

T. C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

**MCI VE ALZHEİMER HASTALARINDA
F_{2α} İZOPROSTAN VE MELATONİN SEVİYELERİNİN
BİLİŞSEL DURUMLA İLİŞKİSİ**

Dr. F. Burcu ŞİRİN

UZMANLIK TEZİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Namık DELİBAŞ**

ISPARTA - 2006

T. C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

**MCI VE ALZHEİMER HASTALARINDA
F_{2α} İZOPROSTAN VE MELATONİN SEVİYELERİNİN
BİLİŞSEL DURUMLA İLİŞKİSİ**

Dr. F. Burcu ŞİRİN

UZMANLIK TEZİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Namık DELİBAŞ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 816-TU-04 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2006

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde emeği geçen, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam, tez danıŐmanım Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. Namık Delibaş'a, her türlü katkı ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Hüseyin Vural'a, Doç. Dr. Fatih Gültekin'e, Doç. Dr. İrfan AltuntaŐ'a, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Akdođan'a, Yrd. Doç. Dr. Recep Sütçü'ye, Yrd. Doç. Dr. Duygu Kumbul Dođuç'a sonsuz Őükran ve saygılarımı sunarım.

Tez hastalarımı toplamamda yardım ve desteklerinden dolayı Psikiyatri Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. İbrahim Eren'e ve Dr. İkbal İnanlı'ya, asistanlığım boyunca laboratuvar çalıŐmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve teknisyen arkadaşlarıma, bana rahat ve huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan eŐim Cem Şirin'e teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
Kısaltmalar	iv
Şekil ve Tablo Listesi	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Alzheimer Hastalığı	2
2.1.1. Risk Faktörleri	2
2.1.2. Koruyucu Faktörler	3
2.1.3. Genetik Açıdan AH	3
2.1.4. AH Kliniği ve Seyri	4
2.1.5. AH tanısı	5
2.1.6. Hafif kognitif bozukluk (MCI, mild cognitive impairment)	6
2.1.7. Alzheimer Hastalığının Nöropatoloji ve Patofizyolojisi	7
2.1.8. AH ve oksidatif stres hipotezi	11
2.1.8.1. AH ve serbest radikal	11
2.1.8.2. AH'nda artan oksidatif stresi destekleyen kanıtlar	15
2.2. Lipid Peroksidasyonu	15
2.2.1. İzoprostanlar	16
2.2.1.1. F ₂ -izoprostan oluşum mekanizması	18
2.2.1.2. İzoprostanların İsimlendirilmesi	19
2.2.1.3. İzoprostan ölçüm metodları	20
2.3. Antioksidanlar	20
2.3.1. Melatonin	21
2.3.1.1. Melatonin sentezi	21
2.3.1.2. Melatonin metabolizması	25
2.3.1.3. Melatonin reseptörleri	25
2.3.1.4. Melatoninin etkileri	26
2.3.1.5. Serbest radikal toplayıcı ve nöral antioksidan olarak melatonin	26
2.3.1.6. AH'nda antioksidan ve antiamiloidojenik olarak melatonin	28

3. MATERYAL VE METOD	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Vaka Seçimi	30
3.1.2. Numunelerin alınışı ve hazırlanması	31
3.1.3. Kullanılan malzeme ve cihazlar	31
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler	31
3.2. Metod	32
3.2.1. Melatonin tayini	32
3.2.2. 8-izo-PGF _{2α} tayini	32
3.3. Veri Analizleri	32
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
ÖZET	43
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	46

KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
Apoε4	: Apolipoprotein E ε4
APP	: Amiloid prekürsör protein
PS1	: Presenilin 1
PS2	: Presenilin 2
NINCDS-ADRA	: Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme- Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği
DSM-IV	: Ruhsal Hastalıkların Tanı ve İstatistiksel El Kitabı IV
MCI	: Hafif kognitif bozukluk
Aβ	: Amiloid β
MAPτ	: Hiperfosforile mikrotübül-ilişkili protein τ
ACh	: Asetilkolin
NGF	: Nerve growth faktör
BDNF	: Brain derived nörotrofik faktör
ROS	: Reaktif oksijen türleri
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
GPX	: Glutatyon peroksidaz
AGE	: Glikozilasyon son ürünleri
MDA	: Malondialdehid
SOD-1	: Süperoksit dismutaz-1
iP	: İzoprostan
F ₂ -iP	: F ₂ -izoprostan
COX	: Siklooksijenaz
AA	: Araşidonik asit
PG	: Prostaglandin
8-izoPGF _{2α}	: 8-izo Prostaglandin F _{2α}

GC-MS	: Gaz kromatografi/Kütle spektrometresi
SCN	: Suprachiasmatik çekirdek
NAT	: N-asetil transferaz
5-HIOM	: 5-hidroksiindol-O-metiltransferaz
5-HT	: 5-hidroksitriptamin
MAO	: Monoamin oksijenaz
LOO ⁻	: Peroksil radikali
BHT	: Butylated hidroxytoluene
RIA	: Radioimmunoassay yöntemi
EIA	: Enzimimmunoassay yöntemi

ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

- Şekil 1. Nörodejeneratif AH'nda patofizyolojik olaylar
- Şekil 2. Alzheimer beyininde A β (1-42)'nin indüklediği oksidatif stres
- Şekil 3. Serbest radikal hasar ürünleri
- Şekil 4. 8-izoprostan oluşumu
- Şekil 5. F₂-izoprostanların oluşum mekanizması
- Şekil 6. Melatoninin moleküler yapısı
- Şekil 7. Pineal bezde melatonin sentez ve kontrolü
- Şekil 8. Melatoninin antioksidan özellikleri
- Tablo 1. Melatoninin bazı biyolojik oluşumlar üzerine etkilerini açıklayan mekanizmalar
- Tablo 2. Kontrol grubunun yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2 α} verileri
- Tablo 3. MCI grubunun yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2 α} verileri
- Tablo 4. Alzheimer grubunun yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2 α} verileri
- Tablo 5. Melatonin, 8-izoPGF_{2 α} seviyeleri ve yaşın gruplardaki ortalama değerleri ve standart deviasyonları

1. GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH), yaşlılarda en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır. Alzheimer tipi demans için bilinen en önemli risk faktörü yaştır ve bu hastalığın görülme sıklığı 65 ile 95 yaş arasındaki bireylerde her geçen beş yıl içinde ikiye katlanmaktadır. Dünya nüfusunun hızla yaşlanması ve ortalama yaşam beklentisinin artması demansın ve onun en sık sebebi olan AH'nın gerçek bir halk sağlığı ve ekonomik sorun olarak algılanmasına yol açmıştır (1,2).

AH'nın tanı almadan önce uzun süren nöropatolojik değişikliklerin olduğu bir süreçten geçtiği bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda AH aşikar hale gelmeden önce hafif kognitif bozukluk (MCI) olarak isimlendirilen ara bir dönem olduğu gösterilmiştir. MCI hastalarının yılda % 12'lik bir hızla, dört yıl içinde % 50'sinin AH'na dönüştüğü gösterilmiştir (3). Alzheimer hastalığının etiolojisinde birçok sebep suçlanmakla beraber oksidatif stresin AH'nın patogenetik mekanizmaları içinde yer aldığı varsayılmaktadır (4,5). Oksidatif hasarın AH'nın erken dönemlerinde hatta MCI döneminde olduğu birtakım çalışmalarda gösterilmiştir (6,7).

Etkili tedaviyi en etkili evrede kullanma fırsatını yakalamak için hastalığı erken ve hatta preklinik evrede yakalamanın önemi büyüktür. Mevcut tedavi ve umut vaad eden tedavi yöntemlerinin erken dönemde etkili olabilmesi erken tanının önemini ortaya koymaktadır (8). AH'nda beyin dokusunda oluşan nöropatolojik değişiklikleri yansıtan, bir biomarker henüz klinik olarak kullanıma geçmemiştir (9).

Bu çalışmada oksidatif stresin göstergelerinden kabul edilen $F_{2\alpha}$ -izoprostan ve antioksidatif-antiamiloidojenik etkileri ile nöroprotektif etki gösteren melatonin konsantrasyonlarını hafif kognitif bozukluk ve Alzheimer tipi demans tanısı almış vakalarda ve kontrollerde ölçerek, hafif kognitif bozukluk evresinde bu markerlerin ölçümlerinin erken tanıya katkısı olup olmayacağını gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Yaşam koşullarının iyileştirilmesi tıbbi alanda gelişmeler insan ömrünü uzatmış, bu durum yaşlılık ile ilgili hastalıkların prevalansında artışa neden olmuştur. Yaşlı nüfus oranının arttığı toplumlarda ise demans önemli bir sağlık sorunudur. Geriye dönüşümsüz ve ilerleyici bilişsel yıkımın yol açtığı klinik hem hastanın hem de hasta yakınlarının hayatını çok olumsuz etkilemektedir. En sık demans nedeni olan Alzheimer Hastalığı (AH), tüm demansların % 50-70'ini oluşturmaktadır. AH entellektüel gerileme ile birlikte çeşitli nöropsikiyatrik rahatsızlıklara ve günlük yaşam aktivitelerinde bozukluklara neden olan progresif nörodejeneratif bir hastalıktır (2).

AH ilk kez 1907 yılında Alman psikiyatrist ve nöropatolog Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. İlerleyici demansla 4.5 yıl takip ettiği 51 yaşındaki bayan hastanın otopsi materyalinde gümüş pozitif nörofibriler yumak, serebral kortikal nöron kaybı, şu anda senil plaklar olarak bilinen değişiklikleri göstermiştir. AH ile ilgili modern çalışmalar 1960-1970'lerde serebral kortikal lezyonların yapısı, spesifik nörotransmitterlerde eksikliklerin anlaşılması ile başlamıştır. 1980-1990'lardaki moleküler biyoloji ve genetik çalışmalar, AH'ndaki moleküler değişikliklere yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Bu gelişmeler hastalıktaki patojenik mekanizmaları anlamak için basamak olmuştur (4).

Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda demansların %50-70'inin AH olmasına rağmen, Japonya'da ve Rusya'da multi infarkt demansların daha fazla olduğu bildirilmiştir. Türkiye' de ise hastalığın sıklığı, bu alanda henüz epidemiyolojik bir çalışma yapılmadığı için bilinmemektedir. AH yaşlılığın fiziksel ve psikolojik yönlerden en çok yıkıma neden olan hastalığıdır. Gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır (1).

2.1.1. Risk Faktörleri

AH'nin gelişiminde ortaya konan kesin risk faktörleri yaş, aile öyküsü ve kişinin Apolipoprotein E'nin ε4 (ApoE ε4) aleline sahip olmasıdır. Yaş en önemli risk faktörü olup, hastalığın prevalansı 65-85 yaşları arasında her 5 senede bir 2 katına çıkmaktadır. AH 65 yaş üzeri kişilerde %3-11, 85 yaş üzerinde ise %30-47

gibi yüksek bir prevalansa sahiptir. Aile öyküsünde birinci derece akrabalığın olması riski 4 kat arttırmaktadır. Kolesterol taşınmasında görevli bir protein olan ApoE ε4 aleli normal beyaz popülasyonda %16, AH'de ise %35-50 sıklıkta bulunması nedeniyle hastalığın major risk faktörlerindedir.

Hastalığın olası risk faktörleri arasında kadın cinsiyeti, düşük eğitim seviyesi ve fazla bilişsel fonksiyon gerektirmeyen işlerde çalışma, Down Sendromu, bilinç kaybına neden olan kafa travması, miyokard infarktüsü öyküsü, aterosklerotik karotid hastalığı, hipertansiyon, atrial fibrilasyon ve tip I Diabetes Mellitus sayılmaktadır. Bazı çalışmalarda ileri anne yaşı, alkol kullanımı ve depresyon öyküsünün de risk faktörleri arasında olduğu belirtilse de bunların AH ile ilişkisi tartışmalıdır (1,2).

2.1.2. Koruyucu Faktörler

Bazı endojen ve eksojen faktörler AH'nın başlangıcını geciktirebilmektedir. ApoE ε2 genotipi varlığında hastalığın başlangıç yaşı daha geç olmaktadır. Non steroid antiinflamatuar ilaç kullanımının, Alzheimer riskini azalttığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca bu ilaçlar hastalardaki kognitif yıkımın hızını azaltmaktadır. Eğitimin Alzheimer riskini azaltan, koruyucu etkisi vardır. Çalışmalarda yüksek eğitimin hastalığın başlangıcını geciktirdiği saptanmıştır. Östrojen alan kadınlarda AH riskinin kullanmayanlara oranla yarı yarıya az olduğu gösterilmiştir. Östrojenin asetilkolin ve nerve growth faktör regülasyonunda biyolojik etkileri olduğu bilinmektedir. Statinlerin AH'na yakalanma riskini azalttığı öne sürülmüştür. Sigara içme öyküsünün varlığının, AH'na yakalanmayı geciktirdiği yönünde çalışmalar vardır (2).

2.1.3. Genetik Açıdan AH

Erken başlangıçlı formları otozomal dominant genetik geçiş özelliğine sahip olup vakaların yalnız %3-5'ini oluşturur. Hastaların % 95'inde hastalık ileri yaşlarda başlar ve sporadik olarak görülür (1).

Genetik açıdan AH ile ilişkili dört kromozom belirlenmiştir. Erken başlangıçlı AH'nda; kromozom 1 (presenilin 1 geni), kromozom 14 (presenilin 2 geni), kromozom 21 (APP geni) geç başlangıçlı AH'nda; kromozom 19'un (Apo E geni)

rolü olduğu gösterilmiştir. Amiloid prekürsör protein (APP) geni 21. kromozomda olması nedeniyle 50’li yaşlara kadar yaşayabilen Down sendromlu kişilerde AH ortaya çıkabilir. Ailesel AH’ında presenilin1 (PS1), presenilin 2 (PS2) ve APP proteinlerini kodlayan genlerde missense mutasyonlar olduğu gösterilmiştir. ApoE ε4 allelinin ileri yaşta başlayan AH ile ilişkili olduğu saptanmıştır ve pek çok araştırmacı tarafından genin hastalığa olan duyarlılığı arttırdığı bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (10,11).

2.1.4. AH Kliniği ve Seyri

Yetişkin yaşın her bir döneminde görülmekle beraber 60 yaşından sonra görülme sıklığı giderek artmaktadır. Çoğunluğu 85 yaş üzerindeki grup oluşturur (12). İlk semptomlar sinsisi olarak başlar, hastalığın başlama zamanını kesin olarak bilmek mümkün değildir. İlk semptomlar başlamadan progresif yıkım senelerce sürer. Bugünkü kanıtlar Alzheimer hastalığına bağlı patolojik değişiklerin klinik bulgular ortaya çıkmadan 15-20 yıl önce başladığına göstermektedir (3).

İlk belirtiler ilgisizlik, isteksizlik ve unutkanlıktır. Klasik olarak AH, hafif, orta ve şiddetli olmak üzere üç evreye ayrılmaktadır. Hastalığın başlangıç evreleri de göz önüne alındığında Alzheimer hastalığı klinik olarak presemptomatik dönem, prelinik dönem, erken şüpheli Alzheimer hastalığı, hafif Alzheimer hastalığı, orta dönem Alzheimer hastalığı, ağır dönem Alzheimer hastalığı olarak altı gruba ayrılabilir (1).

AH’nın önemli klinik özellikleri sessiz başlangıç ve progresif kötüleşme, öncelikle bellek defisiti olmak üzere çok yönlü kognitif kötüleşme, 60 yaşından sonra başlangıç, başlangıçta fokal nörolojik muayene bulgularının olmaması ve diğer demans nedenlerinin dışlanmasıdır (3,12).

Hastalığın seyri 5-20 yıl, ortalama 9-10 yıl arasındadır. Bazı çalışmalarda daha kısa olduğu belirtilmektedir. İlk olarak bellek etkilenir. Prognozu etkileyen en önemli faktör risk faktörleridir. Hastalığın başlama yaşı en önemli prognostik faktördür. Erken yaşta başlama kötü prognostur. Erken başlangıçlı formda daha hızlı bir kognitif kayıp olup, lisan ve konsantrasyon bozuklukları ön plandadır. İlerleme hızını hastanın bakımı, sosyoekonomik düzey, eşlik eden sistemik problemler ve tedaviye yanıt etkiler. Prognoz açısından ırk ve cins farklılığı bulunamamıştır (12).

2.1.5. AH tanısı

Kesin tanı ancak ilerleyici demans bulguları olan vakalarda biyopsi ya da otopsi ile AH'na özgü patolojik bulguların saptanması ile konulabilmesine rağmen; klinik kriterler ve laboratuvar teknikleri ile olası AH tanısına varılabilmektedir (1).

Başlıca iki tanı seti tanıda kullanılmaktadır (12). Bunlardan biri, Ulusal Nörolojik ve İletişim Hastalıkları Enstitüsü ve İnme-Alzheimer Hastalığı ve İlişkili Hastalıklar Derneği (NINCDS-ADRA) tarafından geliştirilen tanı kriterleridir (13). Hastalık tipik seyrediyorsa; olası (muhtemel) AH, atipik başlangıç veya atipik seyirli ancak tablonun Alzheimer hastalığına bağlandığı durumlarda; mümkün AH tanısı konur. İkinci kriterler DSM-IV kriterleri (14) olup, NINCDS-ADRA kriterlerine benzerdir. Standardize klinik kriterler kullanıldığında doğru tanı oranı % 90'a yakındır. Kesin tanı patolojiktir (12).

NINCDS-ADRA kriterlerine göre olası (muhtemel) Alzheimer Hastalığı

1. Muayene ve objektif testler ile belgelenmiş demans varlığı
2. İki veya daha fazla alanda kognitif kayıp
3. Bilinç bozukluluğunun olmaması
4. Bellek ve diğer bilişsel fonksiyonlarda ilerleyici bozulma
5. 40-90 yaş arasında başlaması, sıklıkla 65 yaş sonrası başlangıç
6. İlerleyici bellek ve kognitif kayba yol açabilecek sistemik ve nörolojik hastalık olmaması
7. Tanı desteği:
 - a. Dil, motor yeti ve algılamada ilerleyici kayıp
 - b. Davranış değişikliği
 - c. Günlük yaşam aktivitesinde bozulma
 - d. Ailede benzer bozukluk öyküsü
 - e. Uyumlu laboratuvar incelemeleri

DSM-IV kriterlerine göre Alzheimer tipi demans:

1. Birden çok alanda kognitif kayıp gelişmesi
 - a. Bellek bozuklukları
 - b. Aşağıdakilerden en az birinin bulunması:

Afazi - apraksi - agnozi - planlama, organizasyon, sıralama gibi yönetsel fonksiyonlarda bozulma

2. Yavaş, ilerleyici kognitif ve fonksiyonel gerileme ile giden seyir
3. Hastanın sosyal ve mesleki yaşantısını etkileyecek ve eski yaşantısında gerilemeye yol açacak kayıp
4. Diğer demans nedenleri ekarte edilmiş olmalı (tıbbi, nörolojik, psikiyatrik)

Demans tanısı konan her hastada tedavi edilebilir demans nedenleri öncelikle aranmalıdır. Özellikle volümetrik çalışmalarla temporal loblarda ve hipokampüste atrofinin görülmesi AH tanısını destekler. Fonksiyonel görüntüleme yöntemlerinden SPECT ile serebral kan akımının, PET ile glukoz metabolizmasının temporo-parietal bölgelerde azaldığının gösterilmesi tanıya yardımcı olabilir. Serebrospinal sıvıda artmış tau proteini ve azalmış A β (amiloid β) tanıda kullanılacak testlerdir. Ancak kesin AH tanısı halen özgün patoloji bulgularının gösterilmesi halinde konulabilmektedir (1,2).

2.1.6. Hafif kognitif bozukluk (MCI, mild cognitive impairment)

Son yıllarda yapılan çalışmalar, yaşa bağlı normal kognitif değişikliklerle Alzheimer hastalığı arasında bir geçiş dönemi olduğunu göstermiştir. Hafif kognitif bozukluk (MCI), normal yaşlanma ile Alzheimer hastalığı arasındaki klinik durumu tanımlar. Bu kişilerde yaşına göre umulandan daha fazla unutkanlık vardır, fakat Alzheimer hastalığı tanı kriterlerini karşılamaz. Bugün MCI olan kişilerin yüksek oranda AH'na yakalanma riski taşıdığına inanılmaktadır. Bu bakımdan bu kişilerin tanınması, izlenmesi ve tedavisi önem taşır (3,15,16).

MCI için Petersen tanı kriterleri şunlardır (17):

1. Hasta yakını tarafından da doğrulanan bellek bozukluğu yakınması
2. Yaşa ve eğitime göre objektif bellek bozukluğu (episodik belleğin kantitatif testlerinde normal değerlerin en az 1.5 standart deviasyon değerinden daha fazla bozukluk)
3. Genel kognitif fonksiyonların geniş oranda korunmuş olması (bellek dışında)
4. Günlük yaşam aktivitelerinin büyük miktarda sağlam olması
5. Klinik olarak demans tanısının konulamaması

MCI hastalarının seyri değişkendir. MCI heterojen bir grubu oluşturur. Farklı klinik tablolar en sık Alzheimer hastalığına dönüşmekle birlikte diğer demans tiplerine de dönüşebilir. AH'na dönüşüm The Mayo Alzheimer's Disease Center'a

göre yıllık % 10-15 civarındadır. Amerikan Nöroloji Akademisi tarafından bu oran yıllık %6-25 olarak verilmiştir. MCI'li hastalar çoğu zaman Alzheimer hastalığına dönüştüğü için bu hastaların patolojilerinde AH'na ait değişikliklerle karşılaşmak sürpriz değildir. MCI'li hastaların % 60'ında AH tanısı konmaya yetecek miktarda Alzheimer patolojisi bulunmuştur. MCI tanısı klinik kriterlere göre, klinisyenin kanaati ile konulmaktadır. Tek başına tanı koyduracak nöropsikolojik bir test veya batarya yoktur. MCI'nin şu anda kabul görmüş bir tedavisi yoktur. Bu alanda çalışmalar sürmektedir (3).

2.1.7. Alzheimer Hastalığının Nöropatoloji ve Patofizyolojisi

AH'nda makroskopik olarak; beyin atrofiye uğrayarak küçülmüş, sulkuslar genişlemiş, giruslar daralmıştır. Doku kaybına bağlı ventriküler genişleme vardır (12).

AH'ndaki temel mikroskopik değişiklikler; senil plak ve nörofibriler yumak oluşumu, selektif nöron kaybı-büzülmesi, sinaps kaybı ve amiloid anjiopatidir. Hiperfosforillenmiş tau nörofibriler yumaktaki ana protein iken, APP'den kaynaklanan A β senil plak ve amiloid anjiopatideki temel proteindir (4).

Alzheimer Hastalığı nöronal hasar, sinaptik bozukluk ve nöron ölümü sırası ile giden ilerleyici beyin disfonksiyonu ile karakterize nörodejeneratif bir durumdur. Nörofibriler yumak ve nörofibriler lifler AH'nda patolojik karakteristik bulgudur. Çok az miktarda olduğunda dahi bunlar yaşla ilişkili kabul edilmemelidir. Genellikle ilk değişiklik; nörofibriler yumak ve liflerdir. Bu değişiklikler; hastalığın nedeni, gelişimi ve progresyonu ile karışık bir şekilde ilişkilidir. Plaklar (amiloid birikim ve/veya nörotik plaklar) hastalığın son evresinde bulunur. İlk nörofibriler yumak ve lifler spesifik kortikal bölgelerde oluşur. Değişiklikler telensefalik korteksin diğer kısımlarına tahmin edilebilir ve gelişigüzel olmayan şekilde dağılır. Lezyonların dağılımındaki sıralı değişikliklerin seyri, yıkım sürecinin yavaş ve kademeli ilerlemesi evrelemenin temelini oluşturur. Majör patolojik bulgu; ekstraselüler amiloid protein birikimi ve nöron içi nörofibriler değişikliklerdir. Hastalığın progresyonunda hiç gerileme olmaz. İlk amiloid birikimleri bazal neokorteksin myelinizasyonu az olan bölgelerinde oluşur. İntranöronal lezyonlar ilk olarak transentorhinal bölgede oluşur ve sıralı olarak diğer alanlara yayılır.

Nöropatolojik açıdan AH altı evreye ayrılmaktadır. Evre I-II'de nörofibriler değişiklikler amiloid birikim olmadan oluşur. Vakaların bir kısmında erken amiloid birikimi ve/veya intranöronal değişiklikler görülmektedir. Bu lezyonların oluşumu için ileri yaş önşart değildir. AH yaşla ilişkili ama yaşa bağımlı bir hastalık değildir. Evre III-IV'teki beyin hasarını derecesi sıklıkla ilk klinik semptomların görülmesine yol açar. Tam gelişmiş AH'nı gösteren evre V-VI'nın prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. Yaş AH için ana risk faktörüdür, amiloid birikimi ve nörofibriler patoloji yaşla beraber artar (18).

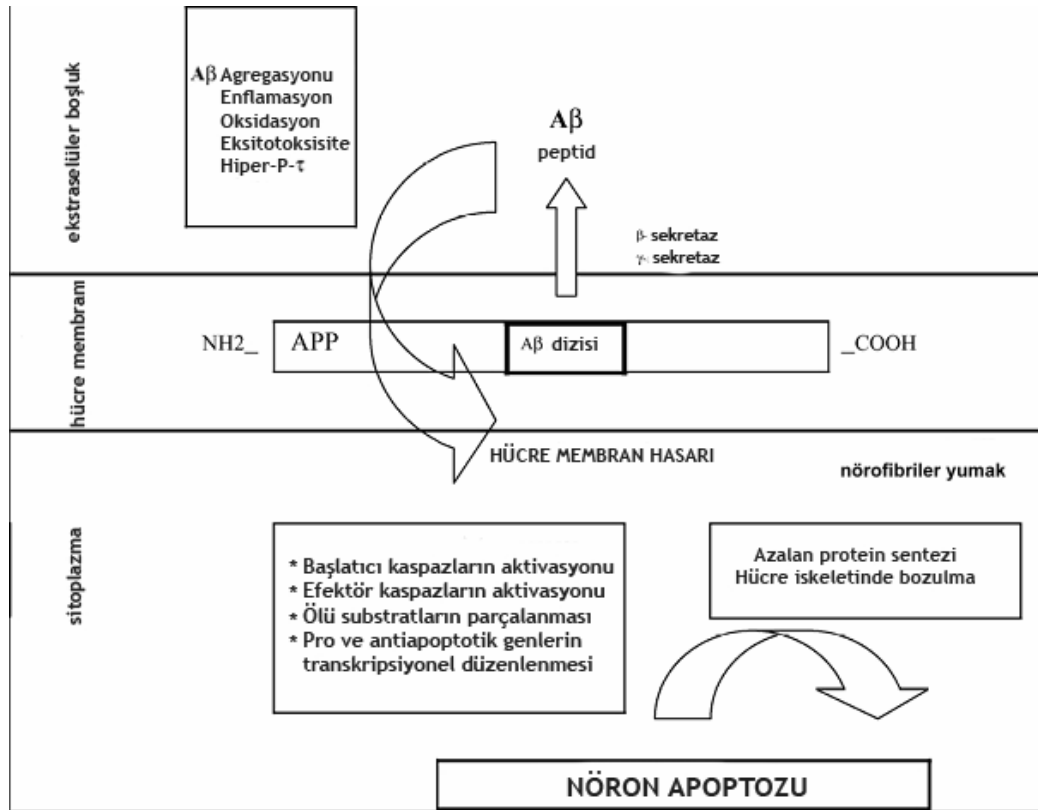
AH patolojik olarak; serebral beta amiloid plakları (ana peptid içeriği A β 42), nörofibriler yumak (hiperfosforile mikrotübül-ilişkili protein τ (MAP τ)'den, oluşan helikal filament çifti) ve nöronal kayıp ile karakterizedir. Beyinde nöron içindeki bu filamentlerin yoğunluğu demansın şiddeti ile direkt ilişkilidir. Bu yumakların oluşma nedeni belli değildir. Bir genin farklı allelerinin yumak haline gelmeye eğilimli τ formlarını oluşturduğu bilinmektedir (19).

MAP τ 'nin AH'nın başlaması ve ilerlemesindeki rolü halen çözülememişse de, ekstraselüler A β birikimi yokluğunda filamentöz τ patolojisi ve beyin dejenerasyonu olan AH dışındaki bozuklukların tanımlanması nörodejenerasyonda τ 'nin nedensel rolü için kanıt sağlamıştır. Yumaklar ile plak oluşumunun bağlantısı olup olmadığı da açık değildir. Nöronal hasar ile sonuçlanan mikrotübüler fonksiyonda bozulma, nörofibriler yumağın en son etkisidir (20).

Plaklar etrafındaki enflamasyonun komşu nöronların ölümüne katkıda bulunduğu düşünülmüştür. A β 'dan oluşan plaklar, A β ve onun prekürsör proteininin işlenmesinde bozukluk sonucunda oluşabilir (20). Genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin kombinasyonu sorumlu olabilir. Yüksek kan basıncı ve artmış kolesterol seviyeleri AH için artmış yatkınlığı olduğundan subklinik iskemi bu çevresel faktörlerden biri olabilir. Kromozom 21 üzerindeki bir gende kodlanan APP'nin, proteolitik olarak işlenmesi ile A β oluşur (21). Tip I transmembran proteini olan APP'nin fonksiyonu halen bilinmemektedir. APP iki yol ile metabolize olmaktadır. Non-amilodojenik yol, A β domainindeki APP'yi parçalayan membrana bağlı proteaz aktivitesine sahip α -sekretaz ile ilişkidir, böylece ekstraselüler birikim engellenir. α -sekretaz, protein kinaz C'ye eşlenik çeşitli hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ile uyarılabilir ve fosfotidil inozitol ile bağlantılıdır. Amilodojenik yol arka arkaya

iki bölünmeyi içerir. APP ilk olarak, 99 aminoasitlik membrana bağlı bir kalıntı C terminal fragmanı (C99) oluşturmak için β -sekretaz tarafından bölünür, ardından transmembran alanda $A\beta$ çıkarmak üzere γ -sekretaz tarafından tekrar bölünür. C-terminalde, γ -sekretaz tarafından heterojen proteolizle oluşan iki C-terminal varyantı ($A\beta_{1-40}$ ve $A\beta_{1-42}$) vardır. Üretilen $A\beta$ 'nin yaklaşık % 90'ı $A\beta_{1-40}$ dır, ancak $A\beta_{1-42}$ fibriller agregat oluşturmaya daha meyilli olup, amiloid birikiminin ana bileşenidir. β ve γ sekretazın farmakolojik inhibisyonu, AH'ndaki amiloidopatinin tedavisinde hedef olabilir (20).

β sekretaz (APP β bölgesi parçalayıcı enzim; BACE) pepsin ailesinden aspartil proteaz ile homologtur. β sekretaz geni kromozom 11 üzerindedir. Damarlanması yüksek dokularda (kalp, böbrek ve plasenta) eksprese olan bir β sekretaz homologu; BACE2, 21. kromozomda tanımlanmıştır (22). β sekretaz ideal bir terapotik hedef olarak düşünülmektedir. $A\beta$ üretimindeki ilk basamağı katalizler. γ sekretaz bir multiprotein kompleksidir ve bazı çalışmalar bu kompleksin katalitik bölgesi olarak presenilin proteinleri göstermektedir (20).



Şekil 1. Nörodegeneratif AH'nda patofizyolojik olaylar (20).

AH multinörotransmitter eksiklik hastalığıdır. Serebral korteksteki en tutarlı değişiklik kolinerjik belirteçlerin (kolinasetiltransferaz ve asetilkolinesteraz) kaybıdır. Ek olarak serotonin, noradrenalin, somatostatin ve kortikotropin salgılatıcı faktör eksiklikleri vardır (4).

1970'lerde AH olan hasta beyinlerinde dikkati arttıran ve öğrenmeye yardım eden önemli bir nörotransmitter, asetilkolinin eksikliği saptanmıştır. Bu buluş kolinerjik hipotezin (AH ile ilişkili kognitif, fonksiyonel ve davranışsal fonksiyon bozukluklarının, kolinerjik sinaps boyunca sinir hücresi impulslarının iletiminde yetersizlik nedeniyle olabileceği hipotezi) gelişimini sağlamıştır. Merkezi kolinerjik iletimde kayıp, AH'nın önemli patolojik ve nörokimyasal özelliği olan bazal ön beyin çekirdeklerinin dejenerasyonu ile indüklenir. AH'nda hastalık süresince progresif nikotinik reseptör kaybı da tanımlanmıştır ve bu reseptörlerin hafıza ve öğrenmede rolünün olduğu saptanmıştır (23). Asetilkolin (ACh) ve kolinerjik belirteçlerde tükenmenin hastalığın erken döneminde olduğu ve hafızadaki bozulma ile ilgili olduğu uzun zamandır düşünülmektedir. Kolin asetil transferaz ve asetilkolin esterazın konsantrasyonlarının hastalığın geç evrelerine kadar düşmediği yönünde olan raporlar, bu düşüncenin doğruluğunu sorgulamaktadır. Kolinerjik nöronların olaya dahil olması sinapslardaki ACh seviyesinde düşmeye neden olur. ACh düşüklüğünü kompanse etmek için asetilkolin esteraz seviyelerinin de düştüğü düşünülebilir. AH'nda erken evrede kolinerjik kayıp, kolinerjik sinyal iletiminde kayıpla ilişkili olabilir (24). Kolinerjik nörotransmisyonu iyileştirmek için ACh sentezini artırılması, presinaptik ACh salınımını kuvvetlendirilmesi, postsinaptik muskarinik ve nikotinik kolinerjik reseptörlerin uyarılması ve kolinesteraz inhibitörleri ile degradasyonun azaltılması gibi farklı stratejiler denenmiştir (20).

En son olarak, AH'nda kognitif düşüşün sinaptik kayıp ile iyi patolojik korelasyonu olduğu gösterilmiştir. Sinaptik disfonksiyon ve yetersizlik, AH'da erken görülmekte ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada ve kognitif, fonksiyonel yetenekleri korumada koruyucu tedaviler için önemli hedeflerdir. AH'nda beyin çeşitli bölgelerinde sinaps yoğunluğunun azaldığı pekçok çalışmada gösterilmiştir (25). Nerve growth faktör (NGF) ve brain derived nörotrofik faktör (BDNF) gibi nörotrofinlerin nöronlar için gelişimi sürdürmekten çok sinaptik plastisitenin regülasyonunda anahtar rolü olabilir (26). NGF ve BDNF, pre-pro polipeptidler

olarak sentezlenip, sekresyondan önce tipik olarak olgun moleküllere parçalanır. NGF hipokampusta, hipokampal nöronların postsinaptik tarafında bulunur ve depolarizasyon ve muhtemelen sinaptik aktivite ile regüle edilir. AH'nda sinaptik plastisitede BDNF veya NGF'nin işlenmesi ya da fonksiyonunda olası bozukluk daha ciddi şekilde araştırılmalıdır (27).

Sinaptik disfonksiyon AH'nda erken bir olaydır ve nöronal kayıptan önce olduğu düşünülmektedir. Sinaptik proteinlerin, membran proteinlerinin, veziküllerin fonksiyonunda bozuklukları ve plastisite fonksiyonunda kaybı içeren çeşitli mekanizmalar sinaptik yetmezliğe katkıda bulunabilir (25).

AH'nın patofizyolojisinde beyinde nörodejenerasyona, yoğun lipid peroksidasyona yol açan serbest radikal birikimi ve oksidatif stres rol alabilir. A β 'nın direkt toksik etkisi ve agreg olmuş MAP τ ile bozulmuş intraselüler taşınması AH'nda sinaptik disfonksiyonu başlatır (25).

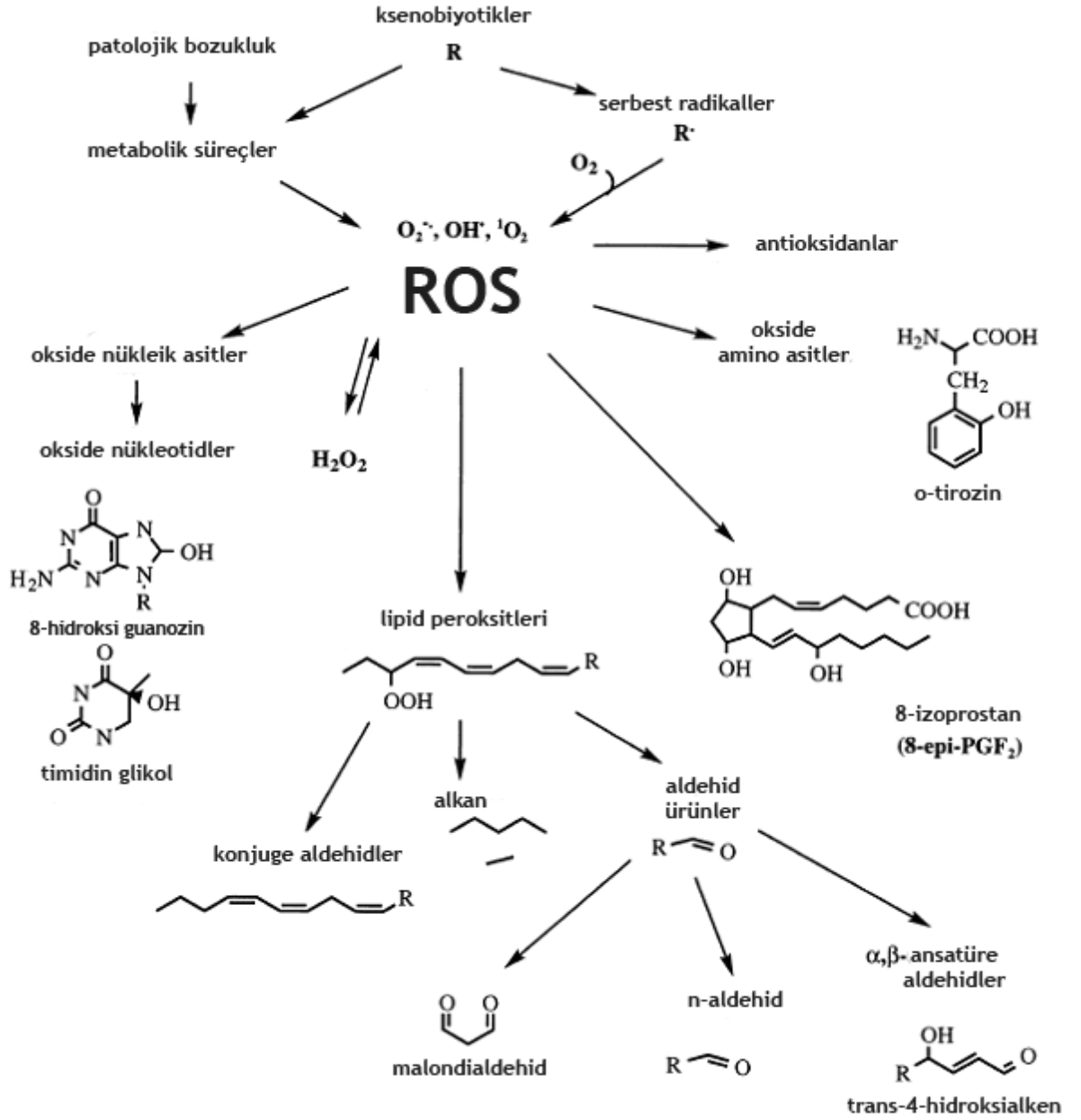
AH için genetik defekt, yavaş veya latent virüs bozukluğu, enerji metabolizma defisiti, değişmiş APP işlenmesi, nörotrofik faktör eksikliği, eser element nörotoksitesi ve serbest radikal indüklenmiş nöron dejenerasyonu ya da oksidatif stres hipotezi gibi çok sayıda etyolojik ve patogenetik hipotez geliştirilmiştir. AH patogenetik mekanizması için bu hipotezlerden bir kısmının; eser element toksitesi, eksitotoksite, mitokondrial defekt ve oksidatif stresin birbiriyle etkileşimi söz konusu olabilir (4).

2.1.8. AH ve oksidatif stres hipotezi

2.1.8.1. AH ve serbest radikal

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. En önemli serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Oksijenin kendisi, süperoksid radikali, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikali önemli reaktif oksijen ürünleridir (28).

Oksijen radikalleri (reaktif oksijen türleri, ROS) kimyasal olarak dengeli olmayan, aşırı reaktif bileşikler olup, hücre ve dokularda aerobik metabolizma sırasında elektron transport zincirinin normal bir parçası olarak üretilmektedir. Serbest oksijen radikallerinin reaktivite özellikleri nedeniyle organizmada herhangi bir zamanda oluşturduğu hücre ve doku hasarı oksidan ve oksidatif stres olarak isimlendirilmektedir (29).



Şekil 3. Serbest radikal hasar ürünleri. Serbest radikaller farklı hücresel elemanlarla reaksiyona girebilir. DNA, membran ve protein gibi. Sonucunda farklı ürünler oluşur (31).

Beyin oksidatif strese yatkın bir organdır. Beynin oksidatif strese yatkınlığının nedenleri şunlardır:

- Beyin vücut ağırlığının sadece % 2'lik kısmını oluşturmasına rağmen; inspire edilen oksijenin % 50'sini kullanır. Hücreler tarafından kullanılan oksijenin yaklaşık % 5'i ROS'a redükte olur, daha az oksijen kullanan dokulara kıyasla beyin daha fazla ROS üretir.

- Beyin çift bağları nedeniyle ROS hasarına yatkın olan poliansatüre yağ asitleri (PUFA) açısından zengindir.

- Beyin omurilik sıvısı (BOS) oldukça reaktif hidroksil radikalleri oluşumunu katalizleyen küçük moleküler ağırlıklı demir ve bakır kompleksleri içerir. Bu geçiş metallerine bağlanan transferin ve seruloplamin antioksidanlarından fakirdir.

- Glutamat gibi eksitator nörotransmitterlerin salınımı postsinaptik nöronlarda ROS oluşumu ile sonuçlanan bir dizi reaksiyonu tetikler. Bu nöronların yoğunluğuna bağlı olarak; sinir sisteminde lokalize lezyonlar oluşabilir. Amiloid- β -peptid aracılı kalsiyum sinyalleri ile artan glutamat toksisitesi; ROS oluşumuna ve oksidatif strese katkıda bulunabilir. Glutamat NMDA reseptör aktivasyonunu; örneğin lipooksijenaz yolu ile araşidonik asit salınımı ve metabolizmasını uyarabilir. Araşidonik asit kaskatı-lipooksijenaz yolu esnasında üretilen 12-HETE ve 12-HPETE gibi araşidonik asit hidroperoksitleri sadece ikinci mesajcılar olarak değil aynı zamanda ROS kaynağı olarak da görev yapar.

- Dopaminerjik nöronlarda, dopaminin monoamin oksidaz ile oksidasyonu sırasında ROS açığa çıkması substansia nigra gibi beyin bölümlerinde artmış oksidatif strese yol açar. Bunun yine bir nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığının etiolojisinde rol aldığı düşünülmektedir.

- Nitrik oksit (NO) ve süperoksid radikalinin etkileşimi normal nöron metabolizmasıyla ilişkili olduğu kadar nöron dejenerasyonu ile de ilişkilidir.

- Beyinde katalaz aktivitesi ve glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitesi azdır.

- Pineal bezde üretilen, iyi bir ROS tutucu olan melatoninin sekresyonu yaşla belirgin olarak azalır.

- Nöronlar replike olmayan hücrelerdir. Beyin dokusundaki herhangi bir ROS hasarı zaman içinde kümülatif olur (32,33).

2.1.8.2. AH'nda artan oksidatif stresi destekleyen kanıtlar

- Serbest radikal oluşumunu uyarma yeteneğine sahip demir, alüminyum ve civanın artmış beyin konsantrasyonları
- Alzheimer beyinde artmış lipid peroksidasyonu, azalan PUFA miktarı ve AH'nda ventriküler sıvıda lipid peroksidasyonunun aldehid ürünü olan 4-hidroksinonenal miktarında artma
- AH beyinde artmış protein ve DNA oksidasyonu
- AH beyinde bozulmuş enerji metabolizması ve azalmış sitokrom oksidaz c
- Nörofibriler yumakta saptanan AGE (glikozilasyon son ürünleri), malondialdehid (MDA), karbonil, peroksinitrit, hem oksijenaz-I, süperoksit dismutaz-1 (SOD-1) ve senil plaklarda saptanan AGE, hem oksijenaz-I, SOD-1
- Amiloid β 'nin serbest radikal oluşturma yeteneğini gösteren çalışmalar (4).

Alzheimer hastalığı etyopatogenezinde temel patolojik belirleyici olan ekstraselüler amiloid beta plakaları ve intraselüler nörofibriler yumakların yanısıra, glutamat toksisitesi, eser element toksisitesi ve antioksidan savunma mekanizması bozukluğundan oluşan oksidatif stres hipotezi son yıllarda yoğun bir şekilde tartışılmaktadır. Oksidatif imbalans; protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu veya lipid peroksidasyonu şeklinde görülür. AH'li beyinde bu üç tip oksidatif hasara da rastlanmaktadır (30). Ancak beyin yüksek lipid konsantrasyonu ve oksidasyona duyarlı poliansatüre yağ asitlerinin yoğunluğu nedeniyle beyinde oksidatif stres kendini öncelikle lipid peroksidasyonu olarak gösterir (34-36).

2.2. Lipid Peroksidasyonu

Dokuda serbest radikal aracılı hasarın temel sonuçlarından biridir. Yağ açıl gruplarının peroksidasyonu çoğunlukla membran fosfolipidlerinde olmaktadır. Başlama, yayılma ve sonlanma şeklinde üç aşaması mevcuttur (37).

Lipid peroksidasyonu serbest radikal etkisi ile membrandaki PUFA'dan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Lipid radikali dayanıksız olup, bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların değişmesi ile dien konjugatları; lipid radikalinin moleküler oksijen ile etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer PUFA'ları etkileyerek

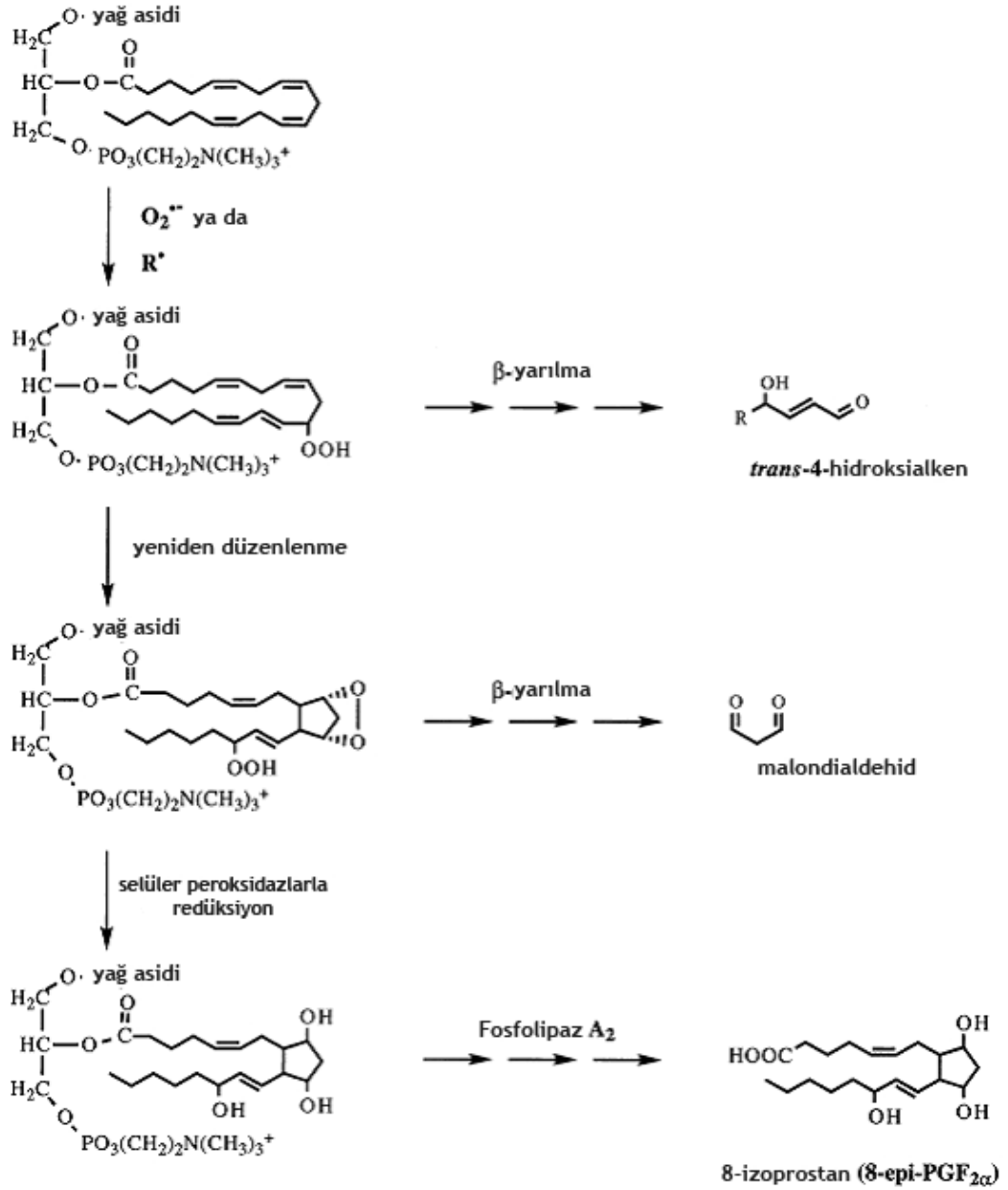
yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksillerine dönüşür, olay kendi kendini katalizler (29). Lipid peroksidasyonu substrat bitip, sonlanıncaya kadar devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucunda membranda yapısal hasar ve sekonder ürünler oluşur. Membran hasarı; fragmente yağ açıl zincirleri, lipid-lipid çapraz bağları, yeni yağ asidi esterlerini oluşturmak üzere endosiklizasyon ve lipid-protein çapraz bağ oluşumundan kaynaklanır. Total olarak bu süreçler, membranın biyofiziksel özelliklerinde değişiklik yapar. Lipid peroksidasyonu primer yada sekonder peroksidasyon ürünlerinin ölçümü ile değerlendirilebilir. Primer ürünler, konjuge dien ve hidroperoksitlerdir. Sekonder ürünler ise tiobarbütürik asit reaktif maddeler, gaz alkenler, F₂-izoprostanlardır (37).

Bu markerlar içinde F₂-izoprostanlar şu an için mevcut metodlara göre insanlarda in vivo oksidatif stresin en doğru göstergesi olarak kabul edilmektedir (38).

2.2.1. İzoprostanlar

İzoprostanlar; prostaglandin izomerleri ailesinin üyesi olup, serbest radikal katalizli mekanizma ile poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif modifikasyonu ile oluşurlar. İlk olarak Pryor ve Porter tarafından 25 yıl önce yağ asitlerinin otooksidasyonu ile PG benzeri yapıların oluşumu gösterilmiştir (39). Bununla beraber 1990'lı yılların başlarında bu bileşikler ilk defa olarak Morrow ve ark. tarafından in vivo olarak da gösterilmiştir (40). Sonrasında, izoprostan ölçümlerinin in vitro ve in vivo olarak lipid peroksidasyonunu sensitif ve spesifik değerlendirmeyi sağlayabileceğine dair pek çok kanıt bulunmuştur (41).

İzoprostanlar (iP), prostaglandinlerin kimyasal olarak stabil, yapısal izomerleridir. Siklooksijenaz, (COX) enzimi etkisi ile oluşan ve serbest araşidonik aside (AA) ihtiyaç duyan klasik prostaglandinlerden (PG) farklı olarak, izoprostanlar membran fosfolipidlerinde esterifiye formdaki araşidonik asitten oluşabilir. PG'lerin yan zincirleri halkaya göre trans pozisyonunda iken, iP yan zinciri halkaya göre cis pozisyonundadır. Membran fosfolipidleri üzerinde AA gibi PUFA'ların peroksidasyonu ile oluşan izoprostanlar, membrandan fosfolipaz aktivitesi ile serbest formda salınır (42).



Şekil 4. 8-izoprostan oluşumu. Esterifiye araşidonik asidin radikal katalizli peroksidasyonu, 8-izoprostanın açığa çıkışı (31).

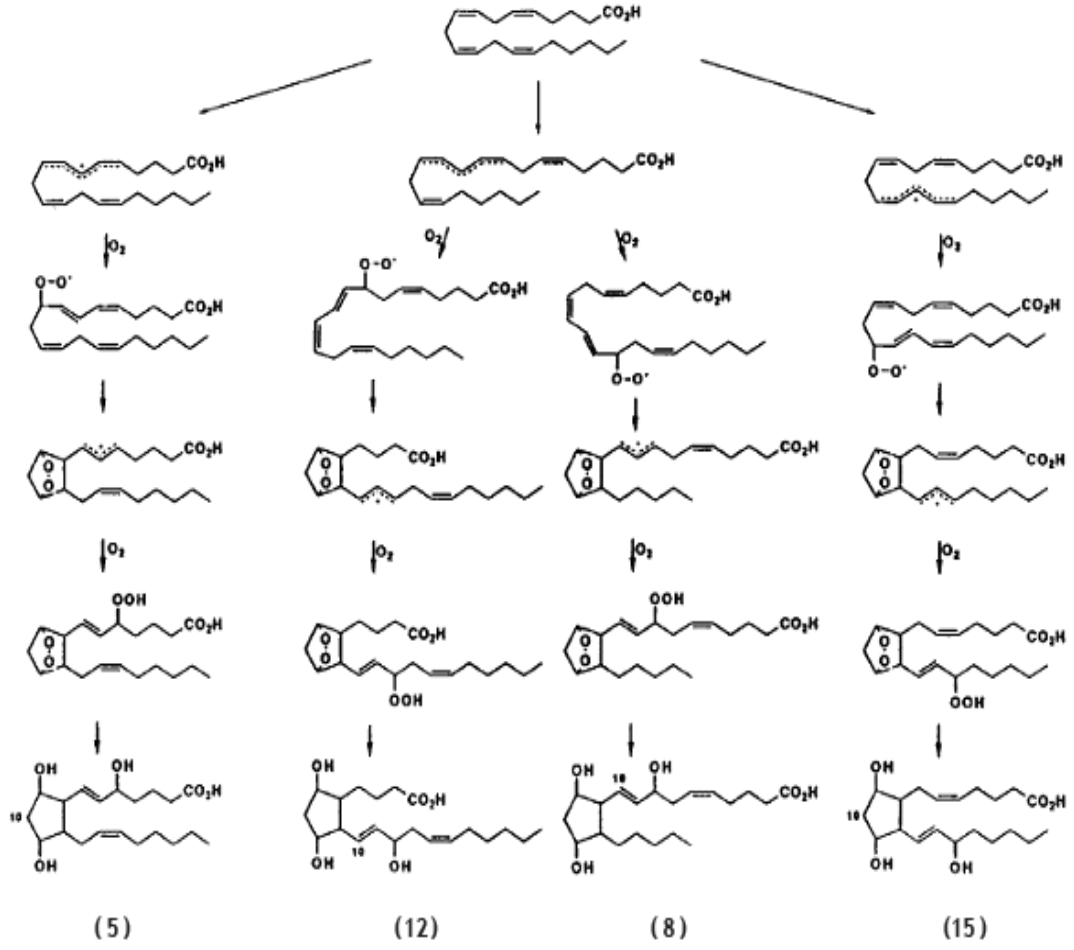
Dolaşıma katılan izoprostanlar, idrar yolu ile atılır. İzoprostana analog bileşikler, eikosapentaenoik asit ve dokosahekzaenoik asit gibi diğer PUFA'lardan da sentezlenebilir. Diğer PG'lerin de (lökotrien ve tromboksan gibi) serbest radikal katalizli izomerleri rapor edilmiştir (41). En kapsamlı olarak çalışılan izoprostanlar PGF_{2α}'ya izomer olup, F₂ izoprostan olarak isimlendirilmiştir (F₂-iP) (39). 8-izoPGF_{2α}'nın serbest radikal katalizli oluşumun yanısıra az miktarda siklooksijenaz

bağımlı olduğu ve biyolojik aktiviteye (renal vazokonstriksiyon, platelet agregasyonunun modülasyonu gibi) sahip olduğu gösterilmiştir (43).

2.2.1.1. F₂-izoprostan oluşum mekanizması

İlk olarak öncül molekül araşidonik asit, allilik hidrojen atomunun çıkarılması ile araşidonil karbon merkezli radikali verir. Sonra peroksil radikali elde etmek üzere oksijen eklenir. Hidrojenin çıkarıldığı yere ve oksijenin eklendiği yere göre dört farklı peroksil radikali izomeri oluşur. Radikallerin endosiklizasyonunu takiben; bisikloendoperoksit oluşturmak üzere diğer bir oksijen molekülü eklenir. Bu ara ürünler F₂-izoprostanlara redüklenir. Dört regioizomerin sekiz rasemik diasteromeri vardır, altmışdört farklı bileşik bu süreçte oluşabilir ama bir kısmı daha çok tercih edilir. Hidroksil iyonunun bağlandığı karbon atomuna göre 5, 12, 8, 15 serisi olarak isimlendirilir. Bu mekanizma Pryor'un in vivo ve in vitro olarak PUFA'ların peroksidasyonu sırasında oluşan bisikloendoperoksit ara ürünlerinin oluşumunu temel alan mekanizmasıdır.

F tipi halka içeren izoprostanlar (izoprostan bisikloendoperoksit ara ürünleri) yeniden düzenlenip D₂-E₂ izoprostanlara (PGD₂ ve PGE₂'ye analog yapılar), izotromboksanlara (tromboksana benzeyen) dönüşür (44).



Şekil 5. F₂-izoprostanların oluşum mekanizması. Dört regioizomer oluşumuna yol açar. Regioizomerlerin her biri teorik olarak sekiz rasemik diastereomer oluşumuna neden olur (44).

2.2.1.2. İzoprostanların İsimlendirilmesi

İzoprostan kısaca iP olarak gösterilir. D,E,F,G,H harfleri izoprostandaki siklopentan halkasının tipini belirler. Çift bağ sayısı alt simge (1,2,3,4) olarak belirtilir. α veya β sembolü, siklopentan halkasındaki hidroksil grubunun stereokimyasını gösterir. (α molekül düzleminin altında, β molekül düzleminin üstünde olduğunu) Romen rakamları ile (I-VIII) grup numarası belirlenir. ω karbonu referans noktasıdır. Araşidonik asitten oluşanlar (III-VI), eikosapentaenoik asitten oluşanlar (I-VI) ve dokosahekzaenoik asitten oluşanlar (I-VIII) sınıflanırken, kullanılan grup sayılarıdır. Şimdiye kadar en çok üzerinde çalışılan F₂iP; 8-epiPGF_{2 α} ya da 8-izoPGF_{2 α} yeni sınıflandırma ile iPF_{2 α} -III olarak bilinmektedir (42).

2.2.1.3. İzoprostan ölçüm metodları

F₂-izoprostanlar PUFA'ların serbest radikal veya otooksidasyonu sonucu ile oluştuğundan numune saklanırken veya işlemden geçirilirken artefakt olarak oluşumunu önlemek için önlem alınmalıdır. Plazma, doku gibi lipid içeren numuneler saklanırken hemen sıvı nitrojen ile dondurulup, -80 derecede saklanmalıdır, -80'de sekiz ay kadar stabildir. İdrarda PUFA bulunmadığı için otooksidasyon problem teşkil etmez (41).

İzoprostanlar, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak idrar, kan, safra, perikardial ve beyin-omurilik sıvısı gibi sıvılarda ve karaciğer, beyin dokularında ölçülmüştür. Bu ölçümlerde farklı metodlar kullanılmıştır. GC-MS (gaz kromatografi/elektron tutma/negatif kimyasal iyonizasyon kütle spektrometre), immüno-GC-MS (GS-MS öncesinde immüno afinite kolonu ile saflaştırma) yöntemleri ile izoprostan ölçümleri yapılabilmektedir. En önemli dezavantajları pahalı ve özelleşmiş ekipman gerekliliğidir. 8-izoPGF_{2α} için hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda kullanılmak için immünoassay kitleri mevcuttur. GC-MS'te mevcut olan ön hazırlama işlemleri burada da gereklidir (41).

2.3. Antioksidanlar

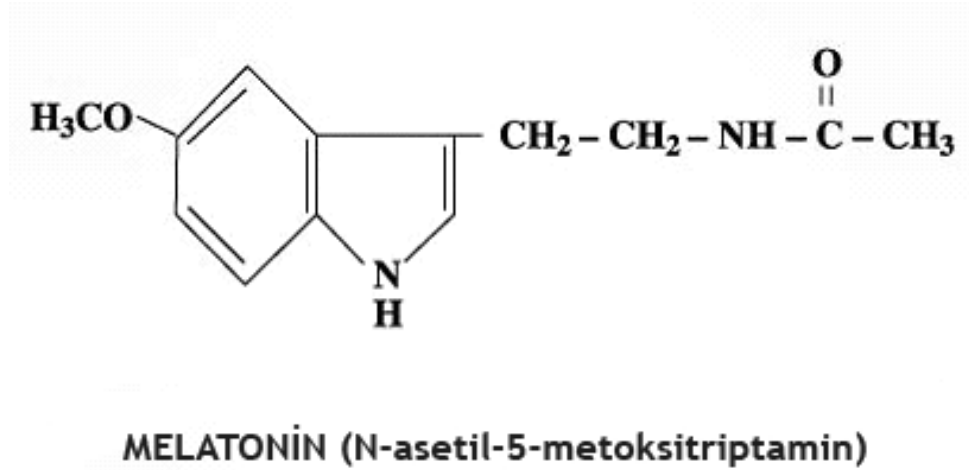
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar, peroksidasyonu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar dört şekilde etki ederler:

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma ve çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir.
2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaydır.
3. Onarıcı etki: Peroksidasyon zincirini tamir ederek etki gösterir.
4. Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak, peroksidasyon zincirini kırıp etkisiz hale getirir.

Antioksidanlar doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olarak iki gruba ayrılır. Kendi içinde de enzim olan ve enzim olmayanlar olarak ayrılırlar. Melatonin endojen kaynaklı olup, enzim olmayan bir antioksidandır (28).

2.3.1. Melatonin

İnsanlarda pineal bez 5 mm uzunluğunda, 1-4 mm kalınlığında ve 100 mg civarındadır. Temel olarak nöroglial hücreler ve melatonin üreten pinealosit hücreleri olmak üzere iki tip hücre içerir (45). 40 sene öncesine kadar pineal bez total olarak fonksiyonu olmayan bir organ olarak düşünülürken, şu anda pineal bezin ana sekretuar ürünü olan melatoninin organizmadaki tüm hücrelerin fizyolojisine etkisi olabileceği düşünülmektedir. Son çalışmalar melatoninin çok eski bir molekül olduğunu ve alglerden insanlara kadar tüm hayvanlarda bulunduğunu göstermiştir. Melatoninin, oksijen temelli metabolizmanın gelişimiyle beraber 2.5-3 milyon yıl öncesinden evrim geçirdiği düşünülmektedir (46).

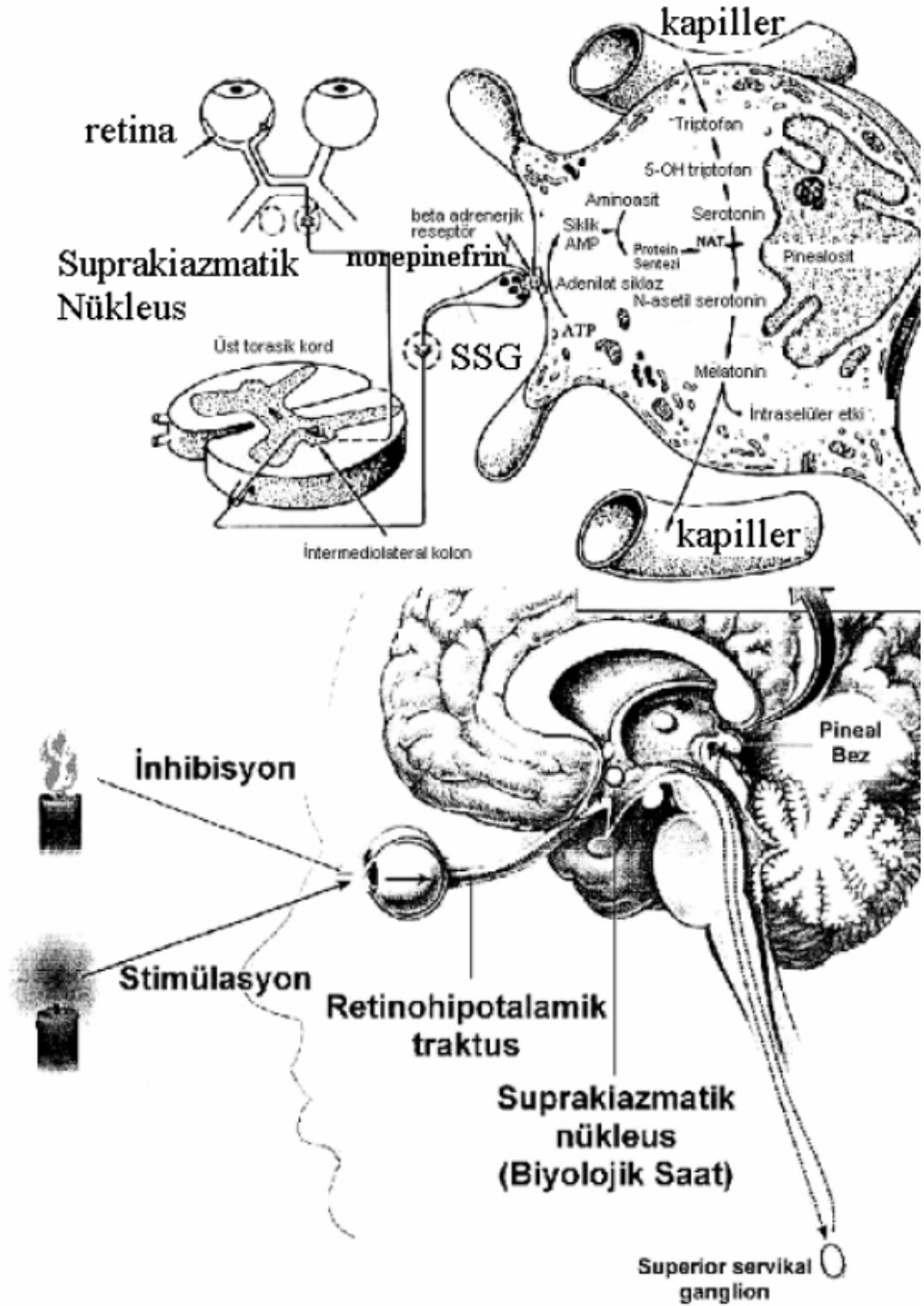


Şekil 6. Melatoninin moleküler yapısı

2.3.1.1. Melatonin sentezi

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), biyojenik bir amin olup serotonin (5-HT, 5-hidroksitriptamin) ile yapısal benzerlikler gösterir. Melatonin biyosentezi fotoperiyodik çevre tarafından düzenlenir. Retinada ışığa cevap veren, fotopigment içeren özelleşmiş nöronlar mevcuttur (47). Retinadan optik sinir içinde çıkan nöronal

impuls ön hipotalamustaki suprachiasmatik çekirdeğe (SCN) ulaşır. SCN'den spinal kordun üst torasik bölgesindeki intermediolateral hücre kolonuna iner. Spinal korddan superior servikal gangliona preganglionik sempatik sinirlerle taşınır, buradan çıkan postganglionik sempatik sinirler pineal bezde sonlanır. Bu yolla aydınlık-karanlık bilgisi pineal beze ulaşır, böylece melatonin sentez döngüsü belirlenir. Karanlıkla birlikte postganglionik sempatik sinirler noradrenalin salınımı yapar. Noradrenalin baskın olarak beta 1 adrenerjik reseptörlere (az miktarda alfa 1'e) bağlanarak hücre içinde depolanmış olan serotonin ve N-asetil transferazı (NAT) açığa çıkarır. Melatonin, serotoninden sırasıyla NAT ve 5-hidroksiindol-O-metiltransferaz (5-HIOM) enzimlerinin katalizlediği asetilasyon reaksiyonları ile sentezlenir. NAT aktivitesi, osilatuar melatonin sentezini düzenleyen, spesifik cAMP-bağımlı transkripsiyon faktörlerince kontrol edilir. (47,48) Kısa süreli bir ışığa maruz kalındığında sempatik aktive inhibe olur, NAT aktivitesi ve melatonin miktarı hızla azalır (49).



Şekil 7. Pineal bezde melatonin sentez ve kontrolü (50).

Karanlıkla beraber pineal bezde melatonin konsantrasyonu artar. Diğer endokrin organlardan farklı olarak, pineal bez melatoninini sentezlendikten sonra depolamaz, melatonin pineositlerden hızlı bir şekilde bez içindeki kapiller

damarlara ve üçüncü ventrikül aracılığıyla BOS'a geçer (47). İnsanda melatonin sekresyonu gece 2 ile 3 arasında pik yapar ve giderek düşüş gösterir. Gündüz melatonin konsantrasyonu gece ölçülen değerinin yirmide biri civarındadır. Melatonin plazma konsantrasyonu gündüz 0-20 pg/ml iken, gece 50-200 pg/ml düzeyine yükselmektedir. Bir günde 30 mg melatonin üretilmektedir ve bunun % 80'i gece sentez edilmektedir (49).

Pineal bezde üretilen melatonin miktarı genetik olarak belirlenmiştir, kişinin salınım döngüsü oldukça sabittir. Aynı yaştaki bireyler arasında melatonin konsantrasyonundaki gece pikleri değişkenlik gösterir. Bazı kişiler hayatları boyunca diğerlerine göre daha fazla melatonin üretir ama bu farklılığın önemi halen bilinmemektedir (47).

Serum melatonin konsantrasyonu yaş ile de değişiklik göstermektedir. Doğumda miktarı çok az iken, doğumdan hemen sonra yükselmeye başlar. 1-3 yaş arasında pik yapar, salınım paterninin sirkadien ritme dönüştüğü puberte ve yetişkin döneme kadar miktarı kademeli şekilde düşer. 20'li yaşlardan sonra yaşla beraber yavaş bir düşüş başlar. İleri yaşlarda pineal bezin sentezleme yeteneğindeki azalma pineosit membranındaki beta adrenerjik reseptörlerin azalması, pineal bez içindeki sentetik yolda gerileme ve SCN'den gelen sinyalde progresif olarak zayıflama gibi çeşitli faktörlerle ilişkili olabilir (48).

Wu ve ark. prelinik ve klinik AH'ında düşük melatonin seviyelerinin altında yatan moleküler mekanizmayı açıklığa kavuşturmak için yaptıkları bir çalışmada, prekürsörler (triptofan, 5-HT), ürünler (melatonin, 5-HIAA) ve enzimlerin mRNA seviyelerini (TPH, NAT-1, HIOMT, MAOA, MAOB), noradrenerjik düzenleyicileri (NA, beta1 adrenerjik reseptörler mRNA seviyeleri) kontrol (Braak evre 0), prelinik AH (Braak evre I-II), AH'larının (Braak evre VI) pineal bezlerinde ölçmüşlerdir. Diurnal melatonin ritminde ve noktürnal melatonin seviyelerinde kaybın, noradrenerjik regülasyonda disfonksiyon ve artmış MAOA ile 5-HT'nin depleasyonu sonucunda erken prelinik AH evrelerinden itibaren olduğu sonucuna varmışlardır (51).

60 yaş üzerinde gündüz ve gece melatonin seviyelerinin düşük olduğunu, yaşlanma ile fizyolojik melatonin konsantrasyonu arasında ilişki gösterilmiştir.

Alzheimer hastalığı bulunan bireylerde bu hastalığı bulunmayanlara nazaran daha düşük seviyede melatonin bulunduğu belirtilmektedir (45,47,49).

2.3.1.2. Melatonin metabolizması

Melatonin, melatonin hidroksilaz enzimi yardımı ile primer olarak karaciğerde hızlı bir şekilde en önemli metaboliti olan 6-hidroksi melatonine metabolize edilir. Bir seri reaksiyon sonrasında kimyasal ortamın durumuna göre sulfat yada glukuronide konjuge olur. İdrarda 6-hidroksimelatonin sülfat metabolit seviyesi pineal fonksiyonu gösteren önemli bir indekstir. Melatonin tahminen tüm hücrelerde 3-hidroksi melatonine dönüştürülür ve benzer şekilde idrarda ölçülebilir, kişinin karşılaştığı oksidatif stresle orantılıdır (47,52).

2.3.1.3. Melatonin reseptörleri

Melatoninin organizma üzerinde çeşitli etkileri vardır, bu etkilerinin bir kısmı reseptör aracılı iken diğerleri reseptörden bağımsızdır. Bilinen melatonin reseptörleri yedi transmembran domain'e sahip olup, G-proteinle eşleşmiş reseptör ailesindedir. İki tane reseptör tanımlanmıştır; MT1 ve MT2. MT1 yüksek afiniteli iken, MT2 düşük afinitelidir (MT1a, MT1b, MT1c, MT2) (48). Pek çok dokuda melatonin reseptörü mevcuttur. SCN ve pars tüberalis üzerinde yoğunluğu fazladır. Membran melatonin reseptör farmakolojisi halen incelenmektedir (47).

Melatonin yüksek miktarda lipofilik olduğundan kolaylıkla hücre içine girebilir. Sitolde kalmoduline bağlandığı ve insan lökositlerinde farmakolojik olarak nükleer bağlanma bölgeleri veya reseptörleri karakterize edilmiştir. Bu bağlanma bölgelerinin melatoninin günlük etkilerini nasıl belirlediği tam olarak açıklanamamıştır. Ek olarak sitozolde, membranda ve nükleusta direkt serbest radikal toplayıcı ve indirekt antioksidan etkisinin reseptöre ihtiyacı olmadığı gösterilmiştir (47).

2.3.1.4. Melatoninin Etkileri

Tablo 1. Melatoninin bazı biyolojik oluşumlar üzerine etkilerini açıklayan mekanizmalar (50).

Biyolojik Oluşum	Mel'in Etkisi	Etki Mekanizması	Kaynak
Uyku	Hipnotik etki ve uykuya eğilimin artması (Uykuya dalış hızı ile uyku süre ve kalitesinin artması)	- Hipotermik etki (farmakolojik dozlarda) - Limbik sistem üzerinde reseptör aracılı etki	Plasebo kontrollü klinik araştırmalar
Sirkadien ritim	- Sirkadien ritimlerin kontrolü - Aydınlık-karanlık siklusunun düzenlenmesi	- Gözlerden ve suprakiazmatik nükleustan gelen nöral uyarılara cevap olarak MEL salınımı - Nöral ve periferik dokularda reseptör aracılı etkiler - Termoregülasyon	Işığın ve aydınlık-karanlık siklusunun MEL salınımına etkisini araştıran çalışmalar
Duygudurum	- Mevsimsel affektif bozukluk ve depresyon gibi siklik duygudurum hastalıkları üzerine düzenleyici etki	-Bilinmiyor (Fakat,tedavide kullanılan tüm antidepresanlar MEL üretimini arttırmaktadır)	MEL salınımı ile ilgili karşılaştırmalı klinik araştırmalar ve duygudurum bozukluklarında fototerapi çalışmaları
İmmünite	- Artmış immün yanıt	- T-helper lenfositler tarafından interlökin yapımının artması - Granülosit ve makrofajlarda,artmış koloni uyarıcı faktörün üretimi ile kemik iliği hücrelerinin apoptozisten korunması	İnsanlarda birkaç kontrolsüz araştırma
Kanser	- Antiproliferatif etkiler	- Direkt antiproliferatif etki (antimitotik aktivite) - İmmünomodülatör etki (immün yanıtın artmasıyla tümör büyümesinin bas-kılanması) - Antioksidan etki	Hayvanlar ve insanlarda neoplastik hücrelerle ve hücre soylarıyla <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> çalışmalar; birkaç kontrolsüz araştırma
Seksüel olgunlaşma ve üreme	- Antigonadal, anovulatuvar etkiler	- Hipotalamik-hipofizer gonadal eksenin baskılanması (serumda düşük LH ve yüksek prolaktin seviyeleri) - Seks steroidlerinin üretimi üzerine düzenleyici etki	MEL salınımı ile ilgili karşılaştırmalı klinik çalışmalar
Yaşlanma	- Hücre hasarının önlenmesi ve diğer koruyucu etkiler	- Antioksidan etki	Hayvanlarda <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> araştırmalar

2.3.1.5. Serbest radikal toplayıcı ve nöral antioksidan olarak melatonin

Melatoninin sirkadyen ve mevsimsel ritimlerin, immün fonksiyonun, retinal fizyolojinin, tümör inhibisyonunun, uykunun düzenlenmesi gibi fonksiyonlarının yanısıra yakın zamanlarda keşfedilen serbest radikal toplayıcı ve antioksidan etkileri olduğu bulunmuştur (47).

Melatoninin beyinde oksidatif hasara karşı oldukça koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. Organizmadaki oksidatif hasarın % 50'sinin hidroksil radikalinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Hidroksil radikali çok reaktif olup, üretildiği yerin çevresindeki molekülleri ayırt etmeden zarar verir. Melatoninin çeşitli teknikler kullanılarak in vivo ve in vitro oldukça toksik hidroksil radikalinin toplayıcısı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle melatoninin etkisi önemlidir. Diğer antioksidanların çoğundan daha büyük hızla toplayıcı etki gösterir (53).

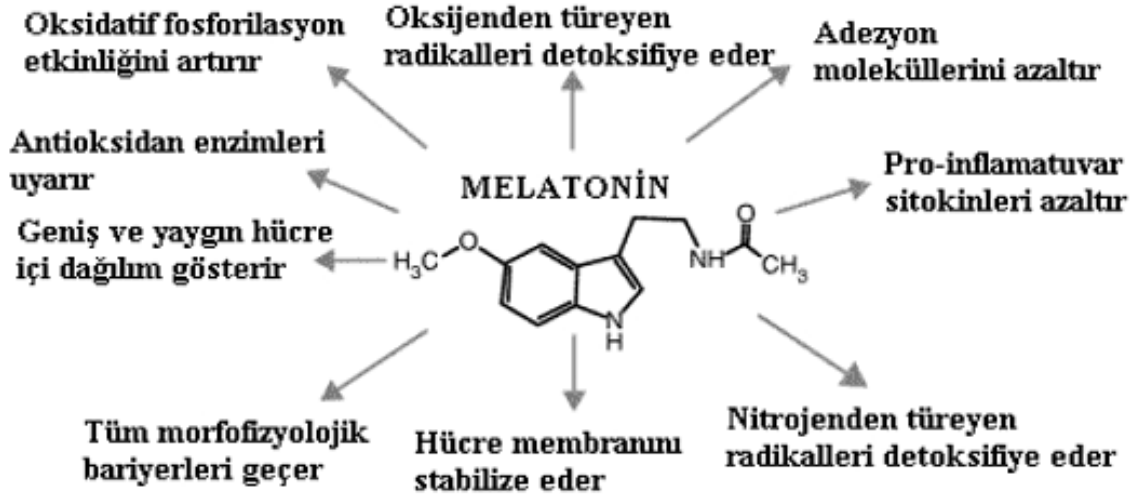
Melatonin hidroksil radikalini detoksifiye etmekle beraber, esansiyal nöronal molekülleri bozan diğer reaktif oksijen ara ürünlerini de nötralize etmektedir. ONOO⁻ ve prekürsör moleküllerinden NO[•]ide toplayıcı etki gösterdiği rapor edilmiştir (54). ¹O₂'inin toksisitesini de engellediği gösterilmiştir (55).

Lipid peroksidasyonu, zincir reaksiyonları nedeniyle diğer serbest radikal hasarlarından daha dramatik olup özellikle yıkıcıdır. Melatonin peroksil radikalini (LOO⁻) detoksifiye edebilmesi nedeniyle zincir kırıcı antioksidan olarak da fonksiyon yapabilir. Majör zincir kırıcı antioksidan vitamin E'dir. Melatoninin Vitamin E'ye göre belirgin bir avantajı kan beyin bariyerini kolayca geçmesidir (56).

Melatonin direkt toplayıcı etkisinin yanısıra, birkaç önemli antioksidanı aktive ederek indirekt bir antioksidan olarak da etki eder. Bu enzimler radikal prekürsörlerini ve reaktif oksijen ara ürünlerini toksik olmayan ürünlere dönüştürerek serbest radikal hasarına karşı korur. Beyinde majör antioksidan enzimler süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glukoz 6-fosfat dehidrogenazdır. Farmakolojik ve fizyolojik melatonin seviyelerinin her ikisinin de bu antioksidan ajanların mRNA seviyelerini ya da aktivitelerini uyardığı gösterilmiştir (57,58) Glutasyon peroksidaz, peroksinitrit redüktaz gibi de fonksiyon gördüğünden, sadece intraselüler alandan toksik hidroperoksidi ve hidrojen peroksidi çıkarmakla kalmaz, yüksek derecede reaktif ONOO⁻ yı azaltır (59). Melatoninin fizyolojik seviyelerinin nitrik oksit sentazı inhibe ederek NO oluşumunu azalttığı da gösterilmiştir (60).

Beynin deneysel oksidatif hasar modellerinde, melatoninin hasarı azaltmada belirgin olarak efektif olduğu gösterilmiştir. İn vivo olarak eksitotoksisite, iskemi-reperfüzyon, travmatik beyin hasarı, hiperoksi, porfirik nöropati ve Parkinson modellerinde, melatoninin serbest radikal mekanizması ile oluşan makromoleküler

hasarı azalttığı, in vitro olarak amiloid β 'nin indüklediği lipid peroksidasyonunu azaltmada efektif olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, oksidatif strese maruz kalan nöronlarda nöron kaybının muhtemel mekanizması olan apoptozu azaltır (56).



Şekil 8. Melatoninin antioksidan özellikleri (47).

2.3.1.6. AH'nda antioksidan ve antiamiloidojenik olarak melatonin

Demans şiddeti nöron kaybı ve sinaptik kayıp ile korele olduğundan, nöronun fonksiyonunu ve hayatta kalmasını arttırmak terapötik açıdan primer amaçtır. Pappolla ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada $A\beta$ 'ya maruz bırakılan nöroblastom kültür hücrelerinde melatoninin, hücre ölümü ve oksidatif hasarı engellediğini göstermişlerdir. $A\beta$ melatonin ile kombine edildiğinde; indoleamin'in $A\beta$ 'ya maruz kalan nöronları tamamen koruduğu, kontrol nöronlar ile aralarında hiç fark olmadığı gözlenmiştir (61).

Etki mekanizmaları incelenirken melatoninin spontan β tabaka ve amiloid fibril oluşumunu kuvvetli olarak inhibe ettiğini gösterilmiştir. Bu özellik melatoninin intraselüler antioksidan etkisi ile sinerjistik olan ek hücre koruması sağlar. Melatoninin güçlü antiamiloidojenik özellikleri diğer antioksidanlar ile gözlenmemiştir (56).

Yaşlanma ile melatonin sekresyonunun azaldığı ve demansta daha derin azalmalar olduğu rapor edilmiştir (47,62). Melatoninin $A\beta$ üzerindeki direkt antiamiloidojenik hareketi, antioksidan etkileri ve bu hormonun diğer hücre

koruyucu özelliklerinin hücre seviyesinde olması mümkündür. Bu hücre koruyucu etkiler sinyal transdüksiyon yollarını (melatonin fosfolipaz A2 ve siklooksijenazı inhibe eder) ve intrinsik selüler antioksidan defanslarda artışı içerebilir. Bu bulgular hesaba katılırsa ilerleyen yaş ile endojen melatonin seviyesinde azalmanın AH semptomlarının başlangıcını ve ciddiyetini etkilemesi olasıdır (56).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Vaka Seçimi

Çalışma, Biyokimya ve Psikiyatri Anabilim Dalı'nda yapıldı. Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı. Çalışma grubu Atabey Huzurevi'nde kalan, Psikiyatri polikliniğine başvuran ve alan taraması ile belirlenen altmış yaş üzerindeki 63 kişiden oluşturuldu. Çalışmaya dahil edilmeden önce, hasta ve ihtiyaç duyulduğunda yakını çalışma konusunda bilgilendirilip, gönüllü bilgilendirilme formu doldurularak onayları alındı. Ayrıntılı nörolojik ve psikiyatrik muayene psikiyatrik hekim tarafından yapıldı. Bilişsel durum değerlendirilmesinde Mini-Mental Durum Muayenesi (MMSE) (63,64), Geriatrik Depresyon Skalası (65), Global Yıkım Ölçeği (66), Behave-AD (67), Günlük Yaşam Aktivitesi Ölçeği (GYA) (68), Saat Çizme Testi (CDT)'nden (14) oluşan bir psikiyatrik test bataryası kullanıldı. Hastaların rutin biyokimyasal incelemeleri yapıldı. Ciddi sistemik hastalığı olanlar, kognitif fonksiyonları değerlendirmeye izin vermeyen körlük, sağırılık gibi rahatsızlıkları olanlar, steroid kullananlar, vitamin-mineral kullananlar ve demans harici psikiyatrik ve nörolojik rahatsızlığı olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

MMSE skoru 24 ve altında olanlar kognitif fonksiyonu bozulmuş olarak kabul edildi. Klinik olarak Hafif Kognitif Bozukluk (MCI) Petersen kriterlerine (17), Alzheimer tipi demans tanısı ise DSM-IV kriterlerine (14) göre konuldu. DSM-IV ve Petersen kriterlerini karşılamayan, kognitif fonksiyonları normal olan, MMSE skoru >26 olanlar kontrol grubuna dahil edildi. Çalışmada Alzheimer Hastalığı (AH) grubu, Hafif Kognitif Bozukluk (MCI) ve kontrol grubu şeklinde üç grup oluşturuldu. AH grubu yaş ortalaması 79.05 ± 8.93 , MMSE skoru 14.7 ± 4.3 olan 8'i kadın 12'si erkek 20 kişi, MCI grubu yaş ortalaması 73.95 ± 7.19 , MMSE skoru 22.0 ± 1.3 olan 12'si kadın, 9'u erkek 21 kişi, kontrol grubu yaş ortalaması 71.59 ± 6.65 , MMSE skoru 27.9 ± 1.3 olan 9'u kadın 13'ü erkek 22 kişiden oluşturuldu.

3.1.2. Numunelerin alınışı ve hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen kişilerden sabah 8:00'de aç karnına venöz kan EDTA'lı ve polistren jelli tüplere alındı. 3000g'de 10 dakika santrüfuj sonrasında plazma ve serum numuneleri ayrıldı. İsoprostan çalışılacak plazma numunelerine, numunenin % 0.5'i olacak şekilde BHT eklendi. Tüm numuneler analiz yapılıncaya kadar -80° de dondurularak saklandı.

3.1.3. Kullanılan malzeme ve cihazlar

1. Derin dondurucu : Scientific Snijders (Hollanda)
2. Buzdolabı : Kirsch Bosch (Almanya)
3. Soğutmalı santrifuj : Centifuge 5415 R Ependorf (Almanya)
4. Santrifuj : Megafuje 1,0 Kendro Lab. Products (Almanya)
5. Manyetik karıştırıcı : Nüve (Türkiye)
6. Vorteks : Labinco (Hollanda)
7. Otomatik pipetler : Ependorf (Almanya), Gilson (Fransa)
8. Hassas terazi : Scaltec (Almanya)
9. Etüv : Memmert
10. PH strip : Merck (Almanya)
11. Gamma sayacı : Mini Assay- Mini Instruments
12. Benmari : Elektro-mag (Türkiye)
13. Elisa okuyucu : EL_x808 IU ultra microplate reader, Biotek ins-USA
14. Elisa plate yıkayıcı : EL_x50 Autostrip Washer, Biotek instruments- USA

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitleler

1. Etanol % 96, Merck (Almanya)
2. BHT (Butylated Hydroxytoluene), Sigma (Almanya)
3. NaOH, Riedel-de Haen
4. HCl %37 Reagent ACS, Riedel-de Haen
5. Melatonin direct RIA (serum/plazma) kiti REF: RE29301, IBL/Hamburg (Almanya)
6. Direct 8-iso-Prostoglandin F_{2α} , Enzyme immunoassay kit, Correlate EIA cat: 900-091, Assay Designs (USA)

3.2. Metod

3.2.1. Melatonin tayini

Serum melatonin düzeyi RIA yöntemi ile çalışıldı. Kullanılan ticari kitin prosedüründeki esaslara uyuldu. Kit, işaretli (I^{125} izotopu ile), işaretli (numune) antijenlerin antikor üzerindeki serbest bölgeler için yarıştığı kompetitif prensibe dayalı idi. Bağlı ve serbest antijenler çöktürülerek, santrifüj edilerek ayrıldı. RIA tüpünün dibinde kalan çökeltinin radyoaktivitesi gamma sayacı ile ölçüldü. Elde edilen cpm değerleri ile bilgisayar programında standart grafiği çizildi ve numunelerin melatonin düzeyleri hesaplandı. Radyoaktivite miktarı ile melatonin düzeyleri arasında ters orantı mevcut idi. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

3.2.2. 8-izo-PGF_{2α} tayini

Plazma total 8-izo-PGF_{2α} düzeyi EIA yöntemi ile çalışıldı. Kullanılan ticari kitin prosedüründeki esaslara uyuldu. Numuneler prosedürdeki, numune ön hazırlık işlemleri uygulandıktan sonra çalışıldı. (alkali hidroliz ve nötralizasyon). Kit, numune içindeki ve enzime (alkalen fosfataz) bağlı 8-izo-PGF_{2α}'ın poliklonal 8-izo-PGF_{2α} antikoru için yarıştığı kompetitif prensibe dayalı idi. İnkübasyon sonrasında fazla reaktif yıkama ile uzaklaştırılıp, enzim için substrat eklenip, kısa bir inkübasyon sonrasında enzim reaksiyonu durduruldu ve kuyucuklarda oluşan sarı rengin 405 nm'de ELİSA mikrolate okuyucuda optik dansiteleri alındı. Oluşturulan standart eğri yardımı ile numune içindeki total 8-izo-PGF_{2α} düzeyleri belirlendi. Rengin şiddeti ile 8-izo-PGF_{2α} düzeyleri arasında ters orantı mevcut idi. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

3.3. Veri Analizleri

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 11.0 for Windows paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm grupların karşılaştırılması için ANOVA testi, grupların ikişerli karşılaştırılması için post-hoc Bonferroni testi kullanıldı. Gruplara göre cinsiyet dağılımı için Ki-kare testi, yaş dağılımı için Kruskal Wallis-ANOVA ve anlamlı farkın hangi gruplar arasında olduğunu anlamak için Mann-Whitney U, korelasyon analizi için Pearson korelasyon testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± SD olarak verildi. Anlamlılık düzeyi için p<0.05 değeri kabul edildi.

4. BULGULAR

Kontrol grubu yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2α} verileri Tablo 2’de, MCI grubu yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2α} verileri Tablo 3’te, Alzheimer grubu yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2α} verileri Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 2. Kontrol grubunun yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2α} verileri

Sıra	Yaş	Cins	MMSE	Melatonin (pg/ml)	8-izoPGF _{2α} (pg/ml)
1	85	erkek	28	14,80	2702,5
2	76	erkek	29	9,73	2500,0
3	72	erkek	30	11,30	2500,0
4	66	erkek	28	10,68	2500,0
5	75	erkek	27	11,59	1780,7
6	66	erkek	30	12,01	2220,0
7	70	erkek	30	9,69	4211,5
8	67	erkek	29	10,40	956,1
9	68	kadın	27	9,91	520,3
10	78	kadın	27	11,51	1882,3
11	84	kadın	27	11,36	2381,8
12	70	erkek	27	11,24	919,3
13	80	erkek	28	12,29	1563,1
14	65	erkek	30	11,77	2246,0
15	80	kadın	26	13,96	2752,7
16	70	kadın	27	15,33	1810,5
17	74	erkek	26	10,40	1676,7
18	63	kadın	28	12,23	1892,8
19	64	erkek	29	9,75	2285,7
20	67	kadın	28	19,70	1840,8
21	72	kadın	27	9,70	718,2
22	63	kadın	27	12,01	2468,3
ortalama	71.59	9K/13E	27,9	11,88	2014,9

Tablo 3. MCI grubunun yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2α} verileri

Sıra	Yaş	Cins	MMSE	Melatonin (pg/ml)	8-izoPGF _{2α} (pg/ml)
1	77	erkek	22	14,14	3392,9
2	75	erkek	23	9,25	3080,4
3	62	erkek	20	12,43	3903,4
4	85	erkek	23	9,03	1780,7
5	79	erkek	23	6,85	2580,0
6	65	kadın	23	7,34	1320,6
7	75	kadın	23	23,06	4519,9
8	80	kadın	21	8,56	3041,6
9	71	kadın	21	8,20	2181,8
10	73	kadın	20	13,34	3673,1
11	75	kadın	20	8,64	1946,6
12	64	kadın	23	8,11	1369,6
13	73	kadın	21	7,25	1185,7
14	65	kadın	22	25,57	1320,6
15	75	kadın	24	23,74	2107,7
16	65	kadın	22	13,21	1914,1
17	76	kadın	23	11,32	6203,3
18	77	erkek	24	13,31	2528,1
19	76	erkek	20	11,44	2259,1
20	73	erkek	23	15,87	1489,9
21	92	erkek	22	16,76	2395,9
ortalama	73,95	12K/9E	22	12,73	2580,7

Tablo 4. Alzheimer grubunun yaş, cins, MMSE, melatonin ve 8-izoPGF_{2α} verileri

Sıra	Yaş	Cins	MMSE	Melatonin (pg/ml)	8-izoPGF _{2α} (pg/ml)
1	78	kadın	4	7,11	8104,2
2	88	kadın	12	9,56	4211,5
3	76	erkek	15	10,50	6670,5
4	74	erkek	9	6,06	6562,6
5	74	kadın	17	8,75	3370,8
6	80	erkek	15	8,09	2498,0
7	78	kadın	11	11,68	6405,3
8	86	erkek	18	9,06	970,4
9	70	kadın	19	9,01	2181,8
10	78	erkek	17	6,50	1957,6
11	92	erkek	9	4,84	1241,4
12	72	erkek	20	9,50	3415,1
13	73	erkek	20	14,03	2395,9
14	70	kadın	20	9,86	1914,1
15	71	erkek	16	7,19	3483,1
16	85	erkek	13	17,77	2169,2
17	100	erkek	17	7,26	2060,0
18	79	erkek	17	7,23	1979,8
19	65	kadın	14	7,51	1546,5
20	92	kadın	11	8,80	1957,6
ortalama	79,05	8K/12E	14,7	9,02	3254,8

Cinsiyet bakımından gruplar karşılaştırıldığında (Ki-kare testi) gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p= 0.456$).

Yaş açısından üç grup Kruskal Wallis–ANOVA testi ile karşılaştırıldığında fark bulunmuştur ($p=0.020$). Farkın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak amacıyla Mann-Whitney-U testi yapıldı. Farkın Alzheimer ve kontrol grupları arasından kaynaklandığı tesbit edildi ($p=0.006$).

Pearson korelasyon testi yapılarak MMSE değerleri ile 8-izoPGF_{2α} seviyeleri arasındaki ilişkiye bakıldığında MMSE değerleri düştükçe 8-izoPGF_{2α} seviyelerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür (Pearson korelasyon $r = -0.459$, $p= 0.00$). MMSE değerleri ile melatonin seviyeleri arasındaki ilişkiye bakıldığında MMSE değerleri arttıkça, melatonin seviyelerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür (Pearson korelasyon $r =0.317$, $p= 0.011$).

ANOVA testi ve post-hoc Bonferroni testi ile gruplar arasında melatonin değerleri karşılaştırıldığında Alzheimer grubu ve MCI grubu arasında istatistiksel

olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.009$). 8-izoPGF_{2 α} seviyeleri karşılaştırıldığında Alzheimer grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.022$). Melatonin, 8-izoPGF_{2 α} seviyeleri ve yaşın gruplardaki ortalama değerleri ve standart deviasyonları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Melatonin, 8-izoPGF_{2 α} seviyeleri ve yaşın gruplardaki ortalama değerleri ve standart deviasyonları

	Kontrol Grubu	MCI Grubu	Alzheimer Grubu
Yaş	71.59 \pm 6.65 ^a	73.95 \pm 7.19	79.05 \pm 8.93 ^a
Melatonin (pg/ml)	11.88 \pm 2.35	12.73 \pm 5.57 ^b	9.02 \pm 2.91 ^b
8-iPGF _{2α} (pg/ml)	2014.9 \pm 809.1 ^c	2580.7 \pm 1239.7	3254.8 \pm 2066.1 ^c

^a: Alzheimer ve kontrol grubu karşılaştırıldığında $p<0.05$ anlamlılık düzeyi ($p=0.006$)

^b: Alzheimer ve MCI grubu karşılaştırıldığında $p<0.05$ anlamlılık düzeyi ($p=0.009$)

^c: Alzheimer ve kontrol grubu karşılaştırıldığında $p<0.05$ anlamlılık düzeyi ($p=0.022$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Alzheimer Hastalığı yaşlılarda en sık görülen nörodejeneratif bozukluktur. Klinik olarak ilerleyici, geri dönüşümsüz hafıza kaybı ve kognitif bozukluklarla karakterizedir. Yaşlılarda demansın en sık nedenidir, altmış beş yaşından sonra her beş yılda bir etkilenen sayısı iki katına çıkar. 85 yaş ve üzerinde % 40 gibi değerlere ulaşmaktadır (1). Halen hastalığı başlatanın ne olduğu bilinmemesine rağmen, en azından sporadik formunun genetik risk faktörleri ile farklı genetik dışı olayların kombinasyonu sonucunda oluştuğu açıktır (4).

Son on yılda artan kanıtlar, AH'nın patolojik belirteci olan lezyonların (senil plak ve nörofibriler yumak) sinaps kaybı, masif nöronal dejenerasyon, yoğun gliosis, mikrogliya aktivasyonu, enflamatuar süreç ve ROS aracılı oksidatif hasar gibi birtakım tanısız olmayan ek anormalliklerle ilişkili olduğunu desteklemektedir (30).

ROS normal koşullarda da vücutta oluşmakta olup, etkili antioksidan sistemler ile seviyeleri düşük tutulur. Oksidan-antioksidan denge oksidan tarafa kaydığında protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu, lipid peroksidasyonu şeklinde oksidatif stres kendini gösterir (37).

AH'nda rapor edilen çok sayıda ROS aracılı hasarın göstergesi vardır. Bunlardan bir kısmı lipid peroksidasyonu göstergesi olarak; malondialdehid, 4-hidroksinonenal, F₂-izoprostanlar, protein oksidasyonu göstergesi olarak; protein karboniller, nitrotirozin DNA oksidasyonu göstergesi olarak; 8-hidroksi-2-deoksiguanozin, tek zincir kırıklarıdır. Yapılan çalışmaların çoğunluğunda bu markerlerin AH beyinlerinde kontrollere göre yüksek seviyeleri saptanırken çok az bir kısmında saptanmamıştır (69).

İzoprostanlar prostaglandin izomerleri ailesinin üyesi olup, serbest radikal katalizli mekanizma ile poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif modifikasyonu ile oluşurlar. İzoprostan ölçümlerinin in vivo olarak lipid peroksidasyonunu sensitif ve spesifik değerlendirmeyi sağlayabileceği gösterilmiştir (41).

İlk olarak post-mortem kesin AH tanısı alanlar kişilerden ventriküler BOS sıvısında F₂-izoprostan ve F₄-izoprostan yüksekliği gösterilmiştir (70).

Pratico ve arkadaşları tarafından yapılan başka post-mortem bir çalışmada, AH'larının beyinlerinin frontal ve temporal loblarında beynin diğer bölgelerine,

kontrol, şizofreni ve Parkinson hastalarının beyinlerinin aynı bölgelerine göre GS-MS'te ölçülen 8-epiPGF_{2α} ve iPF_{2α}-VI miktarları artmış bulunmuştur. Ölçülen her iki iP seviyeleri arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır. Aynı zamanda post-mortem lateral ventriküler BOS iPF_{2α}-VI seviyeleri AH'nda kontrollerden yüksek saptanmıştır (71).

Post-mortem çalışmalar oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun AH'ndaki nörodejeneratif sürecin erken bir basamağı mı yoksa sonucu mu olduğu sorusuna cevap verememektedir. Bu nedenle post mortem beyin dokusu ve BOS'ta yapılan çalışmaların ardından yaşayan ve klinik olarak AH tanısı alanlarda çalışmalar yapılmıştır (7).

Montine ve arkadaşları, yaşayan hafif AH, olası AH tanısı ve ALS hastalarından oluşan bir çalışma grubunda BOS F₂-izoprostan konsantrasyonu orta derecede olmakla beraber AH'nda anlamlı olarak yüksek iken ALS'de normal bulmuşlardır. Bu çalışmada BOS F₂-izoprostan konsantrasyonu; yaş, blessed demans skoru veya hastalık süresi ile ilgili korelasyon saptanmamıştır. AH ve kontrol F₂-izoprostan değerleri arasında her iki grupta kısmi çakışmaların olması nedeniyle demansın erken markeri olarak kullanılamayacağı kanısına varılmıştır (72).

Waddington ve arkadaşları, yaşayan AH'nda plazma ve idrar F₂-izoprostan seviyelerini ölçmüşlerdir. Plazma ve idrar seviyeleri her ikisi de yaş ile uyumlu kontrolleri ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuş, ama sadece plazma değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (73).

Montine ve arkadaşları, olası AH, Alzheimer dışı demans ve kontrollerde BOS amiloid β₄₂ (Aβ₄₂), tau ve F₂-izoprostan konsantrasyonlarını ölçmüşlerdir. BOS amiloid β₄₂ (Aβ₄₂), tau ölçümlerine F₂-izoprostan ölçümünün de eklenmesinin tanının doğruluğunu arttırdığını göstermişlerdir (74).

Pratico ve arkadaşları, klinik olarak AH tanısı almış ve yaş uyumlu kontrollerde BOS, plazma ve idrar 8,12-iPF_{2α}-VI seviyelerini ölçmüşlerdir. AH olanlarda üçünün de seviyesi kontrollere göre artmış olduğunu göstermişlerdir. BOS ile plazma idrar seviyelerindeki korelasyonun beyinde oksidatif stresle bağlantılı olduğu kanısına varılmıştır. Aynı hastalarda endojen vitamin C, vitamin E, lycopene ve α-karoten seviyelerini AH'larında kontrollere göre belirgin düşük saptamışlardır. Ayrıca BOS 8,12-iPF_{2α}-VI ve BOS tau seviyeleri arasında direkt korelasyon, BOS

A β ₄₂ ile ters korelasyon saptamışlardır. MMSE ve CDR ile demansın şiddetini değerlendirmişler 8,12-iPF_{2 α} -VI değerleri ile anlamlı korelasyon saptamışlardır (75).

Bununla birlikte periferik izoprostan seviyeleri ile ilgili uyumsuz sonuçlar da vardır. Feillet-Coudray ve arkadaşları yaptıkları çalışmada plazma 8-epiPGF_{2 α} seviyelerinde AH olanlar ve kontroller arasında farklılık göstermemişlerdir (76).

Montine ve arkadaşları, olası AH olan kişilerden iki yıl süre ile plazma ve idrar toplamışlardır. Üçüncü yılın sonunda 25 hastadan 23'ü ölmüş ve post-mortem inceleme yapılmıştır. 17 kişi kesin AH, 4 kişi DLB, 1 kişi Pick hastalığı tanısı almıştır. Kesin AH olanlar ile yaş uyumlu kontroller arasında, kesin ve olası AH arasında belirgin fark gözlenmemiştir (77).

Kim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sağlıklı ve olası AH kişilerin idrarlarında GS-MS ile idrar F₂-izoprostanları çalışılmıştır. Oksidatif stresin göstergelerinden biri olan idrar 8-izoPGF_{2 α} 34 AH ve 20 kontrol arasında anlamlı fark bulunamamıştır (78).

Montine ve arkadaşları 56 AH ve 34 kontrolde yaptıkları idrar 8-izoPGF_{2 α} ölçümlerinde belirgin bir fark saptamazken, 32 Alzheimer hastasının idrar ve BOS seviyelerinde korelasyon saptamamışlardır (79).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, yaşa bağlı normal kognitif değişikliklerle Alzheimer hastalığı arasında bir hafif kognitif bozukluk (MCI) olarak isimlendirilen bir geçiş dönemi olduğunu göstermiştir (3).

Pratico ve arkadaşları MCI, AH olanlar ve kognitif olarak normal olan kontrollerde BOS, plazma ve idrar 8,12-iPF_{2 α} -VI seviyelerini ölçmüşlerdir. Bu gruplar içinde AH olanlarda en yüksek değerler saptanırken, MCI kriterlerine sahip vakalarda kontrollere göre belirgin bir yükseklik saptanmıştır (80).

Yaşlılarda lumbar sisternadan BOS alımı ciddi bir risk teşkil etmese de, spinal tap'ler hasta açısından oldukça streslidir ve çoğu klinikte kolaylıkla alınamamaktadır. Bu nedenle pek çok araştırmacı plazma ve idrarda F₂-izoprostan ölçümlere yönelmiştir.

Literatürde genellikle GC-MS ile yapılmış çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda plazma 8-izoPGF_{2 α} seviyeleri daha kolay ve ucuz bir yöntem olan EIA metodu ile ölçüldü. MMSE değerleri ve plazma 8-izoPGF_{2 α} düzeyleri arasında istatistiksel olarak negatif korelasyonun bulunması, oksidatif strese artış ile bilişsel

durumda düşüşün birlikte olabileceğini düşündürdü. Kontrol grubuna göre, AH ve MCI gruplarının her ikisinin de plazma 8-izoPGF_{2α} düzeylerinin ortalaması yüksek saptandı. Fakat istatistiksel olarak sadece AH grubunda anlamlılık saptandı. MCI grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. MCI tanısı klinik olarak tanı konulan bir grup olduğu için, grubun çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Hastaların seçim kriterleri, çalışma yöntemleri, hastaların yaşlı olmasının beraberinde getirdiği rahatsızlıkların sistemik oksidatif strese etkisi gibi faktörler yapılan çalışma sonuçlarını etkilemektedir. Plazma ve idrar gibi numunelerde izoprostan seviyeleri beyin dışındaki dokular tarafından etkilenebilmektedir. AH'nda plazma ve idrardaki izoprostanın, beyindeki artmış oksidasyonun spesifik göstergesi ya da daha genel sistemik oksidatif stresi gösterip göstermediği gelecek çalışmalarla belirlenmelidir.

Melatoninin sirkadien ritmlerin düzenlenmesindeki majör rolünün yanısıra antioksidatif ve antiamiloidojenik etkileri ile nöroprotektif etki gösterdiği, yaşlılıkta ve AH'nda bozulmuş üretimi ve ritmi gösterilmiştir (47,56,81).

Liu ve arkadaşları, AH'nda melatonin üretim seviyesini belirlemek amacı ile 85 AH olan vaka ve 82 yaş uyumlu kontrolde postmortem ventriküler BOS sıvısında melatonin seviyesini belirlemişlerdir. AH olanların melatonin seviyesi kontrollerin beşte biri değerinde belirlenmiştir. Postmortem melatonin seviyeleri ve hastalığın başlangıcı, süresi ve ciddiyeti arasında ilişki bulunamamış. Ayrıca AH için risk faktörü olarak belirtilen Apo E-ε4 genotipini incelediklerinde Apo E-ε3/4 genotipine sahip olanların, Apo E-ε4/4 genotipine sahip olanlardan daha yüksek melatonin seviyelerine sahip olduğunu göstererek, melatonin seviyesi ile AH arasındaki bağlantıyı belirlemişlerdir (62).

Beyin dokusunda oluşan nöropatolojik değişiklikleri yansıtan bir biomarker klinik kullanıma henüz geçmemiştir. Zhou ve arkadaşları 121 vakada postmortem nöropatolojik evreleme yapıp, ventriküler BOS'ta melatonin seviyelerini belirlemişlerdir. Braak evrelemesi ve korteks için modifiye Braak evrelemesi kullanarak, AH patolojik sürecinin başladığı temporal kortekste erken nöropatolojik değişiklikleri olup, klinik semptomlara sahip olmayan yaşlılarda, BOS melatonin seviyelerinin belirgin olarak düşük olduğunu göstermişlerdir. BOS melatonin

seviyelerindeki düşüklüğün klinik semptomların çıkmasından önce, AH'nın gelişiminde erken bir olay olabileceği kanısına varılmıştır (9).

Bir çalışmada pineal melatonin içeriği ile BOS arasındaki ve BOS ile plazma melatonin seviyeleri arasındaki korelasyon AH'nın en erken evrelerinden itibaren azalmış melatonin seviyelerinin erken bir marker olarak kullanılabilceğini düşündürmüştür (82). Çalışmamızda MCI ve kontrol gruplarının her ikisinin de serum melatonin düzeylerinin ortalaması Alzheimer grubuna göre yüksek saptandı. Fakat istatistiksel olarak sadece AH grubu ile MCI grubu arasında anlamlı fark bulunurken, AH-Kontrol ve MCI-Kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. MMSE değerleri ile melatonin düzeyleri arasında pozitif korelasyon varlığı melatoninin bilişsel durum açısından koruyucu etkisini göstermektedir. Ancak AH grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmaması, hatta MCI grubunun melatonin seviyelerinin ortalamasının kontrol grubundan hafif de olsa yüksek olması ve bunun yanında her üç grup verileri arasında çakışan değerlerin olması serum melatonin seviyelerinin AH'nda erken tanı markeri olarak kullanılamıyacağını düşündürdü.

Çalışmamızda sadece sabah melatonin seviyelerinin ölçümünü kullanıldı. Yapılan çalışmalarda AH'nda noktürnal melatonin seviyelerinin selektif olarak azaldığını göstermiştir (83,84). Bununla beraber AH'nda gün içinde artmış melatonin seviyeleri de gösterilmiştir. Bunun hastalıkta gözlenen nörodejeneratif sürecin sirkadien-pineal sistemi etkilemesinden olabileceği belirtilmiştir (85). Melatonin üretimindeki yaşla görülen değişikliklerin yanı sıra melatonin ritminin zamanında da değişiklikler rapor edilmiştir (82,85). Ayrıca bireylerin melatonin sekresyonu ve pineal bez büyüklüğü genetik olarak belirlenmiştir (47). Belki de bireylerin özellikle de MCI'li olanların melatonin ritmindeki değişikliği gösteren longitudinal çalışmalar daha anlamlı olabilir.

Bu çalışmada bilinen en güçlü endojen antioksidan olan melatonin ile serbest radikal aracılı hasar göstergesi olarak 8-izoPGF_{2α} düzeyleri özellikle AH'nın erken dönemde tanınması amacıyla MCI'li hastalarda ölçülerek farklılık araştırıldı. Ancak MCI'li grupta melatonin düzeylerinde Alzheimer grubuna göre fark bulunurken, 8-izoPGF_{2α} düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamadı. AH'nın erken tanısı için araştırılan birçok markerde olduğu gibi bu hastalıkta beynin rolü olması ve periferal

markerlerin diğer doku etkileşimlerinden dolayı beyne spesifik olmaması gibi faktörler bu çalışma sonuçlarını da etkiledi.

Sonuç olarak, MCI'li hastalarda serum melatonin ve plazma 8-izoPGF_{2α} düzeyleri, AH riskini göstermesi açısından kullanılabilir erken tanı markerleri olarak anlamlı bulunmadı. MMSE değerleri ve plazma 8-izoPGF_{2α} düzeyleri arasında negatif korelasyon olmasına, kontrol grubuna göre Alzheimer grubunda plazma 8-izoPGF_{2α} düzeyleri yüksek bulunmasına rağmen, 8-izoPGF_{2α} düzeylerinin erken tanı markeri olarak bir değeri olmayıp, bu sonuç AH'nda oksidatif stresin rolü olduğu görüşünü destekleyici olarak değerlendirildi.

ÖZET

MCI ve Alzheimer Hastalarında F_{2α}-izoprostan ve Melatonin Seviyelerinin Bilişsel Durumla İlişkisi

Oksidatif stresin göstergelerinden kabul edilen F_{2α}-izoprostan ve antioksidatif-antiamiloidojenik etkileri ile nöroprotektif etki gösteren melatonin konsantrasyonlarını hafif kognitif bozukluk ve Alzheimer tipi demans tanısı almış vakalarda ve kontrollerde ölçerek, hafif kognitif bozukluk evresinde bu markerlerin ölçümlerinin erken tanıya katkısı olup olmayacağını gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada Alzheimer Hastalığı (AH) grubu, Hafif Kognitif Bozukluk (MCI) ve Kontrol grubu şeklinde üç grup oluşturuldu. Klinik olarak MCI tanısı Petersen kriterlerine, Alzheimer tipi demans tanısı ise DSM-IV kriterlerine göre konuldu. MMSE skoru 24 ve altında olanlar kognitif fonksiyonu bozulmuş olarak kabul edildi. DSM-IV ve Petersen tanı kriterlerini karşılamayan, kognitif fonksiyonları normal olan, MMSE skoru >26 olanlar kontrol grubuna dahil edildi. AH grubu yaş ortalaması 79.05 ± 8.93, MMSE skoru 14.7 ± 4.3 olan 8'i kadın 12'si erkek 20 kişi, MCI grubu yaş ortalaması 73.95 ± 7.19, MMSE skoru 22.0 ± 1.3 olan 12'si kadın, 9'u erkek 21 kişi, kontrol grubu yaş ortalaması 71.59 ± 6.65, MMSE skoru 27.9 ± 1.3 olan 9'u kadın 13'ü erkek 22 kişiden oluşturuldu. Serum melatonin düzeyi RIA yöntemi ile çalışıldı. Plazma total 8-izoPGF_{2α} düzeyi EIA yöntemi ile çalışıldı.

Gruplar arasında melatonin değerleri karşılaştırıldığında Alzheimer grubu ve MCI grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p=0.009). 8-izoPGF_{2α} seviyeleri karşılaştırıldığında Alzheimer grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p=0.022). MMSE değerleri ile 8-izoPGF_{2α} arasında negatif korelasyon (r = - 0.459, p= 0.00), MMSE değerleri ile melatonin seviyeleri arasında pozitif korelasyon saptandı. (r =0.317, p= 0.011).

Sonuç olarak, MCI'li hastalarda serum melatonin ve plazma 8-izoPGF_{2α} düzeyleri, AH riskini göstermesi açısından kullanılabilecek erken tanı markerleri olarak anlamlı bulunmadı. MMSE değerleri ve plazma 8-izoPGF_{2α} düzeyleri arasında negatif korelasyon olmasına, kontrol grubuna göre Alzheimer grubunda plazma 8-izoPGF_{2α} düzeyleri yüksek bulunmasına rağmen, 8-izoPGF_{2α} düzeylerinin erken tanı markeri olarak bir değeri olmayıp, bu sonuç AH'nda oksidatif stresin rolü olduğu görüşünü destekleyici olarak değerlendirildi.

SUMMARY

The Relationship Between F_{2α} isoprostane, Melatonin Levels and Cognitive State In Patients With MCI and Alzheimer Disease

By measuring F_{2α}-isoprostane which is accepted as an oxidative stress indicator and melatonin concentrations which shows neuroprotective effect by its antioxidative and anti-amyloidogenic influences in cases diagnosed as MCI and dementia of the Alzheimer type, we have intended to demonstrate whether the measurement of these markers contributed the early diagnosis in MCI stage or not.

In the study, three groups were composed as Alzheimer Disease group, MCI group and control group. The diagnosis of MCI was established according to Peterson criteria and the diagnosis of dementia of the Alzheimer type was established according to DSM-IV criteria. The patients whose MMSE score was 24 and lower than 24 were accepted as having impaired cognitive functions. The patients whose MMSE scores were higher than 26 and which had normal cognitive functions and did not meet DSM-IV and Peterson diagnostic criteria were included in control group. AD group was consisted of 20 patients (8 women and 12 men) which had 79.05±8.93 mean age and 14.7±4.3 MMSE score. MCI group was consisted of 21 patients (12 women and 9 men) which had 73.95±7.19 mean age and 22.0±1.3 MMSE score. Control group was consisted of 22 persons (9 women and 13 men) which had 71.59±6.65 mean age and 27.9±1.3 MMSE score. Serum melatonin levels were measured by RIA method. Plasma total 8-isoPGF_{2α} levels were measured by EIA.

When melatonin levels were compared between MCI group and Alzheimer group, significant difference was observed statistically (p=0.009). When 8-isoPGF_{2α} levels were compared between Alzheimer group and control group, significant difference was observed statistically (p=0.022). Negative correlation between MMSE scores and 8-isoPGF_{2α} levels was found (r = - 0.459, p= 0.00). Positive correlation between MMSE scores and melatonin levels was found (r =0.317, p= 0.011).

In conclusion, serum melatonin and plasma 8-isoPGF_{2α} levels have no significance that may be used as early diagnostic markers with respect to be an indicator of AD risk in patients with MCI. Although there was a negative correlation between 8-isoPGF_{2α} levels and MMSE scores and 8-isoPGF_{2α} levels in Alzheimer

group was found to be higher than control group, 8-isoPGF_{2α} levels have no value as an early diagnostic marker. This result was evaluated to support the opinion about the role of oxidative stress in AD.

KAYNAKLAR

1. Topçuoğlu ES, Selekler K. Alzheimer Hastalığı. Geriatri. 1(2):63-67, 1998.
2. Selekler K. Alzheimer Hastalığı: patoloji, klinik, tanı ve ayırıcı tanı. Selekler K. (ed.) Modern Tıp Seminerleri:26 Alzheimer ve Diğer Demanslar. Ankara, Güneş Kitapevi, 2003.
3. Selekler K. Alzheimer hastalığının öncesi: hafif kognitif bozukluk. Hacettepe Tıp Dergisi. 35:199-206, 2004.
4. Markesbery WR. Oxidative stres hypothesis in AD. Free Radic Biol Med. 23:134-147, 1997.
5. Butterfield DA, Howard B, Yatin S et al. Elevated oxidative stres in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. Life Sciences. 65:18,19: 1883-1892, 1999.
6. Markesbery WR, Kryscio R, Lovell MA, Morrow JD. Lipid peroxidation is an early event in brain in amnesic cognitive impairment. American Neurological Association. 58:730-735, 2005.
7. Pratico D, Sung Syun. Lipid peroxidation and oxidative imbalance: early functional events in Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's Disease. 6:171-175, 2004.
8. Mecocci P. Oxidative stres in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: A continuum. Journal of Alzheimer's Disease. 6:159-163, 2004.
9. Zhou JN, Liu RY, Kamphorst W, Hofman MA, Swaab DF. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. J Pineal Res. 35: 125-30, 2003.
10. Altan N, Koca C. Alzheimer Hastalığı'nda Biyokimyasal Mekanizmalar. Nöroloji. Türkiye Klinikleri. 1(1):23-26, 2003.
11. Koçer B, Nazlıel B. Alzheimer Hastalığı'nda Genetik Faktörler. Türkiye Klinikleri. 1(1):32-37, 2003.
12. Baysal Aİ, Yeşilbudak Z. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Bulguları. Nöroloji. Türkiye Klinikleri. 1(1):1-5, 2003.
13. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical daignosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ARDRA work group under the auspices of department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. Neurology 34,939-944, 1984.
14. American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth ed. APA Pres, Washington. 157-163, 1994
15. Petersen RC. Mild Cognitive Impairment: Where Are We? Alzheimer Dis Assoc Disord. 19: (3):166-169, 2005.
16. Chertkow H. Mild Cognitive İmpairment. The Canadian Alzheimer Disease. June: 15-20, 2002.
17. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RC, Tangalos EG, Kökmen E. Mild Cognitive İmpairment: clinical characterization and outcome. Arch Neurol. 56:303-308, 1999.
18. Braak H, Braak E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging. 18 (Suppl. 4): 85-88, 1997.
19. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's Disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science 297. 353-356, 2002.
20. Silvestrelli G, Lanari A, Parnetti L, Tomassoni D, Amenta F. Treatment of Alzheimer's disease: From Pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. Mechanisms of Aging and Devolopment. 127(2):148-157, 2006.
21. Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's Disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 43: 545-584, 2003.
22. Golde TE, Youkin SG. Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's Disease. Trends Mol. Med. 6:264-269, 2001.

23. Pettenati C, Annicchiarico R, Caltagirone C. Clinical pharmacology of anti-Alzheimer drugs. *Fundam Clin Pharmacol.* 17(6):659-72, 2003.
24. Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci.* 4(3):233-4, 2001.
25. Coleman P, Federoff H, Kurlan R. A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology.* 63: 1155-1162, 2004.
26. Castren M, Lampinen KE, Miettinen R, Koponen E, Sipola I, Bakker CE, Oostra BA, Castren E. BDNF regulates the expression of fragile X mental retardation protein mRNA in the hippocampus. *Neurobiol Dis.* 11:221-229, 2002.
27. Gauthier S. Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *CMAJ.* 166:616-23, 2002.
28. Akkuş İ. Antioksidan Savunma Sistemleri, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basımevi, 1995.
29. Pratico D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insight. *Biochemical pharmacology.* 63: 563-567, 2002.
30. Butterfield DA, Lauderback CM. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide associated free radical oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 32(11): 1050-1060, 2002.
31. Zwart de LL, Meerman JH, Commandeur JNM, Vermulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine.* 26: 202-226, 1999.
32. Cui K, Luo X, Xu K, Murthy V. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & biological Psychiatry.* 28: 771-799, 2004.
33. Reiter, RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9:526- 533, 1995.
34. Pratico D, Delanty N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's Disease. *Am J Med.* 109: 577-585, 2000.
35. Smith MA, Rottkamp C, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1502: 139-144, 2000.
36. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 71: 621-629, 2000.
37. Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal F, Markesbery WR. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med.* 33(5):620-626, 2002.
38. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography.* 2005.
39. Pratico D. F2 isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis.* 147: 1-10, 1999.
40. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. Biochemistry* 87: 9383-9387, 1990.
41. Pratico D. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 12:(6): 243-247, 2001.
42. Rokach J, Kim S, Bellone S et al. Total synthesis of isoprostanes: discovery and quantitation in biological systems. *Chemistry and Physics of Lipids.* 128: 35-56, 2004.
43. Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi PGF2a. *J Biol Chem.* 270: 9800-9808, 1995.
44. Morrow JD, Zacker WE, Van der Ende et al. Quantification of isoprostanes as indicators of oxidant stress in vivo. Cadenas E (ed). *Handbook of Antioxidants.* Second edition, Marcel Dekker Incorporated, 2001.
45. Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res.* 38: 145-52, 2005.

46. Reiter RJ. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol. Sci.* 15: 246-250, 2000.
47. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism.* 17: 273-285, 2003.
48. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery *Biochemical Pharmacology.* 56:1265-1272, 1998.
49. Mollaoğlu H, Özgüner MF. Yaşlanma sürecinde melatonin rolü. *SDÜ Tıp Fak. Derg.* 12(3): 52-56, 2005.
50. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 13(2): 56-65, 2004.
51. Wu YH, Feenstra MG, Zhou JN, Liu RY, Torano JS, van Kan HJ. Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5898-906, 2003.
52. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of melatonin interaction with hydroxyl radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 253: 614-620, 1998.
53. Matuszak Z, Reszka KJ, Chignell CF. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: ESR and spin trapping investigations. *Free Radical Biology & Medicine.* 23: 367-372, 1997.
54. Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J. Pineal Research.* 18: 222-226, 1995.
55. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sciences.* 60: 169-174, 1997.
56. Pappolla MA, Chyan YJ, Poeggeler B. An assessment of the antioxidant and antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission.* 107: 203-231, 2000.
57. Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res.* 24(2): 83-9, 1998.
58. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry International.* 26: 497-502, 1995.
59. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem.* 31:272(44): 27812-7, 1997.
60. Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res.* 20(4): 205-10, 1996.
61. Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Bick RJ. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *The Journal of Neuroscience.* 17(5): 1683-1690, 1997.
62. Liu RY, Zhou JN, van Heerikhuizen J, Hofman MA, Swaab DF. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein Epsilon4/4 genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 323-7, 1999.
63. Folstein MF, Folstein SF, McHugh PR. Mini Mental State: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 12: 189-198, 1975.
64. Ertan T, Eker E, Güngen C, Engin F, Yaşar R, Kılıç G, Özel S. The Standardized Mini Mental State Examination for illiterate Turkish elderly population. 2nd International Symposium on Neurophysiological and Neuropsychological Assessment of Mental and Behavioral Disorders 28-30 Ağustos 1999, Bursa.
65. Amuk T, Karadağ F, Oğuzhanoglu N, Oğuzhanoglu A. Cornell demansta depresyon ölçeği'nin Türk yaşlı toplumunda geçerlik ve güvenilirliği. *Türk Psikiyatri Dergisi* 14(4): 263-271, 2003

66. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ. The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry*, 139:1136-9, 1982
67. Ceyhun B. Demansın psikolojik değerlendirilmesi. *Demans Dizisi* 3:90-103, 1999.
68. Diker J, Etiler N, Yıldız M, Şeref B. Altmış beş yaş üzerindeki kişilerde bilişsel durumun günlük yaşam aktiviteleri, yaşam kalitesi ve demografik değişkenlerle ilişkisi. *Anadolu Psikiyatri Dergisi* 2(2): 79-86, 2001
69. Pratico D. Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead. *Neurobiology of Aging*. 26: 581-583, 2005.
70. Montine TJ, Markesbery WR, Morrow JD, Roberts LJ. Cerebrospinal fluid F₂-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 44(3): 410-3, 1998.
71. Pratico D, Lee VMY, Trojanowski JQ et al. Increased F₂-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J*. 12: 1777-1783, 1998.
72. Montine TJ, Beal MF, Cudkovicz ME et al. Increased CSF F₂-isoprostane concentration in probable AD. *American Academy of Neurology*. 52(3): 562-565, 1999.
73. Waddington E, Croft K, Clarnette R et al. Plasma F₂-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease: evidence of increased oxidative stress in vivo. *Alzheimer's Report*. 2: 277-282, 1999.
74. Montine TJ, Kaye JA, Montine KS et al. Cerebrospinal fluid A β ₄₂, tau and F₂-isoprostane concentrations in patients with Alzheimer disease, other dementias, and in aged matched controls. *Arch Pathol Lab Med*. 125: 510-514, 2001.
75. Pratico D, Clark CM, Lee VMY, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA. Increased 8,12-iso-iPF_{2 α} -VI in Alzheimer's disease: correlation of a non invasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol* 48:809-812, 2000.
76. Feillet-Coudray C, Tourtaux R, Niculescu M et al. Plasma levels of 8-epiPGF₂-a, an in vivo marker of oxidative stress, are not affected by aging or Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med*. 27: 463-469, 1999.
77. Montine TJ, Sninobu L, Montine KS et al. No difference in plasma or urinary F₂-isoprostanes among patients with Huntington's disease or Alzheimer's disease and controls. *Ann Neurol* 48:950, 2000
78. Kim KM, Jung BH, Paeng K, Kim I. Increased urinary F₂ isoprostane levels in patients with Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*. 64(1): 47-51, 2004.
79. Montine TJ, Quinn JF, Milatović D et al. Peripheral F₂-isoprostanes and F₄-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 52: 175-179, 2002.
80. Pratico D, Clark CM, Linn F, Rokach J. et al. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59(6): 972-976, 2002.
81. Wang J, Wang Z. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *J Pineal Res*. 27(1): 41-49, 2006.
82. Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res*. 38: 145-52, 2005.
83. Wu YH, Feenstra MG, Zhou JN, Liu RY, Torano JS, van Kan HJ. Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages. *J Clin Endocrinol Metab*. 88: 5898-906, 2003.
84. Ferrari E, Arcaini A, Gornati R, Pelanconi L, Cravello L. Pineal and pituitary-adrenocortical function in physiological aging and in senile dementia. *Exp Gerontol*. 35: 1239-50, 2000.
85. Ohashi Y, Okamoto N, Uchida K, Iyo M, Mori N, Morita Y. Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Biol Psychiatry*. 45: 1646-52, 1999.