

Erdem YAKA¹
Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ²
Pembe KESKİNOĞLU³
Zahide ÇAVDAR²
Şermin GENÇ²
Kürşad GENÇ²
Leyla İYİLİKÇİ⁴
Görsev Gülmen YENER¹

İletişim (Correspondance)

Dr. Erdem YAKA
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı İZMİR
Tlf: 0232 412 40 51 Fax: 0232 259 05 41

Geliş Tarihi: 30/11/2005
(Received)

Kabul Tarihi: 20/02/2006
(Accepted)

- 1 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı İZMİR
- 2 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) İZMİR
- 3 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı İZMİR
- 4 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı İZMİR

*2005 yılı "EN İYİ ARAŞTIRMA"
yarışmasının kazanan araştırmasıdır.



ARAŞTIRMA

ALZHEİMER HASTALIĞINDA BEYİN OMURİLİK SIVISINDA (BOS) BİYOLOJİK BELİRTEÇLER VE BOS'UN PC12 HÜCRE HATTI CANLILIĞI ÜZERİNE İN VİTRO ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ*

Öz

Giriş: Günümüzde, Alzheimer hastalığının (AH) kesin tanısı ancak post-mortem beyin incelemesi ile konulabilmektedir. Yaşayan bir hastada kesin AH tanısı koyabilecek hiçbir laboratuvar incelemesi yoktur. Bu konuda özelleşmiş merkezlerde, AH tanısı klinik ölçütlerle % 90 doğrulukla konmakla birlikte, her sağlık merkezinde uygulanabilecek, kesin tanı koymayı hedefleyen laboratuvar belirteçlerine ulaşmak için çalışmalar devam etmektedir. Son bilgiler ışığında, duyarlılık ve özgüllükleriyle ön plana çıkan üç BOS belirteci vardır: Amiloid beta ($A\beta$)₁₋₄₀, $A\beta$ ₁₋₄₂ ve fosfo-tau (f-tau).

Amaç: Çalışmamızda bu belirteçlerin olgu ve kontrollerde BOS düzeyleri, ELISA yöntemiyle belirlenmiş, klinik tanı esas alınarak özgüllük ve duyarlılıkları, laboratuvarımız için hesaplanmıştır. Ayrıca, 'Muhtemel Alzheimer hastalığı' (MAH) olgularının BOS'larının PC12 hücre hattına sitotoksik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla hücre hattına AH ve kontrol BOS'larının eklenmesinden sonra, hücre canlılığı, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testiyle değerlendirilmiş ve gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı Demans Polikliniği hastaları arasında seçilmiş 15 Alzheimer hastası ve nörolojik bir sorunu olmayan, herhangi bir cerrahi girişim nedeniyle spinal anestezi uygulanması gereken hastalar arasında seçilmiş 15 kontrol dahil edilmiştir.

Bulgular: Alzheimerli olguların ve kontrollerin BOS belirteçleri ortalamaları karşılaştırıldığında, olguların $A\beta$ ₁₋₄₀ ortalamalarının kontrollerin ortalamalarından anlamlı olarak düşük olduğu ($p=0.014$), f-tau değer ortalamalarının olgularda anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0.04$). Alzheimerli olguların $A\beta$ ₁₋₄₂ ortalamaları ise kontrollerden farklı bulunmamıştır ($p=0.054$). Olgularda, f-tau'nun ayrıca, hastalık süresi ile orta güçlükte pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Spearman Rho=0.575; $p=0.025$). Canlı kalan hücre sayısı ortalamaları değerlendirildiğinde, olguların canlı kalan hücre sayısı ortalamasının da kontrollerden farklı olmadığı izlenmiştir ($p=0.056$).

Sonuç: Alzheimer hastalarının BOS'larındaki koruyucu ve toksik maddelerin araştırılması gereklidir.

Anahtar sözcükler: Alzheimer hastalığı, BOS belirteçleri, Sitotoksinite, PC12 hücre hattı



RESEARCH

BIOCHEMICAL MARKERS IN CEREBROSPINAL FLUID (CSF) AND EVALUATION OF THE EFFECT OF CSF ON PC12 CELL LINE VIABILITY IN ALZHEIMER'S DISEASE

ABSTRACT

Introduction: The definite diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is based on post mortem pathological examination. To date, there is no laboratory test that can discriminate patients with AD from healthy individuals. Although, there is a relatively high accuracy rate of the clinical diagnosis of AD (~%90) in expert research academic centers, the studies which aim to find out pathognomonic laboratory markers available for AD still continue. In the perspective of recent knowledge, there are three cerebrospinal fluid (CSF) markers which have the highest sensitivity and specificity: Beta-amyloid ($A\beta$)₁₋₄₀, $A\beta$ ₁₋₄₂ and phospho-tau (p-tau).

Aims: In this study, concentrations of these markers in CSF were quantified by using ELISA and the sensitivity and specificity for our laboratory were determined. Also, the effects of 'Probable Alzheimer's Disease' (PRAD) patients' CSF on the survival of PC12 cell line were assessed. For that purpose, cell line viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test and the results were compared between groups.

Material and Methods: In the present study, 15 PRAD patients and 15 control subjects were included. PRAD patients were selected from the patients of Dokuz Eylül University Neurology Department Dementia Outpatient Clinic and control subjects were selected from the patients who were undergone epidural anesthesia because of any surgical operation.

Results: There was a significant decrease of $A\beta$ ₁₋₄₀ ($p=0.014$) and increase of p-tau ($p=0.04$) in patients with AD when compared with controls. $A\beta$ ₁₋₄₂ concentration was not significantly different between groups ($p=0.054$). There was a positive correlation between duration of the disease and CSF of p-tau concentration in patients with AD (Spearman Rho=0.575; $p=0.025$). There was no significant difference in cell line viability values between groups ($p=0.056$).

Conclusion: There is an urgent need for an evaluation of protective and toxic substances in the CSF of patients with AD.

Key words: Alzheimer's disease, CSF markers, cytotoxicity, PC12 cell line



GİRİŞ

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

AH'nin tanısı konusunda klinik bulgulara dayanan ölçeklerin kullanımı, %80-90 (3-4) özgüllük ve duyarlılık sağlamaktadır. Kesin tanıyı koymayı hedefleyen biyolojik belirteçlerin duyarlılık ve özgüllüğü ancak bu düzeye ulaşmakta ya da biraz geçmektedir. Toplam tau, amiloyid beta ($A\beta$)₁₋₄₀ ve $A\beta$ ₁₋₄₂ gibi bazı ölçeklerin kombine kullanımı (5-7) ya da son olarak bildirilen belirteç olan fosfo-tau (f-tau)'nun tek başına (8-9) kullanımını bu oranları yükseltmektedir. Çalışmamızda klinik ölçeklerle 'Muhtemel Alzheimer hastalığı' (MAH) tanısı almış olgularda biyolojik belirteç olan $A\beta$ ₁₋₄₀, $A\beta$ ₁₋₄₂ ve f-tau BOS düzeylerinin klinik tanıya katkısının incelenmesi ilk amaç olarak belirlenmiştir.

Kesin tanısı histopatolojik kanıtlarla ortaya konan AH'de iki patolojik gösterge olan amiloyid plak (AP) ve nörofibriller yumağın (NFY) nöronal hücrelere toksik etkileri bildirilmiştir (10). Ayrıca, Alzheimer hastalığında beyinde nörotoksik etkili ajanların varlığı bilinse de (6) bu konuda beyin omurilik sıvısı örneklerinin nöronal hücreler üzerine in vitro etkileri net değildir. Alzheimer hastalarının serum IgG örneklerinin sıçanlarda in vivo kolinerjik nöronlara toksik etkisi olduğu bildirilmiştir (11). Ancak beklenenin tersine Alzheimer hastalarının BOS ve beyin örneklerinin in vitro hücre canlılığı üzerine, artırıcı etkisinden söz eden yayın da mevcuttur (12). Bunun dışında diğer nörolojik hastalıklarda da serum/BOS örneklerinin nöron gelişimini ve canlılığını azaltıcı etkisi olduğunu saptayan çalışmalar vardır. Parkinson hastalığında BOS örneklerinin sıçan dopaminerjik nöronlarına (13-14), multipl skleroz idrar örneklerinin in vitro sıçan glia kültürlerine (15-16) ve nöropatisi olan diyabet hasta serum örneklerinin in vitro sıçan arka kök ganglion nöronlarına toksik etkisi (17) bildirilmiştir.

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

AH'de BOS sitotoksitesini araştırırken bu araştırma, ayrıca Ab ₁₋₄₀, Ab ₁₋₄₂ ve f-tau gibi önemli üç belirteçle korelasyonunu inceleyen ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgu ve Kontroller

Karşılaştırmalı olgu serisi çalışması yapılmıştır.

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

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

Araştırmanın Değişkenleri

Demografik değişkenler ve alışkanlıkları:

- **Yaş:** Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- **Cins:** Kadın ve erkek olarak belirtilmiştir.
- **Eğitim yılı:** Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir.
- **Sigara:** Hasta ve/veya yakınlarına ve kontrollere yüz yüze görüşme sırasında sorularak elde edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı zamanki içicilik dikkate alınmıştır.

Bilişsel durum: Mini mental durum testi (MMDT), Global Bozulma Ölçeği (GBÖ) ile değerlendirilmiştir. MMDT skorları 26 ve üstü, işlevselliği tam olan ve GBÖ 1 olan sağlıklı bireyler kontrol grubunu oluşturmuşlardır. MMDT skorları 25 ve altında olan ve GBÖ 4 ile 7 arasında değişen Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)-IV kriterine göre demans ve National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) tanı kriterine göre 'muhtemel AH' tanısını karşılayan olgular AH grubu olarak alınmıştır.

- **BOS belirteçleri:** $A\beta$ ₁₋₄₀, $A\beta$ ₁₋₄₂, f-tau BOS belirteçleri olarak değerlendirilmiştir.

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

Verinin Toplanması ve İşlenmesi

Olgu grubu, 01.06.2004 ve 01.07.2004 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı Demans Polikliniğinde muayene edilen Alzheimer hastaları arasından seçilmiştir. Olgular hafif, orta, ağır evre Alzheimer hastalarıdır. AH grubundaki olgulardan, lomber 4-5 aralığından lateral dekubit pozisyonda toplam 2.5 cc BOS alınmıştır. Biyokimya tüplerine konan BOS'lar, 1000 rpm'de 5 dk. boyunca santifüj edildikten sonra, dipte çökelti halinde olan parçacıklar-



dan arındırılarak derin dondurucuya (-75 °C 'de) kaldırılmıştır. Kontrol grubu nörolojik bir sorunu olmayan, herhangi bir cerrahi girişim nedeniyle spinal anestezi uygulanması gereken hastalar arasından seçilmiştir. Seçilen olgularla yüz yüze görüşme yapıp, onamları yazılı olarak alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik bakıyla demansı olmadığı tespit edilen bireylere MMDT uygulanmıştır. Kontrollerden, 2.5 cc BOS spinal anestezi amacıyla yapılan lomber ponksiyon sırasında Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalında çalışan yardımcı araştırmacı koordinasyonu ile alınmıştır. Örnekler, ameliyathanedan alındıktan hemen sonra laboratuvara götürülerek AH grubundaki olguların BOS'larına uygulanan işlemlerin aynı uygulandıktan sonra derin dondurucuya kaldırılmıştır. Çalışmanın yapıldığı güne kadar tüm örnekler derin dondurucuda korunmuştur.

ELISA Yöntemi

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

PC12 Hücre Kültürü ve İn Vitro Deneyler

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

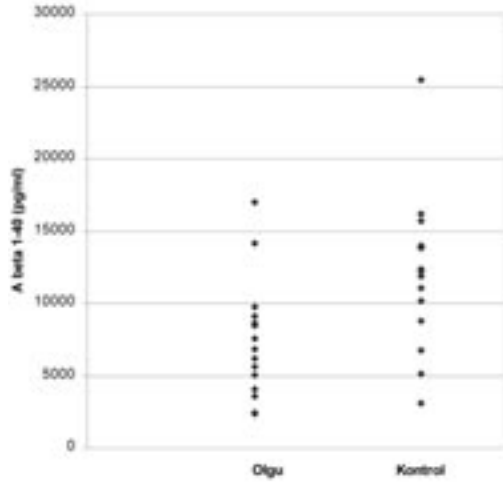
İn vitro deneyler için, 96 kuyucuklu ve PDL ile kaplanmış kültür kaplarına 50 000 hücre/kuyucuk/200 μ l kültür ortamı yoğunluğunda ve %3 oranında serum (%2 at serumu ve %1 fetal inek serumu) içeren kültür ortamı içinde ekilmiş olan PC12 hücreleri kullanıldı. Deneylerde düşük serum içeren kültür ortamına geçilmesinin amacı, hücrelerin deneyler süresince çoğalmasını önlemek ve serumun içerebileceği koruyucu faktörlerin etkisinden kaçınmaktır (18). Deneylerde her bir koşul için en az üçlü eş örnekler çalışılarak deneyler aynı standart koşullarda en az üç kez tekrarlandı. Deney günü BOS örnekleri çözüldükten sonra 56 °C sıcaklıkta 30 dakika süreyle ısıtılarak inaktive edildi. Bu işlemin amacı BOS örneklerinin içerebileceği kompleman faktörlerinin inaktivasyonu yoluyla komplemana bağlı olabilecek hücre ölümü olasılığının dışlanmasıdır. Bu işlemler sonrası hasta ve kontrol BOS örnekleri

96 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 20 μ l hacimde eklendi. Böylece, Alzheimer ve kontrol BOS'unun eklenmediği saf hücre hattı kuyucukları, AH grubunun BOS'larının olduğu kuyucuklar ve kontrol BOS'larının eklenmediği kuyucuklar elde edildi. Kültürler daha sonra karbondioksit enkübatöründe 48 saat süresince enkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi.

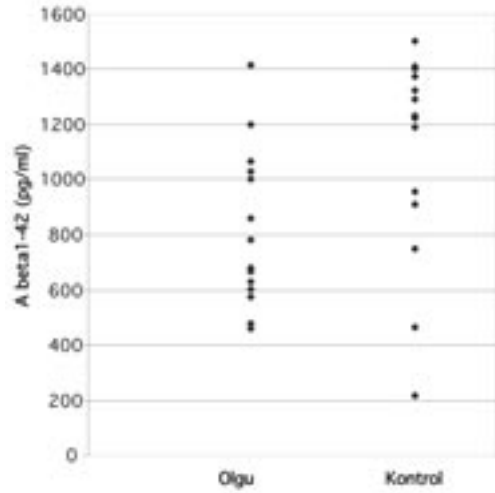
MTT Testi

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (18-19). Bu reaksiyon fragil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla enkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Ayrıntılı deney basamakları şu şekildedir:

1. 100 mg MTT (Sigma) maddesi 10 ml hacimde PBS (Phosphorylated buffer solution- Fosforile edilmiş tampon çözelti) içinde çözülerek %0.5'lik (10 mg/ml konsantrasyonda) stok MTT solüsyonu steril ve karanlık koşullarda hazırlandı. Solüsyon 0.22 mm'lik filtre ile süzülerek debrisis uzaklaştırıldı. Bu solüsyon karanlık ortamda ve 4 °C sıcaklıkta bir ay kadar bir süre saklanabilmektedir.
2. Deneylerde herhangi bir toksik ya da koruyucu ajan eklenmeyen kültür koşulları kontrol olarak kullanıldı. Doksanaltı kuyucuklu kültür plaklarına ekilen ve değişik toksik ve/veya koruyucu ajanların değişik dozlarıyla karşılaştırılan kültürlerle hedeflenen enkübasyon süresinin sonunda 10 ml/kuyucuk hacimde MTT solüsyonu eklendi.
3. Kültür plakları alüminyum folyo ile sarılarak %5 karbondioksitli nemli hava içeren karbondioksit enkübatöründe 37 °C sıcaklıkta 4 saat süreyle tutuldu.
4. Enkübasyon süresinin sonunda faz-kontrast "inverted" mikroskop altında canlı hücrelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu, ölü hücrelerin ise boyanmadığı saptandı.
5. Kültür plağı, plak rotoru kullanılarak 1250 rpm hızda 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelti atıldı.
6. Formazan kristallerini çözünür duruma getirmek için önceden hazırlanmış solubilizasyon solüsyonu 100 ml/kuyucuk hacimde eklendi. Bu solüsyon isopropranolol içinde hazırlanmış 0.04 N HCl solüsyonundan oluşmakta ve oda sıcaklığında saklanmaktadır.



Şekil 1— Olgu ve kontrollerin $A\beta_{1-40}$ değerleri: Olguların $A\beta_{1-40}$ değer ortalamaları 7388.9 ± 4103.9 pg/ml, kontrollerin $A\beta_{1-40}$ değer ortalamaları 12031.5 ± 5297.9 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki $A\beta_{1-40}$ değerlerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0014$).



Şekil 2— Olgu ve kontrollerin $A\beta_{1-42}$ değerleri: Olguların $A\beta_{1-42}$ değer ortalamaları 830 ± 279.7 pg/ml, kontrollerin $A\beta_{1-42}$ değer ortalamaları 1086.6 ± 409.9 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki $A\beta_{1-42}$ değerlerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.054$).

7. Kültür plağı DEÜTF Hematoloji laboratuvarında bulunan ELISA plak okuyucusuna konularak absorbands değerleri 450 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 650 nm dalga boyu kullanıldı. Kontrol ve hasta grubunda canlı oranı absorbands değerleri karşılaştırılarak incelendi.

Veri Çözümlemesi

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

SONUÇLAR

Yukarıdaki olgu ve kontrol tanımlamasına uyacak şekilde 15 olgu, 15 kontrol çalışmaya alınmıştır. Olguların yaş ortalaması 69.7 ± 10.5 , kontrollerin yaş ortalaması 67.3 ± 11.3 bulunmuştur. Yaş ortalamaları arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.63$). Olguların eğitim ortalamaları 7.8 ± 4.7 yıl ve kontrollerin eğitim ortalamaları 7.5 ± 5.9 yıl olarak saptan-

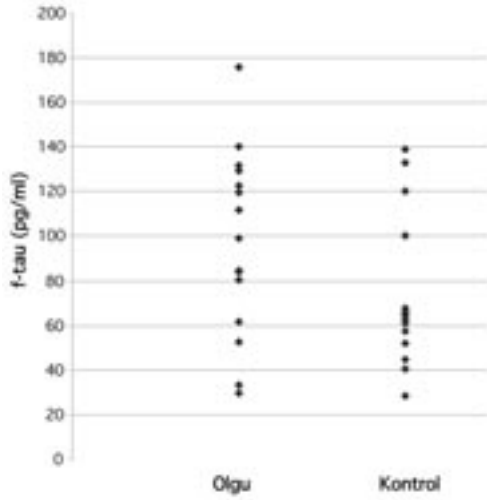
mıştır. Eğitim sürelerinin ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.86$). Olguların hastalık süresi ortalaması 2.67 yıl ($SS=1.76$ yıl) bulunmuştur. Hastalık başlangıç yaşı ortalaması 67.07 ($SS=10.86$) saptanmıştır.

Olgu ve kontrollerin, BOS belirteçleri ve yaş değişkenleri arasında, aynı aynı korelasyonlara bakılmıştır. Her iki grupta da sayı 30'un altında olduğu için Spearman korelasyonu ile birliktelik değerlendirilmiştir. Olgularda, yaş ve $A\beta_{1-40}$ belirteci arasında anlamlı, güçlü, pozitif bir korelasyon saptanmıştır (Spearman $Rho = 0,709$ $p=0,003$). Olgularda, BOS belirteçleri ile hastalık süresi arasında korelasyonlara bakılmıştır. Yalnızca f-tau ve hastalık süresi arasında pozitif, orta düzeyde anlamlı bir birliktelik saptanmıştır (Spearman $Rho = 0,575$ $p=0,025$).

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

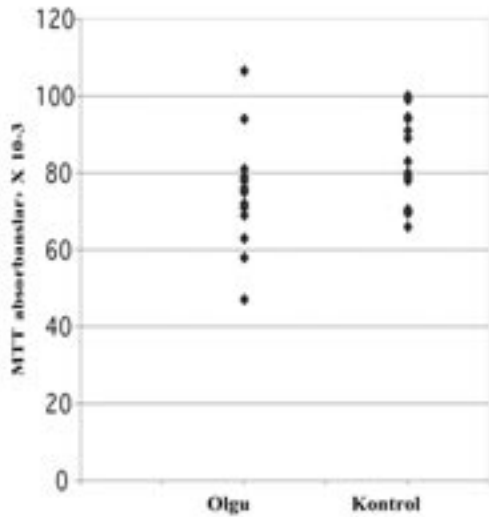
Şekil 2'de olgu ve kontrollerin $A\beta_{1-42}$ değerlerinin dağılımı görülmektedir. Olguların $A\beta_{1-42}$ değer ortalamaları 830 ± 279.7 pg/ml, kontrollerin $A\beta_{1-42}$ değer ortalamaları 1086.6 ± 409.9 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki $A\beta_{1-42}$ değerlerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.054$).

Şekil 3'de olgu ve kontrollerin f-tau değerlerinin dağılımı görülmektedir. Olguların f-tau değer ortalamaları 97.1 ± 41.1 pg/ml, kontrollerin f-tau değer ortalamaları 66.9 ± 30.1 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki f-tau değerlerindeki yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.04$).



Şekil 3— Olgular ve kontrollerin f-tau değerleri: Olguların f-tau değer ortalamaları 97.1 ± 41.1 pg/ml, kontrollerin f-tau değer ortalamaları 66.9 ± 30.1 pg/ml olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki f-tau değerlerindeki yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.04$).

Şekil 4'de olgu ve kontrollerin MTT abzorban ortalamaları görülmektedir. Olguların MTT abzorban değer ortalamaları $74.1 \times (10^{-3}) \pm 13.7 \times (10^{-3})$, kontrollerin abzorban ortalamaları $84.7 \times (10^{-3}) \pm 12.1 \times (10^{-3})$ olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki MTT abzorban değer ortalamalarındaki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.056$).



Şekil 4— Olgular ve kontrollerin MTT abzorban ortalamaları: Olguların MTT abzorban değer ortalamaları $74.1 \times (10^{-3}) \pm 13.7 \times (10^{-3})$, kontrollerin abzorban ortalamaları $84.7 \times (10^{-3}) \pm 12.1 \times (10^{-3})$ olarak hesaplanmıştır. Olgulardaki MTT abzorban değer ortalamalarındaki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.056$).

TARTIŞMA

Günümüzde insanların ortalama yaşam süresinin uzamasına paralel olarak yaşlılarda görülen sağlık sorunlarının prevalansında artış gözlenmektedir. Alzheimer hastalığı da bu sağlık sorunlarından biridir. AH, nörodejeneratif hastalıklar içerisinde en sık görülen (2) ve bir kez kaybedildiği zaman yerine yenisi konamayan beyin hücrelerinin ölümüne neden olan ilerleyici bir hastalıktır (19). Yapılan çalışmalar, klinik bulgular ortaya çıkmadan 15 ile 20 yıl kadar önce nöron yıkımına neden olan patolojik sürecin başlamış olduğunu düşündürmektedir (20-21). AH'de de klinik bulgular saptandığında, bellek işlevinde çok önemli rol oynayan entorinal korteksteki nöronların %50'si kaybedilmiş olmaktadır (22). Bu nedenle AH klinik olarak ortaya çıkmadan önce belirteçlerini saptayıp, patolojiyi gelişmeden durduracak tedaviler geliştirmek gerekmektedir.

Yakın zamanlarda buna ilişkin bir tedavi çabası beta amiloid aşısı olmuş ve yararlı etkileri deneysel olarak gösterilmiştir. Bu aşının immünolojik yönden düzeltilmesi çabalarının önümüzdeki birkaç yılda sonuç vereceği düşünülmektedir (23). Tüm bu çabalar presemptomatik ya da semptomatik olguların belirlenmesine yönelik biyolojik belirteçlerin araştırılmasını haklı kılmaktadır. En iyi belirteçler patolojik süreç ile doğrudan ilişkili olanlar ya da sadece patolojinin sonucu olarak oluşurlardır. Bu çalışmada, mevcut bilgiler ışığında duyarlılık ve özgüllüğü en üst düzeyde olduğu çeşitli çalışmalarda saptanan $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ve f-tau biyolojik belirteç olarak araştırılmıştır.

Bizim çalışmamızda da, Alzheimer grubundaki $A\beta_{1-40}$ değerleri, kontrol grubuna göre, anlamlı oranda düşük bulunmuş ($p=0,014$) (Tablo 1) ve $A\beta_{1-40}$ 'ın önemli bir belirteç olduğunu desteklemiştir. Ayrıca, olguların yaşları ve $A\beta_{1-40}$ belirteç değerleri arasında anlamlı, güçlü, pozitif bir korelasyon saptanmıştır (Spearman Rho = 0,709 $p=0,003$). Bu istatistiksel değer her ne kadar nedenselliği ifade etmese de birlikteliği ortaya koymasından çarpıcıdır.

AH vakalarındaki BOS $A\beta_{1-42}$ değer ortalamaları, kontrol olgularındaki BOS $A\beta_{1-42}$ değer ortalamalarına göre düşük izlenimi vermekle birlikte, aralarında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p=0.054$) (Tablo 1). Aynı şekilde, $A\beta_{1-42}$ 'nin AH'de ve kontrollerde anlamlı fark göstermediğini bulan başka çalışmalar da vardır (24-25). Ancak, hem $A\beta_{1-42}$ hem de $A\beta_{1-40}$ 'ın kontrollerden daha düşük olduğu (25-26) ve $A\beta_{1-42}$ 'nin patogeneze daha yakından ilintili olduğuna ait kanıtlar da vardır (25-27). AH'ye yönelik tanımlanmış en son biyolojik belirteç f-tau proteindir. Fosforile tau proteinin değişik epitoplarını (threonin 181 ve 231, threonin 181, threonin 231, serin 235, serin 199, serin 296 ve 404) saptamak için ELISA yöntemleri geliştirilmiştir (3, 28-30). Bu çalışmaların da dahil olduğu toplam 11 çalışmada 800 Alzheimer hastası, 370 kontrol olgusu çalışılmıştır. Sonuçta f-tau'nun %92 duyarlılık ve %80 özgüllükle AH'yi normal yaşlanmadan ayırt edebildiği



Tablo 1— Olgu ve kontrollerin BOS belirteçleri ve canlı kalan hücre sayısı ortalamalarına göre karşılaştırılması

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

*Mann-Whitney U testi

saptanmıştır. BOS'da f-tau'nun t-tau'nun aksine- iskemik inme ve JCH'de artmadığı gösterilmiştir (31-32). Bizim çalışmamızda duyarlılık ve özgülüğü yüksek olarak düşünülen the-ronin 181'de fosforile olmuş tau kullanılmıştır. Alzheimer hastalarının BOS f-tau değer ortalamaları, kontrol grubunkine oranla anlamlı derecede artmış olarak bulunmuştur (p=0.04) (Tablo 1). Ayrıca, olgularda, BOS belirteçleri ile hastalık süresi arasında korelasyonlara bakıldığında yalnızca f-tau ile hastalık süresi arasında pozitif, orta düzeyde anlamlı bir birliktelik saptanmıştır (Spearman Rho = 0.575 p=0.025). Bu sonuç, hastalık süresi arttıkça f-tau düzeyinin artacağını öngörmekte ve Alzheimer hastalığı ile f-tau düzeyinin yüksekliğinin birlikteliğine işaret etmektedir.

Bu çalışmada ayrıca AH grubundan elde edilen BOS'ların sitotoksik olup olmadığı araştırılmıştır. Daha önce sıçan mezenfalelik hücre kültürlerinde Parkinson hastalarından alınmış BOS örneklerinin, dopaminerjik nöronların fonksiyonlarını ve büyümelerini durdurdukları gösterilmiştir (13). Srinivasan ve ark (17) tip II diabetik nöropatili hastaların serum örneklerinin nöron hücre kültüründe komplemandan bağımsız, kalsiyum bağımlı apoptozis yaptıklarını göstermişlerdir (17). Ayrıca multipl skleroz idrar örneklerinin in vitro sıçan glia kültürlerine toksik etkilerini bildiren çalışmalar da mevcuttur (15, 16).

Pauwels ve ark (12) tarafından yapılan çalışma, 7 Alzheimer hastasının ve 26 sağlıklı kontrolün BOS'u; ayrıca, frontal kortekste NFY tespit edilmiş 2 Alzheimer hastasının ve beyinlerinde NFY olmadığından emin olunan 2 kontrolün otopsi ile alınmış frontal korteks ve hipokampus örnekleri ile yapılmıştır. Bu örneklerin, 17 günlük bir sıçan embriyosunun oksipital korteksinden hazırlanmış hücre kültürü üzerine sitotoksitesine bakılmıştır. Sonuçta, kontrol ve AH grubu hipokampus örneklerinin hücre kültüründe yarattıkları etki arasında bir farklılık saptanmamıştır. Fakat AH grubunun BOS ve frontal korteks örneklerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda hücre canlılığını artırıcı etkileri olduğu tespit edilmiştir (12). Çalışmada, AH örneklerinin nöron koruyucu etkileri, AH'nın beyinlerinde olmayıp, sağlıklı bireylerde olduğu Uchida ve ark'nın (33) yaptığı bir çalışmada gösterilen 'büyüme yokedici faktöre' [(BYF) growth inhibitory factor (GIF)] bağlanmıştır. BYF içeren örneklerin hücre hattında canlılığı azal-

tıcı yönde etki gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Bu protein, sağlıklı insanların beyinlerinde saptanmıştır, fakat AH kortekslerinde BYF-pozitif astrositlerin dramatik olarak azaldıkları tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda, eklediğimiz BOS'ların PC12 hücre hattında ne oranda sitotoksikite yarattığını anlamak için MTT absorbans değerlerine bakıldığında, AH grubunun MTT değer ortalamalarının kontrol grubuna oranla daha düşük olma eğiliminde olmakla beraber, aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (p=0.056) (Tablo 1). Sonuçlarımız Pauwels ve ark'nın (12) yaptıkları çalışmayla uyumsuzdur. Bu durum, iki çalışmadaki olgu-kontrol sayılarındaki farktan ya da çalışmamızdaki hastaların çoğunda asetilkolinesteraz inhibitörü (AEİ) kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak, AEİ kullanımının, Ab (34) ve serbest radikallerle (35) yaratılan PC12 hücre hattındaki hasarlanmayı azaltıcı etkileri olduğunu bildiren çalışmalar vardır. AEİ'nin hücre koruyucu etkisinin gösteren bu çalışmalar, Pauwels ve ark (12) ile bizim çalışmamız arasındaki farkın, ilaç kullanımından bağımsız olduğunu düşündürmüştü, bu iki çalışmada elde edilmiş farklı sonuçları açıklamada yardımcı olmamıştır.

Bütün bu kafa karıştırıcı sonuçlar Alzheimer hastalarının BOS'larında, koruyucu ya da toksik maddelerin araştırılmasını gerektirmektedir. Eğer AH'de BOS'ta sitotoksikiteye ait veri yoksa bu toksik etmenin periferden kaynaklanabileceği de düşünülebilir. Engelhardt ve ark'nın (11) yaptıkları çalışmada Alzheimer hastalarının serumlarından izole ettikleri IgG'nin sıçan beyinlerindeki kolinerjik nöronları harap ettiklerini göstermiş olmaları, BOS dışında nörotoksik etken taşıyan vücut elemanları olabileceği görüşünü destekler niteliktedir. Bu çalışmaya dayanarak, koruyucu ve/veya toksik etkenlerin ortaya konması için, BOS'un yanı sıra, Alzheimer hastalarının serum ve idrar örneklerinin de hücre hattına toksik etkilerini araştıran çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

TEŞEKKÜR

Projemiz Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Desteği ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB)'nda gerçekleştirilmiştir.



KAYNAKLAR

1. Öge AE, Nöroloji. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi temel ve klinik bilimler ders kitapları, Nobel Tıp Kitabevleri 2004; pp 369.
2. Davis KL, Hachoutarian V. Strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 43 (Suppl 4): 52-55.
3. Galasko D, Hansen LA, Katzman R, Wiederholt W, Masliah H, Terry R, et al. Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch Neurol* 1994; 51 (9): 888-895.
4. Jellinger KA. Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a clinicopathological study. *Acta Neuropathol* 1996; 91 (2): 219-220.
5. Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, et al. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta 42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 1998; 55 (7): 937-945.
6. Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid (1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 1999; 52 (8): 1555-1562.
7. Shoji M, Matsubara E, Kanai M, Watanabe M, Nakamura T, Tomikodoro Y, et al. Combination assay of CSF tau, A beta 1-40 and A beta 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1998; 158 (2): 134-140.
8. Sjogren M, Davidsson P, Tullberg M, Minthon L, Wallin A, Wikkelso C, et al. Both total and phosphorylated tau are increased in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 70 (5): 624-630.
9. Kolnen R, Buerger K, Zinkowski R, Miller C, Kerkman D, DeBernardis J, et al. Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*. 2000; 287 (3): 187-190.
10. Clark CM, Xie S, Chittams J, Ewbank D, Peskind E, Galasko D, et al. Cerebrospinal fluid Tau and β -Amyloid. How well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol* 2003; 60 (12): 1696-1702.
11. Engelhardt JI, Le WD, Siklos L, Obal I, Boda K, Appel SH. Stereotoxic injection of IgG from patients with Alzheimer disease initiates injury of cholinergic neurons of the basal forebrain. *Arch Neurol* 2000; 57 (5): 681-685.
12. Pauwels PJ, Van Assouw HP, De Ryck M, Laysen JE, Dom R, Van Gool D. Towards an improved survival of rat brain neurons in culture by cerebrospinal fluid of patients with senile dementia of Alzheimer's type. *Brain Res*. 1993; 610 (1): 8-15.
13. Hao R, Norgen RB Jr, Lau YS, Pfeiffer RF. Cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients inhibits the growth and function of dopaminergic neurons in culture. *Neurology* 1995; 45 (1): 138-142.
14. Yu SJ, Lo ES, Cochran EJ, Lin DH, Faselis CJ, Klawans HL, Carvey PM. Cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease alters the survival of dopamine neurons in mesencephalic culture. *Exp Neurol* 1994; 126 (1): 15-24.
15. Micoud F, Mandrand B, Malcus-Vocanson C. Comparison of several techniques for the detection of apoptotic in vitro. *Cell Prolif* 2001; 34 (2): 99-113.
16. Malcus-Vocanson C, Giraud P, Broussole E, Perron H, Mandrand B, Ghazot G. A urinary marker for multiple sclerosis *Lancet* 1998; 351 (9112): 1330.
17. Srinivasan S, Stevens MJ, Sheng H, Hall KE, Wiley JW. Serum from patients with type 2 diabetes with neuropathy induces complement-independent, calcium-dependent apoptosis in cultured neuronal cells. 1998; 102 (7): 1454-1462.
18. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahbaubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In "Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death", LM Schwartz and BA Osborne (eds.), 1995;150-181, Academic Press, San Diego.
19. Scinto LF, Daffner KR. Early diagnosis of Alzheimer's disease. *Humana press* 2000; pp 31.
20. Ulrich J. Alzheimer changes in nondemented patients younger than 65: possible early stages of Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer's type. *Ann. Neurol*. 1985; 17 (3): 273-277.
21. Johansson K, Bogdanovic N, Kalimo H, Winblad B, Viitatenen M. Alzheimer's disease and apolipoprotein E4 allele in older drivers who died in automobile accidents. *Lancet* 1997; 349 (9059): 1143-1144.
22. Gomez-Isla T, Price JL, McKeel Jr DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1996; 16 (14): 4491-4500.
23. Schenk D. Hopes remain for Alzheimer's vaccine. *Nature* 2004; 431 (7007): 398.
24. Kanai M, Matsubara E, Isoe K, Urakami K, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{18-42(43)}$ in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol* 1998; 44 (1): 17-26.
25. Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, et al. Cerebrospinal fluid $A\beta_{1-40}$ in Alzheimer's disease. Differences between early and late onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol* 1999; 56 (6): 673-680.
26. Tapiola T, Pirtila T, Mikkonen M, Mehta PD, Alafuzoff I, Kovisto K, et al. Three year follow up of cerebrospinal fluid tau, β -amyloid 42 and 40 concentrations in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2000; 280 (2): 119-122.
27. Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2003; 2 (10): 605-613.
28. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Pere B, Sjogren M, et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 2000; 285 (1): 49-52.
29. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, Yamaguchi H, Urakami K, Park JM, et al. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270 (2): 91-94.
30. Hu Y, He SS, Wang X, Duan QH, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, et al. Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Pathol* 2002; 160 (4): 1269-1278.
31. Riemenschneider M, Wagenpfeil S, Vanderstichele H, Otto M, Wiltfang J, Kretschmar H, et al. Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Mol Psychiatry* 2003; 8 (3): 343-347.
32. Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Arai H, DeBernardis J, Kerkman D, et al., Differentiation of geriatric major depression from Alzheimer's disease with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231. *Am J Psychiatry* 2003; 160 (2): 376-379.
33. Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomanaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991; 7 (2): 337-347.
34. Zhou J, Fu Y, Tang XC. Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett*. 2001; 306 (1-2): 53-56.
35. Svensson AL, Nordberg A. Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of A beta (25-35) in rat PC12 cells. *Neuroreport*. 1998; 9(7): 1519-1522.