

ÖZET

ALZHEİMER HASTALIĞINDA YENİ BİYOMARKER GELİŞTİRİLMESİ: İTERLÖKİN-18

Simge Aykan

Sinirbilimleri Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi,
İzmir, Türkiye
simge.aykan@deu.edu.tr

Alzheimer Hastalığı (AH), ileri yaşta görülen demansların en sık formudur. Kognitif fonksiyonlarda ilerleyici bozulma ile karakterizedir. Klinikte, AH'nın tanısı sekonder nedenlerin ve diğer demansif hastalıkların dışlanması ile konur. AH'den sonra yaşlılıkta görülen demansın en sık nedeni serebrovasküler inmedir (SVİ). AH ve SVİ'nin farklı yapısına rağmen her iki hastalığında patogenezinde inflamatuvar özellikler görülmektedir.

İnterlökin-18 (IL-18), T ve NK hücrelerinden IFN γ uyarımını indükleyen proinflamatuvar bir sitokindir. IL-18 düzeyi iskemik koroner hastalıkta prognostik bir marker olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında IL-18'in Alzheimer hastalarını kontroller ve serebrovasküler inme hastalarından ayırt edebilecek bir biyomarker olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmaya 19 Alzheimer, 10 serebrovasküler inme hastası ve 15 kontrol alınmıştır. IL-18 serum seviyeleri enzim bağlı immunosorbent yöntemi (ELISA) ile, gen ekspresyon düzeyleri ise lenfositlerde real-time PCR yöntemi kullanılarak absolut kantifikasyonla belirlenmiştir.

IL-18 gen ekspresyon düzeyleri serebrovasküler olay hastaları ve kontrollere göre, Alzheimer hastalarında anlamlı olarak artmıştır ($p=0,006$). Alzheimer hastaları ile kontroller ve yine Alzheimer hastaları ile serebrovasküler inme hastaları arasında serum IL-18 seviyeleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Buna rağmen, serum IL-18 düzeyleri Alzheimer hastalarının Mini Mental Durum Testi (MMDT) skorları ile korelasyon göstermektedir.

Sonuçlar IL-18 in Alzheimer hastalığının teşhisinde aday biyomarker olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, serebrovasküler hastalık, inme, interlökin-18, biyomarker

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NEW BIOMARKER IN ALZHEIMER'S DISEASE: INTERLEUKIN-18

Simge Aykan

Department of Neuroscience, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylul University,

Izmir, Turkey

simge.aykan@deu.edu.tr

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in elderly. It is characterized by progressive deterioration of cognitive functions. In clinical practice, current criteria for diagnosis of AD are still largely based on the exclusion of secondary causes and other dementive disorders. In addition to AD, cerebrovascular stroke (CvS) is also a common cause of dementia in elderly. Despite the heterogeneous nature of both AD and CvS, the inflammatory aspects of the pathogenesis of these diseases are prominent.

Interleukin-18 (IL-18) is a proinflammatory cytokine that induces IFN γ stimulation in T and NK cells. It has been accepted as a biomarker in ischemic coronary disease. In this project, we aimed to search IL-18 as possible diagnostic biomarker to distinguish AD patients from control subjects and CvS patients.

In this study 19 AD, 10 CvS patients and 15 control subjects were included. IL-18 serum levels determined by enzyme linked immunosorbent immunoassay (ELISA) and IL-18 gene expressions analyzed with real-time PCR absolute quantification from peripheral lymphocytes.

The IL-18 gene expression is elevated in AD patients compared to CvS patients and control subjects ($p=0,006$). There were no significant differences in the serum levels of IL-18 neither between AD and CvS patients nor between control subject and patient groups. Despite this, there was a correlation between Mini Mental State Examination (MMSE) and serum levels of AD patients. Taken together, these results indicate that IL-18 can be a candidate diagnostic biomarker for AD.

Key words: Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, stroke, interleukin-18, biomarker

I. GİRİŞ ve AMAC

Alzheimer Hastalığı (AH) yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Yaşlılarda, demans türleri arasında en sık görülenidir (1). Alzheimer Hastalığı'nın klinik tanısı demansa yol açabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi ile yapılmaktadır. Kesin tanısı ise ancak post-mortem dönemde nöropatolojik inceleme ile mümkündür (2).

Hastalığın kesin tanısının postmortem incelemeler dışında konulamaması teşhis ve tedavi basamaklarını güçleştirmektedir. Günümüzde Alzheimer hastalığının tanısı yaygın biçimde NINCDS-ARDRA tanı kriterleri uygulanarak koyulmaktadır ve bu kriterler bellek veya lisan, görsel-uzaysal yetiler veya yürütücü işlevler gibi bilişsel işlevlerde bozulmayı değerlendirmektedir. Yapılan postmortem incelemelerle NINCDS-ARDRA kriterlerinin %85 oranında doğru tanı sağladığı gösterilmiştir (2). AH'de kesin tanıyı koymayı hedefleyen biyolojik belirteçlerin duyarlılık ve özgüllüğü ise ancak klinik tanı kriterlerinin düzeyine ulaşmakta ya da biraz geçmektedir.

Serebral iskemi AH'den sonra yaşlılıkta demansın en sık görülen ikinci nedenidir (99). Serebrovasküler iskemi ile oluşan demansta belirli kognitif defisit kalıpları yoktur ve nöropsikolojik testler AH ile serebrovasküler demansı birbirinden ayıramamaktadır (100). Serebrovasküler iskemi gelişiminde inflamatuvar süreçlerin yer aldığı bilinmektedir (101).

IL-18 T ve NK hücrelerden IFN γ uyarımını indükleyen proinflamatuvar bir sitokindir. İnflamatuvar süreçlerde mikrogliyal hücreler IL-18 salgılamakta ve hastalığın temel patolojik göstergelerinden biri olan Amyloid β 'nin mikrogliyal aktivasyona yol açtığını bilinmektedir. IL-18 düzeyi, iskemik inme ve multipl skleroz gibi santral sinir sistemi hastalıklarında yüksek olarak bulunmuştur (92,96). Multiple Skleroz'lu hastalardaki yükseklik hem BOS hem de serumda saptanmıştır. Ayrıca manyetik rezonansda aktif lezyonu olan hastalarda daha da yüksek bulunmuştur (96). İskemik inmede ise serumda IL-18 düzeyi çalışılmıştır. Serum IL-18 düzeyi, sedimantasyon hızı, klinik bulgular ve görüntüleme yöntemindeki lezyonun volümü ile korele bulunmuştur (92). IL-18 düzeyi iskemik koroner hastalıkta prognostik bir biyomarker olarak kullanılması (97,98) santral sinir sistemi hastalıklarında da tanı ya da prognoz belirleme amacıyla kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında AH'de diagnostik bir marker olarak kullanılma potansiyeli olduğu düşünölen Interlökin 18 (IL-18) in biyomarker olabileceğinin gösterilmesi ile periferik kan düzeyinde yapılacak incelemelerle teşhis sağlayabilecek, uygulanırlığı kolay bir biyomarkerın belirlenmesi hedeflenmiştir. Serebrovasköler iskemiden kaynaklanan demansın AH'den kognitif testlerle ayrılamaması, en sık görölen demans nedenlerinden olması ve inflamatuvar süreçlerin hastalığa eşlik etmesi nedeniyle çalışmada serebrovasköler olay hastaları (SVO) ikinci bir kontrol grubu olarak alınmıştır.

IL-18 düzeyleri hasta ve kontrollerde serumda protein, periferik lenfositlerde ise gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiştir.

II. GENEL BİLGİLER

1. Alzheimer Hastalığı'nın Klinik Özellikleri

Alzheimer Hastalığı (AH) yaşa bağımlı ve geri dönüşümsüz bir beyin hastalığıdır. Yaşlılarda, demans türleri arasında en sık görülenidir. Hastalığın başlangıcında kısa dönemli hafızada aşamalı ve ilerleyici yıkım görülür ve bu yıkım davranış ve karakter değişiklikleri ile ilerleyerek, düşünme, karar verme ve konuşma gibi diğer bilişsel alanları da etkileyerek en sonunda zihinsel fonksiyonun yitirilmesine, bireyin günlük aktivitelerini yapamaz hale gelmesine neden olur (1).

Alzheimer Hastalığı'nın klinik tanısı demansa yol açabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi ile yapılmaktadır. Kesin tanısı ise ancak post-mortem dönemde nöropatolojik inceleme ile mümkündür. Günümüzde AH'nin tanı kriteri olarak yaygın biçimde NINCDS-ARDRA tanı kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterler bellek veya lisan görsel-uzaysal yetiler veya yürütücü işlevler gibi bilişsel işlevlerde bozulmayı ön görür. Kliniklerin karşılayan hastalık tablosuna "Muhtemel Alzheimer Hastalığı" denilmektedir. Yapılan postmortem incelemelerle NINCDS-ARDRA kriterlerinin %85 doğruluk gösterilmiştir (2).

Tablo 1: NINCDS-ADRDA Alzheimer Hastalığının Klinik Tanı Kriterleri

I. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı klinik tanı kriterleri şunları içerir:

- Klinik muayene ile saptanan, Mini-Mental Durum Testi, Blessed Demans Ölçeği ya da benzer bir test ile dokümanite edilen ve nöropsikolojik testlerle de doğrulanan demans tablosu
- İki ya da daha fazla bilişsel süreçte bozulma
- Bilinç bozukluğu yok
- Başlangıç 40–90 yaşları arasında, büyük sıklıkla da 65 yaşından sonra
- Bellek ya da diğer bilişsel süreçlerde ilerleyici bozukluğa yol açabilecek sistemik ya da beyne ait başka bir hastalık yok

II. MUHTEMEL Alzheimer Hastalığı tanısı şunlarla desteklenir:

- Dil (afazi), motor yetenekler (apraksi) ve algı (agnozi) gibi özgül bilişsel işlevlerde ilerleyici bozulma
- Günlük yaşam aktivitelerinde bozulma ve davranış biçiminde değişme
- Ailede benzer bozukluk öyküsü (özellikle patolojik olarak kanıtlanmışsa)

- EEG'nin normal olması ya da yavaş dalga aktivitesinde artış gibi non-spesifik değişiklikler
- BT'de serebral atrofiye ilişkin bulgular ve seri incelemelerde bu bulguların ilerleyişi

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

- Hastalığın seyrinde platolar
- Depresyon, uykusuzluk, inkontinans, hezeyan, illüzyon ve halüsinasyonlar, verbal, emosyonel ya da fiziksel katastrofik patlamalar, cinsel bozukluklar ve kilo kaybı gibi eşlikçi bulgular
- Bazı hastalarda, özellikle hastalığın ileri dönemlerinde, kas tonusunda artış, myoklonus ya da yürüme güçlüğü gibi diğer nörolojik bozukluklar
- Hastalığın ileri evresinde nöbetler
- Yaş için normal BT

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

- İnme tarzında ani başlangıç
- Hemiparezi, duysal kayıp, görme alanı defektleri ve inkoordinasyon gibi fokal nörolojik bulguların hastalığın erken evrelerinde bulunması
- Nöbetler ya da yürüyüş bozukluklarının, daha başlangıçta ya da hastalığın çok erken evrelerinde bulunması

V. MÜMKÜN Alzheimer Hastalığı tanı kriterleri şunlardır:

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

VI. KESİN Alzheimer Hastalığı tanısı kriterleri şunlardır:

- Muhtemel Alzheimer Hastalığı klinik kriterleri
- Biyopsi ya da otopsiyle elde edilen histopatolojik kanıtlar

Alzheimer hastalığı ilerleyici bir hastalık olması nedeniyle, demans şiddetine göre sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırmada yaygın olarak "Reisberg'in Global Değerlendirme Ölçeği" (GDÖ) , ya da "Mini Mental Durum Testi" (MMDT) kullanılmaktadır (3,4). Alzheimer hastalığında GDÖ evreleri 3 ila 7 arasında değişir (1).

Hafif evredeki demanslı hasta (GDÖ, evre 3-4) yakın geçmişe ait olayların hatırlanmasındaki güçlük çeker, aynı sözleri tekrarlar, önceden tanıdığı insanların isimlerini unuttur, ev işlerini yapmaya devam eder ancak aynı özeni gösteremez. Eşyalarının yerlerini hatırlayamaz, mali işlerde hatalar yapar. Giyinme, yıkanma gibi temel hijyen faaliyetlerinde henüz sorun yoktur. İrritabilite, duygulanımda küntleşme ve inkâr eğilimi ile kendiliğindenliğin azalması dışında davranışsal belirtiler yoktur ve sosyal uygunluk iyi korunmuştur. Uyku kalitesi bozulmaya başlar. Muayenede yakın bellek ön planda olmak üzere, vizuospanyal bozukluk, uzak bellekte bozulmalar, adlandırma güçlükleri, dikkat ve soyutlama-planlamada bozulmalar saptanır. Temel nörolojik muayene normaldir. Eğitilmiş olgularda MMDT skoru yaklaşık 20–24 arasında olabilir.

Orta demans evresinde (GDÖ, evre 5), hasta ev dışındaki bağımsızlığını artık tamamen yitirmiştir. Yeni öğrenme artık hemen hiç mümkün değildir. Anlama, okuma ve yazma giderek bozulur. Unutkanlığın şiddeti artmaya devam eder, yemek pişirme, ev işlerini yapma, faturaları ödemedeki bağımsızlık bozulur. Hırsızlık, terk edilme ve sadakatsizlik hezeyanları olabilir. Yalnız kalmaktan ürker ve yakınına (eşi, çocuğu) sürekli gözünün önünde ister. Uyku-uyanıklık ritminde bozulma artık belirginleşir. Gece sık uyanmalar ve gün sık uyuklamalarla geçer. Temel nörolojik muayenede hafif parkinsoniyen değişiklikler saptanabilir. MMDT skoru yaklaşık 10–19 arasındadır.

Ağır demans evresinde (GDÖ evre 6-7) bellekte artık sadece parçacıklar söz konusudur. Hasta yakınlarını ya da aynada kendi yüzünü tanıyamaz. Giyinmek, yıkanmak, yemek gibi temel aktivitelerde artık tam bir gözetim gerekmektedir. Evrenin sonlarında yutma güçlüğü de ortaya çıkar. Kelime hazinesi son derece fakirleşmiştir. Kognitif, sosyal davranışta maksimum düzeyde bozulma izlenir. Epileptik nöbetler ortaya çıkabilir. Temel nörolojik muayenede tonus değişiklikleri, yürüyüş bozuklukları, parkinsoniyen bulgular belirginleşir. MMDT genellikle 0–9 arasındadır. Ölüm çoğu kez enfeksiyona bağlı komplikasyonlardan olur (1).

AH'nin tipik seyrine uymayan, patolojik olarak AH'si kanıtlanmış hastalarda başka klinik şekillerde bildirilmiştir. Hastalığın genetik geçişli olan ve 1. ya da 14. kromozomda

mutasyonlarla karakterize erken başlangıçlı şekilde, motor kusurlar ve kişilik bozuklukları erken dönemde izlenebilir. Çok küçük bir hasta grubunda, AH'nin tipik nöropatolojisi ilerleyici yarı mekan ihmali, ilerleyici afazi ve hatta miyoklonik epilepsi ile birlikte görülebilir (5).

2. Alzheimer Hastalığı'nın Genetiği

AH'de genetik faktörler büyük oranda hastalığın gelişimi için çevresel faktörlere bir yatkınlık zemini yaratacak şekilde birer risk faktörü niteliğindedirler. AH genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Yine de, tüm AH olgularının uluslararası literatürde %5'ine kadar ulaştığı bildirilen bir oranı basit Mendelien otozomal dominant geçişle hastalığa yakalanırlar (5)

AH, birden fazla kromozomdaki gen lokuslarının çok sayıda farklı mutasyonlarının aynı hastalığa yol açtığı, heterojenite gösteren polijenik/multiallelik bir hastalıktır. Otozomal dominant geçişten sorumlu olan şimdiye kadar 3 ayrı gen bulunmuştur: 21. kromozomdaki amiloid prekürsör protein (APP) geni, 14.kromozomdaki presenilin 1 geni ve 1. kromozomdaki presenilin 2 geni (6). Her 3 protein de normal işlevleri çok iyi bilinmeyen, nöronal plastisitede rol oynadıkları yönünde varsayımlar ileri sürülen transmembran proteinlerdir. Anılan genlerdeki mutasyonlar her durumda APP'den metabolize edilen A β proteinin atılmayıp amiloid plaklar içinde biriken daha uzun bir şeklinin üretimini artışına yol açarlar. Otozomal dominant AH tipik olarak erken başlangıçlıdır, başlangıç 20'li yaşlara kadar inebilir (5).

Sporadik AH'de risk faktörleri olarak 19. kromozom da APOE geni belirlenmiştir. Kolesterolün taşınmasında rol oynayan bir enzim olan APOE üç ayrı allelik forma sahiptir: e2, e3 ve e4. Normal popülasyonda en sık e3 (%70) görülürken, e4'ün sıklığı %20'dir. AH'de e4 sıklığı ikiye katlanarak %40'a ulaşır. e4 AH riskini doza bağlı bir şekilde artırır ve hastalık başlangıç yaşını azaltır. e4 heterozigotlarında (e2-e4 ve e3-e4) AH riski, e4 taşımayanlara (e3-e3, e2-e3 ve e2-e2) göre 2 ila 3 misli artmıştır (5,7).

3. Alzheimer Hastalığı'nın Nöropatolojisi

3.1. Nörofibriller yumaklar ve Amiloid plaklar

AH'deki nörofibriller yumakların (NFY) temel bileşeni fosforile tau proteinleridir. Tau 17. kromozomda bir gen tarafından kodlanan düşük molekül ağırlıklı, mikrotübül ilişkili proteindir. Mikrotübüllerin sabitleştirilmesinde, hücre iskeletinin bütünlüğünün sağlanmasında ve aksoplazma ulaşımının sürdürülmesinde önemli rol oynar. AH patogeneğinde hiperaktif kinazlar ve/veya hipoaktif fosfatazlar tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozarlar. Bağlanmamış fosforile tau çözölemeyen çift sarmallı filamanlara polimerize olur. Bunlar zamanla sinir hücresi içinde NFY'ler şeklinde yoğunlaşırlar. NFY'ler sonunda hücre iskeleti bütünlüğünü ve aksonal iletiyi bozarak hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümüyle ortaya çıkan ekstrasellüler NFY'ye 'hayalet yumak' denir (8).

Alzheimer hastalığının biyolojik temellerine ilişkin önde gelen güncel teorilerden biri, beta amiloid oluşumu çevresinde şekillenmektedir. Aşırı amiloidin Meynert'in nükleus basalisindeki kolinerjik nöronları hasara uğrattığı kuşkusuzdur, ancak hastalık ilerlediğinde hasarın yaygınlığı da artar. Nöritik plaklar, hücre dışında yer alan lezyonlardır ve sayıları bilişsel fonksiyonla yakından ilişkilidir. Amiloid plakların temel bileşeni amiloid beta proteindir (A β) (9). A β , 19. kromozomda kodlanan ve işlevi tam olarak anlaşılammış bir transmembran protein olan APP'nin metabolizma ürünlerindedir.

APP metabolizmasında α , β ve γ sekretazlar olarak adlandırılan üç proteaz iş görür. α -sekretaz APP'yi, A β bölgesinin ortalarına rastlayan ekstrasellüler bölgede keserek tam bir A β parçasının oluşumunu olanaksız kılarken β ve γ sekretazlar etkilerini, sırasıyla, A β bölgesinin hemen dışındaki, N- ve C- uçlarında göstererek, bütün A β 'yı içeren bölünme ürünleri ortaya çıkartırlar. γ -sekretaz'ın etkinlik gösterdiği kesim bölgesine göre, oluşan A β parçası, kısa (39–40 aminoasit) veya uzun (42–43 aminoasit) olabilir. Uzun A β , çözünürlüğü olmayan lifler oluşturmaya daha yatkındır ve nörotoksisite olasılığı daha yüksektir. Potansiyel olarak çözünürlüğü olmayan ve plaklara çökelebilen diğer bir APP parçası α ve γ sekretazların ortak etkisiyle oluşan A β 17–42 parçasıdır. Sonuç olarak, α -

sekretaz aktivitesiyle hücre kültürlerinde nöronlar üzerinde nörotrofik etkileri gösterilmiş olan çözünebilir APP oluşurken β ve γ sekretazların aktiviteleri sonucunda belirgin derecede bölgesel nörotoksik etkiler çıkartan katı ve nöritik β kıvrımlı plaklar (agregatlar) oluşmaktadır (10). Bu β kıvrımlı plakların serebral neokortekste bol veya orta yoğunlukta gösterilmeleri AH'nin kesin tanısı için gerekmektedir (11).

3.2. Kolinerjik Sistem

Bütün korteksin kolinerjik innervasyonu temel limbik yapılardan biri olan basal ön beyindeki Meynert çekirdeğinden sağlanır. Bu innervasyon dikkat ve bellek işlevlerinin optimal sürdürülebilmesi açısından büyük önem taşır. Tau hiperfosforilasyonun ilk görüldüğü alanlardan biri de Meynert çekirdeğidir. AH'de limbik alanlardaki yaygın NFY formasyonu ve nöron kaybı Meynert çekirdeğini de etkiler. Kolinerjik aksonların kaybı diğer patolojik özellikler gibi bir bölgesel yatkınlık gösterir. Lokal internöronlardan sağlanan striatal kolinerjik innervasyon ve talamusun beyin sapı pedinkülopontin çekirdek kaynaklı kolinerjik innervasyonu etkilenmediği gibi, etkilenen Meynert kaynaklı kolinerjik innervasyon da aynı tarzı yansıtır: kortekste en fazla etkilenen bölgeler limbik ve asosiasyon korteksleri iken, primer sensoriyel ve motor korteksler görece olarak sağlam kalırlar (8)

Kolinerjik buton da denilen pre-sinaptik kolinerjik terminalde kolin asetil transferaz enzimi (ChAT) bir yandan mitokondrilerden asetil koenzim A aracılığı ile serbestlenen kolden, diğer yandan da yüksek affiniteli kolin geri alım sistemi aracılığıyla alınan kolden asetil kolin (ACh) üretir. ACh molekülleri veziküllere paketlenip depolarizasyon ile sinaptik aralığa salgılanır. Sinaptik aralıkta difüzyonla ilerleyen ACh post-sinaptik membranda nikotik reseptörlere bağlanarak doğrudan, muskarinik reseptörlere bağlanarak ise G-proteini ilişkili ikincil mesajcılar üzerinden etkisini gösterir. Nikotik etkilerin hücrenin uyarılabilirliğini artırarak dikkat tonusunun sağlanmasında rol oynadığı, muskarinik etkilerin ise kalıcı sinaptik değişikliklerle yeni bilginin depolanması şeklindeki nöroplastisite mekanizmalarının unsuru olduğu bilinmektedir. Hem nikotik, hem de muskarinik stimülasyon kaybının gerek $A\beta$ oluşumunun artması ve gerekse de $A\beta$ nörotoksitesinin artması şeklinde *in vitro* etkileri gösterilmiş, diğer yandan $A\beta$ 'nin sentez, salınım ve post-sinaptik etkinliğini azaltabileceği de ortaya konmuştur. Asetil kolin esteraz (AChE) enzimi

ACh'yi asetat ve koline hidrolize ederek ACh'nin post-sinaptik aktivitesini durdurur. Dolayısıyla, AH'de kolinerjik kaybın kendisi de amiloid plak oluşumuna katkıda bulunan özelliklerden iken Aβ'da muhtemelen kolinerjik kaybı artırarak bir kısır döngü ortaya çıkarmaktadır. Östrojen limbik nöronlarda sinaptogeneze katkıda bulunup nöroplastisitede rol oynarken, Meynert'te ACh üretimine de katkıda bulunur. Post-menapozal kadınlarda östrojen replasmanının koruyucu etkisi anılan işlevleri dolayısıyla olmalıdır (12,13).

3.3. *Nörotransmitter Kayıpları*

AH'de serotonerjik (5-HT-erjik) kayıp, dorsal raphe çekirdeğinde Meynert düzeyinde olmasa bile kayda değer nöron kaybı ve kalan nöronlarda NFY'ler görülür. Kortikal 5-HT-erjik akson terminallerinde 5-HT'nin salınımı ve geri alınımı ciddi düzeyde bozulmuştur. AH'de 5-HT-erjik kayıpla depresyon ve saldırgan davranışın korelasyonu bildirilmektedir. 5-HT geri alım blokörlerinin (SSRI) AH'deki depresyon ve agresyonun tedavisindeki rasyoneli bu gözlemlere dayanmaktadır (14).

Beyin sapındaki noradrenerjik (NA-erjik) çekirdek olan locus ceruleus'ta (LC) da dorsal raphe benzeri bir nöronal kayıp ve NFY oluşumu gözlenir. LC'deki patoloji seçici yatkınlığa uygun biçimde LC'nin kortikal projeksiyonları olan anterior ve medial bölümlerini etkilerken spinal ve serebellar projeksiyonları içeren kaudal ve lateral bölümleri salim kalır. NA-erjik kaybın klinik karşılığı iyi belirlenmemiştir (15).

AH ileri evrelerinde parkinsonizm sıra dışı bir olgu değildir. Bu olguların patolojik karşılığı büyük sıklıkla substantia nigra pars kompakta (SNc) dopaminerjik (DA-erjik) nöronlarında kayıp ve Lewy cisimcikleridir. Lewy cisimcikli demans (DLB) kendine özgü bir antite olarak ortaya çıkmışken DLB ve AH'nin içice geçtiği durumlar olan hem nörofibriller yumak ve senil plakları hem de kortikal Lewy cisimciklerinin sonucu olan klinik durumların DLB mi yoksa Lewy varyantlı AH olarak mı adlandırılacağı tartışmalıdır. Parkinsonizm genellikle postür bozuklukları ve rijidite tarzındadır (15,16).

3.4. Nöronal Plastisite

Alzheimer hastalığı (AH) kademeli ve hiyerarşik olarak ilerleyici demans ile karakterize edilen nöronal hastalıktır. Her iki özellik de yüksek kognitif faaliyetlerin gerçekleştirilmesinde görev alan beyin bölgelerindeki nöral ağların işlevsel özellikleriyle bağlantılıdır. Bu beyin bölgelerinin temel özelliklerinden biri yeterli miktarda erişkin nöronal plastisitesine sahip olmasıdır (17). AH da gerçekten de en çok etkilenen bölgeler nöronal plastisitenin en fazla olduğu bölgelerdir. AH'nda en hasarlı bölgeler hipokampus ile temporal ve parietal korteks bölgeleridir. Diğer taraftan en az plastisite özelliğine sahip olan primer duyuusal korteksler işlevsel hasara en dirençli bölgelerdir. Buna uygun olarak, hayat boyu en yüksek nöronal plastisiteye sahip olan olfaktör bulb, hastalıktan ciddi şekilde etkilenmektedir (18).

Nöral plastisite, değişen çevre koşullarına nöral ağların adapte olmasını sağlayan, karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Nöral plastisitenin temel özellikleri her bir nöronun intrinsik özelliklerinin adaptasyonunu, nöronlar arasındaki sinaptik bağlantıların reorganizasyonunu ve yeni nöronların var olan nörol ağa katılımını içerir. Nöronal plastisiteyi regule eden mekanizmalar tam olarak anlaşılammış olsa da eksitator-inhibitör denge, nörotropinler, kalsiyum dinamikleri, intraselular ve ekstraselüler matriks, nöral ağlarda plastik değişikliklerin ana belirleyicileridir (19).

AH'de sinaptik plastisitenin hücresele ve sistemik mekanizmalarının hemen hemen tümünün hasarlı olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir. Özellikle sinaptik plastisitenin her iki formu ile ilgili mekanizmalarda da yer alan kalsiyum homeostazının hastalıkta hasarlı olduğu bilinmektedir (20). Bozulmuş kalsiyum dengesi aynı zamanda eksitotoksik hasara ve nöronlarda apoptoz uyarımına neden olabilir. Azalmış sinaptik bağlantılara rağmen eksitasyon ve inhibisyon dengede tutulmaktadır. Fakat reseptörlerin fonksiyonel özelliklerini etkileyen reseptör alt ünitelerinin kompozisyonu değişmiştir (21). Erişkin plastisitesi ve nöron gelişiminde önemli olduğu gösterilen reelin, apolipoprotein E sinyalleme yolağı ile birlikte tau proteininin fosforillenmesini engeller (22). Tau proteinin hiperfosforillenmesi AH beyinlerinde görülen çift sarmallı filamentlerin oluşumunda çok önemli bir basamaktır (23). Tau proteininin hiperfosforile olması, artan kalsiyum seviyeleri ile aktive olan apoptotik yollar sonucu hasar gören plastik değişikliklerle olabilir. Fosforile olmuş tau eksprese eden

nöronların apoptoza daha dayanıklı olması nedeniyle, tau hiperfosforilasyonunun koruyucu mekanizma olabileceği düşünülmektedir (18).

3.5 *İnflamasyon*

Uzun süreler beyin birçok haklı nedenden dolayı immun yanıt vermeyen bir organ olarak kabul edilmiştir. Lenf nodüllerine sahip değildir, kan beyin bariyeri ile vücudun geri kalanından ayrılmıştır, diğer dokulara göre graflara daha yüksek toleransı ve daha düşük adaptif immun yanıtı vardır. Bununla beraber immun yanıt izolasyonunun doğru olmadığı gösterilmiş ve bu dogmatik düşünce tersine dönmüştür. Günümüzde herhangi bir hastalık dahilinde beynin düzenli, kazanılmış immun yanıtlar verebildiği gösterilmiştir (24). Önceleri doğal immun yanıtın periferal organlar tarafından stres yada hasardan sonra homestazi sağladığının inanılmasına rağmen, şimdilerde patojenleri tanıyabilen özgül mekanizmaları taşıdığı bilinmektedir. Kazanılmış immun sistem her patojeni tanıyabilme yeteneğinde olmadığı için patojen ilişkili moleküler patternler (PAMPs) denen yüksek derecede korunmuş yapılara odaklanmıştır. Kazanılmış immun sistemin hücreleri toll-like reseptörler (TLR) denen, eksojen ve endojen PAMP ları tanıyan reseptör ailesini eksprese ederler. Astrosit ve mikrogliaların her ikisinde TLR eksprese edildiği gösterilmiştir. Glial hücrelerin TLR'ler ile aktive olmasının pro-inflamatuar yanıtın maksimize edilmesinde yükseltme basamağı olarak kullanılmasını sağlayabileceği önerilmiştir (24,25).

Beyinde görülen inflamasyon periferde görülen inflamasyonda tamamen farklıdır. Periferde inflamasyonun klasik işaretleri olan rubor (kızarıklık), kalor (sıcaklık) ve dolor (ağrı) beyinde görülmez (26). Nöroinflamasyon, beyindeki mikroglial ve astrositik yanıtların inflamasyon benzeri bir patern gösterdiğini ve bu yanıtların birçok nörolojik hastalığın patogeneğinde önemli rol oynadığı düşüncesini özetler. Bu düşünce, nöroinflamasyonun hastalığın ilerlemesine katkısı olduğu düşünülen AH çalışmalarından gelmiştir (27).

Alzheimer hastalığında nöroinflamasyon, mikroglia ve astrositlerin aktivasyonu, sitokin ve kemokinlerin salınması, kompleman proteinler, akut faz proteinleri, peroksizomal proliferatör-aktive reseptörler (PPAR), oksidatif hasar gibi birçok süreci kapsar (26). Bütün bu süreçlerin yer alması inflamasyonun “iki uçlu bir bıçak” olduğu, bir uçta bazı inflamatuvar

bileşenler için koruyucu, diğer yandan da nöronal fonksiyonda yıkıcı olduğunu düşündürmektedir. Bu etkileşimler akut fazda faydalı olabilmekte fakat kronik faza geçildiğinde ilerleyici nörodejenerasyonu kolaylaştırmaktadır (27). Alzheimer Hastalığında inflamasyonun yeri hakkında sürekli artan bilgiye rağmen, nöroinflamasyonun hastalıkta birincil mi yoksa ikincil rol mü oynadığı hala kesinlik kazanmamıştır (28).

3.5.1 *İnflamasyonda Mikroglial Hücreler*

Mikroglia santral sinir sisteminde nöronları ve onların fonksiyonlarını destekler ve korur, merkezi sinir sisteminde endojen immun yanıtı düzenleyen savunma hücresi olarak işlev görür (29). Mikroglia mesodermal kökenli makrofajlardan oluşmuştur (29) ve tüm glia popülasyonunun %20 sini oluşturur (30). Mikroglia savunmanın ilk basamağını oluşturur ve beyindeki immun yanıtların kontrolündedir. Mikroglianın en karakteristik özelliği merkezi sinir sistemindeki en küçük patolojik oluşumlara dahi yanıtta çok hızlı aktive olmasıdır (31).

Geleneksel olarak mikroglialar morfolojilerine göre iki gruba ayrılırlar; dinlenme (ramified) ve aktif (ameboid) mikroglia (30). Aktif olmayan mikroglia küçük diken benzeri çıkıntılarla kaplı kısa karmaşık uzantılara sahiptir. Hasar bölgelerine göç ederler, çoğalırlar ve uzantılı yapılarını kaybedip şişkin yapı kazanırlar.

Mikroglianın aktive olması fagositik olmayan durumdan fagositik duruma geçmesidir (mikroglia kökenli beyin makrofajları) (32). Mikroglianın aktivasyonu, travma, iskemi, tümör ve nörodejenerasyon süreçlerinde nöral parankimin savunmasında anahtar süreçtir. Mikroglianın aktivasyonu proliferasyon, hasar bölgesine göç, morfolojik, immunofenotipik ve fonksiyonel değişiklikler için bir dağarcık ortaya koyar. *In vitro* da, reaktif oksijen ara bileşenleri (ROB), veya türleri ve reaktif nitrojen ara bileşenleri, proteazlar, araşidonik asit türevleri, eksitotör aminoasitler ve prostaglandinler, TNF α , IL-1 β , kemokinler benzeri pro-inflamatuar araçlar gibi bir çok sitotoksik madde salgılayabilmektedirler. Mikroglialar beynin sadece yapısal bütünlüğünün değişmesine değil, ayrıca mikro çevredeki çok küçük değişikliklere (iyon dengesi değişikliği) tepki gösterebilmektedirler (33, 30).

Mikroglialının yaşlılık süreciyle beraber hücre morfolojisi ve eksprese ettiği yüzey antijenleri açısından değişikliğe uğraması muhtemeldir (34). Yaşlanma sürecinde, mikroglia, daha ilerleyici olarak daha uzun sürelerle aktive kalır ve orta yaşta hücreler çok sayıda dallanmış uzantılar oluşturur (35). İleri yaşta, genişlemiş ve özellikle fagositik formdaki mikroglialarda artış görülür (36). Bu aşamada mikroglial hipertrofi artar, kontak inhibisyonlarını kaybederler ve mikroglial kümeler oluştururlar (32). Bunun yanında kazanılmış immun sistemin yaşlanması glial hücrelerin pro-inflamatuar durumu ile ilgilidir. Fakat yaşla birlikte aktive olan mikrogliaların artışı AH'de görülen mikroglia artışına oranla oldukça az kalmaktadır (27).

Son zamanlarda yapılan birçok çalışma mikroglia aktivasyonunun, Alzheimer hastalarında beyin dokusu yıkımının erken dönemlerinde görüldüğünü göstermektedir. Hastalık ilerlediğinde, aktive olmuş mikroglia serebral korteksin etkilenen bölgelerine yayılır ve A β plaklarında yoğunlaşır. Plak ile ilişkili olan mikroglialar erken safha yaygın amiloid birikimlerinden nöritik A β plaklarına dönüşümde önemli bir eleman olarak kabul edilir (27).

Mikrogliaların A β birikimlerini fagosit etme ve internal olarak degrade etme yeteneğini vurgulamıştır. Bu özellik plak gelişimi açısından son derece önemlidir (37). Senil plaklarla ilişkide olan mikroglia aynı zamanda, major histokompatibilite kompleks I ve II (MHC-I ve MHC-II) molekülleri, integrinler gibi aktivasyon belirteçlerini eksprese eder (38). Aktivasyonla beraber mikroglialar akut faz proteinlerini, kompleman sistem bileşenlerini, sitokin ve kemokinleri eksprese ederler (39). Buna ek olarak mikrogliaların A β fibrillerine bağlanmasını ve ardından reaktif oksijen bileşenlerini salgılamasına neden olan tutucu reseptörleri eksprese ederler (40). ROB'ların salınmasıyla nöronlar oksijen radikalleri tarafından hasara uğrar (26).

Aktive olmuş mikroglia A β plaklarına ek olarak nörofibriler yumakların çevresinde de daha ilk yumak oluşumundan itibaren bulunur (41). İlerleyen dönemlerde aktive mikroglia miktarındaki artış, nörofibriler yumaklardaki artış ile paralellik göstermekte ve birbirleriyle korele bulunmaktadır (42,43). Tüm bu çalışmalar mikroglia tarafından indüklenen inflamasyonun AH patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir (44).

3.5.2 İnfiamasyonda Astroglial Hücreler

Astrostitler ilk defa 1856 yılında Virchow tarafından, nöronlara metabolik ve yapısal olarak destek olan hücreler olarak tanımlanmıştır (45). Astrostitler beyinde en çok görülen hücredir (46) ve glial popülasyonun %80 ini oluştururlar (42). Astrostitler, büyük, yıldız görüntüsüne sahip ve birçok uzantısı ile nöropilleri çevreleyen bir morfolojiye sahiptir. Beyin hasara uğradığı zaman astrostitler iyileşme sürecinin bir parçası olarak glial skar dokusunu oluşturur (26). Nöronlar öldüğü zaman mikroglia ölü hücreleri fagositoz ile ortamdaki uzaklaştırır. Uzaklaştırmanın ardından hasar gören bölgede astrostitler proliferer olur ve skar dokusu oluşturularak lezyon tamir edilir (47). Reaktif gliosis, glia aktivasyon süreci, Alzheimer hastalığı ve benzeri birçok nörodejeneratif hastalık sürecinde görülür. Reaktif gliosisin karakteristik özellikleri astrostitlerin hipertrofisi ve astrostit ile mikrogliaların proliferasyonudur (48). Aktive olan astrostitler hem nöroprotektif hem de nörotoksik özellik göstermektedir (42). Lezyonun etrafında oluşan glial bariyer hala bütün olan diğer beyin dokusunu ikincil hasardan korumaktadır (46,48). Reaktif gliosis uzun zamandır aksonal rejenerasyon için bir engel olarak kabul edilmesiyle beraber bazı veriler aksonal büyüme için uyarıcılar oluşturabileceğini düşündürmektedir (42). Reaktif astrostitlerin bir diğer özelliği de çok çeşitli molekülleri artmış olarak ekspres etmeleridir. Mikroglia'ya benzer olarak astrostitler interlökin, prostoglandin, lökotrin, koagülasyon faktörleri, kompleman bileşenleri ve faktörleri, proteazlar ve proteaz inhibitörleri gibi birçok proinflatuar madde salgılamaktadır (26). Proinflatuar maddelere ek olarak astrostitler yüksek miktarda MHC II ve daha az miktarda MHC I antijenleri ile hücre adezyon molekülleri, oksijen ve nitrojen serbest radikallerini sentezlerler. Astrostitlerin yüzeyinde MHC antijenlerinin olması, aktive astrostitlerin T-lenfositleri aktive edebileceğini düşündürmektedir. Artmış hücre adezyon molekülleri immün hücrelerin kan beyin bariyerinden geçişini arttırarak beyindeki inflamasyonu güçlendiriyor olabilir (42).

Alzheimer hastalarının beyinlerinde astrostitler A β senil plaklarının önemli ve göze çarpan bileşenlerindedir (27). Reaktif astrostitler hemen bütün diffuz plaklarda bulunurlar ama en yoğun oldukları nöritik plaklardır (49). Nöritik plaklardaki, Nörotrofik sinyal molekülü olan S100B'nin astrostitik aşırı ekspresyonu A β plaklarındaki nöritik patoloji ile koreledir (41, 27). Astrostitozisin senil plak patogeneğinde ikincil değil birincil rol oynadığı

düşünülmektedir (49). Buna ek olarak astrositler mikroglialın plakları temizleme yeteneğini de azaltıyor olabilir. Eğer A β plakları ilk olarak astrositlerle karşılaşırsa mikroglial atağı engelleyen proteoglikanları biriktirerek mikroglial fagositozu engelliyor olabilir (50,51).

Tablo 2: Alzheimer Hastalığıyla ilişkili olarak mikroglia ve astrositlerden salınan moleküller (61)

Mikroglia	Astrosit
Kompleman proteinler	Kompleman proteinler
Kompleman inhibitörler	Kompleman inhibitörler
A β	A β
Sitokin ve Kemokinler	Sitokin ve Kemokinler
IL-1	IL-1
TNF- α	TNF- α
IL-6	IL-6
IL-8	IL-8
MIP-1	S100
Reaktif oksijen türevleri	COX-2
MHC II	

3.5.3 İnflamasyonda Kompleman Sistem

Komplement sistem, otuz beşten fazla, kendini düzenleyen kaskat ya da yolları oluşturan, plazma da çözünebilen veya hücreye bağlı proteinlerden oluşur. Kompleman aktivasyonu kemotaksi, immün temizlenme, sitoliz, inflamasyon ve immün komplekslerin yürütülmesine öncülük eder. Bu hücrelerin periferik kandaki temel kaynağı karaciğerdir, fakat beyin gibi diğer organlarda da, sentezlenir. Kompleman proteinler beyinde, nöronlar, astrositler, mikroglialar, oligodendrositler ve endotelial hücreler tarafından sentezlenir (52).

Genel olarak üç kompleman yolağı vardır: klasik, alternatif ve leptin kontrollü kaskadlar. Antikora bağlı bir yolak olan klasik yolak, antijenlerle kompleks halinde olan

antikorların C1- kompleksini uyarması ile aktive olur. Alternatif yolak, enfeksiyona karşı, antikor katılımı olmadan, doğal savunma sisteminin humoral komponentini oluşturur. Tam aktivasyon membran atak kompleksi (MAC) olan C5b-9 oluşturulmasına neden olur bu da hedef hücre zarının bütünlüğünü bozup hücre lizisi ve ölümüne, polimorfonukleer lökositler için çekici olan kompleman bileşenlerinin oluşumuna yol açar (53).

Alzheimer hastalığında kompleman sistemin aşırı aktive olduğu ve aşırı ifade edildiği, beyinlerinde kompleman sisteme ait bileşenlerin hem mRNA hem de protein düzeylerinde artış olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (54,55,56) Erken faz kompleman sistem bileşenlerinin (57) ve C5b-9 dan oluşan membran atak proteinlerinin (58) Alzheimer hastalığında birincil olarak etkilenen bölgelerde (hippokampus, korteks) nörofibriler yumaklar, distrofik nöritler, nöritik plaklar ile bağlantılı olarak artmış olduğu görülmektedir. Bu artış Alzheimer dışı olgularda izlenmemektedir (59).

Alzheimer hastalığında klasik ve alternatif yolakların aktive olduğunu ve MAC aktivasyonuna yol açtığını gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Santral sinir sisteminde genel olarak düşünülenin aksine klasik kompleman sistem antikor aracılıklı olarak değil A β plaklarının kompleman bileşenlerinden C1'e direk olarak bağlanması ile aktive olmaktadır (60). Bu şekilde mikrogliaların ve proinflamatuvar sitokinlerin salınması indüklenebilir. Bu araçılar A β salınımını arttırarak böylece süreğen bir döngü oluşmasını sağlıyor olabilir (31). Sonuç olarak, kompleman sistemin Alzheimer hastalığındaki aktivatörü senile plaklardır.

İlk başlarda Alzheimer hastalığında kompleman sistem aktivasyonunun klasik yolak ile sınırlı olduğu düşünülmüştür. Fakat çok sayıda çalışma alternatif yolağın da aktive olduğuna dair bulgular sunmuştur (61). Fakat kompleman sistem hem nöroprotektif hem de norotoksik özellik taşıdığına Alzheimer hastalığı üzerindeki etkisi tam olarak açık değildir.

3.5.4 İnflamasyonda Sitokin ve Kemokinler

Sitokinler immunitiyi, inflamasyonu ve hematopoezi düzenleyen hormon benzeri proteinler ya da gliokoproteinlerdir. Sitokinler temel olarak interferonlar (IFN), interlökinler

(IL), tümör nekroz faktörleri (TNF), transforme büyüme faktörleri (TGF) ve koloni stimülasyon faktörleri (GM-CSF) olarak gruplandırılır.

Kemokinler proinflatuar kemotaktik sitokin proteinleridir ve inflamatuvar hücrelerin bir araya toplanmasından sorumludur. Kemokinler hasara yanıt olarak farklı hücre tipleri tarafından salınırlar ve lökositleri hasar bölgesine çekerek hücre aktivasyonunu indüklerler. Hem kemokin hem de sitokinlerin Alzheimer hastalığında beyinde arttığı gösterilmiştir (26). Sitokin ve kemokinlerin arasında Alzheimer hastalığında en çok çalışılanlar arasında: proinflatuar sitokinlerden interlökin 1 beta ve alfa (IL-1 β , IL-1 α), tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) interlökin 6 (IL-6) ve transforme büyüme faktörü beta (TGF- β) ve kemokinlerden monosit kemotaktan proteini 1 (MCP-1), makrofaj inflamasyon proteini 1 (MIP-1) dir (62,63).

İnterlökin 1'in (IL-1), birçok nörodejeneratif koşulda nörotoksik etkili olarak rol oynadığı, mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olsa da düşünülmektedir. (64). Mikroglia ve astrositler tarafından salınan iki formu vardır. Aktive mikroglia tarafından salınan IL-1, IL-6 gibi diğer sitokinlerin salınımını artırarak, astrositler tarafından salındığında ise TNF α salınımını indüklemektedir. Buna ek olarak IL-1, astrosit ve nöronlar tarafından, amiloid fibrillerin oluşmasına neden olan β -amiloidin üretimini arttırmaktadır (65). Sonuç olarak IL-1 birçok farklı yolak kullanarak daha fazla sayıda mikroglia'yı aktive eder, aktive olmuş bu hücreler daha fazla IL-1 salar ve böylece kendini destekleyen ve güçlendiren bir döngü oluşturur.

İnterlökin 6 (IL-6), doku hasarına karşı koruyan ve kazanılmış immun sistemi güçlendiren akut faz reaksiyonlarını tetikleyen multifonksiyonel bir sitokindir. IL-6 mikroglialar, astrositler, nöronlar ve endotelial hücreler tarafından sentezlenir. Koşullara bağlı olarak IL-6 immun baskılayıcı veya inflamatuvar özellikler gösterir. IL-6, IL-1 β tarafından başlatılan inflamatuvar yanıtı güçlendiren ikincil basamak olarak görülmektedir (66). Artmış IL-6 mRNA seviyeleri Alzheimer hastalarının entorhinal korteks ve superior temporal girusunda gösterilmiştir (67,68).

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) periferde programlı hücre ölümünü başlatmasıyla beraber (69) merkezi sinir sisteminde nöroprotektif etkiler göstermektedir (70). TNF α nın manganese superoksid dismutaz ve Bcl-2 gibi birçok nöronal sağkalım faktörünün stimulatorü olduğu gösterilmiştir (39). TNF α beyinde uzamış aktivite blokajına yanıt olarak sinaptik ölçeklendirmeyi düzenliyor olabilir (71). Sinaptik ölçeklendirme nöronal ağların stabilitesini korumak için beynin kullandığı homeostatik bir mekanizmadır (72). Böylece sinaps kaybıyla meydana gelen yıkıcı bellek bozukluğunu önler. Sinaptik ölçeklendirmenin oluşmadığı koşullarda kritik sayıda sinaps yıkıldığı zaman bellek bozukluğuna neden olabilir. Bununla beraber sinaptik ölçeklendirme ile bellek bozukluğu daha basamaklı olmaktadır, yeni oluşan henüz yeterince oturmamış bilgiler öncelikli olarak yıkılmaktadır. Bu durum Alzheimer hastalığında görülen retrograd amnezi ile son derece uyum göstermektedir (73). Alzheimer hastalığında görülen artmış TNF α düzeyleri ilerleyici bellek bozukluğuna, yani sinaps kaybına, karşın oluşan telafi edici bir mekanizma olabilir.

Transforme büyüme faktörü beta (TGF β) süperalesi, fizyolojik ve patolojik birçok süreci düzenleyen pleiotropik sitokinlerdir (74,75). Alzheimer hastalığında TGF β düzeyleri artmıştır. TGF β düzeylerinin serebral amiloid anjiopati düzeyleri ile korele olduğu gösterilmiştir (76). Bunun yanında TGF β senil plaklar ve nörofibriller yumaklarda da bulunmuştur (77).

İnflamatuar genlerin kodlamayan bölgelerindeki polimorfizmler Alzheimer hastalığı riskini arttırmaktadır. İnflamatuar mediatorlerin daha fazla ifade edilmesine neden olan polimorfizmler Alzheimer hastalarında kontrollere göre daha sık görülmektedir. Örneğin IL-1 α Alzheimer hastalığı için genetik risk faktörü olarak belirlenmiştir (78).

3.5.4.1 *Interlökin 18*

Interlökin 18 (IL-18) IL-1 ailesinden proinflamatuar bir sitokindir ve ilk olarak interferon gama indükleyici faktör olarak adlandırılmıştır. 24 kDa lık inaktif öncül protein olarak sentezlenir (pro-IL-18), kaspaz 1 tarafından 18 kDa'lık biyolojik aktif formuna kesilir (79,80). Pro-IL-18, kaspaz 1 dışında lökositler tarafından salınan proteinaz-3 gibi ekstraselüler enzimler tarafından da kesilebilir (80,81). IL-18 sinyal yollarını birçok

hücrede eksprese edilen, heterokompleks yapıdaki reseptörü olan IL-18 α/β ya bağlanarak başlatır (79,80,82). Nöron ve glialarda fonksiyonel IL-18 reseptör (IL-18R) varlığı stimülasyon deneyleri ile *in vitro* olarak primer murin hücre kültürlerinde ve *ex vivo* olarak murin hipokampal kesitlerde gösterilmiştir (83,84).

Erişkin beyninde IL-18, reseptörü ve kaspaz-1; astrositler, mikroglialar, nöronlar ve ependimal hücreler tarafından eksprese edilebilir (83,84). IL-18' in reseptörüne bağlanması transkripsiyon faktörü olan NF- κ B nin aktive olmasını sağlar (80,85,86). Beyinde IL-18' in aktif formuna dönüştürülmesi inflamatuvar koşullar altında olmaktadır (87). Deneysel ve klinik çalışmalar IL-18 in nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonda önemli rolü olduğunu göstermektedir.

Multipl skleroz hastalarında periferik mononükleer hücrelerde kaspaz-1 seviyeleri, sağlıklı kontrollere göre yüksektir (88,89). Bu çalışmada, monositlerdeki kaspaz-1 gen ekspresyon seviyeleri, hastalık aktivitesi ve kranyal magnetik rezonans görüntülemeledeki lezyonlar ile korelasyon göstermiştir (88,89). Fassbender ve arkadaşları tarafından multipl skleroz ve bakteriyel menenjit viral meningoensefalit hastalarında beyin omurilik sıvısında IL-18 düzeyleri bakılmıştır (90). Bu çalışmada, bakteriyel menenjitli hastaların %94, viral enfeksiyonlu hastaların %43 ve multipl skleroz hastalarının %3 ünde IL-18 seviyeleri tespit edilebilmiştir (90). Buna zıt olarak Balashov ve arkadaşları multipl skleroz hastalarının serebral demiyelinize plaklarında bölgesel olarak IL-18 ve IFN- γ ekspresyonunda artış saptamışlardır. Bu bulgu beyin omurilik sıvısındaki IL-18 düzeyinin multipl sklerozdaki lezyonların IL-18 aktivitesini yansıtmadığını düşündürmektedir (91).

Hipoksik-iskemik beyin hasarında ve travmatik beyin hasarında nöroinflamasyon lezyon bölgesinin artmasında ve ikincil serebral hasarların oluşumunda önemli role sahiptir. Orta serebral arter hasar, hayvan modellerinde IL-18, iskemi kökenli hasarın başlatılması ve devam etmesi süreçlerinde yer almaktadır. Örneğin, sıçanlardaki bölgesel iskemik beyin hasarının, lezyonlu bölgede mikroglia ve monosit/makrofajlarda gecikmiş IL-18 ve kaspaz-1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir(92). İlginç olarak bu çalışmada kaspaz-1'in ekspresyon profili, IL-18 ekspresyonu ile paralellik göstermekte fakat IL-1 β ekspresyonu ile göstermemektedir (92).

İnme hastalarında yükselmiş IL-18 seviyeleri hipodens bölge hacimleriyle ve fonksiyonel dizabilite skorları ile korelasyon göstermektedir (93). Buna ek olarak, laküner olmayan iskemi hastaları lakunar iskemi hastalarına göre daha yüksek serum IL-18 seviyelerine sahiptir (93).

Hipoksik-iskemik serebral hasarlardakine benzer olarak travmatik beyin hasarı patolojisinde IL-18 önemli rol oynuyor görünmektedir (94,95,96). Menge ve arkadaşları sıçanlarda optik ve siyatik sinir ezilme modellerinde, IL-18 in gen ve protein ekspresyonunda artış olduğunu göstermişlerdir (94). Bu çalışmalarda, merkezi sinir sistemindeki IL-18 mRNA ekspresyon artış düzeyleri periferik hasardaki artıştan çok daha yüksek bulunmuştur (94). Hasar bölgelerinde IL-18 in hücrel olarak ana kaynağının infiltrate olan makrofajlar olduğu görülmüştür. Buna ek olarak, miyelin degradasyonunun olduğu alanlarda bulunan mikroglialarda IL-18 ekspresyonunun dramatik olarak arttığı, IL-18 in mikroglia kökenli nörotoksositeye neden olabileceği öne sürülmüştür (94). Yatsiv ve arkadaşları kapalı beyin travması geçiren hastaların beyin omurilik sıvısı IL-18 düzeylerini 10 gün boyunca sağlıklı kontrollerle karşılaştırmış ve bu süre boyunca yaklaşık 200 kat kadar artmış olduğunu göstermişlerdir (95).

4. Serebral iskemi

Serebral iskemi, AH'den sonra yaşlılıkta demansın en sık görülen ikinci nedenidir. Avrupa yapılan prevelans çalışmalarında 65 yaşından büyük olgularda görülen demansların %1.6 sının vasküler demans kaynaklı olduğu belirlenmiştir (99).

Serebral iskemi, beyindeki kan akımının geçici yada kalıcı olarak azalmasından kaynaklanmaktadır. Global serebral iskemi, sistemik kan dolaşımının, kalp krizi gibi bir nedenden azalması ve beyne yeterli oksijen ve glikoz iletilmemesi ile hassas beyin bölgelerinde nöronal hasar oluşmasıdır. Fokal serebral iskemi ise genellikle bir emboli yada trombus tarafından beynin bir kısmını besleyen damarın tıkanması ile kan akımının azalmasıdır.

Serebral iskemiden kaynaklanan demans tek bir infaktan veya multipl kortikal yada lakunar infarktlardan veya klinik semptom vermeyen ve görüntüleme ile belirlenemeyen

mikrovasküler infarktlardan kaynaklanabilir. Vasküler demansda mikrovasküler patolojiyi oluşturan nöronal kayıp ve gliosis, demans oluşumundaki temel nedendir (102).

İskemik hasar parenkimal hücre hasarına ek olarak kan beyin bariyerinden polimorfonükle hücrelerin, monosit/makrofajların ve serum proteinlerinin beyne geçmesine neden olan inflamatuvar olaylara neden olur (106). Direkt travmanın, nutrient ve oksijen deprivasyonunun mikrogliya ve astrositlerin aktivasyonunu, hipertrofini ve proliferasyonunu indüklediği bilinmektedir (105). Aktive olan glial hücreler ise, salgıladıkları sitokinler ile yeniden glia aktivasyonunu, gliosisi ve sitokin salınımını uyaran bir döngü oluştururlar (96).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

1. Araştırmanın tipi

Karşılaştırmalı olgu serisi çalışması yapılmıştır.

2. Araştırmanın yapıldığı yer ve araştırmanın zamanı

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Kliniğinde ve AR-LAB'da Ekim 2005-Mayıs 2007 döneminde gerçekleştirilmiştir. Örnekler Ekim 2005-Mart 2007 döneminde toplanmış, araştırmada toplanan serum ve lenfosit örneklerinin laboratuvar incelemeleri Eylül 2006 ve Mayıs 2007 dönemlerinde AR-LAB'da yapılmıştır. Verinin analizi ve tezin yazımı Haziran-Ağustos 2007 döneminde tamamlanmıştır.

3. Çalışmaya dahil edilen olgu ve kontroller

Olgular: NINCDS-ADRDA tanı kriterlerine göre 'muhtemel AH' tanısı almış olgular AH grubunu, serebrovasküler olay geçirmiş olgular ise SVO grubunu oluşturmuştur.

Kontroller: Herhangi bir demansiyel semptomu olmayan, olgularla benzer yaş grubundan olan, sağlıklı kişiler kontrol grubu olarak araştırmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 19 Alzheimer hastasının, 10 Serebrovasküler olay hastasının ve 15 kontrol olgusunun serumları ELISA yöntemiyle IL-18, 15 Alzheimer hastasının, 10 Serebrovasküler olay hastasının ve 15 kontrol olgusunun lenfosit örnekleri IL-18 gen ekspresyonu için değerlendirilmiştir.

Olgu veya kontroller için dışlama kriterleri;

Alzheimer grubu;

- Serebrovasküler hastalık öyküsü
- İnflamatuar rahatsızlık

Kontrol grubu;

- Serebrovasküler hastalık öyküsü
- Kognitif yıkım

- Herhangi bir demans türü
- Yoğun depresyon
- İnflamatuvar hastalık

Serebrovaskuler olay grubu;

- Herhangi bir demans durumu
- İnflamatuvar rahatsızlık

4. Araştırmanın değişkenleri

- Yaş: Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- Cins: Kadın ve erkek olarak belirtilmiştir.
- Eğitim yılı: Hasta ve/veya yakınlarına yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- Bilişsel durum: MMDT, GBÖ ile değerlendirilmiştir. MMDT skorları 25 ve altında olan ve GBÖ 4 ile 7 arasında değişen DSM-IV kriterine göre demans ve NINCDS-ADRDA tanı kriterine göre 'muhtemel AH' tanısını karşılayan olgular AH grubu olarak alınmıştır.

5. Etik kurul onamı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 23 Kasım 2004 tarih ve 02.14.04 no'lu toplantısı sonucunda çalışmanın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığına dair onay alınmıştır. SVO hastalarının çalışmaya dahil edilmesi için ise 27 Temmuz 2006 tarih ve 01.16.2006 no'lu toplantı sonucu onay alınmıştır. Onam formu örneği EK-1 de verilmiştir.

6. Verinin Toplanması ve İşlenmesi

Olgu grubu, Ekim 2005-Mart 2007 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı Demans Polikliniğinde muayene edilen Alzheimer hastaları arasından

seçilmiştir. Olgular hafif, orta, ağır evre Alzheimer hastalarıdır. Kontrol grubu nörolojik bir sorunu olmayan, hasta yakınları arasından seçilmiştir. Serebrovasküler hastalık olguları aynı tarihlerde Serebrovasküler Hastalık Polikliniğinde muayene edilen hastalardan seçilmiştir. Seçilen olgularla yüz yüze görüşme yapıp, onamları yazılı olarak alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrollerden ve AH grubundaki olgulardan, toplam 25 ml periferik kan örneği alınmıştır. Örnekler, alındıktan hemen sonra laboratuara götürülerek gerekli işlemler uygulandıktan sonra derin dondurucuya kaldırılmıştır. Çalışmanın yapıldığı güne kadar tüm örnekler derin dondurucuda korunmuştur.

7. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri ve malzemeleri

Çalışmada laboratuvar gereci olarak, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) plak okuyucusu ve yıkayıcısı, termal cycler, Real-time PCR cihazı, elektoroforez tankı, santrifüj, derin dondurucu (- 20 ve - 80°C), buzdolabı, pH metre, hassas terazi kullanılmıştır.

IL-18 ELISA kiti (BIOSOURCE Human IL-18, California, USA) ve RNA izolasyon kiti (M&N Nucleospin Total RNA izolasyon Kiti) cDNA sentez malzemeleri (MBI Fermentas), Real-time PCR kiti (LightCycler SYBR Green I DNA Masterplus Kit, Roche), Absolut kantitasyon kitleri (IL-18 ve β -Actin Primer Set, Search LC) temin edilmiştir.

8. Deney Protokolleri

4.1. Periferik kandan serum ve lenfosit eldesi

4.1. Serum Ayrılması;

1. Klot aktivatör içeren tüplere 5ml periferik kan alındı.
2. Alınan örnekler 2-4 saat süresince oda ısısında bekletildi.
3. 3000 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra ayrılan serum 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı.
4. Örneklerin çalışılacağı güne kadar -70°C de saklandı.

1.1.2. Lenfosit Ayrılması;

1. Lityum Heparin içeren tüplere toplam 18 ml periferik kan toplandı.
2. PBS (fosforla tamponlanmış tuz solüsyonu) ile 1:1 oranında dilue edildi.
3. 50 ml lik polipropilen tüplere 15 ml Bicoll ayırıcı konduktan sonra pastör pipeti ile iki faz birbirine karışmadan çok yavaşça aynı miktarda dilue kan örneği eklendi.
4. Örnekler 1200 rpmde 30 dk boyunca santrifuj edildi.
5. Santrifüjün ardından ayrılan lenfosit fazı pastör pipeti ile toplandı ve PBS ile 1:10 oranında dilue edildi.
6. 300 rpmde 10 dk boyunca santrifüj edilip lenfositlerin çökmesi sağlandı.
7. Supernatan atıldı ve pellet süspansiyon haline getirilip ependorf tüplere aktarıldı.
8. Tekrar PBS ile dilue edilip 200 rpm de 10 dk boyunca santrifuj yapılarak yıkandı.
9. Supernatan uzaklaştırıldı ve pellete 350 µl “M&N hücre lizis ve RNA koruma tamponu” eklendi.
10. Tampon içindeki lenfosit örnekleri çalışılacağı güne kadar -70°C de saklandı.

8.2.Lenfosit örneklerinden RNA izolasyonu ve c-DNA sentezi

Koruyucu tampon içindeki lenfosit örnekleri RNA izolasyonunun yapılacağı gün -70°C den çıkarılıp buz içerisinde yavaşça çözüldü. RNA izolasyonu “M&N Nucleospin Total RNA izolasyon Kiti” ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

8.2.1Lenfositlerden “NucleoSpin RNA II kit” ile total RNA izolasyonu

1. Örnekler 3.5 µl β-merkaptioethanol eklendi ve vortekslendi..
2. 350 µl %70 ethanol eklendi ve vortekslendi.
3. Lizat kite ait kolonlara aktarıldı.
4. 30 sn 8000g de santrifuj edildi.
5. 350 µl MDB (Membrane Desalting solüsyonu) eklendi.
6. 1dk 11.000g de santrifüj edildi.

7. Steril bir mikrosantrifüj tüpünde DNase reaksiyon karışımı hazırlandı. Her bir örnek için 10 µl DNase I, 90 µl DNase reaksiyon tamponu koyuldu ve tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
8. 95 µl DNase reaksiyon karışımı silika membranın tam ortasına uygulandı ve oda ısısında 15 dk inkubasyona bırakıldı.
9. 200 µl RA2 tamponu eklendi.
10. 30 sn 8.000g de santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne koyuldu.
11. 600 µl RA3 tamponu eklendi.
12. 30 sn 8000g de santrifüj edildi. Atık döküldü ve yeniden aynı toplama tüpü kullanıldı.
13. 250 µl RA3 tamponu eklenildi.
14. 2 dk 11.000g de santrifüj edildi.
15. Kolon 1,5 ml lik nükleaz, içermeyen mikrosantrifüj tüpüne koyuldu.
16. Membranın ortasına RNA miktarına göre 25-60 µl arasında RNaz içermeyen su eklendi.
17. 1 dk, 11.000g de santrifüj edildi.
18. Bu aşamadan sonra örnekler buz üzerine alınıp RNA miktar tayini yapıldı.

8.2.2. RNA miktar tayini

1. Elde edilen RNA örneğinden 3 µl alınıp, 72 µl distile su ile 1:25 oranında dilue edildi.
2. Spektrofotometre ile A_{280} / A_{260} oranı ölçülür.
3. 1.6 ile 1.8 arasındaki değerler yeterli saflık olarak kabul edildi.
4. Okunan RNA değeri kaydedildi.
5. Elde edilen değerler dilusyon faktörü ile çarpılıp, µg/ml olarak RNA miktarları bulundu.
6. Bu aşamadan sonra cDNA sentezine geçildi.

8.2.3. c-DNA Eldesi

1. RNA konsantrasyonu 1µg/ml olacak ve 15 µl yi geçmeyecek şekilde hesaplandı. RNA örneklerinden gerekli miktar alındıktan sonra 15µl ye RNAz içermeyen distile su ile tamamlandı.
2. 0.5 µl Random Hexamer (Random Primer) eklendi ve pipetaj yapıldı.
3. 95°C de 5 dk inkube edildi.
4. Buz üzerinde reaksiyon karışımı hazırlanır. Reaksiyon karışımının içeriği her bir örnek için; 4µl reaksiyon tamponu, 0.5µl revers transkriptaz enzimi, 0.5µl dNTP karışımı'dır.
5. Reaksiyon karışımı her bir örneğe 5µl eklendi.
6. Örnekler termal cyclerda 37°C de 2 saat ve 65°C de 5 dk inkube edildi.
7. Çalışılincaya kadar örnekler -20°C de saklanır.

8.3.Absolute değerlerle rölatif kantitasyon ile gen ekspresyonunun belirlenmesi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR) yöntemi ile konvansiyonel PCR a göre daha kesin kantifikasyon yapılması mümkündür. Konvansiyonel PCR metodunda, PCR sonlandıktan sonra ürün miktarının belirlendiği son nokta analizi kullanılmaktadır. Bu yöntemde yaşanabilen sıkıntı başlangıç kopya sayısı olarak düşük sayıya sahip fakat verimi yüksek olan bir örnek ile başlangıç kopya sayısı yüksek fakat verimi düşük örnek plato fazında aynı miktara ulaşabilmesidir. Real-Time PCR yöntemi ile ise amplifikasyon eğrisinin izlenmesi örneklerin log fazına geçtiği Cp (Crossing Point) değerleri hesaplanabilmekte ve başlangıç miktarı hesaplanabilmektedir. Başlangıç örnek miktarı arttıkça amplifikasyon ürünleri daha erken döngülerde arka plan (background) değerlerini aşmakta ve belirlenebilen Cp değeri küçülmektedir.

Sybr Green I, real-time PCRda, DNA ya bağlanarak ürün miktarının belirlenmesini sağlayan florasan bir boyadır. Sybr Green I, çift zincirli DNA nın küçük oluşuna bağlanır ve bağlandığı zaman florasan değeri 100 kat artar. PCR reaksiyonunda amplifikasyon ürünlerinin elongasyonu (uzaması) esnasında Sybr Green I ürünlere bağlanır ve elongasyon safhasının

sonunda maksimuma ulaşır. Bu safhada 530 nm de florasan değeri okunur ve ürün miktarı belirlenir.

Sybr Green I boyası sekans spesifik olmayıp, herhangi bir çift sarmal DNA ya bağlandığından yöntemim kısıtlılığı non-spesifik ürünlerin alınan sinyal değerlerine katılabilmesidir. Non spesifik ürünlerin tespit edilmesi için erime eğrisi analizleri yapılması gerekmektedir. Çoğaltılan fragmana uygun değerde tek bir pik alınması reaksiyonda non-spesifik ürünlerin olmadığını göstermektedir.

Absolut kuantifikasyon için Search LC IL-18 ve β .aktin primer setleri kullanılmıştır. β -aktin housekeeping gen olarak değerlendirilmiştir. Tüm reaksiyonların ardından erime eğrisi analizleri ile spesiflik kontrol edilmiştir.

8.3.1. Absolute Kantifikasyon Protokolü

1. 1 μ g RNA örneğinden sentezlenen cDNA örneklerinden 1:10 dilusyon yapıldı.
2. Standart stabilizasyon solüsyonu ile üç farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
3. 1,5 ml lik ependorflarda reaksiyon karışımı hazırlandı. Örnek başına reaksiyon karışımı ;6 μ l distile su, 2 μ l primer ve 2 μ l Sybr Green I ve enzim karışımı içermektedir.
4. Kapiller tüpler reaksiyon karışımı eklenmeden önce soğutuldu.
5. 10 μ l reaksiyon karışımı eklendi.
6. 10 μ l dilue edilmiş cDNA örnekleri ve standartlar kapiller tüplere eklendi.
7. Kapiller tüplerin kapakları kapatıldı.
8. +4°C ye soğutulmuş santrifüjde kapiller tüpler 2000 rpm de 30 sn santrifüj edildi.
9. Kapillerler cihaz rotoruna yerleştirildi.
10. Her bir örnek ve standart duplike olarak çalışıldı.

Reaksiyon safhaları ve program ayarları EK-2 de belirtilmiştir.

8.3.2. Absolute Kantifikasyon analizlerinin yapılması

Deney sonuçlarının analizleri için LightCycler Software 4.0 programı kullanılmıştır.

1. Programda standartlar ve örnekler belirlenmiştir.
2. Standart değerleri girilmiştir.
3. Standart eğrisi oluşturulmuştur.
4. Her bir örneğin absolut değeri elde edilmiştir.
5. Elde edilen sonuçlar her bir kişi için IL-18 değerlerinin aynı kişide elde edilen β -aktin değeri ile bölünmesi sonucu IL-18 ekspresyon oranı elde edilmiştir.

8.4. ELISA Yöntemi ile Serum IL-18 Protein Değerlerinin Belirlenmesi

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi immobilize edilmiş antijen kullanılarak yarışmalı olmayan indirek boyama yöntemidir. Çalışmamızda sandviç ELISA yöntemi kullanılmıştır. Sandviç ELISA metodunda plak zeminine tutunmuş, “yakalama antikor” denilen birinci antikor bağlıdır ve örnekle inkube edilerek ilgili antijenin plağa bağlanması sağlanır. Ardından ikincil biotin bağlı antikor eklenmekte ve ilgili antijene bağlanması sağlanmaktadır. İkili antikor tanıma sisteminin kullanılması spesifisiteyi arttırmaktadır.

Kullanılan ELISA kitinin özellikleri;

- Hassasiyeti ≤ 12.5 pg/mL
- Deteksiyon Aralığı: 15.6-1000 pg/mL
- Güvenilirliği:
 - ♦ Günler arası CV: $<10.1\%$
 - ♦ Gün içi CV: $<10.8\%$

8.4.1. ELISA Protokolü

1. Standart, dilusyon tamponu ile çözüldü ve seri dilusyon ile gerekli miktarda standart elde edildi.
2. Her bir kuyucuğa 100 μ l standart ya da örnek uygulandı. Bütün örnekler ve standartlar duplike olarak çalışıldı.

3. Örnekler kuyucuklarda oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkube edilmiştir.
4. Kuyucuklar 4 kere yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi kuyucuğa 200µl yıkama tamponu koyulması ve ardından plağın ters çevrilerek içeriğinin boşaltılması ile gerçekleştirildi.
5. 100µl konjugasyon reaktifi eklendi.
6. Kuyucuklar oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkube edildi.
7. Kuyucuklar 4 kere yıkama tamponu ile, 4. basamakta belirtildiği şekilde yıkandı.
8. Kuyucuklara 100µl substrat reaktifi eklendi.
9. Oda sıcaklığında, karanlıkta, 30 dakika boyunca inkube edildi.
10. Her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklendi.
11. Absorbans değerleri 450 nm de, spektrofotometre cihazında okundu.
12. Standartların absorbans değerleri ile standart grafiği oluşturuldu ve örneklerin IL-18 içeriği hesaplandı.

9. Veri Çözümlemesi: SPSS 13.0 paket programı kullanılarak, dağılımlar değerlendirilmiştir. Cinsiyet arasındaki farklılığa Ki-kare (Pearson Chi Square) analizi, yaş ortalaması arasındaki farklılığa ise Kruskal Wallis testi ile bakılmıştır. IL-18 absorbansları ve ekspresyon değerleri arasındaki farklılığa gruplar nonparametrik koşulları sağladığı için Mann Whitney U testi ile bakılmıştır. IL-18 düzeyleri ile MMDT düzeyleri arasındaki korelasyon Spearman's Rho korelasyon analizi ile bakılmıştır. Çalışmada $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edilmiştir. Olgu ve kontrol grupları arasındaki yaş farklılıklarının sonuçlara etkisi Univariate Analysis of Variance testi ile değerlendirildi.

IV. BULGULAR

Yukarıdaki olgu ve kontrol tanımlamasına uyacak şekilde 19 AH, 10 Serobrovaskuler olay hastası (SVO) ve 15 kontrol çalışmaya alınmıştır. Araştırmaya katılması için teklif götürülen hastaların yarısından fazlası araştırmaya katılmak için gönüllü olmuştur. Araştırmaya katılmayan hastaların katılmama nedenleri çoğunlukla; bu işlemin kısa dönemde tedaviye bir katkısının olmamasıdır.

Alzheimer hastalarının yaş ortalaması $74,6\pm 8,5$, serebrovasküler olay hastalarının yaş ortalaması $62,8\pm 9,4$, kontrollerin yaş ortalaması ise $69,1\pm 9,6$ bulunmuştur. AH'lerin eğitim ortalamaları $7,4\pm 4,3$ yıl, hastalık süresi ortalaması $4,3\pm 2,5$ yıl, hastalık başlangıç yaşı ortalaması $70,2\pm 10,2$ yıl olarak saptanmıştır.

Tablo 3: Kontrol, Alzheimer hastaları ve serebrovasküler olay hastalarının veri ortalamaları

	AH	SVO	Kontrol
Yaş	$74,6\pm 8,5$	$62,8\pm 9,4$	$69,1\pm 9,6$
Cinsiyet Dağılımı (E/K)	9/10	6/4	9/6
Eğitim Yılı	$7,4\pm 4,3$	-	-
Hastalık Süresi	$4,3\pm 2,5$	$4,8\pm 5,9$	-
Hastalık Başlangıç Yaşı	$70,2\pm 10,2$	$57,9\pm 9,0$	-
MMSE	$11,7\pm 7,3$	-	-
GDS	$5,05\pm 0,9$	-	-
IL-18 Gen ekspresyonu	$814,38\pm 820,91$	$177,57\pm 277,15$	$182,59\pm 318,69$
IL-18 Serum	$511,09\pm 469,53$	$893,72\pm 808,02$	$654,62\pm 302,35$

Grupların, yaş ortalamaları Kruskal-Wallis testi ve cinsiyet dağılımı Pearson Chi-Square ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş, yaş ortalamaları arasında anlamlı fark olduğu ($p=0,004$), cinsiyet dağılımının ise homojen olduğu ($p=0,707$) bulunmuştur.

Alzheimer, serebrovasküler olay hastaları ve kontroller arasında IL-18 serum ve gen ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılık, sayılar nonparametrik koşulları sağladığı için Mann-Whitney U testi ile bakılmıştır. Alzheimer hastaları ve kontroller arasında IL-18 serum düzeyi ve gen ekspresyonu, Alzheimer hastaları ve serebrovasküler olay hastaları arasında ise IL-18 gen ekspresyonu düzeyi arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.

Tablo 4: Kontrol, Alzheimer hastaları ve serebrovasküler olay hastalarının IL-18 serum ve gen ekspresyonu ortalamalarına göre karşılaştırılması

AH-Kontrol	p*	p**
IL-18 serum (pg/ml)	<i>0,021</i>	<i>0,349</i>
IL-18 Gen ekspresyonu	<i>0,001</i>	<i>0,006</i>
AH-SVO	p	
IL-18 serum (pg/ml)	0,142	
IL-18 Gen ekspresyonu	<i>0,005</i>	<i>0,055</i>
SVO-Kontrol	p	
IL-18 serum (pg/ml)	0,657	
IL-18 Gen ekspresyonu	0,824	

*Mann-Whitney U testi

**Tek Değişkenli Varyans Analizi

Anlamlı farklılık elde edilmesinin üzerine tek değişkenli varyans analizi ile yaş ortalaması farklılığının IL-18 düzeyleri arasındaki anlamlılığa etkisi analiz edilmiştir. IL-18 gen ekspresyon düzeylerindeki anlamlılık kontroller ve Alzheimer hastaları arasında devam ederken (corrected model, p=0,006) serum IL-18 düzeylerindeki anlamlılık kaybolmuştur (corrected model, p=0,349). Alzheimer ve serebrovasküler olay hastalarındaki p değeri ise 0,055 olarak değişmiştir.

Alzheimer hastalarında, IL-18 düzeyleri ile MMDT ve GDÖ testleri arasındaki korelasyon Spearman's rho, bivariate korelasyon yöntemi ile analiz edilmiştir. IL-18 serum düzeyleri ile MMDT skorları arasında anlamlı pozitif korelasyon (r= 0,481, p=0,037), GDS

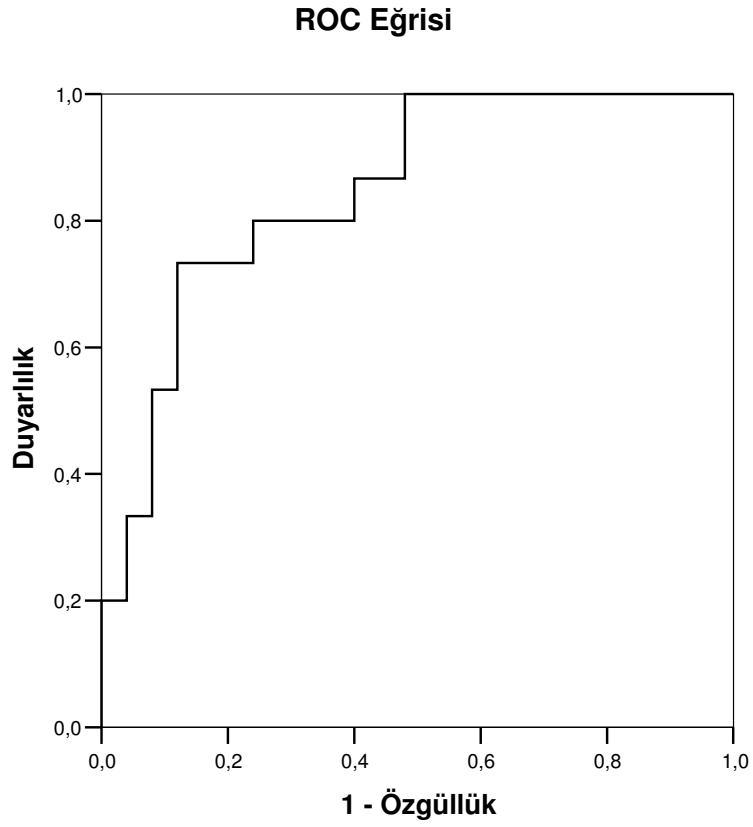
skorları ile ise anlamlı düzeyde negatif korelasyon ($r=-0,462$, $p=0,046$) göstermiştir. gen ekspresyon düzeyleri ile ise korelasyon görülmemiştir.

Tablo 6: Alzheimer hastalarının IL-18 serum ve gen ekspresyonu düzeylerinin MMDT ve GDÖ skorları ile korelasyonunun karşılaştırılması

		IL-18 Gen ekspresyonu	IL-18 serum
MMDT	r	0,102	0,481
	p*	0,717	0,037

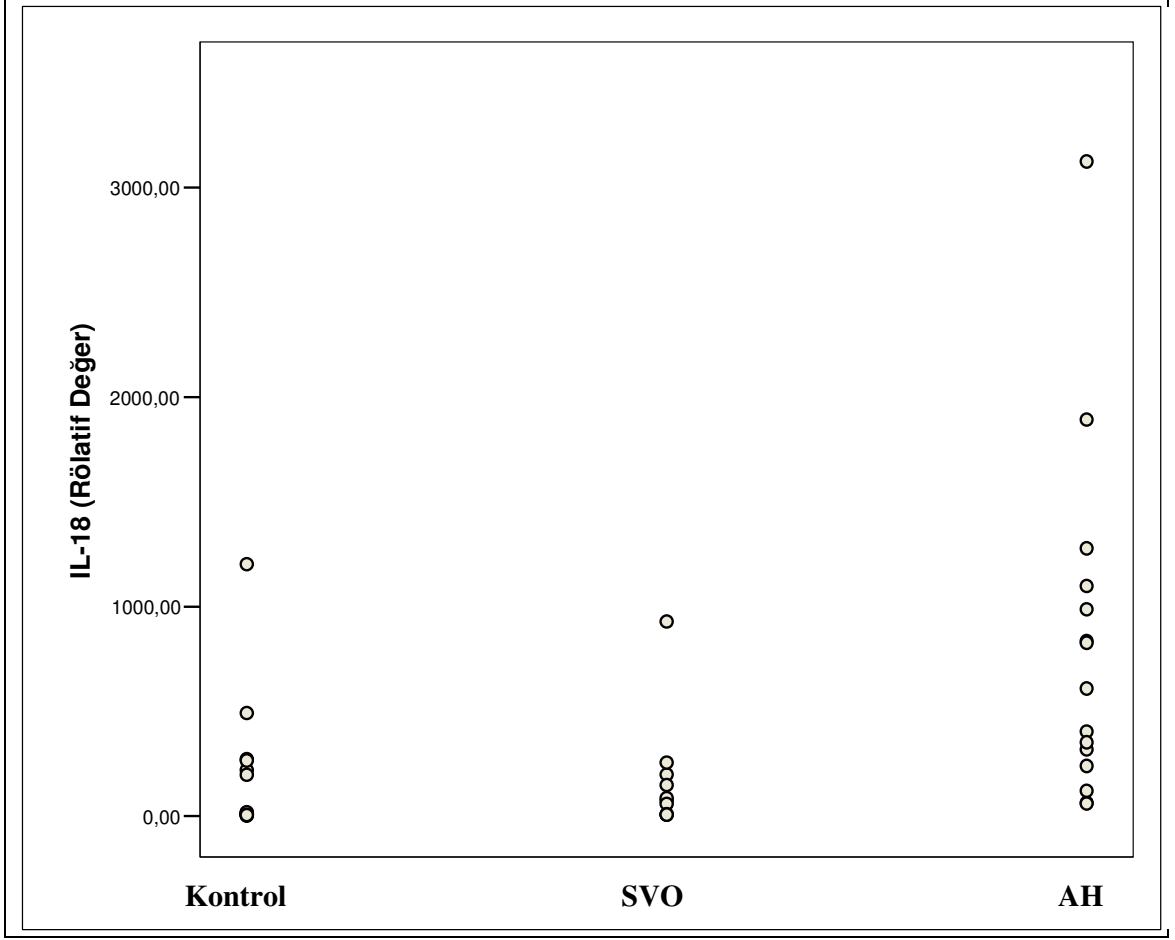
		IL-18 Gen ekspresyonu	IL-18 serum
GDÖ	r	-0,316	-0,462
	p*	0,251	0,046

*Spearman's rho

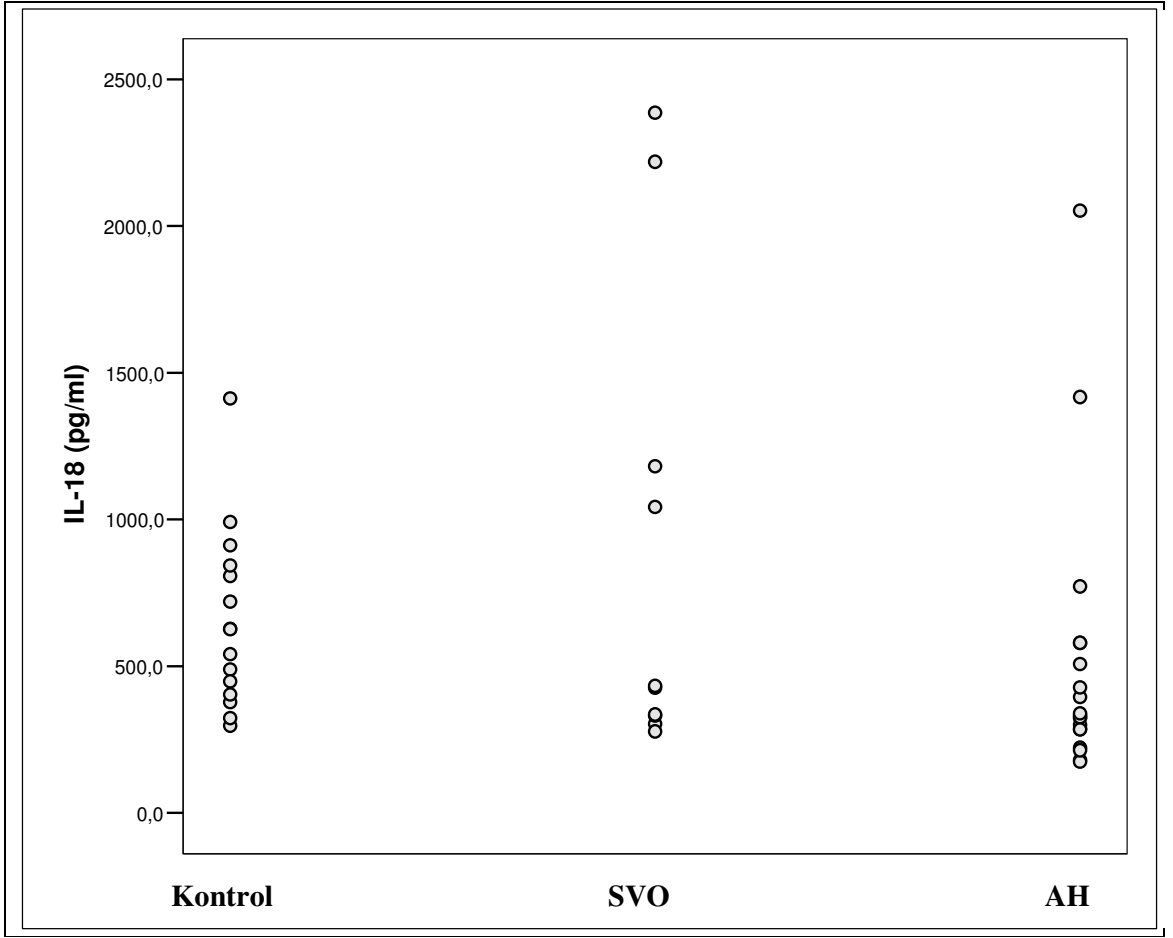


Şekil 1: IL-18 gen ekspresyonu için ROC eğrisi

Klinik tanı esas alınarak IL-18 gen ekspresyonu için ROC eğrisi çizilmiştir. Buna göre IL-18 gen ekspresyonunun Alzheimer hastalarını kontrol ve SVO hastalarından ayırt etme eşik değeri 295.45 (rölatif değer) ve bu değer için duyarlılık %73, özgüllük %88 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2: Kontrol, Alzheimer hastaları ve serebrovasküler olay hastalarının rölatif IL-18 gen ekspresyon değerlerinin grafiği



Şekil 3: Kontrol, Alzheimer hastaları ve serebrovasküler olay hastalarının IL-18 serum değerleri

V. TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları Alzheimer hastalarının lenfositlerinde IL-18 gen ekspresyonunun serebrovasküler olay hastalarına ve kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğunu, buna karşın serum IL-18 seviyelerinin kontrol ve olgular arasında anlamlı farklılığa sahip olmadığını göstermektedir. Alzheimer hastalarının serum IL-18 düzeyleri MMDT testleri ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Literatürde bugüne kadar Alzheimer ve serebrovasküler olay hastalarında IL-18 düzeylerini belirleyen kimi çalışmalar yayınlanmıştır. Lindberg ve ark. tarafından yayınlanan çalışmada (107) Alzheimer hastaları MMDT skorlarına göre erken evre AH ve ileri safha AH olmak üzere gruplanmıştır. Serum IL-18 düzeyleri kontrol, ileri evre AH'ler ve erken evre AH ları arasında karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Alzheimer hastalarında MMDT skorları ile serum IL-18 düzeyleri arasında korelasyon tespit edilememiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak bizim araştırmamızda da serum IL-18 düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir, fakat MMDT skorları ile serum IL-18 düzeyleri pozitif korelasyon göstermektedir. Çalışmamızdaki hasta sayısının (n=19) azlığı ve MMDT skorlarımızdaki (11,7±7,3) standart sapmanın fazlalığı bu farklılığa yol açmış olabilir. Lindberg ve ark. nın çalışmasında MMDT skorları, erken safha Alzheimer hastaları için 25,1±0,47, ileri safha Alzheimer hastaları için ise 8,5±0,91 ve çalışmanın toplam hasta sayısı 32'dir.

Başka bir çalışma Alzheimer ve serebrovasküler olay hastalarında periferik kanlarından izole edilen monosit/makrofaj kültürlerindeki IL-18 gen ekspresyonu düzeylerini incelemiş (108), her iki olgu grubunun da kontrollere göre gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış bulunmuş fakat olgu grupları arasında anlamlı bir farklılık bulamamıştır. Bizim çalışmamızda bu çalışmayla uyumlu olarak Alzheimer hastalarının lenfositlerinde IL-18 gen ekspresyonu incelenmiş ve hastaların gen ekspresyon düzeylerinin kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. İki çalışmada IL-18 gen ekspresyonunda artış düzeylerine tespit etmekle beraber farklılık Di Rosa ve ark. tarafından yapılan çalışmada SVO hastalarında da IL-18 gen ekspresyonunun kontrollere göre anlamlı düzeyde artış göstermesidir. Bu farklılık iki çalışmanın da periferik kandaki hücrelerden gen ekspresyonunu

incelemesine karşın metodolojik olarak çeşitli farklılıklarının bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Lindberg ve ark. çalışmasında periferik kandan monositler izole edilmiş bizim çalışmamızda ise izole edilen hücre topluluğu monositleri içermekle beraber ağırlıklı olarak lenfositlerden oluşmuştur. Ayrıca diğer çalışmada izole edilen hücreler 4 gün boyunca plastik petri kaplarında kültüre edilmiş, yüzeye yapışmış olan monosit/makrofaj hücrelerinden RNA izole edilmiştir. Buna ek olarak diğer çalışmada izole edilen monositler bizim hücre topluluğumuza göre 4 gün kültüre edilmek gibi fazladan işleme tabii tutulmuştur. Hücrelerin *in vitro* da geçirdiği bu süreç, gen ekspresyon profillerinin değişmesine neden olmuş olabilir. Sonuçların farklı olmasına neden olabilecek diğer bir konu da SVO hastalarının özellikleridir. Seçilen hastaların farklı iskemi türlerine (örn. lakunar veya non-lakunar tip) sahip olmaları farklı sonuçlar alınmasına neden olabilir. Fakat, çalışmamızda belirlenen serum IL-18 düzeyleri de gen ekspresyon sonuçlarını desteklemektedir. SVO hastalarının serumlarındaki IL-18 düzeyleri de kontrollere göre anlamlı artış göstermemektedir.

Aynı ekibin yayınladığı diğer bir çalışmada Alzheimer hastaları, serebrovasküler olay hastaları ve kontroller arasında plazma IL-18 düzeylerini incelemiştir (109). AH ve SVO hastalarındaki düzeylerin kontrollere göre anlamlı düzeyde artış gösterdiğini bu artışın AH'lerde SVO'lara göre daha yüksek olduğunu vurgulamaktadır. Çalışmamızda plazma düzeyleri üzerine herhangi bir inceleme yoktur. Sonuçlarımıza baktığımızda aklımıza şu soru gelmektedir "IL-18'in gen ekspresyon düzeyleri artmıştır fakat serum protein düzeyleri artmamıştır, artan gen ekspresyonu neden serumdaki protein miktarına yansımamaktadır?" Plazma düzeylerinde bu artışın gözlenebilmesi serum ve plazma arasında farklılığa neden olan platelet içeriğinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını sorgulatmaktadır. Plazma ile serum arasındaki fark kanın pıhtılaşmasının ardından serumda platelet içeriklerinin de bulunması ve pıhtılaşmada görev alan fibrinojenin ise yer almamasıdır. Plazmada bulunan IL-18 düzeyleri sistemik dolaşımda yer alan, serumda bulunan IL-18 düzeyleri ise total olarak (platelet içeriği de dahil) kanda bulunan IL-18 düzeylerini yansıtmaktadır.

Alzheimer hastalarında platelet aktivasyonunu belirlemek için yapılan bir çalışmada (110) platelet aktivasyon belirteci olan 11-dehydro-TXB2 düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmanın sonuçları Alzheimer hastalarındaki platelet aktivasyonunun kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir. HIV enfekte AIDS hastalarında plazma IL-18 seviyelerini ve

yine platelet aktivasyonu belirteci olan glikoprotein V düzeyleri tespit edilmiştir (111). AIDS hastalarında da Alzheimer hastalarındaki gibi platelet aktivasyon düzeyinin kontrollere göre yüksek olduğu ve sGPV düzeyinin IL-18 düzeyi ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Aynı makalede “4th Annual Conference of Federation of Clinical Immunology Societies” konferansında sunulan, insan vücudunda temel IL-18 deposunun plateletler olduğu” nu belirten bir sunumu referans göstermektedir (112). Bu durumda Alzheimer hastalarında total IL-18 düzeylerinin kontrollerle yakın olmasına rağmen sistemik dolaşımda bulunan IL-18 düzeylerinin, hastalarda görülen yüksek platelet aktivasyonu nedeni ile artmış olduğu düşünülebilir. Artan IL-18 salınımı monosit ve lenfositleri uyarıp, IL-18 ekspresyonunu indüklüyor, böylece kendi kendini düzenleyen bir sistem olabilir.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

Pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-18'in lenfositlerde ekspresyonunun Alzheimer hastalarında artmış olması hastalıkta görülen A β plaklarına karşı ortaya çıkan immun yanıtın ifadesi olarak değerlendirilebilir. Diğer bir inflamatuvar özellik taşıyan serebrovasküler olay hastalarında anlamlı artışın görülmemesi hastalıkların inflamasyon süreçlerinin farklı yolları uyardığını düşündürülebilir.

1998 yılında Amerika'da AH'da moleküler ve biyokimyasal marker geliştirilmesi konusunda bir grup oluşturulmuştur (113). Bu toplantıda ideal biyomarker şöyle tanımlanmıştır:

1. AH'daki patoloji ile direkt ilgili olacak.
2. Marker hastalığa yakalanma riskinden öte hastalığın göstergesi olacak.
3. Marker hastalığın erken evresinde hatta prelinik dönemde pozitif olacak.
4. Marker hastalığın şiddetini gösterebilecek.
5. Diagnostik özelliği ile birlikte marker hastalığın tedaviye yanıtı konusunda bilgi verebilecek.
6. Nörolojik klinik bulgularla korele olacak.
7. Non-invaziv olacak, ucuz olacak ve tekrar örnek alımına izin verecek.

Çalışmanın başında amaçlanan IL-18 in Alzheimer hastalığında diagnostik bir marker olarak kullanılabilirliğini sınamak için ROC eğrisi analizi yapıldı. Analiz sonucunda IL-18 gen ekspresyonunun Alzheimer hastalarını kontrol ve SVO hastalarından ayırt etme eşik değeri 295.45 (rölatif değer) ve bu değer için duyarlılık %73, özgüllük %88 olarak belirlendi. Bu özgüllük ve duyarlılık değerleri ne yazık ki ancak klinik tanı kriterlerinin düzeylerine ulaşmıştır. Fakat olgu ve kontrol sayılarının arttırılıp, çalışmanın genişletilmesi ile daha kesin sonuçlar alınması gerekmektedir.

Alzheimer hastalığında IL-18 in rol oynadığı bu çalışmayla ve literatürdeki diğer çalışmalarla desteklenmektedir fakat hastalık mekanizmasına nasıl bir katkısının olduğu

henüz tam aydınlatılmış değildir. Özellikle platelet aktivasyonunun hastalıkta IL-18 düzeylerine etkisi henüz araştırılmamıştır. Bundan sonrasında araştırmalarda bu konuya yönelinmesinin periferdeki IL-18 düzeylerinin yüksekliğinin Alzheimer hastalığında nasıl gerçekleştiğinin anlaşılması açısından faydalı olacağı görüşündeyiz.

VII. KAYNAKLAR

1. Öge AE, Nöroloji İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Temel Ve Klinik Bilimler Ders Kitapları Nobel Tıp Kitapevleri 2004;369
2. Jellinger KA, Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a clinicopathological study. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 219–220
3. Folstein MF, Folstein SE, McHaugh GR, Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975;12:189–198
4. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T The Global Deterioration Scale (GDS) for assessment of primary degenerative dementia. *American Journal of Psychiatry* 139:1136-9
5. Lewy-Lahad E and Bird TD. Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 1996; 40:829–840
6. Pastor P, Goate AM. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Curr Psychiatry Rep.* 2004; 6(2):125-33.
7. Tanzi RE, Bertram L. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron.* 2001 25;32(2):181-4
8. Mesulam MM. Davranışsal ve Kognitif Nörolojinin İlkeleri Yelkovan Yayınları 2004 2. Baskı;465
9. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1985; 4245–4249
10. Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rudel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 1994;45:373–379
11. NIA: Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Age* 1997;18:S1-S2
12. Quirion R. Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release. *J Psychiatry Neurosci.* 1993; 18(5):226–234.
13. Lane RM, Kivipelto M, Greig NH. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol.* 2004; 27(3):141–149

14. Lorke DE, Lu G, Cho E, Yew DT. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BMC Neurosci.* 2006 27;7:36.
15. Raskind MA, Peskind ER. Neurobiologic bases of noncognitive behavioral problems in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1994;8 Suppl 3:54-60.
16. Carreiras MC, Marco JL. Recent approaches to novel anti-Alzheimer therapy. *Curr Pharm Des.* 2004;10(25):3167-3175.
17. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1991; 1: 103–116
18. Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the, dr.jekyll and mr. Hyde concept of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroelasticity. *Prog Neurobiol* 2003;71(2-3):83-248
19. Turrigiano GG, Nelson SB. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10 (3):358-364
20. Mattson MP, Chan SL. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci* 2001;17(2):205-224
21. Armstrong DM, Sheffield R, Mishizen-Eberz AJ, Carter TL, Rissman RA, Mizukami K, Ikonomovic MD. Plasticity of glutamate and gaba-a receptors in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* 2003;23(4-5):491-505
22. Deutsch SI, Rosse RB, Lakshman RM. Dysregulation of tau phosphorylation is a hypothesized point of convergence in the pathogenesis of Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and schizophrenia with therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006
23. Novak M. Truncated tau proteins as a new marker for Alzheimer's disease. *Acta Virol* 1994;38(3):173-189
24. Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 2006; 711-730
25. Deleo DA, Tanga FY, Tawfik VL. Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyprelgesia. *Neuroscientist* 2004;1:41-52
26. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:289-305

27. Mrak R, Griffin WST. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 2005;26:349-354
28. Pratico I, Trojanowski JQ. Inflammatory hypotheses: novel mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration and new therapeutic targets? *Neurobiol Aging* 2000;21:441-445
29. Streit WJ, Kincaid-Colton CA. The brains's immune system. *Scientific American* 1995;273:38-43
30. Vilhardt F. Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Bioch Cell Biol* 2005;37:17-21
31. Walsch S, Aisen P. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurotherapeutics* , 2004;4:793-798
32. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive Microgliosis. *Progr Neurobiol* 1999;57:563-581
33. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996;8:312-318
34. Conde JR, Streit WJ. Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65(3):199-203
35. Rozemuller AJ, van Gool WA, Eikelen P. The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: therapeutic implication. 2005;4:223-233
36. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WST. Enlarged phagocytic, but not primed, IL-1 α immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol* 1998;95:229-234
37. Moore AH, O'Banion MK. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Delivery Rev* 2002;54:1627-1656
38. Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* 2004;3(4):169-176
39. Blasko I, Grubeck-Loebenstein B. Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* 2003;20(2):101-113
40. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 1996;716-719

41. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. Glial-neuronal interaction in Alzheimer's disease: progressive association of IL1 alfa + microglia and SIOObeta+astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 285-290.
42. Overmyer M, Helisalmi S, Soininen H, Laakso M, Riekkinen P, Alafuzoff I. Reactive microglia in aging and dementia: an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue. *Acta Neuropathol* 1999; 97: 383-392.
43. Sheffield LG, Marquis JG, Berman NE. Regional distribution of cortical microglia parallels that of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2000; 285: 165-168.
44. Barnum SR. Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6:132-146
45. Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Muller C, Roots B, Ng K. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24 (3): 295-340.
46. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 30 (1): 77-105.
47. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999; 49(6): 377-391.
48. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997; 20 (12): 570--577.
49. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Correlation of astrocytic S 100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55 (3): 273-279.
50. DeWitt DA, Perry G, Cohen M, Doller C, Silver J. Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease *Exp Neurol* 1998;149(2):329-340
51. Shaffer LM, Dority MD, Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Younkin SG, Brunden KR. Amyloid beta protein (A beta) removal by neuroglial cells in culture. *Neurobiol Aging* 1995; 16 (5): 737-745.

52. Barnum SR. Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6:132-146
53. Loeffler DA. Using animal models to determine the significance of complement activation in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2004; 1: 18.
54. Walker DG, McGeer PL. Complement gene expression in human brain: comparison between normal and Alzheimer disease cases. *Brain Res Mol Brain Res* 1992; 14: 109-116.
55. Shen Y, Li R, McGeer EG, McGeer PL. Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain. *Brain Res* 1997; 769: 391-395.
56. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Amer J Pathol* 1999; 154: 927-936.
57. Veerhuis R, Janssen I, Hack CE, Eikelenboom P. Early complement components in Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 53-60.
58. Webster S, Lue L-F, Brachova L, Tenner AJ, McGeer PL, Terai K, Walker DG, Bradt B, Cooper NR, Rogers J. Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 415-421.
59. Bradt BM, Kolb WP, Cooper NR. Complement dependent proinflammatory properties of the Alzheimer's disease beta-peptide. *J Exp Med* 1998;188:431-438
60. Strohmeyer R, Shen Y, Rogers J. Detection of complement alternative pathway mRNA and proteins in the Alzheimer's disease brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 81: 7-18.
61. McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Progr Neuro-Psych Biol Psychiatry* 2003; 27: 741-749.
62. Cacquevel M, Lebeurrier N, Cheenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Vur Drug Targets* 2004;5:529-534
63. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Brit J Pharmac* 2006; J47: 232-240.
64. Nilsson L, Rogers J, Potter H. The essential role of inflammation and induced gene expression in the pathogenic pathway of Alzheimer's disease. *Front Biosci* 1998; 3: 436-446.

65. Lee S, Lin W, Dickson D, Brosnan C, Berman J. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1. *J Immunol* 1993; 150: 2659-2667
66. Ge YW, Lahiri DK. Regulation of promoter activity of the APP gene by cytokines and growth factors: implications in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 2002; 973: 463-467.
67. Lahiri DK, Chen D, Vivien D, Ge YW, Greig NH, Rogers JT. Role of cytokines in the gene expression of amyloid beta-protein precursor: identification of a 5'-UTR-binding nuclear factor and its implications in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2003; 5: 81-90.
68. Venters HD, Dantzer R, Kelley KW. A new concept in neurodegeneration: TNF- α is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci* 2000; 23: 175-180.
69. Ferencik M, Novak M, Rovensky J, Rybar I. Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bratisl Lek Listy* 2001; 102 (3): 123-132.
70. Stellwagen D, Malenka Re. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature* 2006; 440: 1054-1059.
71. Hubka P. Neural network plasticity. BDNF and behavioral interventions in Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy* 2006; 107 (9-10):
72. Small DH. Mechanisms of Synaptic Homeostasis in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2004; 1: 27-32.
73. Vivien D, Bernaudin M, Bnisson A, Divonx D, MacKenzie ET and Nonvelot A. Evidence of type I and type II transforming growth factor beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 1998; 70: 2296-230-4
74. Ebendal T, Bengtsson H, Soderstrom S. Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain. *J Neurosci Res* 1998; 51: 139-146.
75. Wyss-Coray T, Masliah E, Mallory M, McConlogue L, JohnsonWood K, Lin C, Mueke L. Amyloidogenic role of cytokine TGF-beta 1 in transgenic mice and in Alzheimer's disease. *Nature* 1997; 389: 603-606.
76. Van der Wal EA, Gomez-Pinilla F, Cotman CW. Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport* 1993; 4: 69-72.

77. Rainero I, Bo M, Ferrero M, Valfre W, Vaula G, Pinessi L. Association between the interleukin-1 alpha gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 1293-1298
78. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol.* 2003 73;2:213-24
79. Dinarello CA, Fantuzzi G, Interleukin-18 and host defense against infection, *J. Infect. Dis.* 2003;187 (Suppl. 2): S370–S384.
80. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, Hanzawa K, Kumagai K, Okamura H, Takada H. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol.* 2001 167;11:6568-6575.
81. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:423-474.
82. Prinz M. and Hanisch U.K, Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18, *J. Neurochem.* 1999;72: 2215–2218
83. Kanno T, Nagata T, Yamamoto S, Okamura H, Nishizaki T. Interleukin-18 stimulates synaptically released glutamate and enhances postsynaptic AMPA receptor responses in the CA1 region of mouse hippocampal slices, *Brain Res.* 2004;1012:190–193.
84. Suk K, Yeou Kim S, Kim H Regulation of IL-18 production by IFN γ and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF- κ B pathway in the regulatory processes, *Immunol. Lett.* 2001;77:79–85.
85. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB. A role for IL-18 in neutrophil activation, *J. Immunol.* pp. 2001;167:2879–2886
86. Wheeler RD, Brough D, Le Feuvre RA, Takeda K, Iwakura Y, Luheshi GN, Rothwell NJ. Interleukin-18 induces expression and release of cytokines from murine glial cells: interactions with interleukin-1 β , *J. Neurochem.* 2003;85: 1412–1420
87. Furlan R, Filippi M, Bergami A, Rocca MA, Martinelli V, Poliani PL, Grimaldi LM, Desina G, Comi G, Martino G. Peripheral levels of caspase-1 mRNA correlate with disease activity in patients with multiple sclerosis; a preliminary study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1999;67: 785–788

88. Furlan R, Martino G, Galbiati F, Poliani PL, Smiroldo S, Bergami A, Desina G, Comi G, Flavell R, Su MS, Adorini L Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination, *J. Immunol.* 1999;163: 2403–2409
89. Fassbender K, Mielke O, Bertsch T, Muehlhauser F, Hennerici M, Kurimoto M, Rossol S. Interferon-gamma-inducing factor (IL-18) and interferon- γ in inflammatory CNS diseases, *Neurology* 1999;53: 1104–1106
90. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96: 6873–6878.
91. Jander S, Schroeter M, Stoll G. Interleukin-18 expression after focal ischemia of the rat brain: association with the late-stage inflammatory response, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002;22: 62–70.
92. Zaremba J. and Losy J, Interleukin-18 in acute ischaemic stroke patients, *Neurol. Sci.* 2003;24: 117–124
93. Menge T, Jander S, Stoll G Induction of the proinflammatory cytokine interleukin-18 by axonal injury, *J. Neurosci. Res.* 2001;65: 332–339.
94. Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Dinarello CA, Novick D, Rubinstein M, Otto VI, Rancan M, Kossmann T, Redaelli CA, Trentz O, Shohami E, Stahel PF Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002;22: 971–978
95. Schmidt OI, Morganti-Kossmann MC, Heyde CE, Perez D, Yatsiv I, Shohami E, Ertel W, Stahel PF Tumor necrosis factor-mediated inhibition of interleukin-18 in the brain: a clinical and experimental study in head-injured patients and in a murine model of closed head injury, *J. Neuroinflammation.* 2004;1:13
96. Nicoletti F, Di Marco R, Mangano K, Patti F, Reggio E, Nicoletti A, Bendtzen K, Reggio A. Increased serum levels of interleukin-18 in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2001;57(2):342-344.
97. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, Rupprecht HJ; AtheroGene Investigators. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation.* 2002 106(1):24-30.

98. SoRelle R. Interleukin-18 predicts coronary events. *Circulation*. 2003;108(20): 9051-9065.
99. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: a collaborative study of population- based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 2000; 54:S4 –S9.
100. Looi JC, Sachdev PS. Differentiation of vascular dementia from Alzheimer’s disease on neuropsychological tests. *Neurology* 1999; 53:670 – 678.
101. Sharkey J, Kelly JS, Butcher SP, Inflammatory responses to cerebral ischemia, in: G.J. Horst, J. Korf (Eds.), *Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia*, Humana Press, Totowa, NJ, 1997, 235–265.
102. White L, Petrovich H, Hardman J. Cerebrovascular pathology and dementia in autopsied Honolulu-Asia Aging Study participants. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 977:9 – 23.
103. Perry WH, Gordon S, Macrophages and the nervous system, *Int.Rev. Cytol.* 125 (1991) 203-244
104. Niwa K, Kazama K, Younkin L, Younkin SG, Carlson G.A., Iadecola C, Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein, *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.* 283 (2002) 315– 323.
105. Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH, The beta amyloid precursor protein of Alzheimer’s disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity, *J. Neurosci.* 1997; 17: 9407– 9414.
106. Paris D, Quadros A, Humphrey J, Patel N, Crescentini R, Crawford F, Mullan M, Nilvadipine antagonizes both Abeta vasoactivity in isolated arteries, and the reduced cerebral blood flow in APPsw transgenic mice, *Brain Res.* 2004;999:53– 61.
107. Linberg C, Chromek M, Ahrengart L, Brauner A, Schultzgerg M, Garlind A. Soluble interleukin-1 receptor type II, IL-18 and caspase-1 in mild cognitive impairment and severe Alzheimer’s disease. *Neurochemistry International* 2005;46:551-557
108. Di Rosa M, Dell’Ombra N, Zambito AM, Malaguarnera M, Nicoletti F and Malaguarnera L. Chitotriosidase and inflammatory mediator levels in Alzheimer’s disease and cerebrovascular dementia. *Eur Jour Neurosci* 2006;23: 2648-2656

109. Malaguarnera L, Motta M, Di Rosa M, Anzaldi M, Malaguarnera M. Interleukin-18 and transforming growth factor beta 1 plasma levels in Alzheimer's disease and vascular demantia. *Neuropathology* 2006;26: 307-312
110. Ciabattoni G, Porreca E, Di Febbo C, Di Iorio A, Paganelli R, Bucciarelli T et al. Determinants of platelet activation in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2007; 28: 336–342
111. Ahmad R, Ianello A, Samarani S, Morisset R, Toma E, Grosley M and Ahmad A. Contribution of platelet activation to plasma IL-18 concentrations in HIV-infected AIDS patients. *AIDS* 2006;20 (14):1907-1909
112. Ahmad R, Ahmad A. Platelets constitute a major source of IL-18 in human body. Presented at the 12th National Congress of Immunology and the 4th Annual Conference of FOCIS. Montreal, Quebec, Canada, 18-23 July 2004. *Clin Invest Med* 2004;27, Abstract no.3463
113. Klunk WE. Biological markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1998;19(2):145-147.

EK-1: Bilgilendirilmiş Hasta Onam Formu

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU

Alzheimer Hastalığı (AH), ileri yaşta en sık karşımıza çıkan nörolojik bir hastalıktır. Toplumdaki genel ölüm nedenleri sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. Kognitif fonksiyonlarda kayıp ile birlikte bellek bozukluğu en önemli klinik bulgularıdır. Bu bulgulara ileri dönemde fiziksel fonksiyonlarda da kayıp eklenir. AH'nın klinik tanısı demansa yol açabilecek diğer nedenlerin ekarte edilmesi ile yapılmaktadır.

Bu çalışmada, Alzheimer hastalarında hastalığın tanısında ve tedavinin izlenmesinde kullanılacak İnterlökin-18 ve TRAIL düzeyini araştırmayı amaçladık.

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Demans polikliniğinde izlenen, klinik olarak Alzheimer tanısı almış 20 hasta alınacaktır. Hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyette nörolojik bir hastalığı olmayan kişiler ve iskemik serebrovasküler hastalık geçirmiş aynı sayıdaki kişiler ise kontrol grubunu oluşturacaktır. Tüm hasta ve kontrollerden bir kez koldan 25 ml kan örneği alınacaktır. Bu işlemleri Nöroloji Anabilim Dalından Dr. Erdem Yaka gerçekleştirecektir. Bu işlemler sonrasında çok şiddetli olmayan baş ağrısı görülebilir. Bu durumda doktoruna aşağıda belirtilen telefonlardan ulaşabilir ve gerekli tıbbi yardımı alabilirsiniz. Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğu resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı red etme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığına açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

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

Hastanın;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

İmza:

Hasta Yakınının;

Adı:

Soyadı:

Tarih:

İmza

**Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş
Görevlisinin**

Adı:

Soyadı:

Tarih:

İmza:

Araştırma Yapan Araştırmacının

Adı:

Soyadı:

Tel:

Tarih:

İmza:

EK-2: Absolut kuantifikasyon deneyinin reaksiyon safhaları ve program ayarları

<i>Denaturasyon</i>			
Döngü Sayısı	1		
Tip	Regular		
Hedef Sıcaklık	95°C		
Inkubasyon Süresi	10 s		
Sıcaklık geçiş oranı (°C/s)	20		
Aquisition modu	Yok		
<i>Amplifikasyon</i>			
Döngü Sayısı	35		
Tip	Kuantifikasyon		
	Kısım 1	Kısım 2	Kısım 3
Hedef Sıcaklık	95°C	68°C	72°C
Inkubasyon Süresi	10 s	10 s	16 s
Sıcaklık Geçiş Oranı (°C/s)	20	20	20
İkincil hedef Sıcaklık	0	58°C	0
Basamak Büyüklüğü	0	0.5	0
Aquisition mode	Yok	Yok	Tek
<i>Erime Eğrisi</i>			
Döngü Sayısı	1		
Tip	Erime Eğrisi		
	Kısım 1	Kısım 2	Kısım 3
Hedef Sıcaklık	95°C	58°C	95°C
Inkubasyon Süresi	0	10s	0
Sıcaklık Geçiş Oranı (°C/s)	20	20	0.1
İkincil hedef Sıcaklık	0	0	0
Basamak Büyüklüğü	0	0	0
Aquisition mode	Yok	Yok	sürekli

<i>Soğuma</i>	
Döngü Sayısı	1
Tip	Regular
Hedef Sıcaklık	40°C
Inkubasyon Süresi	30 s
Sıcaklık Geçiş Oranı (°C/s)	20
İkincil hedef Sıcaklık	0
Basamak Büyüklüğü	0
Aquisition mode	yok

EK-3: Alzheimer hastalarının verileri

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Eğitim yılı	Hastalık Süresi (yıl)	MMSE	GDS
A1	E	60	15	6	4	6
A2	E	69	11	8	9	5
A3	E	71	11	10	13	5
A4	E	69	10	6	1	6
A5	E	78	11	4	13	5
A6	K	66	8	8	0	6
A7	K	74	5	4	13	5
A8	K	74	5	4	22	3
A9	K	77	11	2	14	5
A10	K	78	0	4	3	6
A11	E	96	11	3	16	5
A12	K	81	0	1,5	14	4
A13	K	74	5	4	5	6
A14	E	72	12	7	5	6
A15	E	60	8	5	11	6
A16	K	75	0	1	16	5
A17	E	86	8	1,5	24	4
A18	K	77	5	1,5	24	4
A19	K	81	5	2	16	4

EK-4: Serebrovasküler Olay Hastalarının Verileri

Hasta No	Cinsiyet	Yas	Hastalık Süresi (Yıl)
C1	E	67	1
C2	K	66	3
C3	E	61	0,5
C4	K	68	5
C5	E	45	0,5
C6	K	68	18
C7	E	64	2
C8	E	49	0,5
C9	K	63	13
C10	E	77	5

EK-5: Kontrol Grubu Verileri

Hasta No	Cinsiyet	Yas
K1	K	66
K2	E	65
K3	K	65
K4	E	98
K5	K	65
K6	E	65
K7	K	65
K8	E	60
K9	E	65
K10	E	80
K11	E	65
K12	K	68
K13	E	68
K14	K	63
K15	E	79