A., Walstra G.J., Wolters E.C., Bolhuis P.A. Concentrations of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 37 1995; 277–279.
- 78- Vanderstichele H, Blennow K, D'Heuvaert ND et al., Development of a specific diagnostic test for measurement of β -amyloid(1-42). In: A. Fisher, I. Hanin and M. Yoshida, Editors, *CSF: progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases*, New York, Plenum Press 1998; 73–778.
- 79- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko Det al., Reduction of β -amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995; 38:643–648.
- 80- Kanai M, Matsuvara E, Isoe K, Urakami K, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Iwatsuba T, Kosaka T, Watanabe M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Mizushima K, Nakamura T, Igata Y, Ikeda Y, Amari M, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K,

- Okamoto K, Hirai S, Shoji M. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A β ₁₋₄₀ and A β ₁₈₋₄₂₍₄₃₎ in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol*, 44, 1999; 17–26
- 81- Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K. Cerebrospinal fluid β ₁₋₄₀ in Alzheimer's disease. Differences between early and late onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol* 56, 1999; 673–680
- 82- Clark CM, Xie S, Chittams J, Ewbank D, Peskind E, Galasko D, Morris JC, McKeel DW Jr, Farlow M, Weithlauf SL, Quinn J, Kaye J, Knopman D, Arai H, Doody RS, DeCarli C, Leight S, Lee VMY, Trojanowski JQ. Cerebrospinal fluid Tau and β -Amyloid. How well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol* 2003;60:1696–1702
- 83- Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ et al., Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231. *Am J Psychiatry* 160 2003; 376–379
- 84- Sjögren M, Davidsson P, Wallin A et al., Decreased CSF β -amyloid₄₂ in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mistreatment of β -amyloid induced by separate mechanisms. *Dementia Geriatr Cogn Disord* 13 2002; 112–118.
- 85- Ishii K, Tamaoka A, Mizusawa H, Shoji S, Ohtake T, Fraser P.E, Takahashi H, Tsuji S, Gearing M, Mizutani T, Yamada S, Kato M, George-Hyslop P.H.St., Mirra S.S., Mori H, *Brain Res.* 1997; 748:250–252
- 86- McNamara M.J, Gomez-Isla T, Hyman BT, *Arch. Neurol* 1998;55:1001–1004
- 87- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y and Tomanaga M, The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein *Neuron* 1991;7: 337–347.
- 88- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity *PNAS* 2002; 99: 6364–6369.
- 89- Svensson AL, Nordberg A. Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of A β (25–35) in rat PC12 cells. *Neuroreport*. 1998;9(7):1519–1522.
- 90- Zhou J, Fu Y, Tang XC. Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett*. 2001;306 (1–2):53–56.

91-Kunicki S, Richardson J, Mehta PD, Kim KS, Zorychta E. The effects of age, apolipoprotein E phenotype and gender on the concentration of amyloid β (A β) 40, A β 42, apolipoprotein E and transthyretin in human cerebrospinal fluid. *Clinical biochemistry* 1998; 31(5):409–415



Ek 1: Alzheimer hastaları

Ad soyad	Cinsiyet	Yaş	Eğitim süresi (yıl)	Hastalık başlangıç yaşı (yıl)	Hastalık süresi (yıl)	MMDT	GYÖ
G.T.	E	69	11	64	5	21	4
H.M.	E	58	15	56	2	25	4
F.A.	K	45	5	44	1	14	4
Ş.H.Ç.	E	67	11	62	5	10	6
M.Ç.	E	67	10	65	2	7	6
H.B.	K	77	0	76	1	14	5
C.B.	K	76	5	74	2	21	4
G.K.	K	64	8	59	5	9	6
H.E.	E	70	12	64	6	24	4
A.R.Ö.	E	71	5	71	1	26	4
H.A.	K	72	5	70	2	21	4
N.G.	K	67	5	64	3	20	4
F.P.	K	76	0	74	2	15	6
B.Ö.	E	72	10	71	1	27	4
M.K.	E	94	15	93	1	21	4

Ek 2: Kontrol grubu

Ad soyad	Cinsiyet	Yaş	Eğitim süresi (yıl)	MMDT	GYÖ
S.U.	K	52	0	26	1
A.C.	E	54	5	27	1
A.A.	K	51	13	30	1
H.S.	E	54	19	30	1
Ş.Ç.	E	61	5	28	1
M.P.	E	72	5	26	1
G.Ö.	K	80	10	27	1
M.D.	E	78	15	27	1
K.K.	K	71	0	27	1
R.D.	K	76	0	26	1
O.A.	E	65	10	29	1
M.O.	K	68	8	30	1
H.A.S.	E	74	3	26	1
C.E.	E	72	5	27	1
A.T.	K	88	8	25	1