

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER'LI HASTALARDA PLAZMA A β 1-40
VE A β 1-42'NİN DOLAŞIMDAKİ SRAGE,
ESRAGE, SLRP1, A β OLİGOMER VE
NEPRİLİZİNLE İLİŞKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. FUNDA UYSAL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2012

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER'LI HASTALARDA PLAZMA A β 1-40
VE A β 1-42'NİN DOLAŞIMDAKİ SRAGE,
ESRAGE, SLRP1, A β OLİGOMER VE
NEPRİLİZİNLE İLİŞKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. FUNDA UYSAL

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Yrd. Doç. Dr. Murat ÖRMEN

İZMİR-2012

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2011.KB.SAG.015
sayılı proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Tablo Listesi	i
Şekil Listesi	iii
Grafik Listesi	iv
Kısaltmalar	v
Teşekkür	viii
ÖZET	1
SUMMARY	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER	8
2.1. ALZHEIMER HASTALIĞI	8
2.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi	9
2.1.2. Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği	12
2.1.3. Alzheimer Hastalığı'nın Tanısı ve Biyobelirteçler	16
2.1.4. Alzheimer Hastalığı'nda Nöropatolojik Değişiklikler	20
2.1.5. Alzheimer Hastalığı'nda Nörobiyokimyasal Değişiklikler	23
2.1.6. Aβ Peptidin Sentezi	25
2.1.6.1. Amiloid Prekürsör Proteini	25
2.1.6.2. APP'nin Parçalanması	25
2.1.7. Aβ Peptid	29
2.1.8. Aβ Oligomerleri	30
2.1.9. Aβ'nin Beyinden Temizlenmesi	34
2.2. İLERİ GLİKASYON SON ÜRÜNLERİ RESEPTÖRÜ (RAGE)	38
2.2.1. RAGE İzofomları	39
2.2.2. RAGE Ligandları	41
2.2.3. RAGE'ye Ait Sinyal Yolakları	42
2.2.4. Aβ'nin Kan Beyin Bariyerindeki Transportunda RAGE'nin Rolü	44
2.2.5. RAGE ve Alzheimer Hastalığı	45
2.3. DÜŞÜK-YOĞUNLUKLULİPOPROTEİN RESEPTÖR-İLİŞKİLİ PROTEİN	48
2.3.1. LRP Ligandları	52
2.3.2. Aβ'nin Kan Beyin Bariyerindeki Transportunda LRP'nin Rolü	54
2.3.3. LRP ve Alzheimer Hastalığı	55

2.4. NEPRİLİZİN	56
2.4.1. A β 'nın Yıkılmasında Neprilizinin Yeri	58
2.4.2. Neprilizin ve Alzheimer Hastalığı	59
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	60
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER	60
3.1.1. Cihazlar ve Kitler	60
3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI	62
3.2.1. Olguların Seçimi	62
3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	63
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	64
3.3.1. A β 1-40 Analizi	64
3.3.2. A β 1-42 Analizi	66
3.3.3. A β Oligomer Analizi	68
3.3.4. sLRP-1 Analizi	70
3.3.5. sRAGE Analizi	71
3.3.6. esRAGE Analizi	73
3.3.7. Neprilizin Analizi	75
3.3.8. AST Ölçüm Yöntemi	77
3.3.9. ALT Ölçüm Yöntemi	78
3.3.10. GGT Ölçüm Yöntemi	78
3.3.11. Kreatinin Ölçüm Yöntemi	79
3.3.12. Trigliserid Ölçüm Yöntemi	79
3.3.13. HDL Kolesterol Ölçüm Yöntemi	80
3.3.14. Total Kolesterol Ölçüm Yöntemi	80
3.3.15. LDL Kolesterol Hesaplanması	81
3.3.16. Eritrosit ve Trombosit Ölçüm Yöntemi	81
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	81
4. BULGULAR	82
4.1. TANIMLAYICI BULGULAR	82
4.1.1. Çalışma Grubu	82
4.1.2. Klinik Evreleme	84
4.2. RUTİN BİYOKİMYASAL VE HEMATOLOJİK PARAMETRE BULGULARI	85
4.3. PLAZMA A β 1-40, A β 1-42 ve A β OLİGOMER DÜZEYLERİ	87
4.3.1. Plazma A β 1-40 Düzeylerinin Karşılaştırılması	87
4.3.2. Plazma A β 1-42 Düzeylerinin Karşılaştırılması	89

4.3.3. Plazma A β Oligomer Düzeylerinin Karşılaştırılması	91
4.4. SERUM sRAGE ve esRAGE DÜZEYLERİ	93
4.4.1. Serum sRAGE Düzeylerinin Karşılaştırılması	93
4.4.2. Serum esRAGE Düzeylerinin Karşılaştırılması	95
4.5. SERUM sLRP1 DÜZEYLERİ	97
4.5.1. Serum sLRP düzeylerinin karşılaştırılması	97
4.6. SERUM NEPRİLİZİN DÜZEYLERİ	99
4.6.1. Serum neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması	99
4.7. A β 1-40, A β 1-42, A β OLİGOMER, sRAGE, esRAGE, sLRP ve NEPRİLİZİN DÜZEYLERİNİN YAŞ VE CİNSİYETE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ	103
4.7.1. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin cinsiyete göre karşılaştırılması	103
4.7.2. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş aralıklarına göre karşılaştırılması	104
4.8. AB1-40, AB1-42, AB OLİGOMER, sRAGE, esRAGE, sLRP ve NEPRİLİZİN DÜZEYLERİNİN ALZHEİMER HASTALARINDA ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRÜ KULLANIMINA GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ	106
4.9. AB OLİGOMER, AB1-40, AB1-42, sRAGE, esRAGE, sLRP ve NEPRİLİZİNE AİT DUYARLILIK VE ÖZGÜLLÜK DEĞERLERİ	108
4.10. KORELASYON ANALİZLERİ	109
4.10.1. Alzheimer hastalarında korelasyon analizleri	109
4.10.1.1. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle korelasyonu	109
4.10.1.2. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE ile korelasyonu	110
4.10.1.3. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu	111
4.10.2. Kontrol grubunda korelasyon analizleri	113
4.10.2.1. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle korelasyonu	113
4.10.2.2. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE ile korelasyonu	114
4.10.2.3. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu	114
4.10.3. Alzheimer hastaları ve kontrol bireylerinden oluşan tüm grupta korelasyonlar	116

4.10.3.1. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle korelasyonu	116
4.10.3.2. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE ile korelasyonu	117
4.10.3.3. A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu	117
5. TARTIŞMA	119
6. KAYNAKLAR ve EKLER	145
6.1.Kaynaklar	145
6.2.Ekler	169

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. NINCDS-ADRDA Alzheimer hastalığının klinik tanı kriterleri	17
Tablo 2. DSM-IV Alzheimer Tipi Demans için tanı kriterleri	18
Tablo 3. A β 'yı yıkan enzimlerin, yer aldıkları enzim ailelerine ve hücrede lokalizasyonlarına göre listesi	35
Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	60
Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kitler	61
Tablo 6. AH ve kontrol gruplarının karşılaştırılması	83
Tablo 7. Rutin biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin kandaki konsantrasyonlarını AH ve kontrol gruplarında karşılaştırılması	86
Tablo 8. AH grubu ve kontrol grubunun A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri açısından karşılaştırılması.	101
Tablo 9. Hafif, orta ve ağır evre AH ile kontrol grubunun A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri açısından karşılaştırılması.	102
Tablo 10. Cinsiyete göre AH grubu ve kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması	103
Tablo 11. Yaş aralıklarına göre AH grubu ve kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması	105
Tablo 12. Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin asetilkolinesteraz inhibitör kullanımına göre karşılaştırılması	107
Tablo 13. Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyonu	109
Tablo 14. Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE korelasyonu	110
Tablo 15. Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu	112
Tablo 16. Kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyonu	113
Tablo 17. Kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu	115

Tablo 18. Tüm grupta A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyonu	116
Tablo 19. Tüm grupta A β 1-40, A β 1-42, A β O, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu	118

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Doğu Boston Çalışması'nda Alzheimer hastalığı prevalansı	10
Şekil 2. ABD'de önde gelen ölüm nedenlerinden bazılarının 1958-2008 yılları arasında gösterdiği değişim grafiği	11
Şekil 3. AH tipleri ve başlıca mutasyonlar.	12
Şekil 4. Hücre içi yerleşim gösteren bir NFY.	21
Şekil 5. Diffüz ve nöritik plak görünüşleri.	22
Şekil 6. H-E boyamasında granülovakuoler dejenerasyondan etkilenmiş bir piramidal nöron ve bir Hirano cisimciği.	23
Şekil 7. APP'nin proteolitik olarak yıkılmasının şematik gösterimi.	26
Şekil 8. APP'nin nöron içindeki taşınımı.	28
Şekil 9. C99'un modellemesi ve kolesterolün, A β üzerindeki bağlantı bölgesi	29
Şekil 10. APP'nin γ -sekretaz tarafından ardışık olarak kesime uğratılması	30
Şekil 11. A β 1-42'ye ait fibril, protofibril ve ADDL'lerin görüntüleri	32
Şekil 12. A β 'nın beyinden temizlenmesini sağlayan mekanizmalar	34
Şekil 13. RAGE'nin şematik gösterimi	38
Şekil 14. esRAGE, tRAGE ve Nt-RAGE'nin oluşumundan sorumlu olan hücresel mekanizmalar	40
Şekil 15. RAGE-ligand etkileşimi sonrasında aktive olan sinyal yolları.	41
Şekil 16. RAGE-ligand etkileşimi sonrasında NF- κ B'nin aktive edilmesi	43
Şekil 17. A β 'nın RAGE ve LRP aracılığıyla kan-beyin bariyerinde transport edilmesi	45
Şekil 18. LDL reseptör ailesini oluşturan reseptörlere ait yapısal bileşenler	49
Şekil 19. LRP'nin hücre membranında proteolitik yıkımı ve LRP ligandları.	51
Şekil 20. A β 'yı yıkan enzimlere ait proteolitik kesim noktaları.	58
Şekil 21. sRAGE standartının seri dilüsyonu.	73
Şekil 22. Neprilizin standartının seri dilüsyonu.	76
Şekil 23. Alzheimer hastalarının CDR evrelemesine göre dağılımı.	84

GRAFİK LİSTESİ

	Sayfa No
Grafik 1. A β 1-40 standart eğrisi.	64
Grafik 2. A β 1-42 standart eğrisi.	66
Grafik 3. A β Oligomer standart eğrisi.	68
Grafik 4. sLRP-1 standart eğrisi.	70
Grafik 5. sRAGE standart eğrisi.	72
Grafik 6. esRAGE standart eğrisi.	74
Grafik 7. Neprilizin standart eğrisi.	76
Grafik 8. AH grubu ve kontrol grubu arasında A β 1-40 düzeylerinin karşılaştırılması.	87
Grafik 9. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında A β 1-40 düzeylerinin karşılaştırılması.	88
Grafik 10. AH grubu ve kontrol grubu arasında A β 1-42 düzeylerinin karşılaştırılması.	89
Grafik 11. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında A β 1-42 düzeylerinin karşılaştırılması.	90
Grafik 12. AH grubu ve kontrol grubu arasında A β O düzeylerinin karşılaştırılması.	91
Grafik 13. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında A β O düzeylerinin karşılaştırılması.	92
Grafik 14. AH grubu ve kontrol grubu arasında sRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.	93
Grafik 15. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında sRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.	94
Grafik 16. AH ve kontrol grubu arasında esRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.	95
Grafik 17. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında esRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.	96
Grafik 18. AH grubu ve kontrol grubu arasında sLRP düzeylerinin karşılaştırılması.	97
Grafik 19. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında sLRP düzeylerinin karşılaştırılması.	98
Grafik 20. AH ve kontrol grubu arasında neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması.	99
Grafik 21. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması.	100
Grafik 22. A β oligomerin ROC eğrisi analizine göre ağır evre AH'nın tanısındaki etkinliği	108

KISALTMALAR

A2MR	: Alfa-2-makroglobulin reseptörü
ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
Ach	: Asetilkolin
AchE	: Asetilkolinesteraz
ADDL	: A β -derived diffusibl ligand
ADP	: Adenozin difosfat
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
AH	: Alzheimer hastalığı
AICD	: APP'in intraselüler parçası
ALT	: Alanin aminotransferaz
AP	: Amiloid plak
ApoE	: Apolipoprotein E
APOE	: Apolipoprotein E geni
ApoER	: Apolipoprotein E reseptörü
APP	: Amiloid prekürsör proteini
Ark.	: Arkadaş
ASPD	: Amilosferoid oligomer
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATP	: Adenozin trifosfat
Aβ	: Amiloid beta
Aβ1-40	: Amiloid beta 1-40
Aβ1-42	: Amiloid beta 1-42
Aβx-40	: N-terminali kesilmiş amiloid beta 1-40
Aβx-42	: N-terminali kesilmiş amiloid beta 1-42
AβO	: A β oligomeri
BACE1	: Beta-site APP cleaving enzyme 1
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
BUN	: Kan üre azotu
CatB	: Katepsin B
CDR	: Klinik Demans Evreleme Ölçeği
DSM-IV	: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition

ECE	: Endotelin-dönüştürücü enzim
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent ölçüm
ER	: Endoplazmik retikulum
esRAGE	: Endojen çözünabilir RAGE
fAβ	: Fibriler formdaki A β
GGT	: Gama glutamil transferaz
GSK-3β	: Glikojen sentetaz kinaz- 3 beta
GVD	: Granülovakuoler dejenerasyon
H&E	: Hematoksilen-Eozin
hAβ1-40	: İnsan A β 1-40
HBA	: Hidroksibenzoik asit
HKB	: Hafif kognitif bozukluk
HMGB1	: Yüksek mobilitesi olan grup B1 protein
HRP	: Horse radish peroksidase
IDE	: İnsülin-yıkıcı enzim
IL	: İnterlökin
KAH	: Koroner arter hastalığı
KBB	: kan-beyin bariyeri
LDLR	: Düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptörü
LICD	: LRP'nin intraselüler parçası
LRP	: Düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili protein
LTP	: Long-term potensiyasyon
M1AChR	: Post-sinaptik membrandaki muskarinik reseptör
MBP	: Miyelin bazık proteini
M-CSF	: Makrofaj koloni-stimüle edici faktör
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MMSE	: Kısa Mental Durum Muayenesi
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NEP	: Neprilizin
NFY	: Nörofibriler yumak
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa beta

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

NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
Nt-RAGE	: N-terminali kesilmiş tip RAGE
OD	: Otozomal dominant
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PF	: Protofibril
PS	: Presenilin proteini
PSEN	: Presenilin geni
RAGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü
RAGE-v	: RAGE-varyant
RAP	: Reseptör-ilişkili protein
RIP	: Kontrollü membran içi proteoliz
sAPP-α	: α -sekretazla ayrılmış-çözünebilir APP
sAPP-β	: β -sekretazla ayrılmış-çözünebilir APP
sAβ	: Çözünebilir A β
sLRP	: Çözünebilir LRP
SRAGE	: Çözünebilir RAGE
SSS	: Santral sinir sistemi
SST	: Somatostatin
STAT	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TGN	: Trans-golgi ağı
TMB	: Tetra metil benzin
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör
tPA	: Doku plazminojen aktivatörü
TRAGE	: Truncated (kesilmiş) RAGE
TTR	: Transtiretin
uPA	: Ürokinaz tip plazminojen aktivatörü
uPAR	: uPA reseptörü
VSMC	: Vasküler düz kas hücrelerinde
α2M	: α 2-makroglobulin
α4β2nAChR	: Post-sinaptik membrandaki nikotinik reseptör

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER ve Sayın Prof. Dr. Banu ÖNVURAL' a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Uzmanlık eğitimi ve tez çalışmamın her aşamasında deneyim ve engin bilgisini benimle paylaşan, güler yüzü, sabırlı ve hoşgörüsüyle yardım taleplerimi hiçbir zaman geri çevirmeyen, her konuda desteğini gördüğüm ve öğrencisi olmaktan çok büyük mutluluk ve gurur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Murat ÖRMEN' e,

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda bilgilerine başvurabildiğim ve her zaman desteklerini gördüğüm, hepimize örnek olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN, Prof. Dr. Kemal BAYSAL, Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK, Prof. Dr. Hüray İşlekel, Prof. Dr. Sezer UYSAL, Prof. Dr. Halil RESMİ, Prof. Dr. Pınar TUNCEL, Prof. Dr. Gülgün OKTAY, Doç. Dr. Pınar AKAN, Doç. Dr. Emel ALTEKİN, Doç. Dr. Ali Rıza ŞİSMAN, Doç. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, Yard. Doç. Dr. Tuncay KÜME ve Yard. Doç. Dr. Nilgün YENER'e,

Tezimin Nöroloji ayağını yürüten değerli hocam Sayın Prof Dr. Görsev YENER' e,

Asistanlığım boyunca dostluklarını ve bilgilerini esirgemeyen, bana her zaman moral ve güç veren sevgili arkadaşlarım Sayın Uzm. Dr. Birsen TUĞLU ve Sayın Uzm. Dr. Özlem GÜRSOY ÇALAN' a,

Son derece sıcak ve uyumlu çalışma ortamı bulduğum, sevgileri ile tüm yorgunluk ve sıkıntıları unutturan değerli tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez örneklerinin analizi aşamasında yardımcı olan, çalışmaktan keyif aldığım sevgili merkez laboratuvarı çalışanlarına,

Bu zorlu süreçte dostluk ve sabrını benden esirgemeyen, tüm evraklarımın takibinde büyük titizlik gösteren anabilim dalımızın güler yüzlü sekreteri Sayın Eda OLUM'a,

Hayatımı güzelleştiren ve kolaylaştıran, bana hep destek olan anne ve babama, kardeşim Sayın Uzm. Dr. Murat UYSAL'a teşekkür ederim.

Dr. Funda UYSAL

İzmir 2012

ÖZET

Amiloid plakların esas bileşeni olan amiloid beta (A β), Alzheimer hastalığı (AH)'nın patogeneğinde merkezi bir role sahiptir. Günümüzde yaygın olarak kabul gören görüşe göre hastalığın oluşumundan sorumlu esas A β formları, A β oligomerleridir. Alzheimer hastalarının %99'unu oluşturan sporadik tip AH'nda beyindeki artmış A β düzeylerinin nedeni henüz netleştirilmiş değildir. Ailesel tip AH'dan farklı olarak sporadik tip AH'nda, A β üretiminin arttığına dair direkt kanıtlar bulunmaması nedeniyle beyindeki artmış A β düzeylerinden sorumlu olan esas mekanizmanın, A β yıkımında veya beyinden kana doğru olan taşınmasında ortaya çıkan bozulmanın olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı, plazma A β 1-40, A β 1-42 ve A β oligomer düzeylerinin yanı sıra beyindeki A β 'nın yıkılmasından sorumlu esas enzim olan neprilizin, A β 'nin beyinden dolaşıma doğru temizlenmesini sağlayan düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP)'in ve LRP'in tam tersi olarak A β 'yı dolaşımdan beyine doğru taşıyan ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE)'ne ait sekrete edilen formlar olan çözünebilir RAGE (sRAGE) ve endojen olan sekrete edilen RAGE (esRAGE)'nin serum düzeylerini belirlemektir.

Çalışmaya 50 Alzheimer hastası ve 50 sağlıklı yaşlı kontrol olmak üzere toplam 100 kişi dahil edildi. Alzheimer hastaları klinik demans evreleme ölçeği (CDR) kullanılarak hafif (CDR:1), orta (CDR:2) ve ağır (CDR:3) olarak evrelere ayrıldı. Dolaşımdaki A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri, ELISA ile saptandı. Eş zamanlı olarak rutin biyokimyasal (karaciğer enzimleri, lipid profili, börek fonksiyon testleri) ve hematolojik (eritrosit, lökosit, trombosit, hemoglobin, hematokrit) parametreler otoanalizör ile ölçüldü. Elde edilen sonuçların, çeşitli değişkenler (yaş, cinsiyet, kısa mental durum muayenesi, rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler) ile olan ilişkisi değerlendirildi.

AH ve kontrol grupları arasında dolaşımdaki A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin seviyeleri için anlamlı farklılık saptanmadı. Hastaların evrelere ayrılmasından sonra A β oligomer düzeyleri, ağır evrede hafif evre ve kontrole göre anlamlı düşük saptandı. A β oligomerlerin, ağır evre hastaları saptamada %69 duyarlılık ve %84 özgüllüğe sahip olduğu görüldü. sRAGE, ağır evrede orta evreye göre belirgin olarak düşük seviyede belirlendi. esRAGE düzeyleri ise ağır evrede hafif evreye göre anlamlı olarak düşük bulundu. Alzheimer hastalarında esRAGE düzeylerinin, galantamin kullananlara göre donepezil ve rivastigmin kullananlarda, belirgin olarak yüksek olduğu tespit edildi. Hem AH

hem de kontrol grubunda A β 1-42 ile sRAGE arasında ve sRAGE ile esRAGE arasında korelasyon bulundu. Her iki grupta da esRAGE/sRAGE oranı, 1:3 olarak belirlendi. Ayrıca Alzheimer hastalarında, yaş ile A β 1-42 arasında ve MMSE ile A β oligomer, sRAGE ve esRAGE arasında korelasyon olduğu görüldü. Bunlara ek olarak Alzheimer hastalarında A β 1-42, sRAGE ve sLRP ile böbrek fonksiyon testleri arasında ve sağlıklı kontrollerde ise A β 1-40 ile eritrosit sayısı arasında korelasyon saptandı.

Sonuç olarak dolaşımdaki A β 1-40, A β 1-42, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerini ölçmenin AH tanısında kullanılamayacağını, ancak özellikle ağır evrelerin saptanması amacıyla A β oligomerlerin kullanılabileceğini düşünmekteyiz. esRAGE ve neprilizin düzeylerinin çalışmamız ile ilk kez değerlendirilmiş olmasının yanı sıra A β oligomer ve sLRP düzeyleri için çalışmamız da dahil olmak üzere yalnızca iki çalışmanın bulunması nedeniyle bu parametrelerin AH tanısında kullanılmasına dair ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sRAGE/esRAGR, sLRP, neprilizin, biyobelirteç, MMSE, CDR, ELISA

SUMMARY

Beta-amyloid (A β), the key component of the amyloid plaque, has been shown to be central to Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. According to a widely accepted view, A β oligomers are responsible for the formation of the disease. The cause of A β deposition in sporadic type AD which accounts for more than %99 of all disease cases, however, remains unclear. Over production of A β is observed in the familial type AD, but there is no evidence if this situation is also observed in the sporadic type AD. Deficiencies in the A β clearance or enzyme-mediated A β degradation are thought to be responsible for A β accumulation in sporadic type AD. The aim of the study is to determine the plasma levels of A β 1-40, A β 1-42 and A β oligomers and the serum levels of neprilysin which is main proteolytic enzyme of the A β in the brain and sLRP which is secreted form the transporter of A β from brain to blood, also known as LRP. We also determined the serum levels of sRAGE and esRAGE which are the secreted forms of RAGE, the carrier of A β from blood to brain.

A total of 100 participants, composed of 50 patients with AD and 50 healthy controls were enrolled in the study. AD patients were divided in to three subgroups according to clinical stages: mild stage (CDR:1), moderate stage (CDR:2) and severe stage (CDR:3). Circulating levels of A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP and neprilysin were determined by the ELISA method. Simultaneously, routine biochemical (liver enzymes, lipid profile, kidney function tests) and hematologic (erythrocytes, leukocytes, platelets, hemoglobin, hematocrit) parameters were measured by the autoanalyzer. Correlations of results with different variables (age, gender, mini mental stage examination, routin biochemical and hematological parameters) were also evaluated.

No significant difference was found for circulating levels of A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilysin, between AD and control groups. A β oligomer levels in patients after staging a severe stage were significantly lower than mild stage and control. A β oligomers have 69% sensitivity and 84% specificity for detection of patients with severe stage. Serum sRAGE was significantly decreased in the severe stage when compared with the moderate stage. Also, serum esRAGE was significantly lower in the severe stage than the mild stage. Serum esRAGE was significantly higher in the AD patients treated with galantamin than patients treated with donepezil and rivastigmine. A correlation was found

between the A β 1-42 and sRAGE in AD and control groups. In both groups, sRAGE correlated with esRAGE and the esRAGE/sRAGE ratio was determined as 1:3. A correlation was found between the age and A β 1-42 in AD patients. Additionally, in AD patients, MMSE correlated with A β oligomer, sRAGE and esRAGE. Furthermore A β 1-42, sRAGE and sLRP correlated with kidney function tests in AD patients and a correlation was found A β 1-40 and erythrocyte counts.

In conclusion, we think that the blood levels of A β 1-40, A β 1-42, sRAGE, esRAGE, sLRP and neprilysin could not be used as a diagnostic marker in AD patients. However, plasma A β oligomers could be used for this purpose in patients in the severe stage. We report, for the first time, serum levels of esRAGE and neprilysin in AD patients. In addition there is only one report, besides our study, for the measure mean of blood levels A β oligomers and sLRP in AD patients. For these reasons, additional studies are greatly needed to determine whether these parameters possess the capacity to aid in the clinical diagnosis of AD.

Kew Words: Alzheimer's disease, A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sRAGE/esRAGR, sLRP, neprilysin, biomarker, MMSE, CDR, ELISA

1. GİRİŞ VE AMAC

Alzheimer hastalığı (AH), demansın en sık nedeni olup yaşlı nüfustaki artışa paralel olarak görülme sıklığı giderek artış göstermektedir (1). Günümüzde AH'nin tanısı için kan, idrar ve ter gibi kolay elde edilebilen biyolojik sıvılarda bakılacak olan biyokimyasal belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (2). Bu amaçla sporadik Alzheimer'lı hastalarda AH'nin patofizyolojisinde merkezi rol oynadığı düşünülen amiloid-beta peptidin ($A\beta$) plazmadaki değerleri incelenmiş ve sağlıklı yaşlı bireylerle karşılaştırıldığında artmış, azalmış ve değişmemiş seviyeler gibi birbiriyle uyuşmayan sonuçlar bildirilmiştir (3-5). Hastaların yaklaşık olarak %95-99'undan sorumlu tutulan sporadik tip AH'nda $A\beta$ 'nın beyindeki birikim mekanizması henüz açığa kavuşturulabilmiş değildir. Sporadik AH'nda muhtemelen $A\beta$ 'nın artmış üretimine ek olarak $A\beta$ 'nın yıkımında azalma ve beyinden kana temizlenme mekanizmasında ise bozulma meydana gelmektedir (6). Bu sebeple $A\beta$ 'nın parçalanması ve beyinden uzaklaştırılmasında rol oynayan mekanizmaları açıklamaya yönelik çalışmalar günümüzde artan bir ilgiyle karşılanmakta ve araştırmacılar için cazip bir çalışma alanı oluşturmaktadır. $A\beta$ 'nın yıkımından sorumlu peptidazlar arasında özellikle neprilizin (NEP) ön plana çıktığı görülmektedir. NEP'in inhibe edildiği ya da genetik olarak NEP üretiminin engellendiği farelerle yapılan çalışmalarda, korteks ve hippocampustaki $A\beta$ seviyelerinde artış saptanmıştır (7). RAGE (İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü) ve LRP1 (Düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili protein), kan beyin bariyerindeki endotel hücre membranında yerleşim gösteren ve $A\beta$ 'nın transportunda rol oynadıkları düşünülen iki farklı reseptördür. RAGE, $A\beta$ 'yı kandan beyne doğru taşıırken LRP1 ise tam tersi yönde beyinden kana doğru taşımaktadır (8). Günümüzde çoğu araştırmacı için diğer formlara kıyasla $A\beta$ 'nın oligomer formları, nöronlar için en toksik olan patojenik yapılardır ve AH patogenezinde merkezi bir role sahiptir. Daha önceki çalışmalarda kullanılan klasik ELİSA ölçüm yöntemleri ile $A\beta$ 'nın yalnızca monomer formları değerlendirilebilmektedir (9). Fakat $A\beta$ 'nın oligomer formlarının AH patogenezinde daha etkin bir rol oynadığının anlaşılması sonucu $A\beta$ oligomerlere yönelik çalışmaların sayısı giderek artış göstermektedir.

$A\beta$ peptidin dışında Alzheimer'lı hastaları, diğer tip demanslı hastalardan veya sağlıklı yaşlı bireylerden ayırmak amacıyla kullanılabilecek pek çok tanısal biyobelirteç adayı öne sürülmüştür. Bu biyokimyasal moleküller arasında sLRP1, sRAGE ve neprilizin de yer almaktadır. AH'nin ayırıcı tanısında sLRP1 ve neprilizin kullanıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (10, 11). Alzheimer'lı hastalardaki plazma sRAGE düzeylerini inceleyen kısıtlı

sayıdaki çalışma neticesinde dolaşımdaki total sRAGE miktarlarının sağlıklı yaşlı bireylere göre daha düşük olduğu gösterilmiş fakat bu düşüşün hücre membranından kopup ayrılan kesilmiş RAGE (tRAGE) formunda mı yoksa hücre tarafından endojen olarak sentezlenen sRAGE formunda (esRAGE) mı gerçekleştiği henüz aydınlatılabilmemiş değildir.

Karaciğer ve böbrekler, plazmadaki A β 'nın temizlenmesinden sorumlu olan iki major organdır. Plazma A β konsantrasyonları ile serum kreatinin düzeyleri arasında güçlü bir korelasyonun bulunduğu ve böbrek fonksiyonlarındaki bozulmanın plazma A β seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir. Fakat AST, ALT ve GGT gibi karaciğer fonksiyon testleri ile dolaşımdaki A β düzeyleri arasındaki korelasyonu inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (12). Ayrıca karaciğer enzim düzeyleri ile plazma A β seviyeleri arasında herhangi bir ilişki saptanamaz ise dolaşımdaki A β 'nın temizlenmesinde hepatosit fonksiyonlarındaki genel bozulmadan ziyade bazı araştırmacıların da öne sürdüğü gibi hepatosit hücre membranındaki LRP1 miktarlarının daha etkin rol oynadığına ilişkin ilk ön veriler elde edilmiş olacaktır (13).

Çalışmamızda CDR ve MMSE skorlaması kullanılarak AH grubundaki hastaların hafif, orta ve ağır evre olmak üzere alt gruplara ayrılması sağlanıp, farklı klinik evrelerde yer alan hastalar arasında A β seviyeleri açısından farklılık bulunup bulunmadığı araştırılacaktır. Literatürde A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer ile sLRP1, sRAGE, esRAGE ve neprilizin birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sonuç olarak bu çalışmadaki amacımız:

1. Yaş, cinsiyet, ilaç kullanımı, Alzheimer'lı hastalarla birinci derece akrabalık gibi A β 'nın dolaşımdaki seviyelerini etkileyen parametreler göz önünde bulundurularak uygun eşleştirme yapılan sporadik Alzheimer hastaları ve demans açısından sağlıklı bireylere ait plazma A β 1-40 ve A β 1-42 seviyelerinin ölçülmesi ve bu sayede plazma A β düzeylerini inceleyen daha önceki çalışmaların birbirleriyle tutarsızlık gösterme nedeninin açıklanmaya çalışılması,
2. A β metabolizmasını etkileyerek AH patogenezinde rol oynayan sLRP1 ve sRAGE'nin serum düzeyleri ile plazma A β seviyeleri arasındaki ilişkinin incelenmesi,
3. Alzheimer'lı hastalarda ilk defa serum esRAGE ve neprilizin düzeyleri hakkında bilgi elde edilmesi
4. Serum esRAGE ve sRAGE seviyelerinin ilk kez eş zamanlı olarak ölçülmesiyle esRAGE/sRAGE oranının belirlenmesi

5. Böbrek fonksiyon testleri ve lipid profil seviyeleri ile dolaşımdaki A β türleri, sLRP1, sRAGE, esRAGE ve neprilizin seviyeleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi ve ilk defa karaciğer fonksiyon testleri ile bu parametreler arasındaki ilişkinin araştırılması,
6. Plazma oligomer A β seviyelerinin ölçülmesi ve monomer formlarla olan ilişkinin araştırılması,
7. A β ile birlikte sLRP1, sRAGE, esRAGE ve neprilizin tanısal açıdan duyarlılık ve özgüllüğe olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH), bilişsel yeteneklerde bozulma ve günlük yaşamsal aktivitelerde azalma ile karakterize, nöropsikiyatrik semptomların ve davranışsal değişikliklerin eşlik ettiği ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Erişkinlerde demansın en sık nedeni olup, tüm demans vakalarının üçte ikisinden fazlasını oluşturmaktadır (14). Yaklaşık 100 yıl kadar önce tanımlanmış olan AH, o dönemlerde nadir bir hastalık olarak değerlendirilirken insan ömründeki uzamaya paralel olarak günümüzde sık görülen bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Gerek kişide neden olduğu ciddi hastalık tablosu nedeniyle ve gerekse hastaya bakan kişilere yüklediği ağır yük sebebiyle önemli bir halk sağlığı problemidir.

AH ilk kez, 1906 yılında ilerleyici zihinsel işlev bozukluğu ve davranış değişikliği yakınmaları ile hastaneye yatırılan, beş yıl boyunca izlenen ve ölümü ardından otopsisı yapılan Auguste D. isimli kadın hastadan elde edilen verilere dayanılarak tanımlanmıştır (15). 1850 yılında doğan ve literatürde AH'nın ilk olgusu olma onurunu taşıyan Auguste D., 1890'ların sonlarına doğru bellek ve dil bozuklukları şeklinde demans semptomları geliştirmeye başlamış, kısa zamanda ciddi psikotik özellikler ve ajitasyonun eklenmesiyle birlikte 1901'de, muayene edileceği Frankfurt Akıl Hastanesi'ne yatırılmıştır. Alman psikiyatrist ve nöropatoloğu olan Alois Alzheimer, bu klinikte çalışırken Auguste D. ile karşılaşarak hastayı izlemeye başlamış fakat 1902'de hocası ve şizofreni hastalığının da isim babası olan ünlü psikiyatrist Emil Kraepelin'in daveti üzerine önce Heidelberg'e, bir yıl sonra da yine Kraepelin ile birlikte Münih'e gitmiştir. Auguste D.'nin 1906'da Frankfurt'daki klinikte ölmesi üzerine Dr. Alzheimer, eski çalışma arkadaşlarından Auguste D.'ye ait klinik kayıtları ve beyin dokusunu rica ederek hastaya ait beyin kesitlerinde amiloid plaklar olarak adlandırılacak miliyer odakları ve yine nörofibriler yumaklar adını alacak intraselüler fibril birikintilerini tanımlamıştır. Alois Alzheimer'in 1906'da Tübingen'deki Güneydoğu Alman Psikiyatri Derneği'nin 37. Toplantısı'nda sunduğu bu olguyu, bir yıl sonra Genel Psikiyatri ve Adli Tıp Dergisi'nde "Serebral Korteksin Özgün Bir Hastalığı" başlığı ile yayınlanmıştır. Literatüre bakıldığında hastalığa ismini veren kişinin Dr. Alzheimer'ın klinik şefi Dr. Emil Kraepelin'in olduğu görülmektedir. Kraepelin, "Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Aerzte" adlı dönemin ünlü ders kitabının 1913'teki baskısında bu tür olgulara Alzheimer'ın adını vermiştir (16).

Alois Alzheimer'ın tanımladığı bu ilk olgu, gerek erken başlangıç ve gerekse davranışsal belirtilerin ön planda olması nedeniyle klinik tablo açısından AH'nın atipik vakalarındandır. AH, tipik olarak 65 yaş üstü bireylerde görülmekte ve baskın olarak yakın belleğin, dilsel ve yürütücü işlevlerin bozulduğu, hastalığın ilerleyen dönemlerinde nöropsikiyatrik bulguların da eklendiği hastalık tablosuyla karakterizedir (17). Auguste D.'nin atipik özellik göstermesi sebebiyle, bu olgunun orijinal dosyası son zamanlarda yeniden bulunmuş ve dosya bulgularına göre spekülasyonlar yapılarak aslında olgunun tipik nörodejenerasyondan ziyade beynin aterosklerozuna bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bu gelişmeler üzerine Auguste D'ye ait histolojik preparatların yeniden incelenmesi sonucu serebral kortekste çok fazla miktarda nörofibriler yumak ve amiloid plak olduğu gösterilmiştir. Bu durumda, Auguste D.'nin, bugünün standartlarıyla AH'nın patolojik tanı kriterlerini karşıladığı anlaşılmaktadır (18). Bu ilk olgunun, genç yaşta olması nedeniyle 1970'lerin ortalarına kadar AH, "pre-senil demanslar" kategorisi altında ve nadir görülen hastalıklardan biri olarak sınıflandırılmıştır. Fakat 1970'lerin ortalarından itibaren, aslında çok daha sık görülen ve "kronik organik beyin sendromu" ya da "serebral skleroz" gibi adlar da verilen "senil demansın", AH ile aynı klinik antite olduğu anlaşılmıştır (19).

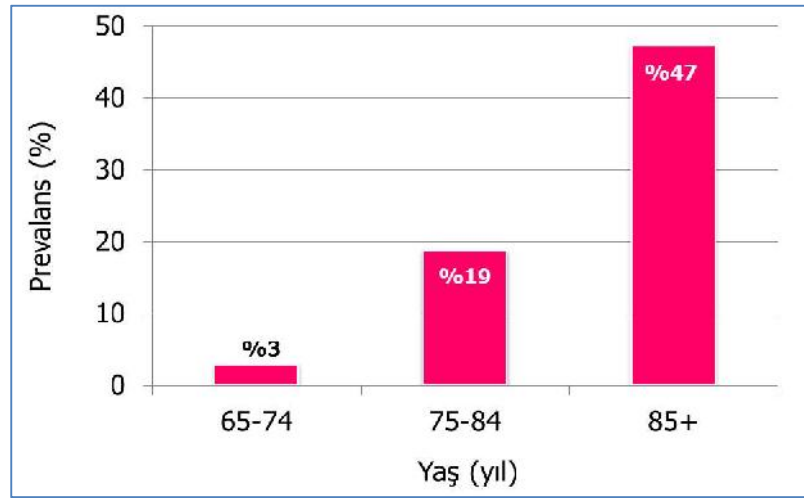
Günümüzde AH, genellikle hastalığın başlama yaşına göre sınıflandırılmaktadır. 65 yaşından önce ortaya çıkan AH "erken-başlangıçlı" (EBAH) , 65 yaşından sonra ortaya çıkan AH ise "geç-başlangıçlı" (GBAH) olarak tanımlanır. EBAH ve GBAH olguları arasında hastalığın başlangıç yaşı dışında belirgin bir klinik ve patolojik fark görülmez (20). Literatürde EBAH'nın "ailesel tip AH", GBAH'nın ise "sporadik tip AH" olarak da isimlendirildiği görülmektedir. Ailesel tip AH, otozomal dominant kalıtıma sahiptir ve tüm Alzheimer olgularının yalnızca %2'sini oluşturmaktadır (21). Geriye kalan %98'lik kısmı oluşturan sporadik tip AH'nda ise belirgin bir genetik kalıp saptanmamakla beraber hastalığın oluşumunda, birçok genetik ve çevresel faktörün birlikte rol oynadığı düşünülmektedir (19).

2.1.1. Alzheimer Hastalığı'nın Epidemiyolojisi

Dünyada 35 milyon Alzheimer hastasının olduğu tahmin edilmektedir (14). İnsan ömrünün her geçen gün uzadığı göz önünde bulundurulduğunda, önümüzdeki on yıl içinde bu sayının 50 milyona, 2050 yılında ise 115 milyona çıkacağı öngörülmektedir (22). Yaşın ilerlemesi ile birlikte AH prevalansının (belli bir zaman kesitinde bulunan tüm olguların nüfusa oranı) belirgin şekilde arttığı gözlenir. Dünya genelinde yapılan prevalans çalışmalarının metaanalizi, 65-70 yaşları arasında %4-5 kadar olan AH'nın, her beş yılda bir katlanarak

arttığını ve 90'lı yaşlarda %50'ye kadar ulaştığını ortaya koymaktadır (6). Yaşa-özl insidans (belli bir zaman aralığında ortaya çıkan yeni olguların sayısı) da yaş aralıkları artıkça hızla artış gösterir. Jorm ve jolley'in meta-analiz çalışmasında, 65-69 ile başlayıp 85-89 ile sonlanan beşer yıllık yaş katmanlarında insidansın %1.6, %3.5, %7.8, %14.8 ve %26 şeklinde katlanarak arttığı görülür (23). 90 yaşın üzerindeki bireylerin toplumdaki sıklığının az olması ve bu yaş grubundan elde edilen verilerin yetersizliği nedeniyle bu yaş sınırı üzerinde insidansın artmaya devam edip etmediği henüz netleştirilebilmiş değildir. Bu veriler ışığında, AH başlangıcını beş yıl geciktirecek bir tedavinin ortaya konması neticesinde hastalık prevalansının %50 oranında azaltılabileceği görülmektedir (24).

Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) Doğu Boston bölgesinde toplum taraması şeklinde yapılan bir çalışmada, 65 yaş üzeri yaklaşık 3000 hasta ele alınmış ve AH'na ait prevalans hızının, 65 yaş üzerinde %10.3, 85 yaş üzerinde ise %47.2 olduğu gösterilmiştir (25) (Şekil 1). Bugün yaklaşık olarak beş milyon Amerikalı'nın bu hastalığın etkisi altında olduğu düşünülmektedir. Bu hastaların %6'sı 65-74 yaş aralığında, %44'ü 75-84 yaş aralığında ve %46'sı 85 yaş ve üzerinde olup AH evrelemesinde %48'i hafif, %31'i orta ve %21'i ileri evrede yer almaktadır (26).



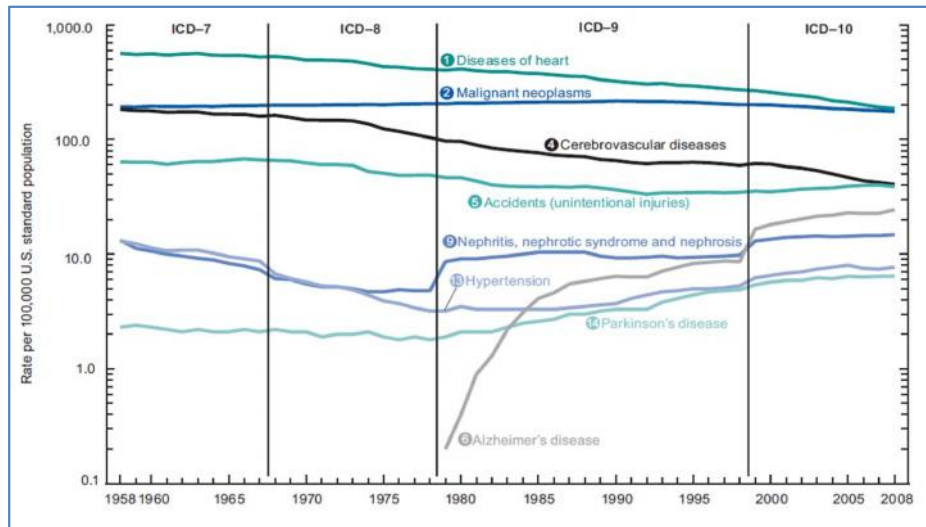
Şekil 1. Doğu Boston Çalışması'nda Alzheimer hastalığı prevalansı (25)

Literatürde Türkiye'deki AH prevalansını değerlendirmeye yönelik oldukça az sayıda çalışmanın gerçekleştirildiği görülmektedir. 2008 yılında İstanbul Kadıköy ilçesindeki 1019 katılımcıyla gerçekleştirilen Türkiye Alzheimer Hastalığı Prevalansı Çalışması'nda, 70 yaş üzerindeki bireyler arasında AH prevalansının %11 olduğu bildirilmiştir (27). Bu prevalans değerine göre Türkiye'de 250-300 bin Alzheimer hastası olduğu varsayılmaktadır. Bir diğer

çalışma Ankara’da gerçekleştirilmiş olup Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları AD Geriatri Ünitesinde 1251 yaşlının (≥ 60 yaş) nörolojik, laboratuvar ve radyolojik incelemelerle değerlendirilmesi sonucu 120 kişide (%9.6) AH saptanmıştır (28). Bu iki çalışmaya ait bulgular, Batı Avrupa ülkeleri ve ABD’ye ait veriler ile paralellik taşımakta ve ülkemiz açısından AH’nın önemli bir sağlık problemi olduğuna işaret etmektedir.

Nadir görülen erken başlangıçlı ailesel tip Alzheimer hastaları göz ardı edildiğinde AH’nın, açık bir şekilde yaşlı nüfusa ait bir hastalık olduğu ve 65 yaşından sonra görülme sıklığında belirgin bir artış gerçekleştiği görülmektedir. 65 yaş üzerindeki bireylerin genel nüfusa oranı Türkiye için 2011 yılı verilerine göre %7 civarındadır (29). Bu rakamlar ABD’de 2010 yılı için %13 (30), Avrupa Birliği’nde 2009 yılı için %17’dir (31). ABD’de 1950-2000 yılları arasında 65 yaş üzerindeki yaşlıların sayısında 3.3 kat artış ve aynı zaman dilimi içinde 85 yaş ve üzeridekilerin sayısında ise 9.5 kat artış olmuştur (30, 32). 2050 yılında dünya nüfusunun %22’sinin 65 yaşın üzerinde olacağı öngörülmektedir (33). Bu rakamlar, artan yaşlı nüfusu ile birlikte logaritmik olarak artış gösteren AH’nın, gelecekte en önemli sağlık sorunlarından biri olacağı izlenimini vermektedir.

AH, yüksek mortalite oranlarına sahiptir ve gelişmiş ülkelerdeki ölüm nedenleri arasında tüm yaş grupları için altıncı sırada, 65 yaş üstü bireylerde ise beşinci sırada yer alır (34). Diğer önemli ölüm nedenlerinden farklı olarak AH’na bağlı mortalite oranları, ilerleyen yıllar içinde belirgin şekilde artış göstermiştir (Şekil 2). ABD’de 2000-2008 yılları arasındaki dönem için AH’na bağlı ölümlerde %66’lık bir artış gerçekleşmiş iken bir numaralı ölüm nedeni olarak kabul edilen kalp hastalıklarında %13’lük azalışla karşılaşmıştır (34).

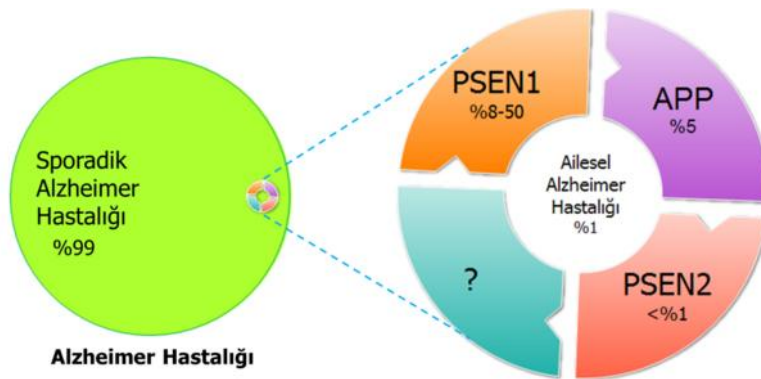


Şekil 2. ABD’de önde gelen ölüm nedenlerinden bazılarının 1958-2008 yılları arasındaki değişimi (34)

Alzheimer Derneği'nin (Alzheimer's Association) 2012 yılı raporunda, AH'na ayrılan ABD ulusal bütçesinin 200 milyar dolar olduğu belirtilmiştir (35). AH'nın dünya genelindeki maliyetine bakıldığında ise İsveç'teki Karolinska Enstitüsü-Alzheimer Araştırma Merkezi tarafından verileri belirli aralıklarla güncellenen Dünya Çapında Demans Maliyet Veritabanı'nda, 2009 yılı için AH'na 422 milyar dolar harcandığı hesaplanmıştır (36). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda AH'nın ekonomik açıdan ağır yük getiren önemli bir toplumsal sağlık problemi olduğu açıkça görülmektedir.

2.1.2. Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği

AH, genetik açıdan kompleks nörolojik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Sporadik tip AH'nda genetik faktörler, hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere yatkınlık zemini oluşturan birer risk faktörü niteliğindedir. Ailesel tip AH'nda ise otozomal dominant geçişle hastalığa kesin olarak yakalanma söz konusudur. Fakat AH, Mendelian kalıtım açısından da heterojenite gösteren poligenik/multiallelik bir hastalıktır. Yani birden fazla kromozomdaki gen lokusuna ait çok sayıda farklı mutasyon, aynı hastalığa yol açmaktadır (19). Otozomal dominant (OD) geçişten sorumlu olan şimdiye kadar 3 ayrı gen bulunmuştur; amiloid prekürsör protein geni (APP, 21. kromozom), presenilin 1 geni (PSEN1, 14. kromozom) ve presenilin 2 geni (PSEN2, 1. kromozom) (37). Bu genlerin kodladığı üç protein de normal işlevleri çok iyi bilinmeyen, nöronal plastisitede rol oynadıkları öne sürülen transmembran proteinlerdir (19). Anılan genlerdeki mutasyonlar sonucu A β 42 (amiloid beta 42) üretiminde artışla karşılaşmaktadır (38, 39). APP genindeki mutasyonlar, ailesel AH'nın az bir kısmının (%5) sebebi iken PSEN1'deki mutasyonlar en fazla %50'sini oluşturur. Fakat bu mutasyonların saptandığı hastalar, tüm AH olgularının yalnızca %1'lik kısmını oluşturmaktadır (40) (Şekil 3).



Şekil 3. AH tipleri ve başlıca mutasyonlar. Alzheimer hastalarının %99'u sporadik tip AH iken olguların yalnızca %1'i Ailesel tip AH'na sahiptir. Ailesel tip AH'ndaki mutasyonların %8-50'si presenilin 1, %5'i APP ve ~%1'i presenilin 2'de görülür. Fakat geriye kalan olgulara ait mutasyonlar henüz tanımlanabilmiş değildir.

Ailesel AH ile ilişkilendirilen ilk mutasyon, John Hardy ve ekibi tarafından 1991 yılında bildirilen APP'nin yanlış anlamlı (missense) bir mutasyonudur (41). Bütün APP mutasyonları, A β (amiloid beta) oluşumunda önemli rol oynayan proteolitik kesim noktalarında ya da bu noktalara çok yakın bölgelerde kümelenme gösterir (42). Down sendromlu kişiler, 21. kromozomun üç kopyasını taşımakta (trizomi 21) ve dolayısıyla 21. kromozomun uzun kolunda yerleşim gösteren APP geninin fazladan bir kopyasına sahip olarak artmış miktarda APP proteini sentezlemektedir. Sonuç olarak bu kişiler ömürleri boyunca APP proteolizinden üretilecek daha fazla A β 'yı beyinlerinden temizlemek zorundadır. Down sendromluların, 30'lu yaşlardan itibaren hemen daima AH'nın nöropatolojik değişikliklerini göstermeye başladıkları bilinmektedir (19).

Peter George-Hyslop ve ekibi tarafından 1995 yılında PSEN1 geni klonlanmış ve bu gen üzerinde AH'na neden olan bir mutasyon tanımlanmıştır (43). Aynı yıl içinde presenilin 1 proteini (PS1) ile %80 homoloji taşıyan Presenilin 2 proteinini (PS2) kodlayan PSEN2 geninde, OD-AH'na neden olan bir mutasyon bildirilmiştir (44, 45). PSEN1 mutasyonları ailesel AH'nın en sık (~%50) sebebi iken PSEN2 mutasyonları oldukça nadir (<%1) görülmektedir (40). Her 2 gendeki mutasyon da γ -sekretaz aktivitesini etkileyerek A β 'nın daha toksik formu olan A β 42 üretiminin artmasına neden olmaktadır (37). PSEN1'deki mutasyonlar, 24-60 yaşları arasında başlangıç gösteren bir hastalığa yol açarken PSEN2 mutasyonlarında başlangıç yaşı genellikle daha ileri olup 44-71 yaş arasında değişir (46).

PSEN1 tarafından kodlanan PS1, ~43 kDa ağırlığında membranı dokuz kez kateden çok geçişli (multipass) transmembran bir proteindir (47). PS1'in, γ -sekretaz enzim kompleksinin merkezi bir parçası olması nedeniyle APP'nin C-terminal bölgesinin kesilmesinde ve sonuç olarak A β peptidlerin üretilmesinde önemli bir rolü bulunmaktadır (48). PSEN1 geninin delesyona uğratıldığı PSEN1-/- nöronlarda, A β üretimi sekteye uğrarken APP'nin C-terminali birikim gösterir (49).

PSEN2 geni, 1. kromozomun uzun kolunda (1q 42.1) yerleşim göstermekte ve PS1 ile homolog olan PS2 proteinini kodlamaktadır (44). PS1 ve PS2 proteinleri arasında %67 benzerlik vardır, proteinlerin transmembran domain'lerinde bu benzerlik %95'e ulaşır (50). Hücre içinde PS1 ile aynı kompartmanlarda bulunmakta ve γ -sekretaz enzim kompleksinin bir bileşeni olarak görev yapmaktadır (51).

Ailesel AH'ndan farklı olarak sporadik AH için genetik faktörlerin rolü tartışmalıdır. Epidemiyolojik çalışmalar, sporadik AH'nın gelişmesinde genetik ve çevresel pek çok faktörün

birlikte rol aldığını göstermiştir. Sporadik AH için kanıtlanmış tek gen Apolipoprotein E (APOE)'dir (52). Fakat APOE geni, polimorfizmleriyle doğrudan belirleyici olmaktan ziyade hastalığın ortaya çıkışında risk faktörü olarak rol oynamaktadır (19). Hastalığa olan duyarlılığı artırması nedeniyle duyarlılık veya yatkınlık geni olarak da kabul edilir (53). APOE geni, kolesterolün taşınması ve metabolizmasında görev alan apoE proteinini kodlamaktadır (19). Bu protein, toplam 299 aminoasit rezidüsünün ikisinde (112 ve 158. pozisyon) arjinin ve/veya sistein bulunmasıyla farklılaşan $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ olmak üzere üç ayrı allelik forma sahiptir. Allelik formlar üç ortak homozigot fenotip ($\epsilon 2/2$, $\epsilon 3/3$, $\epsilon 4/4$) ve üç ortak heterozigot fenotip ($\epsilon 2/3$, $\epsilon 2/4$, $\epsilon 3/4$) oluşturur (54). Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'daki normal popülasyonlarda en sık $\epsilon 3$ (%70-80) görülürken, $\epsilon 4$ 'ün sıklığı %10-20, $\epsilon 2$ 'ninki ise %5-10'dur. Sporadik AH'nda $\epsilon 4$ sıklığı ikiye katlanarak %40'a ulaşır (19). $\epsilon 4$, AH riskini doza bağlı bir şekilde arttırmaktadır. $\epsilon 3/3$ referans grup olarak alındığında, $\epsilon 3/4$ taşıyanlarda 2 kat, $\epsilon 4/4$ taşıyanlarda ise 7 kat artmış riskle karşılaşılmaktadır (55). Fakat bu veriler, genellikle beyaz (Caucasian) toplumların yer aldığı çalışmalardan elde edilmiş olup Hispanikler veya Amerikalı siyahlar ile gerçekleştirilen çalışmalarda daha az tutarlılık gösteren sonuçlarla karşılaşılmıştır (37). $\epsilon 4$ sıklığı ve patolojik rolü için coğrafik farklılıklar ileri sürülmüştür. Bazı araştırmacılara göre Avrupa'da, kuzeyden güneye sıklığı azalacak şekilde bir gradyan mevcuttur. Örneğin, $\epsilon 4$ sıklığı normal popülasyonda kuzeyde (Finlandiya'da) %24 bulunurken, güneyde (Yunanistan'da) %5.6 gibi küçük bir orana kadar inmektedir. Türkiye'de gerçekleştirilen TAPS çalışmasının olgu-kontrollü kısmında, $\epsilon 4$ sıklığı normal kontrollerde %8, buna karşılık AH grubunda %15 bulunmuştur (19). $\epsilon 4$ allelinin varlığı, AH riskindeki artışın yanı sıra hastalığın daha erken yaşta başlamasıyla da ilişkili bulunmuştur. $\epsilon 4$ allelinin etkisi, özellikle 70 yaş öncesi ve erkek cinsiyette daha belirgindir (37). $\epsilon 2$ alleli ise hastalığa karşı koruyucu özellik göstererek AH riskini azaltmakta ve hastalık başlangıç yaşını geciktirmektedir (19).

ApoE, başlıca karaciğer tarafından üretilen bir plazma proteinidir. Diğer apolipoproteinlerden farklı olarak santral sinir sisteminde de sentezlenir (56). Apo E'nin, A β peptidlerine bağlanabilme özelliği bulunmaktadır (57). Bu bağlanmanın, Alzheimer hastalarının beynindeki amiloid düzeylerini nasıl etkilediğine dair iki varsayım ortaya atılmıştır. İlk varsayıma göre; ApoE $\epsilon 4$ alleli, A β peptidleriyle daha stabil kompleksler oluşturmakta ve A β yapısının polimerizasyonu ile fibril formuna dönüşmesine yardım etmektedir. Bu sayede muhtemelen A β 'nin agregasyonunu hızlandırıcı etki göstermektedir (58-60). Bu düşüncüyü destekler şekilde apoE $\epsilon 4$ taşıyan Alzheimer hastalarının beyinlerinde A β

birikiminde artış bulunmuştur (61, 62). İkinci varsayım, apoE-A β kompleksinin oluşumu ve bu komplekslerin apoE reseptörlerine bağlanması şeklinde iki aşama içerir. $\epsilon 2$ ve $\epsilon 3$ alleli, $\epsilon 4$ 'e göre A β ile daha yoğun etkileşime girmektedir (63, 64). $\epsilon 4$ 'ün, A β 'ya bağlanmada $\epsilon 2$ ve $\epsilon 3$ 'e göre daha başarısız olması ve glial hücrelerde ya da kan-beyin bariyeri (KBB) endotelinde bulunan apoE reseptörlerinin, $\epsilon 4$ 'e daha az afinite göstermesi neticesinde A β peptidlerin beyinden temizlenmesinde yetersizlik ortaya çıkmaktadır (63). $\epsilon 2$ ve $\epsilon 3$ ile kompleks oluşturan A β 'nın, $\epsilon 4$ -A β kompleksinden daha hızlı bir şekilde KBB'den transport edilerek plazmaya doğru temizlenmesi bu varsayımı desteklemektedir (65). Sonuç olarak A β 'ya daha az bağlanan fakat bağlandığı durumlarda daha stabil kompleksler oluşturan apoE $\epsilon 4$ 'ün, A β agregasyonunu arttırmak ya da temizlenmesini azaltmak üzerinden hastalık patogeneze katkısı bulunmaktadır.

APOE $\epsilon 4$ alleli, ailesel AH'nda görülen APP, PSEN1 ve PSEN2 gen mutasyonları gibi hastalığın ortaya çıkışına yol açmayıp, ortaya çıkma olasılığını arttıran bir risk faktörü gibi davranmaktadır. Zira $\epsilon 4$ allelini taşıyan bireylerin hepsinde AH ortaya çıkmadığı gibi, bu alleli taşımayan bireylerde de AH görülebilmektedir. Diğer bir ifadeyle bir yatkınlık geni olan ApoE $\epsilon 4$ allelinin varlığı, hastalık başlangıcı için ne zorunlu ne de yeterlidir (37). Sporadik Alzheimer hastalarının %60'ı $\epsilon 4$ alleli taşımazken, $\epsilon 4/4$ homozigotu olan hastalar tüm Alzheimer hastalarının yalnızca %2-10'unu oluşturur (66). AH riski taşıyan kişileri saptamak için APOE genotip tiplemesinin kullanılması önerilmez. APOE genotip bilgisinin, hastalık tahminindeki yararı sınırlı kalmaktadır. Yeterli tanınal duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (67). Ayrıca $\epsilon 4$ allele ait risk değerlerinin, tüm etnik grup ve cinsiyetler için geçerlilikleri henüz net olarak ortaya konabilmiş değildir. Tüm bunlara ek olarak, APOE genotip bilgisini kullanarak, AH başlangıç yaşını tahmin etmek mümkün değildir (37).

Sporadik AH olgularının ~%60'ında ApoE $\epsilon 4$ 'ün saptanmamış olması diğer genetik faktörlerin de mevcut olabileceği düşüncesini gündeme getirmiştir. Sporadik AH için risk faktörü oluşturduğu düşünülen birçok gen üzerindeki tartışmalar halen sürmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 100 civarında genin AH için risk faktörü olabileceği öne sürülmüş ve bazı toplumlarda bu genlerin bazı allelleri ile AH arasında bağlantılar gösterilmiştir. Diğer taraftan, incelenen her toplumda böyle bir bağlantı bulunamamıştır. Genom Boyu Asosiasyon Çalışmalarında, kromozom 6, 9, 10 ve 12'de henüz genleri tanımlanmamış aday bölgeler tutarlı bir şekilde işaret edilmiştir (37). Özellikle 12. kromozom üzerindeki bölgede yer alan üç genin

(α 2-makroglobulin, OLR1, LRP1), AH ile bağlantısı çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Ancak literatürde pozitif ilişki gösteren yayınların yanı sıra herhangi bir ilişki bulmayan yayınlar da vardır (68, 69). Yine de söz konusu genlerin bazılarının APP ve APOE metabolizmasında doğrudan rol alıyor olmaları, bu genler üzerinde daha çok çalışılması gerektiğini düşündürmektedir.

2.1.3. Alzheimer Hastalığı'nın Tanısı ve Biyobelirteçler

AH'nın tanısı için yayınlanmış olan NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Commulative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) ve DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition) kriterlerinin her ikisi de klinik pratikte yaygın biçimde kullanılmaktadır. NINCDS-ADRDA (Tablo 1) ve DSM-IV (Tablo 2) kriterleri, sinsi başlangıç ve yavaş seyirli bir tempoyla günlük yaşam aktivitelerini bozan en az iki kognitif bozukluğun varlığını AH'nın tanısı için zorunlu kılmaktadır. Ayrıca böyle bir tabloya yol açabilecek sekonder nedenlerin (sistemik, nörolojik, psikiyatrik) dışlanmış olması gerekmektedir. Bu koşulların gerçekleştirildiği tipik tabloya DSM-IV "Alzheimer Tipi Demans", NINCDS-ADRDA ise "Muhtemel Alzheimer Hastalığı" adını vermektedir. Ayrıca akut başlangıç ve hızlı seyir gibi beklenmedik özelliklerin gözlenmesi, klinisyenin demans nedeni olarak düşünmediği fakat demansa yol açabilen ikinci bir hastalığın varlığı (inme ve hipotiroidi gibi) ve hastada izole tek bir ilerleyici kognitif bozukluğun bulunduğu atipik tablolar için NINCDS-ADRDA, "Mümkün Alzheimer Hastalığı" adını kullanmaktadır. Her iki tanı seti için de hastalığın kesin tanısı, otopside alınan doku incelemesi sonucu patolojik olarak konulmaktadır (70, 71).

Klinik tanı kriterlerine göre AH tanısının ilk basamağını, unutkanlık yakınması ya da demans şüphesi ile başvuran hastanın gerçekten de demanslı olup olmadığının ortaya konulması oluşturur. Tanının bundan sonraki basamağı, var olan demans tablosu içinden Alzheimer hastalığının tanınmasıdır. Fakat tipik AH paternine sahip ve sistematik inceleme sonrasında başka demans nedeni olmadığı gösterilen hastalara bile en fazla yüksek olasılıklı AH tanısı verilebilmektedir. Bir başka deyişle mevcut durumda sadece patoloğlar kesin AH tanısı koyabilmektedir (19, 2). NINCDS-ADRDA ve DSM-IV kriterlerine göre, yüksek olasılıklı AH tanısı alan ve sonradan otopsi yapılan hastaların %66-87'sinde kesin Alzheimer hastalığı çıkmaktadır (72-78). AAN (American Academy of Neurology)'nin 2001 yılında yayınlamış olduğu demans tanı rehberinde, AH tanısı için NINCDS-ADRDA ve DSM-IV

kriterlerinin güvenilir olduğundan bahsedilmiştir (79). Fakat her iki tanı seti de AH'nın tanınması için kabul edilebilir düzeyler sağlasalar da tanısız kesinlikten uzak oldukları açıktır (19).

Tablo 1. NINCDS-ADRDA Alzheimer hastalığının 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 doğrulanan demans tablosu;
- İki ya da daha fazla kognitif süreçte bozulma;
- Bilinç bozukluğu yok;
- Başlangıç 40-90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra;
- Bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yolaçabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok.

II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:

- Dil, motor yetenekler ve algı gibi özgül kognitif işlevlerde ilerleyici bozulma;
- Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme;
- Ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa);
- Laboratuarda:

Standart tekniklerle normal lomber ponksiyon,

EEG'nin normal olması yada 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 seyrinde 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 güclüğü 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:

- İnme tarzında ani başlangıç;
- Hemiparezi, duysal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi fokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerinde 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, prezantasyon ya da klinik seyrinde 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.

Tablo 2. DSM-IV Alzheimer Tipi Demans için tanı kriterleri

-
- A.** Birden fazla kognitif alanı içeren bozukluk, aşağıdaki iki maddeyi de kapsayacak şekilde ortaya çıkar:
- (1) Bellek bozukluğu
 - (2) Aşağıda sıralanan kognitif bozuklardan en az biri:
 - (a) Afazi
 - (b) Apraksi
 - (c) Agnozi
 - (d) Yürütücü işlevlerde bozulma
- B.** A1 ve A2 kriterlerinde tanımlanan bilişsel bozukluklar toplumsal ve mesleki işlevselliği ciddi biçimde bozmakta ve eski işlevsellik düzeyine göre anlamlı bir gerilemeyi temsil etmektedir.
- C.** Seyir, insi başlangıç ve yavaş ilerleyici kognitif yıkım özelliklerindedir.
- D.** A1 ve A2 kriterlerinde tanımlanan bilişsel bozukluklar aşağıda sıralanan nedenlerden herhangi birine bağlı değildir:
- Bellek ve diğer bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulmaya neden olabilecek merkezi sinir sistemine ait diğer durumlar
- (2) Demansa neden olabileceği bilinen sistemik
 - (3) İlaçlar ve madde kullanımı ile ilgili durumlar
- E.** Bozukluklar delirium seyri dışında ortaya çıkmıştır.
- F.** Bozukluk başka bir Eksen I hastalığı ile açıklanabilir nitelikte değildir.
-

AH tanısı için hastaya uygulanabilecek spesifik bir laboratuvar testi yoktur ve tanı tümüyle klinik kriterlere dayanılarak konulur. Fakat klinik tanı almış bir hastanın, en az iki kognitif alanının bozulduğu ve günlük yaşam aktivitelerinin de etkilendiği düşünüldüğünde bu durumun yeterince gecikmiş bir hastalık dönemini yansıttığı görülmektedir (19). Oysa beyindeki patolojik birikimler herhangi bir klinik bulgunun gözlenmesinden çok daha erken bir dönemde ortaya çıkmaya başlamaktadır (80). Bu nedenle özellikle hastalığın erken dönemlerini kapsayacak şekilde hem pratik uygulamada hem de klinik çalışmalarda kullanılacak tanısall bir biyobelirtece ihtiyaç duyulmaktadır. AH'nın kesin tanısı ölüm sonrası patolojik değerlendirmelerle ortaya konabilmektedir ki hastalığın seyrine müdahale olanaklarının sınırlı olduğu yakın tarihlere kadar bu durumun klinik olarak pek de sakınca oluşturmadığı görülmektedir. Fakat hastalığın nörobiyolojisinin kavranmasındaki baş döndürücü gelişmeler doğrultusunda etyopatogenetik mekanizmaları hedefleyen ve çoğu faz 2 veya faz 3 evresine gelmiş olan tedavi araştırmalarının gerçekleştirildiği günümüz için tanının klinisyen tarafından konulması daha fazla önem kazanmıştır (19).

Birçok araştırmacıya göre AH için ortaya konulacak bir biyobelirteç, sadece hastalığın tanısı için değil hastalık ilerleyişinin ve yeni ilaç etkinliklerinin izlenmesi için de kullanılabilmelidir. Bu konuya ilişkin olarak ABD'deki NIA (National Institute on Aging) ve

Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association'ın birlikte yayınladıkları uzlaşma raporu bulunmaktadır. Bu rapora göre tanınan bir belirteç, AH'nı diğer tip demanslardan, sağlıklı yaşlı bireylerden ve diğer nörodejeneratif hastalıklardan ayırt edebilmeli, hastalığın seyrinin takip edilmesinde ve yeni geliştirilen ilaçlarının etkinliklerinin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Ayrıca AH ile ilgili temel patolojik olayları yansıtabilmeli ve otopsi sonrası nöropatolojik olarak doğrulanmış hastalarda en az %80 duyarlılık ve %80 özgüllük ile hastalığı saptayabildiği gösterilmelidir. Bununla birlikte ucuz olmalı, tekrar edilebilmeli ve beyin omurilik sıvısı (BOS), kan ya da idrar gibi vücut sıvılarında saptanabilmelidir (81).

AH'nda biyobelirteç geliştirilmesi amacıyla saç, tükürük, idrar ve deri örneği gibi birçok biyolojik materyal çalışılmış olsa da araştırmaların büyük kısmında BOS ve plazma/serum kullanılmıştır (82). Geçtiğimiz yıllar içinde çeşitli gruplar, Alzheimer'lı hastaların BOS ve plazma/serum örneklerini normal kognitif fonksiyonlu kontrol bireyleriyle ve/veya diğer nörodejeneratif hastalığı olanlarla karşılaştırmışlardır. Bu çalışmalarda amiloid depolanması, sinaptik dejenerasyon, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, kronik SSS (santral sinir sistemi) enflamasyonu ve nöronal dejenerasyonla ilişkili pek çok protein veya molekülün araştırıldığı görülmektedir (1). AH'nda bugüne kadar araştırılan biyobelirteçler arasında en fazla umut vaat edenler, A β 42 peptidi ve tau proteindir (83). AH'nda A β 42 seviyelerinin BOS'ta belirgin olarak düşük olduğu gösterilmiştir. Selektif olarak A β 42'de niçin düşüş meydana geldiği henüz tam olarak netleştirilebilmiş değilse de konuya ilişkin olarak öne sürülen varsayımlar arasında BOS'taki A β 42 agregatlarının klasik yöntemlerle ölçülememesi veya A β 42'nin amiloid plaklar içinde çökmesi sonucunda BOS'a geçişinin azalması gibi açıklamalar yer almaktadır (1). BOS A β 42 düzeylerini değerlendiren çalışmaların bir kısmında duyarlılık ve özgüllük hesaplamasına gidilmiş ve özellikle tau proteinleriyle birlikte kullanıldığında, AH tanısında yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir (84-87). Fakat sağlıklı bireylerin yanı sıra diğer nörodejeneratif hastalıkların veya AH dışı demansların çalışmaya dahil edilmesiyle birlikte özgüllük değerlerinde düşüş ortaya çıkmaktadır (88, 89). Ayrıca BOS A β 42 seviyeleri, hastalık süresince sabit kalarak prognozu yansıtmakta yetersiz kalmaktadır (90, 91). Hem bu nedenlerle hem de BOS'un elde edilmesinde invaziv bir işlem olan lomber ponksiyonun gerekli olması sebebiyle kan ve idrar gibi kolay elde edilebilen vücut sıvılarının kullanıldığı çalışmalar, daha fazla ilgi çeker hale gelmiştir (1). Bu konuyla ilişkili olarak Alzheimer hastalarının plazma ve serumunda çok

sayıda biyokimyasal parametre değerlendirilmiş fakat çalışılan biyobelirteçlerden hiçbirisi henüz %80'i aşan duyarlılık ve özgüllük değerlerine ulaşamamıştır (82). Bu çalışmalardan elde edilen deneyimler sayesinde tek bir biyokimyasal belirtece bakmak yerine birden fazla belirteci kullanmanın daha yararlı olduğu anlaşılmıştır.

Günümüzde AH için geliştirilen tedavi şekillerinin, beyindeki A β oluşumunu engellemeye ya da mevcut A β 'yı bloke etmeye yönelik olması nedeniyle hastaların tedaviye yanıtının izlenmesinde, dolaşımdaki A β seviyelerini ölçmenin gerekli olacağı üzerinde durulmaktadır (92). Bu sebeple AH ile ilişkili biyobelirteçler arasında plazma A β 'nın büyük önem taşıdığı görülmektedir. Günümüzde plazmadaki serbest ve bağlı A β 'yı net bir şekilde değerlendirecek, dolaşımdaki monomer ve oligomer A β formlarını ölçerek birbirleriyle ilişkilendirecek ve plazma A β 'nın tanısal doğruluğunu arttıracak olan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır (93).

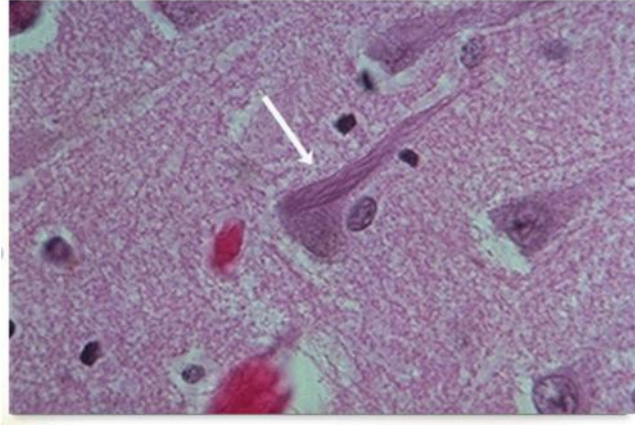
2.1.4. Alzheimer Hastalığında Nöropatolojik Değişiklikler

AH'nda makroskobik olarak beyin atrofiye uğrayarak küçüldüğü, serebral girusların düzleştiği ve sulkusların genişlediği gözlenir (94). Bu değişikliklerden genel olarak temporal lob (özellikle hipokampus ve parahipokampal girus) daha az olarak da frontal ve parietal loblar etkilenir. Fakat frontal lobdaki presentral girus ve parietal lobdaki postsentral girus, hastalığın son evrelerine kadar sağlam kalabilmektedir (95). Fikse edilmiş beyin dokusundan alınan örneklerde kortekse ait gri cevher oldukça incelmış görülür. Beyaz madde, normal görünüm ve yapıdadır ancak hacim olarak azalma izlenir. Parankim kaybına sekonder olarak ventriküler sistemde özellikle de lateral ventriküllerin temporal boynuzlarında genişleme ortaya çıkar.

Mikroskobik olarak intraselüler nörofibriler yumak (NFY), ekstraselüler yerleşimli amiloid plak (AP), granülovakuoler dejenerasyon (GVD), Hirano cisimciği, amiloid anjiyopati, sinaps kaybı, nöritik dendritik uzantılarda küçülme, nöron kaybı ve gliosis temel patolojik bulguları oluşturur (94). Özellikle hiperfosforile tau proteinlerinden oluşan "NFY" ve A β peptid birikimleri olan "AP", patolojik tanı açısından önem taşıyan iki önemli bulgudur. Ancak AH'nın patolojik olarak kesin tanısı için NFY ve AP'ların saptanması gerekli ancak yeterli değildir. Her iki lezyon da hem normal yaşlanmada hem de bazı başka nörodejeneratif hastalıklarda görülebilir. Bu nedenle AH'nın kesin tanısı için NFY ve AP'ların belli bir nöroanatomik dağılımda ve belirgin olarak artmış miktarlarda oldukları gösterilmelidir. Normal bir insanda, altmışlı yaşlardan itibaren neokortekste AP'lar ve limbik sistemde NFY'lar oluşmaya başlar. Ancak titiz kliniko-anatomik korelasyon çalışmaları NFY'ların neokorteks,

AP'ların ise limbik sistemde ve 'nöritik plak' halinde görünür olmalarının AH için %100'e yaklaşan duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini ortaya koymuştur (19).

NFY'nın temel bileşeni hiperfosforile olmuş tau proteinidir (94). Normalde defosforile halde bulunan tau, tubulin proteiniyle etkileşime girerek mikrotübüllerin stabilize halde kalmasını sağlamaktadır. Tau-tubulin etkileşimi, tau'nun izoformuna ve fosforilizasyon durumuna bağlıdır (19). NFY, ışık mikroskopu preparasyonlarında intranöronal yerleşimli filamentöz inklüzyonlar olarak görülür (94) (Şekil 4).



Şekil 4. Hücre içi yerleşim gösteren bir NFY.

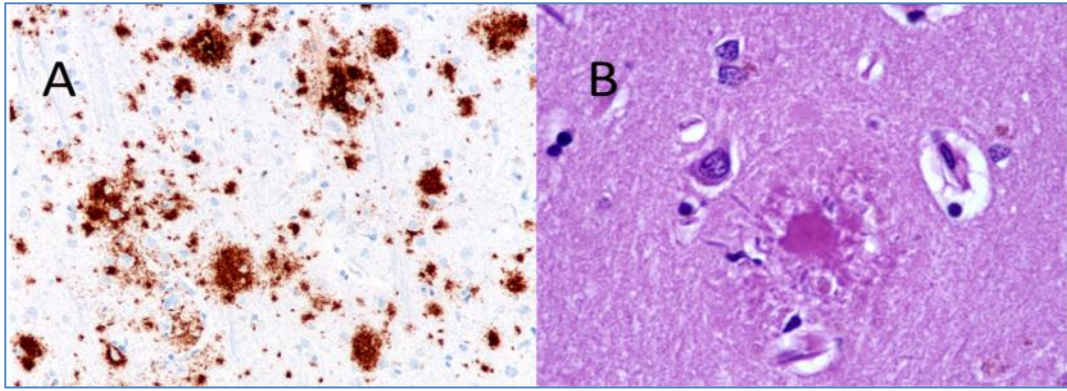
[<http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS094.html>]

NFY'lar, demans açısından sağlıklı olan normal yaşlı bireylerde de saptanır. Fakat sağlıklı bireylere kıyasla aynı yaştaki demanslı bir hastada NFY sayısı daima artmıştır (96). NFY'ların limbik sistemde birikip neokortekse geçmesi ve kortikal alanlarda yaygınlaşmasının; normal yaşlanma, hafif kognitif bozukluk ve demans devamlılığının patolojik karşılığı olduğu öne sürülmektedir (19).

AH'ndaki ikinci temel nöropatolojik değişiklik AP'tır (94). AP'lar içinde biriken asıl A β peptid formunun, 42 aminoasitten oluşan A β 42 olduğu fakat daha az oranlarda 40 aminoasitlik A β 40 (amiloid beta 40) formunun da plak yapısında yer aldığı bildirilmiştir (97). İlk oluştuğunda monomer şeklinde olan A β peptid, proteazlarca yıkılamaması ve beyin parankiminden efektif olarak temizlenememesi sonucunda çevresel faktörlerin (Zn⁺² ve Cu⁺² gibi metal iyonlar, düşük pH ve oksidatif stres gibi) etkisiyle β -kırmalı tabaka oluşturacak şekilde konformasyon değiştirerek kendi üzerine katlanır ve toksik A β oligomerlere dönüşür. Çözünebilir olan A β oligomerleri bir sonraki aşamada yine toksik olan fakat çözünmeyen A β fibrillere polimerize olur. A β fibriller ise ekstraselüler AP'lar şeklinde birikim gösterir (98).

NFY'lara benzer şekilde AP'ların da toksik oligomerlerin etkisini sınırlamaya çalışan bir savunma mekanizması olduğu düşüncesi giderek geçerlilik kazanmaktadır (19).

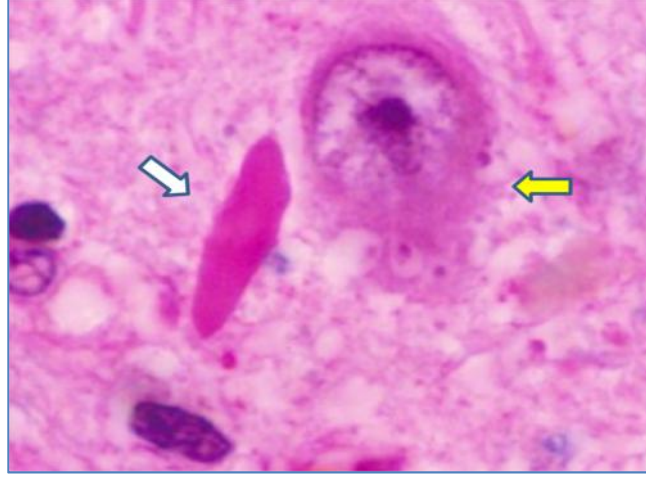
Mikroskopik görünimleri ve içerdikleri A β peptidinin yapısına göre “diffüz”, “kompakt” ve “nöritik” olmak üzere AP'ların başlıca üç farklı tipi tanımlanmıştır (Şekil 5). Kompakt ve nöritik plaklarda, plağın merkezinden periferine doğru uzanan ışınal tarzda A β fibrilleri bulunmakta iken diffüz plaklarda, büyük kısmını oligomerlerin oluşturduğu non-fibriler formda A β yer almaktadır (19). Diffüz plaklar, AH'nın yanı sıra sağlıklı yaşlı bireylerde de artmış miktarlarda görülebilir. Diğer plak formu olan kompakt plaklar, çekirdeğini fibriler A β 'nın oluşturduğu yuvarlak şekilli plaklardır. Nöritik plaklar ise kompakt plak çevresinde distrofik nöritlerin ve reaktif glial hücrelerin yer aldığı bir plak formudur (94). AH Kayıt ve Saptama Konsorsiyumu'nun (CERAD) rehberliğinde hazırlanan nöropatolojik tanı kriterlerinde sadece nöritik plakların kullanıldığı görülmektedir (99).



Şekil 5. Diffüz ve nöritik plak görünimleri. (A) Anti-A β antikorlarıyla immünohistokimyasal boyanmış bir kesitte çok sayıda diffüz plak, (B) Hematoksilen-Eozin (H&E) boyamasıyla bir nöritik plak (94).

AP'ların AH'daki yerleşim ve ilerleme paterni, NFY'lardan farklıdır. İlk birikim NFY'ların tersine limbik sistemde değil, bazal neokortekstedir. İlerleyen süreçte çevre kortekse ve hipokampal formasyona yayılım gerçekleşir (100).

GVD terimi ilk kez 1911'de Simchowitz tarafından senil demanslı hastalarda görülen vakuoler sitoplazmik bir lezyon için kullanılmıştır (96). Bu lezyonlar genellikle hipokampusun piramidal hücrelerinde (özellikle CA1 ve subikulum) gözlenmektedir (94). Etkilenen hücrelerde birkaç vakuol görülmesi sıktır ve çok sayıda olduklarında hücrenin şeklini değiştirerek çekirdeği kenara itilebilir. Değişiklik H&E ve birçok gümüş boyası ile kolayca görülür ve granül yoğun olarak boyanır (96) (Şekil 6).



Şekil 6. H&E boyamasında granülovakuoler dejenerasyondan etkilenmiş bir piramidal nöron (sarı renkli ok) ve ovoid şekilli eozinofilik bir Hirano cisimciği (beyaz renkli ok) görülmektedir (94).

Hirano Cisimcikleri, ilk kez Hirano tarafından Guam'ın Parkinson-Demens kompleksinde gösterilmiştir (96). Bu yapılar 10-30 mikron boyunda ve 8 mikron eninde olan Hirano cisimcikleri, H&E ile iyi gösterilir ve parlak eozinofilik, ovoid veya çubuk şeklinde gözlenirler (94) (Şekil 6).

2.1.5. Alzheimer Hastalığında Nörobiyokimyasal Değişiklikler

Alzheimer hastalarının beyinlerinde saptanan ve en çok doğrulanan nörobiyokimyasal anormallik, kolin asetiltransferaz (ChAT) aktivitesinin hipokampus ve temporal kortekste belirgin olarak azalmasıdır. Biyopsi çalışmaları, belirtilerin görüldüğü ilk yıl gibi erken bir dönemde bile bu enzimde kayda değer kayıpların olduğunu göstermiştir. ChAT'dan daha az spesifik kolinerjik hücre aktivitesi belirteçleri olan asetilkolinesteraz (AChE) ve asetilkolin (ACh) konsantrasyonlarının da Alzheimer hastalarının beyinlerinde azalmış olduğu bildirilmiştir (101).

ACh, öğrenme ve bellek gibi yüksek beyin fonksiyonlarının sağlıklı işlemesi için kritik önemi olan bir nörotransmitterdir. ACh molekülleri, veziküllerde paketlenir ve depolarizasyon sonrası sinaptik aralığa salgılanır. Sinaptik aralıkta difüzyonla ilerleyen ACh, post-sinaptik membrandaki nikotinik ($\alpha 4\beta 2nAChR$) ve muskarinik reseptörlere ($M1AChR$) bağlanır. $\alpha 4\beta 2nAChR$ 'e bağlanarak doğrudan, $M1AChR$ 'e bağlandığında ise G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir. $M1AChR$ ve $\alpha 4\beta 2nAChR$ 'nin, hastalığın erken dönemlerinden itibaren azalmaya başlamasıyla birlikte hem nikotinik hem de muskarinik stimülasyon kaybı ortaya çıkmaktadır. Kolinerjik stimülasyon kaybı, GSK-3 β (glikojen sentetaz kinaz- 3 beta) etkinliğini artırarak taunun hiperfosforilasyonuna ve α -sekretaz

etkinliğini azaltarak A β üretiminde artışa yol açar. Diğer yandan A β 'nın, presinaptik Ach reseptörünü ($\alpha 7nAChR$) bloke etmesi sonucunda Ach'in sentez ve salınımında azalma gözlenir. Bu durum, kolinerjik kayıp ile A β 'nın, birbirlerini pozitif geri besledikleri kısır bir döngüyle sonuçlanır (19).

Beynin asetilkolinerjik innervasyonu, bazal önbeyin bölgesinde kümelenmiş nöron grupları tarafından gerçekleştirilir. Medyal septal çekirdek ve diyagonal bandın vertikal bacağı içindeki çekirdekler hipokampusun, Meynert'in bazal çekirdeği ise tüm korteksin kolinerjik innervasyonunu sağlamaktadır (102). AH sürecinde tüm kolinerjik çekirdekler etkilenmişse de patolojinin en belirgin olduğu yer Meynert'in bazal çekirdeğidir. Bu çekirdekteki nöron kaybının %75'in üzerinde olduğu ve nöronal kayıp oranı ile kognitif bozukluğun ciddiyeti arasında korelasyonun varlığı gösterilmiştir (103, 104). Bazal önbeyin sistemindeki kolinerjik hücre kayıplarından bu bölgede sıkça saptanan NFY ve AP'lar sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca erken dönemlerde kolinerjik nöronlara trofik destek sağlayan nörotrofin reseptöründeki azalmanın da etkisi bulunmaktadır. Kolinerjik kayıp, nöropatolojik lezyonların dağılım tarzını andırır. Tüm hastalık seyri boyunca limbik ve paralimbik bölgeler, kolinerjik innervasyon kaybından en erken ve en belirgin derecede etkilenen yapılar iken presentral ve postsentral giruslardaki kolinerjik kayıp diğer alanlara göre oldukça geri plandadır (19). AH'nda ortaya çıkan kognitif bulguların bir kısmından kolinerjik eksiklik sorumlu tutulmaktadır. Örneğin kortikal kolinerjik eksiklik dikkat bozukluğu, hipokampal kolinerjik girdi eksikliği ise bellek bozukluğu ile ilişkilendirilmektedir (105).

Ach'nin yanı sıra diğer transmitter ve nöromodülatörler de hastalıktan etkilenirler. Alzheimer hastalarının beyinlerinde serotonin (5-HT), GABA, somatostatin, norepinefrin oranları azalmış olarak saptanır. Tüm beyin serotoninjik innervasyonunu sağlayan dorsal rafe çekirdeğinde, Meynert'in bazal çekirdeği düzeyinde olmasa bile kayda değer nöron kaybı görülür. Ayrıca kortikal serotoninjik akson terminallerinde 5-HT'nin salınımı ve geri alınımı ciddi düzeyde bozulmuştur. Serotonerjik kayıpla hastalarda gözlenen depresyon ve saldırgan davranışlar arasında korelasyonun olduğu bildirilmiştir. Serotonin geri alım blokerlerinin (SSRI) AH'ndaki tedavi rasyoneli bu gözlemlere dayanır (19). Dorsal rafe çekirdeğinin yanısıra beyin sapındaki noradrenerjik çekirdek olan lokus seruleus'ta da nöronal kayıp gözlenir. Lokus seruleus'taki patoloji, seçici yatkınlığa uygun biçimde lokus seruleus'un kortikal projeksiyonları olan anterior ve medial bölümlerini etkilerken spinal ve serebellar projeksiyonları içeren kaudal ve lateral bölümleri sağlam kalır. Noradrenerjik kaybın klinik

karşılığı iyi belirlenememiştir (19, 106). AH'nın değişik evrelerini içeren çalışmalarda, glutamat reseptörleri olan N-metil-D-aspartik asit (NMDA) ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit (AMPA) reseptör yoğunluğunun serebral korteks ve hipokampus'da azaldığı gösterilmiştir (107). Ayrıca AH'nda, düşük düzeylerde olmak üzere sürekli bir glutamat NMDA reseptör aktivitesinin bulunduğu ve bu aktivitenin nöronal iletişimde gürültüye neden olarak hastalığın kognitif semptomlarında rol oynadığı ileri sürülmüştür (108).

2.1.6. A β Peptid Sentezi

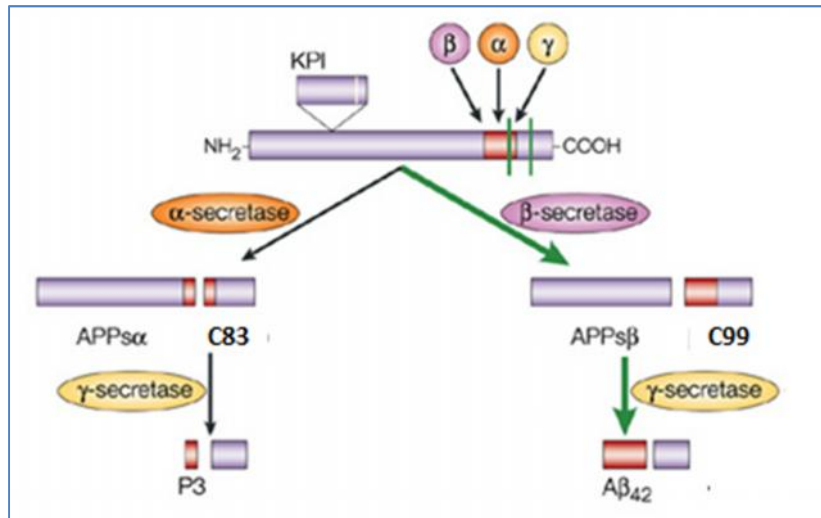
2.1.6.1. Amiloid Prekürsör Proteini

Amiloid plakların temel bileşeni olan A β peptid, amiloid prekürsör proteininin (APP) sekretazlarla kesilmesi sonucu oluşmaktadır. APP, hemen her hücrede eksprese edilen ve tek transmembran bölgesi bulunan tip1 integral membran preoteinidir. Hücre dışında kalan parçası oldukça uzun olup, hücre içinde küçük sitoplazmik bir kuyruğu bulunur (48). İlk kez tanımlandığı 1987 yılından günümüze kadar geçen süre içinde APP'nin fonksiyonlarını ortaya koymaya yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. APP, heparin-bağlayıcı bölgesi vasıtasıyla tip1 kollajen ve laminine bağlanmakta ve bu sayede hücre-matriks etkileşiminde etkin rol oynamaktadır (109). Ayrıca iki ayrı hücre membranında yerleşim gösteren APP'lerin, birbirlerine E2 bölgeleri aracılığıyla antiparalel homodimerler (trans-dimerizasyon) oluşturarak tutunması, hücre-hücre etkileşimine olanak sağlar (110). APP'nin nörotrofik fonksiyona sahip olduğunu destekleyen çok fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. APP'nin azatılması veya silinmesi, in vitro olarak nöronların canlılığında azalmaya yol açar (111-113). Ayrıca APP'den yoksun hipokampal nöronlarda, nörit filizlenmesinin ve dallanmasının azaldığı gözlenir (112, 114). APP ile Notch proteini arasında moleküler yapı ve proteolitik yıkım açısından benzerlik bulunması, APP'nin de hücre yüzey reseptörü olarak fonksiyon görebileceği düşüncesini doğurmuştur (109). Bu varsayımı destekler şekilde içlerinde F-spondin, nectrin-1, Nogo-66, BRI2 ve A β 'nın da yer aldığı çok sayıda APP ligandı tanımlanmıştır (115). Fakat bu ligandların APP'ye bağlandıktan sonra APP proteolizini nasıl etkiledikleri veya APP'nin hücre içinde hangi sinyal ileti yollarını kullandığı tam olarak ortaya konabilmiş değildir.

2.1.6.2. APP'nin parçalanması

APP, ilk olarak α -sekretaz veya β -sekretaz ve daha sonra γ -sekretaz adı verilen proteazlar tarafından proteolitik olarak kesime uğramaktadır. APP'in parçalanmasıyla ilişkili birinci yolda, A β peptid oluşumu engellenmekte ve bu sebeple α -sekretazın yer aldığı bu

proteolitik süreç “non-amiloidojenik yolak” olarak adlandırılmaktadır (48). Non-amiloidojenik yolakta, APP’in α -sekretazla kesilmesini takiben α -sekretazla ayrılmış-çözünebilir APP (sAPP- α) ve 83 aminoasitlik karboksi uç parçası (C83) ortaya çıkmaktadır. sAPP- α , membran dışına salınmakta iken membrana tutunmuş şekilde kalan C83’ün γ -sekretaz tarafından kesilmesiyle hücre dışına salınan p3 ve sitoplazmaya salınan APP’in intraselüler parçası (AICD) oluşmaktadır (116). İkinci yolakta, APP’in β ve γ -sekretazlarla ardışık yıkımı sonucu $A\beta$ oluşmakta ve bu nedenle bu yolağa “amiloidojenik yolak” denilmektedir (48). Amiloidojenik yolaktaki β -sekretaz aktivitesi sonucunda APP’in ekstraselüler bölgesinden, sAPP- β parçası kesilmekte ve ardından membrana tutunmuş şekilde kalan 99 aminoasitlik karboksi uç parçasının (C99) γ -sekretazla kesilmesiyle $A\beta$ peptid ve AICD meydana gelmektedir (116) (Şekil 7). Sağlıklı bireylerde non-amiloidojenik yolak daha baskın iken AH’nda APP yıkımının amiloidojenik yolağa doğru kaydığı düşünülmektedir (19). Alzheimer hastalarının beyinlerinde α -sekretaz aktivitesinin azalmış, tersi olarak β -sekretaz aktivitesinin ve düzeyinin artmış olarak saptanması bu düşüncüyü destekler niteliktedir (117-119).

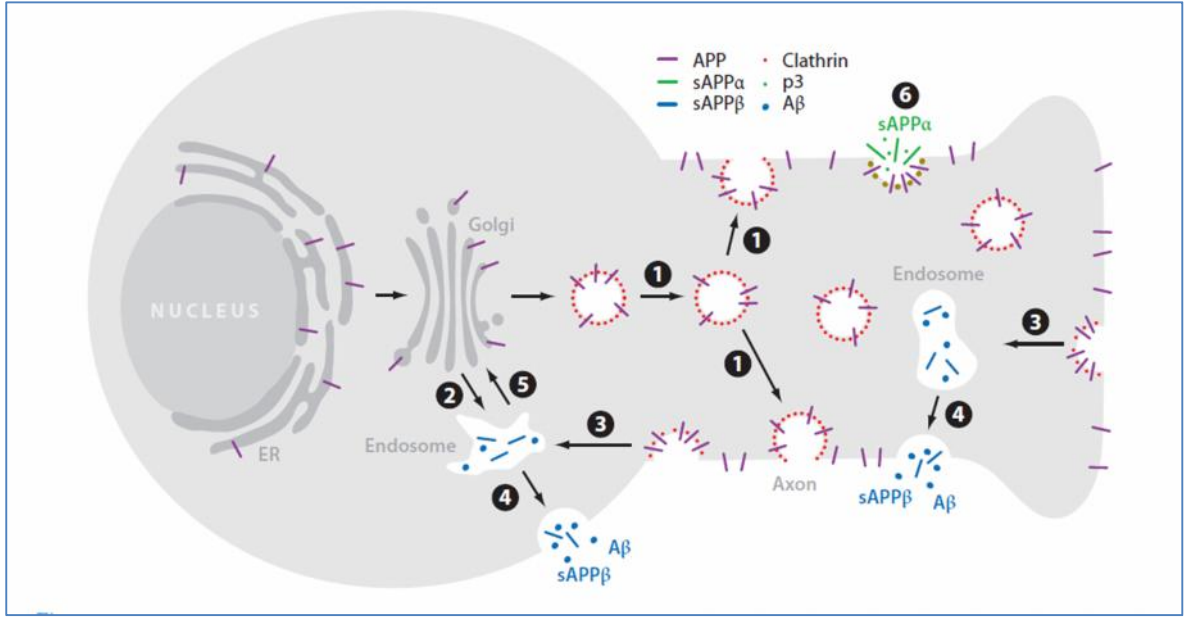


Şekil 7. APP'nin proteolitik olarak yıkılmasının şematik gösterimi.

1999 yılında birbirinden bağımsız beş farklı araştırma grubu tarafından β -sekretazın 11. kromozomdaki geni bulunarak karakterize edilmiş ve daha sonra bu enzime BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) adı verilmiştir. Bir başka deyişle, β -sekretaz aktivitesinden sorumlu olan BACE1, aynı zamanda $A\beta$ üretiminde hız kısıtlayıcı enzimdir (120-125). Transgenik AH modeli oluşturulan farelerde BACE1'in nakavt edilmesi sonucunda $A\beta$ üretimi engellenmekte ve beyindeki AH patolojisi tümüyle ortadan kaldırılmaktadır (126-128).

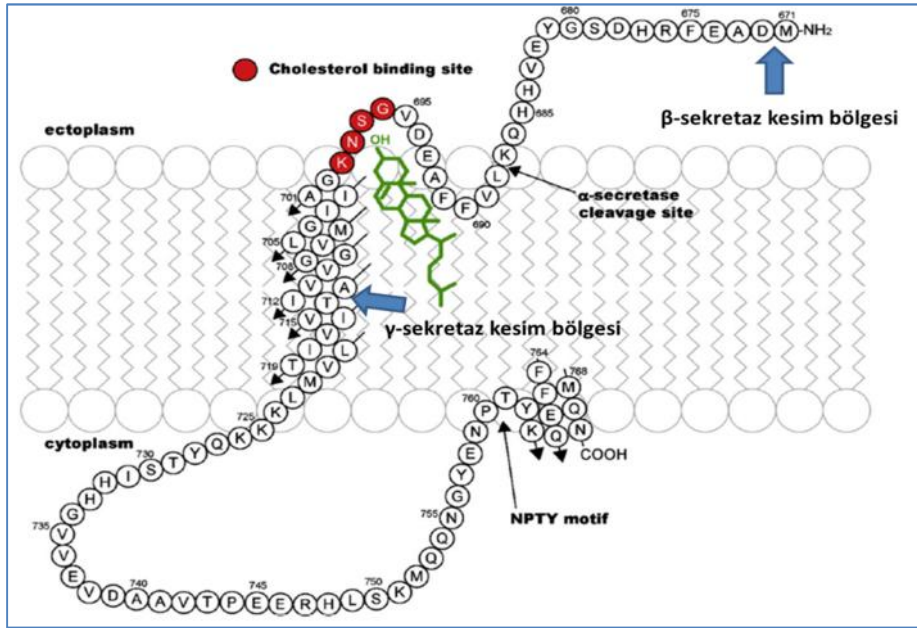
β -sekretazdan farklı olarak γ -sekretaz, dört adet proteinden oluşan bir proteaz kompleksidir. γ -sekretaz kompleksinin bileşenleri arasında presenilin (PS), nikastrin (Nct), presenilin enhancer 2 (PEN2) ve anterior pharynx-defective 1 (APH1) yer alır (129). PS, aspartil proteaz aktivitesine sahip multi-transmembran bir proteindir (120). PS, katalitik aktiviteden sorumlu en kritik protein olsa da diğer bileşenlerden herhangi birinin eksikliği γ -sekretaz aktivitesinde belirgin kayba yol açmaktadır (130, 131).

APP, hem embriyonel gelişim sırasında hem de erişkin dönemde nöronlar tarafından yüksek düzeyde eksprese edilir ve sentezlenmelerinin ardından hızlı bir şekilde yıkıma uğratılır (132). ER (endoplazmik retikulum)'da sentezlendikten sonra golgi'ye taşınan APP, trans-golgi ağı (TGN) kaynaklı sekretuar veziküller ile hücre membranına ulaştırılabileceği gibi direkt olarak endozomlara da verilebilir (133). α -sekretazın, ağırlıklı olarak hücre membranında yer alması nedeniyle hücre membranına ulaşan APP, α -sekretazlar ile parçalanmakta ve açığa çıkan sAPP- α ekstraselüler aralığa salınmaktadır. Membranda kalan C99 parçası ise γ -sekretaz tarafından kesilerek APP sinyalizasyonunda önemli rol oynayan AICD oluşturulmaktadır (133). Parçalanmamış APP'ler, endozomlar vasıtasıyla hızlı bir şekilde hücre içine alınır ve endozomlarda bulunan β - ve γ -sekretazlarla yıkılarak A β peptid üretilir (116). TGN sisteminin yanı sıra golgiden direkt olarak endozomlara verilen APP de aynı şekilde A β üretimine katkıda bulunur (133). Endozomdaki A β 'lar, daha sonra ekzositozla interstisyel sıvıya salınır ve beyindeki temizleme mekanizmalarıyla ortadan kaldırılır (134). Bu durumda A β 'ya kaynaklık eden APP'lerin, öncelikle hücre membranına kadar taşınıp daha sonra hücre içine alındığı ve A β 'nın büyük bir kısmının endozomlarda üretildiği görülmektedir (Şekil 8). Fakat bu model tüm durumlar için geçerli değildir. Örneğin endozomlardaki APP, retromerler vasıtasıyla golgiye tekrar taşınabilmektedir. Ayrıca retromerlerin sadece bu taşınımına özgü olmadığı ve endozomlardan TGN'ye doğru direkt şantların oluşmasında da etkili oldukları ileri sürülmüştür. Bunlara ek olarak endozom içindeki A β 'nın, hücre dışına salınmadığı durumda endozom-lizozom birleşmesiyle lizozomlar tarafında yıkılması sağlanmaktadır (133).



Şekil 8. APP'nin nöron içindeki taşınımı. Yeni sentezlenen APP (mor renk) Golgi'den aksona doğru transport edilemekte (1) veya hücre içindeki endozomal kompartmana verilmektedir (2). Hücre yüzeyine ulaştıktan sonra bazı APP'ler α -sekretaz (6) ile kesilerek sAPP α (yeşil) oluşturulur. Bazı APP'ler ise endozomlar içine alınarak (3) β -sekretaz ile A β (mavi) üretilir. Takip eden süreçte endozomun hücre yüzeyine geri dönmesi (4) sonucunda A β ve sAPP β , ekstraselüler ortama salınır. Fakat APP, β -sekretazlar ile kesime uğramadan önce retromerler (5) vasıtasıyla golgiye tekrar taşınabilir.

APP'nin parçalanması, hücresel kolesterol seviyeleriyle yakın ilişki içindedir. Kolesterolün, β - ve γ -sekretaz aktivitesi üzerine indükleyici etkisi bulunmaktadır (135). Nöron kültürü çalışmalarında, kolesterol depleasyonu sonrasında α -sekretaz aktivitesinin belirgin olarak yükseldiği ve sAPP- α seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (136, 137). β - ve γ -sekretaz aktivitesi ise tam tersi olarak kolesterol depleasyonu ile birlikte inhibe olmakta ve A β üretiminde azalma gerçekleşmektedir (136, 138). BACE1, hücre membranında ağırlıklı olarak kolesterolden zengin "lipid raft" adı verilen yapılarda yer alır (116). Bu sayede BACE1'in, membranın diğer kısımlarında bol miktarda bulunan APP'ye ulaşmasının önüne geçilmiş olur (139). β -sekretaza ek olarak γ -sekretazın da çoğunlukla lipid raftlarda yerleşim gösterdiği bildirilmiştir. APP üzerindeki α -kesim noktasından sekiz aminoasit uzakta bulunan GSNK motifi, kolesterol bağlanma bölgesi olarak tanımlanmıştır (140) (Şekil 9). Kolesterolün APP'ye direkt olarak bağlanabilmesi, APP'lerin lipid raft'a alınmasına ve BACE1 ile kesilmesine olanak sağlamaktadır. Fakat sağlıklı bireylere ait nöronlarda, plazma membranının büyük bir kısmının lipid raft içermemesi ve APP'nin çoğunlukla lipid raft'tan fakir olan bu bölgelerde yer alması sayesinde fazladan A β üretilmesinin önüne geçilmektedir (139).



Şekil 9. C99'un solüsyon NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi yöntemiyle ortaya konmuş olan modellemesi ve kolesterolün, A β üzerindeki bağlantı bölgesinin gösterimi.

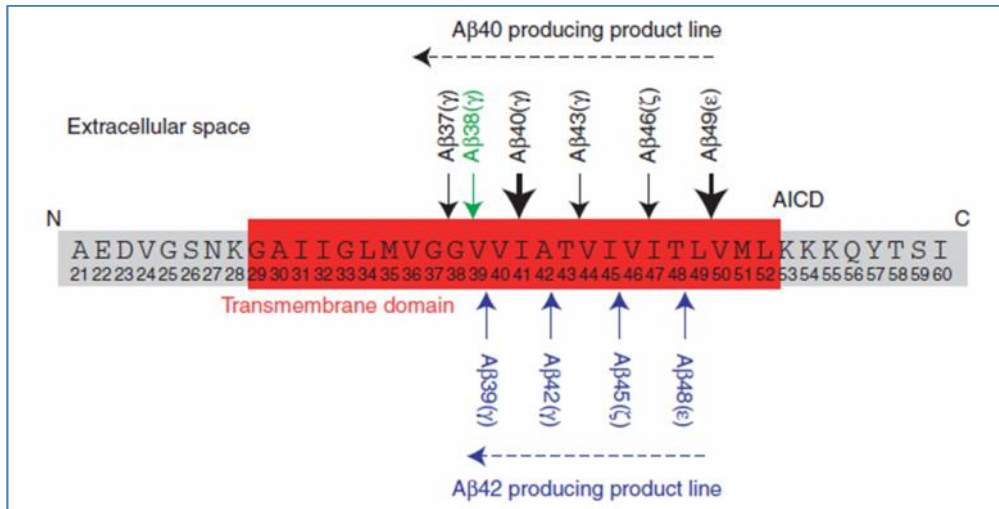
Kolesterolden zengin beslenen tavşanların hipokampuslarında, A β üretimi ve birikiminde artış gözlenmektedir (141). Ayrıca diyetle hiperkolesterolemi oluşturulan APP transgenik farelerin beyinlerinde, kolesterolden fakir beslenenlere kıyasla BACE1 aktivitesinde ve A β miktarında daha fazla artış gerçekleşmektedir (142). Sonuç olarak hücrel kolesterol içeriğinde ortaya çıkan değişiklikler, plazma membranındaki kolesterol seviyelerini ve buna bağlı olarak lipid raft oluşumunu etkileyerek AH patogenezinde önemli rol oynamaktadır (140).

2.1.7. A β peptid

APP'nin β - ve γ - sekretazlar ile ardışık kesimi sonucu 37-43 aminoasit uzunluğunda A β peptid oluşur. Normalde en sık (%80-90) üretilen form, 40 aminoasit içeren A β 40 iken ikinci sıklıkta (%5-10) 42 aminoasitlik A β 42 üretilir (143, 144). A β 42, A β 40'a göre nöronlar üzerinde daha fazla toksik etkiye sahiptir ve karboksi ucunda bulunan fazladan iki hidrofobik aminoasit nedeniyle interstisyel sıvıda daha az çözünerek amiloid plaklar şeklinde çökme eğilimi gösterir (144). Üretilen A β 'ların, aminoasit uzunlukları açısından polimorfizm göstermesi dikkat çekicidir. γ -sekratazın, C99'u ϵ -, ζ - ve γ - bölgelerinden ardışık kesime uğratması sonucunda bu tarz bir farklılık ile karşılaşıldığı ileri sürülmüştür. Ortaya atılan bu

görüŖe göre γ -sekretaz, C99'u ilk olarak ϵ -bölgesinden keserek 49 aminoasit uzunluğundaki A β 49 oluşmakta ve arda kalan 50 aminoasitlik parça ise AICD olarak sitoplazmaya salınmaktadır. A β 49'un ζ -kesime uğramasıyla A β 46 ve A β 46'nın γ -kesime uğraması sonucunda ise A β 43 oluşmaktadır. Eğer γ -sekretaz kesime devam ederse sonraki aşama A β 40, A β 38 ve A β 37 oluşumuyla sonuçlanmaktadır. A β 42 üretilmesinde ise ϵ -, ζ - ve γ -kesimleri sırasıyla A β 48, A β 45, A β 42 ve A β 39 şeklinde devam etmektedir (143) (Şekil10).

A β , C-terminal bölgesinin yanı sıra N-terminal bölgesi açısından da polimorfizm sergiler. BACE1'in APP'yi A β 'nın birinci amino asitinden önceki peptid bağından kesmesi ve ardı sıra gelen γ -sekretaz aktivitesi sonucunda sırasıyla 40 ve 42. aminoasitten oluşan A β 1-40 ve A β 1-42 üretilir (48). BACE1'in APP'yi β' bölgeden (A β 'nın 10 ve 11. aminoasitleri arasından) kesmesi ise A β 11-40 /A β 11-42 oluşumuyla sonuçlanır (116). Alzheimer hastaları veya sağlıklı bireylerin BOS ya da beyin dokularında tüm bu A β formlarına rastlanmıştır. Fakat A β 1-40 ve A β 1-42'ye kıyasla diğer formların konsantrasyonları oldukça düşük düzeylerde (9).



Şekil 10. APP'nin γ -sekretaz tarafından ardışık olarak kesime uğratılması (143).

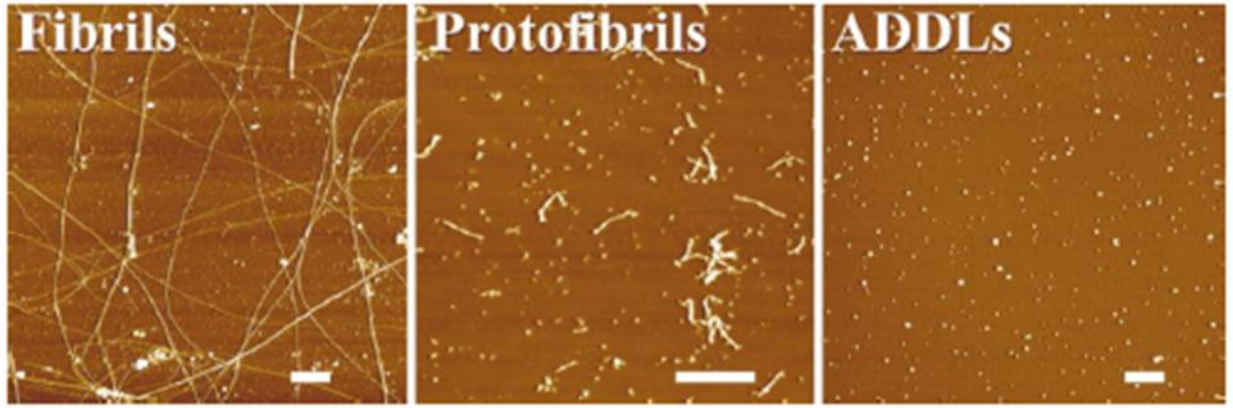
2.1.8. A β Oligomerleri

Yakın dönemde yapılan çalışmalar sayesinde A β 'nın toksisitesinden sorumlu esas yapıların, A β oligomerlerinin olduğu anlaşılmış ve bunun üzerine oligomer formları ortaya koymaya yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. 1997 yılından itibaren günümüze kadar geçen dönemde birçok oligomer tanımlanmıştır. Başlıca tanımlanan oligomer tipleri;

protofibril (PF), A β -derived diffusibl ligand (ADDL), globulomer, annular ve amilosferoid (ASPD) formdaki oligomerlerdir.

İlk kez 1997 yılında Walsh ve ekibi tarafından sentetik A β 1-40 ve A β 1-42 kullanılarak çeşitli moleküler görüntüleme yöntemleriyle “*protofibril*” adı verilen A β oligomeri (A β O) tanımlanmıştır (145). Protofibriller, fibrillerin saptanmasından önce ortaya çıkan ve en fazla 200 nm uzunluğunda (<8 X <200 nm) olan eğri şeklinde yapılardır (Şekil 11). Fibrillerin oluşumuyla birlikte PF’ler artık gözlenemezler (146). Aynı yıl yayınlanan bir başka çalışmada bu yapıların, fibril öncesi dönemde gözlenen ara ürünler olduğu doğrulanmıştır (147). PF’lerin toksik etkiye sahip oldukları birçok çalışmayla ortaya konmuştur. Rat kortikal kültürlerinde, PF eklenmesinden sonra nöronal sağ kalımın azaldığı saptanmıştır (148, 149). Ayrıca primer nöron kültürlerinin PF ile inkübasyonu sonrasında, doz bağımlı bir şekilde MTT redüksiyonunda azalma ortaya çıktığı bildirilmiştir (150). PF’lerin, nörotoksik olmalarının yanı sıra nöronlardaki elektriksel aktivite üzerinde de belirgin olumsuz etkileri bulunmaktadır. Primer neokortikal nöronlara A β 1-40 PF’lerin uygulanması sonrasında, yama-kıskacı (patch-clamp) tekniğiyle saptanan aksiyon potansiyellerinde ve eksitator post-sinaptik akım (EPSC) aktivitesinde artış gözlenir. Nöronlardaki artmış eksitabilite, konsantrasyon bağımlıdır ve geriye döndürülebilir bir değişimdir (148). PF’in sahip olduğu elektrofizyolojik aktivitenin, fibrilden farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur (151). PF’lerin nöronlar üzerinde yol açtığı bir diğer elektriksel aktivite değişikliği, long term potansiyalizasyonun (LTP) belirgin olarak bloke edilmesidir. LTP’nin bloke edilmesi ise farelerde öğrenme ve hafızanın bozulmasıyla sonuçlanmaktadır (152).

PF’in tanımlanmasından yalnızca bir sene sonra Klein ve ekibi tarafından “*ADDL (A β -derived diffusibl ligand)*” olarak isimlendirilen bir diğer oligomer formu bildirilmiştir (153). 5-6 nm çapında, küçük globüler yapılar olan ADDL’ler, yalnızca A β 1-42 tarafından oluşturulur ve PF’lere göre daha stabil yapılardır (151) (Şekil 11). ADDL içeriği, trimer’den heksamer’e kadar değişebilmekte fakat tetraeicosamer (~108 kDa) gibi büyük türler de saptanabilmektedir (146). ADDL’lerin en önemli karakteristiği, fibrillerden bağımsız yapılar olmalarıdır. Diğer bir ifadeyle fibrillerin oluşumu sırasında ortaya çıkan ara ürünler değildir (151).



Şekil 11. Aβ1-42'ye ait fibril, protofibril ve ADDL'lerin, atomik kuvvet mikroskopisiyle (AFM) elde edilmiş görüntüleri (ölçek çubuğu 200 nm) (154).

ADDL'nin keşfinden sonra oligomerler, “on-pathway” ve “off-pathway” olarak ikiye ayrılmaya başlanmıştır. PF'ler, fibril oluşum yolağında yer alan (on-pathway) oligomerler iken ADDL'ler fibril oluşumuna katılmayan yolak dışı (off-pathway) oluşumlardır. ADDL'lerin, Alzheimer hastalarının beyinlerinde de bulunup bulunmadığı merak edilmeye başlanmış ve 2001 yılında Lambert ve ark.larının yaptığı çalışmayla Alzheimer hastalarının beyin dokularında, büyük kısmı dodecamer şeklinde olmak üzere 20 kat artmış seviyelerde ADDL'lerin bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca hastalık patogeneziyle uyumlu bir şekilde serebral kortekste daha fazla oligomer saptanmış iken serebellum gibi hastalıktan daha az etkilenen bölgelerde böyle bir artışa rastlanmamıştır (155). Fare/rat beyinleri ya da hipokampal nöron kültürü çalışmalarında, ADDL uygulanmasının ardından sinaptik plastisitenin bozulduğu, sinaptik terminallerde kayıp ortaya çıktığı ve nöron ölümlerinin indüklendiği belirlenmiştir (153, 156-158). ADDL'nin uygulanmasından kısa bir süre sonra hipokampal LTP'de inhibisyon gerçekleşirken, daha uzun süre beklendiğinde sinaptik terminallerdeki lokal etkisi sonucu sinaps kaybı ve selektif nöronal ölümler ortaya çıkar (153, 156). İmmüno Floresans işaretleme yöntemlerinin kullanıldığında nöron kültürü çalışmalarında, sinaptotoksik aktiviteyle uyumlu olarak ADDL'nin, dendritik dallanmalara tutunduğu gösterilmiştir (159, 160).

Lashuel ve ark.ları, in vitro olarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada, dış ve iç çapları sırasıyla 8 ve 2 nm olan halka şeklinde “annular” bir oligomer formu bildirmişlerdir (161). Bu oligomerlerin, off-pathway grubunda yer aldığı düşünülmektedir. ADDL ve PF'e benzer şekilde nörotoksik etkili olan bu oligomerler, hücre membranında destrüksiyona ya da por

oluşumuna yol açarak hücre içi Ca^{+2} düzeylerinin arttırmakta ve sonuç olarak hücrenin apoptoz ile ölmesine neden olmaktadır (146).

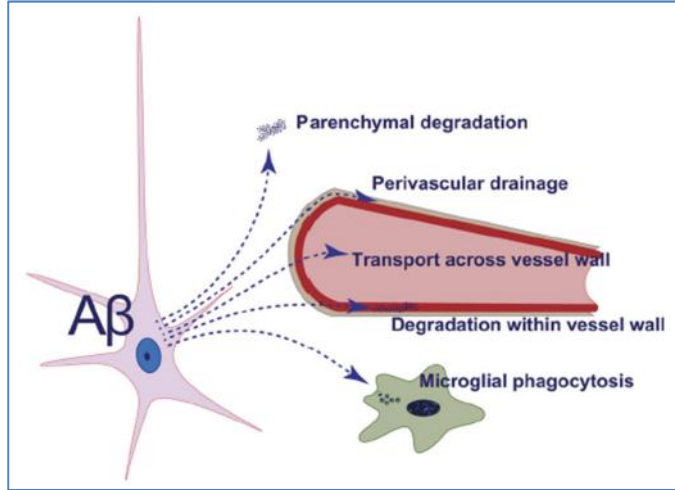
Sato ve ekibi 2003 yılında, en fazla 20 nm çapa sahip “*amilosferoid (ASPD)*” adını verdikleri büyük (~100 kDa) küresel bir oligomer formu tanımlamışlardır (162). Yakın dönemde yaptıkları bir çalışmada, bu oligomerlerin Alzheimer hastalarının beyin dokularında bulunduğunu ve ADDL’den farklı olarak genellikle postsinaptik yerleşim gösterdiğini saptamışlardır (163). ASPD, nöron kültürlerinde GSK-3 β aktivitesini arttırıcı ve hücre ölümlerini indükleyici etki gösterir (162).

Off-pathway oligomerler arasında yer alan “*globulomer*”, ilk kez 2005 yılında A β 1-42 peptidlerin kullanıldığı bir çalışmada, dodecamer (~60 kDa) yapıda sodyum dodesil sülfat (SDS)-stabil bir oligomer olarak gösterilmiştir (164). Globulomerler, AH modeli oluşturulan fare (Tg2576) beyinlerinde ve Alzheimer hastalarının hem beyin hem de BOS’unda bulunmaktadır. Globulomerlerin, organotropik fare beyin dilimlerinde LTP oluşumunu inhibe ettiği görülmektedir (164).

Literatür verileri tarandığında, Alzheimer hastalarının beyinlerindeki oligomerleri tanımlamaya yönelik oldukça az sayıda çalışmanın gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu konuyla ilişkili ilk çalışma Kuo ve ark.ları tarafından gerçekleştirilmiş olup hem kontrol hem de AH beyinlerinde non-fibriler formda A β ’nın izole edilmesi sağlanmıştır. Beyinden alınan örnekler sulu tampon içinde 220 000 g’de santrifüj edildikten sonra süpernatantın 100 kDa, 30 kDa ve 10kDa olmak üzere farklı MWCO (moleküler-ağırlık cut-off)’da filtrasyonu sağlanmış ve monomerden başlayıp 100kDa’u aşan oligomerlere kadar uzanan farklı A β türleri saptanmıştır. Fakat en fazla düşük molekül ağırlıklı oligomer formların (dimer’den oktamer’e kadar) bulunduğu dikkat çekilmiştir (165). McLean ve ark.larının çalışmasında Alzheimer hastalarına ait frontal korteks örnekleri PBS içine alınarak 175 000g’de döndürülmüş ve süpernatantın Western blot analizi yapılmıştır. Sonuç olarak beyinde monomer, dimer ve trimer şeklinde A β türlerinin bulunduğu ortaya konmuştur (166). Bu çalışmadakine benzer şekilde SDS-stabil düşük molekül ağırlıklı oligomerlerin, sıvı kromatografi- kütle spektrometri (LC-MS) yöntemi kullanılarak BOS’ta da bulunduğu saptanmış ve özellikle yüksek stabilite gösteren non-kovalent bağlı A β 1-40 dimerlerinin varlığına dikkat çekilmiştir (167).

2.1.9. A β 'nın beyinden temizlenmesi

Sağlıklı genç bireylerde, nöronlar tarafından sürekli olarak üretilen A β 'nın, beyin dokusundan hızlı bir şekilde temizlendiği görülür. A β 'nın beyinden temizlenmesini sağlayan birçok mekanizma bulunmaktadır. Bunların arasında interstisyel sıvıdan BOS'a doğru olan sıvı akımı, perivasküler aralık boyunca drenaj, KBB aracılığıyla beyinden sistemik dolaşıma transport, mikroglial fagositoz ve enzimatik yıkım yer alır (168, 169) (Şekil 12).



Şekil 12. A β 'nın beyinden temizlenmesini sağlayan mekanizmalar (168).

Üretildikten sonra interstisyel sıvıya verilen A β , BOS'a doğru gerçekleşen sıvı akımı (bulk flow) sayesinde BOS'a geçip buradan da kan dolaşımına katılmaktadır (169). Bu mekanizma, total A β 'nın ancak %10-15'ini temizleyebilmektedir (170). Serebral kan damarlarına ait pulsasyon gücü, perivasküler aralık boyunca A β 'nın drenajına olanak sağlar (171). Virchow-Robin aralığı da denilen perivasküler aralık, BOS ile devamlılık gösterir (172). Bu sayede perivasküler aralık boyunca taşınan A β 'nın, BOS'a geçmesi sağlanır (168). Fakat bu mekanizmanın total klirens olan katkısı oldukça düşüktür (169). Ayrıca Alzheimer hastalarında bu mekanizmanın etkin bir şekilde çalışmadığı düşünülmektedir. Yaşlanmayla birlikte ortaya çıkan ateroskleroz ve A β 'nın vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) birikmesi, damar duvarında sertleşmeye yol açar. Ayrıca AH'nda, serum tepki faktörü (SRF) ya da myocardin (MYOCD)'in artmış ekspresyonu, VSMC'ndeki kontraktıl proteinlerde artışa ve sonuç olarak arteriyel hiperkontraktiliteye neden olur (171). Buna ek olarak interstisyel sıvıdaki A β , damarlar üzerinde vasokonstriktör etkiye sahiptir (173). Tüm bu nedenler, arteriyel pulsasyonu azaltarak A β 'nın perivasküler aralıktaki drenajına engel olur (171). A β 'nın beyinden temizlenmesini sağlayan diğer bir mekanizma, proteolitik enzimler

tarafından A β 'nın yıkıma uğratılmasıdır. İn vitro olarak A β 'yı bir ya da birden fazla noktadan kesebilen çok sayıda enzim tanımlanmıştır (168). Fakat bu enzimlerden birçoğunun, in vivo olarak beyin dokusunda da işlev görüp görmediği netleştirilebilmiş değildir (174). Çinko metalloproteinazlar, serin proteazlar ve sistein proteazlar, bu enzimler arasında üzerinde en fazla çalışılmış olanlardır. Çinko metalloproteinaz grubu içinde neprilizin (NEP), NEP-2, endotelin-dönüştürücü enzim (ECE-1 ve ECE-2), anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE), insülin-yıkıcı enzim (IDE) ve matriks metalloproteinazlar (MMP-2, MMP-3 ve MMP-9) yer alır (175) (Tablo 3).

Tablo 3. A β 'yı yıkan enzimlerin, yer aldıkları enzim ailelerine ve hücredeki lokalizasyonlarına göre listesi

Ailesi	Enzim	Lokalizasyon	Hücre tipi	Yıkılan A β formu
M13, çinko metalloendopeptidaz	Neprilizin	Plazma membranı	Nöron, VSMC	Monomer, oligomer
M13, çinko metalloendopeptidaz	ECE-1	Plazma membranı, TGN	Endotel	Monomer
M13, çinko metalloendopeptidaz	ECE-2	Plazma membranı, TGN	Nöron, astrosit, mikroglia	Monomer
Çinko metalloproteinaz	ACE	Plazma membranı	Nöron	Monomer
Çinko metalloendopeptidaz	IDE	Sitozol, peroksizom, plazma membranı, hücre dışı (sekrete edilen)	Nöron, astrosit, mikroglia, endotel	Monomer
Matriks metalloproteinaz	MMP-9	Plazma membranı, hücre dışı (sekrete edilen)	Nöron, astrosit, mikroglia	Monomer, oligomer, fibril
Matriks metalloproteinaz	MMP-2	Hücre dışı (sekrete edilen)	Astrosit, mikroglia	Monomer, oligomer, fibril
Serin proteinaz	MBP	Plazma membranı	Oligodendrosit	Monomer, fibril
Serin proteinaz	Plazmin	Sitoplazma, hücre dışı (sekrete edilen)	Nöron	Monomer, oligomer, fibril
Sistein proteinaz	Katepsin B	Lizozom, hücre dışı (sekrete edilen)	Nöron, mikroglia	Monomer, fibril

NEP, NEP-2, ECE-1, ECE-2 ve ACE'den oluşan vazopeptidazlar, tip 2 integral membran proteinleridir ve aktif bölgelerinin hücre dışında yer alması nedeniyle interstisyel sıvıdaki çözünebilir A β (sA β)'nın başarılı bir şekilde yıkılmasını sağlarlar (176). MMP'lar da vazopeptidazlara benzer şekilde aktif bölgelerinde, çinko bağlayıcı "HEXXH" motifine

sahiptir fakat latent proenzimler olarak üretilirler ve aktive olmaları için proteolitik olarak yıkılmaları gerekir (175). IDE'in, diğer çinko metalloproteazlardan farklı olarak aktif bölgesinde "HXXEH" motifi taşıdığı görülür ve bu nedenle "inverzincin" olarak da adlandırılır (7). IDE, sitozol ve peroksizomda yer alan tek A β yıkıcı enzimdir (175). Fakat hücre membranında bulunabildiği gibi interstisyel sıvıya da salınabilir (176). Miyelin bazik proteini (MBP), plasmin ve açıl peptid hidrolaz (APEH), A β yıkımından sorumlu serin proteaz grubunu oluşturur (168). Ayrıca doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz tip plazminojen aktivatörü (uPA), aktif plazmin oluşumunu sağlamaları nedeniyle bu grup içinde kabul edilir (177). Sistein proteazlar arasında özellikle katepsin B (CatB) ön plana çıkar. CatB, in vivo olarak A β 'yı yıktığı gösterilmiş olan tek sistein proteazdır (168). Genellikle lizozomal sistemde görev alsa da bazı patolojik durumlarda ekstraselüler ortama da salınabilmektedir (175).

A β 'nın yıkımında görev alan tüm enzimler, monomer formları degradasyona uğratabilmektedir (168). Fakat fibriler formun, yalnızca MMP, MBP, plasmin ve CatB tarafından yıkılabildiği gösterilmiştir (176). AH patogenezi açısından oldukça önem taşıyan oligomer formların yıkımı ise NEP, MMP ve plasmin tarafından gerçekleştirilir (175). Fibril ve oligomer formlarda, A β 'nın hidrofobik C-terminal bölgesi, enzimlerin ulaşamayacağı şekilde yapının iç kısmında kalır. Bu nedenle fibril ve oligomerler, monomerlere göre enzimatik yıkıma daha dirençlidir (178). A β yıkımından sorumlu enzimler, genellikle nöron ve glial hücreler tarafından sentezlenir. Fakat ECE ve IDE, endotel hücreleri tarafından da eksprese edilir. Oligodendrositler ise yalnızca MBP'yi sentezleyebilmektedir (168). A β 'yı yıkan enzimler arasında, üzerinde en fazla çalışılmış ve en iyi karakterize edilmiş olanı neprilizindir (177). NEP, A β 'nın yıkılmasında hız kısıtlayıcı enzim olarak görev alır (179). NEP'in, A β 'nın yıkımından sorumlu esas enzim olduğu birçok çalışmayla ortaya konmuştur (20, 174, 180, 181). NEP dışındaki diğer enzimlerin, A β dışındaki diğer substratlarına olan afinitesi daha fazladır. Tersi olarak NEP'in, A β için oldukça düşük Km değerlerine sahip olduğu ve diğer substratlara kıyasla A β 'ya belirgin afinite gösterdiği görülür (174). Bazı araştırmacılara göre IDE, A β 'nın in vivo olarak yıkılmasında etkin rol oynayan bir diğer enzimdir (7). Fakat IDE, direkt olarak A β 'yı yıkmanın yanı sıra diğer substratı olan insülini yıkmak suretiyle APP'den A β oluşumunu engelleyici yönde etki gösteriyor olabilir (20). İnsülin'in, ekstraselüler A β düzeylerinde artışa yol açtığı iyi bir şekilde ortaya konmuştur (182). Ayrıca IDE'nin insüline daha fazla afinite gösterdiği bilinmektedir (183). NEP,

genellikle presinaptik terminalde yer alır, ekstraselüler A β 'yı yıkar ve oligomerler üzerinde etkinlik gösterir (177). Bunun tersi olarak, IDE'nin, başlıca sitozol de yer alması ve oligomerleri yıkamaması, sinaptik aralıkta birikim gösteren oligomerler üzerinde etkinlik gösterememesine yol açar (20).

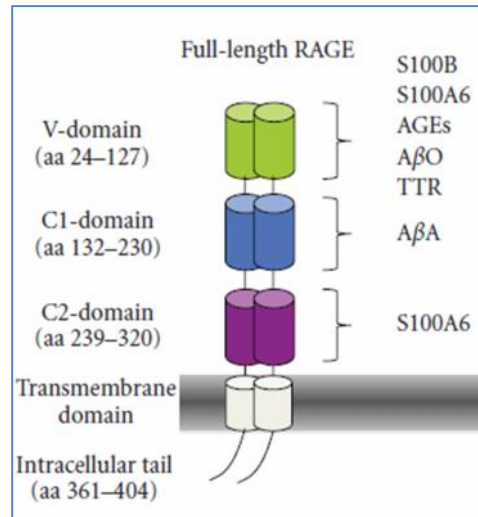
A β 'nın beyinden temizlenmesinde etkin rol oynayan bir diğer mekanizma, A β 'nın, KBB aracılığıyla beyinden sistemik dolaşıma doğru taşınmasıdır. KBB'ni oluşturan endotel hücrelerinin, birbirine sıkı bağlantı (tight junction) ile tutunmuş olması, A β gibi polar moleküllerin direkt olarak kana geçişini imkansız kılar. Bu moleküller için KBB üzerinde bulunan spesifik taşıyıcılara ihtiyaç vardır (184). A β 'nın, beyinden sistemik dolaşıma doğru taşınmasını düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili protein (LRP) sağlar (185). LRP'nin, sA β formlarının (monomerik ve oligomerik A β) taşınmasında etkin rol oynadığı birçok çalışmayla ortaya konmuştur (11, 169, 170, 186-188). LRP, aralarında apoE, APP, A β , tPA, uTPA ve alfa-2-makroglobulin'in yer aldığı birçok ligandı bağlayabilmektedir (189). A β , direkt olarak veya apoE-A β kompleksi şeklinde LRP'ye bağlanır (184). ApoE ile kompleks oluşturmayan serbest A β , LRP'ye daha fazla tutunur ve bu sayede daha hızlı bir şekilde temizlenir (65). A β 1-40'ın LRP'ye olan afinitesi, A β 1-42 ve mutant A β 1-40 (Dutch ve Iowa)'dan daha fazladır (188). ApoE ϵ 4, apoE ϵ 2 ve apoE ϵ 3'e göre LRP'ye daha düşük afiniteyle bağlanır ve A β 'nın temizlenmesinde daha az başarılıdır (65).

LRP'nin yanı sıra sA β 'nın temizlenmesinde görev alan diğer bir mekanizma, mikroglialar tarafından A β 'nın ortadan kaldırılmasıdır. sA β 'nın mikroglialara alınması genellikle LRP aracılıklı endositozla gerçekleşir (190). Fakat mikroglialar, LRP bağımsız bir şekilde makropinositozla da sA β 'yı hücre içine alabilir. Hücre içine alınan A β , yıkılmak üzere geç-endozomal sistem vasıtasıyla lizozomlara gönderilir (190). Mikroglia, fibriler formdaki A β (fA β)'yı da yutabilir fakat daha sonra fA β 'yı yıkıp yıkamadığı tam olarak bilinmemektedir. Paresce ve ark.ları, fA β 'nın haftalarca mikroglialar içinde yıkılmadan kaldığını göstermiştir (191). Fakat Majumdar ve ark.larının çalışmasında, aktive olmamış mikroglialın, fA β 'yı yıkamadığını fakat makrofaj koloni-stimüle edici faktör (M-CSF) tarafından aktive edildikten sonra lizozomlardaki artmış asidifikasyon sonucunda fA β 'yı başarıyla degrade edebildiğini ortaya koymuştur (192). fA β 'nın mikrogliala alınması, çöpçü reseptörler (class A scavenger receptor, SR-A; class B scavenger receptor B, SR-B) tarafından sağlanır (190, 193). Mikroglialar, proinflamatuvar sitokinlerin varlığında fA β 'yı daha az

degrade edebilmektedir. Antiinflamatuvar sitokinler ise fA β degradasyonunu artırıcı yönde etki gösterir (194, 195).

2.2. İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü (RAGE)

RAGE, immünglobulin süper ailesi içinde yer alan bir hücre yüzey reseptörüdür (196). İlk kez 1992’de Schmidt ve ark.ları tarafından ileri glikasyon son ürünlerini (AGE) bağlayabilen polipeptidlerden biri olarak sığır akciğerinden izole edilmiştir (197). 404 aminoasitten oluşan RAGE, posttranslasyonel olarak N-bağlı glikozilasyona uğramakta ve bu nedenle moleküler ağırlığı 45-50 kDa arasında değişebilmektedir (196). Hücre dışı parçasında, reseptörün hücre membranına yönlendirilmesini sağlayan kısa bir sinyal dizisi ve ligand bağlanmasından sorumlu üç adet immünglobulin benzeri bölge (bir V-tipi ve iki C-tipi bölge) yer alır (198). RAGE’ye bağlanan ligandların büyük kısmı V-tipi bölgeye tutunmakta iken az sayıda ligandın, C1- ve C2-tipi bölgeye tutunduğu görülür (199) (Şekil 13). RAGE, monomer şeklindeyken ligand bağlayamamaktadır. Bu sebeple RAGE’nin hücre membranında homodimer veya multimer şeklinde bulunduğu ileri sürülmüş fakat bu konuya tam olarak açıklık getirilememiştir (200, 201). Reseptörün transmembran bölgesi, reseptörün membrana tutunmasını sağlamakta iken bu parçayı takip eden 43 aminoasitlik sitoplazmik kuyruk, hücre içi sinyalizasyonda görev almaktadır (196).



Şekil 13. RAGE’nin şematik gösterimi.

RAGE, özellikle T lenfosit, podosit, endotel hücresi, alveolar epitelyal hücre, mononükleer fagosit, düz kas hücresi ve mikroglia başta olmak üzere vücuttaki birçok hücre tarafından sentezlenmektedir (202-204). Embriyonel gelişim sırasında yüksek düzeyde

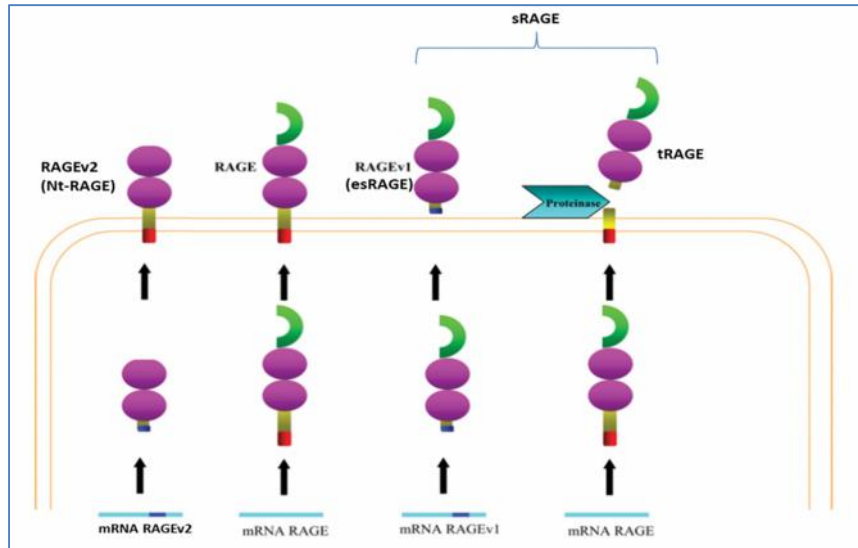
eksprese edilmekte iken erişkin dönemde alveolar epitelyal hücrelerin dışında ekspresyon düzeylerinde belirgin düşüş ortaya çıkmaktadır (202). Fakat ateroskleroz, inflamatuvar böbrek hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, romatoid artrit ve Alzheimer hastalığı gibi RAGE ligandlarının arttığı durumlarda, dokudaki RAGE ekspresyonunda hem mRNA hem de protein seviyesinde belirgin artış gerçekleşmektedir (205-209). RAGE, ilk bulunduğu AGE bağlayıcı bir reseptör olarak tanımlanmış olsa da sonraki çalışmalarda amiloid A, transtiretin (TTR), makrofaj-1 antijen (Mac-1), S100/kalgranulin ailesi, yüksek mobilitesi olan grup B1 protein (high-mobility group box-1, HMGB1) ve A β gibi birçok ligand için reseptör görevi gördüğü ortaya konmuştur (210). Yapısal olarak birbirine benzemeyen birçok ligandın RAGE tarafından nasıl tanındığı bir çok araştırmacının dikkatini çekmiş ve RAGE-ligand etkileşimini araştıran yapısal analizler sonucunda reseptörün, spesifik aminoasit diziliminden ziyade proteinlerin üç boyutlu yapısını tanıdığı (β -tabaka ve fibril gibi) anlaşılmıştır (211, 212). Sistemik amiloidozda biriken amiloid A ve TTR'in ya da AH'de biriken A β 'nın, β tabakadan zengin fibriller oluşturması bu düşüncüyü desteklemektedir (199).

2.2.1. RAGE izoformları

RAGE'nin ilk kez tanımlanmasından yaklaşık yedi yıl sonra Malherbe ve ark.larının yaptıkları çalışmada, RAGE'nin değişik bir varyantı saptanmış ve bunu takip eden çalışmalarda çok sayıda farklı RAGE izoformunun olduğu gösterilmiştir (213). Bu izoformlara çözünebilir RAGE1/2/3 (sRAGE1/2/3), endojen çözünebilir RAGE (endogen solubl RAGE, esRAGE), insan RAGE sekrete formu (hRAGEsec), C-terminali kesilmiş tip RAGE (Ct-RAGE), N-terminali kesilmiş tip RAGE (Nt-RAGE), RAGE-delta (RAGE $^{\Delta}$) ve delta 8-RAGE (Δ^8 -RAGE) gibi değişik isimler verildiği görülmektedir (214-217). İsimlendirmeden kaynaklanan bu karışıklığı önlemek amacıyla Hudson ve ark.ları, tüm izoformları tanımlayan ve sınıflandıran yeni bir terminoloji önermişlerdir (218). Bu terminolojiye göre izoformlar, RAGE-varyant (RAGE-v) olarak isimlendirilmekte ve birden ondokuza kadar numaralandırılmaktadır.

RAGE geni, 11 ekson ve 10 intron içerir (196). Normalde 11 eksonun tamamı translasyona uğramakta ve tam boydaki RAGE'nin (full-length RAGE) oluşması sağlanmaktadır (218). Tek bir genden çok sayıda izoformun sentezleniyor olması RNA düzeyinde seçimli eklenme (alternatif splicing) mekanizmasının kullanıldığını göstermektedir (219). RAGE'nin en çok saptanan varyantı olan RAGE-v1, 10. eksonu içermeyen splice

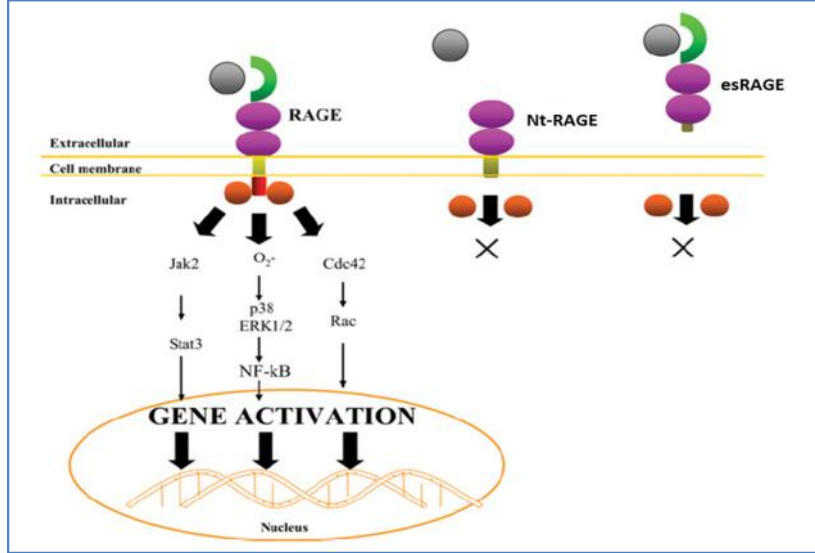
mRNA tarafından sentezlenir ve bu nedenle transmembran parça ve sitoplazmik kuyruğa sahip değildir. RAGE-v1'in transmembran bölgeye sahip olmaması, ekstraselüler aralığa salınmasına neden olur. RAGE-v1, es-RAGE olarak da bilinen izoforma karşılık gelir (196). RAGE'nin diğer izoformları arasında da ekson 10'u içermeyen varyantlar yer almakta fakat hücre dışına salınabilen tek çözünebilir RAGE varyantının, RAGE-v1/esRAGE olduğu görülmektedir (218). Diğer varyantların, sentezlendikten sonra hızlı bir şekilde sitoplazmada yıkıma uğraması, hücre dışına salınmalarını engellemektedir (196, 218). Nt-RAGE adı da verilen RAGE-v2 izoformunda, reseptörün ekstraselüler bölgesine ait V-bölgesi bulunmamakta ve bunun neticesinde birçok ligandın, Nt-RAGE'ye bağlanamadığı ve hücre içine sinyal iletilemediği görülmektedir (220, 218). Hücre membranında yer alan metalloproteinazların, membrana yakın bir noktadan reseptörün ekstraselüler bölgesini kesmesi ve kesilen bu parçanın sitoplazmaya salınması sonucunda diğer bir RAGE formu olan tRAGE (truncated RAGE) üretilmektedir (196). RAGE'yi hücre membranında hangi metalloproteinazın kestiği net ortaya konabilmiş değilse de ADAM-10'un (a disintegrin and metalloproteinase-10) bu görevi yerine getirdiğine dair üç yayın bulunmaktadır (221-223). Hem tRAGE hem de esRAGE, hücre dışına salınmalarının ardından vücut sıvılarında saptanabilmektedir (220). t-RAGE, esRAGE'yle birlikte total çözünebilir RAGE (sRAGE) havuzunu oluşturmaktadır (sRAGE= tRAGE + esRAGE) (219) (Şekil 14).



Şekil 14. esRAGE, tRAGE ve Nt-RAGE'nin oluşumundan sorumlu olan hücresel mekanizmalar (196).

esRAGE'nin yapısal olarak önemli bir özelliği, 10. eksona sahip olmamasının yanı sıra 9. intronu içermesi ve bu sebeple C-terminal bölgesinde 22 aminoasitlik ufak bir parçanın

bulunmasıdır (220, 196). Bu parçaya karşı geliştirilen antikorlar sayesinde doku örnekleri ve vücut sıvılarından esRAGE'nin spesifik olarak saptanabilmesi mümkün hale gelmiştir (224). Reseptörün ekstraselüler kısmına karşı geliştirilen antikorlar ise total sRAGE'nin ölçülmesine olanak sağlamaktadır (196). Ligandların, interstisyel sıvıdaki tRAGE ve esRAGE'ye bağlanması sonucunda hücre membranında yer alan RAGE'ye tutunmaları ve hücre içine sinyal iletmeleri engellenmektedir (219) (Şekil 15).



Şekil 15. RAGE-ligand etkileşimi sonrasında aktive olan sinyal yolları. Nt-RAGE ve esRAGE'nin, sitoplazmik kuyruğa sahip olmaması nedeniyle sinyal iletemedikleri görülmektedir (196).

2.2.2. RAGE ligandları

RAGE'nin ilk tanımlanan ligandı olan "AGE", diabetes mellitus'un kronik komplikasyonlarının (nefropati ve nöropati gibi) gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca aterosklerotik lezyonların oluşmasında ve iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası kardiyak hücrelerin ölmesinde de etkili oldukları düşünülmektedir (196). Bu istenmeyen etkilerinin ortaya çıkmasında proteinlerde yapısal değişiklere yol açmalarının (reseptör bağımsız etki) yanı sıra RAGE'ye bağlanarak hücrel işlevleri bozmalarının (reseptör bağımlı etki) da katkısı bulunmaktadır (225). Bir diğer RAGE ligandı olan "HMGB1", nükleusta DNA-bağlayıcı protein olarak görev yapmakta fakat hücre dışına salınmaları durumunda sitokin benzeri işlev görerek inflamatuvar süreçlerde yer almaktadır (196). Ayrıca HMGB1-RAGE etkileşimi matriks metalloproteinazların (MMP) salınımına yol açarak tümör hücrelerinin göçünü ve yayılımını artırmaktadır (199). RAGE, yapısal olarak birbirine benzerlik gösteren 21 proteinden oluşan "S100 protein ailesi"nin bazı üyeleri tarafından da aktive edilmektedir

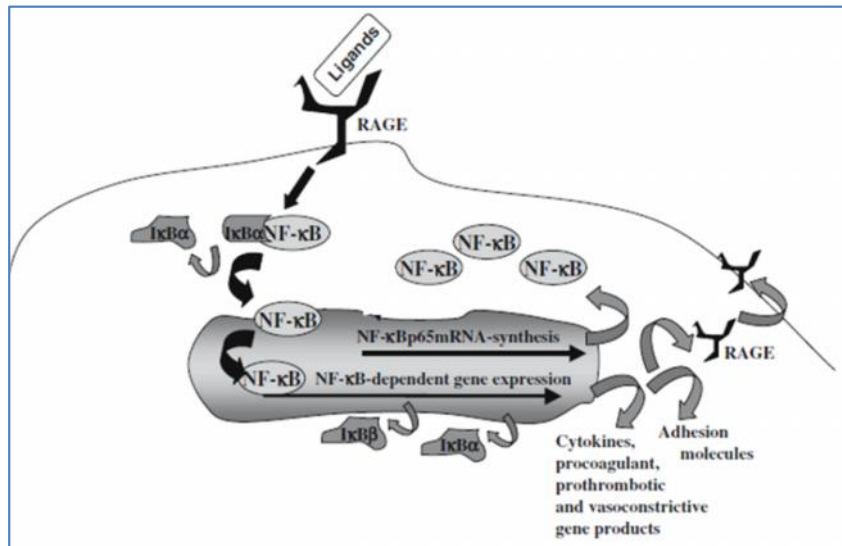
(196). S100 ailesi, kalsiyum bağlayıcı proteinler olarak hücre içi kalsiyum dengesinin korunmasında görev almaktadır. S100 proteinlerinden en az yedi tanesinin RAGE'ye bağlandığı gösterilmiş olup bunların arasında özellikle S100B, S100A6, S100A9 ve S100A12'nin AH patogeneziyle ilişkili olduğu bilinmektedir (199). Diğer bir ligand olan "A β "nın RAGE'ye bağlanabildiği ilk kez 1996 yılında endotelden zengin akciğer dokusu kullanılarak belirlenmiş, A β 'nın AH patofizyolojisinde önemli rol oynadığının anlaşılmasıyla birlikte A β -RAGE etkileşimini açıklamaya yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (226). Yan ve ark.larının çalışmasında, AGE, HMGB1 ve monomer formdaki A β 'nın RAGE üzerinde aynı bölgeye (V-bölgesi) bağlandıkları gösterilmiştir (226). Takip eden çalışmalarda da A β 'ya ait monomer ve fibrillerin, açık bir şekilde RAGE'ye bağlandığı saptanmıştır (227, 228). Başka bir çalışmada ise fibriller (fA β) ve monomer formlara ek olarak oligomer (A β O) formların da yüksek afiniteyle RAGE'ye bağlandığı belirlenmiştir (229). Sturchler ve ark.larının çalışmasında, fA β 'nın reseptör üzerinde C-1 bölgesine, A β O'nun ise V-bölgesine bağlandığı gösterilmiştir (230). A β O'nun AH patogenezindeki belirgin rolü göz önünde bulundurulduğunda, tedavi stratejisi olarak A β O-RAGE bağlanmasını önleyen/azaltan bileşiklerin geliştirilmesinde reseptörün V-bölgesinin hedeflenmesi büyük önem taşımaktadır (199).

2.2.3. RAGE'ye ait sinyal yolları

RAGE'nin kendi ligandları için sinyal reseptörü olarak görev yaptığı birçok çalışmayla ortaya konmuştur (231-235). RAGE'nin birçok liganda sahip olmasının dışında bir diğer karakteristik özelliği, birbirinden farklı çok sayıda hücre içi sinyal ileti yolağını aktive edebilmesidir (210). Bu ileti yollarında JAK (Janus kinaz), mitojen aktive edici protein kinaz (MAP kinaz) ve Rho GTPaz gibi birçok enzim görev almaktadır (233, 235, 236-238) (Şekil 15). RAGE-ligand etkileşimi sonrasında muhtemelen hücre tipine, ligand tipine, ligandın reseptör üzerindeki bağlanma yerine ve ligandın doz konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içinde hangi sinyal yolağının seçileceğine karar verilmektedir (196).

RAGE-ligand etkileşimiyle aktive olan sinyal yolları, sonraki aşamada c-jun, c-fos, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT), c-AMP cevap elementi bağlayıcı protein (CREB) ve nükleer faktör-kappa beta (NF- κ B) gibi çok sayıda transkripsiyon faktörünü aktive etmektedir (229). Bu transkripsiyon faktörleri arasında yolların büyük bir kısmı tarafından aktive edilmesi, proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu arttırarak

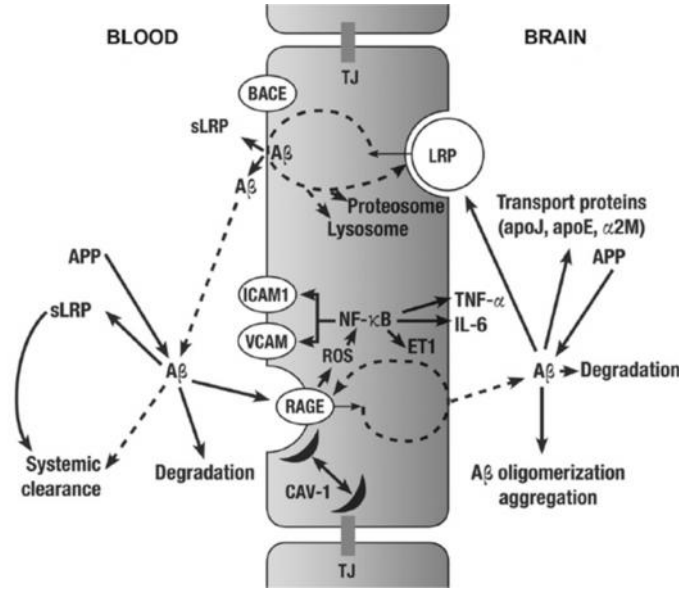
inflamatuar süreçlere yol açması ve kronik inflammatuar hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynaması nedeniyle NF- κ B'nin ön plana çıktığı görülmektedir (210). RAGE geninin promotör bölgesinde NF- κ B'ya ait iki adet tepki elemanı bulunur ve RAGE-ligand etkileşimi neticesinde pozitif geri besleme ile RAGE'nin kendisini up-regüle etmesi sağlanır. Bu durum, ligandın bağlanacağı yeni RAGE reseptörlerinin sentezine ve RAGE-ligand bağlantı sayısında artışa yol açmaktadır (239). Diğer reseptörlerden farklı olarak RAGE'nin aracılık ettiği NF- κ B aktivasyonu, uzun süre devam etmektedir. Normalde NF- κ B'nin aktive ettiği genler arasında I κ B α (İnhibitör kapa B alfa) da bulunmakta ve bu sayede hücresel uyarının ortadan kalkmasıyla birlikte yeni sentezlenen I κ B α tarafından NF- κ B'nin inaktive edilmesi sağlanmaktadır. Fakat RAGE'nin yer aldığı süreç içerisinde NF- κ B'yı baskı altında tutan bu tür negatif otoregülatör döngülerin aşıldığı ve hücre içinde uzun süreli bir NF- κ B aktivasyonunun ortaya çıktığı görülür. RAGE-NF- κ B ekseninde bu olayın nasıl gerçekleştiği tam olarak anlaşılabilmiş değilse de ileri sürülen bir varsayıma göre, NF- κ B'nin aktivasyonu ve nükleusa translokasyonunu içeren ilk aşamayı, NF- κ B'nin denovo olarak sentezlendiği ikinci bir aşamanın takip etmesidir (210). Böylece ilk aşamada sentezlenen I κ -B α 'nın, ikinci aşamada sentezlenen yeni NF- κ B'ler ile başa çıkamaması sonucunda sürekli bir NF- κ B aktivasyonu ile karşılaşmaktadır (239). Sonuç olarak NF- κ B ile indüklenen RAGE ekspresyonunun, NF- κ B'nin uzun süreli aktivasyonuna yol açtığı ve bu sayede ligand kaynaklı sinyalizasyonun daha fazla güçlendiği ve devamlı hale getirildiği bir süreç ortaya çıkmaktadır. Diğer bir ifadeyle RAGE, inflammatuar uyarılar sonrasında ortaya çıkan geçici inflammatuar cevabın, kalıcı hale dönüştürülmesinde adeta şalter görevi görmektedir (210) (Şekil 16).



Şekil 16. RAGE-ligand etkileşimi sonrasında NF- κ B'nin aktive edilmesi (210).

2.2.4. Aβ'nın kan beyin bariyerindeki transportunda RAGE'nin rolü

Dolaşımdaki serbest Aβ, KBB'nin luminal yüzünde yer alan RAGE tarafından transitozla beyne doğru taşınmaktadır (240). RAGE ve LRP, Aβ transportu açısından KBB üzerinde birbirine zıt fonksiyon gösteren iki farklı taşıma mekanizması oluşturur. RAGE, Aβ'yı kandan beyne doğru (influks) taşırken, LRP ise beyinden kana doğru (efluks) taşımaktadır (8) (Şekil 17). KBB üzerinde Aβ'ya ait taşıyıcı reseptörlerin olduğu, ilk defa 1993 yılında Zlokovic ve ark.larının çalışmasıyla ortaya konmuş ve takip eden dönemde gerçekleştirilen çok sayıda çalışmada, Aβ'nın KBB'de transport edildiği doğrulanmıştır (241-252). Deane ve ark.larının çalışmasında, [¹²⁵I] işaretli hAβ1-40 (insan Aβ1-40)'ın, farelerin sistemik dolaşımına injekte edilmesinin ardından beyin kapiller damarları tarafından alındığı ve KBB'de transporta uğradığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, RAGE spesifik IgG'nin uygulanması ya da RAGE'nin eksprese edilmesinin engellenmesiyle (RAGE-null fare), [¹²⁵I]-hAβ(1-40) ve [¹²⁵I]-hAβ(1-42)'nin KBB'deki transportunun engellendiği saptanmıştır. Radyo-ışaretili olmayan hAβ1-40'ın sistemik dolaşıma injeksiyonu sonrasında ise 10 ve 60 dk sonra sırasıyla beyin mikrodamarları ve parankiminde hAβ1-40'ın varlığı immünohistokimyasal olarak ortaya konmuştur. Ayrıca dolaşımdaki hAβ1-40'ın, hAβ1-42'ye kıyasla beyne doğru daha fazla transport edildiği gözlenmiştir (252). Beyindeki RAGE ekspresyonunun, embriyonel dönemde oldukça yüksek düzeylerde iken erişkin dönemde düşük seviyelere gerilediği görülür. Fakat arteriyol ve kapiller endoteldeki ekspresyon, yüksek düzeyde kalmaya devam eder (233). Bu durum, sağlıklı bireylerde bile dolaşımdaki Aβ'nın, RAGE üzerinden sürekli olarak beyine doğru taşındığını gösterir. Fakat KBB üzerinde LRP'nin daha aktif fonksiyon görmesi neticesinde Aβ'nın beyinde birikmesinin önüne geçilmektedir (8).



Şekil 17. Aβ'nın RAGE ve LRP aracılığıyla kan-beyin bariyerinde transport edilmesi.

2.2.5. RAGE ve Alzheimer hastalığı

RAGE ekspresyonu, kendisine bağlanan ligand düzeyleri ile yakın ilişki içindedir. İn vitro ve in vivo birçok çalışmada, ortamdaki ligand miktarının artırılmasının, RAGE ekspresyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir (210, 219). Alzheimer hastalarının beyinlerinde, RAGE'ye ait ligandların (Aβ, S100, HMGB1 ve AGE gibi) artmış düzeylerde olduğu bilinmektedir (199, 253). Bu nedenle nöron, mikroglia, astrosit ve kapiller endoteldeki RAGE ekspresyonunda belirgin bir artışla karşılaşmaktadır (254, 255). RAGE düzeylerindeki artış, özellikle hipokampus ve dentat girus gibi AH'ndan etkilenen bölgelerde kendini göstermekte fakat serebellum ve bazal çekirdeklerde herhangi bir artışa rastlanmamaktadır (254, 255).

Mikroglia, nöron ve kapiller endotelde gözlenen RAGE ekspresyon artışı, AH patogenezi açısından büyük önem taşımaktadır (229). RAGE, Aβ'ya cevap olarak mikrogliaların aktive edilmesinde merkezi role sahiptir (256, 257). Aβ'nın mikroglialar üzerindeki RAGE'ye bağlanması sonucunda NF-κB aktivasyonu üzerinden IL (interlökin) 1, IL-6, TNF-α (tümör nekrozis faktör), M-CSF ve makrofaj inflamatuvar protein-1α (MIP-1α) gibi birçok proinflamatuvar sitokin salınmaktadır. Anti-RAGE antikoru kullanılarak Aβ-RAGE etkileşiminin engellenmesi durumunda ise sitokin salınımı önemli ölçüde azalmaktadır (229). Lue ve ark.larının Alzheimer hastalarının beyinlerini inceleyerek gerçekleştirdikleri

çalışmada, RAGE-pozitif mikrogliaların özellikle hipokampus ve parahipokampal girusta artmış olduğu ve bu artışın hastalığın patolojik evresiyle korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (254). Hipokampal formasyonu oluşturan bu yapılarda, hastalığın erken dönemlerden itibaren patolojik değişikliklerin gözleniyor olması ve aynı bölgelerde mikrogliyal RAGE ekspresyonunda artış saptanması, AH patogenezi açısından RAGE'nin önemini ortaya koymaktadır (229).

Alzheimer hastalarında, sağlıklı yaşlı bireylere kıyasla beyin damarlarındaki RAGE ekspresyon düzeylerinde belirgin artış saptanmaktadır (252, 255). Bunun sonucunda A β 'nın RAGE'ye bağlanmasıyla birlikte endotelden salınan sitokinlerin (TNF- α ve IL-6 gibi) ve adezyon moleküllerinin (intersetüler adezyon molekülü-1, trombosit endotelial hücre adezyon molekülü-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü gibi) sentezinde artış gerçekleşmektedir (Şekil 17). Proinflatuar sitokinler, lokal inflamasyona yol açarak komşu beyin parankiminde hasarlanmaya neden olurken, adezyon moleküllerindeki artış ise dolaşımdaki monositlerin beyne doğru göç etmesinde etkili olmaktadır (171, 229, 240). Ayrıca RAGE, A β 'nın beyin damarları üzerindeki vazokonstriktör etkisine aracılık etmektedir. A β -RAGE etkileşimi sonrasında endotel hücreleri tarafından kuvvetli bir vazokonstriktör olan endotelin (ET-1)'in salınımında artış gerçekleşmekte ve bunun sonucunda beyin kan akımında azalma ortaya çıkmaktadır (229, 252) (Şekil 15). Transkranyal doppler ve SPECT (tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi) yöntemi kullanılarak Alzheimer hastalarının beyin kan akımı (CBF) değerlendirildiğinde temporoparyetal bölgelerde azalmış kan akımı gözlenmektedir. Ayrıca aynı bölgelerde PET (pozitron emisyon tomografi) ile saptanan glukoz kullanımında azalma izlenmektedir (172). Beyin kan akımındaki azalma, nöronlara glukoz ve oksijen taşınmasında azalmaya yol açarak nöronal fonksiyon bozukluğuna ve nörodejenerasyon gelişmesine katkıda bulunmaktadır (172). AH'nda ortaya çıkan bozulmuş glukoz metabolizmasında, RAGE'nin indüklediği inflammatuar değişikliklerin belirgin rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bu varsayıma göre, RAGE'nin NF- κ B aktivasyonu ile uzun süreli olarak proinflatuar sitokin salınımına yol açması, nöronların efektif olarak enerji üretmesine engel olmaktadır. Benzer durum özellikle kanser hastalarında kaşeksi şeklinde kendini göstermekte ve bu hastalarda gözlenen artmış düzeylerdeki TNF- α , IL-6 ve IFN- γ (interferon- γ)'nın, kanserli olmayan normal hücrelerde azalmış ATP (adenozin trifosfat) seviyelerine ve artmış laktat üretimine yol açtığı bilinmektedir. RAGE aktivasyonu sonrasında endotel hücreleri, mikroglialar ve astrositler tarafından sürekli olarak proinflatuar sitokinlerin salınıyor olması, nöronların bu

sitokinlere uzun süreli maruz kalmasına ve muhtemelen azalmış hücre içi ATP seviyelerine yol açmaktadır. ATP, yalnızca nöronların hayatta kalması için gerekli olmayıp nörotransmitter sentezi gibi fonksiyonel işlevler için de gereklidir. Böylece azalmış ATP seviyeleri sonucunda başta asetilkolin olmak üzere birçok nörotransmitterin sentezinde ortaya çıkan bozulma, AH'ndaki kognitif bozukluklara katkıda bulunmaktadır (253).

AH'nda KBB'deki endotelde ortaya çıkan artmış RAGE düzeyleri, dolaşımdaki çözünebilir A β peptidlerin (monomer ve oligomer formların) beyne doğru daha fazla taşınmasına ve beyindeki amiloid yükünde artışa neden olmaktadır (184). Alzheimer hastalarının beyinlerinde RAGE'nin tam tersi olarak başta endotel hücreleri olmak üzere LRP düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (170). Böylece kapiller endotel üzerindeki RAGE düzeylerinin artması ve LRP düzeylerinin ise azalması neticesinde beyne doğru artmış A β transportuyla karşılaşmaktadır. Bu durum, A β 'yı beyinden temizlemekte görevli bir diğer mekanizma olan katabolik aktivite üzerinde artmış yüke sebep olmaktadır. Fakat AH'nda başta neprilizin olmak üzere A β 'yı yıkan enzim düzeylerinin, belirgin derecede azalmış olduğu görülmektedir (177). Bu nedenle artmış A β yüküyle başa çıkılamamakta ve A β 'nın giderek amiloid plaklar şeklinde biriktirilmeye çalışıldığı görülmektedir. Bu savunma mekanizması sayesinde hastalık oluşumundan sorumlu olan A β oligomerleri, daha az toksik form olan fA β şeklinde lokalize edilmekte ve nöronların oligomerlere daha az maruz kalması sağlanmaktadır (19).

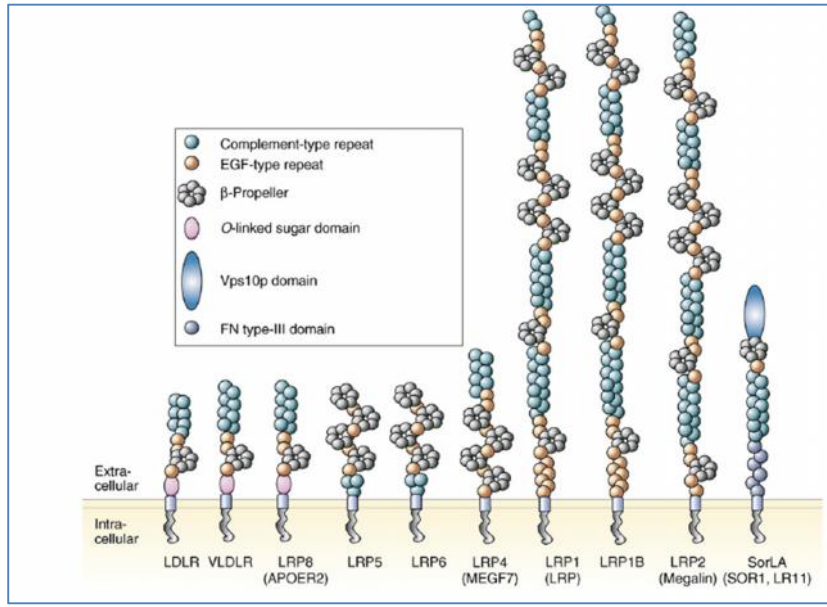
Oligomer formların, A β monomerlerinden farklı olarak nöronlar üzerinde belirgin toksik etkiye sahip olduğu ve nörotoksik etkilerini birçok mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği bilinmektedir (258). A β oligomerlerin, kortikal nöronlardaki RAGE'yi direkt olarak aktive etmesi, nöronlarda hasarlayıcı etkiye hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (229). Nöronal RAGE ekspresyonu, sağlıklı bireylerin beyinlerinde oldukça düşük düzeylerde iken Alzheimer hastalarının beyinlerinde parankimdeki artmış A β düzeylerine bağlı olarak yüksek düzeylerde saptanmaktadır (255). Farelerde A β 1-40'ın sistemik dolaşıma injekte edilmesiyle, nöronlardaki TNF- α , IL-6 ve heme oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunun arttığı, RAGE-null farelerde ise ekspresyon düzeylerinde herhangi bir değişiklik oluşmadığı gösterilmiştir (252). Bu durumda artmış RAGE ekspresyonu gösteren nöronlar tarafından sekrete edilen proinflamatuvar sitokinlerin hem otokrin olarak aynı hücre üzerinde hem de çevresindeki nöronlar üzerinde artmış hücresel strese yol açtığı görülmektedir (229). RAGE, A β oligomerlerinin yanı sıra A β fibrilleri tarafından da aktive edilmektedir (230). Böylece

nöritik plaklar çevresinde yerleşim gösteren glial hücrelerdeki ve nöronlardaki RAGE'nin A β fibrilleriyle uyarılması sonucunda bu hücrelerden ortama salınan sitokinlerin, lokal inflamasyona yol açması veya daha uzaktaki nöronlar üzerinde toksik etki göstermesi mümkündür. Fakat nöritik plakların oluşturduğu bu hasarlayıcı etki, tüm parankim boyunca rahatlıkla ilerleyebilen çözünebilir A β oligomerlerin oluşturduğu nörotoksik etkiye göre oldukça zayıf kalmaktadır (19). A β -RAGE etkileşimi sonrasında diğer proinflamatuvar mediyatörlere ek olarak nöronal M-CSF ekspresyonunda da artış gözlenmektedir (254). M-CSF'nin, çevredeki mikrogliaları aktive etmesi ise nöroinflamasyonun daha fazla arttığı kısır bir döngü oluşturmaktadır (229).

RAGE ligandları, birbirlerinin etkilerini sinerjistik olarak arttırabilmektedir (259-261). S100B, S100A6/9/12, TTR ve HMGB1 gibi A β dışındaki diğer RAGE ligandlarının da Alzheimer hastalarının beyinlerinde artmış düzeylerde olduğu görülmektedir (262-264). Tüm bu ligandların, sinerjistik etki göstermesi sonucunda RAGE ve NF- κ B aktivasyonu aracılığıyla kalıcı ve güçlü bir nöroinflamatuvar cevap gelişmektedir (199). A β ve diğer ligandlar için nöronlar üzerinde spesifik ve indüklenebilir bir reseptörün (RAGE gibi) bulunması, hastalığın erken evrelerinden itibaren bu ligandlar tarafından nöronların hasarlanmasına yol açmaktadır (229).

2.3. Düşük-Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör-İlişkili Protein (LRP)

Alfa-2-makroglobulin reseptörü (A2MR), apolipoprotein E reseptörü (ApoER) veya yüzey farklılaşma antijeni 91 (CD91) olarak da bilinen LRP (LRP1), LDL reseptör ailesi içinde yer alan çok fonksiyonlu bir hücre yüzey reseptörüdür (Şekil 18). Bu ailenin ikinci keşfedilen üyesi olan LRP, LDL reseptörüne benzerlik gösteren diğer proteinlerin ortaya konması amacıyla cDNA kütüphanesinin taranması sırasında keşfedilmiş ve 1988 yılında klonlanmasının ardından A2MR olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda APOER ve CD91 olarak da adlandırılan LRP, günümüzde daha çok LRP1 ve LRP isimleriyle bilinmektedir (265).



Şekil 18. LDL reseptör ailesini oluşturan reseptörlere ait yapısal bileşenler.

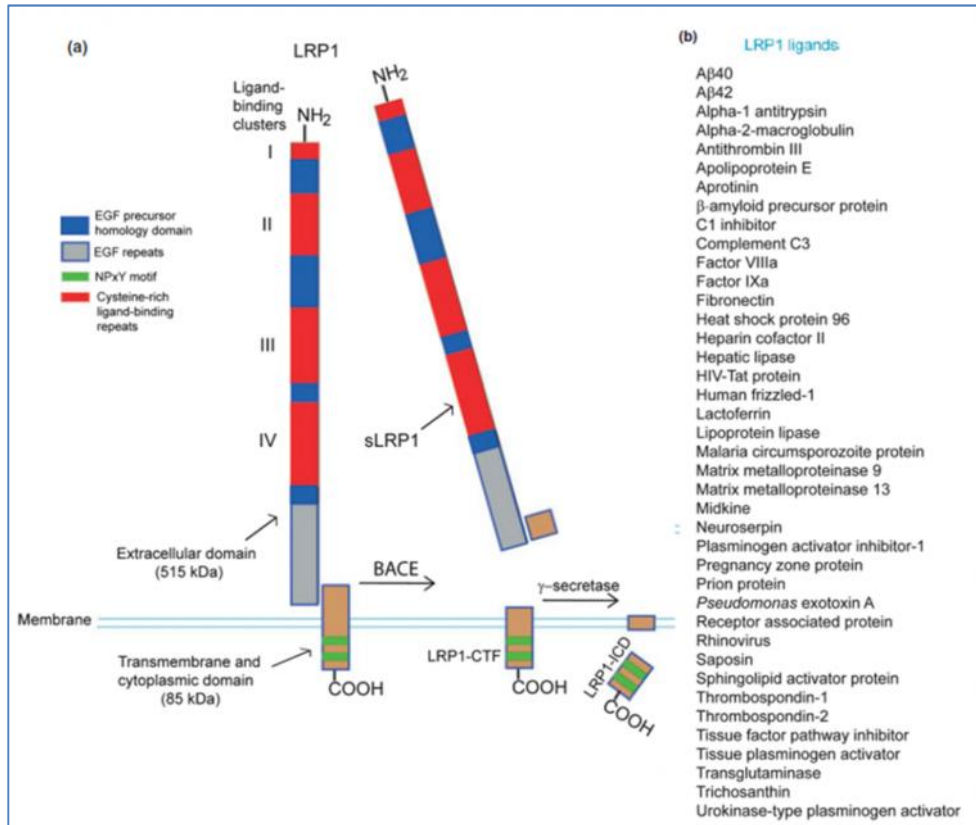
LRP, ailenin diğer üyelerine yapısal olarak benzerlik gösterse de onlardan (LRP1B ve LRP2 hariç) belirgin olarak daha büyüktür. 4454 aminoasitten oluşan ve 600 kDa ağırlığında olan LRP, vücuttaki en büyük hücre yüzey reseptörlerinden biridir (266). İlk kez keşfedildiğinde çöpçü reseptörü olarak tanımlanmış fakat daha sonra sinyal iletiminde de görev yaptığı anlaşılmıştır. ER’da sentezlenmesinin ardından golgi’ye gönderilen LRP, TGN içindeyken furin tarafından kesilerek 515 kDa ve 85 kDa ağırlığında iki parçaya (sırasıyla ‘ağır α -zinciri’ ve ‘hafif β -zinciri’) ayrılmakta fakat daha sonra bu iki parça, non-kovalent olarak bir arada bulunmaya devam etmektedir (169) (Şekil 19). LRP’nin ER’da doğru bir şekilde katlanması ve uygun tersiyer yapı kazanabilmesi için reseptör-ilişkili protein (RAP)’e ihtiyaç duyulmaktadır. RAP ayrıca LRP’nin ER ve cis-golgi ağı (CGN)’nda taşınması sırasında LRP üzerindeki ligand bağlayıcı bölgelere bağlanarak bu bölgeleri kapatmakta ve bu sayede LRP’nin ligandlarıyla erken etkileşime girmesine engel olmaktadır. LRP’nin golgiye ulaşmasıyla birlikte RAP, ER’a geri dönmekte, LRP ise TGN aracılığıyla hücre membranına taşınmaya devam etmektedir (267). LRP, LDL reseptör ailesinin tüm üyelerinde bulunan beş yaygın yapısal ünite içerir: (a) sisteinden zengin ligand-bağlayıcı (kompleman) tip tekrar, (b) epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrar, (c) β -pervane (β -propeller) yapı gösteren tekrar, (d) membranı bir defa kateden transmembranöz parça ve (e) NPXY motifini içeren kısa bir sitoplazmik kuyruk. Ligand bağlayıcı tip tekrarlar, reseptörün hücre dışı parçası

üzerinde kümelenme göstererek 'ligand bağlayıcı bölge'leri oluşturur. LRP'nin hücre dışı parçası üzerinde sırasıyla 2, 8, 10 ve 11 adet tekrar içeren dört ligand bağlayıcı bölge bulunur. LRP'ye ait ligandlar, özellikle ikinci ve dördüncü bölgelere bağlanmaktadır. Reseptörün hücre dışı parçası, transmembranöz parçanın hemen öncesinde yer alan altı adet EGF benzeri tekrar ile son bulmaktadır (Şekil 18) (268). LDL reseptör ailesinin tümü, apoE gibi ortak bir liganda sahip olsa da endositik fonksiyon açısından birbirlerinden farklılık göstermektedir. Diğer üyelerden farklı olarak LRP, kendi ligandıyla etkileşime girmesinin ardından hızlı bir şekilde (<0.5 sn) endositozla hücre içine alınabilmektedir (267).

LRP, özellikle karaciğer (KC), beyin ve akciğer başta olmak üzere kalp, bağırsak, böbrek, over ve testis gibi vücuttaki birçok doku tarafından eksprese edilmektedir (269). LRP, SSS'deki hemen hemen tüm hücreler (endotel hücresi, vasküler düz kas hücresi, perisit, ependim hücresi, nöron, mikroglia ve astrositler) tarafından sentez edilebilmektedir. Nöronlar LRP'yi güçlü bir şekilde sürekli olarak eksprese etmekte iken mikroglia ve astrositlerdeki ekspresyonun, düşük seviyelerde olduğu fakat aktive edilmelerinin ardından up-regüle edildiği görülmektedir (169). LRP'nin beyindeki ekspresyonu, tüm alanlarda homojen bir şekilde gerçekleşmeyerek bölgesel bir takım farklılıklar içerir. Özellikle dentat girus'un granüler tabakasındaki nöronlarda, hipokampusun CA1, CA3, CA4 bölgelerindeki piramidal nöronlarda, entorinal kortekste ki nöronlarda ve koroid pleksusun epitelyal hücrelerinde immünohistokimyasal olarak artmış boyanma paterni izlenir. Entorinal korteks ve hipokampal formasyonun, AH'ndaki patolojik değişikliklerden yoğun bir şekilde etkileniyor olması, LRP'yi bu hastalık açısından önemli hale getirmektedir (270).

APP'e benzer şekilde LRP'nin de hücre membranında ardışık proteolitik kesime uğradığı belirlenmiştir. Kontrollü membran içi proteoliz (regulated intramembrane proteolysis; RIP) adı verilen bu proteolitik süreç, ilk defa sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein (SREBP)'de tanımlanmış ve ardı sıra yapılan çalışmalar ile hücre membranında yer alan birçok protein ve reseptörde (Notch, APP, reseptör tirozin kinaz ErbB-4, hyaluronan reseptörü CD44, aktivasyon transkripsiyon faktörü 6, inositol gerektiren 1, LRP ve kaderin gibi) RIP'in gerçekleştiği ortaya konmuştur (271). RIP'e uğrayan proteinler tipik olarak önce hücre membranına yakın bir noktadan kesilmekte ve ardından transmembranöz parçanın ikinci bir kesime uğramasıyla intraselüler parçanın sitoplazmaya salınması sağlanmaktadır. Sitoplazmaya salınan parçanın, nükleusa taşınması ise birçok genin transkripsiyonunda değişikliğe yol açmaktadır. İkinci kesimi, genellikle presenilin'in yer aldığı γ -sekretaz

kompleksi gerçekleştirmektedirken, birinci kesimi gerçekleştiren enzim, proteinler arasında farklılık gösterebilmektedir. LRP için birinci kesimi, nöronlarda BACE1, hepatositlerde ise metalloproteinazlar gerçekleştirir (169, 271). Böylece LRP'nin hücre dışında yer alan 515 kDa'luk α -zinciri ve β -zincire ait 15kDa'luk kısmı, interstisyel alana salınmaktadır. Hücre dışına salınan bu parça, çözünebilir LRP (sLRP) olarak isimlendirilir (169) (Şekil 19). sLRP, ligand bağlayıcı bölgelere sahip olması nedeniyle 'tuzak reseptör' gibi görev yaparak ligandların, hücre membranındaki LRP'ye bağlanmasını engellemekte ve bu sayede hücre içine sinyal iletilmesini önleyerek artmış LRP-ligand etkilerine karşı koruyucu bir mekanizma sağlamaktadır. Ayrıca sLRP, plazmada nanomolar seviyede bulunmakta ve plazmada A β için taşıyıcı protein olarak görev yapmaktadır. Böylece KBB'deki A β -RAGE etkileşimini önleyerek A β 'nın beyine doğru olan taşınmasını azaltıcı yönde etki gösterir (272). Birinci kesimin ardından membrana tutulu halde kalan 70 kDa'luk β -zincir parçasının, γ -sekretaz ile kesilmesi ise intraselüler parçanın (LRP-ICD; LICD) sitoplazmaya salınmasıyla sonuçlanır (169) (Şekil 19).



Şekil 19. (a) LRP'nin hücre membranında proteolitik olarak yıkılma uğratılması. (b) LRP ligandları. (169).

2.3.1. LRP ligandları

LRP'nin ilk tanımlanan ligandlarından olan "apoE", kolesterol hemostazı ve lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (273). Bağırsaklardan emilen lipidleri taşıyan şilomikronlar, vasküler endoteldeki lipoprotein lipazlar ile şilomikron kalıntılarına dönüştürülmelerinin ardından, KC'e taşınarak apoE reseptörleri aracılığıyla dolaşımdan temizlenmektedir (266). LRP'nin keşfedilmesinden önce KC'deki tek lipoprotein kalıntı reseptörünün, düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) olduğu düşünülmekteyken, LDLR fonksiyonunun engellendiği (LDLR gen delesyonu gibi) çalışmalarda, şilomikron kalıntılarının dolaşımdan rahatça temizlenebildiği gösterilmesi üzerine başka bir apoE reseptörünün varlığına dikkat çekilmiştir. LDLR'ne yapısal olarak benzerlik göstermesi, KC'de yüksek düzeyde eksprese edilmesi ve apoE'ye bağlanabilmesi nedeniyle LRP'nin, KC'deki diğer kalıntı reseptörü olabileceği düşünülmüş ve Willnow ve ark.larının yaptıkları çalışmayla bu varsayımın doğruluğu kanıtlanmıştır (274). Bu çalışma sonrasında gerçekleştirilen diğer birçok çalışmada da LRP'nin, KC'de apoE reseptörü olarak görev yaptığı doğrulanmıştır (275, 276). ApoE, periferik dolaşımda genellikle şilomikron kalıntıları ve IDL (ara-yoğunluklu lipoprotein) tipi lipoproteinler içinde yer almaktayken SSS'nde ağırlıklı olarak yüksek-yoğunluklu lipoprotein (HDL) benzeri lipoproteinler içinde bulunmaktadır (277). Başlıca KC tarafından üretilen ve periferik dolaşıma verilen apoE, KBB'ni geçememekte ve bu nedenle SSS'nin kendisine ait bağımsız bir apoE havuzu bulunmaktadır. Periferik apoE'nin tersine beyinde üretilen apoE, KBB'de bulunan LRP vasıtasıyla beyinden sistemik dolaşıma doğru geçebilmektedir (273). Myelin kılıfı ve nöronal hücre membranının devamlılığı açısından nöronlara sürekli olarak kolesterol sağlanması gerekmektedir. Ayrıca sinaptik bağlantıların dayanıklılığında ve yeni sinaps oluşumunda (sinaptik plastisitede olduğu gibi) kolesterolün aktif rol oynadığı görülür (273, 276). LRP, KC'e ek olarak beyinde de apoE reseptörü olarak görev yapmakta ve nöronlara kolesterol sağlanması, apoE-LRP etkileşimi sayesinde gerçekleştirilmektedir. Astrosit ve mikroglialar tarafından üretilen apoE, LRP vasıtasıyla nöronlara alınmakta ve bu esnada kendisiyle birlikte kolesterolün de hücre içine taşınmasına aracılık etmektedir (273).

Proteinaz inhibitörleri olan "α2-makroglobulin (α2M)" ve "gebelik bölgesi proteini", yalnızca inhibe ettikleri enzimler ile kompleks oluşturduktan sonra LRP'ye bağlanabilmektedir (266). Proteinazların, α2M üzerindeki tuzak bölgelere bağlanması sonucunda α2M'nin kendi üzerine katlanarak konformasyonel değişikliğe uğradığı ve bu

sayede proteinazların kapana kısılarak inhibisyona uğradıkları görülmektedir. Bu şekilde yapısal değişiklik gösteren $\alpha 2M$, aktive $\alpha 2M$ ($\alpha 2M^*$) olarak adlandırılır . $\alpha 2M^*$ 'in, LRP'ye bağlanması sonrasında endositozla hücre içine alınması ve lizozomlar tarafından ortadan kaldırılması sayesinde dokuların, proteinazlardan kalıcı olarak temizlenmesi sağlanmaktadır (189).

$\alpha 2M$ 'e benzer şekilde serin proteinaz inhibitörü (serpin) olan “plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)”in de LRP'ye bağlanabilmesi için inihibe edeceği uPA ve tPA'ya bağlanarak yapısal değişikliğe uğramış olması gerekmektedir (278). Fakat “uPA” ve “tPA”, PAI-1 ile kompleks oluşturmadan da direkt olarak LRP'ye bağlanabilmektedir (265). uPA'nın, uPA reseptörüne (uPAR) bağlanması sonucunda plasminojenin proteolitik olarak yıkılmasıyla plasmin oluşması sağlanmakta ve bu proteolitik süreç PAI-1 ile regüle edilmektedir. PAI-1'in uPAR'a bağlı olan uPA ile stabil kompleks oluşturması sonrasında PAI-1-uPA-uPAR kompleksi, PAI-1 vasıtasıyla LRP ile de etkileşime girmekte ve bu dörtlü kompleks yapı (PAI-1-uPA-uPAR-LRP), LRP vasıtasıyla hızlı bir şekilde hücre içine alınmaktadır. Endozom içinde yer alan bu yapılardan PAI-1 ve uPA, lizozomlara verilerek yıkılmakta iken uPAR ve LRP'nin intakt halde hücre membranına geri dönmesi sağlanmaktadır (266).

Diğer bir ligand olan tPA, uPA'ya benzer şekilde plasmin oluşumuna katkıda bulunarak fibrinolitik sistem içinde yer aldığı gibi SSS'de diğer birçok farklı fonksiyona aracılık etmektedir. Örneğin nörit büyümesi, nöronal migrasyon, visual korteks plastisitesi ve LTP oluşumunun tPA aktivitesiyle direkt olarak ilişkisi bulunmaktadır (279). Hipokampusta yüksek düzeyde eksprese edilen LRP, özellikle hipokampal LTP oluşumunda tPA'nın bu etkilerine aracılık etmektedir. RAP ile LRP düzeylerinin azaltılması, tPA'nın LTP artırıcı etkilerini bloke etmektedir (278).

LRP, insanlarda hastalık yapan bazı “rhinovirüslerin”, “prion proteininin” ve “Pseudomonas exotoksin A”nın hücre içine alınmasına yol açmaktadır. Ayrıca “HIV-Tat proteini” için reseptör görevi görerek HIV'in aktivasyonunda rol oynamaktadır (189). HIV ile enfekte hücrelerden salınan HIV-Tat, LRP aracılığıyla endozom içine alınmakta ve daha sonra tam olarak anlaşılamamış bir mekanizmayla nükleusa ulaşarak uyuyan (dormant) viral genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Bu süreç özellikle SSS için önem taşır. LRP'nin nöronlar tarafından oldukça yüksek düzeyde sentezleniyor olması, HIV ile enfekte kişilerde sık gözlenen HIV-demans kompleksinin gelişimi için zemin hazırlar (278). LRP'nin AH

açısından önemli bir ligandı olan “A β ”, direkt olarak ya da apoE vasıtasıyla ligand bağlayıcı bölgelere tutunur (272). A β ’nın nöronlar, mikroglialar ve vasküler düz kas hücreleri üzerindeki LRP’ye bağlanması, bu hücreler tarafından hücre içine alınmasına ve lizozomlar vasıtasıyla yıkılmasına yol açarken, KBB üzerindeki LRP’ye bağlanması ise beyinden sistemik dolaşıma doğru temizlenmesiyle sonuçlanır (171). A β ’nın yanı sıra Knutiz tip proteinaz inhibitör (KPI) bölgesi içeren “APP” de LRP ligandları arasında yer almakta fakat APP695 gibi KPI bölgesi içermeyen APP’ler, LRP’ye bağlanamamaktadır. APP’nin LRP’ye bağlanması, hızlı bir şekilde endositozla hücre içine alınmasına ve daha sonra endozomlar içinde sekretazlar tarafından A β üretilmesine yol açmaktadır (267).

2.3.2. A β ’nın kan beyin bariyerindeki transportunda LRP’nin rolü

Nöronlar tarafından üretilen A β , KBB’nin abluminal yüzünde yer alan LRP tarafından transitozla sistemik dolaşıma doğru taşınmaktadır (280) (Şekil 17). LRP’nin beyindeki kapiller endotel hücreleri tarafından eksprese edildiği immünohistokimyasal çalışmalarla ortaya konmuştur (169). Ayrıca yüksek çözünürlüklü konfokal mikroskop görüntülerinde endotel hücrelerinin özellikle beyine bakan yüzünde kümelenme gösterdiği belirlenmiştir (184). Hayvan çalışmaları, A β ’nın taşınmasında spesifik olarak LRP’nin yer aldığını ortaya koymuştur (169).

LRP ekspresyonu üzerinde etkili olan çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Hem deney hayvanlarında (fare, domuz ve maymunlar gibi) hem de insanlarda yaşlanmayla birlikte KBB’deki LRP düzeylerinin azaldığı ve A β klirensinde bozulma ortaya çıkarak RAGE aktivitesinin giderek daha baskın hale geldiği görülmektedir (184). Ayrıca A β ’dan zengin bir ortamda, beyin endotel hücrelerindeki artmış RAGE düzeylerinin, LRP ekspresyonunu inhibe ettiği ve bu etkinin RAGE-spesifik antikorlar ile engellendiği bildirilmiştir (8). Düzenli egzersiz yapılması ve çevresel ortamın zenginleştirilmesi ise farelerde, KBB’deki LRP ekspresyon düzeylerini arttırmakta ve A β ’nın temizlenmesini hızlandırmaktadır (272).

A β ’nın, endotel üzerindeki LRP’ye bağlanması yalnızca transitozla sonuçlanmayıp patolojik konsantrasyondaki A β ’ya maruz kalan endotel hücrelerinde, hücre yüzeyinde oluşan A β -LRP komplekslerinin, proteozomal sistem tarafından ortadan kaldırılabildiği görülmektedir (240) (Şekil 15). Zlokovic ve ekibinin 2004 yılında yaptığı çalışma öncesinde A β ’nın yalnızca apoE, apoJ ve α 2M gibi şaperonlar ile kompleks oluşturduktan sonra LRP’ye bağlanabildiği düşünülmekte iken bu çalışma sonrasında A β ’nın direkt olarak LRP’ye bağlanabildiği

anlaşılmıştır (188). Zlokovic ve ark.larına göre A β 40'a kıyasla A β 42'nin, fibrilleşmeye daha yatkın olması ve beyinden daha zor temizlenmesi neticesinde yaşlanmayla birlikte beyindeki A β 42 düzeyleri giderek artış göstermekte ve sonuç olarak AH'nda gözlenen artmış amiloid birikimleriyle karşılaşmaktadır (169).

2.3.3. LRP ve Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalarının beyinlerinden elde edilen doku örneklerinin, Western blot yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda aynı yaş grubundaki sağlıklı yaşlılara göre LRP düzeylerinin belirgin olarak azaldığı görülmektedir (281). Ayrıca Alzheimer hastalarından elde edilen doku kesitlerinin (frontal korteks ve hipokampus gibi), immünohistokimyasal olarak analizi sonrasında kapiller endotelde azalmış LRP ekspresyon düzeyleriyle karşılaşmaktadır (170). Fakat endotel hücrelerinin tam tersi olarak, hem Alzheimer hastalarında hem de AH modellerinde, nöronlardaki LRP seviyelerinde belirgin artış saptanır. Amiloid plakların immünohistokimyasal analizinde ise hem LRP hem de birçok ligand (apoE, α 2M, tPA ve MMP9 gibi), plaklar içinde artmış miktarda saptanmaktadır (272).

Yaşlanma süreci içinde KBB'deki endotelde LRP düzeylerinin azalmaya başlamasıyla birlikte A β 'nın etkin bir şekilde temizlenememesi sonucunda beyindeki A β düzeyleri giderek artış gösterir (184). Beyindeki artmış A β 'nın, KBB'deki RAGE ekspresyon düzeylerini arttırması ve tam tersi olarak LRP düzeylerini azaltması ise kısır bir döngüye yol açmaktadır. Ayrıca artmış RAGE'nin, LRP ekspresyonu üzerinde direkt olarak inhibe edici etki göstermesi, tabloyu daha da ağırlaştırır. Tüm bunlara ek olarak, ilerleyen süreç içinde patolojik düzeylere yükselen A β 'nın, proteozomal sistem tarafından LRP'nin yıkılmasını indüklemesi ise reseptör düzeylerini daha fazla azaltır. Böylece etkin bir şekilde temizlenememesi sonucunda beyinde sürekli olarak birikim gösteren A β monomerleri, oligomer ve fibriler formlara dönüşerek Alzheimer hastalığına yol açan patofizyolojik süreci başlatmaktadır (169).

Hücre içi kalsiyum seviyelerinin, hücre dışı uyarılarla belirli bir düzeye kadar artış göstermesi, sinyal iletimi ve LTP oluşumu için gerekliken, daha fazla artarak toksik düzeylere ulaşması hücreyi apoptoza sürüklemektedir (282). LRP-ligand etkileşimi sonrasında aktive olan LRP'nin, PSD-95 aracılığıyla NMDA reseptörlerinden hücre içine Ca⁺² girişini indüklediği ve LTP oluşumunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (189). AH'nda ise LRP'nin, nöronlarda artmış düzeyde olması ve beyindeki artmış A β ile etkileşime girmesi sonucunda hücrelere fazla miktarda Ca⁺² girişi gerçekleşmekte ve bu durum A β 'ya ait nörotoksik

etkilerin ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır. Ayrıca kortikal ve hipokampal nöronlarda LTP oluşum mekanizması bozulmakta ve bu durum hastalarda gözlenen hafıza kaybına katkıda bulunmaktadır (189). Bunlara ek olarak, LRP'nin GSK-3 β aktivitesinde artışa yol açması, NFY oluşumunu artırarak nöronal disfonksiyona ve ilerleyen süreçte nöronların apoptozla kaybedilmesine yol açmaktadır (277).

2.4. Neprilizin

A β 'yı yıkan enzimler arasında üzerinde en fazla çalışılmış ve en iyi karakterize edilmiş olanı neprilizin (NEP)'dir (177). NEP, M13 proteolitik enzim ailesi içinde yer alan bir çinko metalloendopeptidazdır (176). İlk kez 1974 yılında Kerry ve Kenny tarafından insülinin B zincirini hidrolize eden bir endopeptidaz olarak böbrek epitel hücrelerinin fırçamsı kenar membranlarından izole edilmiş ve 1978 yılında Schwartz ve ekibi tarafından beyindeki enkefalinleri yıkan enzimlerden biri olarak tekrar keşfedilmiştir (283, 284). Turner ve ark. ları, 1983 yılında yaptıkları çalışmayla böbrekteki “nötral endopeptidaz” ile beyindeki “enkefalinaz”ın aslında aynı enzim olduklarını göstermiş ve bunun üzerine NEP, “endopeptidaz-24.11” olarak adlandırılmıştır (285). İlerleyen süreç içinde NEP'in, lökositlerin tanınmasında kullanılan hücre yüzey antijenlerinden biri olarak “ortak akut lenfositik lösemi antijeni (CALLA)” veya “CD10” şeklinde adlandırıldığı görülmektedir (286). Ayrıca literatürde “atriopeptidaz”, “deri fibroblast elastazı; SFE”, “membran metallo-endopeptidaz; MME” gibi isimlendirmelerle de karşılaşılmaktadır (287). Bu isim karışıklığının önüne geçmek amacıyla günümüzde Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) önerdiği “neprilizin” (EC 3.4.24.11) ismi kullanılmaktadır (288).

NEP, tip II integral membran proteindir ve bu nedenle C-terminal kısmı hücre dışında, N-terminali ise sitoplazmada yer alır. Uzun hücre dışı parçası üzerinde, çinko metallo-endopeptidazlarda tipik olarak bulunan ve çinko bağlayıcı bölge olarak görev yapan “HEXXH” motifi yer almaktadır. Buna ek olarak “EXXXD” motifi ve 10 adet sistein rezidüsü taşımaktadır. Çinkonun bağlanması HEXXH motifi üzerindeki iki histidine ek olarak EXXXD üzerindeki glutamat da üçüncü bir bağlantı noktası olarak görev yapmakta ve bu nedenle M13 ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak NEP, “gluzincin” olarak da kabul edilmektedir (289). HEXXH motifini içeren ve enzimatik aktiviteden sorumlu olan bölgenin, enzimin ekstraselüler parçası üzerinde yer alması nedeniyle NEP, ektoenzim gibi fonksiyon görerek ekstraselüler alanda bulunan substratların parçalanmasını sağlar (290).

NEP, özellikle böbrek (fırçamsı kenar membran proteinlerinin %4'ünü oluşturur), bağırsak, nötrofil, timosit, karaciğer, dalak, akciğer, prostat, testis ve beyin olmak üzere vücuttaki birçok hücre tarafından sentezlenmektedir (291). Böbreğe kıyasla beyindeki ekspresyon düzeyleri oldukça düşüktür. Beyinde başlıca nigrostriatal yolakta bulunmakta fakat daha az oranda korteks ve hipokampusta da saptanmaktadır (292). NEP immünoreaktivitesini hücresel düzeyde analiz eden çalışmalar neticesinde NEP'in, astrosit ve mikroglialar tarafından eksprese edilmeyip sadece nöronlar tarafından sentezlendiği ve çoğunlukla akson terminallerinde bulunması nedeniyle presinaptik bölgede aktivite gösterdiği anlaşılmıştır (177).

NEP'in ekspresyon düzeyleri üzerinde etkili olan birçok faktör tanımlanmıştır. Bunların arasında yaşlanma, AH için önemli bir risk faktörü olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Yaşlanma sonucunda beyindeki NEP düzeyleri, bölgesel spesifikite gösterecek şekilde değişikliğe uğramaktadır. Fare ve ratlarda NEP ekspresyon düzeylerinin, amiloid birikimlerinin sık gözlendiği bölgelerde (hipokampus ve korteks gibi) belirgin olarak azaldığı fakat amiloid birikimlerine karşı dirençli olan bölgelerde (serebellum ve striatum gibi) ise tam tersi olarak artış gösterdiği saptanmıştır (293). Hayvan çalışmalarının yanı sıra insanlarda da yaşlanma sonucunda, temporal ve frontal kortekste NEP seviyelerinde azalmanın ortaya çıktığı belirlenmiştir (20). Hipokampusun DG ve CA bölgelerinde, AH'nın erken dönemlerden itibaren amiloid birikimlerinin ve nörodejenerasyonun geliştiği bilinmektedir (100). Bu patolojik tablonun ortaya çıkmasında muhtemelen bu bölgelerde ortaya çıkan NEP azalması etkili olmakta ve sonuç olarak hipokampustaki sinaptik döngüsünün kesintiye uğramasıyla hafıza ve öğrenme gibi kognitif fonksiyonlarda belirgin kayıp ortaya çıkmaktadır (20).

Somatostatin (SST), primer nöronal hücre kültürlerine uygulandığında NEP aktivitesinde artışa yol açmaktadır (294). Lu ve ark.larının çalışmasında, beyinde sentezlenen proteinlere ait 11.000 transkript taranmış ve bunların içinden aralarında SST mRNA da olmak üzere 50 tanesinin, 40'lı yaşlardan itibaren belirgin derecede azaldığı saptanmıştır (295). Beyindeki SST düzeylerinde ortaya çıkan azalma, NEP düzeylerinde de azalmaya yol açarak A β 'nın daha fazla birikmesine yol açmakta ve artmış A β ise hem SST'i hem de neprilizini daha fazla azaltarak kısır bir döngü oluşturmaktadır (294). Hücre kültürü çalışmalarında yeşil çay ekstratları, polifenoller ve epigallokateşin-3-gallat (EPCG)'ın, NEP aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. Histon deasetilaz inhibitörü olan valproik asitin, AH modeli oluşturulan

aralıkta birikim göstererek LTP oluşumunu engellediği ve AH'nda gözlenen hafıza bozukluklarına yol açtığı bilinmektedir (152, 153). NEP'in, monomerlerin yanı sıra A β 'ya ait oligomer formları da yıkabiliyor olması, A β 'nın sinaptotoksik etkilerine karşı koruyucu bir mekanizma sağlamaktadır (174). NEP, sentetik olarak hazırlanan oligomerlere ek olarak beyin dokusundan elde edilmiş oligomerleri de başarılı bir şekilde yıkabilmekte ve in vivo olarak A β oligomerlerini parçalayabilmektedir (298). NEP, diğer substratlarına kıyasla A β 'ya karşı daha fazla afinite göstermekte ve A β 40'ı, A β 42'ye göre daha etkin bir şekilde yıkabilmektedir (299).

2.4.2. Neprilizin ve Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalarının beyinlerinde, benzer yaş grubundaki sağlıklı bireylere göre NEP mRNA ve protein düzeylerinde belirgin azalmayla karşılaşmaktadır. İmmünohistokimyasal analizlerde, hem nöronlarda hem de vasküler düz kas hücrelerinde NEP ekspresyonunun azaldığı fakat amiloid plakların çevresinde yer alan aktive astrositlerde, tam tersi olarak arttığı görülmektedir (292). Ayrıca beyin parankimindeki azalmayla uyumlu olarak BOS'taki NEP düzeylerinde de belirgin azalma gözlenmektedir (10). NEP'teki bu azalma, AH'ndan etkilenen bölgeler olan hipokampus ve kortekste kendini göstermekte fakat serebellum ve striatumda herhangi bir azalmaya rastlanmamaktadır (174). NEP düzeylerine ek olarak beyindeki A β seviyelerini de değerlendiren çalışmalarda, NEP ile çözünebilir A β seviyeleri arasında negatif korelasyonun olduğu bildirilmiştir. Ayrıca NEP düzeyleri yüksek olan hastaların, premortem olarak daha iyi klinik performansa (Blessed skoru ve MMSE) sahip olduğu belirlenmiştir (293). AH'nda, beyindeki artmış oksidatif hasarlanma sonucunda okside formdaki NEP düzeyleri giderek artış göstermekte ve bu durum, NEP'in fonksiyon görmesine engel olarak NEP aktivitesinde belirgin kayba yol açmaktadır (175). Sonuç olarak AH'nda, beyindeki NEP seviyelerinde gözlenen belirgin azalma sonucunda A β , etkin bir şekilde yıkılamamakta ve oligomerler şeklinde birikmeye başlamaktadır. A β oligomerini, sinaptik aralıkta yıkan esas enzimin NEP olması nedeniyle oligomerlerin de yıkılmadığı görülmekte ve bu durum LTP oluşumunu engelleyerek hafıza oluşumunda bozulmaya yol açmaktadır. Ayrıca oligomerlerin, mikrogial hücrelerdeki RAGE'yi aktive etmesiyle birlikte nöroinflamasyon ve oksidatif hasarlanmada artış ortaya çıkmakta, artmış reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) NEP'i oksidize etmesi ise NEP fonksiyonlarında daha fazla azalmaya neden olarak A β 'nın birikmeye devam etmesine ve sonuç olarak amiloid plaklar şeklinde depolanmasına neden olmaktadır (20).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar ve Kitler

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

CİHAZ ADI	MARKA	MODEL	ÜRETİCİ FİRMA
Otoanalizör	Architect	C16000	Abbott Diagnostic, USA
Kan Sayım Cihazı	Beckman Coulter	LH780	Coulter Corp, USA
ELISA Plak Okuyucusu	Thermo	Varioskan Flash	Thermo, Finlandiya
ELISA Plak Yıkayıcısı	Thermo	Wellwash 4MK2	Thermo, USA
Santrifüj	Hettich	Rotina 35	Hettich Zentr., Almanya
Vorteks	Velp Scientifica	ZX3	Velp Scientifica, İtalya
Derin Dondurucu(-80°C)	Thermo	VLT1740-5-V40	Thermo Elect. Corp, USA
Derin Dondurucu(-20°C)	Arçelik	2031	Arçelik, Türkiye
Saf Su Cihazı	Milipore Mili-Q	ZLX55003Y	Hettich Corp, Almanya
Otomatik Pipetler	Eppendorf	Res. Plus, 8kanal	Eppendorf, Almanya
Elektronik Hassas Terazî	Presica	XB 220 A	Presica, İsveç
pH Metre	Orion	420	USA

Tablo 5. Tez çalışmasında kullanılan kitler.

KİT ADI	YÖNTEM	KATALOG NO	FİRMA
Aβ 1-40	Enzim İmmunassay	27713	IBL
Aβ 1-42 Ultrasensitive	Enzim İmmunassay	KHB3544	Invitrogen
Aβ Oligomer	Enzim İmmunassay	27725	IBL
sLRP-1	Enzim İmmunassay	CSB-E13348h	Cusabio
sRAGE	Enzim İmmunassay	DRG00	R&D Systems
esRAGE	Enzim İmmunassay	K1009-1	B-Bridge
Neprilizin	Enzim İmmunassay	E1785h	Wuhan EIAab Science
AST	Enzimatik Kolorimetrik	7D81-20	Abbott Diagnostic
ALT	Enzimatik Kolorimetrik	7D56-20	Abbott Diagnostic
GGT	Enzimatik Kolorimetrik	7D65-20	Abbott Diagnostic
Total Kolesterol	Enzimatik Kolorimetrik	7D62-20	Abbott Diagnostic
Trigliserid	Enzimatik Kolorimetrik	7D74-20	Abbott Diagnostic
LDL Kolesterol	Friedewald formülü		
HDL Kolesterol	Enzimatik Kolorimetrik	3K33-20	Abbott Diagnostic
Kreatinin	Enzimatik Kolorimetrik	7D64-20	Abbott Diagnostic
Eritrosit	Empedans		Coulter Corp, USA
Trombosit	Empedans		Coulter Corp, USA

3.2. OLGULARIN SEÇİMİ, ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

3.2.1. Olguların Seçimi

Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Hastanesi Nöroloji polikliniğine başvuran ve Demans polikliniğinde izlenmekte olan, NINCDS-ADRDA ve DSM-IV kriterlerine göre (Tablo 1, 2) Alzheimer tanısı almış kişiler hasta grubu olarak ve sağlıklı yaşlı kişiler ise kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. AH grubunu oluşturan kişilerin seçiminde; serebro vasküler hastalıklar, psikiyatrik hastalıklar, diğer santral sinir sistemi dejeneratif hastalıkları, hipoksi yapacak bir kalp ve akciğer hastalığı, alkolizm öyküsü, malignite, kronik inflamatuvar hastalıklar (ülseratif kolit ve romatoid artrit gibi), hastanın mental ve genel durumunu kötüleştirecek sistemik hastalıklar (kronik böbrek yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği gibi) dikkate alınarak bu hastalıklara sahip olanlar çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubu oluşturulurken; hem bu hastalıklara sahip olmayanlar hem de kognitif bozukluğu düşündüren belirti ve bulguların olmadığı kişiler seçildi. Ayrıca kontrol grubundaki bireylerin, Alzheimer'lı hastalar ile birinci dereceden akrabalık taşınamasına dikkat edildi. Poliklinikte yeni tanı konulan ve AH nedeniyle izlenen hastalarda normal tanı ve takip prosedürü gereği; klinik muayenesi, nöropsikolojik testleri, radyolojik incelemeleri (BBT veya MRG) ve laboratuvar testleri (açlık kan şekeri, böbrek fonksiyon testleri, karaciğer fonksiyon testleri, tiroid hormon düzeyleri, B12 vitamini ve folik asit düzeyleri, hemogram) yapıldı. Çalışmamızda kandaki düzeylerini ölçtüğümüz parametrelerden bazılarının, yaş ve cinsiyet faktöründen etkilenmesi nedeniyle iki grup arasında yaş ve cinsiyet açısından denklik sağlandı. Ayrıca bu parametreler üzerinde etkili olan ilaçların (insülin, pentoksifilin, fibrat gibi) kullanımı, her iki grupta da dışlama kriteri kabul edilirken kontrol grubu için bunlara ek olarak bir yıldan uzun süreli vitamin desteği, ginkgo biloba ve piracetam kullanımı dışlama kriterleri içine alındı. Fakat oral antidiyabetik, statin, östrojen, nonsteroid anti-inflamatuvar ilaç (NSAİD), anti-koagülan, anti-histaminik, H₂ reseptör antagonisti ve ergotaminin, çalışma parametreleri üzerine etkisi olmadığı gösterilmiş olması nedeniyle, bu parametreler her iki grup için dışlama kriterleri içinde yer almadı (300-308). Çalışma kriterlerini karşılayan 50 Alzheimer hastası ve demansı olmayan 50 kontrol olgusu çalışmaya dahil edildi.

Etik kurul onayı alındıktan sonra başlatılan çalışma için örnek alınacak tüm Alzheimer hastalarının yakınları ve kontrol grubunu oluşturan kişiler bilgilendirildi ve imzalı onam formları alındı (EK 1, 2, 3). Ayrıca hastalara ait hazırladığımız veri kayıt formları dolduruldu.

Çalışmaya alınan tüm hastalara ve kontrol grubundaki kişilere, kognitif bozukluğu değerlendirmede en yaygın olarak kullanılan Kısa Mental Durum Muayenesi (Mini Mental State Examination, MMSE) yapıldı (EK 4). MMSE ile hafıza, oryantasyon, dikkat, verbal akıcılık, nominal afazi, reseptif afazi, aleksi, agrafi ve konstruksiyonel apraksi, 30 puan üzerinden değerlendirildi. Kontrol grubu için MMSE: ≥ 27 olarak kabul edildi. Ayrıca tüm olgulara, demansın evrelemesinde ve zaman içindeki değişiminin ölçülmesinde kullanılan ölçekler içinde altın standartlardan biri olan Klinik Demans Evreleme Ölçeği (Clinical Demantia Rating, CDR) testi uygulandı (EK 5). CDR ile bellek, oryantasyon, yargılama-problem çözme, ev dışında işlevsellik, ev yaşamı-hobiler ve kişisel bakımdan oluşan 6 alan, bellek puanı esas alınarak değerlendirildi. CDR evrelemesinde CDR: 0 kontrol, CDR:1 erken evre, CDR:2 orta evre ve CDR:3 ileri evre demans olarak kabul edildi. Bu testler, hastalar ve yakınları ile yüz yüze görüşme yöntemi ile uygulandı.

3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Hastanesi Nöroloji polikliniğine başvuran ve Demans polikliniğinde izlenmekte olan Alzheimer hastalarından ve kontrol grubunu oluşturacak sağlıklı yaşlı kişilerden; rutin tanı ve takip prosedürü gereği istenen laboratuvar testleri için kan örnekleri poliklinikte alındı. Periferik venlerden vacutainer ile girilip düz tüpe bir kez olmak üzere 6-8 mL, EDTA'lı tüpe (1,8 mg/mL EDTA) bir kez olmak üzere 2 mL kan alındı. Alınan kan örnekleri en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

Düz tüpler hemen, EDTA'lı tüpler ise hemogramları çalışıldıktan sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Poliklinik için rutin tanı ve takip prosedürü gereği istenilen laboratuvar testleri çalışıldıktan sonra, kalan serum ve plazmalar; çalışılacak her test parametresi için birer ependorf ve ayrıca üç yedek ependorf olmak üzere toplam 17 ependorf tüpe ayrılarak çalışılınca kadar -80°C'de saklandı.

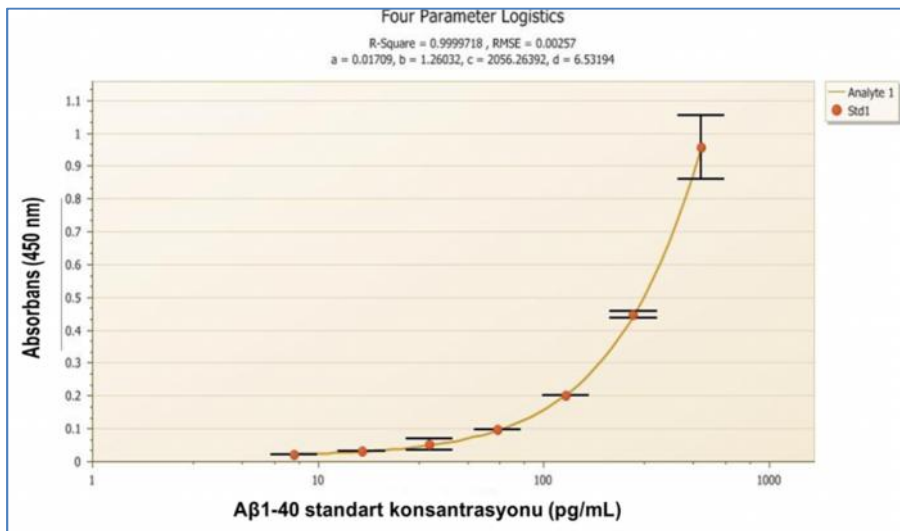
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

İnsan A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sLRP-1, sRAGE, esRAGE ve neprilizin analizleri enzim bağılı immünosorbent ölçüm (ELISA) ile çalışıldı. A β 1-40, A β 1-42 ve A β oligomer analizinde plazma örnekleri kullanılırken, sRAGE, esRAGE, sLRP1 ve neprilizin için serum örnekleri kullanıldı. ELISA ile çalışılan tüm parametrelerde standartlar ve örnekler duplike çalışıldı. AST, ALT, GGT, lipid paneli ve kreatinin ölçümleri enzimatik kolorimetrik yöntem ile spektrofotometrik olarak, eritrosit ve trombosit ölçümleri ise empedans yöntemi ile DEÜ Hastanesi Merkez Laboratuvarı otoanalizörlerinde çalışıldı.

3.3.1. İnsan A β 1-40 Analizi

Ölçüm Yöntemi ve Test Prensipleri: A β 1-40 analizi IBL Human ELISA kiti ile yapıldı. Standartlar ve örnekler, monoklonal anti-human A β (35-40) antikoru ile kaplı kuyucuklarda 4 °C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon ve yıkama sonrasında, horse radish peroksidase (HRP) konjuge anti human A β (11-28) monoklonal antikoru eklendi. İnkübasyon ve son yıkama basamağının ardından kuyucuklara renklendirici olarak tetra metil benzidin solüsyonu (TMB) eklendi. Karanlıkta inkübasyonun ardından reaksiyon asidik solüsyon ile sonlandırıldı ve oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 450 nm’de okundu. Absorbans değerleri A β 1-40’ın konsantrasyonuyla orantılı olarak bulundu. İnsan A β 1-40 standardının yedi farklı dilüsyonuyla elde edilen standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak standart eğrisi çizildi (Grafik 1). Örneklerin konsantrasyonu bu standart eğrisi kullanılarak hesaplandı.

Ölçüm aralığı: 7.81 – 500 pg/mL



Grafik 1. A β 1-40 standart eğrisi

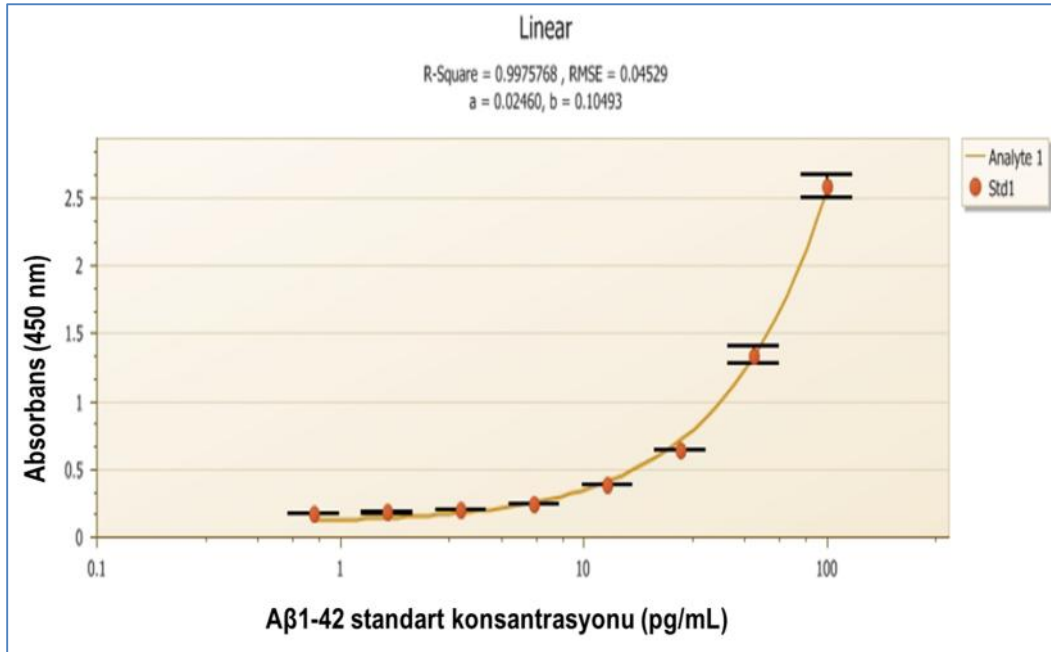
Analiz Aşamaları:

- Ölçümden yaklaşık 30 dk öncesinde tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilip, hafifçe karıştırıldı.
- Liyofilize standart ve 1 mL distile su hafifçe karıştırılıp çözülerek 1000 pg/mL'lik stok solüsyon hazırlandı. Sekiz adet tüp içine 230 µL EIA tamponu konuldu. Birinci tüpe 230 µL standart solüsyonu (1000 pg/mL) eklenip, 500 pg/ml'lik standart elde edildi ve hafifçe karıştırıldı. Sonrasında 1. tüpteki karışımdan 230 µL alınarak 2. tüpe aktarıldı. Bu şekilde yedi tüp için seri dilüsyon yapıldı (500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 ve 7.81 pg/mL). 8. tüp 0 pg/mL'lik standart olarak bırakıldı.
- Plak üzerinde örnek körü, örnek ve standartlar için kullanılacak olan kuyucuklar belirlendi. 1-7. tüplere 100 µL dilüe standartlar, 8. tüpe 100 µL örnek körü ve belirlenen kuyucuklara 100 µL örnekler, reaktif körü olarak belirlenen kuyucuklara 100 µL EIA tamponu eklendi.
- Plak 4 °C'de bir gece inkübe edildi.
- Plak yıkayıcı ile plak'ın toplam yedi kez yıkanması sağlandı.
- 100 µL işaretli antikorun örnek, örnek körü ve standartların bulunduğu kuyucuklara eklenmesi sağlanıp ve 4 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- Plak bir önceki yıkama basamağındaki gibi dokuz kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µL kromojen konularak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildi. Kuyucuklardaki rengin maviye döndüğü görüldü.
- Kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu koyulup ve plak hafifçe vurularak kuyucuklardaki sıvının karışması sağlandı. Stop solüsyonu konulduktan sonra kuyucuklardaki rengin sarıya dönüştüğü gözlemlendi. Plak'ın tabanında herhangi bir kirlilik veya su damlacığının kalmamasına ve sıvı yüzeyinde hava kabarcığının olmamasına dikkat edilerek 30 dk içinde plak okuyucu ile 450 nm'de plak okutuldu.

3.3.2. İnsan A β 1-42 Analizi

Ölçüm Yöntemi ve Test Prensipli: Analiz, İnvitrogen Human A β 42 Ultrasensitive ELISA kiti ile yapıldı. İnsan A β 'sının N terminaline spesifik monoklonal antikor ile kaplı kuyucuklara örnek ve standartlar konarak A β (1-42)'nin C terminaline spesifik tavşan monoklonal antikorlu ile inkübe edildi. Bağlanmış olan tavşan monoklonal antikorları, HRP işaretli anti-tavşan antikorlu ile saptandı. Anti-tavşan antikorlarının fazlalığı yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra bağlı enzim işaretli antikor saptanması için kuyucuklara renklendirici olarak tetra metil benzidin (TMB) solüsyonu eklendi. Karanlıkta inkübasyon sonrasında asidik solüsyon ile reaksiyon sonlandırıldı. Oluşan sarı renkli ürün 450 nm'de okundu. A β (1-42) miktarı ile renk değişimi orantılıdır. İnsan A β (1-42) standardının sekiz değişik dilüsyonu ile elde edilen standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak standart eğrisi çizildi (Grafik 2). Standart eğrisi kullanılarak örneklerin konsantrasyonu hesaplandı.

Ölçüm aralığı: <1.0 – 100 pg/mL



Grafik 2. A β 1-42 standart eğrisi.

Analiz Aşamaları:

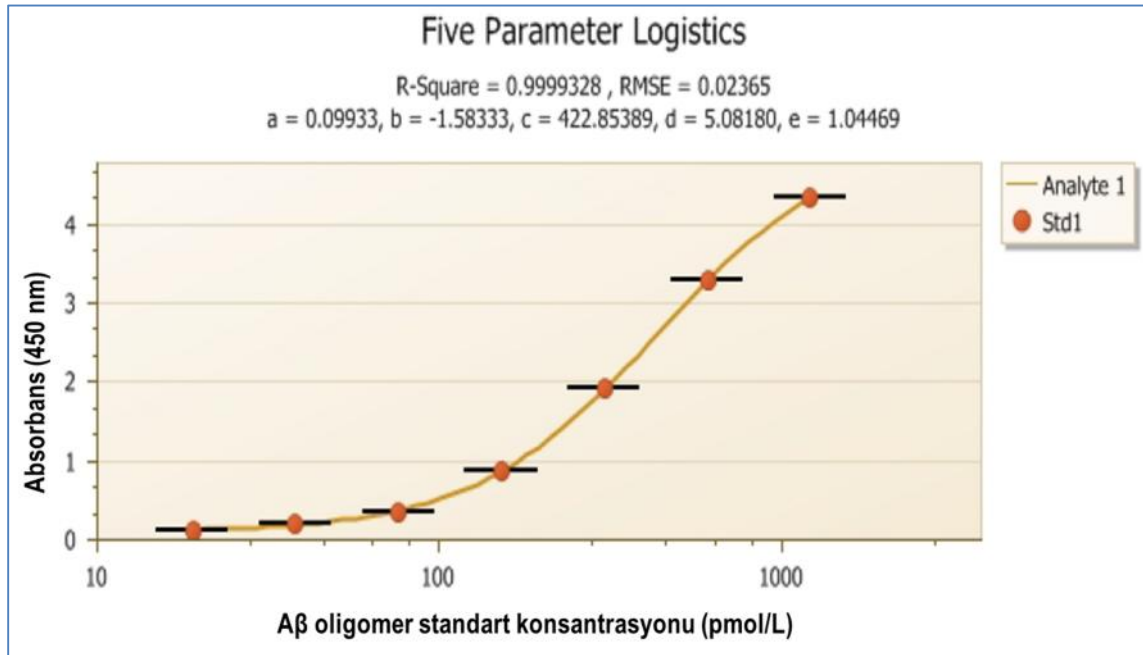
- Ölçümden yaklaşık 30 dk öncesinde tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve hafifçe karıştırıldı.
- Standart dilüsyon tamponu için 2.31 g sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , ultrapure grade), 500 mL deionize su içinde çözülüp 2 N sodyum hidroksit ile pH=9'a getirildi. Bu solüsyon 0.2 μm 'lik filtreden geçirildi. Hazırlanan standart dilüsyon tamponu ile liyofilize standart hafifçe karıştırılarak çözüldü. Konsantrasyonu 1 $\mu\text{g/mL}$ olan stok solüsyondan 0.1 mL alınarak 0.9 mL standart dilüsyon tamponu ile karıştırıldı (100,000 pg/mL). Bu çözeltiden 0.1 mL alınıp 0.9 mL standart dilüsyon tamponu ile karıştırıldı (10,000 pg/mL). Sonrasında çözeltiden 0.1 mL alınarak 0.9 mL standart dilüsyon tamponu ile karıştırılıp 1000 pg/mL 'lik standart elde edildi. Bu çözeltiden de 0.2 mL alınıp 1.8 mL standart dilüsyon tamponu ile karıştırıldı (100 pg/mL). Sonraki altı tüp için standart dilüsyon tamponu ile seri dilüsyonlar hazırlandı (50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 1.56 pg/mL). Sadece standart dilüsyon tamponu içeren tüp 0 pg/mL 'lik standart olarak kabul edildi.
- Uygun dilüsyon\konsantrasyon oranlarında örnekler ve hazırladığımız standartlar plak kuyucuklarına 50 μL olarak konuldu.
- Her bir kuyucuğa 50 μL deteksiyon antikoru hızlıca eklenip oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi.
- Yıkama talimatlarına uygun şekilde plak'ın dört kez yıkanması sağlandı.
- Kuyucuklara 100 μL anti-tavşan Ab-HRP solüsyonu hızlıca eklenip ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
- Plak, yıkama talimatlarına uygun şekilde yine dört kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 μL stabilize kromojen eklenip ve kuyucuklardaki rengin maviye döndüğü görüldü. Plak, karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- Kuyucuklara 100 μL stop solüsyonu eklendi ve plak tabanı hafifçe vurularak kuyucuklar içindeki sıvının karışması sağlandı. Bu sırada solüsyonun renginin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi. 30 dk içinde plak okuyucu ile 450 nm'de plak okutuldu.
- Örnek ve standart serilerine ait ortalama absorbans değerinden kör (0 ng/mL) absorbans değeri çıkarılarak net absorbans değeri elde edildi. Her bir standarta ait

bilinen konsantrasyona karşılık gelen net absorbans değeri x ve y ekseninde çizdirildi. Böylece çizilen standart eğri grafiği ile örneklere ait konsantrasyonlar saptandı.

3.3.3. A β Oligomer Analizi

Ölçüm Yöntemi ve Test Prensipleri: A β Oligomer analizi IBL Human ELISA kiti ile yapıldı. Önce U-plak kullanılarak işaretli antikorların (HRP konjuge anti-human A β (N) fare monoklonal antikorları) standartlar ve örnekler ile primer reaksiyonu için inkübasyonu sağlandı. Sonrasında bu inkübe edilmiş karışım anti-human A β (N) fare monoklonal antikorları ile kaplı plak'a eklenip sekonder reaksiyon gerçekleştirilmek üzere tekrar inkübe edildi. Yıkama işlemi sonrası renklendirici olarak TMB eklendi. Karanlıkta inkübasyonun ardından reaksiyon asidik solüsyon ile sonlandırıldı ve oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 450 nm'de okundu. İnsan A β (1-16) dimer standardının yedi farklı dilüsyonuyla elde edilen standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak standart eğrisi çizildi (Grafik 3). Örneklerin konsantrasyonu bu standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Bu kit insan A β (1-16) dimer'e spesifiktir ve duyarlılığı 4.41 pmol/L'dir.

Ölçüm aralığı: 18.98-1215 pmol/L



Grafik 3. A β Oligomer standart eğrisi.

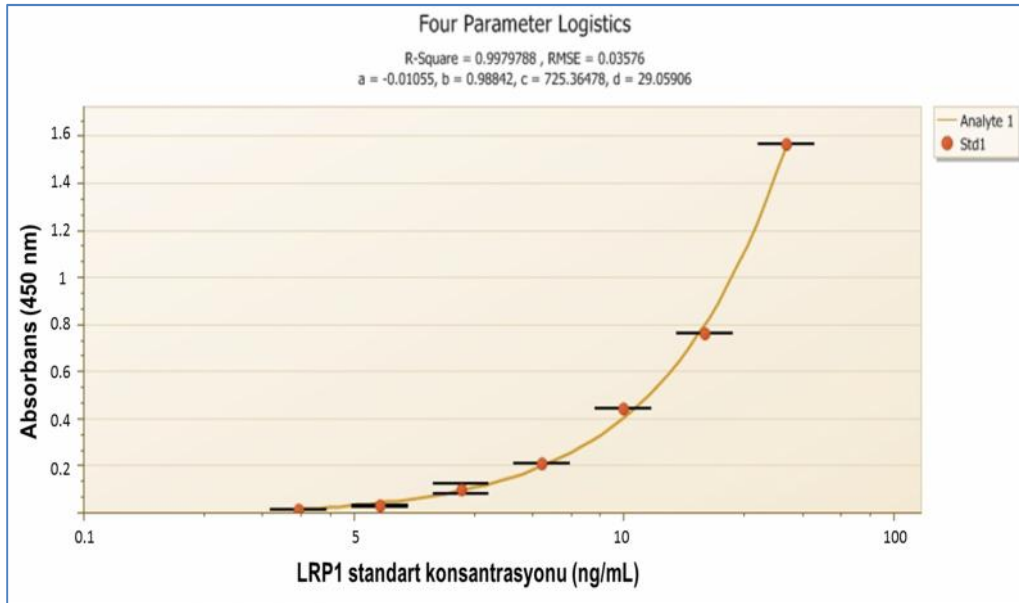
Analiz Aşamaları:

- Ölçümden yaklaşık 30 dk öncesinde tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve hafifçe karıştırıldı.
- Liyofilize standart ve 0.5 mL deiyonize su hafifçe karıştırılıp çözülerek 2430 pmol/L'lik stok solüsyon hazırlandı.
- Standart dilüsyonu için şekil 22'de görüldüğü gibi U-plak kullanıldı. A1-H1 ve A2-H2 kuyucuklarına 100 μ L EIA tamponu konuldu. Sonrasında A1 ve A2 kuyucuklarına stok standart solüsyonundan (2430 pmol/L) 100 μ L eklenir ve böylece 1215 pmol/L'lik standart elde edildi. Takibinde A1 ve A2 kuyucuklarındaki karışımdan 100 μ L alınarak B1 ve B2 kuyucuklarına aktarıldı. Bu şekilde G1 ve G2 kuyucuğuna kadar seri dilüsyon yapıldı (1215, 607.5, 303.75, 151.88, 75.94, 37.97, 18.98 pmol/L). Son olarak G1 ve G2 kuyucuğundan 100 μ L sıvı dışarı atıldı. Böylece H1 ve H2 kuyucuğu 0 pmol/L'lik standart ve örnek körü olarak kullanıldı.
- Reaktif körü olarak belirlenen kuyucuklara 120 μ L EIA tamponu eklendikten sonra örnekler için kullanılacak olan kuyucuklar belirlenip bu kuyucuklara da 100 μ L örnek konuldu.
- Örnek, örnek körü ve standartların bulunduğu kuyucuklara 20 μ L işaretli antikor solüsyonu eklendiğinde kuyucuklardaki rengin maviye dönüşümü gözlemlendi. Primer reaksiyonun gerçekleşmesi için U-plak 4 °C'de 60 dk inkübe edildi.
- İnkübasyonu takiben U-plak'daki her bir kuyucuktan 100 μ L solüsyon alınarak antikor kaplı plak'daki kuyucuklara konuldu. Böylece antikor kaplı plak sekonder reaksiyonun gerçekleşmesi için 4 °C'de 60 dk tekrar inkübe edildi.
- Yıkama talimatlarına uygun şekilde plak yıkayıcı ile plak'ın yedi kez yıkanması sağlandı.
- Her bir kuyucuğa 100 μ L kromojen konularak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildiğinde kuyucuklardaki rengin maviye döndüğü görüldü.
- Kuyucuklara 100 μ L stop solüsyonu koyulup plak'a hafifçe vurularak kuyucuklardaki sıvının karışması sağlandıktan sonra ise kuyucuklardaki rengin sarıya dönüştüğü gözlemlendi. Plak'ın tabanında herhangi bir kirlilik veya su damlacığının kalmamasına ve sıvı yüzeyinde hava kabarcığının olmamasına dikkat edilerek 30 dk içinde plak okuyucu ile 450 nm'de plak okutuldu.

3.3.4. sLRP-1 Analizi

Ölçüm Yöntemi ve Test Prensipleri: Analiz için “Cusabio Human Low-density lipoprotein-receptor-related protein 1 (LRP-1) ELISA kit”i kullanılarak serum örneklerindeki sLRP-1 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. İnsan sLRP-1’ine spesifik antikorla kaplı plak’daki kuyucuklara standartlar ve örnekler eklenip inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı dışarı alındıktan sonra biyotinlenmiş sLRP-1 spesifik antikorla tekrar inkübe edilen plak yıkama işleminden geçirildi. Avidinlenmiş HRP eklenerek inkübe edilen plak’a bağlanamayan moleküller yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa TMB substrat solüsyonu eklendikten sonra sadece sLRP-1, biyotinle konjuge antikor ve enzimle konjuge avidin içeren kuyucuklarda renk değişimi gözlemlendi. Otuz dakikalık karanlıkta gerçekleştirilen inkübasyon süresinin bitiminde sülfirik asit eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonlandırıldı ve oluşan renk değişikliği 450 nm’de okutuldu. Standart sLRP-1 standardının yedi farklı diüsyonu ile elde edilen standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleriyle standart eğrisi çizildi (Grafik 4). Örnekler ait konsantrasyonlar bu standart eğri kullanılarak hesaplandı. Bu kit insan sLRP-1’i için spesifiktir ve minimum saptama dozu <1.56 ng/mL’dir.

Ölçüm aralığı: 6.25-40 ng/mL



Grafik 4. sLRP-1 standart eğrisi.

Analiz Aşamaları:

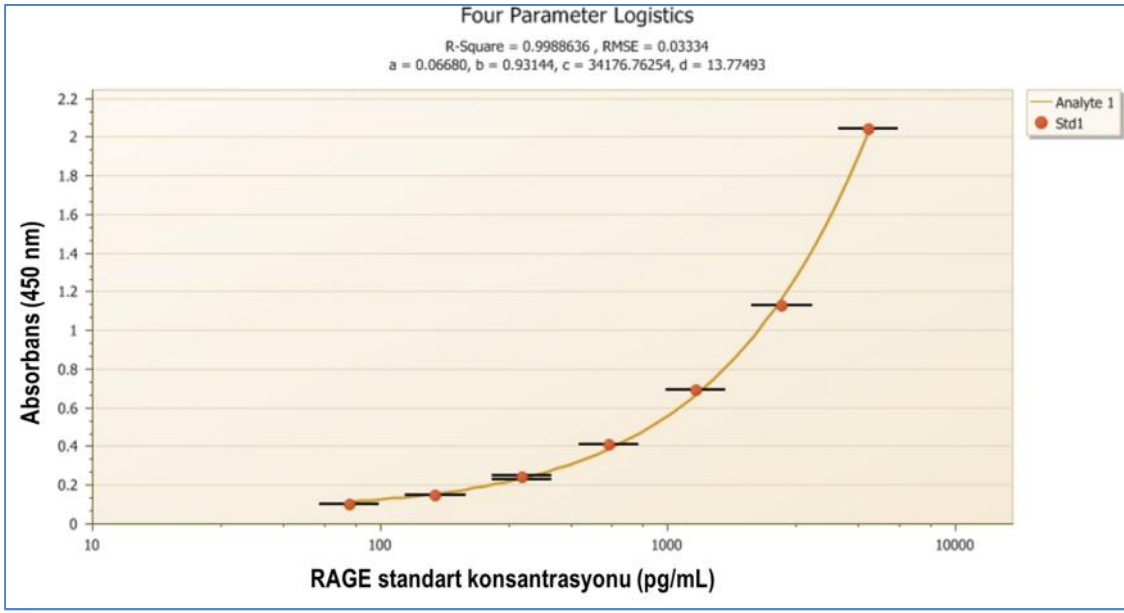
- Ölçümden yaklaşık 30 dk öncesinde tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- Standart vialı 6000-10000 rpm’de 30 sn santrifüj edilip 1 mL sample dilüenti ilave edilerek standart çözöldü. Elde edilen 400 ng/mL’lik bu stok solüsyonu seri dilüsyon öncesinde en az 15 dk yumuşak bir şekilde çalkalandı. Sample dilüenti kullanılarak seri dilüsyon ile yedi tüp içinde standartlar (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.625 ng/mL) hazırlandı. Sadece sample dilüenti olan 8.tüp, 0 ng/mL standart olarak kabul edildi.
- Önceden belirlenen şemaya uygun şekilde her bir kuyucuğa standart ve örnekler 100 µL eklenip plak 37 °C’de 2 saat inkübe edildi.
- Sonrasında kuyucuklardaki sıvı dışarı alınıp kuyucuklara 100 µL biotin-Ab solüsyonu eklendi. Plak 37 °C’de bir saat tekrar inkübe edildi.
- Kuyucuklardaki sıvı aspire edilip ve yıkama talimatlarına uygun şekilde üç kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µL HRP-avidin solüsyonu eklenip 37 °C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.
- Yıkama talimatlarına uyularak benzer şekilde aspirasyon ve yıkama işlemi beş kez yapıldı.
- Kuyucuklara 90 µL TMB-substrat ilave edildikten sonra plak karanlıkta olacak şekilde 37 °C’de 10-30 dk son defa inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenince renk değişimi gözlemlendi. Renk değişiminin uniform olması için plak’a çok yumuşak bir şekilde vurularak karışması sağlandı. Reaksiyon stoplandıktan sonra 30 dk içinde 450 nm’de plak okutuldu.

3.3.5. sRAGE Analizi

Ölçüm Yöntemi ve Test Prensipli: Analiz R&D Quantikine Human RAGE Immunoassay kiti ile gerçekleştirildi. Bu kitte kantitatif sandviç enzim immün ölçüm tekniği kullanılmaktadır. Yüzeyi sRAGE (ekstraselüler parça) için spesifik fare monoklonal antikor ile kaplanmış plak kuyucuklarına standart ve örnekler eklendi. Oda sıcaklığında inkübasyonun ardından plak yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklara sRAGE için spesifik enzim bağlı poliklonal antikor eklendi. İnkübasyonu takiben kuyucuklar tekrar yıkanıp ve kuyucuklara substrat solüsyonu konarak karanlıkta inkübe edildi. sRAGE miktarı ile orantılı olarak renk

değişimi gerçekleşti. Sonlandırma solüsyonu ile reaksiyon stoplandıktan sonra oluşan rengin yoğunluğu 450 nm’de ölçüldü. İnsan sRAGE standardının yedi farklı dilüsyonu yapılarak elde edilen standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak standart eğrisi çizildi (Grafik 5). Örneklerin konsantrasyonu bu standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Bu kit insan sRAGE’si için spesifiktir ve minimum saptanabilir doz ortalaması 4.12 pg/mL’dir.

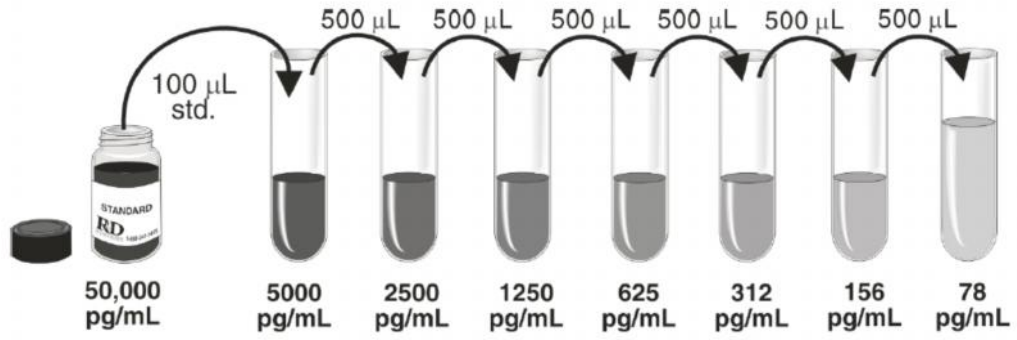
Ölçüm aralığı: 78-5000 pg/mL



Grafik 5. sRAGE standart eğrisi.

Analiz Aşamaları:

- Ölçümden yaklaşık 30 dk öncesinde tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- Liyofilize standart, 1 mL deiyonize veya distile su ile çözülerek 50,000 pg/mL stok solüsyonu hazırlandı. 15 dk hafifçe çalkalanarak karıştırılma işlemi sonrası 100µL stok solüsyonu ve 900 µL kalibratör dilüenti RD6-10 konularak 5000 pg/mL’lik standart elde edildi. 5000pg/mL’lik standarttan seri dilüsyonlar ile altı ayrı tüp içinde 2500, 1250, 625, 312, 156, 78 pg/mL’lik standartlar oluşturuldu (Şekil 21). Sadece kalibratör dilüenti içeren 8. tüp 0 pg/mL’lik standart olarak kabul edildi.



Şekil 21. sRAGE standartının seri dilüsyonu.

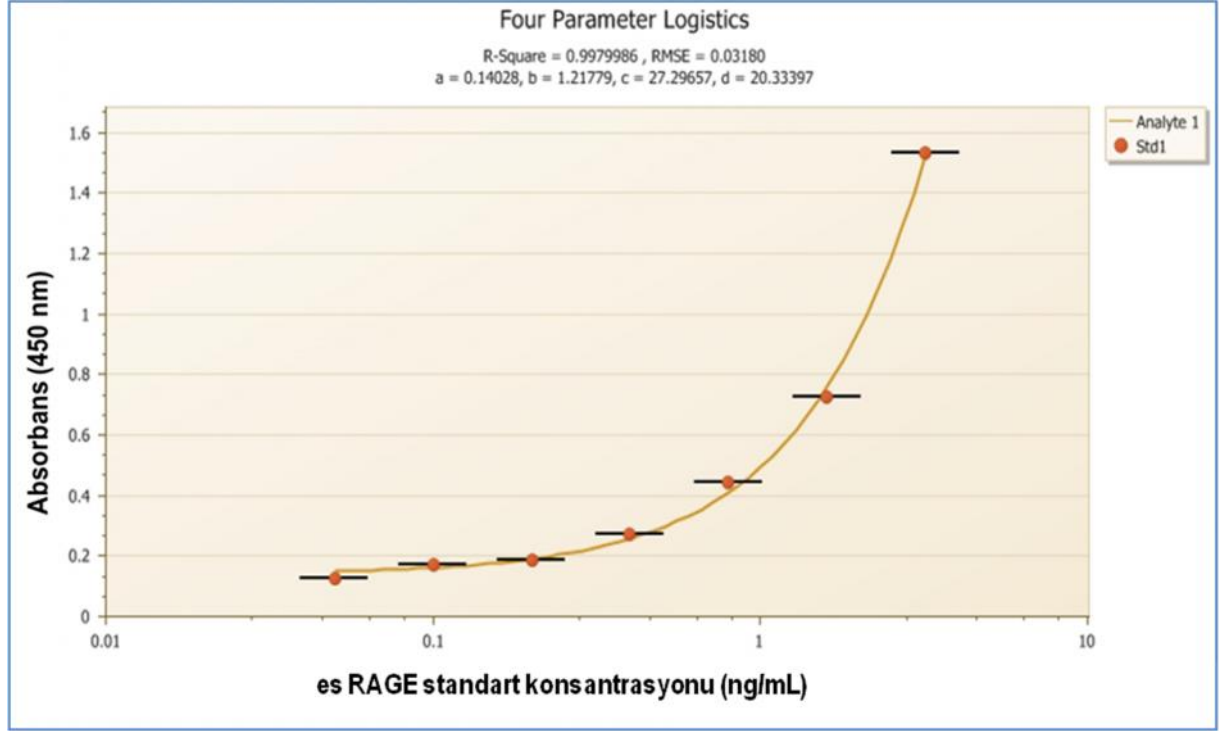
- Folyosundan çıkarılan plak kuyucuklarına assay dilüenti RD1-60 100 µL eklendi.
- Daha önce belirlediğimiz şemaya uygun şekilde standartlar (0, 78, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 pg/mL) ve örnekler kuyucuklara 50 µL olarak konuldu.
- Plak oda sıcaklığında iki saat inkübe edildi.
- Her bir kuyucuktaki reaksiyon karışımı aspire edilip kuyucuklar 400 µL wash tampon ile 4 kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 200 µL konjugat konarak oda sıcaklığında iki saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası yıkama talimatlarına göre yıkama ve aspirasyon işlemi dört kez yapıldı.
- Her bir kuyucuğa 200 µL substrat solüsyonu eklenip, plak ışıktan korunarak oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
- 50 µL stop solüsyonu eklenip kuyucuklardaki mavi rengin sarıya değiştiği görüldü. Renk değişiminin uniform olması için plak'a hafifçe vurularak karışması sağlandı.
- Reaksiyon stoplandıktan sonra 30 dk içinde 450 nm'de plak okutuldu.

3.3.6. esRAGE Analizi

Ölçüm Yöntemi ve Test Prensipleri: Analiz B-Bridge esRAGE ELISA kiti kullanılarak ELISA ölçüm yöntemiyle gerçekleştirildi. Standart ve örnekler, anti-RAGE ile kaplı plak üzerine saptama antikoru (HRP konjuge esRAGE antikoru) da eklenerek 4-10 °C'de 16-24 saat inkübe edildi. Yıkama işlemi sonrası her kuyucuğa substrat (TMB-H₂O₂) ilave edildiğinde sarı renk değişimi görüldü. Plak karanlıkta olacak şekilde oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra enzimatik reaksiyon, sonlandırma solüsyonu ile durdurularak plak

okuyucuda 450 nm’de okutuldu. İnsan esRAGE standardının yedi farklı dilüsyonuyla oluşturulan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanılarak standart eğrisi çizildi (Grafik 6). Oluşturulan bu standart eğri kullanılarak örnekler ait konsantrasyonlar hesaplandı.

Ölçüm aralığı: 0.05-3.2 ng/mL



Grafik 6. esRAGE standart eğrisi.

Analiz Aşamaları:

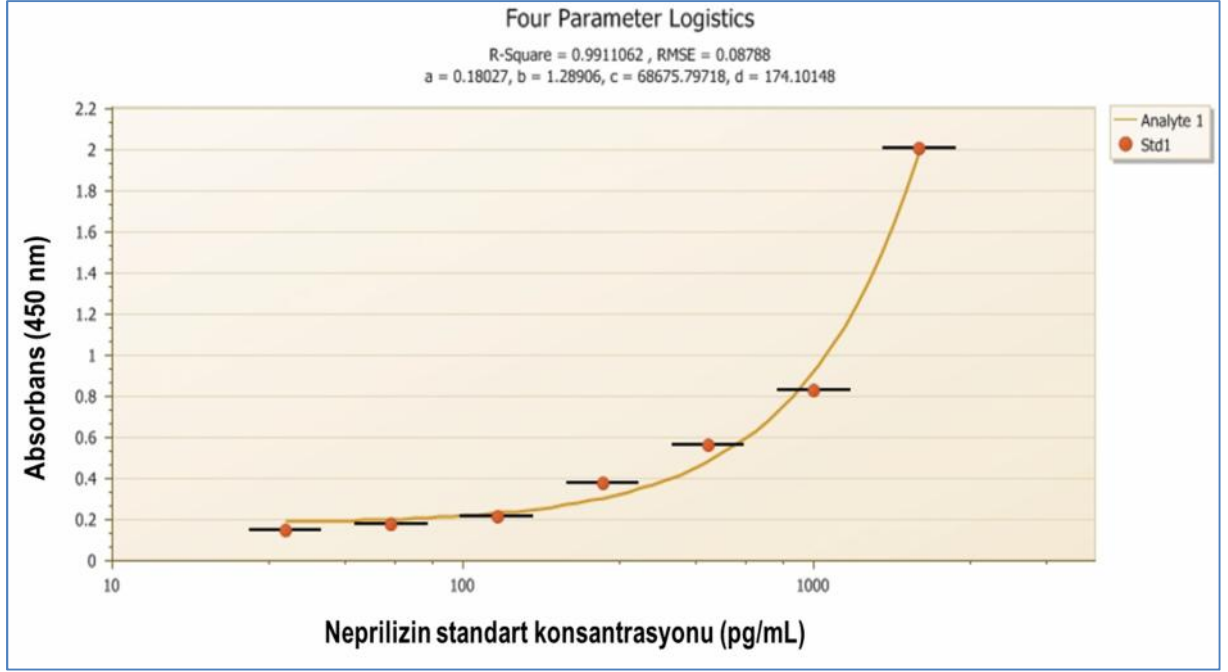
- Ölçümden yaklaşık 30 dk öncesinde tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- Liyofilize standart 0.5 mL distile su ile çözülerek 3.2 ng/mL’lik standart hazırlandı. 15 dk hafifçe çalkalanarak karıştırılan bu dilüe edilmemiş 1.tüpteki standarttan, tampon kullanılarak seri dilüsyon ile farklı altı tüp içine standartlar (1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 ve 0.05 ng/mL) oluşturuldu. Sadece tampon içeren 8. tüp 0 ng/mL’lik standart olarak kabul edildi.
- Folyosundan çıkarılan plak kuyucuklarına esRAGE Ab-HRP 100 µL eklendi.

- Önceden karar verdiğimiz şemaya uygun şekilde standartlar (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 ng/mL) ve örneklerden 20 µL kuyucuklara eklenip pipetle karıştırıldı.
- Plak sarsılmadan 4-10 °C’de 16-24 saat inkübe edildi.
- Her bir kuyucuktaki reaksiyon karışımı aspire edilip kuyucuklar 350 µL wash solüsyonu dört kez yıkandı.
- Kuyucuklara 100 µL substrat koyulup plak’ın direkt ışığa maruz kalması engellenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
- 100 µL sonlandırma solüsyonu her bir kuyucuğa ilave edilip reaksiyon durdurulduktan sonra plak 30 dk içinde 450 nm’de okutuldu.

3.3.7. Neprilizin Analizi

Ölçüm Yöntemi ve Test Prensipleri: Analiz için “USCN Life Science Human Neprilysin, Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen, CALLA\CD10 ELISA kit”i kullanılarak örneklerdeki neprilizin düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. İnsan CALLA (neprilizin) spesifik antikor ile kaplı plak’daki kuyucuklara standartlar ve örnekler eklenerek inkübe edildi. Kuyucuklardaki sıvı dışarı alındıktan sonra biyotinlenmiş poliklonal antikorla tekrar inkübe edilen plak yıkandı. Avidinlenmiş HRP eklenen plak inkübe edilip tekrar yıkandı. Her bir kuyucuğa TMB substrat solüsyonu eklendikten sonra CALLA (neprilizin), biyotinle konjuge antikor ve enzimle konjuge avidin içeren kuyucuklarda renk değişimi gözlemlendi. Karanlıkta inkübasyon süresinin bitiminde kuyucuklara sülfirik asit eklenip enzim-substrat reaksiyonu sonlandırıldı ve oluşan renk değişikliği 450 nm’de okutuldu. CALLA (neprilizin) standardının yedi değişik dilüsyonu ile oluşturulan standart konsantrasyonlarına karşı absorban değerleriyle standart eğrisi çizildi (Grafik 7). Örneklerin konsantrasyonları bu standart eğri kullanılarak hesaplandı. Bu kit insan CALLA (neprilizin) için spesifiktir ve minimum saptama dozu 7.8 pg/mL’dir.

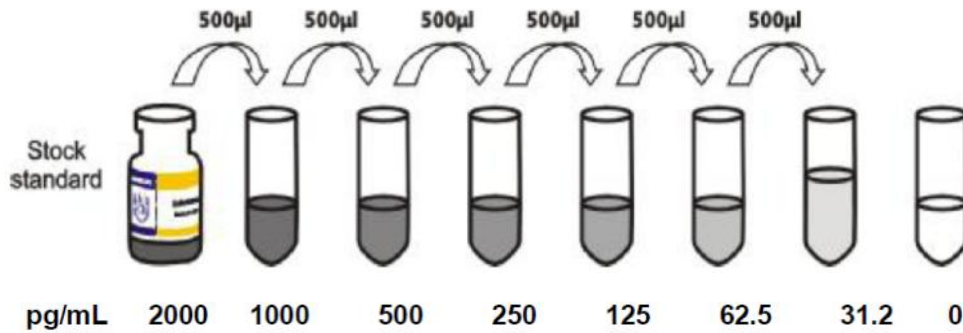
Ölçüm aralığı: 31.2-2000 pg/mL



Grafik 7. Neprilizin standart eğrisi.

Analiz Aşamaları:

- Ölçümden yaklaşık 30 dk öncesinde tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.
- Liyofilize standart 1 mL sample dilüenti ile çözülerek 2000 pg/mL’lik standart hazırlandı. Elde edilen bu standart, seri dilüsyon öncesinde en az 15 dk yumuşak bir şekilde çalkalandı. Sample dilüenti kullanılarak seri dilüsyon ile farklı altı tüp içinde standartlar (1000, 500, 250, 125, 62.5, ve 31.2 pg/mL) hazırlandı (Şekil 22). İçinde sadece sample dilüenti olan 8.tüp, 0 pg/mL standart olarak kabul edildi.

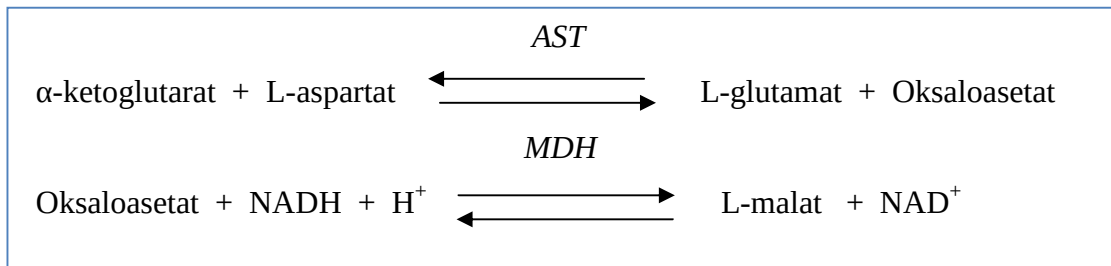


Şekil 22. Neprilizin standartının seri dilüsyonu.

- Önceden belirlenen şemaya uygun olarak kuyucuklara standart ve örnekler 100 µL eklenip 37 °C’de iki saat inkübe edildi.
- Sonrasında kuyucuklardaki sıvı dışarı alınıp her bir kuyucuğa 100 µL detection reaktif A solüsyonu eklenen plak, 37 °C’de bir saat tekrar inkübe edildi.
- Kuyucuklardaki sıvı aspire edilip, plak yıkama talimatlarına uyularak üç kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µL detection reaktif B eklenip 37 °C’de bir saat inkübe edildi.
- Yıkama talimatlarına uyularak benzer şekilde aspirasyon ve yıkama işlemi üç kez yapıldı.
- Kuyucuklara 90 µL TMB-substrat ilavesinden sonra plak karanlıkta olacak şekilde 37 °C’de 30 dk inkübe edildi.
- Her bir kuyucuğa 50 µL sonlandırma solüsyonu eklenince oluşan renk değişiminin uniform olması için plak’a çok yumuşak bir şekilde vurularak karışması sağlandı.
- Reaksiyon durdurulduktan sonra 30 dk içinde 450 nm’de plak okutuldu.

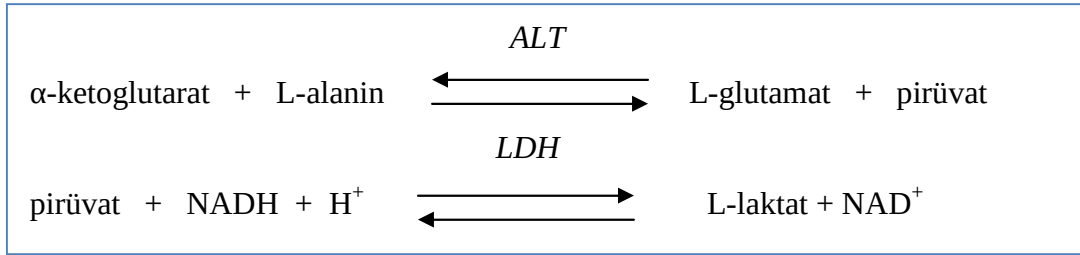
3.3.8. AST Ölçüm Yöntemi

Aspartat aminotransferaz (AST, EC 2.6.1.1), Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizörü ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. Örnekte bulunan AST, amino grubunun, oksaloasetat ve L-glutamat oluşturmak üzere L-aspartattan α -ketoglutarata transferini katalizler. NADH ve malat dehidrogenaz varlığında oksaloasetat L-malata indirgenir. Bu reaksiyonda NADH, NAD’e okside olur. Reaksiyon, NADH’ın 340 nm’de fotometrik olarak belirlenen absorbans düşüş hızının ölçümü ile izlenir.



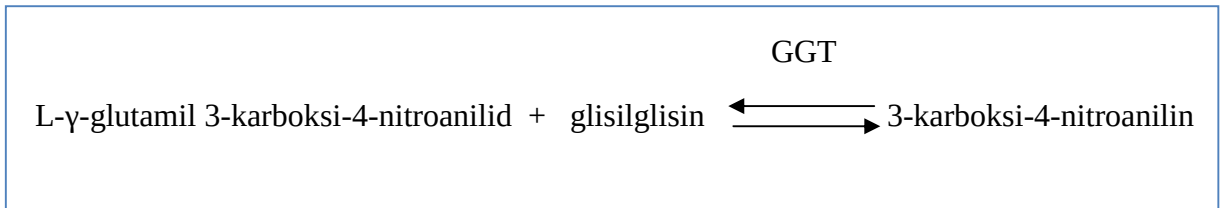
3.3.9. ALT Ölçüm Yöntemi

Alanin aminotransferaz (ALT, EC 2.6.1.2), Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizörü ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. Örnekteki ALT, amino grubunun, pirüvat ve L-glutamat oluşturmak üzere L-alaninden α -ketoglutarata transferini katalizler. NADH ve laktat dehidrogenaz varlığında pirüvat L-laktata indirgenir. Bu reaksiyonda NADH, NAD'e okside olur. Reaksiyon, NADH'nin 340 nm'de fotometrik olarak belirlenen absorbans düşüş hızının ölçümü ile izlenir.



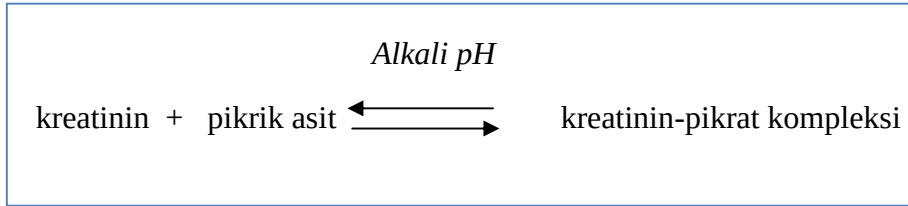
3.3.10. GGT Ölçüm Yöntemi

Gama glutamil transferaz (GGT, EC 2.3.2.2), Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizörü ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. Örnekteki GGT, gamaglutamil grubunun, verici substrattan glisilglisine transferini katalizler. 412 nm'deki absorbans artışı örnekteki GGT seviyesi ile doğru orantılıdır.



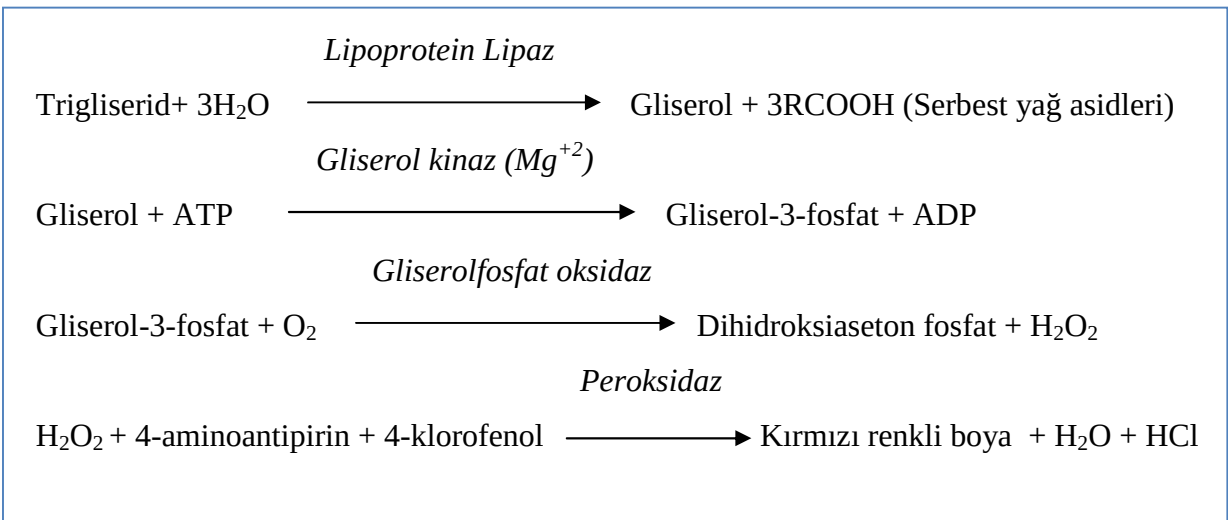
3.3.11. Kreatinin Ölçüm Yöntemi

Kreatinin, Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizörü ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. Örnekteki kreatinin, alkali pH'da, pikrik asit ile reaksiyona girerek kreatinin-pikrat kompleksi oluşturmaktadır (Jaffe reaksiyonu). Oluşan renkli kompleksin, 500 nm'de verdiği absorbansdaki artış kreatinin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.



3.3.12. Trigliserid Ölçüm Yöntemi

Trigliserid Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizörü ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. Trigliseridler enzimatik olarak lipaz tarafından yağ asitlerine ve gliserole hidrolize edilirler. Gliserol, gliserol kinazlı ATP tarafından gliserol-3-fosfat ve ADP oluşturmak için fosforile olur. Gliserol-3-fosfat, gliserol fosfat oksidaz ile dihidroksiaseton fosfata oksidize edilmekte ve hidrojen peroksit (H_2O_2) üretilmektedir. Peroksidaz ile katalize edilen bir renkli reaksiyonda, H_2O_2 kırmızı renkli bir boya oluşturmak için 4-aminoantipirin ve 4-klorofenol ile reaksiyona girmektedir. Bu renkli boyanın 500 nm'de okunan absorbansı örnekteki trigliserid konsantrasyonu ile orantılıdır.

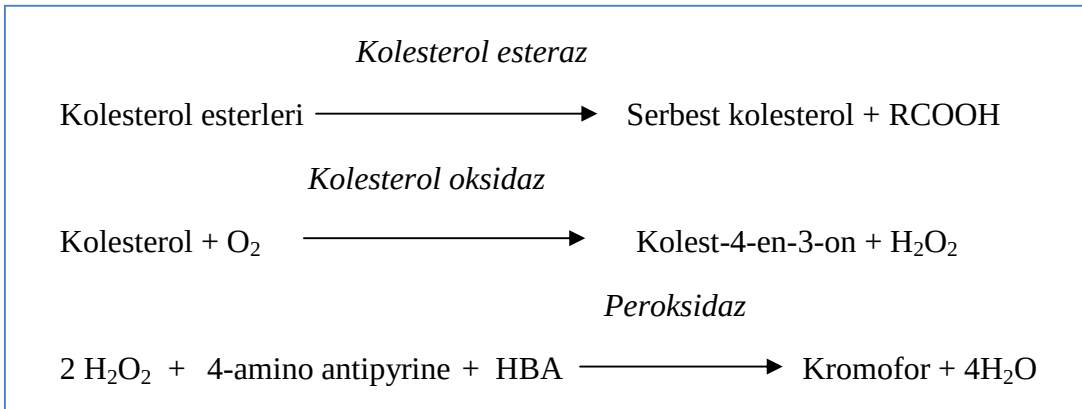


3.3.13. HDL Kolesterol Ölçüm Yöntemi

HDL kolesterol Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizörü ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. "Accelerator selective detergent" yöntemi ile ölçüm yapılır. Yöntem, HDL'den kaynaklanmayan esterleşmemiş kolesterol ile kolesteroloksidaz reaksiyonunun hızlandırılması ve özel deterjan kullanarak HDL kolesterolün spesifik olarak çözünmesi esasına dayanmaktadır. Analiz öncesi herhangi bir ön işlem veya santrifüjasyon basamağı olmaksızın iki aşamalı bir analiz yöntemi kullanılmaktadır. Birinci basamakta kolesterol oksidaz enziminin etkisi ile HDL dışındaki esterifiye kolesterolden açığa çıkan hidrojen peroksit, peroksidaz enzimi ve N,N,bis (4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium (DSBmT) ile reaksiyona girerek renksiz bir ürün oluşturmaktadır. İkinci basamakta ise HDL kaynaklı kolesterol bir deterjan yardımı ile lipoproteinden ayrılarak, kolesterol esteraz ile reaksiyona girmektedir. Oluşan serbest kolesterol 4-aminoantipyrine ile renkli ürün meydana getirmektedir. Bu renkli ürün 604 nm'de okunabilmektedir.

3.3.14. Total Kolesterol Ölçüm Yöntemi

Total kolesterol Architect C16000 (Abbott Diag., USA) otoanalizörü ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm için enzimatik kolorimetrik yöntem kullanıldı. Kolesterol esterler, kolesterol esteraz ile enzimatik olarak kolesterol ve serbest yağ asitlerine hidroliz olmaktadır. Serbest kolesterol daha sonra kolesterol oksidaz ile Kolest-4-en-3-on ve hidrojen peroksit okside olmaktadır. Son olarak hidrojen peroksit, hidroksibenzoik asit (HBA) ve 4-aminoantipirin ile reaksiyona girerek 500 nm'de okunan kromoforu (quinoneimine dye) oluşturmaktadır.



3.3.15. LDL Kolesterol Hesaplanması

LDL Kolesterol düzeyleri 'Friedewald Formülü' kullanılarak hesaplandı.

$$\text{LDL Kolesterol} = \text{Total Kolesterol} - (\text{HDL Kolesterol} + \text{Trigliserid} / 5)$$

3.3.16. Eritrosit ve Trombosit Ölçüm Yöntemi

Eritrositler ve trombositler Beckman Coulter LH780 (Coulter Corp, USA) otoanalizöründe empedans yöntemi ile ölçüldü. Bu yöntemde yalıtkan olan kan, iletken bir sıvıda seyreltilerek vakum yardımı ile bir aralıktan geçirilir. Kan hücreleri bu aralıktan geçerken doğru akım uygulanmış elektrodlar arasında oluşturdukları dirençten dolayı voltaj değişikliklerine neden olur. Oluşan elektriksel sinyallerin sayısı partikül sayısını gösterirken elektrik sinyallerinin büyüklükleri hücrelerin hacimleri ile orantılıdır. Yazılım programı kullanılarak hücrelerin hacimleri x- eksenine, sayıları y- eksenine gelecek şekilde histogramlar oluşturulur. Histogramların incelenmesi hücre sub-populasyonlarının saptanmasını sağlamaktadır.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, "SPSS for Windows 15.0" programı kullanıldı. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için öncelikle ortalama değer ve standart sapmaları hesaplandı. Değerlerin normal dağılıma uygunluğu Levene testi ile değerlendirildi. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında değişkenin durumuna göre parametrik independent samples t testi veya ki-kare testi kullanıldı. Birden fazla grubun karşılaştırılmasında ise nonparametrik Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis analizi ile anlamlı farklılık görülen parametreler için ikili grup analizi, Mann Whitney U testiyle yapıldı. Korelasyon analizlerinde Spearman korelasyon testi kullanıldı. Korelasyon katsayısı (r değeri), 0,00-0,24 arasında ise zayıf; 0,25-0,49 arasında ise orta; 0,50-0,74 arasında ise güçlü ve 0,75-1,00 arasında ise çok güçlü olarak kabul edildi. Çalışılan parametreler için tanısal spesifite ve tanısal sensitivite değerleri hesaplandıktan sonra bu parametrelere ilişkin kesim (cut-off) değerlerinin saptanmasında ROC eğrisi kullanıldı. Tüm testlerde $p < 0,05$ anlamlı bir farklılık olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. TANIMLAYICI BULGULAR

4.1.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubu, AH tanısı alan 50 hastadan, kontrol grubu ise 50 sağlıklı yaşlı bireyden oluşturuldu (Tablo 6) . AH ve kontrol grubunda yaş ortalaması 79 olarak hesaplandı. Yaş parametresi her iki grupta 65-74, 75-84 ve ≥ 85 olarak üç yaş aralığına ayrıldığında her bir yaş aralığı için iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Cinsiyet açısından iki grup arasında farklılık yoktu fakat hem AH hem de kontrol grubunda kadınların sayısı erkeklerden daha fazlaydı. Yaş ve cinsiyete ek olarak eğitim düzeylerinin de, iki grup için benzer olduğu belirlendi. Yeni tanı alan üç hasta göz ardı edildiğinde AH grubunda hastalık süresi ortalama 4.5 yıl (minimum: 1 yıl ve maksimum: 10 yıl) idi. AH dışındaki hastalıklar açısından karşılaştırma yapılırken, hastaya bakım veren kişilerden sağlıklı bilgi alınamaması nedeniyle AH grubundaki iki hasta göz ardı edildi. Hipertansiyon, Tip2 diabetes mellitus (DM) ve geçirilmiş koroner arter hastalığı (KAH) açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmadı. Hiperlipidemik hastaların sayısı AH grubunda daha fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Statin ve asetilsalisilik asit kullananların sayısı AH grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti ancak bu yükseklik sadece asetilsalisilik asit için anlamlı düzeydeydi ($p < 0,001$). Alzheimer hastaları AchE inhibitör kullanımına göre üç gruba ayrıldığında, donepezil ve rivastigmin'in galantamine göre daha fazla kullanıldığı görüldü ($p = 0,004$). Bu karşılaştırmalar yapılırken yeni tanı almış olan üç hasta, ilaç tedavisinin ilk kez başlanması nedeniyle göz ardı edildi. AH ve kontrol grupları, antihipertansif ve oral antidiyabetik kullanımı açısından karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 6. AH ve kontrol gruplarının demografik özellikler ve öykü açısından karşılaştırılması.

	AH grubu	Kontrol grubu
Sayı (%)	50 (%50)	50 (%50)
Yaş (Ort±SD)	79±6,9	79±6,4
Yaş aralıkları, n (%)		
65-74	11 (28)	17 (34)
75-84	27 (54)	21 (42)
≥85	12 (24)	12 (24)
Cinsiyet, K/E (% K)	40/10 (80)	40/10 (80)
Eğitim, n (%)		
Eğitim almamış	21 (42)	18 (36)
5-11 yıl	24 (48)	25 (50)
≥13 yıl	5 (10)	7 (14)
MMSE skoru (Ort±SD)	16±6,5	27±2,4*
Hastalık süresi (yıl) (Ort±SD)	4,5±3,5	-
Diğer hastalıklar, n†		
Hipertansiyon	26 (54)	27 (54)
Hiperlipidemi	13 (27)	7 (14)
Tip 2 DM	9 (19)	9 (18)
Geçirilmiş KAH	7 (15)	4 (8)
Benign prostat hiperplazisi	-	1 (2)
Kolesistektomi	-	2 (4)
İlaç kullanımı, n‡		
Antihipertansif	26 (54)	26 (52)
Statin	13 (27)	7 (14)
Oral antidiyabetik	9 (19)	9 (18)
AchE inhibitörü		
Donepezil	21 (45)[§]	-
Rivastigmin	19 (40)[§]	-
Galantamin	7 (15)	-
Memantin	31 (66)	-
Asetilsalisilik asit	21 (44)	4 (8)*
Ketiapin	19 (40)	-
Gingko biloba	5 (11)	-
α-blokörü	-	1 (2)

* p< 0,001; §p= 0,004

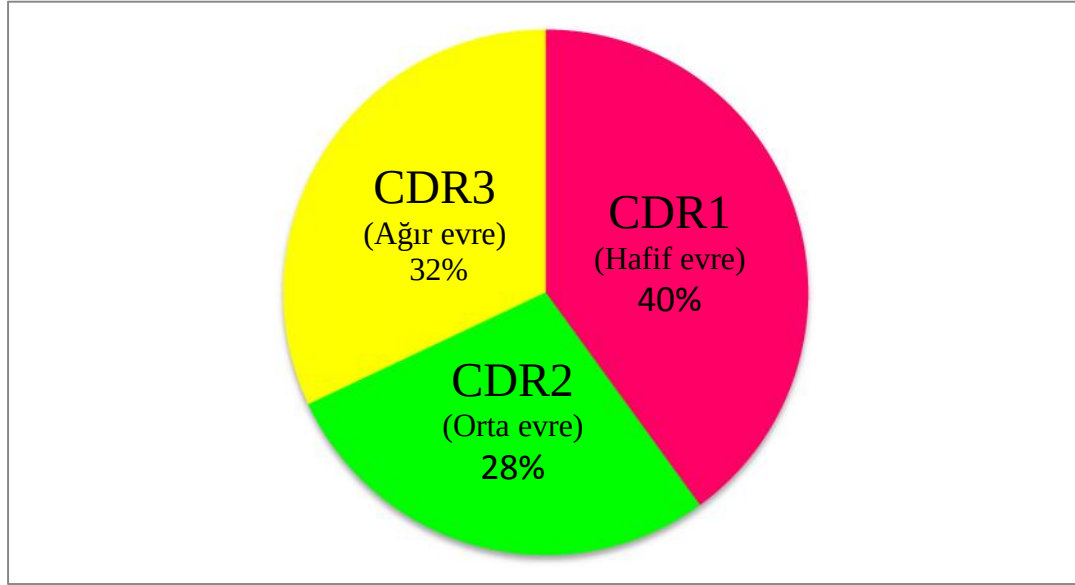
†AH grubunda: 48 kişi kullanılarak hesaplandı.

‡Ach inhibitörleri, memantin, ketiapin ve gingko biloba için AH grubunda: 47 kişi kullanılarak hesaplandı.

4.1.2. Klinik evreleme

Çalışmaya aldığımız 50 Alzheimer hastasının, CDR evrelemesine göre dağılımları Şekil 23'te görülmektedir.

AH grubundaki hastaların 20'si CDR1, 14'ü CDR2 ve 16'sı CDR3 evresinde yer almaktaydı. Buna göre Alzheimer hastalarının %40'ı hafif evre, %28'i orta evre ve %32'si ağır evre AH olarak değerlendirildi.



Şekil 23. Alzheimer hastalarının CDR evrelemesine göre dağılımı.

4.2. RUTİN BİYOKİMYASAL VE HEMATOLOJİK PARAMETRELERE AİT BULGULAR

Rutin biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin, AH ve kontrol gruplarında karşılaştırılmaları Tablo 7’de görülmektedir.

AH grubu ve kontrol grubu arasında karşılaştırma yapıldığında total kolesterol, HDL kolesterol ve LDL kolesterol düzeylerinin AH grubunda kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$ ve $p= 0,005$). Diğer biyokimyasal parametreler ve hematolojik parametreler açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

Tablo 7. Rutin biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin kandaki konsantrasyonlarının AH ve kontrol gruplarında karşılaştırılması

	AH grubu (Ort±SD)	Kontrol grubu (Ort±SD)
Total kolesterol (mg/dL)	224±50*	171±40
HDL-K (mg/dL)	54±13*	42±13
LDL-K (mg/dL)	122±36†	104±29
Trigliserid (mg/dL)	167±99	138±54
AST (IU/L)	23±9	21±7
ALT (IU/L)	16±9	16±7
GGT (IU/L)	21±12	26±15
BUN (mg/dL)	18±6	17±5
Kreatinin (mg/dL)	0,84±0,3	0,76±0,2
Hemoglobin (g/dL)	12,35±1,44	12,6±1,1
Hematokrit (%)	37,52±4,09	36,44±3,15
Lökosit (x10 ³ /µL)	7,3±2,02	6,94±1,49
Eritrosit (x10 ⁶ /µL)	4,21±0,48	4,15±0,42
Trombosit (x10 ³ /µL)	230±70	207±47

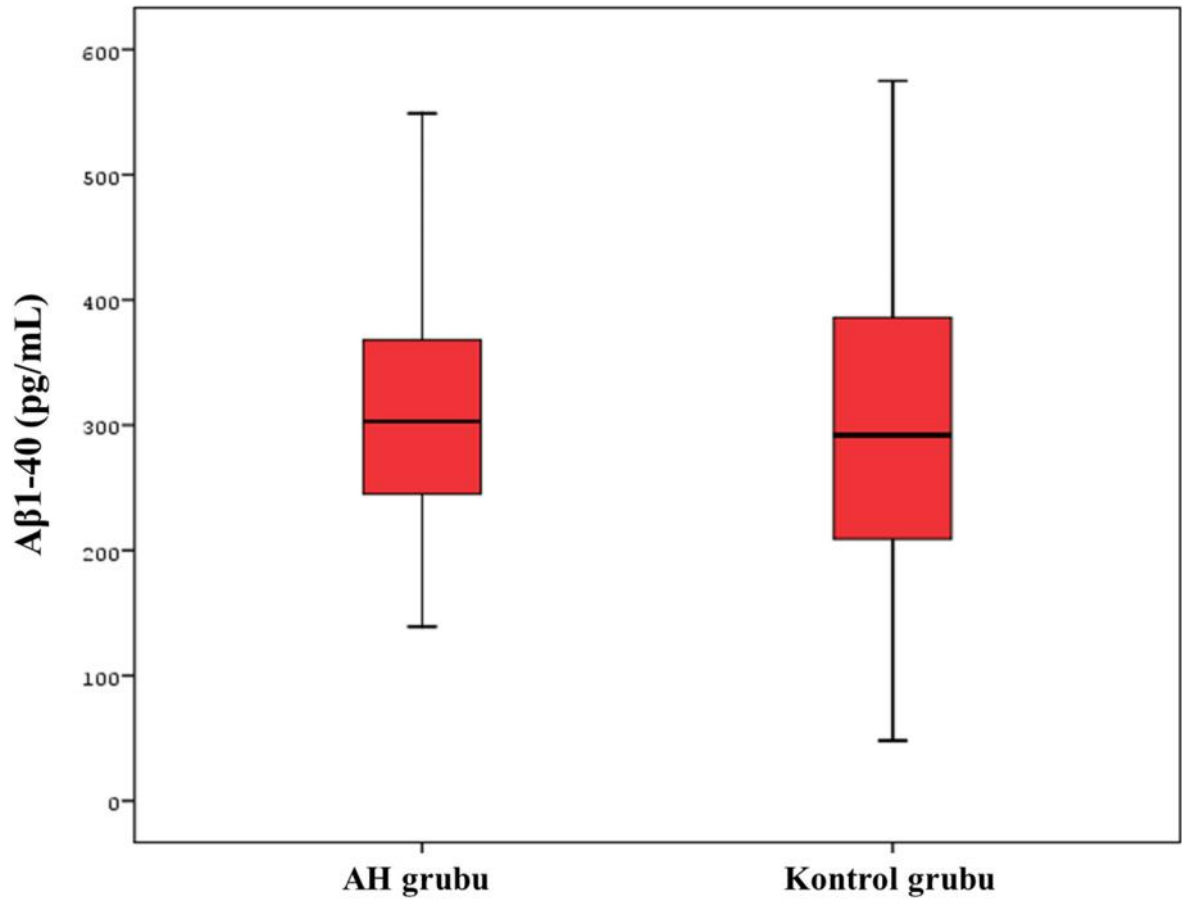
*p<0,001 kontrole göre. †p= 0,005 kontrole göre.

4.3. PLAZMA A β 1-40, A β 1-42 ve A β OLİGOMER DÜZEYLERİ

4.3.1. Plazma A β 1-40 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Plazma A β 1-40 düzeylerinin ortalaması AH grubunda 308 pg/mL ve kontrol grubunda 301 pg/mL olarak saptandı.

İki grup arasında plazma A β 1-40 düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,746$) (Grafik 8).

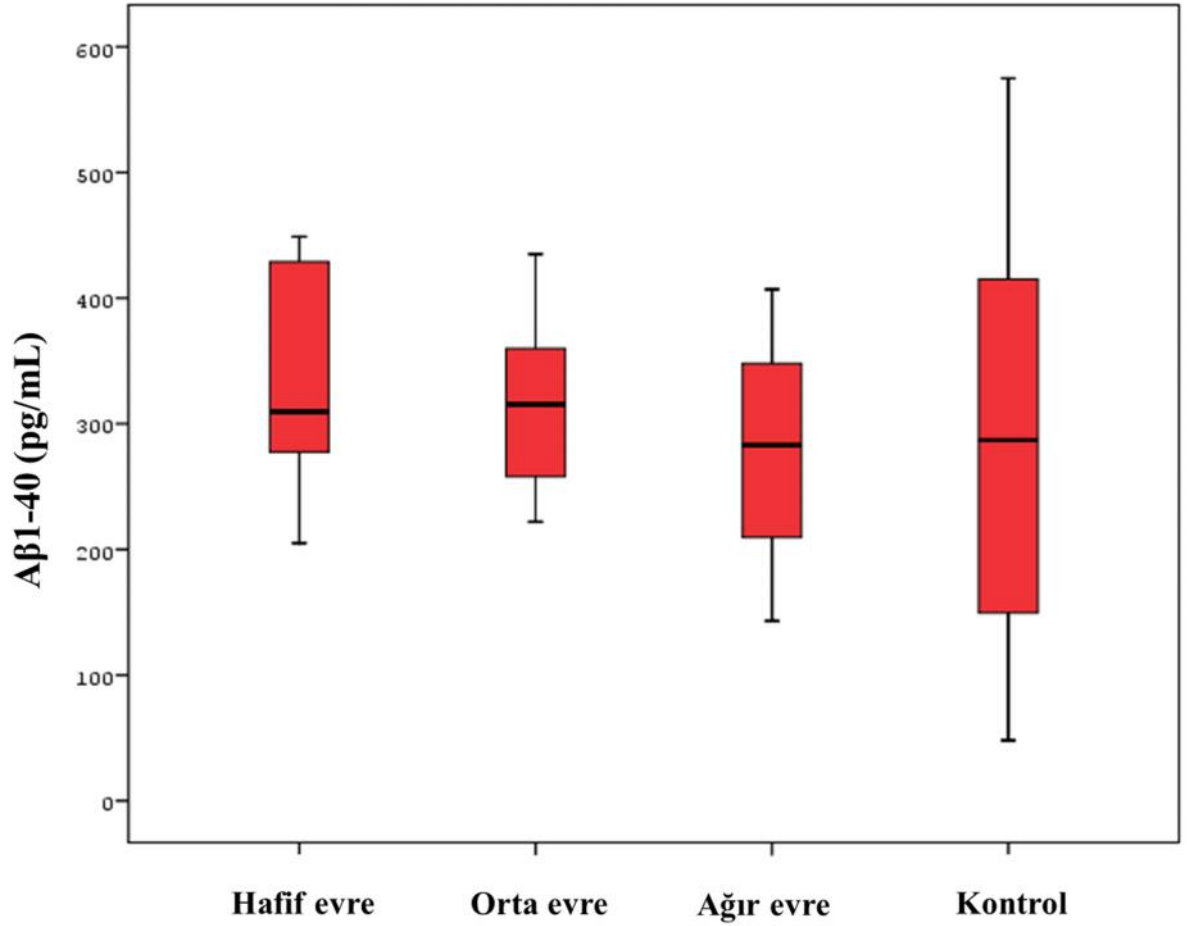


Grafik 8. AH grubu ve kontrol grubu arasında A β 1-40 düzeylerinin karşılaştırılması.

(Grafikte kutunun alt sınırı 25. persentili, üst sınırı 75. persentili ve kutunun içindeki yatay çizgi ise ortancayı göstermektedir. Kutunun yüksekliği çeyrekler arası aralığı ifade eder. Kutuların alt ve üst kenarlarının ortasından çizilen dikey çizgiler, yani alt veya üst kenarlar, uzaklığı 1.5 kutu boyundan az olan en büyük ve en küçük değerlere kadar uzanmaktadır.)

AH grubunda CDR'ye göre yapılan evrelendirme sonrasında, plazma A β 1-40 düzeylerinin ortalaması hafif evrede 316 pg/mL, orta evrede 313 ve ağır evrede 295 pg/mL olarak bulundu.

Hastalık evreleri arasında ve her bir hastalık evresi ile kontrol grubu arasında ve plazma A β 1-40 düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p= 0,707) (Grafik 9).

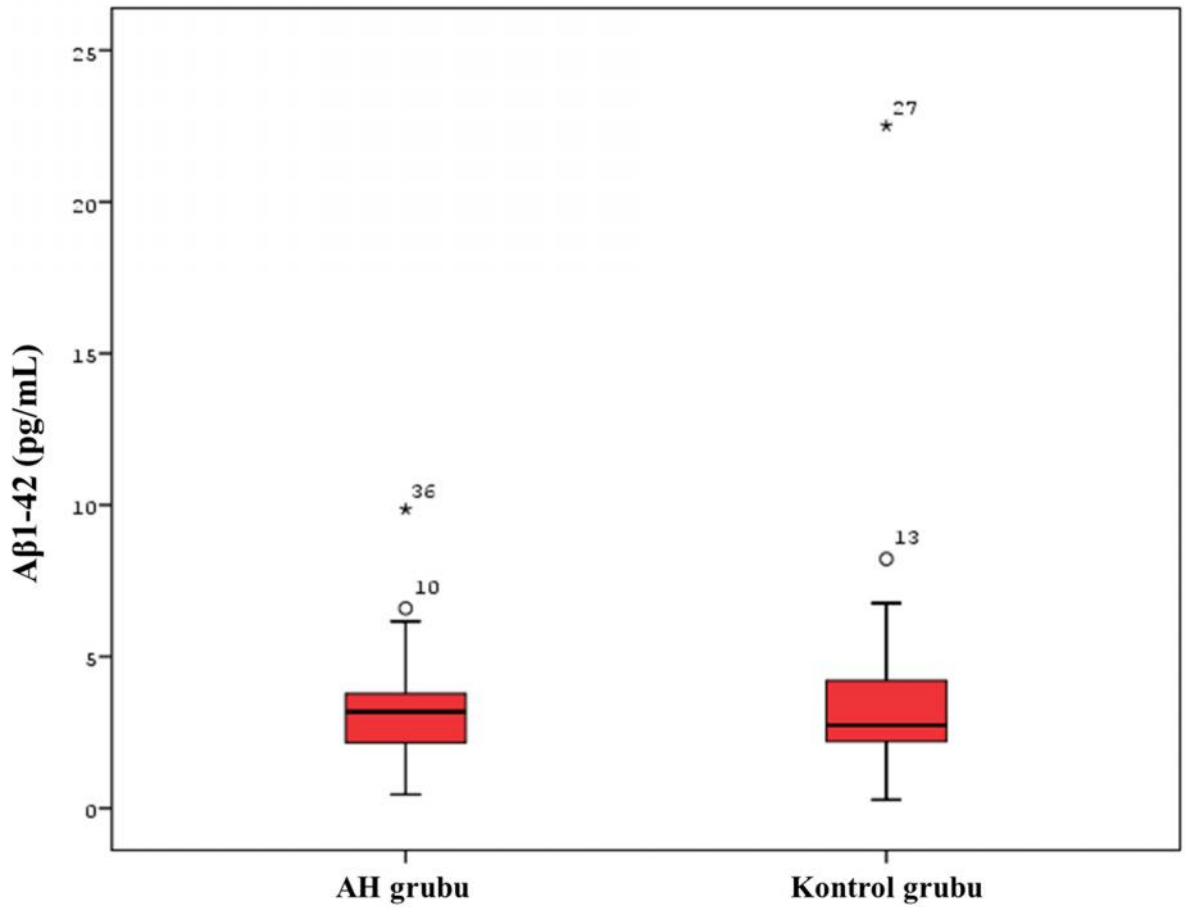


Grafik 9. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında A β 1-40 düzeylerinin karşılaştırılması.

4.3.2. Plazma A β 1-42 Düzeylerinin Karşılaştırılması

Plazma A β 1-42 düzeylerinin ortalaması AH grubunda 3,32 pg/mL ve kontrol grubunda 3,54 pg/mL olarak bulundu.

İki grup arasında plazma A β 1-42 düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,672$) (Grafik 10).

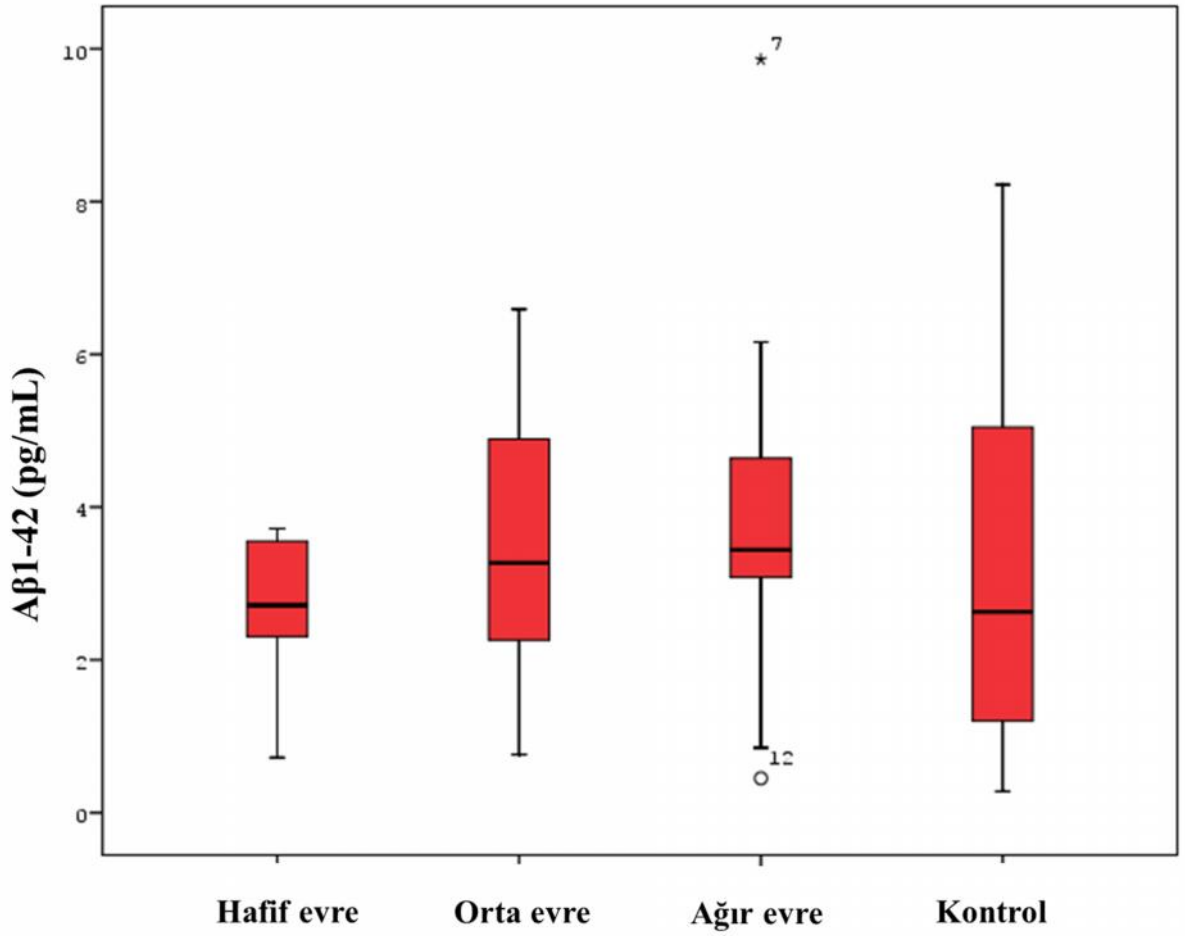


Grafik 10. AH grubu ve kontrol grubu arasında A β 1-42 düzeylerinin karşılaştırılması.

(Grafikte kutunun alt sınırı 25. persentili, üst sınırı 75. persentili ve kutunun içindeki yatay çizgi ise ortancayı göstermektedir. Kutunun yüksekliği çeyrekler arası aralığı ifade eder. Kutuların alt ve üst kenarlarının ortasından çizilen dikey çizgiler, yani alt veya üst kenarlar, uzaklığı 1.5 kutu boyundan az olan en büyük ve en küçük değerlere kadar uzanmaktadır. Üç kutu boyu ya da daha uzak olan değerler asteriks (*), 1,5-3 kutu boyu uzaklıkta olan değerler içi boş daire (o) ile gösterilmektedir.)

AH grubunda CDR'ye göre yapılan evrelendirme sonrasında, plazma A β 1-42 düzeylerinin ortalaması hafif evrede 3,03 pg/mL, orta evrede 3,47 pg/mL ve ağır evrede 3,57 pg/mL olarak saptandı.

Hastalık evreleri arasında ve her bir hastalık evresi ile kontrol grubu arasında plazma A β 1-42 düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p= 0,923) (Grafik 11).

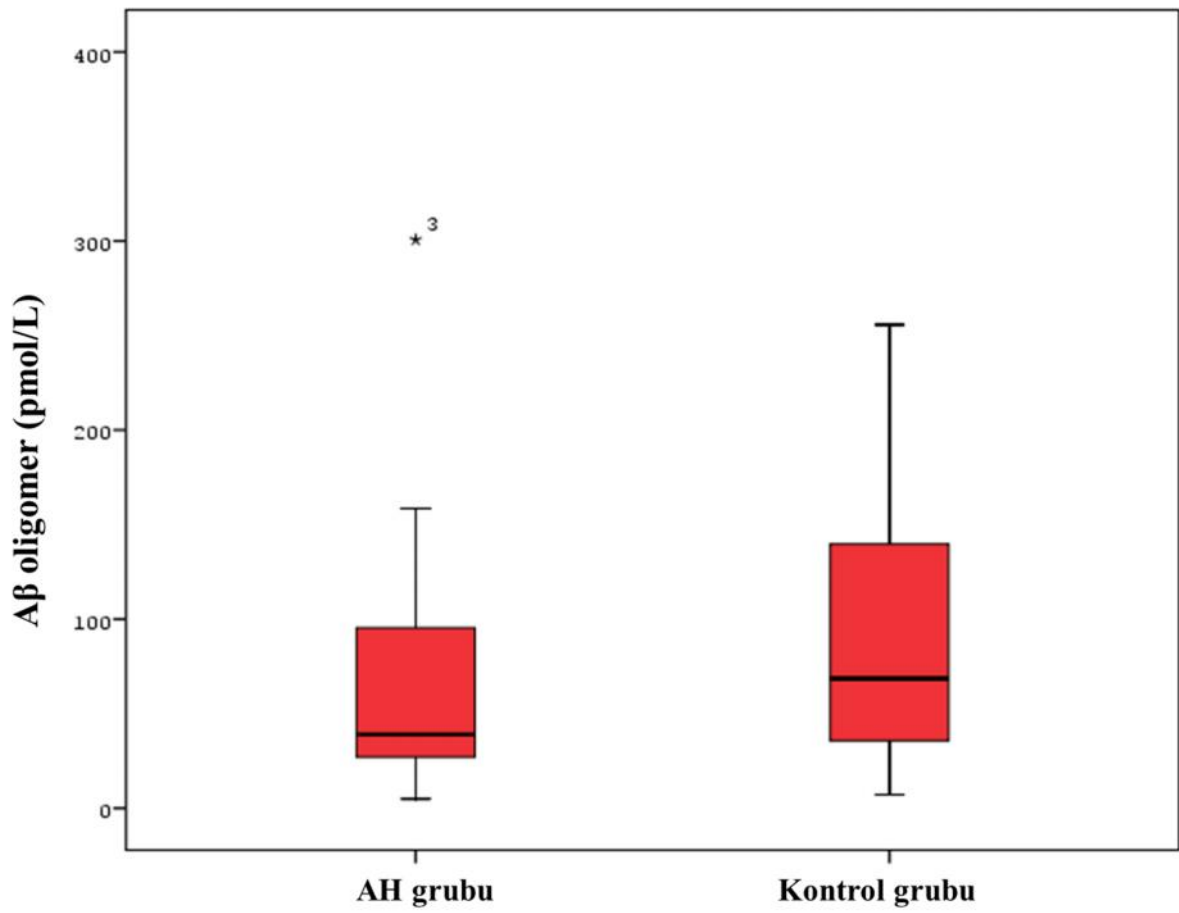


Grafik 11. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında A β 1-42 düzeylerinin karşılaştırılması.

4.3.3. Plazma A β Oligomer Düzeylerinin Karşılaştırılması

Plazma A β oligomer düzeylerinin ortalaması AH grubunda 62,16 pmol/L ve kontrol grubunda 80,68 pmol/L olarak saptandı.

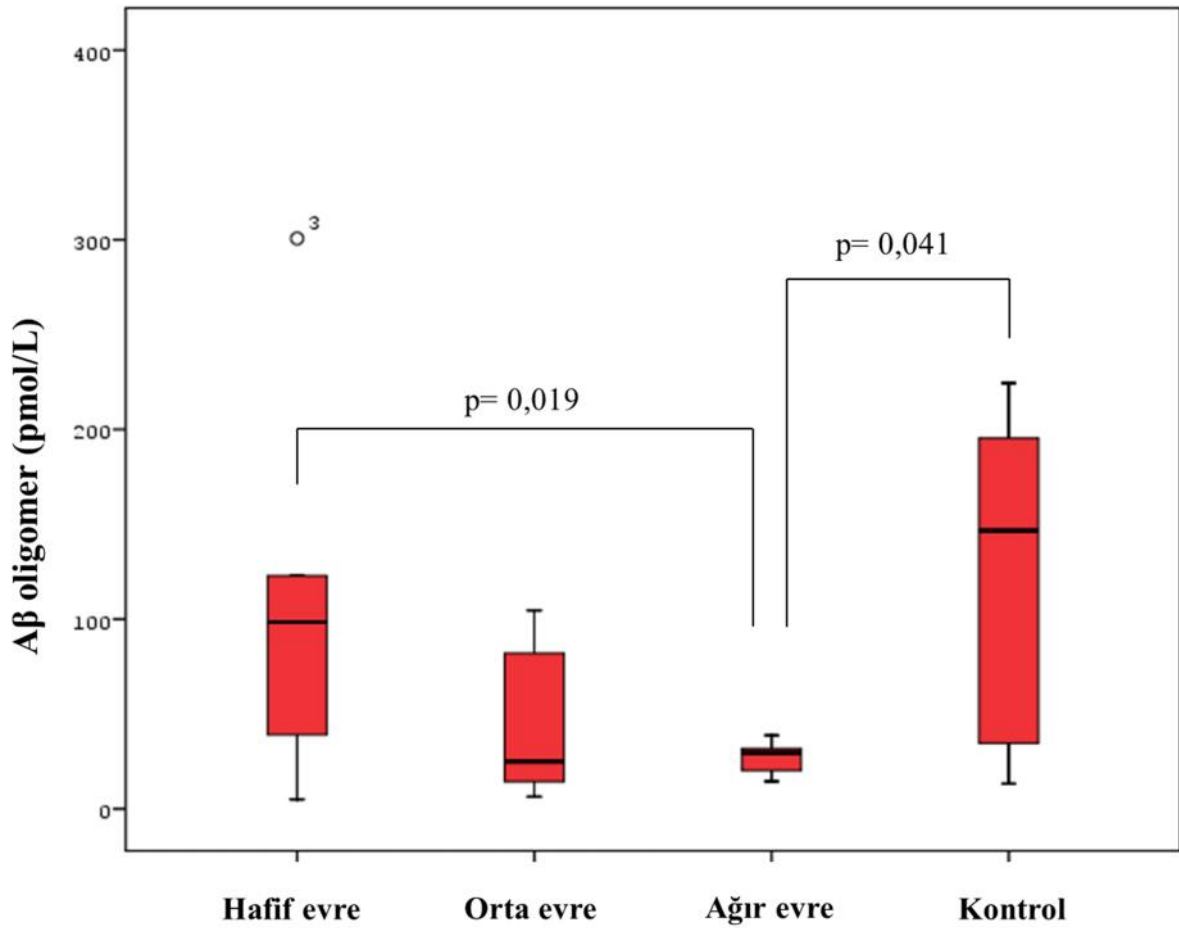
İki grup arasında plazma A β oligomer düzeyleri karşılaştırıldığında, AH grubunda kontrol grubuna göre düşük bulundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p= 0,190$) (Grafik 12).



Grafik 12. AH grubu ve kontrol grubu arasında A β oligomer düzeylerinin karşılaştırılması.

AH grubunda CDR'ye göre yapılan evrelendirme sonrasında, plazma A β oligomer düzeylerinin ortalaması hafif evrede 89,17 pmol/L, orta evrede 56,78 pmol/L ve ağır evrede 38,45 pmol/L olarak saptandı.

Plazma A β oligomer düzeyi, AH grubu içinde hastalık evresi arttıkça kademeli bir düşüş göstermekteydi. Ağır evrede, hafif evreye göre anlamlı olarak düşüş saptandı ($p= 0,019$). Hastalık evreleri ile kontrol grubunun karşılaştırmasında ise ağır evre'deki A β oligomer düzeyinin kontrole göre olan düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p= 0,041$) (Grafik 13).



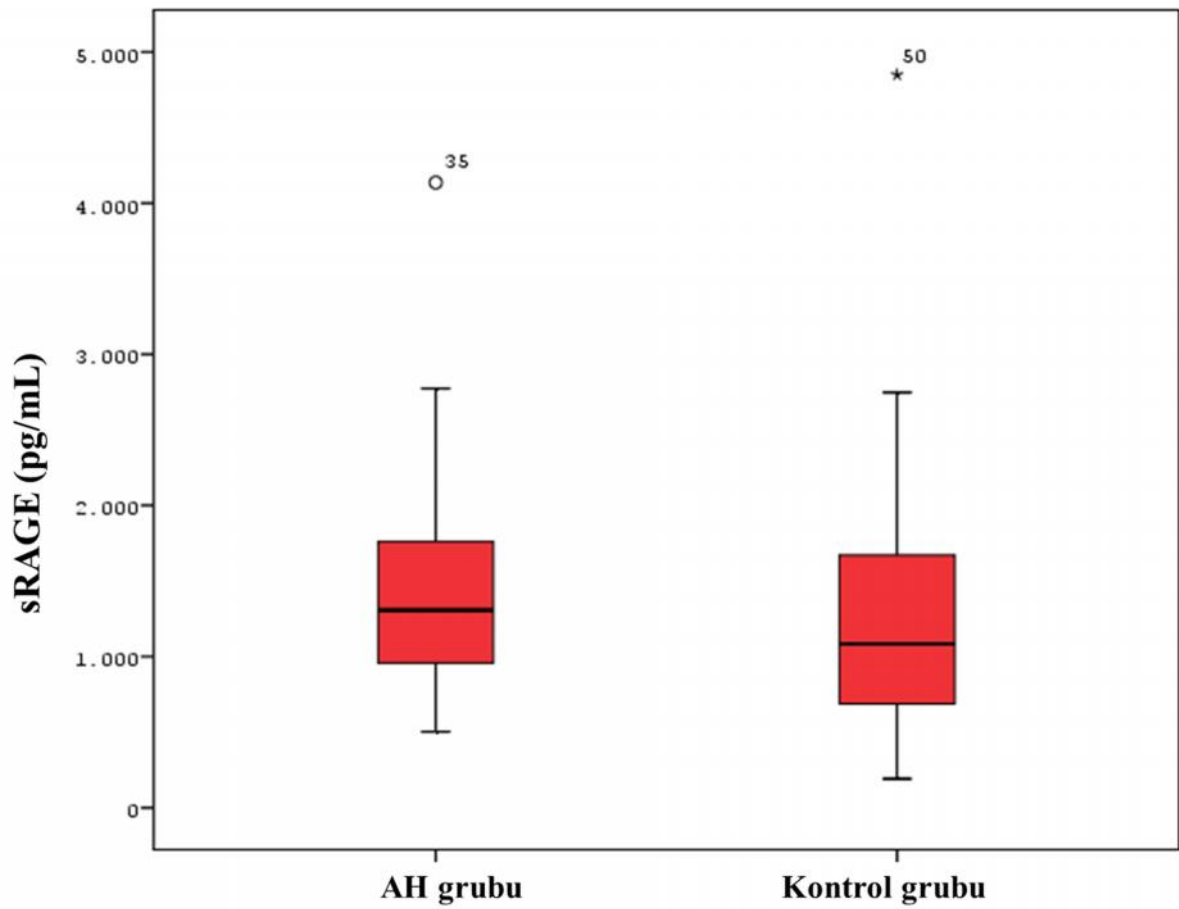
Grafik 13. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında A β oligomer düzeylerinin karşılaştırılması.

4.4. SERUM sRAGE ve esRAGE DÜZEYLERİ

4.4.1. Serum sRAGE Düzeylerinin Karşılaştırılması

Serum sRAGE düzeylerinin ortalaması AH grubunda 1398 pg/mL ve kontrol grubunda 1321 pg/mL olarak saptandı.

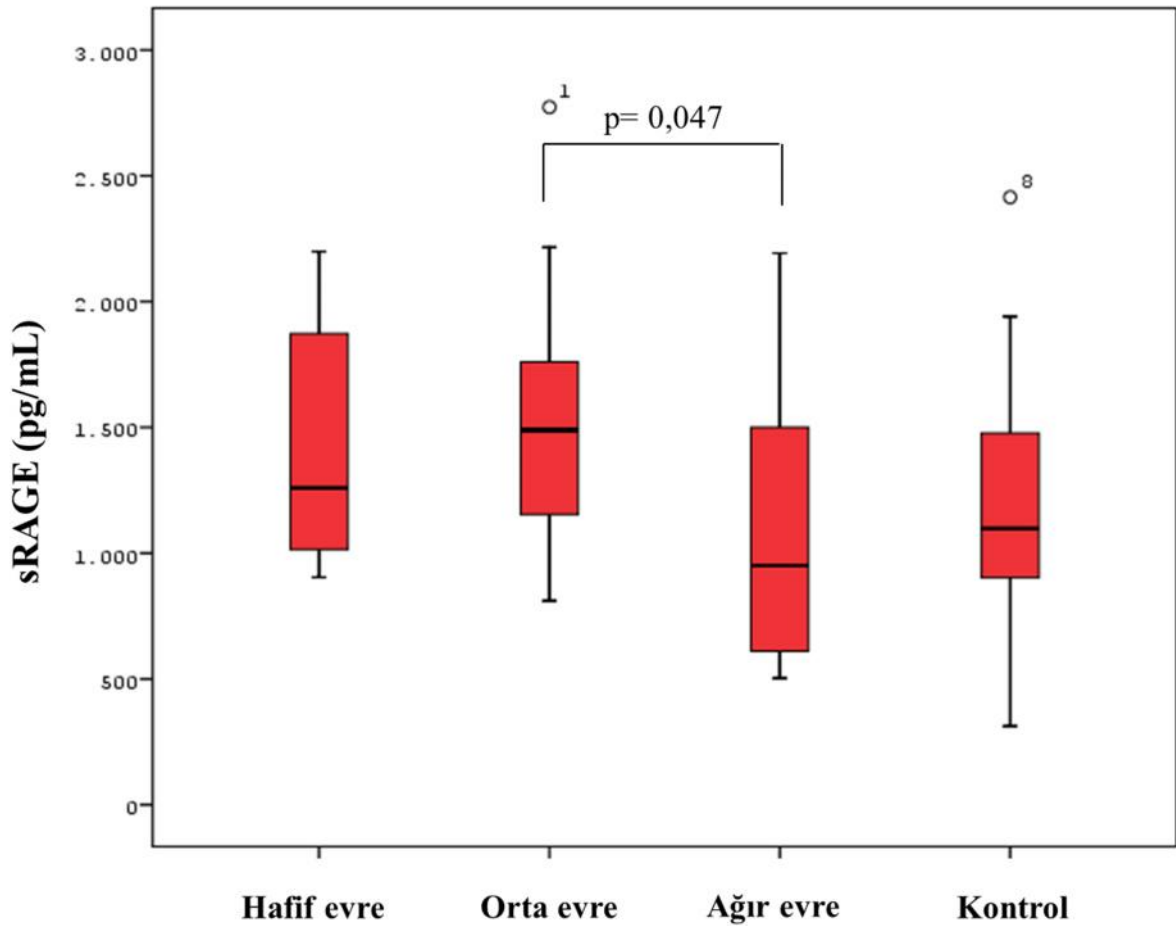
İki grup arasında serum sRAGE düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p= 0,616$) (Grafik14).



Grafik 14. AH grubu ve kontrol grubu arasında sRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.

AH grubunda CDR'ye göre yapılan evrelendirme sonrasında, serum sRAGE düzeylerinin ortalaması hafif evrede 1532 pg/mL, orta evrede 1538 pg/mL ve ağır evrede 1107 pg/mL olarak bulundu.

Hafif ve orta evredeki serum sRAGE düzeyleri, kontrol grubuna göre yüksek saptandı. Ancak bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmadığı belirlendi (sırasıyla $p=0,160$ ve $p=0,069$). Ağır evrede sRAGE hem kontrol grubuna hem de hafif ve orta evreye göre düşük bulundu ancak bu fark, sadece orta evre için anlamlı düzeydeydi. (sırasıyla $p=0,047$). (Grafik 15).

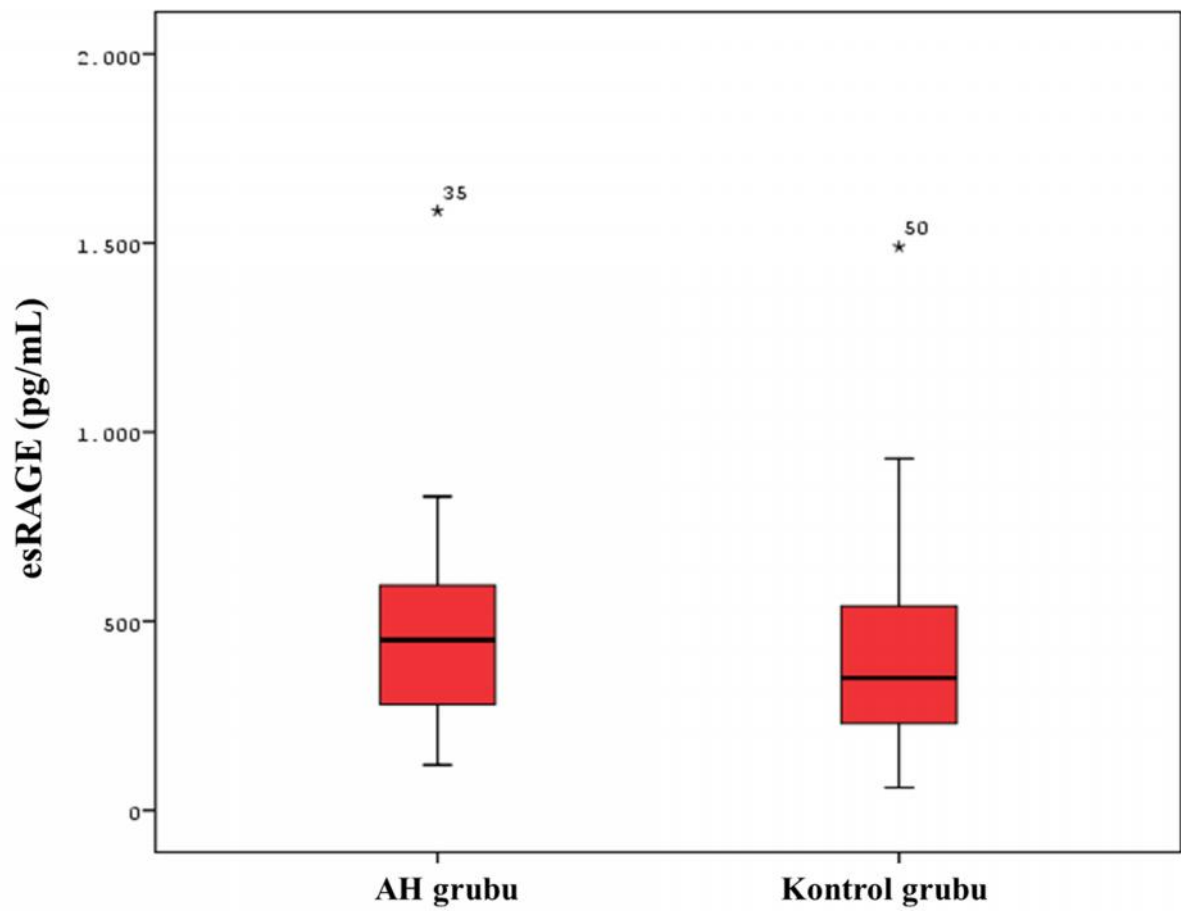


Grafik 15. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında sRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.

4.4.2. Serum esRAGE Düzeylerinin Karşılaştırılması

Serum esRAGE düzeylerinin ortalaması AH grubunda 456 pg/mL ve kontrol grubunda 417 pg/mL olarak saptandı.

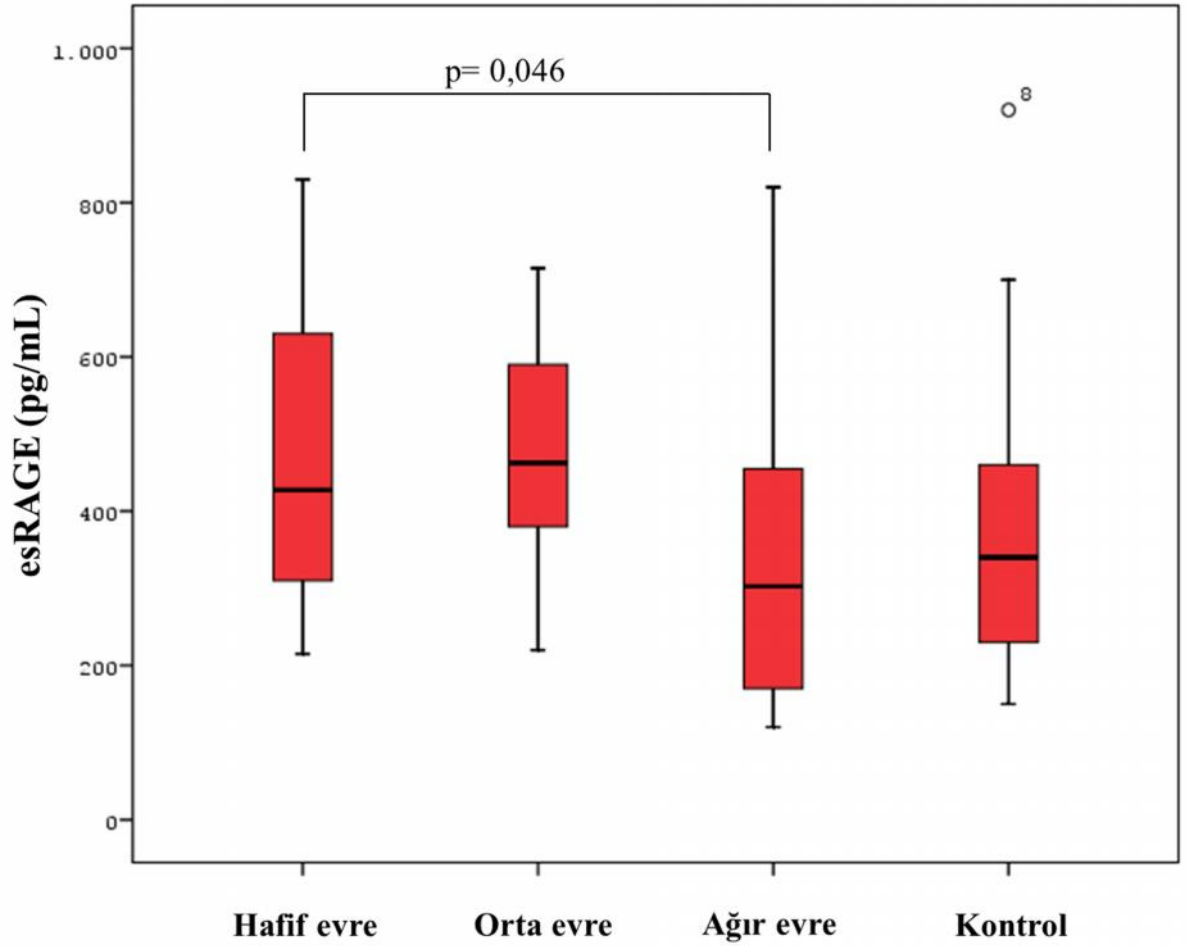
İki grup arasında serum esRAGE düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p= 0,466$) (Grafik16).



Grafik 16. AH grubu ve kontrol grubu arasında esRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.

AH grubunda CDR'ye göre yapılan evrelendirme sonrasında, serum esRAGE düzeylerinin ortalaması hafif evrede 524 pg/mL, orta evrede 467 pg/mL ve ağır evrede 362 pg/mL olarak bulundu.

Plazma esRAGE düzeyi, AH grubu içinde hastalık evresi arttıkça kademeli bir düşüş göstermekteydi. Ağır evrede, hafif evreye göre anlamlı olarak düşüş saptandı ($p= 0,046$). Hastalık evreleri ile kontrol grubunun karşılaştırmasında ise esRAGE, ağır evrede kontrole göre daha düşük bulunmakla beraber bu düşüklüğün istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmadığı belirlendi ($p= 0,448$) (Grafik 17).



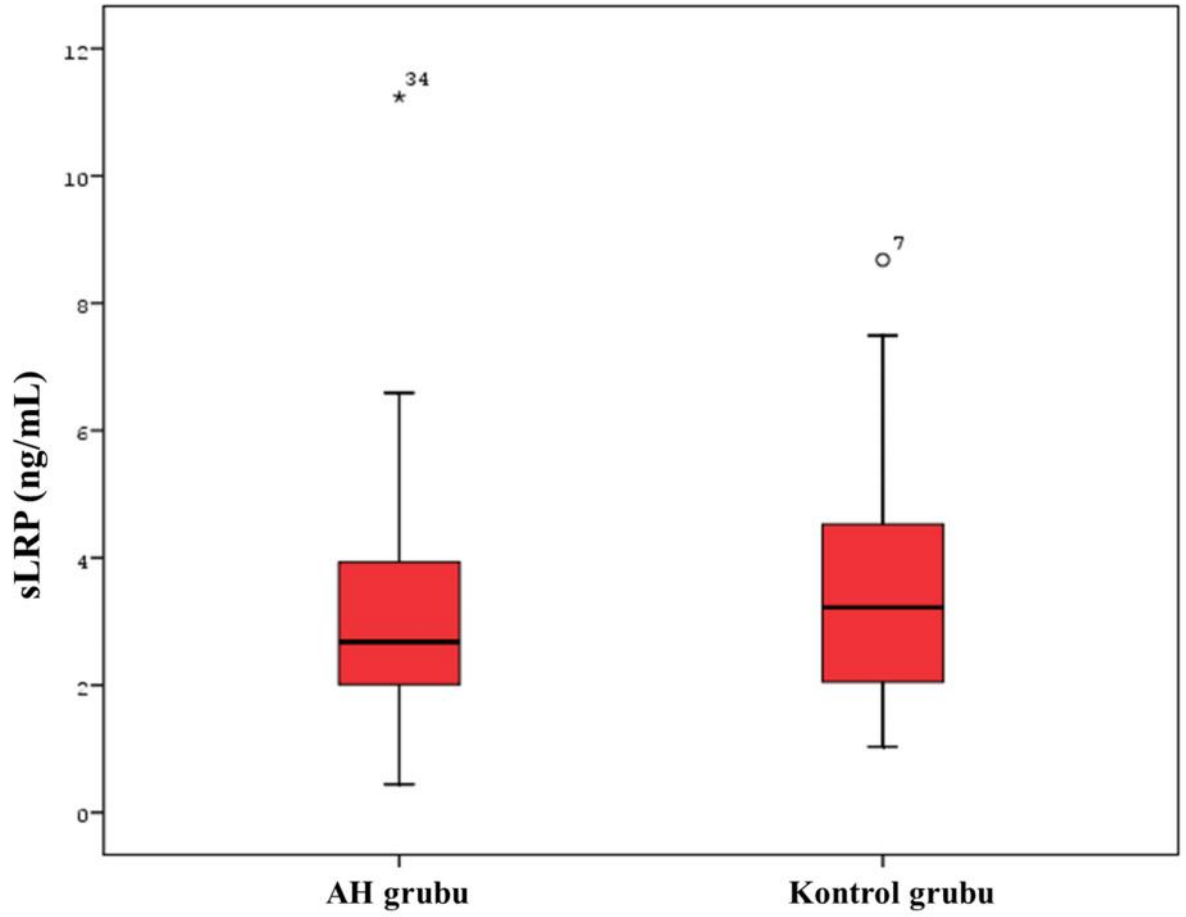
Grafik 17. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında esRAGE düzeylerinin karşılaştırılması.

4.5. SERUM sLRP1 DÜZEYLERİ

4.5.1. Serum sLRP düzeylerinin karşılaştırılması

Serum sLRP düzeylerinin ortalaması AH grubunda 3,17 ng/mL ve kontrol grubunda 3,44 ng/mL olarak saptandı.

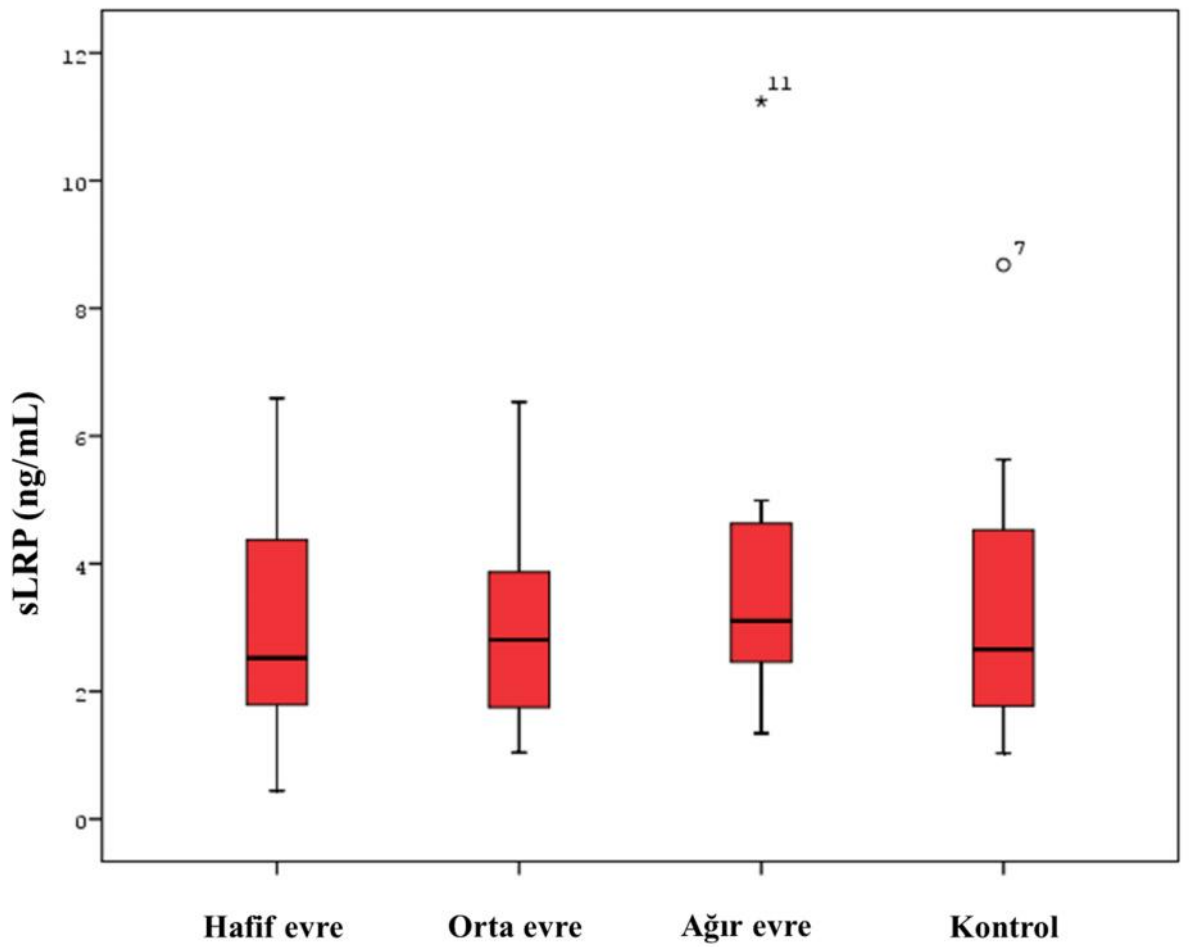
İki grup arasında serum sLRP düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p= 0,467$) (Grafik18).



Grafik 18. AH grubu ve kontrol grubu arasında sLRP düzeylerinin karşılaştırılması.

AH grubunda CDR'ye göre yapılan evrelendirme sonrasında, serum sLRP düzeylerinin ortalaması hafif evrede 3,08 ng/mL, orta evrede 2,97 ng/mL ve ağır evrede 3,47 ng/mL olarak bulundu.

Hastalık evreleri arasında ve her bir hastalık evresi ile kontrol grubu arasında plazma sLRP düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p= 0,462$) (Grafik 19).



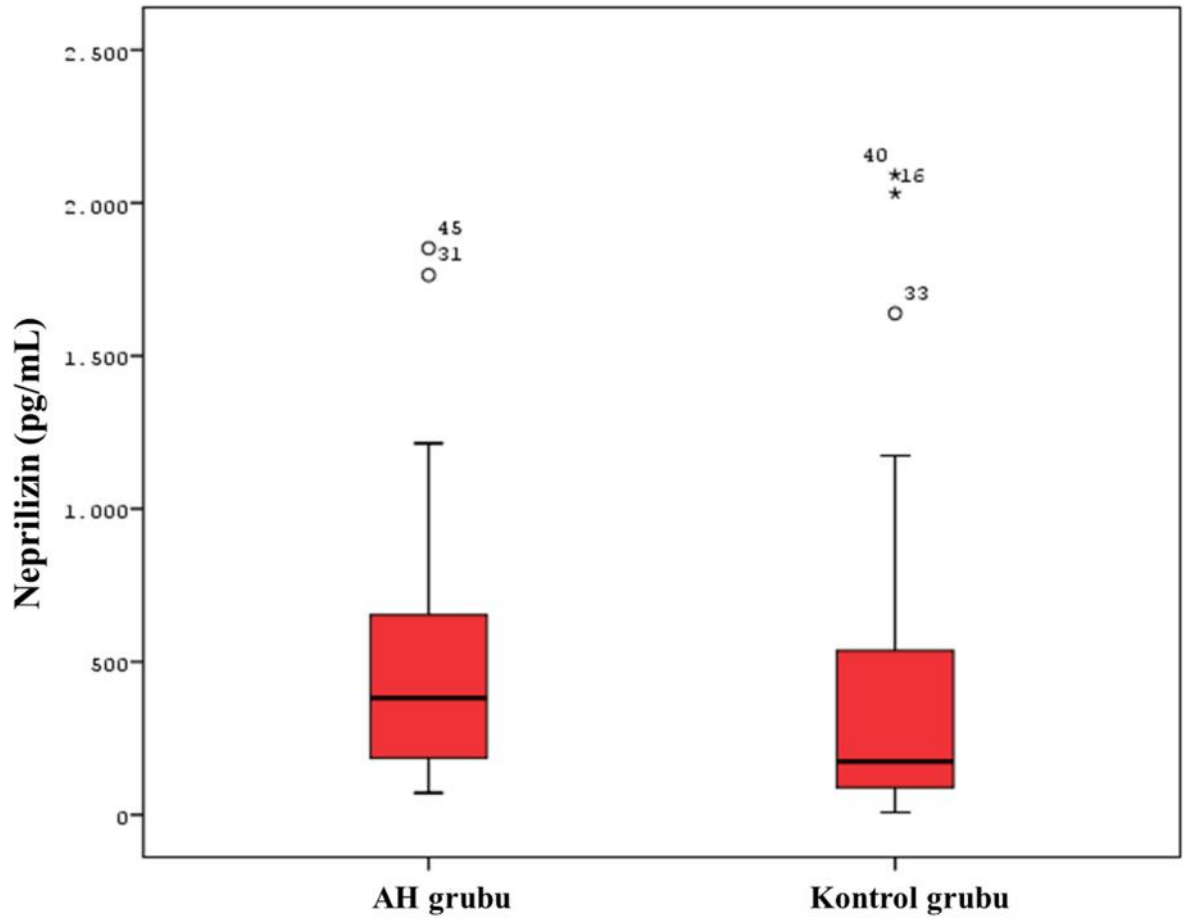
Grafik 19. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında sLRP düzeylerinin karşılaştırılması.

4.6. SERUM NEPRİLİZİN DÜZEYLERİ

4.6.1. Serum neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması

Serum neprilizin düzeylerinin ortalaması AH grubunda 527 pg/mL ve kontrol grubunda 419 pg/mL olarak saptandı.

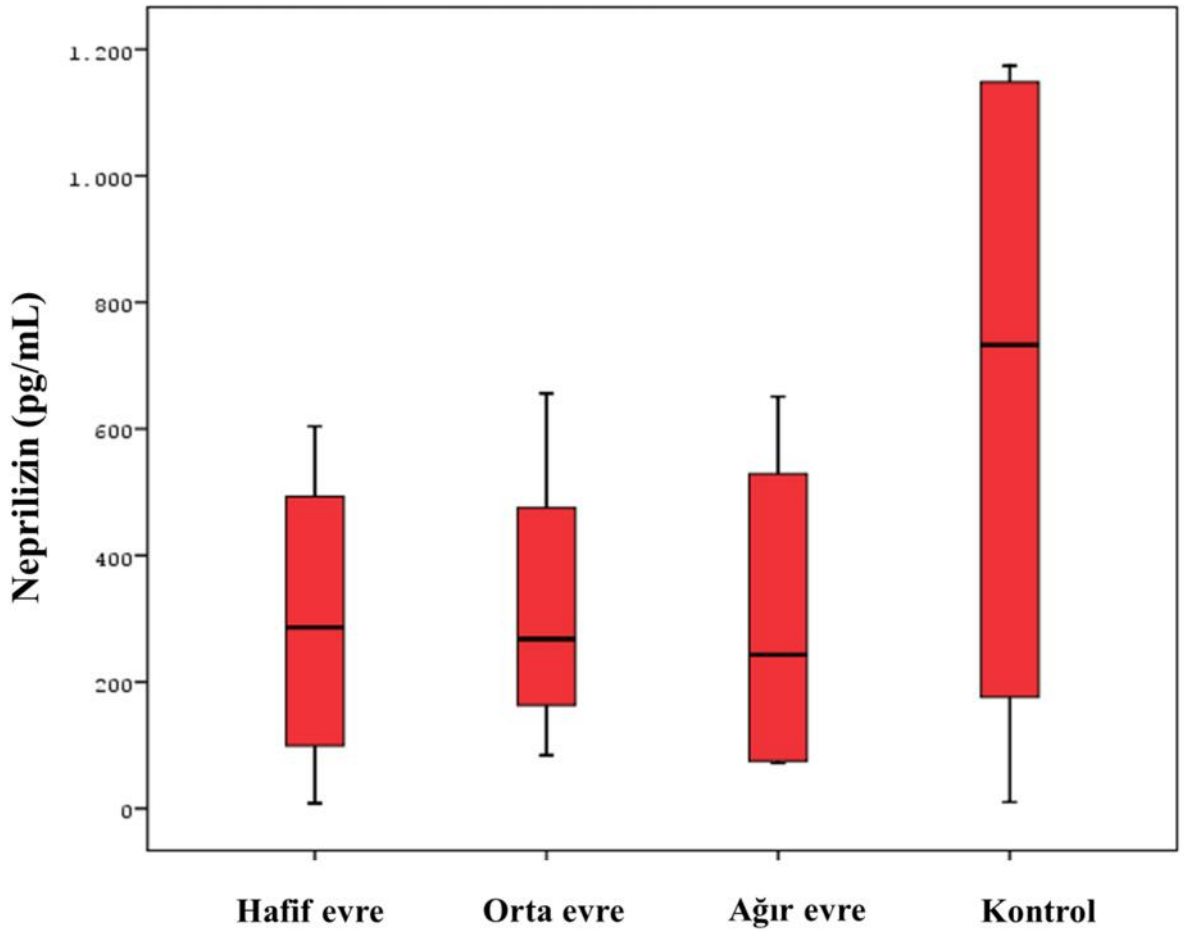
İki grup arasında serum neprilizin düzeyleri karşılaştırıldığında, AH grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi ($p=0,401$) (Grafik 20).



Grafik 20. AH grubu ve kontrol grubu arasında neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması.

AH grubunda CDR'ye göre yapılan evrelendirme sonrasında, serum neprilizin düzeylerinin ortalaması hafif evrede 407 pg/mL, orta evrede 690 pg/mL ve ağır evrede 533 pg/mL olarak saptandı.

Hastalık evreleri arasında ve her bir hastalık evresi ile kontrol grubu arasında ve plazma neprilizin düzeyleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p= 0,195$) (Grafik 21).



Grafik 21. Kontrol, hafif evre, orta evre ve ağır evre AH grubu arasında neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması.

Tablo 8. AH grubu ve kontrol grubunun A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri açısından karşılaştırılması.

	AH grubu (Ort$\pm$SD)	Kontrol grubu (Ort$\pm$SD)	p değeri
A β 1-40 (pg/mL)	308 $\pm$ 91	301 $\pm$ 117	0,746
A β 1-42 (pg/mL)	3,32 $\pm$ 1,76	3,54 $\pm$ 3,17	0,672
A β oligomer (pmol/L)	62,16 $\pm$ 57,17	80,68 $\pm$ 67	0,190
sRAGE (pg/mL)	1398 $\pm$ 655	1321 $\pm$ 857	0,616
esRAGE (pg/mL)	456 $\pm$ 251	417 $\pm$ 276	0,466
sLRP (ng/mL)	3,17 $\pm$ 1,81	3,44 $\pm$ 1,8	0,467
Neprilizin (pg/mL)	527 $\pm$ 502	419 $\pm$ 552	0,401

Tablo 9. Hafif, orta ve ağır evre AH ile kontrol grubunun A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri açısından karşılaştırılması.

	Hafif evre (Ort$\pm$SD)	Orta evre (Ort$\pm$SD)	Ağır evre (Ort$\pm$SD)	Kontrol grubu (Ort$\pm$SD)
A β 1-40 (pg/mL)	316 $\pm$ 88	313 $\pm$ 62	295 $\pm$ 114	301 $\pm$ 117
A β 1-42 (pg/mL)	3,03 $\pm$ 1,40	3,47 $\pm$ 1,65	3,57 $\pm$ 2,28	3,54 $\pm$ 3,17
A β oligomer (pmol/L)	89,17$\pm$77,51^a	56,78 $\pm$ 44,29	38,45$\pm$25,77^b	80,68 $\pm$ 67
sRAGE (pg/mL)	1532 $\pm$ 769	1538 $\pm$ 529	1107$\pm$528^c	1321 $\pm$ 857
esRAGE (pg/mL)	524 $\pm$ 307	467 $\pm$ 157	362$\pm$223^d	417 $\pm$ 276
sLRP (ng/mL)	3,08 $\pm$ 1,59	2,97 $\pm$ 1,42	3,47 $\pm$ 2,37	3,44 $\pm$ 1,8
Neprilizin (pg/mL)	407 $\pm$ 302	690 $\pm$ 660	533 $\pm$ 568	419 $\pm$ 552

^ap= 0,019 ağır evreye göre. ^bp= 0,041 kontrole göre. ^cp= 0,047 orta evreye göre.

^dp= 0,046 hafif evreye göre.

4.7. A β 1-40, A β 1-42, A β OLİGOMER, sRAGE, esRAGE, sLRP ve NEPRİLİZİN DÜZEYLERİNİN YAŞ VE CİNSİYETE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ

4.7.1. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin cinsiyete göre karşılaştırılması

AH grubu ve kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin cinsiyete göre karşılaştırılması Tablo 10’de görülmektedir.

Tüm parametreler için AH ve kontrol grupları her iki cinsiyete göre kendi içinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Ayrıca gruplar arasında erkek ve kadın cinsiyete göre karşılaştırma yapıldığında da anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

Tablo 10. Cinsiyete göre AH grubu ve kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması

Parametre	Cinsiyet	Grup	
		AH (Ort $\pm$ SD)	Kontrol (Ort $\pm$ SD)
A β 1-40 (pg/mL)	Erkek	293 $\pm$ 100	275 $\pm$ 80
	Kadın	312 $\pm$ 89	308 $\pm$ 120
A β 1-42 (pg/mL)	Erkek	3,10 $\pm$ 1,78	3,23 $\pm$ 1,86
	Kadın	3,38 $\pm$ 1,78	3,62 $\pm$ 3,43
A β oligomer (pmol/L)	Erkek	67,22 $\pm$ 93,96	89,24 $\pm$ 76,75
	Kadın	60,69 $\pm$ 43,43	78,48 $\pm$ 65,48
sRAGE (pg/mL)	Erkek	1435 $\pm$ 750	1192 $\pm$ 650
	Kadın	1388 $\pm$ 640	1353 $\pm$ 905
esRAGE (pg/mL)	Erkek	485 $\pm$ 223	387 $\pm$ 250
	Kadın	449 $\pm$ 261	425 $\pm$ 285
sLRP (ng/mL)	Erkek	2,78 $\pm$ 1,76	3,02 $\pm$ 2,38
	Kadın	3,27 $\pm$ 1,83	3,54 $\pm$ 1,64
Neprilizin (pg/mL)	Erkek	694 $\pm$ 453	286 $\pm$ 369
	Kadın	509 $\pm$ 511	461 $\pm$ 598

4.7.2. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş aralıklarına göre karşılaştırılması

AH grubu ve kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş aralıklarına göre karşılaştırılması Tablo 11’da görülmektedir.

A β 1-40, A β 1-42 ve A β oligomer için kontrol grubu üç farklı yaş aralığına göre kendi içinde karşılaştırıldığında kontrol grubunda 75-84 yaş aralığındaki değerler diğer iki yaş aralığına göre daha yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi. Ayrıca kontrol grubunda sRAGE ve esRAGE’nin yaşlanmaya bağlı olarak artış gösterdiği ve sLRP’nin ise tam tersi olarak düşüş gösterdiği saptandı. Ancak bu eğilimlerin anlamlılık düzeyine ulaşmadığı belirlendi.

AH grubu yaş aralıklarına göre kendi içinde karşılaştırıldığında A β 1-42, sRAGE, esRAGE ve neprilizin yaşlanmaya bağlı olarak artış gösterdiği ancak istatistiksel olarak anlamlılık taşımadığı saptandı. Buna ek olarak AH grubunda A β 1-40 için üç yaş aralığı arasında herhangi bir farklılık gözlenmezken A β oligomer düzeylerinin, 75-84 yaş aralığında ve sLRP düzeylerinin ise ≥ 85 yaş aralığında diğer yaş aralıklarına göre anlamlılık göstermeyen düzeyde yüksek olduğu belirlendi.

AH ve kontrol grupları arasında yaş aralıklarına göre karşılaştırma yapıldığında neprilizin düzeylerinin ≥ 85 yaş aralığı için AH grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p = 0,038$).

Tablo 11. Yaş aralıklarına göre AH grubu ve kontrol grubunda Aβ1-40, Aβ1-42, Aβ oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin karşılaştırılması

Parametre	Yaş	Grup	
		AH (Ort±SD)	Kontrol (Ort±SD)
Aβ1-40 (pg/mL)	65-74	317±68	258±109
	75-84	298±101	347±119
	≥85	318±94	289±107
Aβ1-42 (pg/mL)	65-74	2,52±0,67	2,93±1,72
	75-84	3,24±1,5	4,55±4,38
	≥85	4,3±2,6	2,68±1,44
Aβ oligomer (pmol/L)	65-74	44,14±44,86	77,52±65,99
	75-84	75,64±66,67	88,67±69,86
	≥85	46,91±35,19	72,02±69,3
sRAGE (pg/mL)	65-74	1206±454	1198±781
	75-84	1343±501	1313±651
	≥85	1696±995	1506±1245
esRAGE (pg/mL)	65-74	352±149	376±278
	75-84	454±208	415±211
	≥85	556±370	485±389
sLRP (ng/mL)	65-74	2,99±1,93	3,83±1,57
	75-84	2,9±0,97	3,33±2,14
	≥85	3,94±2,85	3,02±1,4
Neprilizin (pg/mL)	65-74	403±137	638±784
	75-84	489±581	305±288
	≥85	716±520*	332±538

* p= 0,038 kontrol grubunun ≥85 yaş aralığına göre.

4.8. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin Alzheimer hastalarında asetilkolinesteraz inhibitörü kullanımına göre değerlendirilmesi

AH grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin AchE inhibitörü kullanımına göre karşılaştırılması Tablo 12’de görülmektedir.

A β oligomer düzeyleri rivastigmin kullanan hastalarda donepezil ve galantamin kullananlara göre daha yüksekti ancak istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi ($p=0,192$). A β 40 ve A β 42 düzeyleri açısından üç ilaç grubu arasında anlamlı bir farklılık yoktu (sırasıyla $p=0,478$ ve $p=0,694$). Neprilizin ve sLRP için donepezil kullanan hastalarda diğer ilaçları kullanan hastalara göre anlamlılık göstermeyen düzeyde düşüş saptandı (sırasıyla $p=0,429$ ve $p=0,526$). sRAGE ve esRAGE düzeyleri galantamin kullananlarda rivastigmin ve donepezil kullananlara göre daha düşük olduğu görüldü. Bu düşüş sRAGE için istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşamazken, esRAGE’de galantamin-donepezil karşılaştırması için $p=0,042$ ve galantamin-rivastigmin karşılaştırması için $p=0,005$ olarak belirlendi.

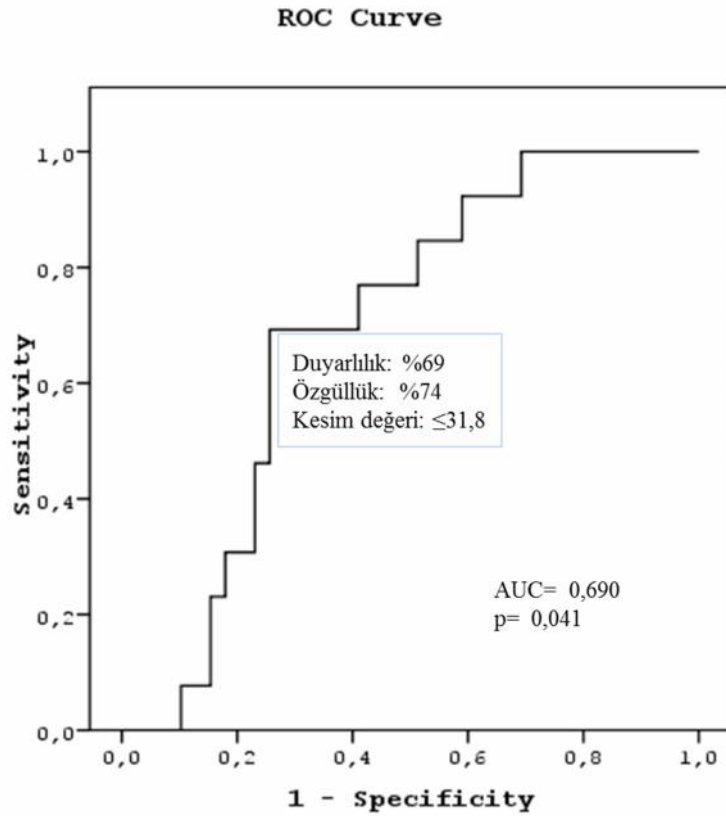
Tablo 12. Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin asetilkolinesteraz inhibitör kullanımına göre karşılaştırılması

Parametre	İlaç	AH (Ort $\pm$ SD)
A β 1-40 (pg/mL)	Donepezil	312 $\pm$ 87
	Rivastigmin	294 $\pm$ 91
	Galantamin	335 $\pm$ 84
A β 1-42 (pg/mL)	Donepezil	3,29 $\pm$ 1,39
	Rivastigmin	3,37 $\pm$ 1,67
	Galantamin	3,45 $\pm$ 1,05
A β oligomer (pmol/L)	Donepezil	57,1 $\pm$ 49,35
	Rivastigmin	88,5 $\pm$ 73,41
	Galantamin	51,8 $\pm$ 35,58
sRAGE (pg/mL)	Donepezil	1475 $\pm$ 812
	Rivastigmin	1498 $\pm$ 451
	Galantamin	1092 $\pm$ 381
esRAGE (pg/mL)	Donepezil	487$\pm$308*
	Rivastigmin	506$\pm$191†
	Galantamin	281 $\pm$ 114
sLRP (ng/mL)	Donepezil	2,8 $\pm$ 1,51
	Rivastigmin	3,01 $\pm$ 1,4
	Galantamin	3,36 $\pm$ 1,25
Neprilizin (pg/mL)	Donepezil	396 $\pm$ 430
	Rivastigmin	655 $\pm$ 546
	Galantamin	662 $\pm$ 778

*p= 0,042 galantamine göre. †p= 0,005 galantamine göre.

4.9. AB OLİGOMER, AB1-40, AB1-42, sRAGE, esRAGE, sLRP ve NEPRİLİZİNE AİT DUYARLILIK ve ÖZGÜLLÜK DEĞERLERİ

A β oligomer düzeyleri, AH grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermese de hastaların klinik olarak evrelendirilmesi sonrasında ağır evreye ait A β oligomer düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük bulundu. Bu nedenle ağır evrenin tanısı için A β oligomer düzeylerine ait duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplandı. Kesim değeri (cut-off) 31,8 pmol/L olarak seçildiğinde A β oligomerin, %69 duyarlılık ve %74 özgüllük ile ağır evredeki hastaları sağlıklı bireylerden ayırt edebildiği görüldü (Grafik 22).



Grafik 22. A β oligomerin ROC eğrisi analizine göre ağır evre AH'nın tanısındaki etkinliği.

A β 1-40, A β 1-42, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri için AH ve kontrol grupları arasında (klinik evrelendirme öncesi ya da sonrasında) anlamlı farklılık bulunmadığı için duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplanmadı.

4.10. KORELASYON ANALİZLERİ

4.10.1. Alzheimer hastalarında korelasyon analizleri

4.10.1.1. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle korelasyonu

Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyon analizleri Tablo 13'te görülmektedir.

Plazma A β 1-42 düzeyi ile serum sRAGE ve esRAGE düzeyleri arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon saptandı. Ayrıca sRAGE ve esRAGE düzeyleri arasında pozitif yönde, çok güçlü, anlamlı korelasyon bulundu.

Tablo 13. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyonu

		A β 1-40	A β 1-42	A β oligomer	sRAGE	esRAGE	sLRP	Neprilizin
A β 1-40								
A β 1-42	r	-0,059						
	p	0,7						
A β oligomer	r	0,051	0,201					
	p	0,767	0,226					
sRAGE	r	0,07	0,328	-0,036				
	p	0,639	0,023	0,825				
esRAGE	r	-0,029	0,312	-0,064	0,875			
	p	0,847	0,031	0,694	<0,001			
sLRP	r	0,004	0,125	0,033	0,065	-0,077		
	p	0,978	0,398	0,838	0,653	0,593		
Neprilizin	r	-0,045	0,158	-0,07	0,27	0,348	-0,111	
	p	0,814	0,405	0,729	0,134	0,051	0,546	

4.10.1.2. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE ile korelasyonu

Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE ile korelasyon analizleri Tablo 14’te görülmektedir.

A β 1-42 düzeyi ile yaş arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon saptandı. A β oligomer ve esRAGE düzeyleri, CDR skoru ile negatif yönde, orta derecede, anlamlı korele idi. Ayrıca A β oligomer, sRAGE ve esRAGE düzeyleri ile MMSE skoru arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon bulundu.

Tablo 14. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE korelasyonu

		MMSE	CDR	Cinsiyet	Yaş
Aβ1-40	r	0,208	-0,134	-0,063	0,030
	p	0,171	0,369	0,673	0,840
Aβ1-42	r	-0,024	0,075	0,03	0,406
	p	0,873	0,61	0,842	0,004
Aβ oligomer	r	0,376	-0,364	0,086	-0,09
	p	0,02	0,021	0,6	0,581
sRAGE	r	0,338	-0,247	-0,012	0,089
	p	0,019	0,084	0,933	0,539
esRAGE	r	0,341	-0,283	-0,087	0,206
	p	0,018	0,046	0,55	0,151
sLRP	r	0,15	0,035	0,121	0,072
	p	0,309	0,811	0,402	0,62
Neprilizin	r	-0,034	0,057	-0,192	0,145
	p	0,859	0,758	0,294	0,43

4.10.1.3. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu

Alzheimer hastalarında A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyon analizleri Tablo 15’da görülmektedir.

A β 1-42 düzeyi ile kan üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeyleri arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon saptandı. A β 1-40 ve A β oligomer düzeyleri ise rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korele değildi.

sRAGE ve esRAGE düzeyleri, lökosit ve trombosit sayıları ile negatif yönde, orta derecede, anlamlı korele idi. Ayrıca esRAGE ile BUN düzeyi arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon bulundu.

sLRP düzeyi, kreatinin düzeyi ile pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korele idi. sLRP düzeyi ile total kolesterol, eritrosit, hemoglobin ve hematokrit arasında negatif yönde, orta derecede anlamlı korelasyon saptandı.

Neprilizin düzeyi ile total kolesterol ve LDL kolesterol düzeyleri arasında negatif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon bulundu.

Tablo 15. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu

		A β 1-40	A β 1-42	A β oligomer	sRAGE	esRAGE	sLRP	Neprilizin
BUN	r	-0,003	0,35	0,038	0,259	0,3	0,245	0,195
	p	0,987	0,017	0,821	0,076	0,038	0,093	0,284
Kreatinin	r	0,167	0,361	-0,086	0,224	0,227	0,324	0,132
	p	0,274	0,014	0,609	0,125	0,12	0,025	0,473
AST	r	0,159	-0,221	0,133	0,072	0,094	-0,032	-0,238
	p	0,298	0,14	0,426	0,628	0,525	0,828	0,19
ALT	r	0,093	-0,118	0,023	0,015	0,073	-0,07	-0,106
	p	0,542	0,434	0,893	0,92	0,624	0,636	0,564
GGT	r	0,172	0,002	-0,186	0,034	0,061	-0,131	0,08
	p	0,259	0,988	0,263	0,819	0,679	0,374	0,663
Trigliserid	r	0,131	0,109	0,01	-0,078	-0,124	-0,176	-0,135
	p	0,39	0,471	0,953	0,597	0,4	0,232	0,462
Total kolesterol	r	0,086	-0,033	-0,058	-0,234	-0,173	-0,323	-0,376
	p	0,574	0,827	0,727	0,11	0,241	0,025	0,034
HDL kolesterol	r	-0,077	0,004	-0,197	-0,099	-0,04	-0,063	-0,225
	p	0,616	0,978	0,236	0,503	0,785	0,672	0,216
LDL kolesterol	r	0,173	-0,128	-0,041	-0,285	-0,265	-0,269	-0,433
	p	0,255	0,398	0,805	0,05	0,069	0,065	0,013
Lökosit	r	0,086	-0,145	0,163	-0,352	-0,286	-0,1	-0,084
	p	0,576	0,338	0,329	0,014	0,049	0,498	0,647
Eritrosit	r	-0,057	0,008	0,018	-0,078	-0,032	-0,311	-0,163
	p	0,71	0,957	0,915	0,597	0,831	0,031	0,373
Hemoglobin	r	-0,072	-0,045	-0,084	-0,061	-0,005	-0,349	-0,1
	p	0,637	0,766	0,618	0,679	0,972	0,015	0,585
Hematokrit	r	-0,065	-0,038	-0,064	-0,039	0,009	-0,338	-0,079
	p	0,672	0,802	0,703	0,79	0,949	0,019	0,667
Trombosit	r	-0,097	-0,068	0,265	-0,362	-0,324	0,014	-0,123
	p	0,527	0,653	0,108	0,012	0,025	0,923	0,502

4.10.2. Kontrol grubunda korelasyon analizleri

4.10.2.1. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle korelasyonu

Kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyon analizleri Tablo 16’de görülmektedir.

Plazma A β 1-42 düzeyi ile serum sRAGE düzeyleri arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon saptandı. sLRP düzeyi, A β 1-40 ve esRAGE düzeyi ile pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korele idi. Ayrıca sRAGE ve esRAGE düzeyleri arasında pozitif yönde, çok güçlü, anlamlı korelasyon bulundu.

Tablo 16. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyonu

		A β 1-40	A β 1-42	A β oligomer	sRAGE	esRAGE	sLRP	Neprilizin
A β 1-40								
A β 1-42	r	0,201						
	p	0,17						
A β oligomer	r	0,235	0,135					
	p	0,155	0,413					
sRAGE	r	0,079	0,327	-0,05				
	p	0,594	0,021	0,762				
esRAGE	r	0,042	0,238	-0,207	0,819			
	p	0,783	0,107	0,218	<0,001			
sLRP	r	0,293	0,027	-0,019	0,125	0,323		
	p	0,046	0,852	0,911	0,394	0,029		
Neprilizin	r	0,031	0,253	0,243	0,021	0,178	0,307	
	p	0,858	0,132	0,222	0,901	0,307	0,069	

4.10.2.2. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE ile korelasyonu

Kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri ile yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE arasında yapılan korelasyon analizlerinde anlamlılık bulunmadı.

4.10.2.3. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu

Kontrol grubunda A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyon analizleri Tablo 17’de görülmektedir.

A β 1-40 ile eritrosit, hemoglobin ve hematokrit arasında negatif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon saptandı. A β oligomer düzeyi, trombosit sayısı ile pozitif yönde ve ALT düzeyi ile negatif yönde, orta derecede, anlamlı korele idi.

A β 1-42, sRAGE, esRAGE ve sLRP düzeyleri, rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korele değildi.

Neprilizin düzeyi ile trigliserid ve total kolesterol arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon bulundu.

Tablo 17. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu

		A β 1-40	A β 1-42	A β oligomer	sRAGE	esRAGE	sLRP	Neprilizin
BUN	r	0,201	0,072	0,024	0,079	0,237	-0,1	0,108
	p	0,171	0,62	0,883	0,584	0,109	0,495	0,525
Kreatinin	r	0,083	0,039	0,051	0,104	0,275	-0,163	-0,02
	p	0,575	0,787	0,757	0,472	0,062	0,264	0,905
AST	r	0,075	0,006	-0,1	0,111	0,036	0,13	0,042
	p	0,613	0,968	0,547	0,441	0,811	0,375	0,804
ALT	r	0,013	-0,111	-0,324	-0,077	-0,128	-0,015	-0,059
	p	0,928	0,442	0,044	0,595	0,392	0,917	0,727
GGT	r	-0,089	-0,056	-0,166	-0,168	-0,198	0,008	-0,219
	p	0,548	0,699	0,311	0,244	0,183	0,954	0,192
Trigliserid	r	-0,02	-0,067	-0,067	-0,064	-0,026	0,027	0,35
	p	0,892	0,646	0,687	0,659	0,864	0,855	0,033
Total kolesterol	r	0,072	0,266	-0,12	0,134	0,13	0,135	0,384
	p	0,627	0,062	0,468	0,355	0,385	0,355	0,019
HDL kolesterol	r	-0,036	0,122	0,045	-0,146	-0,253	-0,087	0,101
	p	0,81	0,4	0,787	0,312	0,086	0,554	0,552
LDL kolesterol	r	-0,182	0,047	-0,043	0,019	0,099	0,244	0,276
	p	0,215	0,744	0,793	0,898	0,509	0,091	0,098
Lökosit	r	-0,094	-0,094	0,01	0,019	-0,174	-0,079	0,097
	p	0,525	0,516	0,95	0,898	0,242	0,59	0,569
Eritrosit	r	-0,334	-0,068	0,08	-0,102	-0,253	0,012	0,087
	p	0,02	0,641	0,629	0,482	0,086	0,934	0,608
Hemoglobin	r	-0,355	-0,072	0,104	-0,116	-0,251	-0,08	0,005
	p	0,013	0,619	0,529	0,424	0,088	0,587	0,978
Hematokrit	r	-0,304	0,027	0,052	-0,087	-0,26	-0,065	-0,03
	p	0,036	0,852	0,754	0,548	0,078	0,659	0,86
Trombosit	r	-0,067	0,178	0,428	0,076	0,051	-0,044	0,201
	p	0,65	0,215	0,007	0,599	0,735	0,764	0,233

4.10.3. Alzheimer hastaları ve kontrol bireylerinden oluşan tüm grupta korelasyon analizleri

4.10.3.1. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle korelasyonu

Alzheimer hastaları ve kontrol bireylerinden oluşan tüm grupta A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyon analizleri Tablo 18’da görülmektedir.

Plazma A β 1-42 düzeyi ile serum sRAGE ve esRAGE düzeyleri arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon saptandı. esRAGE düzeyi, neprilizin düzeyi ile pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korele idi. Ayrıca esRAGE ve sRAGE düzeyleri arasında pozitif yönde, çok güçlü, anlamlı korelasyon bulundu.

Tablo 18. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin birbiriyle olan korelasyonu

		A β 1-40	A β 1-42	A β oligomer	sRAGE	esRAGE	sLRP	Neprilizin
A β 1-40								
A β 1-42	r	0,075						
	p	0,478						
A β oligomer	r	0,125	0,154					
	p	0,284	0,18					
sRAGE	r	0,068	0,312	-0,065				
	p	0,514	0,002	0,568				
esRAGE	r	0,01	0,261	-0,143	0,849			
	p	0,922	0,011	0,214	<0,001			
sLRP	r	0,165	0,043	0,026	0,078	0,104		
	p	0,112	0,677	0,821	0,44	0,314		
Neprilizin	r	0,041	0,219	0,118	0,124	0,283	0,153	
	p	0,743	0,075	0,394	0,31	0,02	0,214	

4.10.3.2. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE ile korelasyonu

Alzheimer hastaları ve kontrol bireylerinden oluşan tüm grupta A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeyleri ile yaş, cinsiyet, CDR ve MMSE arasında yapılan korelasyon analizlerinde anlamlılık bulunmadı.

4.10.3.3. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu

Alzheimer hastaları ve kontrol bireylerinden oluşan tüm grupta A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyon analizleri Tablo 19’de görülmektedir.

A β oligomer düzeyi ile trombosit sayısı arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon saptandı.

A β 1-40, A β 1-42, sRAGE, neprilizin düzeyleri, rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korele değildi.

esRAGE düzeyi ile BUN ve kreatinin arasında pozitif yönde, orta derecede, anlamlı korelasyon bulundu. Ayrıca esRAGE, lökosit sayısı ile negatif yönde, zayıf derecede, anlamlı korele idi.

sLRP düzeyi ile hemoglobin ve hematokrit arasında negatif yönde, zayıf derecede, anlamlı korelasyon bulundu.

Tablo 19. A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin düzeylerinin rutin biyokimyasal ve hematolojik parametreler ile korelasyonu

		A β 1-40	A β 1-42	A β oligomer	sRAGE	esRAGE	sLRP	Neprilizin
BUN	r	0,1	0,187	0,024	0,165	0,273	0,069	0,172
	p	0,339	0,069	0,833	0,105	0,007	0,499	0,158
Kreatinin	r	0,119	0,181	-0,004	0,163	0,254	0,06	0,07
	p	0,257	0,077	0,974	0,11	0,013	0,56	0,57
AST	r	0,108	-0,101	-0,009	0,124	0,097	0,042	-0,046
	p	0,302	0,33	0,938	0,223	0,351	0,68	0,705
ALT	r	0,052	-0,123	-0,172	-0,028	-0,038	-0,043	-0,091
	p	0,618	0,233	0,134	0,784	0,714	0,672	0,458
GGT	r	0,002	-0,054	-0,12	-0,114	-0,132	-0,021	-0,115
	p	0,981	0,601	0,3	0,265	0,202	0,835	0,349
Trigliserid	r	0,044	0,004	-0,055	-0,034	-0,049	-0,062	0,149
	p	0,673	0,97	0,633	0,738	0,638	0,544	0,222
Total kolesterol	r	0,091	0,135	-0,129	0,048	0,045	-0,103	0,194
	p	0,387	0,191	0,262	0,637	0,662	0,313	0,111
HDL kolesterol	r	0,002	0,112	-0,069	-0,022	-0,026	-0,094	0,034
	p	0,983	0,275	0,548	0,828	0,802	0,362	0,78
LDL kolesterol	r	0,005	-0,037	-0,058	-0,079	-0,065	-0,024	0,058
	p	0,962	0,719	0,614	0,441	0,534	0,817	0,639
Lökosit	r	-0,005	-0,114	0,072	-0,148	-0,217	-0,084	0,062
	p	0,966	0,269	0,533	0,147	0,034	0,412	0,612
Eritrosit	r	-0,193	-0,031	0,053	-0,097	-0,136	-0,16	0,021
	p	0,064	0,761	0,647	0,34	0,188	0,117	0,861
Hemoglobin	r	-0,195	-0,063	-0,008	-0,079	-0,119	-0,235	-0,027
	p	0,062	0,543	0,943	0,44	0,25	0,021	0,823
Hematokrit	r	-0,166	-0,027	-0,015	-0,042	-0,09	-0,235	-0,049
	p	0,111	0,797	0,9	0,681	0,387	0,021	0,688
Trombosit	r	-0,073	0,057	0,311	-0,118	-0,137	-0,029	0,086
	p	0,487	0,579	0,006	0,246	0,184	0,777	0,481

5. TARTIŞMA

Sağlık alanında yaşanan gelişmeler, bireylerin yaşam sürelerini uzatırken beraberinde de yaşlı nüfusta daha sık karşılaşılan bir takım hastalıkları gündeme getirmiştir. Yaşlılarda görülen hastalıkların en ağır şekillerinden birisi, günlük yaşam aktivitelerini kısıtlaması ve yüksek mortalite oranlarıyla seyretmesi nedeniyle Alzheimer hastalığı (AH)'dır (14). Günümüzde AH tanısı, klinik tanı kriterlerine göre konulmakta olsa da hastaların klinik olarak tanı aldıkları aşamada AH'na ait patolojik değişikliklerin, çoktan geri dönüşsüz bir safhaya girmiş olduğu görülmektedir (19). Bu nedenle hastalığın özellikle erken evrelerinde tanınmasını kolaylaştıracak güvenilir biyokimyasal belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. AH'nda biyobelirteçlerin keşfine yönelik çalışmalar artan bir ilgiyle karşılanmakta ve araştırmacılar için cazip bir çalışma alanı oluşturmaktadır. AH patofizyolojisinde merkezi bir role sahip olması nedeniyle biyobelirteç çalışmalarının çok büyük bir kısmında A β peptidin değerlendirildiği görülmektedir (92). AH'nda plazma/serum A β düzeylerini değerlendiren ilk çalışma, Jensen ve ark.ları tarafından 1995 yılında gerçekleştirilmiş olup bu çalışmada, APP mutasyonu taşıyan ailesel tip AH'na sahip hastalarda kontrol grubuna göre plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Ancak sporadik Alzheimer hastalarında, A β düzeyleri açısından belirgin bir yükselme saptanmamıştır (309). Aynı ekip tarafından yine aynı yıl içinde bildirilen diğer bir çalışmada ise bu kez PSEN1 mutasyonu taşıyan ailesel Alzheimer hastaları değerlendirilmeye alınmış ve bu hastalarda plazma A β 1-42 düzeylerinin belirgin olarak artmış olduğu gösterilmiştir (310). Jensen ve ark.larının çalışması ile aynı yıl içinde bildirilen bir diğer çalışma, Motter ve ark.ları tarafından gerçekleştirilmiş fakat bu çalışmada, kan örnekleri yerine BOS kullanılmış ve BOS A β 1-42 seviyeleri kontrol grubundan yaklaşık iki kat yüksek bulunmuştur (311). Motter ve ark.larının yapmış oldukları bu öncül çalışmanın ardından gerçekleştirilen az sayıdaki çalışmada da BOS A β 1-42 seviyeleri yüksek bulunmuş fakat ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda, ELISA yöntemine ait eksikliklerin giderilmesi sayesinde ilk çalışmaların tam tersi olarak BOS A β 1-42 seviyelerinin, Alzheimer hastalarında belirgin olarak düşük seviyelerde olduğu anlaşılmıştır. A β 1-42 düzeylerinin BOS'da belirgin olarak düşük olduğunu gösteren bu ilk çalışmaların ardından gerçekleştirilen 180'den fazla çalışmada da bu düşüşün gerçekleştiği doğrulanmıştır. İlk çalışmanın yayınlandığı 1995 yılından günümüze kadar geçen süre içinde AH'nın biyobelirteci olarak dolaşımdaki A β düzeylerini araştıran yaklaşık 80 çalışma bildirilmiştir.

Bu çalışmaların yarısı longitudinal olarak planlanmışken, diğer yarısı bizim çalışmamızdakine benzer şekilde kesitsel (cross-sectional) olarak gerçekleştirilmiştir. Plazma, BOS'a göre daha kolay elde edilebilir bir vücut sıvısı olmasına rağmen A β düzeylerini araştıran çalışmalarda, BOS'un daha fazla tercih edildiği görülmektedir. Bu durumun altında yatan temel sebep BOS'un beyin parankimindeki değişiklikleri daha iyi yansıtır olmasının yanı sıra ilk çalışmaların ardından takip eden çalışmalarda da plazma A β düzeyleri açısından tutarlı sonuçların elde edilememiş olmasıdır. Bu nedenle araştırmacıların ilgisi, dolaşımdaki A β seviyelerinden uzaklaşmış ve BOS çalışmaları daha fazla tercih edilir hale gelmiştir. Fakat 2000'li yılların ortalarından itibaren dolaşımdaki A β düzeylerini inceleyen çalışmaların sayısında belirgin bir artış göze çarpmaktadır. Günümüzde AH'nın kesin tedavisi bulunmamakta fakat AH ile ilgili araştırmalardan elde edilen biyokimyasal ve patolojik veriler sayesinde hastalığın patofizyolojik sürecini engellemeye yönelik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunların arasında özellikle β -sekretaz ya da γ -sekretaz inhibitörleriyle A β üretiminin azaltılması, A β 'yı bloke etmeye yönelik monoklonal antikorların geliştirilmesi ve KBB'nde RAGE-A β etkileşiminin önüne geçilerek A β 'nın dolaşımdan beyne doğru taşınmasının engellenmesi gibi primer olarak A β 'yı hedef alan tedavi modalitelerinin ön plana çıktığı görülmektedir (92). Geliştirilmeye çalışılan bu ilaçların birçoğu faz 2 veya faz 3 aşamasındadır. Bu nedenle bu farmakolojik ajanların etkinliklerinin değerlendirilmesinde, A β düzeylerini ölçmenin gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu ajanların, A β metabolizması üzerinde ne derece etkili olduğunu değerlendiren az sayıdaki klinik çalışmalar neticesinde plazma A β düzeylerinin, tedaviyi izlem için kullanılabileceğine ilişkin ipuçları elde edilmiştir (312-316). Yakın dönemde yapılan bu öncül çalışmalar, biyokimyasal bir belirteç olarak A β 'nın önemini tekrar gündeme getirmiş ve plazma/serum A β düzeylerini araştıran çalışmaların sayısında belirgin bir artış gerçekleşmiştir.

5.1. Plazma A β 1-40, A β 1-42 ve A β oligomer bulgularının değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde ettiğimiz plazma A β 1-40 ve A β 1-42 bulguları, literatürde yer alan bazı çalışmalarla benzerlik göstermektedir (317-329). 1032 katılımcının (186 AH, 112 HKB ve 724 kontrol) yer aldığı AIBL (Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle) çalışmasında, ELISA yöntemi kullanılarak tüm bireylerin plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri incelenmiş ve üç grup arasında A β düzeyleri açısından her hangi bir farklılık saptanmamıştır (329). İda ve ark.larının çalışmasında sporadik tip AH, ailesel tip AH ve sağlıklı yaşlı bireylerden oluşan üç grup arasında BOS ve plazmada A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinin karşılaştırılması yapılmış

ve plazma A β peptid düzeyleri açısından sporadik tip AH grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (317). Alzheimer hastaları ile mikst tip ve vasküler tip demanslı hastaların karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada, kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm gruplarda, plazma A β 1-42 düzeylerinin birbirine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (323). Beyaz ırkın yer aldığı Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinin yanı sıra Asya kıtasında gerçekleştirilen bazı çalışmalarda da AH ve kontrol grupları arasında plazma A β düzeyleri açısından belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Tamaoka ve ark.larının Japonyada gerçekleştirdikleri çalışmada, Down sendromlu hastalarda plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri yüksek değerlerde bulunmuş iken sporadik Alzheimer hastaları, sağlıklı kontrol grubu ve nörolojik kontrol grubu arasında A β düzeyleri açısından farklılık bulunmamıştır (324). Yaptığımız literatür taramasında çalışmamız, bu konuda Türkiye’de gerçekleştirilmiş tek çalışmadır. Çalışmamızda 50 sağlıklı birey ve 50 Alzheimer hastası bulunmakta olup bu sayının Türk toplumuna ilişkin plazma A β düzeylerini yansıtmakta göreceli olarak yetersiz kaldığı görülmekte ve bu açıdan daha fazla katılımcının yer aldığı geniş tabanlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızdan farklı olarak bazı çalışmalarda, A β 1-40 ve A β 1-42’in yerine A β x-40 ve A β x-42 düzeylerinin değerlendirildiği görülmektedir. Literatürde yaygın olarak A β x-40 ve A β x-42 için sırasıyla A β 40 ve A β 42 adlandırılması kullanıldığı görülmektedir. A β peptidin N-terminal bölgesine spesifik antikorların kullanıldığı durumlarda A β 1-40 veya A β 1-42 saptanmaktayken, peptidin orta bölgesini tanıyan antikorların tercih edildiği durumlarda A β 40 veya A β 42’nin saptanması sağlanmaktadır. A β 40 ve A β 42’nin belirlenmesini sağlayan antikorlar, tam uzunluktaki A β ’nın yanı sıra orta bölgelerinden kesime uğramış (A β 10-40/42 ve A β 16-40/42 gibi) A β peptid parçalarını da tanımaktadır. Böylece bu antikorlar ile elde edilen A β 40 ve A β 42 düzeyleri, A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinden daha yüksek bulunmaktadır. A β 1-40 ve A β 1-42’nin yanı sıra dolaşımdaki A β 40 ve A β 42 düzeylerini değerlendiren çalışmalarda da AH için anlamlı farklılık saptanmadığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (330-337). Fukumoto ve ark.larının sporadik Alzheimer hastaları (146 hasta), hafif kognitif bozukluklu hastalar (37 hasta), Parkinson hastaları (96 hasta) ve demansı olmayan kontrol bireylerinde (92 kişi) gerçekleştirdikleri çalışmada, A β 40 ve A β 42 düzeylerinin gruplar arasında farklılık göstermediği belirlenmiştir (330). Az sayıda katılımcıyla (39 AH ve 18 kontrol) gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, A β düzeyleri açısından AH grubunda, kontrole göre belirgin değişiklik saptanmamıştır (331). Vanderstichele ve ark.larının Alzheimer hastaları, Lewy cisimcikli demans hastaları ve

sağlıklı yaşlılardan oluşan üç grup üzerinde yaptıkları çalışmada BOS, plazma ve idrar örneklerinde A β 42 düzeyleri değerlendirilmiş ve yalnızca BOS A β 42 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bildirilmiştir (334). Iwatsubo ve ark.ların çalışmasında, hem sporadik tip hem de ailesel tip AH olan hastalar kullanılmış ve sadece ailesel Alzheimer hastalarında plazma A β 42 yüksekliği saptanmıştır (332). Bu çalışmanın yanı sıra ailesel Alzheimer hastalarının ve Down sendromlu hastaların yer aldığı tüm araştırmalarda plazma A β 42 veya A β 1-42 düzeylerinde artış gerçekleştiği gösterilmiştir (309, 310, 324, 332). Çalışmamız da dahil olmak üzere tüm bu çalışmalardan elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda plazma A β düzeylerini değerlendirmenin, ailesel AH'nın tanısı için yararlı olduğu fakat hastaların %98'inden sorumlu olan sporadik AH'nın tanısında yetersiz kaldığı görülmektedir.

Bulgularımızdan farklı olarak AH ve kontrol grupları arasında plazma A β düzeylerinde farklılık saptayan birçok bildiri bulunmaktadır (338-353). Bu çalışmaların büyük bir kısmında A β 40 ve A β 42'den sadece birisinde değişiklik saptanmış olup A β 40 ve A β 42 düzeylerinin her ikisinde de değişiklik yakalayan sadece iki çalışma bulunmaktadır. Xu ve ark.ları tarafından 2008 yılında gerçekleştirilen çalışmada, Alzheimer hastalarında A β 40 düzeylerinde artış ve A β 42 düzeylerinde ise tam tersi olarak düşüş tespit edilmiştir. Bu çalışmada, A β düzeyleri açısından farklılık saptanmış olsa da saçılım grafiklerine bakıldığında iki grup arasında hem A β 40 hem de A β 42 için çok fazla çakışmanın olduğu göze çarpmaktadır (348). Luis ve ark.larının 2009 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada (25 AH ve 40 sağlıklı kontrol) ise Alzheimer hastalarında hem A β 40 hem de A β 42 düzeylerinde artış saptanmış fakat bu artışın sadece A β 42 için istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığı belirlenmiştir (347).

A β 40/42 ile A β 1-40/42'yi eş zamanlı olarak ölçerek hasta ve kontrol grupları arasında kıyaslama yapan yalnızca üç çalışma bulunmaktadır (318, 329, 344). Xia ve ark.larının 2009 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada, bu dört A β peptid formunun (A β 40, A β 1-40, A β 42 ve A β 1-42) plazma örneklerinde değerlendirilmesi sağlanmış ve Alzheimer hastalarında sağlıklı kontrollere göre yalnızca A β 1-42 düzeylerinde anlamlı artış saptanmıştır (344). AIBL çalışmasında, ELISA yöntemiyle sadece A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri değerlendirilmiş iken INNO-BIA-multiplex assay yöntemiyle A β 1-40, A β 40, A β 1-42 ve A β 42'nin hepsi değerlendirilmeye alınmıştır. Bu çalışmadaki INNO-BIA multiplex assay sonuçlarına göre Alzheimer hastalarında A β 1-42 düzeylerinin azaldığı ve A β 40 düzeylerinin ise arttığı

belirlenmiştir (329). Bu iki çalışmadan farklı olarak Le Bastard ve ark.larının çalışmasında, sadece A β 1-42 ve A β 42'nin eş zamanlı olarak ölçülmesi sağlanmış ve sağlıklı kontrollere kıyasla AH grubunda belirgin bir farklılık saptanmamıştır (318).

Alzheimer hastalarında plazma A β 1-42 düzeylerinde azalma saptayan araştırmacılara göre bu azalışın sorumlu olan temel mekanizma hastalık süreci içinde A β 1-42'nin amiloid plaklar içinde birikmesi sonucunda dolaşımdaki düzeylerinin azalıyor olmasıdır. Fakat Alzheimer hastalarında plazma ve BOS A β 1-42 düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların tamamında A β 1-42 için anlamlı bir korelasyonun gösterilememiş olması ve buna ek olarak beyindeki amiloid plak yükünü gösteren PIB-PET sonuçları ile plazma A β 1-42 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişkinin ortaya konamamış olması, bu açıklamanın geçerliliğini tartışılır kılmaktadır (318, 331, 334, 339, 352). A β 1-40 düzeylerinde yükseklik saptayan araştırmacılar ise artmış A β üretiminin bir sonucu olarak A β 1-40'ın beyinden dışarıya doğru başarılı bir şekilde temizlendiği fakat A β 1-42'nin KBB'den daha zor temizlenmesi neticesinde sadece plazma A β 1-40 düzeylerinde artış saptandığını ileri sürülmüştür. Fakat bu çalışmaların tamamında sporadik tip AH olan vakaların kullanılmış olması ve sporadik AH için ailesel AH'ndan farklı olarak A β üretiminde artış olduğunu gösteren direkt kanıtların bulunmaması nedeniyle araştırmacıların ileri sürdüğü bu düşünce yaygın olarak kabul görmemiştir (297). A β 40 veya A β 42'yi ölçmenin, A β 1-40 veya A β 1-42'yi ölçmeye olan üstünlüğü tam uzunluktaki A β peptidlere ek olarak neprilizin gibi enzimler tarafından N-terminal bölgesinden yıkılmış olan A β peptid parçalarının da eş zamanlı olarak belirlenebilmesidir. Fakat enzimatik olarak yıkıma uğramış olan bu peptidlerin, beyinden mi yoksa periferdeki yıkımdan mı kaynaklandığı netleştirilememiştir. A β 'nın KBB'nde taşınmasını değerlendiren tüm çalışmalarda tam uzunluktaki A β 1-40 ya da A β 1-42'nin kullanılmış olması fakat değişik uzunluktaki A β parçalarının taşınmasına yönelik ise her hangi bir çalışmanın bulunmaması bu konunun anlaşılması açısından ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Plazma/serum A β 1-42 ve A β 42 düzeyleri, A β 1-40 ve A β 40 düzeylerinden 10-100 kat daha düşüktür. A β 1-42 ve A β 42'nin dolaşımda oldukça düşük düzeylerde bulunması, saptanmaları açısından problem oluşturabilmektedir. Hatta Xia ve ark.larının çalışmasında kontrol grubundaki bireylerin %90'ında ve AH grubundaki hastaların ise yarısında A β 1-42 düzeylerinin saptama sınırının altında olduğu bildirilmiştir (344). Abdullah ve ark.larının çalışmasında, serum A β 1-42 düzeylerine ait değerler, plazmadakilerden daha yüksek bulunmuş ve bu nedenle A β 1-42'nin değerlendirilmesi için

serum örneklerini kullanmanın daha yararlı olduğu belirtilmiştir (349). Günümüzde A β 1-42 için geliştirilen yüksek duyarlılıklı ELISA kitleri sayesinde saptama probleminin önüne geçilmiş durumdadır. Fakat bu kitlerin sadece A β 1-42'yi saptamaya yönelik olduğu görülmektedir. Çalışmamızda yüksek duyarlılıklı ticari ELISA kitlerinden birisi kullanılarak A β 1-42 düzeyleri ölçülmüş ve A β 1-42 düzeylerini değerlendiren çalışmaların %70'lik kısmına benzer şekilde Alzheimer hastalarında plazma A β 1-42 düzeyleri açısından her hangi bir farklılık saptanmamıştır.

Ailesel Alzheimer hastalarını inceleyen çalışmalar birbiriyle tutarlılık göstermekte ve plazma A β düzeyleri artmış olarak saptanmaktadır. Fakat plazma/serum A β düzeylerini sporadik Alzheimer hastalarında inceleyen çalışmalara bakıldığında, çalışmalar arasında belirgin tutarsızlık bulunmaktadır. Sporadik AH'nda plazma/serum A β düzeyleri için artmış, azalmış ya da değişmemiş seviyeler bildirilmiştir (317-353). Birbiriyle çelişen bu sonuçlara açıklık getirmek amacıyla birçok varsayım öne sürülmüştür: (1) Çalışmalar arasında farklı yöntemlerin kullanılmış olması (ELISA, Western blot, INNO-BIA multiplex assay gibi), (2) çalışmalarda kullanılan hasta gruplarının, hastalık evreleri ve ciddiyeti açısından belirgin farklılık göstermesi, (3) ELISA yöntemi için farklı antikorların kullanılıyor olması, (4) monomerleri saptayan klasik ELISA yöntemiyle oligomerlerin belirlenememesi, (5) A β 'nın periferik dokularda da üretiliyor olması nedeniyle plazma A β 'nın, beyinden çok periferik dokuları yansıtıyor olması, (6) A β 'nın büyük bir kısmının (%99) dolaşımdaki proteinlere ve kan hücrelerine bağlanması nedeniyle serbest formun net olarak belirlenememesi, (7) kan örneği alınan tüpteki aktive olmuş trombositler tarafından salınan A β 'nın, hasta örneğine geçerek sonuç değerlerinde değişikliğe yol açması, (8) çalışmaların büyük bir kısmında, plazma A β düzeyleri üzerinde etkili olan yaş ve cinsiyet gibi faktörler açısından AH ve kontrol grupları arasında iyi bir denklik sağlanamamış olması, (9) A β düzeylerini ölçmek amacıyla standardize edilmiş bir prosedürün bulunmaması, (10) kontrol grubunun oluşturulması sırasında A β düzeylerini etkileyen ilaçların ve hastalık durumlarının dikkate alınmaması, (11) Alzheimer hastaları ile birinci dereceden akrabalık taşıyan sağlıklı yaşlıların diğer yaşlılara göre daha yüksek plazma A β düzeylerine sahip olması nedeniyle sağlıklı kontrollerin seçimi sırasında akrabalık durumunun dışlama kriterleri içine alınmamış olması, (12) plazma A β düzeylerini inceleyen çalışmaların birkaç tanesi dışında göreceli olarak az sayıda katılımcı içermesi, (13) preanalitik faktörler açısından (örneklerin depolanması ve standart örneklerinin hazırlanması gibi) çalışmalar arasında farklılıkların bulunması, (14)

dolaşımdaki A β 'nın, karaciğer ve böbrekte hızlıca temizlenmesi nedeniyle beyindeki artmış A β düzeylerini iyi bir şekilde yansıtamaması, (15) plazma A β düzeyleri ile kreatinin düzeyleri arasında güçlü bir korelasyonun bulunması nedeniyle grupların oluşturulması sırasında kreatinin düzeylerinin dikkate alınmamış olması.

Dolaşımdaki A β düzeylerini inceleyen çalışmaların çok büyük bir kısmında (~%85) çalışmamızda kullanmış olduğumuz ELISA yönteminin tercih edildiği görülmektedir. Ancak bu yöntemin dışında Western blot, elektroforetik ayırma, SELDI-TOF-MS ve INNO-BIA multiplex assay yöntemleri de kullanılmıştır. ELISA dışındaki diğer yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda (bir tanesi hariç), çalışmamızdakine benzer şekilde plazma A β düzeyleri açısından AH ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (317-319, 325, 354). AIBL çalışmasında ise plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri için ELISA yöntemiyle belirgin farklılık saptanmamış iken INNO-BIA multiplex assay yönteminin kullanıldığı ölçümlerde plazma A β 1-42'nin AH grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (329). AIBL çalışması, 1032 katılımcıyla gerçekleştirilmiş olup plazma A β düzeylerini inceleyen en büyük çalışma olarak göze çarpmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda, bizimkine benzer şekilde bu çalışmada da ELISA yöntemiyle yapılan ölçümler sonrasında A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinin, AH için anlamlı bir farklılık taşımadığı belirlenmiş fakat aynı kan örneklerinin INNO-BIA multiplex assay yöntemiyle ölçülmesinde anlamlı farklılık saptanmıştır (329). Bildiğimiz kadarıyla AIBL çalışması dışında yöntem karşılaştırması yapan başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durumda hangi yöntemden elde edilen sonuçların daha doğru olduğu hususu gündeme gelmekte ve bu duruma açıklık getirmek amacıyla iki yöntem arasında A β düzeyleri açısından karşılaştırma yapan ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. INNO-BIA multiplex assay yöntemiyle ölçüm yapılabilmesi için Luminex xMAP cihazının kullanılmasının gerekli olması, bu yönteminin tercih edilmesini büyük ölçüde kısıtlamaktadır. INNO-BIA multiplex assay yöntemiyle A β 1-40, A β 1-42, A β 40 ve A β 42'nin hepsi aynı anda analiz edilebilmektedir. Ayrıca analiz aşamalarının büyük bir kısmı Luminex xMAP cihazı tarafından gerçekleştirildiği için ölçüm yapan kişiden kaynaklanabilecek olan hatalar en aza indirilmektedir. Ayrıca standart bir metodoloji ve saptama prosedürü sağlaması nedeniyle farklı merkezler arasında karşılaştırma yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Fakat AIBL çalışmasında INNO-BIA multiplex assay yöntemiyle elde edilen plazma A β 1-40 ve A β 1-42 değerlerinin Perth şehrinde, Melbourne şehrine kıyasla daha düşük düzeylerde olduğu

belirlenmiştir. İki şehir arasında demografik veriler açısından belirgin bir farklılık olmadığı göz önünde bulundurulduğunda, INNO-BIA multiplex assay yöntemi açısından da aşılması gereken bazı yöntem problemlerinin olduğu görülmektedir (329). Literatürde plazma/serum A β düzeylerini ölçmeye yönelik standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmalarda elde edilen A β düzeylerine ilişkin konsantrasyon değerlerinin çok fazla değişkenlik gösterdiği göze çarpmaktadır. INNO-BIA multiplex assay yönteminden elde edilen değerlerin, ELISA yönteminden elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmektedir (329). Ayrıca serumdan elde edilen düzeyler, plazmaya göre yaklaşık iki kat daha yüksektir (349). A β 'nın serumda daha yüksek düzeylerde saptanmasına açıklama getirmek amacıyla aktive olmuş trombositlerden salınan A β 'nın, serum A β düzeylerinde artışa yol açtığı ileri sürülmüş fakat in vitro çalışmalarda, trombositlerin aktive edilmesinin A β düzeylerinde belirgin bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir (333, 355). Bu konuya ilişkin bir diğer açıklama ise serum örneklerinin plazmaya göre daha az immünglobulin içermesi nedeniyle antikorların maskeleyici etkisinin azalmış olması neticesinde ELISA yöntemiyle serum örnekleri için daha yüksek değerlerin elde edilmesidir (349). A β düzeylerini, serum ve plazma örneklerinde eşzamanlı olarak ölçerek karşılaştırma yapan yalnızca bir çalışma bulunmaktadır (349). Bu nedenle serum ve plazma örneklerinde saptanmış olan bu farklılığın doğrulanması ve sebeplerinin ortaya konması açısından ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

A β düzeylerini değerlendirmek amacıyla ortaya konmuş olan ilk ELISA prosedürü 1994 yılında Suzuki ve ekibi tarafından geliştirilmiş olup, kendi ürettikleri antikorları (N-terminali için BAN50 ve C-terminali için BA27/BC05) kullanarak plazma veya BOS örneklerinde A β düzeylerini saptayabildiklerini bildirmişlerdir (356). Bunun ardından Mehta ve ekibi tarafından peptidin N- (6E10) ve C-terminal (R162/R165) bölgelerine spesifik antikorlar geliştirilerek kendi test prosedürlerini bildirmişlerdir (352). Daha sonra diğer birçok ekip tarafından kendi ürettikleri ya da ticari firmalardan elde edilmiş olan antikorlar kullanılarak plazma veya BOS örneklerinde A β 'nın ölçülebilmesi sağlanmıştır. Ticari ELISA kiti kullanılmadan gerçekleştirilmiş olan tüm bu çalışmalar, konsantrasyon değerleri açısından büyük farklılık göstermektedir. Örneğin Mehta ve ark.larının önerdiği prosedürü uygulayan çalışmalar arasında hatta Mehta ve ark.larının kendi yaptıkları çalışmalar arasında bile elde edilen konsantrasyon değerleri açısından büyük farklılık bulunmaktadır (329, 336, 352, 357). Bu çalışmalar arasında muhtemelen test aşamalarındaki dilüsyon tekrar sayısında ya da

kullanılan sentetik A β peptidlerde farklılıkların bulunması nedeniyle bu tarz bir heterojeniteyle karşılaşmaktadır. Plazma/serum A β düzeylerini araştıran çalışmalarda, dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta standart olarak kullanılan sentetik A β peptidlerin, yeterli saflığa sahip olup olmadığıdır. Klasik saflaştırma yönteminde, trifloroasetik asit içeren sıvı asetonitril içinde ters-faz HPLC'nin yardımıyla saflaştırma yapılması sağlanmaktadır. Fakat A β peptidin, hidrofobik özelliğe sahip olması ve artmış agregasyon eğilimi taşıması nedeniyle klasik yöntemle bu peptidlerin başarılı bir şekilde saflaştırılması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle ilk dönem çalışmalarında kullanılan A β peptidlerin yeterli saflıkta olmadığı fakat ilerleyen dönemlerde geliştirilen yöntemler sayesinde %95-98 saflıkta A β peptid elde edilebildiği görülmektedir (144). İlk dönem çalışmalarda gözlenen çelişkili sonuçlarda bu durumun da katkısı bulunuyor olabilir. Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarından elde edilen plazma örneklerinin, -80 °C'de depolanması sağlanmıştır. Diğer çalışmalarda da genellikle bu tarz bir depolama sistemi kullanıldığı görülmektedir. Fakat depolama zamanı, çalışmalar arasında farklılık gösterebilmektedir. Bazı geniş kapsamlı çalışmalarda kan örneklerinin elde edilmesinden sonra göreceli olarak uzun bir depolama ve bekletilme süresi sonrasında A β düzeylerinin ölçüldüğü bildirilmiştir. Bu tarzdaki preanalitik faktörlerin, sonuçlar üzerindeki etkisini ortaya koymaya yönelik olarak elde edilen örneklerin kısa bir süre içinde çalışıldığı ya da değişik derecelerde ve farklı sürelerde depolandıktan sonra değerlendirilmeye alındığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Alzheimer hastalarında dolaşımdaki A β seviyelerini değerlendiren kesitsel çalışmalar, çalışma ve kontrol gruplarının oluşturulması açısından ele alındığında; çalışmaların büyük bir kısmında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlılık gösteren düzeylerde farklılık olduğu görülmektedir. Tüm çalışmalarda ortaya konabilmiş değilse de bu iki faktörün hem Alzheimer hastalarında hem de sağlıklı yaşlı bireylerde A β düzeyleri üzerinde belirgin etkileri olduğunu gösteren birçok bildiri bulunmaktadır. Yaşlanma, AH için en önemli risk faktörüdür. Bu nedenle yaş faktörünün, plazma/serum A β düzeyleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla çok sayıda çalışmanın gerçekleştirildiği görülmektedir. Fukumoto ve ark.larının çalışmasında, bir çok faktörün (yaş, MMSE skoru, eğitim düzeyi ve apoE ϵ 4 genotipi gibi) plazma A β düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve AH grubu için A β düzeyleri üzerinde etkili olan tek faktörün, yaş olduğu ortaya konmuştur (330). Mayeux ve ark.larının 530 kişi (79 AH ve 451 demans açısından sağlıklı yaşlı birey) kullanarak yaptıkları çalışmada, tüm bireylerin plazma A β düzeyleri ölçülmüş ve yaklaşık beş yıl sonra bu

bireylerden 307'sinde (%58) A β düzeyleri tekrar değerlendirildiğinde, A β 1-40'ın belirgin artış gösterdiği saptanmıştır. Sağlıklı bireyler, beş yıllık izlem süresi içinde AH gelişip gelişmemesine göre ikiye ayrıldığında ise AH gelişen kontrol bireylerinde, A β 1-42 düzeylerinin 1pg/mL/yıl olacak şekilde belirgin düşüş eğilimi taşıdığı belirlenmiştir (358). Bu bulgulara göre herhangi bir araştırma için kontrol grubu ve AH grubu arasında beş yıllık bir farkın bulunması durumunda çalışmaya yaş faktörü açısından yanlılık katılması kaçınılmazdır. Bu çalışmanın yanı sıra diğer çalışmalarda da 3,5-4,5 senelik izlem süresi sonunda AH gelişen sağlıklı bireylerde, AH gelişemeyenlere kıyasla A β 1-42 seviyelerinde anlamlı düşüş ortaya çıktığı gösterilmiştir (359-361). Hatta 2,5 senelik bir sürecin bile plazma A β 42 seviyelerinde belirgin değişikliğe yol açabildiği bildirilmiştir (362). Bu çalışmalardan elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda, kontrol grubunun oluşturulması sırasında çalışmaya alınan sağlıklı bireylerin ilerleyen dönemde AH'na yakalanıp yakalanmayacağı önceden öngörülemediği için gruplar arasında yaş faktörü açısından denklik sağlanmasının gerekliliği açıktır. AH'nda plazma/serum A β düzeylerini araştıran ve çalışma grupları arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğunu bildiren çalışmalarda, iki grup arasında en az beş senelik bir yaş farkının (5-16 yıl) olduğu göze çarpmaktadır. Gruplar arasında yaş ortalamaları açısından anlamlı farklılık olmadığını bildiren çalışmalar ele alındığında ise bu çalışmaların yaklaşık olarak yarısında, yaş ortalaması açısından 4-7 senelik bir fark ile karşılaşılmaktadır. Yaş ortalamaları açısından gözlenen bu farklılıklara, cinsiyet oranlarına ilişkin farklılıkların da eklenmesiyle kesitsel olarak gerçekleştirilen çalışmaların üçte ikisinden fazlasında, yaş ve cinsiyet açısından gruplar arasında homojen bir dağılımın yakalanamadığı görülmektedir. Bu iki faktörün A β düzeyleri üzerindeki etkisi göz önünde bulundurulduğunda, plazma A β düzeyleriyle ilişkili çalışmalardan elde edilen verilerin güvenilirliği büyük ölçüde kayba uğramaktadır. Yaş ve cinsiyet faktörünün yanı sıra A β 'nın dolaşımdaki düzeyleri üzerinde etkili olan diğer bir çok faktör tanımlanmıştır. İnsülin, piracetam, vitamin E, ginkgo biloba, PPAR- γ agonistleri, fibratlar ve benzodiazepinler gibi ilaçların plazma A β düzeylerinde değişikliğe yol açtığı gösterilmiştir (300-308). Ayrıca plazma/serum A β düzeylerinin, Alzheimer hastaları ile birinci dereceden akrabalık taşıyan sağlıklı bireylerde, diğer sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum yalnızca ailesel tip AH için geçerli olmayıp sporadik Alzheimer hastalarının birinci derece akrabalarında da yüksek plazma A β seviyeleriyle karşılaşılmaktadır (363-365). Bu nedenle kontrol grubuna seçilen

bireylerin, Alzheimer hastaları ile akrabalık taşıyıp taşımadıklarının sorgulanmaması durumunda ya da A β düzeyleri üzerinde etkili olan ilaçları kullananların çalışmadan dışlanmaması durumunda bu faktörler açısından çalışmaya yanlılık katılması kaçınılmazdır. Bu faktörlere ek olarak kreatinin düzeyleri ile A β düzeyleri arasında anlamlı korelasyon olduğunun gösterilmiş olması nedeniyle bu faktör açısından da gruplar arasında eşitlik sağlanması ve normal düzeylerden sapmış değerlere sahip bireylerin çalışmadan dışlanması gerekmektedir. Çalışmamızda tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak AH ve kontrol grupları arasında iyi bir şekilde denklik sağlanmış ve bu sayede elde ettiğimiz bulguların doğruluğunun artırılmasına çalışılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla literatürde, tüm bu faktörleri göz önünde bulunduran başka bir çalışma bulunmamaktadır. Tüm bu faktörleri dikkate almış olmamıza rağmen AH ve kontrol grupları arasında plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri açısından herhangi bir farklılık saptanmamış olması, bu peptidlerin AH tanısında diyagnostik bir belirteç olarak kullanılamayacaklarını düşündürmektedir.

Çalışmamız da dahil olmak üzere plazma/serum A β düzeylerini araştıran çalışmaların yalnızca %40'lık kısmında 50 ve üzeri sayıda hastanın yer aldığı görülmektedir. Çalışmaların %60'ında hasta sayısı 50'den küçüktür. Hasta sayısının fazla olmasının, hastalığın daha iyi yansıtılması ve çalışmaya ait yanlılıkların en aza indirilmesi açısından gerekli olduğu bilinmektedir. Plazma/serum A β düzeylerini araştıran çalışmalarda, AH grubunun en fazla 192 hastadan oluştuğu görülmektedir (345). Ayrıca 100'den fazla hastaya sahip olan çalışmalar, tüm çalışmaların yalnızca %20'sini oluşturmaktadır. Buna ek olarak yüksek hasta sayısına sahip olan bu çalışmaların büyük bir kısmında kontrol grubunda yer alan sağlıklı birey sayısının hasta sayısının çok altında olduğu görülmektedir. Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, fazla sayıda katılımcıyı içeren ve çok merkezli olarak planlanmış çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

AH'nın tanısında kullanılacak olan ideal bir diyagnostik belirtecin, en az %80 duyarlılık ve %80 özgüllük ile hasta ve sağlıklı kontrolleri birbirinden ayırt edebilmesi gerekmektedir (81). AH ve kontrol grupları arasında dolaşımdaki A β düzeyleri açısından farklılık saptayan çalışmaların yalnızca iki tanesinde duyarlılık ve özgüllük değerlerinin hesaplandığı görülmektedir (864, 870). Diğer çalışmalarda hasta ve sağlıklı kontroller arasında A β düzeyleri açısından belirgin çakışmanın gözlenmiş olması nedeniyle muhtemelen bu tarz bir hesaplama yapılmamıştır. Özgüllük ve duyarlılık hesaplaması yapan bu çalışmalara bakıldığında, plazma A β 40 konsantrasyonunu ya da A β 40/42 oranını kullanmanın yeterli

duyarlılık ve özgüllük taşımadığı görülmektedir (348, 350). AH patogenezinin karmaşık moleküler mekanizması göz önünde bulundurularak eş zamanlı olarak birden fazla biyokimyasal belirtece bakmanın daha doğru bir tanısal yaklaşım olacağı ileri sürülmüştür. AH tanısı için plazma A β düzeyleri ile diğer biyobelirteçlerin ikili birleşim şeklinde kullanıldığı yalnızca bir çalışmaya rastlanmaktadır. Ait-ghezala ve ark.larının gerçekleştirdiği bu çalışmada, plazma A β 40 ile sCD40 seviyeleri eş zamanlı olarak ölçülmüş ve tek başına kullanılmalarına göre birlikte değerlendirilmeleri sonrasında duyarlılık ve özgüllük değerlerinde belirgin artış yakalanmıştır (348). Çalışmamızda, AH ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık saptanması durumunda plazma A β ve diğer parametreler için duyarlılık ve özgüllük değerlerinin birlikte hesaplanması planlanmış fakat iki grup arasında A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinin benzer olması nedeniyle bu tarz bir hesaplama yapılmamıştır.

Tüm çalışmalarda gösterilebilmiş değilse de bazı çalışmalarda, plazma A β ile MMSE skoru arasında anlamlı korelasyonun olduğu ve hastalık evresindeki (ciddiyetindeki) artışın, A β düzeylerinde azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, herhangi bir çalışmada hastalık evreleri açısından homojenitenin sağlanamamış olması durumunda istenmeden de olsa çalışmaya yanlılık katılması kaçınılmazdır. Çalışmalar arasında A β düzeyleri açısından tutarsızlık gözlenmesinde bu durumun da katkısı bulunuyor olabilir. Örneğin yayınlanan bazı çalışmalarda sadece erken evredeki hastaların çalışmaya dahil edildiği bildirilmektedir ki bu çalışmalar ile ağırlıklı olarak ağır evre hastaları içeren çalışmalar arasında A β düzeyleri açısından belirgin farklılık gözlenmesi olası bir durumdur (327, 335, 339, 340). Çalışmaların büyük bir kısmında hastalık evresi açısından bilgi verilmemiş olması nedeniyle hastaların ağırlıklı olarak hangi evrede oldukları ya da hastalık evreleri açısından homojenitenin sağlanıp sağlanamadığına ilişkin doğru bir tespit yapılması güçleşmektedir. Çalışmalarda genellikle AH ve kontrol grubuna ait MMSE skor ortalamaları bildiriliyor olsa da ortalama değerlere bakarak AH grubundaki hastaların ağırlıklı olarak hangi evrede yer aldığının kestirilmesi güçtür. Örneğin MMSE skoru 5, 5, 10 ve 20 olan dört hastanın MMSE skor ortalaması 10 olarak hesaplanır. Bu durumda MMSE skoruna göre evreleme (0-9: ağır evre, 10-19: orta evre ve 20-26: hafif evre) yapıldığında, hastaların genel olarak orta evrede yer aldığı düşünülebilir. Fakat gerçekte sadece bir hasta orta evrede iken, iki hasta ağır evrede ve bir hasta ise hafif evrede yer almaktadır. Plazma A β düzeylerinin hastalık evresinden nasıl etkilendiğini ortaya koymak

amacıyla çalışmamızda, AH grubunun hafif, orta ve ağır evre olmak üzere üç evreye ayrılması sağlanmış ve bu evrelemenin ardından evreler ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Ayrıca evreler arasındaki karşılaştırmalarda da belirgin farklılık olmadığı gösterilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde hasta grubunu hafif, orta ve ağır evre olarak ayıran yalnızca üç çalışma bulunmaktadır (338, 342, 348). Baranowska-Bik ve ark.larının çalışmasında, hem AH ve hem de kontrol grubunda sadece kadın katılımcılar kullanılarak plazma A β 1-42 düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışmada, orta ve ağır evredeki hastaların yetersiz sayıda olması nedeniyle bu iki evre birleştirilerek tek evre olarak değerlendirilmeye alınmıştır. Böylece AH grubu, erken evre ve orta-ağır evre şeklinde iki gruba ayrıldıktan sonra sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması sağlanmış ve orta-ağır evredeki plazma A β 1-42 düzeylerinin kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir (338). Matsubara ve ark.larının çalışmasında (100 AH ve 241 sağlıklı kontrol) ise A β 42'nin tüm evrelerde kontrol grubuna göre hafif düzeyde yüksek olduğu gösterilmiş fakat bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlılık taşımadığı bildirilmiştir (342). AH grubunda evreleme yapan son çalışma, Xu ve ark.ları tarafından gerçekleştirilmiş olup tüm evrelerde kontrol grubuna göre A β 40 ve A β 42 düzeyleri için sırasıyla yüksek ve düşük değerler saptanmış fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir (348). Çalışmamızda dahil olmak üzere plazma A β düzeylerini evreleme yaparak değerlendiren çalışmalara ait sonuçların, birbiriyle tutarsızlık gösterdiği görülmektedir. Çalışmamızın, diğer üç çalışmaya göre önemli bir üstünlüğü, diğer çalışmalarda evreleme yaparken MMSE skorları kullanılmış iken çalışmamızda ise kognitif durumu daha iyi yansıtan ve daha hassas bir yöntem olan CDR'ye ait skorlar kullanılmıştır. MMSE'nin yaş, eğitim durumu ve cinsiyet gibi faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamıza benzer şekilde hastaların CDR'ye göre evrelenerek değerlendirildiği daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Bu sayede hastaların plazma A β düzeyleri açısından endofenotip taşıyıp taşımadıkları diğer bir ifadeyle farklı evrelerdeki hastalar arasında A β düzeylerinin değişiklik gösterip göstermediği daha iyi bir şekilde anlaşılabilir.

Plazma/serum A β düzeylerinin, hastalık progresyonu içinde değişiklik gösterip göstermediği diğer bir ifadeyle hastalık evrelerinden etkilenip etkilenmediğinin anlaşılmasında longitudinal olarak gerçekleştirilen çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Aynı hastalarda belirli bir zaman dilimi sonrasında plazma A β düzeylerinin tekrar ölçülmesi, A β 'nın prognostik bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağına ilişkin önemli veriler

sağlamaktadır. Plazma A β düzeylerinin hastalar arasında belirgin farklılık gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda, aynı hastada tekrarlayan ölçümler ile hastalık progresyonunu değerlendirmenin daha akıllıca bir yaklaşım olacağı açıktır. Bu konuya ilişkin olarak literatürde yalnızca bir çalışmaya rastlanmaktadır. Pesaresi ve ark.ları tarafından gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada, 146 hastanın bazal plazma A β 42 düzeyleri ölçülmüş ve daha sonra bu hastaların 20'sinde A β 42 düzeyi 1,5 sene sonra tekrar değerlendirildiğinde, başlangıç değerlerine göre belirgin bir farklılık saptanmamıştır (343). Bu çalışmada izleme alınmış olan 20 hastanın başlangıçta hangi evrede olduğu ve bu hastaların 1,5 sene sonra hastalık evresi açısından değişiklik gösterip göstermediklerine ilişkin her hangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmanın, çalışma dizaynı ve izleme alınan hasta sayısı açısından eksiklikler içermesi nedeniyle ileriye yönelik olarak planlanacak longitudinal çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu sayede plazma A β düzeyleri ile hastalık progresyonu arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi sağlanacaktır.

Günümüzde AH tedavisi için AchE inhibitörleri yaygın olarak kullanılmaktadır. AchE inhibitörlerinden biri olan rivastigminin, iki ve dört hafta süreyle uygulandıktan sonra hastaların plazma A β 42 düzeylerinde belirgin artışa yol açtığı gösterilmiştir (365, 366). Ayrıca donepezil verilmesinden iki hafta sonra A β 40 ve A β 42 düzeylerinin azaldığı fakat altı hafta sonra bu etkinin kaybolduğu belirlenmiştir (368). Modrego ve ark.larının çalışmasında ise galantaminin, 6 ay sonra A β düzeylerinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (369). Çalışmamızda bu üç grup ilacı alan hastalar arasında plazma A β düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmaya aldığımız hastaların, en az 6 ay süreyle poliklinik takipleri yapılması nedeniyle bu üç ilacın 6 ay veya daha uzun sürede A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinde değişiklik oluşturmadığı görülmektedir. Çalışmamızda bu üç ilaç arasından galantaminin daha az kullanıldığı göze çarpsa da ilaç alan gruplar arasında hastalık ciddiyeti ve demografik veriler açısından farklılık bulunmaması nedeniyle bu ilaçların, plazma A β düzeyleri üzerindeki etkisi hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Yine de AH grubunun ilaç kullanımı açısından üç gruba ayrılması sonrasında her gruptaki hasta sayısının anlamlı olarak azaldığı göz önünde bulundurulduğunda elde ettiğimiz bulgunun doğruluğu, daha fazla sayıda hasta içeren çalışmalarla doğrulanmalıdır.

Orta ve ileri yaşlarda yüksek serum kolesterol düzeylerine sahip olmanın, AH gelişme riskini arttırdığına dair bazı bildiriler bulunmaktadır. Fakat kolesterol ile AH riski arasındaki ilişki tüm çalışmalarda ortaya konabilmiş değildir (370-373). Aynı şekilde Alzheimer

hastalarının, yüksek serum kolesterol düzeylerine sahip olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi düşük ya da değişmeyen seviyeler bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Çalışmamızda serum total kolesterol (TK), HDL kolesterol, LDL kolesterol düzeyleri Alzheimer hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuşken, trigliserid (TG) düzeylerinin her iki grupta da benzer düzeylerde olduğu saptanmıştır. Corzo ve ark.larının çalışmasında, bizdekine benzer şekilde TK ve LDL düzeyleri AH grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ancak bizden farklı olarak HDL düzeyleri açısından gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır (323). Bu çalışmayı destekler şekilde AIBL çalışmasında da HDL düzeylerinin AH ve kontrol grupları arasında farklılık göstermediği bildirilmiştir (329). Ülkemizde 1251 katılımcıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, Alzheimer hastalarının ve normal kognitif fonksiyonlu bireylerin serum TG, TK, HDL ve LDL düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (28). Razay ve Vreugdenhil'in çalışmasında, TG düzeylerinin Alzheimer hastalarında kontrollere göre daha yüksek ve HDL düzeylerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (374). Hall ve ark.larının çalışmasında, kontrol grubu (n=1046) ile oldukça az sayıda hasta içeren AH grubu (n=29) arasında HDL açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (375). Alzheimer hastalarında kolesterol düzeylerini araştıran kesitsel çalışmalarda, hiperlipidemi tanısı almış olan hasta sayısına ilişkin herhangi bir verinin bulunmadığı göze çarpmaktadır. Ayrıca bu hastaların statin tedavisi alıp almadığı ya da statin tedavisiyle kolesterol düzeylerinin ne oranda regüle edildiğine dair bilgi verilmemektedir. Çalışmalar arasında gözlenen çelişkili sonuçların nedeni gruplar arasında karşılaştırma yapılırken bu durumun dikkate alınmamış olması olabilir. Çalışmamızda hiperlipidemi tanısı almış olan katılımcı sayısının, AH grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat fazla sayıda olduğu görülmektedir. Ancak Alzheimer hastalarında saptamış olduğumuz yüksek kolesterol düzeylerinde bu durumun etkisi bulunmamaktadır. Çalışmamızda hem AH hem de kontrol grubundaki hiperlipidemik hastaların hepsinin statin tedavisi aldığı ve büyük bir kısmında kolesterol düzeylerinin regüle seyrettiği belirlenmiştir. Ayrıca hiperlipidemi tanısı alan hastalar devre dışı bırakılarak gruplar arasında tekrar karşılaştırma yaptığımızda AH grubunda kolesterol düzeylerinin hala yüksek olduğu gözlenmiştir. İn vitro çalışmalar neticesinde HDL'nin, Aβ'nın dolaşımdaki taşınmasında etkin rol oynadığına ilişkin ipuçları elde edilmiştir (376, 377). Çalışmamızda Alzheimer hastalarında saptamış olduğumuz yüksek HDL kolesterol düzeyleri, bu çalışmaları destekler nitelikte olup muhtemelen Aβ'ya karşı koruyucu bir mekanizma olarak HDL

düzeylerinde artış gerçekleşmekte ve bu sayede dolaşımdaki serbest A β 'nın azaltılması sonucunda beyne geri taşınmasının önüne geçilmektedir.

Kolesterol yüksekliğinin, AH patogenezinde önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında, kolesterol yüksekliğinin α -sekretaz aktivitesini belirgin olarak azalttığı, β - ya da γ -sekretaz aktivitesini ise tam tersi olarak arttırdığı ve bu sayede A β üretiminde artışa yol açtığı gösterilmiştir (136, 137, 138). Dört ve sekiz hafta süreyle yüksek kolesterolü diyetle beslenen tavşanlarda, A β üretimi ve birikiminin artmış olduğu belirlenmiştir (378, 379). Ayrıca kolesterolle beslenen tavşanların hipokampuslarında β -sekretaz aktivitesinde artış olduğu rapor edilmiştir (380). Bunlara ek olarak diyetle hiperkolesterolemi oluşturulan APP transgenik farelerde, hiperkolesterolemik olmayan farelere göre beyindeki A β birikiminde belirgin artış tespit edilmiştir (381). Çalışmamızda AH grubundaki hastaların rutin biyokimya sonuçlarına göre hiperkolesterolemik olanlar ve olmayanlar şeklinde ikiye ayrılması sağlandıktan sonra plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinin karşılaştırılması yapılmış ve gruplar arasında belirgin farklılık saptanmamıştır. Ayrıca TK, LDL, HDL ve TG düzeyleri ile A β düzeyleri arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, hayvanlardan farklı olarak insanlarda hiperkolesterolemi sonucunda beyindeki A β düzeyleri üzerinde herhangi bir değişikliğin ortaya çıkmadığı düşünülebilir. Ancak plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinin, beyindeki A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerini iyi bir şekilde yansıtmıyor olması sonucunda böyle bir bulgu elde etmiş olmamız da olasıdır. Bu konunun aydınlatılması için daha fazla sayıda çalışmaya gerek olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda AH grubundaki katılımcıların, statin kullananlar ve kullanmayanlar şeklinde ikiye ayrılarak analiz edilmesi sağlanmış ve diğer çalışmalarla uyumlu olarak statin kullanımının plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Bilişsel becerileri yaşlarına göre beklenenden daha kötü olan, ancak yine de genel olarak bakıldığında kendini iyi idare eden ve demansı olmayan hastalarla karşılaşmak olasıdır. Bu nedenle son yıllardaki araştırmaların çoğu “hafif kognitif bozukluk (HKB)” olarak adlandırılan bu gri alanda yoğunlaşmıştır (382). 3-8 yıllık takip sonrasında HKB olgularının yaklaşık %70’inde AH geliştiği görülmektedir (383). Sağlıklı bireylerde HKB’a dönüşümün tahmin edilmesinde plazma A β 40 ya da A β 42/A β 40 oranını kullanmanın yararlı olduğu gösterilmiştir (384, 385). Fakat HKB’tan AH’na dönüşümün belirlenmesinde plazma A β düzeylerini kullanmanın yarar sağlamadığı bildirilmiştir (386).

A β 'nın hidrofobik özelliğe sahip olması nedeniyle sıvı ortam içindeyken agregasyon eğilimi gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca proteinlerle ve hücre membranındaki lipidlerle etkileşime girebildiği gösterilmiştir. Plazmada bulunan A β 'nın yalnızca %1-5'lik kısmı serbest formda olup geri kalan %95-99'luk kısmı plazma proteinleri ya da dolaşımdaki hücrelere bağlı haldedir (376, 387). A β 'yı bağlayan birçok plazma proteini bildirilmiştir (387). A β 'nın taşınmasından sorumlu esas plazma proteini henüz net bir şekilde ortaya konabilmiş değildir. Biere ve ark.larının çalışmasında radyoişaretle A β 1-40 ve A β 1-42 peptidlerinin sağlıklı bireylerden elde edilen plazmalara uygulanması sağlanmış ve işaretli A β 'ların %90 albumine ve %5 apolipoproteinlere bağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada HDL'nin, LDL ve VLDL'ye göre daha fazla (HDL>LDL>VLDL) A β bağladığı belirlenmiştir. Bunlara ek olarak A β 1-40 ve A β 1-42'nin albumine olan afinitesinin benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (376). Koudinov ve ark.larının in vitro olarak gerçekleştirdikleri çalışmada ise A β 'nın başlıca HDL ile taşındığı fakat LDL ve VLDL'ye bağlanmadığı saptanmıştır (377). Sagare ve ark.larının çalışmasında, plazmadaki A β 'yı bağlayan esas proteinin, sLRP olduğu gösterilmiştir. A β 40'ın %70'i ve A β 42'nin ise %90'ının bu proteine bağlı halde olduğu ileri sürülmüştür (11). Matsubara ve ark.larının çalışmasında albumin ve sLRP'den farklı olarak plazmadaki esas A β taşıyıcısının lipidden zengin lipoproteinler olduğu gösterilmiştir (342). Bu çalışmada plazmada bulunan lipoproteinler uzaklaştırılarak A β düzeylerinin ölçülmesi sağlanmıştır. Sonuç olarak lipoprotein içermeyen plazma örneklerindeki A β düzeylerinin, lipoprotein içeren doğal plazmaya göre %90 oranında azaldığı belirlenmiş ve bulguların yola çıkılarak plazmadaki esas A β taşıyıcısının lipoproteinler olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada, lipoprotein içermeyen plazmalar kullanılarak AH ve kontrol grupları arasında A β düzeyleri açısından karşılaştırma yapılmış ve AH grubunda serbest A β 42'nin belirgin şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (342). Proteinlerin yanı sıra kan hücrelerinin de A β taşınması açısından önemli olduğunu gösteren bildiriler bulunmaktadır (387, 388). Kuo ve ark.larının çalışmasında, sağlıklı bireylerden elde edilmiş eritrositler, önce yıkanmış ve daha sonra PBS ile dilüe edilerek değişik Htc seviyelerine (%10-50) ulaşılmıştır. Daha sonra dışardan A β 40 ve A β 42 uygulanarak eritrositlerin A β ile inkübe edilmesi sağlanmış ve ortam sıvısındaki serbest A β düzeyleri ölçülmüştür. Htc düzeylerindeki artışın serbest A β düzeylerinde belirgin azalmaya yol açtığı gösterilmiş ve bunun üzerine dolaşımdaki A β 'yı bağlayan önemli yapılardan birisinin, eritrosit membranı olduğu ileri sürülmüştür (387). Eritrosit membranının lipidden

zengin içeriğe sahip olması, muhtemelen hidrofobik A β peptidler için iyi bir kaçış platformu oluşturmaktadır. Ditto ve ark.larının çalışmasında, sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinden, plazma ve hücre pelleti elde edilmiştir. Daha sonra plazma ve pelletdeki A β 1-42 içeriğinin ELISA yöntemiyle ölçülmesi sağlandığında A β 1-42'nin %40'ının hücre pelletinde yer aldığı gösterilmiştir (388). Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre eritrositin yanı sıra trombosit ve lökositin de dahil olduğu tüm kan hücrelerinin, A β 1-42'nin taşınmasında etkin rol oynadığı anlaşılmaktadır. Çalışmamızda bu durum göz önünde bulundurularak AH ve kontrol grupları arasında eritrosit, lökosit ve trombosit sayıları açısından gruplar arasında iyi bir şekilde denklik oluşması sağlanmıştır.

Alzheimer hastalığında plazma A β düzeylerini araştıran çalışmalarda A β peptid düzeylerinin yaş, cinsiyet, MMSE, kreatinin, kolesterol seviyeleri ve diğer biyobelirteçler ile ilişkisi de araştırılmıştır. Çalışmaların bir kısmında yaş ve cinsiyet ile plazma/serum A β 1-40/42 ya da A β 40/42 düzeyleri arasında anlamlı korelasyon saptanmışken, diğerlerinde korelasyon saptanmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda cinsiyet ile plazma A β 1-40 ve A β 1-42 düzeyleri arasında her hangi bir korelasyon belirlenmemiş ayrıca her grup kendi içinde kadın ve erkek şeklinde ikiye ayrıldığında A β düzeylerinin cinsiyetler arasında farklılık göstermediği görülmüştür. Çalışmamızdan farklı olarak Fukumoto ve ark.larının çalışmasında, sağlıklı kontrollerde kadınların erkeklere göre daha yüksek plazma A β 40 düzeylerine sahip olduğu gösterilmiştir (330). Çalışmamızdaki yaş ile A β düzeyleri arasındaki korelasyon değerlendirmelerinde AH grubunda yaşın, A β 1-42 ile pozitif yönde korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Fakat bu ilişki kontrol grubunda belirlenememiştir. Bu durumda Alzheimer hastalarında yaşla birlikte A β 1-42 düzeylerinde artış gerçekleştiği görülmektedir. Fukumoto ve ark.larının çalışmasında ise yaşın, hem AH hem de kontrol grubunda A β 40 ve A β 42 düzeyleriyle pozitif yönde korelasyon gösterdiği saptanmıştır (330). MMSE ile A β düzeyleri arasındaki ilişki değerlendiren çalışmalar arasında da farklılıklar gözlenmektedir. MMSE ile plazma A β düzeyleri arasında anlamlı ilişki olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi çalışmamıza benzer şekilde herhangi bir ilişki saptanmamış olan çalışmalar da bulunmaktadır. Fakat çalışmaların büyük bir kısmında, MMSE ile A β arasında ilişkinin belirlenmemiş olması plazma A β düzeylerinin hastalık progresyonunu izlemede yararlı bir biyobelirteç olamayacağına işaret etmektedir. Fakat aynı bireylerin uzun süreli olarak takip edildiği longitudinal tip çalışmalar, A β düzeyleri ile hastalık ciddiyeti arasındaki ilişki hakkında daha net bilgi vereceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız sayesinde ilk defa A β 1-40 düzeyleri ile eritrosit sayısı, Hb ve Hct düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmış olup bu ilişkinin sadece sağlıklı kontrollerde bulunduğu gösterilmiştir. Böylece Alzheimer hastalarından farklı olarak sağlıklı yaşlılarda, A β 1-40'ın taşınmasında eritrositlerin önemli rol oynadığına ilişkin ipucu elde edilmiştir. Çalışmamızda A β 1-42 düzeyleri ile BUN ve kreatinin seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmış ve A β 1-42'nin temizlenmesinde böbreklerin önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Böbreklerden etkin bir şekilde temizlenemeyen serbest A β 1-42'nin, KBB'ndeki RAGE aracılığıyla beyne geri taşınması muhtemelen hastalık sürecini daha da kötüleştirecektir. Çalışmamıza benzer şekilde diğer bir çok çalışmada da hem AH hem de sağlıklı kontroller açısından plazma A β 1-42 ve A β 42 düzeyleri ile kreatinin düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon belirlenmiştir (12, 363). Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız KC fonksiyon testleri ile plazma A β düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırarak ilk çalışmadır. Çalışmamızda ilginç olarak KC fonksiyon testleri ile plazma A β düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon belirlenmemiştir. Dolaşımdaki A β 'nın hepatositler tarafından temizlenmesinde LRP reseptörlerinin aracılık ettiği düşünülmektedir (169). Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre A β 'nın temizlenmesinde, hepatositlerin genel olarak fonksiyon görmelerinden ziyade hepatosit membranındaki LRP düzeylerinin daha belirleyici olduğu anlaşılmıştır. Alzheimer hastaları ve sağlıklı kontrollerden elde edilecek olan KC dokularında, LRP ekspresyon düzeylerinin ortaya konması bu durumun daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Günümüzde yaygın olarak kabul gören görüşe göre AH'nın patogenezinin sorumlu olan asıl A β formları oligomerlerdir (344). Amiloid plak sayısı ile hastalığın ciddiyeti arasında korelasyonun saptanamaması olması ve monomer formların direkt olarak sitotoksik etkiye sahip olmaması bu varsayımı destekler niteliktedir. Hayvan çalışmaları ve postmortem beyin analizleri sayesinde A β oligomerlerinin, hastalık patofizyolojisindeki önemi daha iyi anlaşılmıştır. Alzheimer hastalarının beyinlerinde A β oligomer seviyelerinin belirgin olarak artmış olduğu görülmektedir (165, 166). Çalışmamızda A β 1-40 ve A β 1-42 düzeylerinin yanı sıra plazmadaki A β oligomer (A β O) düzeyleri de araştırılmış ve AH grubunda, sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermeyen düzeylerde düşüklük saptanmıştır. Ayrıca A β O seviyeleri hafif evreden ağır evreye doğru kademeli şekilde düşüş göstermiş ve ağır evrede, sağlıklı kontrollere göre belirgin olarak düşük seviyelere ulaşmıştır. Bu durumda A β O'lerin hastalığın özellikle ağır evresinin tanınmasında kullanılabilecek bir biyobelirteç olduğu fakat hastaları erken evrelerde tanıyamaması nedeniyle ideal bir belirteçte bulunması

gereken şartları yerine getiremediği görülmektedir. Çalışmamız dışında Alzheimer hastalarında dolaşımdaki A β oligomer düzeylerini araştıran yalnızca bir çalışma bulunmaktadır (344). Xia ve ark.ları tarafından 2009 yılında gerçekleştirilen bu çalışmada, bizdekine benzer şekilde sandviç ELISA yöntemi kullanılarak plazma A β O düzeyleri belirlenmiş ve bizden farklı olarak AH grubunda A β oligomerlerin artmış düzeyde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca A β 1-42 düzeylerinde düşüş saptamaları nedeniyle bu oligomerlerin, A β 1-42 kaynaklı olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (344). Xia ve ark.larının çalışmasında, kontrol ve AH gruplarının sırasıyla 10 ve 36 kişiden oluştuğu görülmekte fakat kontrol grubundaki yedi kişi ve AH grubundaki 17 kişide oligomer düzeylerinin saptama sınırının altında kalması nedeniyle değerlendirilmeye alınmadıkları görülmektedir. Sonuç olarak toplam 22 kişiyle gerçekleştirilen bu çalışma, bizim çalışmamızdaki toplam 100 kişilik sayının oldukça altında kalmıştır. Çalışmamızda Xia ve ark.larından farklı olarak ELISA kiti kullanıldığı için örneklerin hiç birisinde saptama problemi yaşanmamıştır. Xia ve ark.larının çalışmasında yer alan sağlıklı kontrollerin bizdekilere göre belirgin olarak daha az yaşlı oldukları görülmektedir. İki çalışma arasında hastalık evreleri ve yaş faktörü açısından farklılıkların bulunmasının, çalışmalar arasındaki tutarsızlıkta etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Kullanmış olduğumuz ELISA yöntemi, teorik olarak dimer formları saptamaya yönelik olarak dizayn edilmiş olsa da Xia ve ark.larına göre dimerlerin yanı sıra düşük molekül ağırlıklı diğer oligomerlerin (trimer, tetramer, pentamer, heksamer gibi) de saptanabilmesi mümkündür (344). Alzheimer hastalarının beyinlerinde düşük molekül ağırlıklı oligomerlerin artmış düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda ise bu oligomer formlarının düşük düzeyde saptanmış olması, beyinden kana doğru efektif bir şekilde taşınmadıklarını göstermektedir. AH'nda KBB'deki LRP düzeylerinde belirgin azalma ortaya çıktığı bilinmektedir (170). Hastalık neticesinde KBB'deki LRP düzeylerinin azalması muhtemelen oligomer formların sistemik dolaşıma doğru efektif bir şekilde taşınmasını engellemekte ve bunun neticesinde beyindeki oligomer düzeylerinde artış gerçekleşerek patofizyolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. A β monomerlerinin, sıvı ortam içindeyken bir araya geldikleri ve C-terminal bölgeleri iç tarafta kalacak şekilde oligomer formlar oluşturduğu bilinmektedir. Böylece monomerlere göre daha stabil yapılar ortaya çıkmaktadır. Plazmada bulunan monomerler, ağırlıklı olarak proteinler ve kan hücreleriyle taşınmakta iken oligomerler, daha stabil yapılar olmaları nedeniyle muhtemelen ağırlıklı olarak dolaşımda tek başına bulunmakta ve sonuç olarak KC'deki LRP reseptörleri

vasıtasıyla dolaşımdan temizlenmektedir. Bu sayede oligomer formların, ELISA yöntemiyle daha iyi saptandıkları ve hastalığın tanınmasında daha başarılı oldukları görülmektedir. HKB'lu hastalarda gerçekleştirilecek çalışmalar sayesinde plazma oligomer düzeylerini ölçmenin, Alzheimer hastalığının en erken evresi olan HKB'da tanısız açıdan yarar sağlayıp sağlamadığı ortaya konabilecektir. BOS sıvısında A β oligomerlerini değerlendiren bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle plazma ve BOS sıvılarında eş zamanlı olarak oligomer seviyelerini ölçecek olan çalışmalar ile plazma oligomer düzeylerinin beyindeki değişikliği ne derece yansıtabildiği daha iyi anlaşılabilecektir.

5.2. Serum sRAGE ve esRAGE bulgularının değerlendirilmesi

Ailesel AH'nda artmış A β üretimi sonucunda beyindeki artmış A β düzeyleriyle karşılaşmaktadır. Fakat sporadik AH'nda da A β üretiminde artış gerçekleşip gerçekleşmediğine ilişkin direkt kanıtlar bulunmamaktadır (20). Birçok araştırmacıya göre sporadik AH'ndan sorumlu olan esas mekanizma A β yıkımındaki ya da beyinden dolaşıma doğru olan temizlenmesindeki bozulmadır. A β 'nın KBB üzerindeki iki taşıyıcısından biri olan RAGE, A β 'yı dolaşımdan beyne doğru taşımaktadır (184). RAGE'nin en çok saptanan varyantı olan ve alternatif splicing ile sentezlenen esRAGE, transmembran parça ve sitoplazmik kuyruğa sahip değildir. Bu durum esRAGE'nin ekstraselüler aralığa salınmasına neden olur (196). Hücre membranında yer alan metalloproteinazların, membrana yakın bir noktadan RAGE'nin ekstraselüler bölgesini kesmesi ve kesilen bu parçanın sitoplazmaya salınması sonucunda tRAGE (truncated RAGE) üretilmektedir (221). t-RAGE, esRAGE'yle birlikte total çözünebilir RAGE (sRAGE) havuzunu oluşturmaktadır (219). KBB'nde yer alan RAGE, A β 'yı beyne doğru taşıması nedeniyle hastalık patogeneze katkıda bulunurken sRAGE, tuzak reseptör olarak işlev görmekte ve bu sayede dolaşımdaki serbest A β 'yı bağlayarak hastalığa karşı koruyucu bir mekanizma oluşturmaktadır. AH modeli oluşturulan hayvanlarda sistemik dolaşıma sRAGE uygulanmasının, beyindeki A β düzeylerini azalttığı ve hafıza performanslarını arttırdığı tespit edilmiştir (252). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda sRAGE'nin KBB'ni geçemediği gösterilmiş ve muhtemelen insanlarda da benzer şekilde sRAGE'nin yalnızca dolaşımda aktif rol oynadığı öne sürülmüştür. AH'nda KBB'deki endotel hücrelerinde RAGE ekspresyon düzeylerinin belirgin şekilde artmış olduğu gösterilmiştir (252, 255). Çalışmamızda KBB endotelinde gözlenen RAGE ekspresyon artışının, dolaşımdaki sRAGE seviyeleri üzerinden değerlendirilmesi amaçlandı. Beyinde üretilen sRAGE'nin KBB'ni geçememesi nedeniyle dolaşımdaki sRAGE düzeyleri,

muhtemelen periferik dokulardan ve başlıca KBB olmak üzere endotel hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Serum sRAGE düzeylerinin AH tanısında ne derece yararlı olduğunu ortaya koymaya yönelik olarak literatürde yalnızca üç çalışma bulunmaktadır (391-393). Emanuele ve ark.larının çalışmasında, sağlıklı kontrollere göre Alzheimer hastalarında serum sRAGE düzeylerinin belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (391). Yine aynı ekip tarafından yapılan bir başka çalışmada bu sefer AH, HKB ve kontrol grupları arasında karşılaştırma yapılmış ve önceki çalışmaya benzer şekilde AH grubunda, serum sRAGE düzeylerinin belirgin olarak düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca HKB'lu hastalarda sRAGE seviyelerinin kontrol grubundan daha düşük olduğu fakat AH grubundakiler kadar düşük seviyelere inmediği tespit edilmiştir (392). Hernanz ve ark.larının çalışmasında ise AH, HKB ve kontrol grupları arasında sRAGE düzeyleri açısından herhangi bir farklılık bulunmamıştır (393). Çalışmamızda, Hernanz ve ark.larının çalışmasına benzer şekilde AH ve kontrol grupları arasında serum sRAGE düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmamış fakat AH grubu evrelere ayrılarak değerlendirildiğinde ağır evrede, kontrollere ve diğer iki evreye göre sRAGE düzeylerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. KBB'deki artmış RAGE düzeylerine karşın sRAGE düzeylerinde ortaya çıkan azalmada, sRAGE'nin oluşumunda rol oynayan ADAM-10 ya da MMP-9'un ekspresyon seviyelerindeki olası bir azalmanın etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde bu iki enzimin KBB'deki ekspresyon düzeylerini araştıran herhangi bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle bu konunun daha iyi anlaşılması için AH modeli oluşturulan hayvanlarda ya da postmortem olarak Alzheimer hastalarından elde edilen beyinlerde immünohistokimyasal olarak yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Diğer üç çalışmada da bizdekine benzer şekilde aynı ELISA kiti kullanılmış ve serum örnekleri kullanılmıştır. Çalışmamızdaki sağlıklı kontrollere ait sRAGE konsantrasyon değerleri ile Emanuele ve ark.larının iki çalışmasındaki değerler arasında benzerlik bulunmakta fakat Hernanz ve ark.larının bildirdiği değerlerden daha düşük düzeylerde kaldığı görülmektedir (391-393). Diğer üç çalışmada, hastaların ağırlıklı olarak hangi evrede yer aldıkları ya da evreler açısından homojenite sağlanıp sağlanmadığı bildirilmemektedir. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak sRAGE düzeylerinin, hastalık evrelerinde değerlendirilmesi sağlanmış ve sRAGE düzeylerinin hastalık progresyonundan etkilendiği gösterilmiştir. Emanuele ve ark.larının iki çalışmasında da AH ve kontrol grubundaki katılımcıların bizdekilerden daha genç yaşta oldukları görülmekte fakat sRAGE seviyelerinin, tüm çalışmalarda yaş ile korelasyon göstermemiş olması nedeniyle yaş açısından gözlenen bu

farklılığın sonuçlar arasındaki tutarsızlıkta etkili olmadığını düşünmekteyiz. Emanuele ve ark.larının bildirdiklerine benzer şekilde çalışmamızda da serum sRAGE düzeyleri ile MMSE arasında pozitif yönde korelasyon belirlenmiştir (391, 392). Bu durumda hastalık ciddiyetindeki artış sonucunda her iki çalışmada da sRAGE seviyelerinde düşüş ortaya çıktığı görülmektedir. Ghidoni ve ark.larının çalışmasında, muhtemelen bizdekilerden daha fazla sayıda ağır evre Alzheimer hastanın bulunması nedeniyle serum sRAGE düzeyleri açısından farklılık ortaya çıkmaktadır. Hernanz ve ark.larının çalışmasında ise bizdekine benzer bir hasta grubunun bulunduğu düşünülebilir. Bu çalışmalardan elde edilen deneyimler, serum sRAGE düzeylerini hastalık evrelemesi yaptıktan sonra değerlendirmenin, çalışma sonuçlarının daha iyi yorumlanması açısından büyük önem taşıdığını göstermektedir. sRAGE düzeylerinin hastalık progresyonuna bağlı olarak düşüş göstermesi, sRAGE'ye ait koruyucu etkilerin hastalığın ilerleyen dönemlerinde ortadan kalktığını göstermektedir. Çalışmamıza benzer şekilde hastalık evreleri dikkate alınarak dizayn edilecek çalışmalar sayesinde, serum sRAGE düzeylerini kullanmanın Ghidoni ve ark.larının ileri sürdüğü şekilde gerçekten de tanısal bir değer taşıyıp taşımadığı daha iyi anlaşılacaktır. Çalışmamızda sRAGE düzeyleri ile A β 1-42 düzeyleri arasında hem AH hem de kontrol grubunda pozitif yönde korelasyon saptanmış olması, artmış A β 1-42 düzeylerine karşı sRAGE'nin koruyucu bir mekanizma sağladığını düşündürmektedir. Böylece A β 1-42'nin beyine doğru tekrar geri taşınmasının önüne geçilerek KC tarafından temizlenmesi sağlanıyor olabilir. sRAGE'den farklı olarak hücreler tarafından endojen olarak sentezlenen esRAGE, bir diğer çözünebilir RAGE formunu oluşturmaktadır (196). Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, Alzheimer hastalarında serum esRAGE düzeylerini araştıran ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızda sRAGE'ye benzer şekilde esRAGE düzeyleri açısından da AH ve kontrol grupları arasında belirgin farklılık saptanmamıştır. Ancak hastalık evresi ilerledikçe esRAGE düzeylerinde azalmanın ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu durumda ağır evredeki hastalarda, sRAGE'nin yanı sıra esRAGE'ye ait koruyucu etkinin de ortadan kalktığı görülmektedir. Günümüzde KBB'deki A β -RAGE etkileşimini engellemeye yönelik ya da direkt olarak sRAGE'nin uygulanmasına yönelik tedavi modelleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (280). Bu tür tedavi rejimlerinin uygulanmasıyla RAGE'nin zararlı etkilerine karşı hastaların korunması sağlanabilir. Sağlıklı bireyler ya da koroner kalp hastalarında yapılmış çalışmalarda, esRAGE/sRAGE oranına ilişkin olarak 1/4 ya da 1/5 gibi oranlar bildirilmiştir (196, 394). Fakat bu çalışmaların hiç birinde eş zamanlı olarak sRAGE ve esRAGE'nin ölçülmediği

görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, bu konuya yönelik olarak daha doğru veri elde edilmesi sağlanmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre hem Alzheimer hastaları hem de sağlıklı kontrollerde esRAGE/sRAGE oranının 1/3 şeklinde olduğu görülmektedir. Bu bulgulara göre ağır evre Alzheimer hastalarındaki sRAGE düzeylerinde ortaya çıkan düşüşte hem MMP-9/ADAM-10 enzim aktivitesindeki hem de esRAGE ekspresyon düzeylerindeki azalmanın etkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu durumla uyumlu olarak çalışmamızdaki korelasyon analizlerinde sRAGE ve esRAGE düzeyleri arasında güçlü bir korelasyonun varlığı göze çarpmaktadır.

5.3. Serum sLRP bulgularının değerlendirilmesi

A β 'nın KBB üzerindeki bir diğer taşıyıcısı olan LRP, RAGE'nin tam tersi olarak A β 'nın beyinden kana doğru temizlenmesini sağlamaktadır (184). Alzheimer hastalarında RAGE'nin tam tersi olarak LRP düzeylerinde düşüş ortaya çıkmaktadır (281). Bu durum A β 'nın beyinden dolaşıma doğru atılmasını engelleyerek hastalık patogenezinin belirgin katkıda bulunmaktadır. AH modeli oluşturulan hayvanlarda sistemik dolaşıma sLRP uygulanmasının, sRAGE'ye benzer şekilde beyindeki A β düzeylerini azalttığı ve hafıza performanslarını arttırdığı tespit edilmiştir. (170) Ayrıca yine sRAGE'ye benzer şekilde sLRP'nin de KBB'ni geçemediği gösterilmiştir (11). Bu durumda çalışmamızda ortaya konan sLRP düzeyleri, periferik olarak veya KBB endoteli tarafından üretilen sLRP'yi yansıtacak fakat beyinde üretilen sLRP hakkında bilgi vermeyecektir. Alzheimer hastalarında sLRP düzeylerini ortaya koymaya yönelik olarak sadece bir çalışma bulunmaktadır (11). Sagare ve ark.ları tarafından yapılan bu çalışmada, sağlıklı kontrollere göre Alzheimer hastalarında sLRP düzeylerinin belirgin olarak düştüğü fakat oksidize sLRP düzeylerinin tam tersi olarak arttığı gösterilmiştir (11). Bu bulgulara göre AH'nda sLRP'nin koruyucu etkisinin ortadan kalktığı görülmektedir. Ayrıca KBB'deki azalmış LRP ekspresyon düzeylerinin, plazma sLRP düzeyleri ile başarılı bir şekilde gösterilebildiği anlaşılmıştır. Çalışmamızda da sLRP düzeylerinin, hafif ve orta evrede bir miktar düştüğü gözlenmiş fakat bu düşüklüğün istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği belirlenmiştir. Bu konuya ilişkin olarak daha fazla sayıda katılımcıyı içeren çalışmaların planlanmasıyla plazma sLRP düzeyleri hakkında daha iyi bilgi sahibi olunabilecektir.

5.4. Serum neprilizin bulgularının değerlendirilmesi

A β 'nın beyinden temizlenmesinde etkin rol oynayan bir diğer mekanizma neprilizin (NEP) tarafından enzimatik olarak yıkıma uğratılmasıdır (177). NEP düzeyleri Alzheimer

hastalarının beyinlerinde belirgin olarak düşük seviyelerde saptanmaktadır (292). Çalışmamızda ise tam tersi olarak plazma NEP düzeyleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermeyen düzeylerde yüksek olarak saptanmıştır. Bu durumda plazma NEP düzeylerinin, beyindeki NEP düzeylerini iyi bir şekilde yansıtamadığı görülmektedir. Böbrek ve akciğerde NEP'in yüksek düzeyde eksprese edildiği bilinmektedir ki muhtemelen saptamış olduğumuz artmış NEP düzeyleri, bu organlardan kaynaklanan NEP'i daha fazla göstermektedir. Bu nedenle NEP seviyeleri açısından beyinde gözlenen düşüşün, serum düzeylerine yansımadığını düşünmekteyiz. AH'nda muhtemelen A β yıkımını arttırmaya yönelik olarak böbreklerdeki NEP ekspresyonu düzeylerinde artış gerçekleşmekte ve bunun sonucunda serum NEP düzeyleri artmış olarak saptanmaktadır. Alzheimer hastalarından postmortem olarak elde edilen böbrek dokularında NEP ekspresyon düzeylerinin, biyokimyasal ve immünohistokimyasal olarak araştırılması sayesinde bu konunun daha iyi anlaşılabilmesi sağlanacaktır. İdrardaki A β düzeyleri, plazmanın sadece %1'i seviyesindedir (395, 396). Fakat bu çalışmalarda idrardaki tam uzunluktaki A β peptidlerin değerlendirildiği fakat kesilmiş formların ortaya konmadığı görülmektedir. Böbreklerdeki yüksek düzeyde eksprese edilen NEP'in, dolaşımdaki A β peptidleri başarılı bir şekilde yıkıma uğratması olasıdır. Böylece idrarda saptanan %1'lik düzey, aslında NEP tarafından yıkılmayan tam uzunluktaki A β 'ları yansıtır olabilir. Bu konunun daha iyi anlaşılması için kesilmiş A β 'ları, idrar örneklerinde ayrıntılı bir şekilde değerlendirecek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kesilmiş A β formlarını BOS'ta inceleyen çalışmalar bulunsun da BOS'taki düzeylerin idrara göre çok daha yüksek olması nedeniyle aynı saptamaların idrarda yapılması daha zor olacaktır. Nanoteknolojik olarak geliştirilen yöntemler sayesinde proteinlerin femtomolar veya attomolar seviyelerinde belirlenebilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu durumda nanoteknoloji tabanlı ölçüm yöntemleriyle idrardaki kesilmiş A β formlarının saptanabilmesinin mümkün olduğu görülmektedir. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla A β 'yı sistemik dolaşımdan temizleyen esas organın karaciğer mi yoksa böbrekler mi olduğu hususu daha iyi ortaya konabilecektir.

Sonuç olarak,

Çalışmamızda Alzheimer hastalarının CDR skorlamasına göre evrelendirilmesi sağlanarak A β 1-40, A β 1-42, A β oligomer, sRAGE, esRAGE, sLRP ve neprilizin dolaşımdaki düzeyleri ölçüldü. Tüm parametreler için AH ve kontrol grupları arasındaki

karşılaştırmalarda anlamlı farklılık saptanmadı. Hastaların hafif, orta ve ağır evre olmak üzere klinik olarak evrelere ayrılmasından sonra ağır evredeki hastalara ait A β oligomer düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre belirgin olarak daha düşük olduğu tespit edildi. Ayrıca A β oligomer, sRAGE ve esRAGE düzeylerinin hastalık evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık gösteren farklılıklar içerdiği belirlendi.

Çalışılan tüm parametrelerin, cinsiyetler arasında farklılık göstermediği görüldü. Ayrıca esRAGE dışındaki diğer tüm parametrelerin antikolinergik ilaç kullanımından etkilenmediği tespit edildi.

A β oligomer düzeylerinin ağır evre ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık göstermesi üzerine duyarlılık ve özgüllük hesaplamasına gidilerek A β oligomerlerinin %69 duyarlılık ve %84 özgüllük ile ağır evre hastaları sağlıklı kontrollerden ayırt edebildiği görüldü.

Alzheimer hastalarında A β oligomer, sRAGE ve esRAGE düzeylerinin MMSE ve CDR skorları ile korelasyon gösterdiği ve hastalık progresyonundan etkilendiği saptandı. Ayrıca yaşlanmanın ve serum kreatinin düzeylerinin A β 1-42 seviyeleri üzerinde belirgin etkisi olduğu belirlendi.

Alzheimer hastalarından farklı olarak sağlıklı bireylerde, A β 1-40'ın dolaşımdaki taşınmasında eritrositlerin de önemli rol oynadığına ilişkin ön veriler elde edildi.

Alzheimer hastalarında dolaşımdaki A β oligomer, sRAGE ve sLRP düzeylerini araştıran öncü çalışmalardan elde edilen veriler ile çalışmamızdaki bulgular arasında uyumsuzluk bulundu ve bu nedenle ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu görüldü.

Çalışmamız sayesinde ilk kez serum neprilizin ve esRAGE düzeylerinin Alzheimer hastalarında ölçülmesi sağlandı. Yine bir ilk olarak sRAGE ve esRAGE düzeylerinin eş zamanlı olarak aynı bireylerde ölçülmesiyle esRAGE/sRAGE oranı, 1:3 olarak doğru bir şekilde ortaya konulmuş oldu. Ayrıca daha önceki plazma/serum A β düzeylerini araştıran çalışmalardan elde edilen veriler göz önünde bulundurularak A β düzeyleri üzerinde etkili olan birçok faktör açısından AH ve kontrol grupları arasında sıkı bir şekilde denklik sağlandı ve yapılan karşılaştırmalar sonrasında plazmadaki serbest A β düzeylerini ölçmenin tanısal açıdan yarar sağlamadığı sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR VE EKLER

6.1. KAYNAKLAR

1. Flirski M, Sobow T. Biochemical markers and risk factors of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2005;2:47-64.
2. Sobow T, Flirski M, Liberski PP. Amyloid-beta and tau proteins as biochemical markers of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2004;64:53-70.
3. Kulstad JJ et al. Differential modulation of plasma beta-amyloid by insulin in patients with Alzheimer disease. *Neurology.* 2006;66(10):1506-10.
4. Matsubara E et al. Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol.* 1999;45(4):537-41.
5. Fukumoto H et al. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol.* 2003;60(7):958-64.
6. Wang R et al. Effects of HNE-modification induced by Abeta on neprilysin expression and activity in SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 2009;108(4):1072-82.
7. Turner AJ et al. Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1035:1-20.
8. Deane R et al. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke.* 2004;35(11 Suppl 1):2628-31.
9. Hampel H et al. Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2010;223(2):334-46.
10. Maruyama M et al. Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2005;57(6):832-42.
11. Sagare A et al. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med.* 2007;13(9):1029-31.
12. Arvanitakis Z et al. Serum creatinine levels correlate with plasma amyloid Beta protein. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002;16(3):187-90.
13. Tamaki C et al. Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide (1-40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 2007;72(4):850-5.
14. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 2011;10:819-28.
15. Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1997;349:1546-9
16. Small DH, Cappai R. Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective. *J Neurochem.* 2006;99:708-10.
17. Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, et al. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA.* 1997;278:1363-71.
18. Graeber MB, Mehraein P. Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999;249 S3:10-3.
19. Gürvit Hİ. Demans sendromu, Alzheimer hastalığı ve Alzheimer dışı demanslar. Bahar SZ ve Öge AE, editörler. Nöroloji 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2004;367-415.

20. Saido TC, Iwata N. Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neurosci Res*. 2006;54:235-53.
21. Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer's disease: Lessons learned in two decades. *Turk Norol Derg*. 2010;16:1-11.
22. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007;3:186-91.
23. Jorm AF, Jolley D. The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology*. 1998;51:728-33.
24. Lopez OL. The growing burden of Alzheimer's disease. *Am J Manag Care*. 2011;Suppl 13:S339-45.
25. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA*. 1989;262:2551-6.
26. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, et al. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*. 2003;60:1119-22.
27. Gürvit H, Emre M, Tinaz S, Bilgic B, et al. The prevalence of dementia in an urban Turkish population. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*. 2008;23:67-76.
28. Cankurtaran M, Yavuz BB, Halil M, Dagli N, et al. Are serum lipid and lipoprotein levels related to dementia? *Arch Gerontol Geriatr*. 2005;41:31-9.
29. Türkiye İstatistik Kurumu. Adrese dayalı nüfus kayıt sistemi 2011 sonuçları. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/adnksdagitapp/adnks.zul>
30. United States Census Bureau. 2010 census briefs. <http://2010.census.gov/news/releases/operations/cb11-cn147.html>
31. Central Intelligence Agency. The World factbook; European Union. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ee.html>
32. United States Census Bureau. 1950 census, characteristics of the population. <http://www.census.gov/prod/www/abs/decennial/1950cenpopv2.html>
33. United Nations. World population ageing 2009. <http://www.un.org/esa/population>
34. Minino A, Murphy SL, Xu J, Kochanek K. Deaths: Final Data for 2008. National Vital Statistics Reports, Hyattsville, Md.; National Center for Health Statistics, 2011.
35. Alzheimer's Association. 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2012;8:131-68.
36. Wimo A, Winblad B, Jönsson L. The worldwide societal costs of dementia: Estimates for 2009. *Alzheimers Dement*. 2010;6:98-103.
37. Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer's disease: Lessons learned in two decades. *Turk Norol Derg*. 2010;25:1-11.
38. Theuns J, Marjaux E, Vandenbulcke M, Van Laere K, et al. Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Hum Mutat*. 2006;27:888-96.
39. Shen J, Kelleher RJ 3rd. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:403-9.
40. Rademakers R, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *Scientific World Journal*. 2003;3:497-519.
41. Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*. 1991;353: 844-6
42. Bertram L. The genetics of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. 2008;89:223-32.

43. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;375:754-60.
44. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995;376:775-8.
45. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995;269:973-7.
46. Bertram L, Tanzi RE. The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res*. 2004;50:385-96.
47. Hutton M, Hardy J. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 1997;6:1639-46.
48. Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 2012;120 Suppl 1:9-21.
49. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 1998;391:387-90.
50. Levy-Lahad E, Poorkaj P, Wang K, Fu YH, et al. Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics*. 1996;34:198-204.
51. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, et al. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med*. 1996;2:224-9.
52. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:1977-81.
53. Lohmann E. Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Turkiye Klinikleri Neurol-Special Topics*. 2009;2:25-30.
54. Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. *Indian J Med Res*. 2010;132:363-78.
55. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. Raber J, Huang Y, Ashford JW. *Neurobiol Aging*. 2004;25:641-50.
56. Okuizumi K. The role of apolipoprotein E in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nihon Rinsho*. 1999;57:2673-7.
57. Golabek AA, Soto C, Vogel T, Wisniewski T. The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid b-peptide is dependent on b-peptide conformation. *J Biol Chem*. 1996;271:10602-6.
58. Wisniewski T, Castano EM, Golabek AA, Vogel T et al. Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol*. 1994;145:1030-5.
59. Ma J, Yee A, Brewer HB, Das S et al. Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature*. 1994;372:92-4.
60. Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, et al. Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest*. 1994;94:860-9.
61. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, et al. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:9649-53.

62. Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: Allelic variation and receptor interactions. *Neuron*. 1993;11:575–80.
63. LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, et al. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem*. 1994;269:23403–6.
64. Yang DS, Smith JD, Zhou ZM, Gandy SE, et al. Characterization of the binding of amyloid- β peptide to cell culture-derived native apolipoprotein E2, E3, and E4 isoforms and to isoforms from human plasma. *J Neurochem*. 1997;68:721–5.
65. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*. 2008;118:4002–13.
66. Ward A, Crean S, Mercaldi CJ, Collins JM, et al. Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*. 2012;38:1–17.
67. Reitz C, Mayeux R. Use of genetic variation as biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1180:75–96.
68. Sánchez-Guerra M, Combarros O, Infante J, Llorca J, et al. Case-control study and meta-analysis of low density lipoprotein receptor-related protein gene exon 3 polymorphism in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2001;316:17–20.
69. Kovacs DM. $\alpha 2$ -macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2000;35:473–9.
70. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994. DSM-IV Alzheimer tipi demans (DAT) kriterleri.
71. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, et al. 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;34:939–44.
72. Lim A, Tsuang D, Kukull W, Nochlin D, et al. Clinico-neuropathological correlation of Alzheimer's disease in a community-based case series. *J Am Geriatr Soc*. 1999;47:564–9.
73. Jobst KA, Barnetson LP, Shepstone BJ. Accurate prediction of histologically confirmed Alzheimer's disease and the differential diagnosis of dementia: the use of NINCDS-ADRDA and DSM-III-R criteria, SPECT, X-ray CT, and Apo E4 in medial temporal lobe dementias. Oxford Project to Investigate Memory and Aging. *Int Psychogeriatr*. 1998;10:271–302.
74. Blacker D, Albert MS, Bassett SS, Go RC, et al. Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol*. 1994;51:1198–204.
75. Risse SC, Raskind MA, Nochlin D, Sumi SM, et al. Neuropathological findings in patients with clinical diagnoses of probable Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 1990;147:168–72.
76. Beach TG, Monsell SE, Phillips LE, Kukull W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71:266–73.
77. Boller F, Lopez OL, Moosy J. Diagnosis of dementia: clinicopathologic correlations. *Neurology*. 1989;39:76–9.

78. Mendez MF, Mastri AR, Sung JH, Frey WH 2nd. Clinically diagnosed Alzheimer disease: neuropathologic findings in 650 cases. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1992;6:35-43.
79. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001;56:1143-53.
80. Tarawneh R, Holtzman DM. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006148.
81. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol Aging*. 1998;19:109-16.
82. Schneider P, Hampel H, Buerger K. Biological marker candidates of Alzheimer's disease in blood, plasma, and serum. *CNS Neurosci Ther*. 2009;15:358-74.
83. Teunissen CE, de Vente J, Steinbusch HW, De Bruijn C. Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging*. 2002;23:485-508.
84. Sjögren M, Minthon L, Davidsson P, Granérus A-K, et al. CSF levels of tau, beta-amyloid(1-42) and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging. *J Neural Transm*. 2000;107:563-79.
85. Olsson A, Vanderstichele H, Andreasen N, De Meyer G, et al. Simultaneous measurement of beta-amyloid(1-42), total tau, and phosphorylated tau (Thr181) in cerebrospinal fluid by the xMAP technology. *Clin Chem*. 2005;51:336-45.
86. Nielsen HM, Minthon L, Londos E, Blennow K, et al. Plasma and CSF serpins in Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology*. 2007;69:1569-79.
87. Smach MA, Charfeddine B, Lammouchi T, Harrabi I, et al. CSF beta-amyloid 1-42 and tau in Tunisian patients with Alzheimer's disease: the effect of APOE epsilon4 allele. *Neurosci Lett*. 2008;440:145-9.
88. Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol*. 2001;58:373-9.
89. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*. 1999;52:1555-62.
90. Ivanoiu A, Sindic CJ. Cerebrospinal fluid TAU protein and amyloid beta42 in mild cognitive impairment: prediction of progression to Alzheimer's disease and correlation with the neuropsychological examination. *Neurocase*. 2005;11:32-9.
91. Briani C, Ruggero S, Naccarato M, Cagnin A, et al. Combined analysis of CSF betaA42 peptide and tau protein and serum antibodies to glycosaminoglycans in Alzheimer's disease: preliminary data. *J Neural Transm*. 2002;109:393-8.
92. Zetterberg H. Is plasma amyloid-beta a reliable biomarker for Alzheimer's disease? *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2008;3:109-11.
93. Clarke EE, Shearman MS. Quantitation of amyloid-beta peptides in biological milieu using a novel homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay. *J Neurosci Methods*. 2000;102:61-8.
94. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis Mon*. 2010;56:484-546.
95. Memiş L, Sezer C. Alzheimer hastalığında patolojik bulgular. *T Klin J Neur*. 2003;1:27-31.

96. İnan L. Alzheimer hastalığında histopatoloji. *Demans Dizisi*. 1999;1:52-61.
97. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:4245-9.
98. Masters CL, Selkoe DJ. Biochemistry of amyloid b-protein and amyloid deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006262.
99. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1991;41:479-86.
100. Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82:239-59.
101. Spar JE, La Rue A. Geriyatrik psikiyatri. s 195-7. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, 2006.
102. Saka E. Alzheimer hastalığında patolojik ve nörokimyasal değişiklikler. *Türkiye Klinkleri J Neurol-Special Topics*. 2009;2:20-4.
103. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, et al. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 1982;215:1237-9.
104. Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006;113:1625-44.
105. Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J Clin Psychiatry*. 2006;67 Suppl 3:3-7.
106. German DC, Manaye KF, White III CL, Woodward DJ, et al. Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann Neurol*. 1992;32:667-76.
107. Schaeffer EL, Gattaz WF. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology*. 2008;198:1-27.
108. Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, et al. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res*. 2000;2:85-97.
109. Müller UC, Zheng H. Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Feb;2(2):a006288.
110. Wang Y, Ha Y 2004. The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell*. 15: 343–353.
111. Allinquant B, Hantraye P, Mailleux P, Moya K, et al. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol*. 1995;128: 919–927.
112. Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH . The β -amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci*. 1997; 17: 9407–9414.
113. Herard AS, Besret L, Dubois A, Dauguet J, et al. siRNA targeted against amyloid precursor protein impairs synaptic activity in vivo. *Neurobiol Aging*. 2006; 27: 1740–1750.
114. Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, et al. A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci*. 2007;27: 14459–14469.
115. Chen CD, Oh SY, Hinman JD, Abraham CR. Visualization of APP dimerization and APP-Notch2 heterodimerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Neurochem*. 2006;97:30–43.
116. Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med*. 2010;12:1-12.

117. Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, et al. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2002;51:783-6.
118. Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, et al. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med.* 2003 Jan;9(1):3-4.
119. Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ. alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299:373-376.
120. De Strooper B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev.* 2010;90:465-94.
121. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci.* 1999;14: 419-427.
122. Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, et al. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97: 1456-1460.
123. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature.* 1999;402: 537-540.
124. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, et al. β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999; 286: 735-741
125. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature.* 1999;402: 533-537.
126. Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, et al. BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:9712-9717.
127. Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, et al. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J. Neurosci.* 2005;25:11693-11709.
128. Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, et al. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004;41:27-33.
129. Vetrivel K. S., Zhang Y. W., Xu H. and Thinakaran G. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol. Neurodegener.* 2006;1:4.
130. Zhang Y. W., Luo W. J., Wang H. et al. Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other presenilin/ gamma-secretase components. *J. Biol. Chem.* 2005;280:17020-17026.
131. Francis R., McGrath G., Zhang J. et al. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* 2002;3:85-97.
132. Lee J, Retamal C, Cuitino L, Caruano-Yzermans A, et al. Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J Biol Chem.* 2008;283:11501-8.
133. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:185-204.
134. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2011;4:3.
135. Grösgen S, Grimm MO, Friess P, Hartmann T. Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:966-74.

136. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6460-4.
137. Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, et al. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5815-20.
138. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5856-61.
139. Peri A, Benvenuti S, Luciani P, Deledda C, et al. Membrane cholesterol as a mediator of the neuroprotective effects of estrogens. *Neuroscience*. 2011;191:107-17.
140. Beel AJ, Sakakura M, Barrett PJ, Sanders CR. Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid-Alzheimer's disease relationships? *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801:975-82.
141. Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, et al. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol*. 1994;126:88-94.
142. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*. 2000;7:321-31.
143. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006270.
144. Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, et al. Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng*. 2005;99:437-47.
145. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, et al. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem*. 1997;272:22364-72.
146. Finder VH, Glockshuber R. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis*. 2007;4:13-27.
147. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol*. 1997;4:119-25.
148. Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, et al. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci*. 1999;19:8876-84.
149. Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, et al. Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. *J Biol Chem*. 2006;281:27916-23.
150. Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, et al. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem*. 1999;274:25945-52.
151. Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*. 2007;101:1172-84.
152. Hartley DM, Zhao C, Speier AC, Woodard GA, et al. Transglutaminase induces protofibril-like amyloid beta-protein assemblies that are protease-resistant and inhibit long-term potentiation. *J Biol Chem*. 2008;283:16790-800.

153. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6448-53.
154. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*. 2001;24:219-24.
155. Lambert MP, Viola KL, Chromy BA, Chang L, et al. Vaccination with soluble Abeta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J Neurochem*. 2001;79:595-605.
156. Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, et al. Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*. 2002;924:133-40.
157. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, Baker LK, et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*. 2002;277:32046-53.
158. Kim HJ, Chae SC, Lee DK, Chromy B, et al. Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein. *FASEB J*. 2003;17:118-20.
159. Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:10417-22.
160. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, et al. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*. 2004;24:10191-200.
161. Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, et al. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*. 2002;418:291.
162. Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, et al. Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:6370-5.
163. Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, Tada M, et al. Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (Abeta) assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem*. 2009;284:32895-905.
164. Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, et al. Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2005;95:834-47.
165. Kuo WL, Gehm BD, Rosner MR. Cloning and expression of the cDNA for a Drosophila insulin-degrading enzyme. *Mol Endocrinol*. 1990;4:1580-91.
166. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999;46:860-6.
167. Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, et al. Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem*. 1993;61:1965-8.
168. Miners JS, Barua N, Kehoe PG, Gill S, et al. Aβ-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70:944-59.
169. Zlokovic BV, Deane R, Sagare AP, Bell RD, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β-peptide elimination from the brain. *J Neurochem*. 2010;115:1077-89.
170. Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid-β(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2000;106:1489-99.
171. Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009;118:103-13.

172. Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005;28:202-8.
173. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, et al. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature.* 1996;380:168-71.
174. Iwata N, Higuchi M, Saido TC. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther.* 2005;108:129-48.
175. Leissring MA. The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases. *J Biol Chem.* 2008;283:29645-9.
176. Nalivaeva NN, Beckett C, Belyaev ND, Turner AJ. Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J Neurochem.* 2012;120 Suppl 1:167-85.
177. Saido T, Leissring MA. Proteolytic Degradation of Amyloid β -Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:a006379.
178. Zhang R, Hu X, Khant H, Ludtke SJ, et al. Interprotofilament interactions between Alzheimer's Abeta1-42 peptides in amyloid fibrils revealed by cryoEM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:4653-8.
179. Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett.* 2003;350:113-6.
180. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, et al. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science.* 2001;292:1550-2.
181. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, et al. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* 2003;40:1087-93.
182. Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, et al. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci.* 2001;21:2561-70.
183. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:4162-7.
184. Deane R, Zlokovic BV. Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2007;4:191-7.
185. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008;57:178-201.
186. Ito S, Ueno T, Ohtsuki S, Terasaki T. Lack of brain-to-blood efflux transport activity of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) for amyloid-beta peptide(1-40) in mouse: involvement of an LRP-1-independent pathway. *J Neurochem.* 2010;113:1356-63.
187. Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, , et al. Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:909-18.
188. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, et al. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron.* 2004;43:333-44.
189. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001;108:779-84.
190. Lee CY, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm.* 2010;117:949-60.

191. Paresce DM, Chung H, Maxfield FR. Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J Biol Chem*. 1997;272:29390-7.
192. Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, et al. Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol Biol Cell*. 2007;18:1490-6.
193. Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*. 1996;17:553-65.
194. Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci*. 2005;25:8240-9.
195. Yamamoto M, Kiyota T, Walsh SM, Liu J, et al. Cytokine-mediated inhibition of fibrillar amyloid-beta peptide degradation by human mononuclear phagocytes. *J Immunol*. 2008;181:3877-86.
196. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116:621-37.
197. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. 1992;267:14987-97.
198. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*. 2008;22:1572-80.
199. Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW. The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010:539581.
200. Xie J, Burz DS, He W, Bronstein IB, et al. Hexameric calgranulin C (S100A12) binds to the receptor for advanced glycosylated end products (RAGE) using symmetric hydrophobic target-binding patches. *J Biol Chem*. 2007;282:4218-31.
201. Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, et al. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J*. 2007;26:3868-78.
202. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, et al. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*. 1993;143:1699-712.
203. Rong LL, Yan SF, Wendt T, Hans D, et al. RAGE modulates peripheral nerve regeneration via recruitment of both inflammatory and axonal outgrowth pathways. *FASEB J*. 2004;18:1818-25.
204. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol*. 2003;162:1123-37.
205. Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, et al. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol*. 1995;146:688-94.
206. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, et al. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:97-104.
207. Drinda S, Franke S, Rüster M, Petrow P, et al. Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2005;25:411-3.

208. Lu C, He JC, Cai W, Liu H, et al. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11767-72.
209. Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, et al. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol*. 2001;171:29-45.
210. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83:876-86.
211. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59:1117-1128.
212. Hanford LE, Enghild JJ, Valnickova Z, Petersen SV, et al. (2004) Purification and characterization of mouse soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE). *J Biol Chem* 279:50019-24.
213. Malherbe P, Richards JG, Gaillard H, Thompson A, et al. cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;71:159-70.
214. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 2003;370:1097-109.
215. Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, et al. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta*. 2003;1630:1-6.
216. Park IH, Yeon SI, Youn JH, Choi JE, et al. Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol*. 2004;40:1203-11.
217. Ding, Q., and Keller, J. N. Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. *Neurosci. Lett*. 2005; 373, 67-72.
218. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*. 2008;22:1572-80.
219. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr Med Chem*. 2006;13:1971-8.
220. Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. Endogenous Secretory RAGE as a Novel Biomarker for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Diseases. *Biomark Insights*. 2007;2:331-9.
221. Galichet A, Weibel M, Heizmann CW. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 May 23;370:1-5.
222. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*. 2008;22:3716-27.
223. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, et al. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2008;283:35507-16.

224. Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG, Davì G. Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical and therapeutical implications. *Curr Med Chem*. 2009;16(8):940-52.
225. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114:597-605.
226. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382:685-91.
227. Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci*. 2006;26:6011-8.
228. Chaney MO, Stine WB, Kokjohn TA, Kuo YM, et al. RAGE and amyloid beta interactions: atomic force microscopy and molecular modeling. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1741:199-205.
229. Chen X, Walker DG, Schmidt AM, Arancio O, et al. RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease. *Curr Mol Med*. 2007;7:735-42.
230. Sturchler E, Galichet A, Weibel M, Leclerc E, et al. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *J Neurosci*. 2008;28:5149-58.
231. Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, et al. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest*. 2003;111:959-72.
232. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem*. 1999;274:31740-9.
233. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*. 1999;97:889-901.
234. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000;405:354-60.
235. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem*. 1999;274:19919-24.
236. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, et al. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem*. 1997;272:17810-4.
237. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001;50:1495-504.
238. Origlia N, Righi M, Capsoni S, Cattaneo A, Fang F, Stern DM, Chen JX, Schmidt AM, Arancio O, Yan SD, Domenici L. Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid-beta-mediated cortical synaptic dysfunction. *J Neurosci*. 2008;28:3521-30.
239. Bierhaus A, Nawroth PP. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*. 2009;52:2251-63.
240. Zlokovic BV. New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2008;5:409-14.

241. Zlokovic BV, Ghiso J, Mackic JB, McComb JG, Weiss MH, Frangione B. Blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197:1034-40.
242. Maness LM, Banks WA, Podlisny MB, Selkoe DJ, Kastin AJ. Passage of human amyloid beta-protein 1-40 across the murine blood-brain barrier. *Life Sci.* 1994;55:1643-50.
243. Zlokovic BV, Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Wisniewski T, McComb JG, Frangione B, Ghiso J. Brain uptake of circulating apolipoproteins J and E complexed to Alzheimer's amyloid beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:1431-7.
244. Ghilardi JR, Catton M, Stimson ER, Rogers S, Walker LC, Maggio JE, Mantyh PW. Intra-arterial infusion of [125I]A beta 1-40 labels amyloid deposits in the aged primate brain in vivo. *Neuroreport.* 1996;7:2607-11.
245. Martel CL, Mackic JB, McComb JG, Ghiso J, Zlokovic BV. Blood-brain barrier uptake of the 40 and 42 amino acid sequences of circulating Alzheimer's amyloid beta in guinea pigs. *Neurosci Lett.* 1996;206:157-60.
246. Martel CL, Mackic JB, Matsubara E, Governale S, Miguel C, Miao W, McComb JG, Frangione B, Ghiso J, Zlokovic BV. Isoform-specific effects of apolipoproteins E2, E3, and E4 on cerebral capillary sequestration and blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid beta. *J Neurochem.* 1997;69:1995-2004.
247. Poduslo JF, Curran GL, Haggard JJ, Biere AL, Selkoe DJ. Permeability and residual plasma volume of human, Dutch variant, and rat amyloid beta-protein 1-40 at the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 1997;4:27-34.
248. Mackic JB, Stins M, McComb JG, Calero M, Ghiso J, Kim KS, Yan SD, Stern D, Schmidt AM, Frangione B, Zlokovic BV. Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1-40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest.* 1998;102:734-43.
249. Poduslo JF, Curran GL. Amyloid beta peptide as a vaccine for Alzheimer's disease involves receptor-mediated transport at the blood-brain barrier. *Neuroreport.* 2001;12:3197-200.
250. Mackic JB, Bading J, Ghiso J, Walker L, Wisniewski T, Frangione B, Zlokovic BV. Circulating amyloid-beta peptide crosses the blood-brain barrier in aged monkeys and contributes to Alzheimer's disease lesions. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:303-13.
251. Monro OR, Mackic JB, Yamada S, Segal MB, Ghiso J, Maurer C, Calero M, Frangione B, Zlokovic BV. Substitution at codon 22 reduces clearance of Alzheimer's amyloid-beta peptide from the cerebrospinal fluid and prevents its transport from the central nervous system into blood. *Neurobiol Aging.* 2002;23:405-12.
252. Deane R, Du Yan S, Subramanyam RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Maness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003;9:907-13.
253. Maczurek A, Shanmugam K, Münch G. Inflammation and the redox-sensitive AGE-RAGE pathway as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1126:147-51.
254. Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, Rogers J, Schmidt AM, Stern DM, Yan SD. Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in

- Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol*. 2001;171:29-45.
255. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382:685-91.
 256. Arancio O, Zhang HP, Chen X, Lin C, Trinchese F, Puzzo D, Liu S, Hegde A, Yan SF, Stern A, Luddy JS, Lue LF, Walker DG, Roher A, Buttini M, Mucke L, Li W, Schmidt AM, Kindy M, Hyslop PA, Stern DM, Du Yan SS. RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J*. 2004;23:4096-105.
 257. Yan SD, Stern D, Kane MD, Kuo YM, Lampert HC, Roher AE. RAGE-Abeta interactions in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Restor Neurol Neurosci*. 1998;12:167-73.
 258. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:552-7.
 259. Mruthinti S, Sood A, Humphrey CL, Swamy-Mruthinti S, Buccafusco JJ. The induction of surface β -amyloid binding proteins and enhanced cytotoxicity in cultured PC-12 and IMR-32 cells by advanced glycation end products. *Neuroscience*. 2006;142:463-473.
 260. Gasic-Milenkovic J, Dukic-Stefanovic S, Deuther-Conrad W, Gärtner U, Münch G. β -amyloid peptide potentiates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide, interferon -gamma and 'advanced glycation endproducts' in a murine microglia cell line. *European Journal of Neuroscience*. 2003;17:813-821.
 261. Businaro R, Leone S, Fabrizi C, et al. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against A β amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases A β amyloid neurotoxicity at high doses. *Journal of Neuroscience Research*. 2006;83:897-906.
 262. Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC, Griffin WST. Increased S100 β neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiology of Aging*. 1992;13(1):1-7.
 263. Peskind ER, Griffin WST, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 2001;39:409-413.
 264. Boom A, Pochet R, Authalet M, et al. Astrocytic calcium/zinc binding protein S100A6 over expression in Alzheimer's disease and in PS1/APP transgenic mice models. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004;1742:161-168.
 265. Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*. 2008;88:887-918.
 266. Strickland DK, Ranganathan S. Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1663-70.
 267. Bu G, Cam J, Zerbinatti C. LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1086:35-53.
 268. Andersen OM, Willnow TE. Lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 2006;29:687-94.
 269. Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:141-72.
 270. Van Uden E, Kang DE, Koo EH, Masliah E. LDL receptor-related protein (LRP) in Alzheimer's disease: towards a unified theory of pathogenesis. *Microsc Res Tech*. 2000;50:268-72.

271. May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med*. 2007;39:219-28.
272. Deane R, Sagare A, Zlokovic BV. The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier Abeta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2008;14:1601-5.
273. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009;63(3):287-303.
274. Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science*. 1994;264:1471-4.
275. Willnow TE, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J. Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4537-41.
276. Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest*. 1998;101:689-95.
277. Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein e and apolipoprotein e receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006312.
278. Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS. Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:66-74.
279. Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1884-93.
280. Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009;8:16-30.
281. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, Koo EH. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest*. 2000 Nov;106:1159-66.
282. May P, Herz J. LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic*. 2003;4:291-301.
283. Kerr MA, Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochemical Journal*. 1974;137:477-88.
284. Malfroy B, Swerts JP, Guyon A et al. High affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature*. 1978;276:523-526.
285. Matsas R, Fulcher IS, Kenny AJ, Turner AJ. Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:3111-5.
286. Letarte M, Vera S, Tran R et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *Journal of Experimental Medicine*. 1988;168:1247-53.
287. Morisaki N, Moriwaki S, Sugiyama-Nakagiri Y, Haketa K, Takema Y, Imokawa G. Neprilysin is identical to skin fibroblast elastase: its role in skin aging and UV responses. *J Biol Chem*. 2010;285:39819-27.
288. Malito E, Hulse RE, Tang WJ. Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:2574-85.
289. Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays*. 2001;23:261-9.

290. Morelli L, Llovera R, Ibendahl S, Castaño EM. The degradation of amyloid beta as a therapeutic strategy in Alzheimer's disease and cerebrovascular amyloidoses. *Neurochem Res*. 2002;27:1387-99.
291. Carson JA, Turner AJ. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem*. 2002;81:1-8.
292. Nalivaeva NN, Balyeav ND, Zhuravin IA, Turner AJ. The Alzheimer's Amyloid-Degrading Peptidase, Neprilysin: Can We Control It? *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;383796:12.
293. Wang DS, Dickson DW, Malter JS. β -Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006:58406.
294. Hama E, Saido TC. Etiology of sporadic Alzheimer's disease: somatostatin, neprilysin, and amyloid beta peptide. *Med Hypotheses*. 2005;65:498-500.
295. Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 2004 ;429:883-91.
296. Howell S, Nalbantoglu J, Crine P. Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides*. 1995;16:647-52.
297. Saido TC, Nakahara H. Proteolytic degradation of A β by neprilysin and other peptidases. In: A β metabolism and Alzheimer's disease (Saido TC, ed). Texas: Landes Bioscience. 2003;61-80.
298. Leissring MA, Saido TC. in Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, Molecular and Cellular Biology (Sisodia S, Tanzi R, eds) Springer-Verlag New York Inc. New York. 2007;157-178,
299. Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S. Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2008;18:240-52.
300. Blasko I, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, et al. Plasma amyloid beta protein 42 in non-demented persons aged 75 years: effects of concomitant medication and medial temporal lobe atrophy. *Neurobiol Aging*. 2005;26:1135-43.
301. Galasko DR, Graff-Radford N, May S, Hendrix S, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and Abeta levels after short-term administration of R-flurbiprofen in healthy elderly individuals. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2007;21:292-9.
302. Höglund K, Wiklund O, Vanderstichele H, Eikenberg O, et al. Plasma levels of beta-amyloid(1-40), beta-amyloid(1-42), and total beta-amyloid remain unaffected in adult patients with hypercholesterolemia after treatment with statins. *Arch Neurol*. 2004;61:333-7.
303. Tokuda T, Tamaoka A, Matsuno S, Sakurai S, et al. Plasma levels of amyloid beta proteins did not differ between subjects taking statins and those not taking statins. *Ann Neurol*. 2001;49:546-7.
304. Serrano-Pozo A, Vega GL, Lütjohann D, Locascio JJ, et al. Effects of simvastatin on cholesterol metabolism and Alzheimer disease biomarkers. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2010;24:220-6.
305. Ishii K, Tokuda T, Matsushima T, Miya F, et al. Pravastatin at 10 mg/day does not decrease plasma levels of either amyloid-beta (Abeta) 40 or Abeta 42 in humans. *Neurosci Lett*. 2003;350:161-4.
306. Sjögren M, Gustafsson K, Syversen S, Olsson A, et al. Treatment with simvastatin in patients with Alzheimer's disease lowers both alpha- and beta-cleaved amyloid precursor protein. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003;16:25-30.

307. Fishel MA, Watson GS, Montine TJ, Wang Q, et al. Hyperinsulinemia provokes synchronous increases in central inflammation and beta-amyloid in normal adults. *Arch Neurol*. 2005;62:1539-44.
308. Blasko I, Jungwirth S, Jellinger K, Kemmler G, et al. Effects of medications on plasma amyloid beta (A β) 42: longitudinal data from the VITA cohort. *J Psychiatr Res*. 2008;42:946-55.
309. Jensen M, Song XH, Suzuki N, Lannfelt L, Younkin SG. *Soc Neurosci*. 1995. Abstr. 21, 1501.
310. Song XH, Suzuki N, Bird T, Peskind E, Schellenberg G, Younkin SG. *Soc. Neurosci*. 1995. Abstr. 21, 1501.
311. Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1995;38:643-8.
312. Fleisher AS, Raman R, Siemers ER, Becerra L, Clark CM, Dean RA, et al. Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2008;65:1031-8.
313. Siemers ER, Friedrich S, Dean RA, Gonzales CR, Farlow MR, Paul SM, et al. Safety and changes in plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta after a single administration of an amyloid beta monoclonal antibody in subjects with Alzheimer disease. *Clin Neuropsychopharmacol*. 2010;33:67-73.
314. Siemers ER, Quinn JF, Kaye J, Farlow MR, Porsteinsson A, Tariot P, et al. Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology*. 2006;66:602-4.
315. Black RS, Sperling RA, Safirstein B, Motter RN, Pallay A, Nichols A, et al. A single ascending dose study of bapineuzumab in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2010;24:198-203.
316. Siemers ER, Dean RA, Friedrich S, Ferguson-Sells L, Gonzales C, Farlow MR, et al. Safety, tolerability, and effects on plasma and cerebrospinal fluid amyloid-beta after inhibition of gamma-secretase. *Clin Neuropsychopharmacol*. 2007;30:317-25.
317. Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schröder J, Zeffass R, Förstl H, et al. Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem*. 1996;271:22908-14.
318. Le Bastard N, Aerts L, Leurs J, Blomme W, De Deyn PP, Engelborghs S. No correlation between time-linked plasma and CSF A β levels. *Neurochem Int*. 2009;55:820-5.
319. Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, Paul S, Svitek J, Miertschischkn J, et al. Electrophoretic separation of amyloid β peptides in plasma. *Electrophoresis*. 2004;25:3336-43.
320. Öztürk C, Özge A, Yalın OÖ, Yılmaz İA, Delialioğlu N, Yıldız Ç, et al. The diagnostic role of serum inflammatory and soluble proteins on dementia subtypes: Correlation with cognitive and functional decline. *Behave Neurol*. 2007;18:207-15.
321. Sedaghat F, Dedousi E, Costa V, Dimitriadis AS, Baloyannis SJ. Plasma levels of amyloid beta1-42 are independent of neuronal function in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2009;17:343-8.

322. Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, Ishikawa K, Oguni E, Komatsuzaki Y, et al. Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1996;141:65-8.
323. Corzo L, Zas R, Rodríguez S, Fernández-Novoa L, Cacabelos R. Decreased levels of serum nitric oxide in different forms of dementia. *Neurosci Lett.* 2007;420:263-7.
324. Tamaoka A. Characterization of amyloid beta protein species in the plasma, cerebrospinal fluid and brains of patients with Alzheimer's disease. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 1998;35:273-7.
325. Bibl M, Esselmann H, Mollenhauer B, Weniger G, Welge V, Liess M, et al. Blood-based neurochemical diagnosis of vascular dementia: a pilot study. *J Neurochem.* 2007;103:467-74.
326. Le Bastard N, Leurs J, Blomme W, De Deyn PP, Engelborghs S. Plasma amyloid-beta forms in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 2010;21:291-301.
327. Sparks DL, Petanceska S, Sabbagh M, Connor D, Soares H, Adler C, et al. Cholesterol, copper and Abeta in controls, MCI, AD and the AD cholesterol-lowering treatment trial (ADCLT). *Curr Alzheimer Res.* 2005;2:527-39.
328. Kester MI, Verwey NA, van Elk EJ, Scheltens P, Blankenstein MA. Evaluation of plasma Abeta40 and Abeta42 as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2010;31:539-40.
329. Lui JK, Laws SM, Li QX, Villemagne VL, et al. Plasma amyloid-beta as a biomarker in Alzheimer's disease: the AIBL study of aging. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(4):1233-42.
330. Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC. Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol.* 2003;60:958-64.
331. Giedraitis V, Sundelöf J, Irizarry MC, Gårevik N, Hyman BT, Wahlund LO, et al. The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2007;427:127-31.
332. Iwatsubo T. Amyloid beta protein in plasma as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1998;19:161-3.
333. Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Castaño EM, Van Vickle GD, Kalback WM, et al. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2009;5:18-29.
334. Vanderstichele H, Van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, et al. Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid.* 2000;7:245-58.
335. Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol.* 2007;64:343-9.
336. Mehta PD, Pirttilä T, Patrick BA, Barshatzky M, Mehta SP. Amyloid β protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett.* 2001;304:102-6.

337. Bermejo-Pareja F, Antequera D, Vargas T, Molina JA, Carro E. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *BMC Neurol.* 2010;10:108.
338. Baranowska-Bik A, Bik W, Wolinska-Witort E, Martynska L, Chmielowska M, Barcikowska M, et al. Plasma beta amyloid and cytokine profile in women with Alzheimer's disease. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29:75-9.
339. Fagan AM, Head D, Shah AR, Marcus D, Mintun M, Morris JC, et al. Decreased cerebrospinal fluid Abeta(42) correlates with brain atrophy in cognitively normal elderly. *Ann Neurol.* 2009;65:176-83.
340. Kulstad JJ, Green PS, Cook DG, Watson GS, Reger MA, Baker LD, et al. Differential modulation of plasma beta-amyloid by insulin in patients with Alzheimer disease. *Neurology.* 2006;66:1506-10.
341. Matsubara E, Ghiso J, Frangione B, Amari M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, et al. Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol.* 1999;45:537-41.
342. Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, et al. Soluble Abeta homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins. *Neurobiol Aging.* 2004;25:833-41.
343. Pesaresi M, Lovati C, Bertora P, Mailland E, Galimberti D, Scarpini E, et al. Plasma levels of beta-amyloid (1-42) in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging.* 2006;27:904-5.
344. Xia W, Yang T, Shankar G, Smith IM, Shen Y, Walsh DM, et al. A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2009;66:190-9.
345. Pesaresi M, Batelli S, Prato F, Polito L, Lovati C, Scarpini E, et al. The urokinase-type plasminogen activator polymorphism PLAU_1 is a risk factor for APOE-epsilon4 non-carriers in the Italian Alzheimer's disease population and does not affect the plasma Abeta(1-42) level. *Neurobiol Dis.* 2007;25:609-13.
346. Squitti R, Barbati G, Rossi L, Ventriglia M, Dal Forno G, Cesaretti S, Moffa et al. Excess of nonceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF [beta]-amyloid, and h-tau. *Neurology.* 2006;67:76-82.
347. Luis CA, Abdullah L, Paris D, Quadros A, Mullan M, Mouzon B, et al. Serum beta-amyloid correlates with neuropsychological impairment. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn.* 2009;16:203-18.
348. Xu W, Kawarabayashi T, Matsubara E, Deguchi K, Murakami T, Harigaya Y, et al. Plasma antibodies to Abeta40 and Abeta42 in patients with Alzheimer's disease and normal controls. *Brain Res.* 2008;1219:169-79.
349. Abdullah L, Paris D, Luis C, Quadros A, Parrish J, Valdes L, et al. The influence of diagnosis, intra- and inter-person variability on serum and plasma Abeta levels. *Neurosci Lett.* 2007;428:53-8.

350. Ait-ghezala G, Abdullah L, Volmar CH, Paris D, Luis CA, Quadros A, et al. Diagnostic utility of APOE, soluble CD40, CD40L, and Abeta1-40 levels in plasma in Alzheimer's disease. *Cytokine*. 2008;44:283-7.
351. Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC. Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66:264-71.
352. Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2000;57:100-5.
353. Buerger K, Frisoni G, Uspenskaya O, Ewers M, Zetterberg H, Geroldi C, et al. Validation of Alzheimer's disease CSF and plasma biological markers: the multicentre reliability study of the pilot European Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (E-ADNI). *Exp Gerontol*. 2009;44:579-85.
354. Frankfort SV, van Campen JP, Tulner LR, Beijnen JH. Serum amyloid beta peptides in patients with dementia and age-matched non-demented controls as detected by surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS). *Curr Clin Pharmacol*. 2008;3:144-54.
355. Olsson A, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K. Unaltered plasma levels of beta-amyloid(1-40) and beta-amyloid(1-42) upon stimulation of human platelets. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003;16:93-7.
356. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994;264:1336-40.
357. Mehta PD, Pirttilä T. Increased cerebrospinal fluid A beta38/A beta42 ratio in Alzheimer disease. *Neurodegener Dis*. 2005;2:242-5.
358. Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, et al. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology*. 2003;61:1185-90.
359. Mayeux R, Tang MX, Jacobs DM, Manly J, Bell K, Merchant C, Small SA, Stern Y, Wisniewski HM, Mehta PD. Plasma amyloid beta-peptide 1-42 and incipient Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999;46:412-6.
360. Schupf N, Tang MX, Fukuyama H, Manly J, Andrews H, Mehta P, et al. Peripheral Abeta subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:14052-7.
361. Pomara N, Willoughby LM, Sidtis JJ, Mehta PD. Selective reductions in plasma Abeta 1-42 in healthy elderly subjects during longitudinal follow-up: a preliminary report. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2005;13:914-7.
362. Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, et al. Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging*. 2008;29:1-11.
363. Abdullah L, Luis C, Paris D, Ait-ghezala G, Mouzon B, Allen E, et al. High serum Abeta and vascular risk factors in first-degree relatives of Alzheimer's disease patients. *Mol Med*. 2009;15:95-100.
364. Ertekin-Taner N, Ronald J, Feuk L, Prince J, Tucker M, et al. Elevated amyloid beta protein (Abeta42) and late onset Alzheimer's disease are associated with single

- nucleotide polymorphisms in the urokinase-type plasminogen activator gene. *Hum Mol Genet.* 2005;14:447-60.
365. Ertekin-Taner N, Younkin LH, Yager DM, Parfitt F, et al. Plasma amyloid beta protein is elevated in late-onset Alzheimer disease families. *Neurology.* 2008;70:596-606.
 366. Sobow T, Kloszewska I. Short-term treatment with rivastigmine and plasma levels of Abeta peptides in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2005;43:340-4.
 367. Sobow T, Flirski M, Liberski P, Kloszewska I. Plasma Abeta levels as predictors of response to rivastigmine treatment in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2007;67:131-9.
 368. Basun H, Nilsberth C, Eckman C, Lannfelt L, Younkin S. Plasma levels of Abeta42 and Abeta40 in Alzheimer patients during treatment with the acetylcholinesterase inhibitor tacrine. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2002;14:156-60.
 369. Modrego PJ, Monleon I, Sarasa M. The clinical significance of plasmatic amyloid A{beta}-40 peptide levels in Alzheimer's disease patients treated with galantamine. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2008;23:286-90.
 370. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, et al. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann Intern Med.* 2002;137:149-55.
 371. Tan ZS, Seshadri S, Beiser A, Wilson PW, et al. Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch Intern Med.* 2003;163:1053-7.
 372. Romas SN, Tang MX, Berglund L, Mayeux R. APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology.* 1999;53:517-21.
 373. Li G, Shofer JB, Kukull WA, Peskind ER, et al. Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease: A community-based cohort study. *Neurology.* 2005;65:1045-50.
 374. Razay G, Vreugdenhil A, Wilcock G. The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2007;64:93-6.
 375. Hall K, Murrell J, Ogunniyi A, Deeg M, et al. Cholesterol, APOE genotype, and Alzheimer disease: an epidemiologic study of Nigerian Yoruba. *Neurology.* 2006;66:223-7.
 376. Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, et al. Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem.* 1996;271:32916-22.
 377. Koudinov A, Matsubara E, Frangione B, Ghiso J. The soluble form of Alzheimer's amyloid beta protein is complexed to high density lipoprotein 3 and very high density lipoprotein in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:1164-71.
 378. Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, Liu H, et al. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains with dietary cholesterol. *Experimental Neurology.* 1994;126:88-94.

379. Sparks DL, Kuo YM, Roher A, Martin T, et al. Alteration of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *ANNALS of the New York Academy of Sciences*. 2000;903:335-344.
380. Ghribi O, Larsen B, Schrag M, Herman MM. High cholesterol content in neurons increases BACE, β -amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Experimental Neurology*. 2006;200:460-7.
381. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*. 2000;7:321-31.
382. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999;56:303-8.
383. Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2001;58:1985-92.
384. Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, et al. Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2007;64:354-62.
385. Lopez OL, Kuller LH, Mehta PD, Becker JT, Gach HM, Sweet RA, et al. Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. *Neurology*. 2008;70:1664-71.
386. van Rossum IA, Vos S, Handels R, Visser PJ. Biomarkers as predictors for conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer-type dementia: implications for trial design. *J Alzheimers Dis*. 2010;20:881-91.
387. Kuo YM, Kokjohn TA, Kalback W, Luehrs D, et al. Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268:750-6.
388. Ditto NT, Kline TR, Alfinito PD, Slemmon JR. Enrichment and analysis of Alzheimer's Abeta1-42 peptide in human plasma and whole blood. *J Neurosci Methods*. 2009;182:260-5.
389. Slemmon JR, Painter CL, Nadanaciva S, Catana F, et al. Distribution of Abeta peptide in whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;846:24-31.
390. Lanz TA, Schachter JB. Solid-phase extraction enhances detection of beta-amyloid peptides in plasma and enables Abeta quantification following passive immunization with Abeta antibodies. *J Neurosci Methods*. 2008;169:16-22.
391. Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, et al. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol*. 2005;62:1734-6.
392. Ghidoni R, Benussi L, Glionna M, Franzoni M, et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in mild cognitive impairment. *J Neural Transm*. 2008;115:1047-50.
393. Hernanz A, De la Fuente M, Navarro M, Frank A. Plasma aminothiols compounds, but not serum tumor necrosis factor receptor II and soluble receptor for advanced glycation

end products, are related to the cognitive impairment in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment patients. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14:163-7.

394. Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, Motoyama K, et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2587-93.
395. Ghiso J, Calero M, Matsubara E, Governale S, et al. Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. *FEBS Lett*. 1997;408:105-8.
396. Takata M, Nakashima M, Takehara T, Baba H, et al. Detection of amyloid beta protein in the urine of Alzheimer's disease patients and healthy individuals. *Neurosci Lett*. 2008;435:126-30.

6.2. EKLER

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Alzheimer hastalığının gelişiminde rol oynayan, kanda bulunan bazı maddeler arasındaki ilişkiyi araştırmayı planlıyoruz. Bu çalışma, 50 Alzheimer hastası ve 50 sağlıklı yaşlı bireyden alınan toplam 100 adet kanda yapılacaktır. Bu nedenle poliklinik muayeneniz sırasında zaten sizden alınacak ve rutin kan testleriniz için kullanılacak olan kanın bir bölümünü (2 tüp; 10 ml) bu araştırmaya yardımcı olmak üzere kullanabilmemiz için müsaadenizi istiyoruz. Yapılacak olan araştırmalar tanı ve tedavinizi hiçbir şekilde etkilemeyecektir. **Bu çalışma için kan bir kez alınacaktır. Kan alınırken oluşabilecek hematoma (cilt altı kanamaya bağlı şişlik) karşı alkollü pamukla bası yapılacaktır.** Muhtemel zarar durumunda Dr. Funda UYSAL'ı 0 531 6905390, 0 232 4122559 no'lu telefonlardan arayıp yardım alabilirsiniz. Alınan kan örnekleri bu çalışma dışında kullanılmayacak, çalışma sonrasında imha edilecektir.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. **Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.** Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya vasisi olduğum hastamın, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmasını kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

Adres :

Vasinin;

Adı:

Soyadı:

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Görevi :

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı: Funda

Soyadı: Uysal

Tarih:

Tel: 0 531 690 53 90 , 0 232 412 25 59

İmza:

BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU (Sağlıklı Gönüllü)

Alzheimer hastalığının gelişiminde rol oynayan biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkiyi araştırmayı planlıyoruz. Bu amaçla, 50 Alzheimer hastası ve 50 sağlıklı yaşlı bireyden alınan toplam 100 adet kanda, çalışmayı planladığımız çeşitli belirteçleri araştıracağız. Bu nedenle poliklinik muayeneniz sırasında zaten sizden alınacak ve rutin kan testleriniz için kullanılacak olan kanın bir bölümünü (1 tüp; 8 ml) bu araştırmaya yardımcı olmak üzere kullanabilmemiz için müsaadenizi istiyoruz. Yapılacak olan araştırmalar tanı ve tedavinizi hiçbir şekilde etkilemeyecektir. **Bu çalışma için kan ve doku örneği bir kez alınacaktır. Kan alınırken oluşabilecek hemotoma (cilt altı kanamaya bağlı şişlik) karşı alkollü pamukla bası yapılacaktır. Biyopsi sonrası oluşabilecek kesi veya enfeksiyon kontrol edilerek tedavisi verilecektir.** Muhtemel zarar durumunda Dr. Funda UYSAL'ı 0 531 6905390, 0 232 4122559 no'lu telefonlardan arayıp yardım alabilirsiniz. Alınan kan örnekleri bu çalışma dışında kullanılmayacak, çalışma sonrasında imha edilecektir.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. **Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir.** Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Tel:

Adres :

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

Görevi :

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı: Funda

Soyadı: Uysal

Tarih:

Tel: 0 531 690 53 90 , 0 232 412 25 59

İmza:

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	01-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alzheimer hastalarında Plazma Aβ40 ve Aβ42'nin dolaşımdaki Sırası, Esrage, SLRP1, Aβ Oligomer ve Neprilizinle İlişkilerinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Yrd.Doç.Dr.Murat ÖRMEN Dr.Funda Uysal Biyokimya A.D.
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/01-01	Tarih: 13.01.2011
	Yrd.Doç.Dr.Murat ÖRMEN'in sorumlusu, Dr.Funda UYSAL'ın proje yürütücüsü olduğu "Alzheimer hastalarında Plazma Aβ40 ve Aβ42'nin dolaşımdaki Srage, Esrage, SLRP1, Aβ Oligomer ve Neprilizinle İlişkilerinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Bestü ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Derya ERÇAL	Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Murat ÖZGÖREN	Biyofizik	DEU Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Av.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukukçu	D.E.Ü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐ H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	

EK-4

MİNİ-MENTAL DURUM TESTİ

1. İlk olarak tarih sorulur: "Bugünün tarihi ne?" Eğer eksik yanıt geldiyse her bir item tek tek sorulur:

- ☐ Ayın kaçı ☐ Hangi yıldayız ☐ Hangi aydayız
☐ Haftanın hangi günü ☐ Hangi mevsimdeyiz

2. Neredesiniz?

- ☐ Hangi hastanedeyiz ☐ Kaçınıcı kattayız ☐ Hangi semtteyiz
☐ Hangi şehirdeyiz ☐ Hangi ülkede yaşıyoruz

3. Şimdi hafızanızı muayene etmek istiyorum. Şu söyleyeceğim 3 cismi benden sonra tekrarlayın ve aklınızda tutun. Sonra tekrar bu 3 cismi soracağım. (İlk tekrar skoru belirler. Hasta tümünü tekrar edinceye kadar en fazla 6 kez tekrarlanır)

- ☐ Divan ☐ Patates ☐ Yeşil

4. Şimdi 100'den geriye 7'şer 7'şer sayın. (Her doğru çıkarma için 1 puan verilir. Eğer bunda hata yaparsa DÜNYA kelimesinin harflerini önce düzden söyleterek hasta oryante edilir, ardından harfleri tersten söylemesi istenir. İkisinden hangisinden yüksek skor aldıysa o skor puanlamaya eklenir.

- ☐ 93 ☐ 86 ☐ 79 ☐ 72 ☐ 65 veya ☐ A ☐ Y ☐ N ☐ Ü ☐ D

5. Daha önce tekrarlamamızı istediğim 3 cismi hatırlayabilecek misiniz?

- ☐ Divan ☐ Patates ☐ Yeşil

6. Şunun adı neydi? (göstererek) ☐ Kalem ☐ Saat

7. Şunu aynı benim dediğim gibi tekrarlayın. (Yalnız bir defa söylenir, eğer aynı şekilde tekrar edemezse puan verilmez.) ☐ Bugün hava çok güzel değil

8. Söylediğimi aynen yapın (yalnız 1 defa söylenir, hastaya doktor sözünü bitirinceye kadar beklemesi söylenir. Hasta tamamen söylenenlere uyuyorsa puan alır. Ancak kağıdı sağ eli yerine sol eliyle alırsa veya kağıdı 2 yerine 4'e katlarsa veya yere atacağı yerde masaya koyarsa puan almaz.)

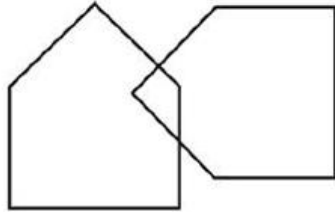
- ☐ Bu kağıdı sağ elinize alın ☐ İki elinizle ikiye katlayın ☐ Sonra yere atın

9. Bu yazıyı okuyun ve ne diyorsa yapın (ancak bir defa söylenir ve hasta göztünü yumarsa puan alır)

☐ GÖZÜNÜ YUM

10. Aklınıza gelen herhangi bir cümleyi yazın (cümle anlamlı olmalıdır, gramer hataları veya kelimeyi yazarken harf atlamaları affedilir) ☐

11. Şu şekli aynen çizin (her iki şeklin 5 kenarı varsa ve iki şeklin birer açıları iç içe geçiyorsa puan verilir) ☐



SKOR= /30

Demansın Klinik Evrelendirilmesi Ölçeği (CDR)

CDR	1. Bellek	2. Oryantasyon	3. Yargılama – Problem çözme
0	Bellek kaybı yok ya da hafif ve belirsiz unutkanlık	Tümtüyle oryante	Günlük problemler, çalışma hayatı ve mali işlerle ilgili problemleri iyi çözer; yargılama iyidir
0,5	Hafif fakat aşikar unutkanlık; olayların kısmen hatırlanabilmesi; "selim" unutkanlık	Zaman ilişkilerinde hafif güçlük dışında tümtüyle oryante	Problem çözme, benzerlik ve farklılıkları kavramakta hafif bozukluk
1	Orta düzeyde unutkanlık, yakın dönem olayları için daha belirgin; unutkanlık günlük aktiviteleri etkiliyor	Zamanda orta düzeyde güçlük; muayene sırasında mekana oryante, dışarda coğrafi disoriantasyonu olabilir	Orta düzeyde bozukluk; toplumsal yargılama genellikle korunmuştur
2	Ağır düzeyde unutkanlık; yalnızca çok iyi öğrenilmiş materyel tutulabilir; yeni materyel hızla yitilir	Zaman ilişkilerinde ağır düzeyde güçlük; genellikle zamana, sıklıkla da mekana disoriant	Ağır düzeyde bozukluk; genellikle toplumsal yargılama da bozuktur
3	Ağır düzeyde unutkanlık; yalnızca parçacıklar kalır	Yalnızca kişilere oryante	Yargılama ve problem çözme tümtüyle bozuk
CDR	4. Ev dışında işlevsellik	5. Ev yaşamı – Hobiler	6. Kişisel bakım
0	İşte, alışverişte, gönüllü gruplar ve toplumsal gruplar içinde her zamanki düzeyde bağımsız işlevsellik	Ev yaşamı, hobiler ve entelektüel ilgiler iyi korunmuş	Kendine bakıma tümtüyle muktedir
0,5	Anılan aktivitelerde hafif bozulma	Ev yaşamı, hobiler ve entelektüel ilgilerde hafif bozulma	
1	Anılan aktivitelerden bazılarını halen sürdürse de, bağımsız işlev görememe; yüzeysel bir bakışla hala normal görünebilir	Evdeki işlevlerde hafif fakat aşikar bozulma; güç ev işleri, karmaşık hobiler ve ilgiler terkedilmiş durumda	Gayrete getirilmesi gerekiyor
2	Ev dışında bağımsızlığını tümtüyle yitirmiş / Ev dışında aktivitelere götürülebilecek kadar görünür	Yalnızca basit işler yapılabilir; ilgiler son derece sınırlı	Giyinme, hijyen ve diğer kişisel bakım için yardım gerekiyor
3	Ev dışında bağımsızlığını tümtüyle yitirmiş / ev dışında aktivitelere götürülemeyecek kadar hasta görünür	Evde kayda değer bir işlevselliği yok	Kişisel bakım için önemli ölçüde yardım gerekir; genellikle enkontinandır

Evrelendirme: Bellek ekseninin dışındaki eksenlerden en az üçü bellek ekseninden farklı değilse, evre bellek eksenine aittir. Farklı olduğu durumda ise, evre bellek ekseninin üstünde ya da altında kalan bu 3 eksenin derecesidir. Bu kuralın tek istisnası bellek eksenini dışarıda kalan 5 eksenin üçünün belleğin bir tarafında geri kalan ikisinin diğer tarafında olmasıdır ki bu durumda da evre bellek eksenine aittir. Bellek eksenini 0,5 ise evre 0 olamaz; diğer eksenlerin derecesine bağlı olarak 0,5 ya da 1 olmalıdır. Bellek 0, fakat en az iki eksen 1 ya da daha fazla ise, evre 0,5 olmalıdır.