



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

Alzheimer Hastalığı'nda Erken Teşhis için Biyobelirteçler

**Dr. Gözde CEYLAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin VURAL**

İstanbul 2024



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

Alzheimer Hastalığı'nda Erken Teşhis için Biyobelirteçler

**Dr. Gözde CEYLAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin VURAL**

İstanbul 2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezi çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Gözde CEYLAN

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2023-39857).

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılması aşamalarında beni daima destekleyen, beraber çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum değerli tez danışmanım Prof. Dr. Pervin Vural'a,

Tez çalışmam ve asistanlık eğitimim süresince benden ilgi ve yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Semra Doğru Abbasoğlu ve Prof. Dr. Canan Küçükgergin'e,

Asistanlık eğitimimiz boyunca bu güzel ve huzurlu ortamda çalışmamızı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Seldağ Bekpınar'a,

Akademik kimliğinin yanı sıra insan ilişkileri ve liderlik vasıflarıyla örnek olan Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvar sorumlularımız Prof. Dr. Beyhan Ömer ve Doç. Dr. Fatih Aydın 'a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli hocalarıma,

Tez çalışmamın klinik ayağını yöneten ve hasta toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalından Dr. Nazan Karagöz Sakallı ve Biyokimya Anabilim Dalından Dr. Hacer Eroğlu İçli'ye,

Birlikte güzel günler geçirdiğim, beraber çalışmaktan keyif aldığım ve değerli dostluklar edindiğim tüm asistan arkadaşlarıma,

Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarı, Endokrin Laboratuvarı ve Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına,

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bana daima destek olan ve kararlarıma saygı duyan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Gözde Ceylan
İstanbul, 2024

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	II
ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	7
2.1.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi.....	7
2.1.2. Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi.....	8
2.1.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi	9
2.1.3.1. Amiloid Plaklar.....	9
2.1.3.2. Nörofibriler Yumaklar.....	11
2.1.4. Alzheimer Hastalığının Evreleri ve Klinik Özellikleri.....	12
2.1.5. Alzheimer Hastalığının Tanı Kriterleri.....	13
2.2. Alzheimer Hastalığı Sıvı Biyobelirteçleri.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Etik İzin.....	24
3.2. Örneklem Seçimi ve Araştırmaya Alım Ölçütleri.....	24
3.3. Araştırmada Kullanılan Ölçekler.....	26
3.3.1. Mini-Mental Durum Değerlendirme Testi (MMSE).....	26
3.3.2. Klinik Demans Evreleme Ölçeği (CDR).....	26
3.4. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	27
3.5. Örneklerin Çalışılması.....	27
3.6. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Cihaz Listesi.....	29
3.7. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Çalışma gruplarının tanımlayıcı özellikleri.....	31
4.2. Serum glikoz düzeyleri ve lipid paneli.....	32

4.3. Serum total tau, NFL, nörogranin, YKL-40, oreksin, FABP-3 ve idrar 8-OHdG düzeyleri.....	33
4.4. ROC eğrileri.....	36
4.5. Korelasyon analizleri.....	38
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ.....	49
7. KAYNAKLAR.....	50
EKLER	59



TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1: Sıvı biyobelirteç adayları

Tablo 2: Çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan dışlama kriterleri

Tablo 3: Kullanılan malzemeler

Tablo 4: Kullanılan cihazlar

Tablo 5: Kontrol ve hasta grubunun tanımlayıcı özellikleri

Tablo 6: Alzheimer Hastalığı'nda (AH) ve kontrol grubunda serum glikoz ve lipid paneli

Tablo 7: Alzheimer Hastalığı'nda (AH) ve kontrol grubunda serum total tau, NFL, nörogranin, YKL-40, oreksin, FABP-3 ve idrar 8-OHdG düzeyleri

Tablo 8: Serum glikoz, total kolesterol, trigliserid ve lipoprotein düzeyleri arasındaki korelasyonlar

Tablo 9: Serum total tau, NFL ve oreksin düzeyleri ile total kolesterol, trigliserid ve lipoprotein düzeyleri arasındaki korelasyonlar

Şekil 1: APP'nin sekretaz enzimleriyle işlenmesi sonucu amiloid plak oluşumu

Şekil 2: Nörofibriler yumak oluşumu

Şekil 3: Alzheimer hastalığındaki patofizyolojik süreç

Şekil 4: a) Total tau, b) NFL, c) Oreksin dağılım grafiği

Şekil 5: a) Nörogranin, b) YKL-40, c) FABP-3, d) 8-OHdG/Cr dağılım grafiği

Şekil 6: Alzheimer hastaları ve kontrol grubunu ayırt etmek için total tau, NFL, oreksinin performansını gösteren ROC eğrisi

Şekil 7: A) Total tau ve NFL'nin birleştirilmiş ROC eğrisi, B) Total tau ve oreksinin birleştirilmiş ROC eğrisi

Şekil 8: Spearman korelasyon analizi

Şekil 9: A) MMSE ve NFL, B) MMSE ve Oreksin, C) KTS ve Total tau, D) KTS ve NFL, E) KTS ve Oreksin korelasyonları

Şekil 10: A) Total tau ve NFL, B) Total tau ve oreksin korelasyonları

KISALTMALAR

- α -APPs:** Alfa sekretuar amiloid öncü proteini
A β : Amiloid beta
AGE: İleri glikasyon son ürünleri
AH: Alzheimer hastalığı
AICD: APP intraselüler domain
ApoE: Apolipoprotein E
APP: Amiloid öncü protein
ARA: Araşidonik asit
AUC: Eğri altındaki alan
BACE-1: β -sekretaz enzimi
 β -APPs: Beta sekretuar amiloid öncü proteini
BOS: Beyin omurilik sıvısı
CDR: Klinik demans evreleme ölçeği
ELISA: Enzim işaretli immunosorbent test
FABP-3: Yağ asidi bağlayıcı protein-3
KTS: Kutu toplamları skoru
MAP kinaz: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MAPT: Mikrotübül ilişkili protein tau
MCI: Hafif bilişsel bozukluk
MMSE: Mini-mental durum değerlendirme testi
MRG: Manyetik rezonans görüntüleme
MSS: Merkezi sinir sistemi
NIA-AA: Ulusal Yaşlanma Enstitüsü ve Alzheimer Derneği
NFL: Nörofilament hafif polipeptid
NFY: Nörofibriler yumak
PET: Pozitron emisyon tomografisi
PSEN: Presenilin
ROC: Alıcı çalışma karakteristik eğrisi
ROS: Reaktif oksijen türleri
SPECT: Tek foton emisyon kompüterize tomografi
YKL-40: Kitinaz-3-benzeri protein 1
8- OHdG: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin

ÖZET

Alzheimer Hastalığı'nda Erken Teşhis için Biyobelirteçler

Amaç: Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH), demansın en yaygın görülen nedenidir (%50-75). Günümüzde erken tanı koyabilmek amacıyla AH'nin altında yatan patolojilere yönelik noninvaziv belirteçler araştırılmaktadır. AH patolojisi ile ilişkili belirteçlerden tau ve NFL (nörofilament hafif polipeptid) aksonal nörodejenerasyonu, nörogranin sinaptik nörodejenerasyonu, YKL-40 (kitinaz-3-benzeri protein 1) nöroinflamasyonu, oreksin protein klirens bozukluğunu, FABP-3 (yağ asidi bağlayıcı protein-3) lipid metabolizması bozukluğunu, 8-OHdG (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) ise oksidatif stresi yansıtmaktadır. Bu çalışmada bu belirteçlerle AH riski arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

Yöntem: Çalışmamıza Şubat 2023-Şubat 2024 tarihleri arasında Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Demans Polikliniği'ne başvuran 86 Alzheimer hastası ve 30 sağlıklı birey dahil edildi. Hasta grubunun mini mental durum değerlendirme testi (MMSE) ve klinik demans evreleme ölçeği-kutu toplamaları skoru (CDR-KTS), hasta ve kontrol grubunun serum glikoz ve lipid paneli sonuçları kaydedildi. Serum örneklerinden total tau, NFL, nörogranin, YKL-40, oreksin, FABP-3; idrar örneklerinden ise 8-OHdG ELISA (enzim işaretli immunosorbent test) yöntemi ile çalışıldı.

Bulgular: Klinik demans evreleme ölçeğine göre 86 hastanın 33'ü hafif evre, 29'u orta evre, 24'ü ağır evre şeklinde üç gruba ayrıldı. Hasta ve kontrol grubu yaş ($p=0.377$) ve cinsiyet ($p=0.518$) dağılımı bakımından uyumluydu. Alzheimer hastalarının serumlarında total tau ($p<0.001$), NFL ($p=0.002$) ve oreksin ($p=0.002$) seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek bulundu. Serum glikoz ($p=0.022$), total kolesterol ($p=0.004$) ve LDL ($p=0.005$) değerleri de Alzheimer'lı bireylerde yüksek olarak saptandı. Alzheimer'lı hastaların serumlarında total tau-NFL ve total tau-oreksin biyobelirteçleri ilk kez birlikte değerlendirilerek, oluşturulan ROC eğrilerinin parametreleri güçlendirici etkisi olup olmadığı değerlendirildi. Tek başına serum total tau değerlerinin en yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu gözlemlendi. Oreksin ve NFL'nin total tau ile kombine edildiğinde sensitivite ve spesifitelerinin tek başına olana kıyasla daha yüksek olduğu saptandı.

Sonuç: Bulgularımız AH'nin erken tanısı için total taunun tek başına yeterli olduğu, bununla birlikte total tau-NFL veya total tau-oreksin biyobelirteç kombinasyonlarının da tarama testi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, hasta grubundaki yüksek serum glikoz, total kolesterol ve LDL düzeyleri AH ile metabolik sendrom arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Alzheimer hastalığı, kan biyobelirteçleri, idrar biyobelirteçleri, erken tanı



ABSTRACT

Biomarkers for Alzheimer's Disease Early Diagnosis

Aim: Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder, accounts for the majority of dementia cases (50-75%). Currently, non-invasive markers targeting the underlying pathologies of AD are being investigated for early diagnosis. Among the markers associated with AD pathology, tau and NFL (neurofilament light polypeptide) reflect axonal neurodegeneration, neurogranin reflects synaptic neurodegeneration, YKL-40 (chitinase-3-like protein 1) reflects neuroinflammation, orexin reflects protein clearance dysfunction, FABP-3 (fatty acid binding protein-3) reflects lipid metabolism dysfunction, and 8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) reflects oxidative stress. This study aims to explore the relationship between these markers and the risk of AD.

Methods: Our study included 86 Alzheimer's patients and 30 healthy individuals who applied to the Department of Neurology, Dementia Clinic, Prof. Dr. Mazhar Osman Mental Health and Neurological Disorders Training and Research Hospital, between February 2023 and February 2024. Mini-Mental State Examination (MMSE) and Clinical Dementia Rating Scale-Sum of Boxes (CDR-SB) scores of the patient group, as well as serum glucose and lipid panel results of both patient and control groups, were recorded. Total tau, NFL, neurogranin, YKL-40, orexin, and FABP-3 were analyzed from serum samples, while 8-OHdG was analyzed from urine samples using the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method.

Results: According to the clinical dementia staging scale, the 86 patients were divided into three groups: 33 mild stage, 29 moderate stage, and 24 severe stage. The patient and control groups were comparable in terms of age ($p=0.377$) and gender distribution ($p=0.518$). Levels of total tau ($p<0.001$), NFL ($p=0.002$), and orexin ($p=0.002$) were significantly higher in Alzheimer's patients compared to the control group. Serum glucose ($p=0.022$), total cholesterol ($p=0.004$), and LDL ($p=0.005$) values were also found to be high in individuals with Alzheimer's. The combined evaluation of serum total tau-NFL and total tau-orexin biomarkers for the first time, and assessing whether the parameters of the ROC curves created were reinforcing, showed that serum total tau values alone had the highest sensitivity and specificity. It was observed that when orexin and NFL were combined with total tau, their sensitivity and specificity were higher compared to when they were evaluated alone.

Conclusion: Our findings suggest that total tau alone is sufficient for the early diagnosis of AD; however, combinations of total tau-NFL or total tau-orexin biomarkers could also be used as screening tests. Additionally, the high serum glucose, total cholesterol, and LDL levels in the patient group support the relationship between AD and metabolic syndrome.

Keywords: Alzheimer's disease, blood biomarkers, urine biomarkers, early diagnosis



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), nörodejeneratif hastalıklar arasında demansın en sık (%50-75) görülen nedenidir. Yaşla birlikte görülme olasılığı artar; 65-75 yaş arasındaki kişilerin %3'ünde, 75-84 yaş arasındakilerin %17'sinde ve 84 yaşından daha yaşlı kişilerin %32'sinde hastalık görülür. AH'nin yaşlı nüfusun artmasıyla birlikte ilerleyen dönemde en önemli sağlık problemlerinden biri olması beklenmektedir.

Alzheimer hastalığında histopatolojik olarak senil amiloid plak birikimi, nörofibriler yumak oluşumu; bu bulguların yanında nöron hasarı ve beyin atrofisi gözlenir (2). Oksidatif stres de AH'de önemli rol oynar ve AH'nin patogenezinde çok önemli bir merkezi faktör olarak kabul edilir. Bunların yanı sıra gliosis, nöroinflamasyon, bozulmuş protein klirensi, lipid metabolizması değişiklikleri ve nörotransmitter sistemlerde meydana gelen kayıplar AH nöropatolojisinin bileşenlerini oluşturur.

Klinik olarak AH, hafıza kaybı ve ilerleyici bilişsel gerileme gibi çeşitli özelliklerle tanımlanır. Hafif bilişsel bozukluk (mild cognitive impairment-MCI) ise AH nöropatolojisinin mevcut olduğu fakat hafif hafıza kaybı dışında semptomların henüz ortaya çıkmadığı, bireylerin günlük yaşam aktivitelerini yerine getirebildiği AH'nin prodromal erken evresidir. MCI'lı kişilerin yaklaşık %15'inin her yıl AH'ye ilerlediği tahmin edilmektedir. MCI evresinde AH nöropatolojisine ait değişikliklerden bazıları semptomlar henüz belirgin olmadan tespit edilebilir.

Günümüzde erken tanı koyabilmek amacıyla AH'nin altında yatan patolojiyi yansıtan belirteçler araştırılmaktadır. Bu patolojilerle ilişkili belirteçlerden NFL (nörofilament hafif polipeptid), miyelinli aksonların en bol bulunan bileşenidir. Nörodejenerasyon oluştuğunda hem beyin omurilik sıvısına (BOS) hem de sistemik dolaşıma salınır ve aksonal dejenerasyonu yansıtır. Nörogranin; dendritik dikenlerde bol miktarda bulunan, sinaptik aktivite ve plastisitede rol oynayan postsinaptik bir proteindir ve sinaptik dejenerasyonu yansıtır. YKL-40 (kitinaz-3-benzeri protein 1), aktive makrofajlar ve mikrogliya tarafından salgılanan karbonhidrat bağlayıcı bir proteindir. İnflamasyonun modülasyonunda, astrositlerin migrasyonunda ve dokunun yeniden şekillendirilmesinde görev aldığı düşünülmektedir ve nöroinflamasyonu yansıtır. Oreksin, sirkadiyen ritmi ve fizyolojik homeostazı düzenleyen bir nöropeptiddir ve bozulmuş protein klirensini gösterir. FABP-3 (yağ asidi bağlayıcı protein-3), nöronal sinaps oluşumunda ve hücre içi lipidlerin taşınmasında rol oynar ve lipid metabolizması bozukluğunu gösterir. 8-OHdG (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) ise oksidatif DNA hasarını gösterir.

AH'nın şu an kullanımında olan tanı araçları bilişsel testler, sinir sistemi görüntülemesi ve çeşitli biyobelirteçlerin ölçümüdür. Bilişsel testler AH semptomlarını tespit etmek için kullanılır. Dolayısıyla bu testlerin kullanımı hastalığın presemptomatik evresinde mümkün değildir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) görüntüleme yöntemleri ise amiloid birikimlerini ve metabolik değişiklikleri semptomlar başlamadan önce tespit ederek tanının belirlenmesine ve aynı zamanda hastalığın izlenmesine olanak sağlar. Bu teknikler sayesinde protein birikimi ile ilgili olan tipik lezyonların ve farklı beyin bölgelerinde meydana gelen yapısal değişikliklerin saptanması ve dolayısıyla da tanı konulması kolaylaşır. Bununla birlikte görüntüleme tekniklerinin toplumsal tarama için kullanılması zor ve pahalıdır.

Biyobelirteçler üzerine daha önce yapılan araştırmaların çoğu BOS örnekleri üzerinde yapılmıştır. BOS örnekleri invaziv lomber ponksiyon prosedürü gerektirir ve bu durum enfeksiyon ve baş ağrısı riskine neden olabilir. Kullanılabilecek diğer biyolojik örnekler periferik kan ve idrardır. Kan alınması lomber ponksiyona kıyasla çok daha az invazivdir ve rutin olarak uygulanmaktadır. İdrar örneği ise ürinyasyon sonrası alınabilen noninvaziv bir numunedir. Dolayısıyla, periferik kan ve idrar örneklerinde biyobelirteç ölçümü toplumsal tarama ve hastalığın monitorizasyonu için daha kullanılabilir görünmektedir.

Bu çalışmada Alzheimer hastalarını hafif, orta ve ağır evre olarak sınıflandırıp bu hasta gruplarından ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerinde AH için potansiyel biyobelirteç adayları olan total tau, NFL, nörogranin, YKL-40, oreksin, FABP-3; idrar örneklerinde 8-OHdG düzeylerini ölçmeyi planladık. Amacımız;

- Farklı evredeki Alzheimer hastalarında ve kontrol grubunda çalıştığımız parametrelerin düzeylerini ve aralarındaki korelasyonu incelemek
- Farklı evredeki Alzheimer hastalarında ve kontrol grubunda kan glikoz ve lipid paneli sonuçlarını değerlendirmek ve bu sonuçların Alzheimer hastalığı ile olan ilişkisini incelemek
- Bu parametrelerin AH'nın erken tanısında ve takibinde kullanılma potansiyelini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

Demans; akut bilinç bozukluğu veya deliryum olmadan merkezi sinir sisteminin (MSS) hasarına bağlı olarak meydana gelen, bilişsel yeteneklerde günlük yaşam aktivitelerini engelleyecek düzeyde önemli bir azalma durumunu tanımlayan genel bir kavramdır. Demansın en yaygın görülen nedeni ise Alzheimer hastalığı (AH)'dır. İlk kez 1906 senesinde Alois Alzheimer tarafından keşfedilmiş ve klinik görünümüyle ilişkili nöropatolojik değişiklikleri tanımlanmıştır. AH serebral korteks, hipokampus, ventral striatum ve entorhinal korteks gibi bilişsel fonksiyonları koordine eden bölgelerde geri dönüşümsüz nöron hasarı ve sinaptik kayıplar ile karakterize edilen kompleks bir hastalıktır. Bu hastalarda dil, hafıza, anlama, dikkat, muhakeme gibi bilişsel ve davranışsal işlevlerde ilerleyici bozulma ve nöropsikiyatrik semptomlar görülür. 100 yılı aşkın bir süre önce AH son derece nadir görülen bir patoloji olarak tanımlanırken günümüzde, yaşlı nüfusun artmasıyla birlikte, 21. yüzyılın en önemli tıbbi, sosyal ve ekonomik sorunlarından birine dönüşmüştür.

2.1.1. Alzheimer Hastalığının Epidemiyolojisi

Tüm dünyada 50 milyon civarında demans hastası bulunmaktadır (3). Tahminlere göre bu sayının 2030'da 80 milyona, 2050 yılında ise 150 milyon kişiye ulaşması beklenmektedir (4). Demans tablosunun en sık görülen nedeni ise (%50-75) AH'dir.

İstanbul'da 70 yaş üzerinde 1019 kişinin katıldığı Türkiye Alzheimer Hastalığı Prevalansı çalışmasında AH prevalansının %11 olduğu saptanmıştır (5). 2009 yılında Eskişehir'de yapılan bir çalışmada ise 55 yaş ve üstü kişilerde AH prevalansının %4.6 olduğu saptanmıştır (6). TÜİK'e (Türkiye İstatistik Kurumu) göre 2011 yılında AH sebebiyle ölen yaşlı kişilerin oranı %2.9 iken, 2015 yılında bu oran %4.3'e, 2017 yılında %4.6'ya yükselmiştir. Bu verilere dayanarak günümüzde Alzheimer'lı hasta sayısının 300.000 civarında olduğu tahmin edilmekte ve yaşlanan nüfusun artmasına bağlı olarak önümüzdeki yıllarda bu sayının daha fazla olması beklenmektedir (7).

Alzheimer hastalığı her zaman ilerleyicidir. 65 yaş ve üzerinde AH tanısı alan bir kişinin ortalama yaşam beklentisi yaklaşık 4 ile 8 yıldır. Fakat bazı hastalar, hastalığın ilk belirtilerinden sonra 20 yıla kadar yaşayabilir. Bu hastalarda en sık ölüm nedeni zatürredir (8).

2.1.2. Alzheimer Hastalığının Etiyolojisi

AH'nin gelişiminde genetik risk faktörleriyle birlikte çevresel faktörler de rol oynamaktadır.

AH başlangıç yaşına göre, erken ve geç başlangıçlı; taşınan genlere göre, sporadik ve ailesel olarak sınıflandırılır. Olguların % 90'ında görülen geç başlangıçlı AH, 65 yaş üzerinde başlar ve sporadiktir (9). Olguların %10'unda görülen erken başlangıçlı AH ise 65 yaşından önce başlar. Erken başlangıçlı AH için risk faktörleri; amiloid öncü protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) ve presenilin 2 (PSEN2) genlerindeki otozomal dominant mutasyonlardır (10). Bununla birlikte Down sendromlu (trizomi 21) hastalar, APP geninin üç kopyasını taşıdıkları için AH ile uyumlu bir nöropatoloji geliştirirler.

APP geni, ailesel AH ile bağlantılı genlerden biri olan 21. kromozom üzerinde yer almaktadır. Bu gen üzerinde bilinen 50'den fazla mutasyon vardır ve ailesel Alzheimer olgularının %10'unu oluştururlar. Araştırmalar, bu mutasyonların çoğunun A β (amiloid beta) üretimini ya da A β 42/40 oranını arttırdığını öne sürmektedir (11,12).

PSEN1 ve PSEN2 genleri, APP işlemede rol oynayan γ -sekretaz enzim kompleksinin katalitik bileşenlerini kodlar ve sırasıyla 14 ve 1 numaralı kromozomlarda bulunur (13). PSEN1 geninde 200 civarında mutasyon tanımlanmış ve ailesel erken başlangıçlı Alzheimer olgularının yaklaşık olarak %30-50'sinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür (14). PSEN1 genindeki mutasyonlar A β 42/40 oranını arttırmaktadır (15). Buna karşılık PSEN-2 mutasyonları nadirdir ve A β üretiminde küçük bir rol oynar. Fakat PSEN-2 genindeki herhangi bir mutasyon A β 42/40 oranının ciddi bir şekilde artmasına yol açabilir ve normal PSEN-1 alellerinin varlığında bile ailesel AH'ye neden olabilir (16).

AH riskini arttıran başka bir genetik belirteç olan Apolipoprotein E (ApoE), beta-amiloid proteinine afinitesi olan bir lipid metabolizması düzenleyicisidir ve sinaps yaranmasının onarımında kritik rol oynadığı düşünülmektedir. 19. kromozomda bulunan ApoE geninin kodlama dizisinde değişikliklere neden olan tek nükleotid polimorfizmlerinden dolayı Apo ϵ 2, Apo ϵ 3, Apo ϵ 4 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. APOE geninin izoform ϵ 4'ü, diğer izoformlara göre hem sporadik hem ailesel AH'nin gelişiminde güçlü bir risk faktörüdür; ϵ 2 aleli ise AH üzerine koruyucu etkiye sahiptir (17).

AH için en önemli risk faktörlerinden biri yaştır. Yapılan çalışmalarda AH'nin yaşa göre insidans ve prevalansının 65 yaşından sonra, her 5 yılda bir ikiye katlandığı gösterilmiştir (18). AH cinsiyet bakımından karşılaştırıldığında kadınlarda daha yaygın görülmektedir. Erkeklerde yaşam boyu AH'ye yakalanma riski 1/10 bulunurken kadınlarda bu risk 1/5 olarak

hesaplanmıştır (19). Bu duruma yaşam süresinin kadınlarda daha uzun olması, hormonal değişiklikler ve düşük eğitim düzeyi sebep olabilir.

Yaşlanma ve genetik risk faktörleri tüm AH vakalarını açıklayamaz. Hava kirliliği, beslenme, metaller, enfeksiyonlar gibi çevresel risk faktörleri oksidatif stresi ve inflamasyonu tetikleyebilir ve AH gelişme riskini arttırabilir (20). Depresyon, kafa travması, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalık, sigara ve alkol kullanımı, ileri anne-baba yaşı, ailede demans öyküsü AH riskini arttıran diğer faktörlerdir. Birinci derece akrabalarında Alzheimer hastalığı öyküsü olan kişilerin AH'ye yakalanma riski %10 ile %30 oranında artarken, 2 veya daha fazla kardeşinde geç başlangıçlı AH olan kişilerin bu hastalığa yakalanma riski aile öyküsü olmayanlara göre 3 kat artmaktadır (21).

2.1.3. Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

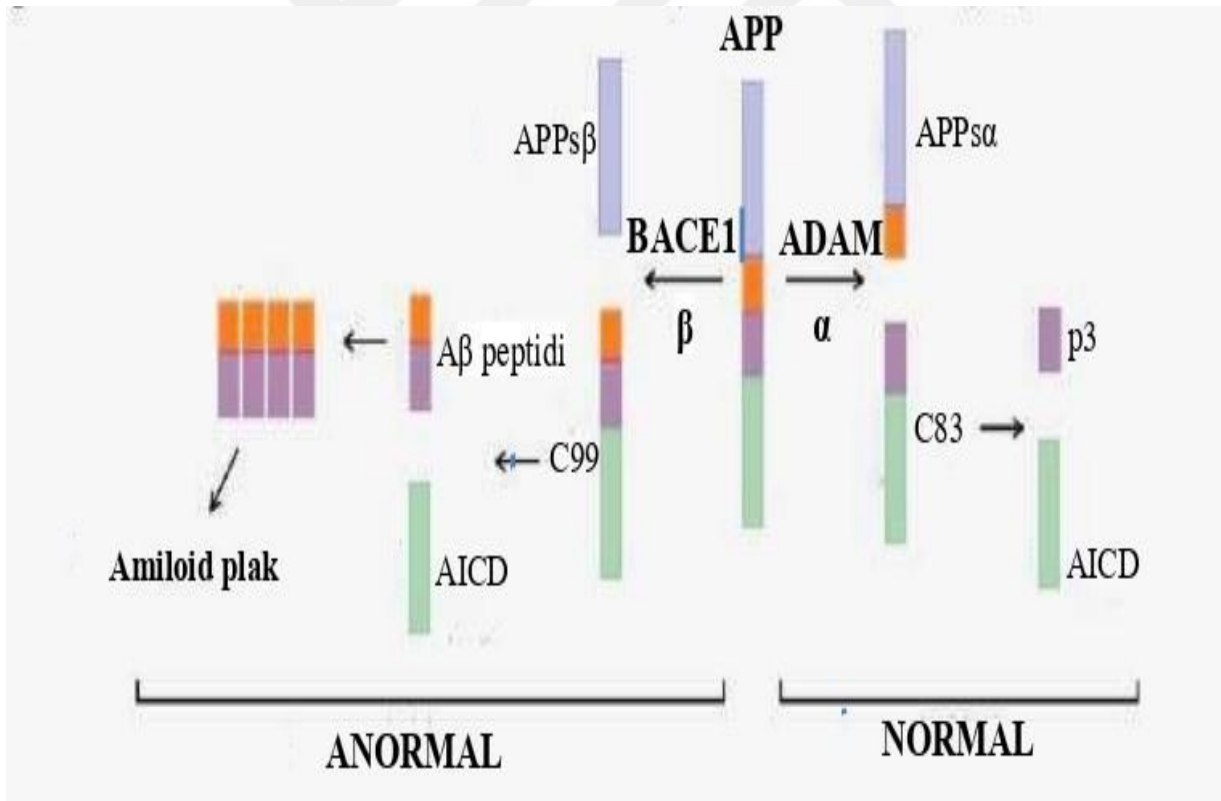
AH, sinaps kaybı ve ardından serebral korteks boyunca nöronların atrofisi ile karakterize edilir (22). Histopatolojik bulguların temelini ekstraselüler yerleşimli amiloid plaklar ve tau protein kümelerinin hücre içinde birikmesiyle oluşan nörofibriler yumaklar oluşturur.

2.1.3.1. Amiloid Plaklar

Amiloid plakların temel bileşeni, APP'nin proteolitik yıkımı ile oluşan amiloid beta (A β) proteinidir. APP ve A β 'nin işlevleri tam olarak bilinmemektedir; fakat nöronal gelişim ve büyüme için sinyal iletiminde görev aldıkları düşünülmektedir (23). A β birikiminin eksitotoksiste, sinaptik bozulma, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stres gibi farklı mekanizmalarla nöron ölümüne neden olduğu öne sürülmüştür. APP'nin yapısında; hücre dışında amino ucu, hücre içinde karboksi ucu ve membran içinde 28 amino asitlik kısım bulunur. A β , APP'nin membran içindeki 28 amino asitlik bölümünü kapsayan parçasıdır.

APP; α , β ve γ sekretaz olmak üzere bir dizi proteolitik enzimle kesilerek işlenir. APP başlangıçta amiloidojenik olmayan yolakta α -sekretaz enzimi aracılığıyla, amiloidojenik yolakta β -sekretaz enzimi (BACE-1) aracılığıyla kesilir. α -sekretaz APP'nin A β bölgesi üzerinde etki göstererek 83 amino asitten oluşan C83 ile alfa sekretuar amiloid öncü proteini (α -APPs) adı verilen ekstraselüler yeni bir proteini meydana getirir. C83 parçası hücre membranında kalırken α -APPs ekstraselüler aralığa salınır. α -APPs nöronal plastisite ve MSS gelişiminde rol oynar; bunun yanında eksitotoksisteye karşı koruyucudur (24). BACE-1 ise APP'nin amino terminali üzerinde etki göstererek 99 amino asitten oluşan C99 ile beta sekretuar

amiloid öncü proteinini (β -APPs) oluşturur. C99 hücre membranında kalırken β -APPs ekstraselüler aralığa salınır. APP genellikle α veya β -sekretaz tarafından bölünür ve bölünme sonucu oluşan küçük parçalar nöronlar üzerinde toksik etki göstermez. γ sekretaz C83 ve C99'u etkiler. C83 segmentinden AICD (APP intraselüler domain) ile toksik olmayan P3 oluşurken; C99 segmentinden AICD ile toksik $A\beta$ proteini oluşur (25) (Şekil 1). Bu proteolitik bölünme ile 38, 40, 42 aminoasit diziliimli $A\beta$ formları üretilir. Bunlar arasında en yaygın bulunan form $A\beta_{40}$ 'tır. $A\beta_{42}$ formu $A\beta_{40}$ 'a kıyasla daha az üretilir; fakat daha çok amiloidojenik olduğu için birikme eğilimi gösterir, yaşın ilerlemesiyle birlikte çökelir ve plak oluşturur. Çok sayıda çalışma bilişsel açıdan herhangi bir hastalığı olmayan yaşlı kişilerin de önemli miktarda $A\beta$ birikimine sahip olabileceğini göstermiştir (26,27). Buna karşın bazı çalışmalar birikimin bilişsel gerileme (28) ve demans şiddeti (29) ile bağıntılı olduğunu bildirmiştir. Yakın dönemde yapılan bir çalışmada $A\beta$ oligomer konsantrasyonundaki farklılıkların AH ile daha iyi bir korelasyon gösterebileceği bildirilmiştir (30).



Şekil 1: APP'nin sekretaz enzimleriyle işlenmesi sonucu amiloid plak oluşumu (Çam'dan, 2019)

A β proteininin AH patogenezindeki rolü amiloid kaskadı hipotezi olarak adlandırılan hipotezde açıklanmaktadır. Bu teori, hastalık sürecinin A β 'nin aşırı üretimi ve amiloid plaklar halinde birikmesiyle başladığını öne sürmektedir. Amiloid plaklar sinaptik ve mitokondriyal hasara yol açarak beyin dokusunun homeostazisini bozar. Bu sürece mikroglia ve astrosit aktivasyonu eşlik eder. Bu durum iltihaplanma ve oksidatif stresle sonuçlanır ve sonunda nöronların ölümüne neden olur. Ayrıca A β 'nin tau proteinlerinin hiperfosforilasyonunu aktive eden bir faktör olduğu düşünülmektedir. Giderek daha fazla sayıda çalışma, amiloid kaskadı hipotezinin AH'nin patogenezinin tam olarak açıklayamadığını göstermiştir. Yakın tarihli bir çalışmada tau proteininin amiloidden bağımsız olarak hafıza ve sinaptik plastisite bozukluklarına yol açabileceği gösterilmiştir (31).

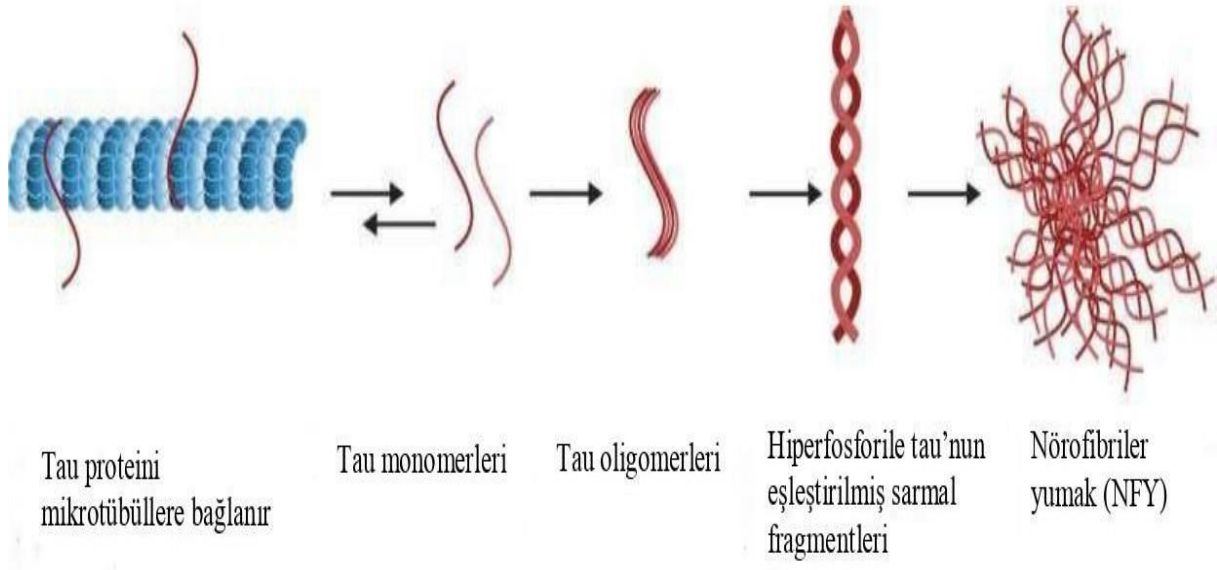
2.1.3.2. Nörofibriler Yumaklar

Tau proteini, MAPT (mikrotübül ilişkili protein tau) geninin bir ürünüdür ve 17. kromozom üzerinde yer alır. Çoğunlukla MSS'de eksprese edilir (32). Bu protein genel olarak nöronların içinde (özellikle mikrotübül açısından zengin aksonlarda) bulunur; daha az miktarda ise glial hücrelerde (astrosit ve oligodentrositler) ve hücre dışı alanda bulunur. Esas olarak hücrenin hücre iskeleti yapılarında, bunun yanında çekirdeklerde ve sentrozomlarda da tanımlanmıştır (33).

Nörofibriler yumaklar (NFY) nöronlarda tau proteini tarafından oluşturulan intrasitoplazmik fibriler yapılardır. Tau proteini mikrotübüllere bağlanarak mikrotübüllerin polimerizasyonu, depolimerizasyonu ve stabilizasyonunda görev alır (34). Nöronal aksonlar boyunca uzanan mikrotübüller hücre içi taşıma için gereklidir.

AH patogenezinde tau proteininin asetilasyon ve fosforilasyon gibi anormal posttranslasyonel modifikasyonları artar ve bu durum tau proteininin mikrotübüllere bağlanma yeteneğini bozar. Mikrotübüllere bağlanamayan fosforilize tau çözünemeyen çift sarmallı filamanlara polimerleşir. Bunlar zaman içinde intranöronal nörofibriler yumak haline gelir (Şekil 2). İlk önce hipokampüste ortaya çıkar sonrasında serebral korteks boyunca görülebilir. Oluşan NFY'ler aksonal iletinin bozulmasına, hücre hasarına ve son olarak nöron ölümüne sebep olur. Yapılan çalışmalarda AH'deki bilişsel kötüleşmenin ciddiyetinin amiloid depozisyonuna göre NFY miktarı ile daha fazla korele olduğu bulunmuştur (35,36).

Tau proteini nöronlardan beyin omurilik sıvısına (BOS) salgılanır, burada kan-beyin bariyerini ve araknoid granülleri geçerek kan dolaşımına geçer, bu nedenle periferik kanda tanımlanabilmektedir (37). Yapılan çalışmalar, total taunun serumdaki konsantrasyonu ile PET taramasıyla değerlendirilen beyin dokusu seviyeleri arasında korelasyon olduğunu göstermektedir (38,39).



Şekil 2: Nörofibriler yumak oluşumu (Sheppard ve Coleman'dan, 2020)

2.1.4. Alzheimer Hastalığının Evreleri ve Klinik Özellikleri

Kişinin normal yaşına ve eğitim düzeyine göre beklenenin ilerisinde olan ancak demans sınırına ulaşmamış bellek bozukluklarına hafif bilişsel bozukluk (mild cognitive impairment-MCI) denir. Bu evrede günlük yaşam aktivitelerinde bozukluk olmaz (40); isimlerin ve eşyaların konulduğu yerin unutulması gibi şikayetler görülür. Bu grup hastaların çoğu uzun dönemde AH'ye ilerler, geri kalan kısmı ise diğer tip demanslara dönüşür ya da aynı seviyede kalır. MCI henüz bir tanı olarak kabul edilmemektedir; fakat hastaların bu evrede saptanması hastalığın ilerlemesini engellemek açısından önemlidir.

AH, klinik açıdan hastada izlediği seyrine göre genel kapsamlı olarak üç evrede sınıflandırılır. Bunlar; hafif, orta ve ağır evrelerdir.

- **Hafif evre**

Hastalarda konsantrasyon ve hafıza kaybıyla birlikte günlük yaşamda sorunlar görülür. Yer ve zaman yöneliminde bozukluk, hesaplamada zorluklar, kelime bulma güçlüğü, soruların veya cümlelerin tekrarlanması, eşyaları kaybetme, aktivite ve hobilere karşı ilginin kaybı görülebilir (41); fakat günlük yaşantıda bariz bir etkilenme yoktur. Bu hastalarda demansla ilişkili davranışsal ve psikiyatrik belirtiler de gelişebilir. Bu belirtiler arasında depresif ruh hali, anksiyete, halüsinasyonlar, şüphecilik ve başıboş gezme bulunabilir. Hastanın hayat kalitesini negatif yönde etkileyen en belirgin faktör depresyondur. Hastalar nöropsikiyatrik hastalık gelişimi açısından sık olarak takip edilmelidir. Bu evre yavaş başlangıç nedeniyle sıklıkla gözden kaçtığından erken teşhis açısından en önemli evredir.

- **Orta evre**

Hastalık serebral korteks bölgelerine yayılır. Bulgular daha belirgin hale gelir. Hastalar ev dışında yalnız başlarına dolaşamazlar. Bu evrede aileyi ve arkadaşları tanımada zorlukla birlikte artan hafıza kaybı, dürtü kontrolü kaybı, yemek yeme ve giyinme gibi özbakımda yardım gereksiniminin artması, okuma-yazma ve konuşma güçlüğü görülür (41). Zaman oryantasyonun bozulması, hava kararınca uyuma isteği başlar. Hastaların sosyal ilişkileri bozulur, agresyon ve paranoid delüzyonlar başlayabilir.

- **Ağır evre**

Hastalık tüm korteks alanına yayılır, ciddi nöritik plak ve nörofibriler yumak birikimi görülür. Hastaların ailelerini hatta aynada kendilerini dahi tanıyamadığı ilerleyici fonksiyonel ve bilişsel kötüleşmenin olduğu bu evrede yürüme güçlüğü, yutma ve idrara çıkma güçlüğü görülür (42). İleri evre Alzheimer hastalarının en sık ölüm sebepleri; beslenme bozuklukları, yatak yarası enfeksiyonları ve akciğer enfeksiyonu/ embolisidir.

2.1.5. Alzheimer Hastalığının Tanı Kriterleri

Demans tanısında klinik semptomlar ve bulgular büyük öneme sahiptir. Mevcut durumda Alzheimer hastalığının klinik tanısını koymayı sağlayan kesin bir kılavuz olmamasına rağmen sıkça kullanılan birçok tanı kriteri bulunmaktadır. Bu çeşitli kriterler arasından en fazla NIA-

AA (Ulusal Yaşlanma Enstitüsü ve Alzheimer Derneği) tanı kriteri kullanılmaktadır. AH tanı kriterlerini belirlemek için bu dernek tarafından görevlendirilen çalışma grubu AH patofizyolojisine ikincil olarak gelişen demans kriterlerine odaklanarak 2011 yılında bir rapor yayınlamıştır (43). Bu raporda prelinik AH, hafif bilişsel bozukluk, tüm nedenlere bağlı demans ve AH'ye bağlı demans kriterleri belirtilmiştir. Bu kriterlerin hem klinik deney çalışmalarında yer alan uzman araştırmacılar hem de gelişmiş görüntüleme yöntemlerine ve BOS ölçümlerine erişimi olmayan genel sağlık hizmeti sunan hekimler tarafından kullanılabilecek kadar esnek olması hedeflenmiştir.

NIA-AA Tanı Kriterleri

- **Prelinik Alzheimer hastalığı**

AH'ye bağlı nöropatolojik değişikliklerin oluşmasına rağmen bilişsel bozukluğun henüz saptanabilecek düzeye erişmediği durumları tanımlamak için kullanılmıştır.

- **Hafif Bilişsel Bozukluk**

Bu tanı aşağıdaki semptomların varlığında konur:

1. Kişinin önceki düzeyiyle karşılaştırıldığında bilişte bir değişiklik olduğuna dair endişe olması
2. Bir veya birden çok bilişsel alanda, hastanın yaşı ve eğitim geçmişine göre beklenenden daha düşük performans görülmesi
3. İşlevsel yetilerde fonksiyonelliğin korunması
4. Bu bilişsel değişikliklerin, sosyal veya mesleki işlevsellikte kayda değer bir bozulma olmayacak kadar hafif olması

- **Tüm Nedenlere Bağlı Demans**

Demans tanısı aşağıdaki bilişsel veya davranışsal semptomların varlığında konur:

1. İş yaparken veya sıradan faaliyetlerde işlevselliğin etkilenmesi
2. Kişinin performans ve işlevsellik düzeyinin önceki durumuna göre azalması
3. Deliryum veya diğer psikiyatrik bozukluklar ile açıklanamaması
4. Bilişsel bozukluğun hastanın kendisi veya yakını tarafından öykü alınması ve yatak

başı mini-mental durum muayenesi ile tespit edilmesi (rutin öykü ve mini-mental durum muayenesinin kesin bir tanı sağlayamadığı durumlarda nöropsikolojik testler yapılmalıdır.)

5. Bilişsel veya davranışsal bozukluk aşağıda bulunan en az iki durumu içermelidir:

- a.** Bilgiyi edinmede ve bilgiyi hatırlama yeteneğinde bozulma (tekrarlayan sorular, etkinliklerin veya randevuların unutulması, tanıdık bir yolda kaybolma)
- b.** Muhakeme yeteneğinde ve karmaşık görevlerin yerine getirilmesinde bozulma (finansmanı yönetememe, karmaşık veya sıralı faaliyetleri planlayamama, zayıf karar verme yeteneği)
- c.** Görsel-uzamsal yetilerde bozulma (basit aletleri kullanamama, yüzleri ve nesneleri tanıyamama, doğrudan görüş alanında yer alan nesneleri bulamama)
- d.** Dil işlevlerinde bozulma (konuşurken kelime bulmada güçlük, konuşma ve yazma bozuklukları)
- e.** Kişilik veya davranış değişiklikleri (ajitasyon, ilgisizlik, empati kaybı, dürtü kaybı, sosyal geri çekilme, hobilere karşı ilginin azalması, tekrarlı veya takıntılı davranışlar gibi spesifik olmayan davranışlar)

• Olası Alzheimer Hastalığı Demansı

Üstte açıklanan demans kriterlerini karşılar ve ayrıca aşağıdaki özellikler bulunur:

- 1.** Sinsi başlangıç
- 2.** Rapor veya gözlemle bilişte kötüleşmenin net olarak bildirilmesi
- 3.** Öykü veya muayenede ilk ve en net bilişsel bozukluğun aşağıda bulunan kategorilerden birinde olduğunun saptanması

a. Bellek bozukluğu: AH demansında en sık görülen sendromik bozukluktur. Bu durum, öğrenme ve yakın zamanda öğrenilen bilgilerin hatırlanmasında bozulmayı içermeli ve beraberinde en az bir bilişsel alanda daha işlev bozukluğunun kanıtını içermelidir.

b. Bellek dışı bozukluk:

- Dil bozukluğu: En belirgin eksiklikler kelime bulmada güçlütür; ancak diğer bilişsel alanlarda da eksiklikler mevcut olmalıdır.
- Görsel-uzamsal bozukluk: En belirgin eksiklikler; nesne agnozisi, bozulmuş yüz tanıma, simultanagnozi ve aleksi dahil olmak üzere uzamsal biliştedir. Diğer bilişsel alanlarda da eksiklikler mevcut olmalıdır.
- Yürütme işlev bozukluğu: En belirgin eksiklikler problem çözme ve

muhakemede bozulmadır. Diğer bilişsel alanlarda da eksiklikler mevcut olmalıdır.

4. Bu tanı aşağıdaki durumlar varlığında konulmamalıdır:

- a.** Bilişsel bozukluğun başlaması veya kötüleşmesiyle ilişkili olan serebrovasküler hastalık veya yaygın enfarktüslerin/ciddi beyaz cevher hiperintensitesi yükünün varlığı
- b.** Lewy cisimcikli demansın belirgin özellikleri
- c.** Frontotemporal demansın belirgin özellikleri
- d.** Primer ilerleyici afazinin belirgin özellikleri
- e.** Eşzamanlı aktif bir nörolojik hastalığa veya nörolojik olmayan tıbbi bir komorbiditeye veya bilişte değişikliğe yol açabilecek ilaç kullanımına dair kanıtlar

• Arttırılmış Kesinlik Düzeyiyle Olası Alzheimer Hastalığı Demansı

Olası AH demansı için ana klinik kriterleri bulunduran kişilerde bilişsel gerilemenin belgelenmesi, durumun aktif gelişen bir patolojik süreci temsil ettiği kesinliğini arttırır. Ancak sürecin AH patofizyolojisi ile ilgili olduğunun kesinliğini arttırmaz. Bilişsel gerilemenin belgelenmesi nöropsikolojik değerlendirme, standart mental durum muayeneleri sonucunda ilerleyici bilişsel gerilemenin kanıtı veya genetik mutasyonun (APP, PSEN1, PSEN2) kanıtı ile olur.

• AH'nin Patofizyolojik Sürecine İlişkin Kanıtlarla Birlikte Olası Alzheimer Hastalığı Demansı

Olası AH demansı için ana klinik kriterleri bulunduran kişilerde biyobelirteçlerin tanı kriterlerine dahil edilmesini kapsar. AH biyobelirteçleri ölçtükleri patolojiye göre iki sınıfa ayrılabilirler. İlki beyin A β protein birikiminin kanıtları; düşük BOS A β 42 seviyeleri ve pozitif PET amiloid görüntüleme sonucudur. İkincisi nöronal dejenerasyon veya yaralanmanın biyolojik belirteçleridir. Bu kategorideki üç ana biyolojik belirteç hem fosforile tau hem total tau olmak üzere yüksek BOS tau, temporo-parietal kortekste PET (pozitron emisyon tomografisi) ölçümlerinde hipoaktivite gözlenmesi ve medial, bazal, lateral temporal lobda ve medial-parietal kortekste MRG'de (manyetik rezonans görüntüleme) atrofi görülmesidir.

Mini-mental durum değerlendirme testleri gibi bilişsel testler tarama için kullanılabilmelerine rağmen sensitivite ve spesifiteleri düşüktür.

MRG, PET ve SPECT (tek foton emisyon kompüterize tomografi) gibi fonksiyonel beyin görüntüleme yöntemleri medial temporal ve parietal lob gibi daha küçük beyin alanlarındaki işlev bozukluğu modellerini haritalamak için kullanılır. Bu çalışmalar erken teşhis ve klinik seyrin izlenmesinde yardımcı olabilir; ancak AH'nin teşhisindeki rolleri henüz tam olarak belirlenmemiştir.

AH'nin tanısının kesin olarak konulabilmesi için biyopsi veya otopsi gerekmektedir. Bu sebeple hastalığın tanısına antemortem dönemde yardımcı olabilecek biyobelirteçler araştırılmaktadır. AH'nin tanısına katkı sağlayacak biyobelirteçler BOS'un zor bir şekilde elde edilmesi nedeniyle hem periferik kan örneklerinde hem de noninvaziv örneklerde çokça araştırılmaktadır. AH tanısında güvenle kullanılabilecek biyobelirteçler bulunursa hastalık erken evrede fark edilebilir ve hastalığın ilerlemesini önlemek mümkün olabilir. Ancak kesin tanıda kullanılacak nöropsikolojik değerlendirme testleri, nörogörüntüleme yöntemleri ve biyobelirteçler için ortak kriterler henüz belirlenemediğinden daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır (44,45).

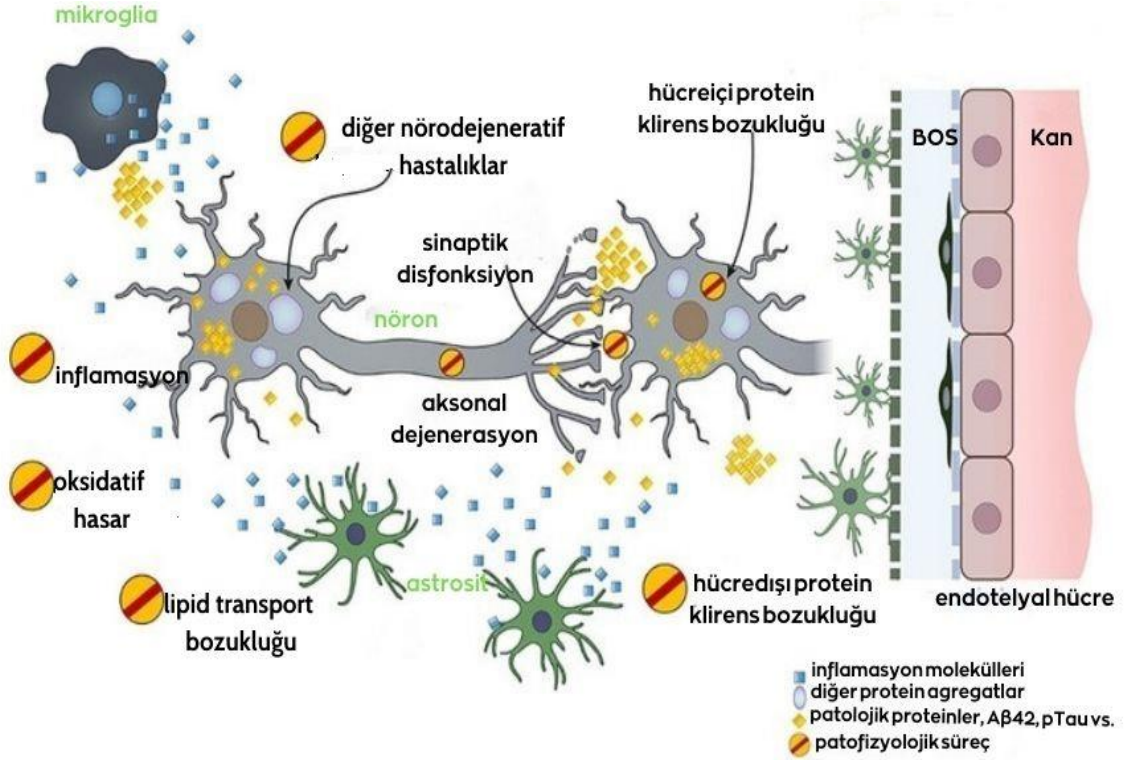
2.2. Alzheimer Hastalığı Sıvı Biyobelirteçleri

Biyobelirteçler; klinik tanıya yön göstermeyi, terapötik müdahaleleri izlemeyi, hastalık riskini ve prognozu değerlendirmeyi sağlayan moleküllerdir. İdeal bir biyobelirteç; noninvaziv, uygun maliyetli, ölçümü kolay ve hızlı, tekrarlanabilirliği yüksek ve benzer koşullar arasında ayırım yapabilme özelliklerine sahip olmalıdır.

AH'nin karmaşık patofizyolojisini açığa çıkarmak için çok sayıda araştırma yapılmasına rağmen altta yatan neden kesin olarak bulunamamıştır. Mevcut durumda hastalığı değiştirici tedaviler bulunmamakla birlikte genellikle semptomatik tedavi uygulanmaktadır. Farmakolojik çalışmalarda eksikliğin sebebi çalışmaların hastalığın ileri evresinde yapılması olabilir. Belirli bir nöropatolojik eşikğin üstünde uygulanan tedavinin hastalık gelişimi üzerinde yeterli etkiye sahip olmayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle hastalık değiştirici tedavilerden güçlü bir yanıt elde etmek için AH'nin erken evrelerini tanımlayabilen biyobelirteçlere acil ihtiyaç vardır.

AH için sıvı biyobelirteç keşfi; hastalık teşhisini öngörmeyi ve zaman içinde hastalığın ilerlemesini takip etmeyi amaçlayan, hızla genişleyen bir araştırma alanıdır. Şu anda BOS'daki A β 42, A β 42/40 oranı, fosforile tau ve total tau düzeyleri AH için en iyi çalışılmış sıvı biyobelirteçlerdir. Ancak son zamanlarda yeni, ucuz, kolay erişilebilir ve minimal invaziv

belirteçlere olan ihtiyaç ortaya çıkmıştır; buna bağlı olarak idrar ve kan bazlı yeni moleküller araştırılmaya başlanmıştır. Bu durum AH'nin tanısında farklı patofizyolojik yolları yansıtan birden fazla biyobelirtecin araştırılması ve kullanılması için güçlü bir gerekçe sağlar (Şekil 3).



Şekil 3: Alzheimer hastalığındaki patofizyolojik süreç (Park ve ark'dan, 2020)

Senil plak ve nörofibriler yumaklara ek olarak, aktif glial hücrelerle çevrelenen distrofik aksonlar ve dendritler Alzheimer'lı hastaların beyinde bol miktarda bulunur ve bunlar doğrudan nörodejenerasyonu ve sinaps kaybını temsil eder. Sinaps kaybı bilişsel işlev bozukluğu ile yakından ilişkilidir (46). Bu nedenle, nörodejenerasyonla ilişkili biyobelirteçler bilişsel durumu yakından gösterebilir.

Nöroinflamasyon MSS'deki mikrogliya ve astrositleri içeren bağışıklık hücrelerinin yanlış uyarılmasıyla tetiklenir. Nöroinflamasyon; MSS hasarının, enfeksiyonun, toksisitenin veya otoimmünitenin bir sonucudur. Nöronal gelişim ve ilgili süreçler için hem olumlu yönde hem de olumsuz yönde etkileri vardır. İnflamatuvar yanıtın geçici aktivasyonu ile sitokinler ve büyüme faktörleri salınır, bu durum doku gelişimini ve yaralanma sonrası iyileşmeyi olumlu yönde etkiler. Bununla birlikte kronik veya kontrolsüz inflamatuvar tepkiler; AH'ye ve diğer nörodejeneratif hastalıklara yol açabilir. Biriken deneysel veriler AH patogenezinde

nöroinflamasyonun aktif rolünü desteklemektedir ve şu anda AH tedavilerinin geliştirilmesinde bir hedef olarak kabul edilmektedir (47). İnflamatuar beyin hücrelerinin aktivasyonunu ve nöroinflamasyonu modüle eden faktörlerin salınımını gösteren çeşitli moleküller potansiyel biyobelirteçler olarak öne sürülmüştür.

Lipid homeostazisi; hücrel membran fonksiyonu, sinaptik bütünlük, nöronal plastisite ve nöronal rejenerasyon dahil olmak üzere beynin fizyolojik işlevlerinde önemlidir (48). AH'de bozulmuş lipid metabolizması, glial hücreler içindeki birçok lipid damlacığına, değişen lipid içeriğine ve dağılımına sebep olmaktadır (49). Lipid metabolizmasında yer alan proteinler AH'de hastalığın takibi ve prognozunu izlenmesi için biyobelirteçler olarak önerilmiştir.

Alzheimer'lı hastaların %90'ından fazlasında geç ve sporadik başlangıç görülür. Genetik mutasyonlu AH'de A β sentezi birincil sorun olsa da sporadik AH'de ana patogeneze bozulmuş protein klirensidir (50). Nöronlardaki ve diğer beyin hücrelerindeki anormal protein yükleri; hücre içi homeostazı korumak için otofaji-lizozomal sistemi, şaperon aracılı otofaji ve ubiquitin-proteozom sistemi tarafından azaltılır. Hücre dışı alanda protein temizliğine ise proteazlar, astrositler ve mikrogliaların fagositozu ve kan-beyin bariyeri yoluyla anormal proteinlerin sistemik dolaşıma aktarımı aracılık eder (51). Otofaji, A β ve tau temizlenmesinde rol oynar. Ubikitin-proteozom sisteminde parçalanacak proteinler, ubiquitin zinciri ile işaretlenip proteozom tarafından tanınan ve daha sonra parçalanan enzimatik süreçten geçer. Proteozomun monomerik proteinleri hedef alması nedeni ile A β plakları ve NFY'leri parçalamadığı düşünülmektedir ve her iki durumun potansiyel olarak proteozom aktivitesini inhibe edebileceği gösterilmiştir. Bu durum yanlış katlanmış proteinlerin sinapslarda toksik olarak birikmesine yol açabilir. Protein bozunma mekanizmasıyla ilişkili proteinlerin kontrol edilmesi, anormal protein birikiminin neden olduğu hastalık durumu hakkında bilgi sağlayabilir.

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidan mekanizma arasındaki dengenin bozulmasıyla karakterize olup; protein ve DNA oksidasyonuna, lipid peroksidasyonuna, glikoksidasyona ve değişen glikoz metabolizmasına yol açar (52). Beynin yüksek oranda oksijen tüketmesi, kolayca oksitlenebilen lipidlerden oluşması ve diğer organlara nazaran daha az antioksidan molekül içermesi nedeniyle oksidatif hasara sık maruz kaldığı düşünülmektedir (53). Oksidatif stresin BACE-1 aktivitesini etkilediği bilinmektedir; bu durum A β üretimini değiştirir. Birçok çalışma, oksidatif stresin erken beyin değişikliklerine neden olabileceğini bildirmiş ve bu nedenle AH dahil birçok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde oksidatif hasarın merkezi bir rol oynadığını öne sürmüştür (54,55).

AH'nin gelişimi ve ilerlemesi sırasında vücut sıvılarında değişen ekspresyon sergileyen proteinler hastalık izleme biyobelirteçleri olarak değerlidir (Tablo 1).

Tablo 1: Sıvı biyobelirteç adayları

Nörodejenerasyon	Nöroinflamasyon	Protein klirens bozukluğu	Lipid metabolizması bozukluğu	Oksidatif stres
Nörofilament hafif polipeptid (NFL)	Kitinaz-3-benzeri protein 1 (YKL-40)	Oreksin	Yağ asidi bağlayıcı protein-3 (FABP-3)	8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG)
Nörogranin	İnterselüler adezyon molekülü 1	Klusterin	Apolipoprotein E (ApoE)	Psödoüridin
Nörofascin	sTREM2	Transtiretin		3-Metilüridin
Miyelin basic protein	β 2 mikroglobulin			N2-Dimetilguanozin
Nöronal pentraksin 1	Progranülin			İzoprostan 8,12-iso-IPF 2alfa
Kontaktin-2	Osteopontin			
Kromogranin A				
Sekretogranin-2				
Sinaptozomal ilişkili protein 25				
Visinin benzeri protein 1				

BOS'un beynin interstisyel sıvısı ile ilişkisi sürekli ve beyindeki kimyasal değişiklikleri doğrudan yansıtır. AH'nin teşhisi veya izlenmesi için değerli olduğu kanıtlanmış çoğu sıvı biyobelirteç BOS'da ölçülmüştür. Ancak BOS elde etmek için gerekli olan lomber ponksiyon tecrübeli personel gerektirir, zaman alıcıdır ve bazen işlem sonrası enfeksiyon, baş ağrısı gibi riskler görülebilir (56). Bunun yanında seçilmiş düşük miktarlardaki beyin proteinleri kan-beyin engelini geçerek kan dolaşımına ulaşabilir. Bu nedenle, yalnızca beyinden veya sistemik patolojilerden türetilen spesifik maddelerin kanda tespiti mümkündür (57). Periferik kandaki nörodejeneratif biyobelirteçlerin araştırılması için kan daha karmaşık bir matris olmasına rağmen erişilebilirliği, çalışmayı ve doğrulamayı kolaylaştırmaktadır. Bu anlamda

periferik kan AH gelişimini ve ilerlemesini izlemenin daha az invaziv bir yolunu temsil eder. Kan bazlı biyobelirteçler, AH'deki hastalık süreçlerinin etkin bir şekilde izlenmesine olanak sağlayabilir ve birinci basamakta bir tarama aracı olarak kullanılabilir.

• Nörofilament hafif polipeptid (NFL)

Nörofilamentlerin aksonların radyal büyümesi ile stabilizasyonunda kritik öneme sahip oldukları böylece etkili ve yüksek hızlı sinir iletimini sağladıkları düşünülmektedir (58). Nörofilamentler, nöroaksonal hasarın aday biyobelirteçleri olarak giderek artan ilgi görmektedir. Bunlar aksonal hasarın bir etkisi olarak yalnızca nöronlarda ve BOS'da değil aynı zamanda serumda da eksprese edilebilen nörodejeneratif, vasküler, travmatik ve inflamatuvar hastalıklarda anormal seviyelere yükselen yapısal iskelet proteinleridir.

Plazmadaki seviyeleri BOS seviyelerinden 50 kat daha düşük bulunmasına rağmen, BOS NFL seviyelerinin plazma NFL seviyeleriyle iyi korele olduğu belgelenmiştir (59,60). Hem BOS hem de plazma NFL düzeyleri AH ilerlemesi ile ilişkili olarak artar, bu da bilişsel işlevlerle yüksek düzeyde bir korelasyonu ve gelecekteki bilişsel gerileme için iyi bir öngörü değerini ortaya çıkarır (60,61). Ancak AH'nin diğer nörodejeneratif hastalıklardan ayrılması açısından NFL düzeylerinin faydalı olma ihtimali daha düşüktür. Progresif supranükleer felç, frontotemporal demans, çoklu sistem atrofisi ve kortikobazal dejenerasyonda da yüksek plazma NFL düzeyleri gözlenmiştir (62-64). Bu nedenle, NFL düzeyleri şu anda nörodejenerasyonun temsilcisi olarak kabul edilmektedir.

NFL seviyelerindeki artışlar, bilişsel bozuklukların klinik başlangıcından çok önce açıkça görülmektedir. Bu nedenle vücut sıvılarında, özellikle de kolayca erişilebilen kanda NFL ölçümünün, AH'nin klinik öncesi aşamalarının taramasında uygulanabilir olması beklenmektedir.

• Nörogranin

Nörogranin, korteks ve hipokampus gibi AH'den en çok etkilenen beyin bölgelerinde eksprese edilir. Dendritik dikenlerde bol miktarda bulunan, sinaptik aktivite ve plastisitede rol oynayan postsinaptik bir proteindir. Aksonal dejenerasyonu temsil eden NFL'nin aksine nörogranin sinaptik dejenerasyonu ifade eder. Birçok çalışmada hem Alzheimer hastalarının hem hafif bilişsel bozukluğu olan hastaların BOS'unda nörogranin düzeylerinin arttığı görülmüştür. BOS nörogranin konsantrasyonlarındaki dinamik değişiklikler AH'nin farklı

aşamalarını yansıtabilir. Ayrıca, artan BOS nörograninin çeşitli nörodejeneratif bozukluklar arasında AH'ye özgü olduğu bulunmuştur (65,66).

- **Kitinaz-3-benzeri protein 1 (YKL-40)**

YKL-40, aktive edilmiş makrofajlar ve mikroglia tarafından salgılanan karbonhidrat bağlayıcı bir proteindir. Bağ dokusu hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, glandüler epitel ve ayrıca diğer hücreler aracılığıyla hücre dışı matrise salgılanan bir akut faz proteinidir. İnflamasyonun modülasyonunda, astrositlerin migrasyonunda ve dokunun yeniden şekillendirilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. YKL-40'ın artan ekspresyonu esas olarak AH dahil olmak üzere diğer nörolojik bozukluklarda da reaktif astrositlerde tanımlanmıştır (67). BOS'daki yüksek YKL-40 seviyeleri sıklıkla bildirilmiş ve MCI veya prelinik hastalık gibi AH'nin erken aşamalarında artan inflamasyon ve astrositozu temsil ettiği öne sürülmüştür. Klinik semptomların ilerlemesi ve kortikal beyin atrofisi de YKL-40 seviyelerindeki artışlarla yakından ilişkili bulunmuştur (61,68). Bu nedenle, YKL-40'taki artışların belirli bir hastalık sürecinden ziyade nörodejenerasyonla sonuçlanan ortak bir yolla bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

- **Oreksin**

Oreksin, lateral hipotalamustaki nöronlar tarafından üretilen bir nöropeptiddir. Uyku-uyanıklık döngüsü, yemek yeme, biliş, ruh hali değişiklikleri ve ödüllere tepki gibi birçok vücut fonksiyonunu düzenler (74). Alzheimer'lı hastalarda oreksin sinyalleme sisteminin bozulduğu, bu durumun uyanıklığın artmasına, REM uykusunun azalmasına neden olduğu ve buna bağlı olarak Aβ birikiminin ve nörodejenerasyonun arttığı gösterilmiştir (75). Yapılan çalışmalarda birkaç istisna dışında Alzheimer hastalarının BOS'unda oreksin seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (76,77).

- **Yağ asidi bağlayıcı protein-3 (FABP-3)**

FABP-3 kalpte ve sinir sisteminde; özellikle dopaminerjik, asetilokolinerjik ve glutamaterjik nöronlarda eksprese edilir (69). FABP-3; membran akışkanlığında, nöronal sinaps oluşumunda ve hücre içi lipidlerin taşınmasında, özellikle de araşidonik asit oluşumunda (ARA) önemli bir rol oynar (69,70). Ayrıca, ARA aracılı FABP-3 dolaylı olarak Aβ proteini ve

alfa-sin kleinin toplanmasını etkileyerek A  plaklarının oluşumuna yol açabilir (70). Patolojik amiloid konsantrasyonları olan hastalarda yüksek FABP-3 seviyeleri ile önemli beyin yapılarının atrofisi arasında ilişki bulunmuştur (71,72). Alzheimer hastalarında BOS'daki FABP-3 seviyelerinin MCI aşaması kadar erken bir zamanda arttığı ve bilişsel açıdan sağlıklı kişilere göre daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir (71,73). MCI hastalarında daha yüksek bazal FABP-3 seviyeleri takip sırasında AH'ye dönüşümü öngörebilir.

- **8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG)**

Oksidatif stres AH'de önemli bir rol oynar. Oksidatif beyin hasarını yansıtan moleküllerin idrarda incelenmesi, AH'nin erken tanısı için  mit verici olabilir. Oksidatif stres hipotezinin en önemli özelliklerinden biri hücrelerin içinde meydana gelen DNA hasarıdır. DNA hasarını yansıtabilecek en önemli biyobelirteçlerden biri 8-hidroksi-2-deoksiguanozindir (8-OHdG) (78). İdrardaki 8-OHdG seviyeleri, yaşlanma ve Alzheimer hastalığının gelişmesiyle oldukça bağlantılıdır. Bu durum, kontrol gruplarına kıyasla Alzheimer hastalarında 8-OHdG'nin anlamlı artışını gösteren çalışmalarla kanıtlanmıştır (79,80).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik İzin

Çalışmamız İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nda değerlendirilmiş ve onay almıştır. Hastalar çalışma hakkında bilgilendirilmiş, bilgilerinin gizli tutulacağı belirtilmiş ve çalışmanın ne amaçla yapıldığı anlatılmıştır. Çalışma için hastalardan veya yakınlarından ve sağlıklı gönüllü bireylerden onam alınmıştır.

3.2. Örneklem Seçimi ve Araştırmaya Alım Ölçütleri

Bu çalışma, Şubat 2023-Şubat 2024 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Anabilim Dalı tarafından ortaklaşa yürütüldü.

Çalışmanın örneklem grubunu, Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Demans Polikliniği'ne başvuran, klinik bulgulara ve MR sonuçlarına göre AH tanısı almış 86 Alzheimer hastası; kontrol grubunu ise yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu, herhangi bir unutkanlık yakınması ve bulgusu olmayan hasta yakınlarından 30 sağlıklı gönüllü birey oluşturdu. Klinik demans evreleme ölçeğine (CDR) göre Alzheimer hastalarının 33'ü hafif evre, 29'u orta evre ve 24'ü ağır evre grubuna dahil edildi.

Her olguyla yüz yüze görüşme yapıldı. Tüm olgulara nörolojik muayene, mini-mental durum değerlendirme testi (MMSE) ve rutin laboratuvar inceleme (glikoz, total kolesterol, trigliserid, LDL, HDL) testleri uygulandı. Ek olarak AH olgularına beyin görüntüleme (MR, PET) yöntemleri uygulandı. Çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan dışlama kriterleri Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2: Çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan dışlama kriterleri

	Dahil edilme kriterleri	Dışlama kriterleri
Hasta grubu	Nöropsikolojik testler ve nörogörüntüleme yöntemleri (MR, PET) ile AH tanısı alma	Başka nöropsikiyatrik hastalık hikayesinin veya alkol-madde bağımlılığının bulunması
	Hastalık öyküsünün 1 sene ve üzerinde olması	Kafa travması, menenjit, ensefalit, beyin operasyonu, inme ve epileptik nöbet hikayesinden en az bir tanesinin olması
		Kontrolsüz ağır metabolik-endokrin hastalığı olması
		MR dışlama kriterleri: Beyin MR incelemesinde geçirilmiş serebrovasküler hastalığa ait geniş enfarkt, stratejik enfarkt, derin ve ak maddede multipl lakünler, ağır ak madde hasarı, hematoma sekeli, belirgin hidrocefali, intrakraniyal kitle lezyonu ve ansefalomalazik alan saptanan hastalar
Kontrol grubu	55 yaşın üzerinde olma	Herhangi bir nöropsikiyatrik hastalık hikayesinin veya alkol-madde bağımlılığının bulunması
	Herhangi bir unutkanlık yakınması ve bulgusu olmayan kişiler	Kafa travması, menenjit, ensefalit, beyin operasyonu, inme ve epileptik nöbet hikayesinden en az bir tanesinin olması

3.3. Araştırmada Kullanılan Ölçekler

3.3.1. Mini-Mental Durum Değerlendirme Testi (Mini-Mental State Examination-MMSE)

İlk kez 1975 yılında Folstein ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (81). Test global olarak bilişsel düzeyin ağırlığının ve progresyonunun belirlenmesinde kullanılabilecek kısa ve standardize bir tarama yöntemidir. Yaklaşık 10 dk içinde poliklinikte veya yatak başında uygulanabilir. MMSE bellek, dikkat, yer ve zaman oryantasyonu, dil ve vizospasyal işlevler olmak üzere beş genel başlıktan ve on bir maddeden oluşmakta ve 30 puan üzerinden değerlendirilmektedir. Türkiye Alzheimer Hastalığı Prevalans çalışmasına göre 24 puan sınır olarak kabul edildiğinde demans tanısının duyarlılık ve özgüllüğü %75 olarak bulunmuştur (82). 20-24 arası hafif, 12-20 arası orta, 12 puanın altı ağır evre olarak değerlendirilir.

3.3.2. Klinik Demans Evreleme Ölçeği (Clinical Dementia Rating Scale-CDR)

Bu ölçek muayene eden hekim tarafından hasta ve yakınıyla ayrı görüşme yapıp hastanın mental durum muayenesi sonrasında doldurulan bir tarama aracıdır (83).

Bellek, yer-zaman yönelimi, topluluk ilişkileri, hobiler-ev yaşamı, yargılama-problem çözme ve kişisel bakım dahil olmak üzere toplam altı eksen değerlendirilir; öykü ve muayene sonrasında çıkarılan sonuca göre 5 puan üzerinden derecelendirilir (0-0.5-1-2-3). Bu altı eksenden evrenin belirlenmesini sağlayan asıl eksen bellektir. En az üç eksenin puanı bellek ekseninden farklı (üçü birden bellek ekseninin altında veya üstünde) değilse evre bellek ekseninin puanı ile aynıdır. Aksi takdirde farklı olan üç eksen evreyi belirler. Bu durumun istisnalarından biri üç eksen belleğin bir tarafında, iki eksen diğer tarafında ise evre bellek ekseninin puanı ile aynıdır. Diğer istisna ise bellek ekseninin puanı 0.5 ise evre 0 olamaz.

Evre 0 normal yaşlılık; evre 0.5 kuşkulu demans; evre 1 hafif şiddette demans; evre 2 orta şiddette demans; evre 3 ağır demans anlamına gelir. Altı eksenin puanlarının toplamı (CDR-KTS: kutu toplamı skoru) bir işlevsel bozulma ölçeği olarak da kullanılabilir. KTS'ye göre sınıflandırıldığında 4-7 hafif, 8-11 hafif-orta, 12-15 orta, 16-18 ağır demans düzeyini gösterir.

3.4. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Hasta ve kontrollerin periferik kan örnekleri 8 ml'lik jelli biyokimya tüplerine alındı. Tüpler +4°C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar eppendorflara bölündü. Hasta ve kontrollerden alınan spot idrar örnekleri de eppendorflara bölündü. Örnekler soğuk zincir ile İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya AD. Laboratuvarı'na getirildi ve çalışma yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

3.5. Örneklerin Çalışılması

Kan ve idrar örnekleri ELISA (enzim işaretli immunosorbent test) yöntemi ile çalışıldı.

Total tau ve NFL testleri için kuyucuklara 100 µL standart ve 100 µL serum numuneleri eklendi. 37 °C'de 90 dk inkübasyondan sonra her kuyucuğa 100 µL antikor eklendi. 37 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra 3 defa yıkama yapıldı. Sonrasında her kuyucuğa 100 µL HRP (horse radish peroksidaz) konjugatı eklendi. 37 °C'de 30 dk inkübasyondan sonra 5 defa yıkama yapıldı. Sonrasında her kuyucuğa 90 µL TMB (tetrametil benzidin) substratı ilave edildi ve ardından 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Son olarak reaksiyon 50 µL stop solüsyonu eklenerek durduruldu ve optik yoğunluk 450 nm'ye ayarlanmış mikropilaka okuyucu kullanılarak belirlendi. Standart eğriden konsantrasyonlar belirlendi.

Nörogranin testi için kuyucuklara 50 µL standart ve 40 µL serum numuneleri eklendi. Ardından yalnızca örnek kuyucuklarına 10 µL antikor ilave edildi (standart solüsyonunun içinde antikor mevcuttu). Daha sonra her kuyucuğa 50 µL streptavidin-HRP konjugatı eklendi. 37 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra 5 defa yıkama yapıldı. Her kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A ardından 50 µL substrat solüsyonu B ilave edildi. 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra reaksiyon 50 µL stop solüsyonu eklenerek durduruldu. Optik yoğunluk 450 nm'ye ayarlanmış mikropilaka okuyucu kullanılarak belirlendi. Standart eğriden konsantrasyonlar belirlendi.

YKL-40 testi için serum numuneleri 10 kat dilüe edildi. Mikropilaka boşken 2 defa yıkandı. Ardından 100 µL standart, örnek kuyucuklarına ise 50 µL numune ve 50 µL ölçüm tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 saat mikropilaka karıştırıcıda karıştırıldı. 3 defa yıkama yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara 50 µL antikor ilave edildi. Ardından oda sıcaklığında 1 saat mikropilaka karıştırıcıda karıştırıldı. 3 defa yıkama yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µL streptavidin-HRP konjugatı eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat mikropilaka karıştırıcıda karıştırılıp 3 defa yıkandıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µL TMB substratı ilave edildi. 20 dk

oda sıcaklığında bekledikten sonra reaksiyon 100 µL stop solüsyonu eklenerek durduruldu. Optik yoğunluk 450 nm'ye ayarlanmış mikrolaka okuyucu kullanılarak belirlendi. Standart eğriden konsantrasyonlar belirlendi. Sonuçlar dilüsyon katsayısı olan 20 ile çarpıldı.

Oreksin A testi için kuyucuklara 50 µL standart ve 50 µL serum numuneleri eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µL antikor ilave edildi. 37 °C'de 45 dk inkübasyondan sonra 3 defa yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 100 µL HRP konjugatı eklendi. 37 °C'de 30 dk inkübasyondan sonra 5 defa yıkama yapıldı. Sonrasında her kuyucuğa 90 µL TMB substratı ilave edildi ve 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Son olarak reaksiyon 50 µL stop solüsyonu eklenerek durduruldu ve optik yoğunluk 450 nm'ye ayarlanmış mikrolaka okuyucu kullanılarak belirlendi. Standart eğriden konsantrasyonlar belirlendi.

FABP-3 testi için mikrolaka boşken 2 defa yıkandı. Ardından 100 µL standart, örnek kuyucuklarına ise 50 µL numune ve 50 µL örnek dilüenti eklendi. Oda sıcaklığında 2 saat mikrolaka karıştırıcıda karıştırıldı. 4 defa yıkama yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µL antikor ilave edildi. Ardından oda sıcaklığında 1 saat mikrolaka karıştırıcıda karıştırıldı. 4 defa yıkama yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µL streptavidin-HRP konjugatı eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk mikrolaka karıştırıcıda karıştırılıp 4 defa yıkandıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µL TMB substratı ilave edildi. 20 dk oda sıcaklığında bekledikten sonra reaksiyon 100 µL stop solüsyonu eklenerek durduruldu. Optik yoğunluk 450 nm'ye ayarlanmış mikrolaka okuyucu kullanılarak belirlendi. Standart eğriden konsantrasyonlar belirlendi. Sonuçlar dilüsyon katsayısı olan 2 ile çarpıldı.

8-OHdG testi için kuyucuklara 50 µL standart ve 50 µL idrar numuneleri eklendi. Ardından tüm kuyucuklara 50 µL antikor ilave edildi. 37 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra 3 defa yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 100 µL HRP konjugatı eklendi. 37 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra 5 defa yıkama yapıldı. Sonrasında her kuyucuğa 90 µL TMB substratı ilave edildi ve 37 °C'de 20 dk inkübe edildi. Son olarak reaksiyon 50 µL stop solüsyonu eklenerek durduruldu ve optik yoğunluk 450 nm'ye ayarlanmış mikrolaka okuyucu kullanılarak belirlendi. Standart eğriden konsantrasyonlar belirlendi. Sonuçlar, aynı numunelerde ölçülen kreatinin içeriğine (mg Cr başına) oranlanarak ifade edildi.

3.6. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Cihaz Listesi

Çalışmada kullanılan malzemeler Tablo 3 ve cihazlar Tablo 4’te belirtilmektedir.

Tablo 3: Kullanılan malzemeler

Malzeme Adı	Marka - Üretici Firma
MAP τ / TAU ELISA Kit	Elabscience E-EL-H0948 (Houston, Texas, USA)
NEFL (Neurofilament, Light Polypeptide) ELISA Kit	Elabscience E-EL-H0741 (Houston, Texas, USA)
Neurogranin (NRGN) ELISA Kit	Mybiosource MBS167225 (San Diego, CA, USA)
YKL-40 ELISA Kit	Invitrogen BMS2322 (Waltham, MA, USA)
FABP3 ELISA Kit	Invitrogen BMS2263 (Waltham, MA, USA)
OXA (Orexin A) ELISA Kit	Elabscience E-EL-H1015 (Houston, Texas, USA)
8-OHdG ELISA Kit	Mybiosource MBS58807457 (San Diego, CA, USA)
Polipropilen tüp	Vacusera Prp (İzmir, TÜRKİYE)
Polipropilen numune kabı	NemHesis (Ankara, TÜRKİYE)
Eppendorf tüp	Fıratmed (İstanbul, TÜRKİYE)
Pipet ucu	Trueline (Haryana, INDIA)

Tablo 4: Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Model - Üretici Firma
Santrifüj	Nüve	NF 1200R-TÜRKİYE
Otomatik pipet	Eppendorf	Eppendorf Research-USA
Biyokimya otoanalizörü	Roche	Roche cobas c6000-SWITZERLAND
Derin dondurucu	Panasonic	MDF794-JAPAN
İnkübatör	Hettich	Hettcube 400-GERMANY
ELISA plate karıştırıcı	Yellowline	OS 5 basic-UK
ELISA plate yıkayıcı	Biotek	ELX50-USA
ELISA okuyucu	Biotek	EON-USA

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için Statistical Package for The Social Sciences programı (21, SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) ve GraphPad Prism (10, GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) kullanıldı. Verilerin sunumunda sayı, ortalama, standart deviasyon, minimum ve maksimum değerler kullanıldı. Veri dağılımları ve homojenliği Kolmogorov-Smirnov ve Levene testi ile değerlendirildi. Normal ve homojen dağılım gösteren verilerin kıyaslanmasında ANOVA, normal ve homojen dağılım göstermeyen verilerin kıyaslanmasında ise Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Çalışma gruplarındaki cinsiyet dağılımı ki-kare testi ile analiz edildi. Değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde parametrik veriler için Pearson korelasyon testi; parametrik olmayan veriler için Spearman korelasyon testi kullanıldı. Biyobelirteçlerin Alzheimer hastaları ve kontrol grupları arasında ayırım yapma yeteneğini değerlendirmek için alıcı çalışma karakteristik eğrisi (receiver operating characteristic-ROC) analizi kullanıldı. ROC analizinin eğri altındaki alanı (area under the curve-AUC)>0.6 ile sonuçlandığı biyobelirteçler için eşik değer, duyarlılık ve özgüllük hesaplandı. $p<0.05$ istatistik anlamlılık için eşik değer olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma gruplarının tanımlayıcı özellikleri

Çalışmaya Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Demans Polikliniği'ne başvuran ve buradan takip edilen NIA-AA kriterlerine göre Alzheimer tipi demans tanısı konmuş 86 hasta ve 30 sağlıklı gönüllü birey dahil edildi. Klinik demans evreleme ölçeğine göre, hastaların 33'ü hafif, 29'u orta, 24'ü ağır evre olarak üç gruba ayrıldı. Tüm gruplar arasında yaş ($p=0.377$) ve cinsiyet ($p=0.518$) dağılımı bakımından anlamlı bir fark bulunmadı. Hasta grupları arasındaki MMSE ve KTS ortalamaları ise anlamlı olarak farklılık gösterdi ($p<0.001$; Tablo 5).

Tablo 5: Kontrol ve hasta grubunun tanımlayıcı özellikleri (MMSE: mini-mental durum değerlendirme testi; KTS: kutu toplamaları skoru; Ort: ortalama; SD: standart deviasyon; min-max: minimum-maksimum)

	Kontrol	Hafif evre	Orta evre	Ağır evre	p değeri*
Örnek sayısı (n)	30	33	29	24	-
Yaş (Ort.±SD; yıl)	72.63 ± 5.92	73.45 ± 8.10	69.72 ± 9.88	71.79 ± 10.42	0.377
Cinsiyet (K/E)	15/15	16/17	19/10	14/10	0.518
MMSE (Ort.; min-max)	-	20.33 (14 – 25)	14.00 (7 – 21)	4.42 (0 – 14)	$p<0.001^*$
KTS (Ort.; min-max)	-	6.70 (3 – 9)	11.93 (7 – 15)	16.92 (15 – 18)	$p<0.001^*$

*p değerinin hesaplanmasında kategorik değişkenlerde ki-kare testi, sürekli değişkenlerde Kruskal-Wallis testi kullanıldı.

4.2. Serum glikoz düzeyleri ve lipid paneli

Kontrol ve hasta gruplarından muayene sırasında istenen rutin kan testleri sonuçları değerlendirildi. Sonuçlar mg/dL cinsinden ortalama ve min-max değerleriyle belirtildi. Glikoz, total kolesterol ve LDL değerleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.022$, $p=0.004$, $p=0.005$). Hasta gruplarındaki serum trigliserid düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında sınırda bir artış göstermekle birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.055$; Tablo 6). Hafif evreli AH'de serum glikoz, total kolesterol ve LDL değerleri kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gösterdi (sırasıyla $p=0.013$, $p=0.049$, $p=0.032$). Orta ve ağır evreli AH'de glikoz değerleri anlamsızken, total kolesterol ve LDL düzeylerinde anlamlı artış saptandı (orta evrede sırasıyla $p=0.103$, $p=0.007$, $p=0.023$; ağır evrede sırasıyla $p=0.194$, $p=0.013$, $p=0.015$). AH grupları birbirleri ile kıyaslandığında serum glikoz değerleri ve lipid panelinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 6: Alzheimer Hastalığı'nda (AH) ve kontrol grubunda serum glikoz ve lipid paneli (Ort.: ortalama; min-max: minimum-maksimum)

	Kontrol (n=30)	Alzheimer hastaları (n=86)	p değeri*
Glikoz (mg/dL)	100.34 (68 – 140)	120.29 (78 – 267)	0.022*
Total kolesterol (mg/dL)	174 (101.3 – 243.2)	206.10 (96.2 – 292.8)	0.004*
Trigliserid (mg/dL)	114.65 (50.7 – 255.1)	151.04 (48.3 – 437)	0.055
LDL (mg/dL)	103.36 (46 – 172)	126.96 (35 – 190)	0.005*
HDL (mg/dL)	54.52 (26.5 – 86.6)	50.63 (32.3 – 141.6)	0.149

*p değerinin hesaplanmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı.

4.3. Serum total tau, NFL, nörogranin, YKL-40, oreksin, FABP-3 ve idrar 8-OHdG düzeyleri

Alzheimer'lı hastaların serumlarında total tau, NFL ve oreksin düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenirken; nörogranin, YKL-40, FABP-3 ve 8-OHdG düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı (Tablo 7).

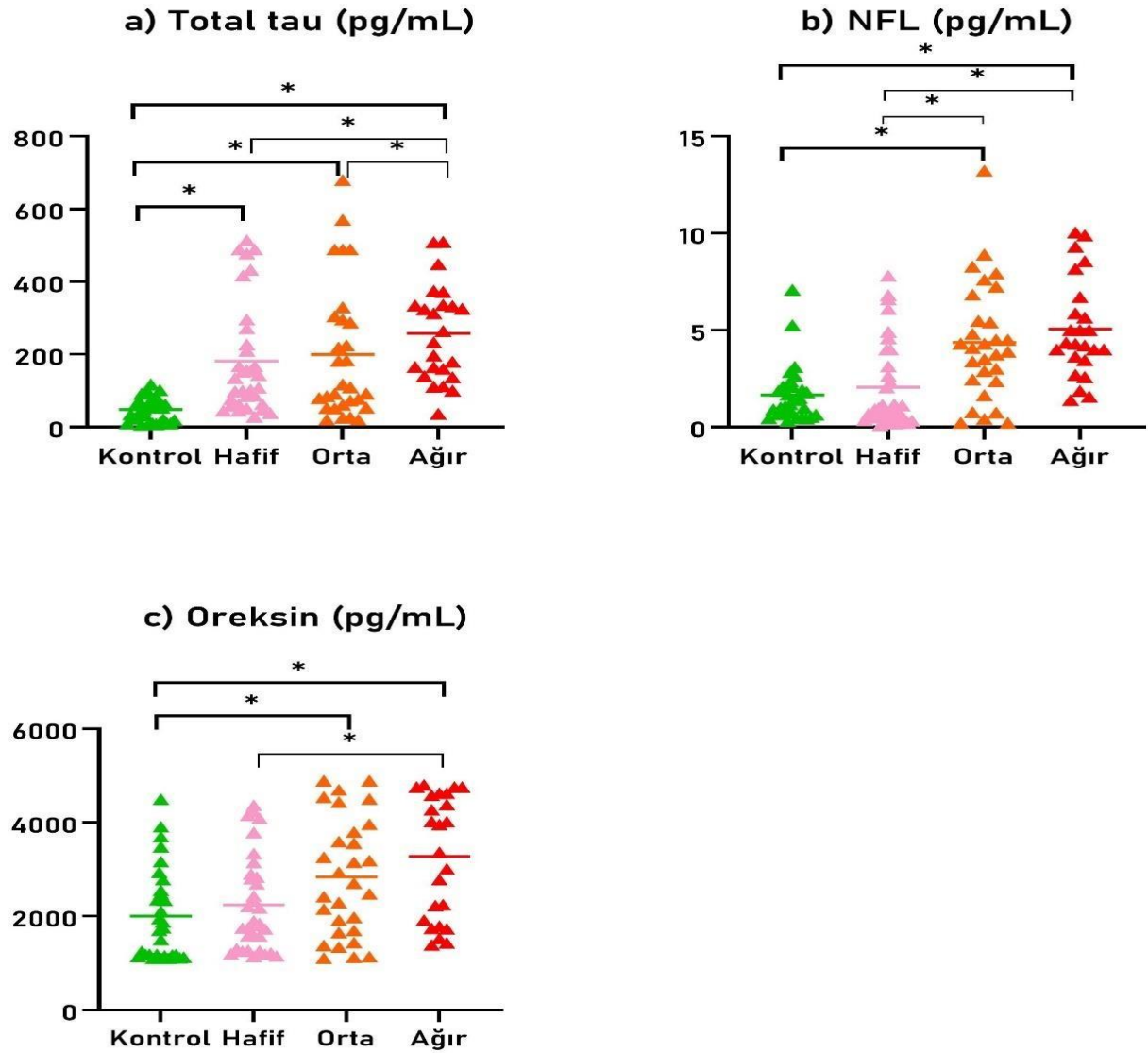
Tablo 7: Alzheimer Hastalığı'nda (AH) ve kontrol grubunda serum total tau, NFL, nörogranin, YKL-40, oreksin, FABP-3 ve idrar 8-OHdG düzeyleri (*NFL: nörofilament hafif polipeptid; YKL-40: kitinaz-3-benzeri protein 1; FABP-3: yağ asidi bağlayıcı protein-3; 8-OHdG/Cr: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin/kreatinin; Ort.: ortalama; min-max: minimum-maksimum*)

	Kontrol (n=30)	Alzheimer hastaları (n=86)	p değeri*
Total tau (pg/mL)	48.33 (6.98 – 117.42)	208.97 (20.2 – 679.62)	<0.001*
NFL (pg/mL)	1.66 (0.32 – 7.08)	3.67 (0.11 – 13.23)	0.002*
Nörogranin (ng/mL)	216.17 (70 – 635.96)	232.83 (58.01 – 688.34)	0.605
YKL-40 (pg/mL)	56441.1 (21094.22 – 93599.2)	64927.34 (19262.78 – 173242.26)	0.354
Oreksin (pg/mL)	2003.47 (1100 – 4496.9)	2732.36 (1106.01 – 4890.82)	0.002*
FABP-3 (pg/mL)	2459.9 (717.75 – 6285.03)	2552.41 (1065.63 – 6182.5)	0.212
8-OHdG/Cr (ng/mg)	0.11 (0.02 – 0.28)	0.14 (0.01 – 0.67)	0.677

*p değerinin hesaplanmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı.

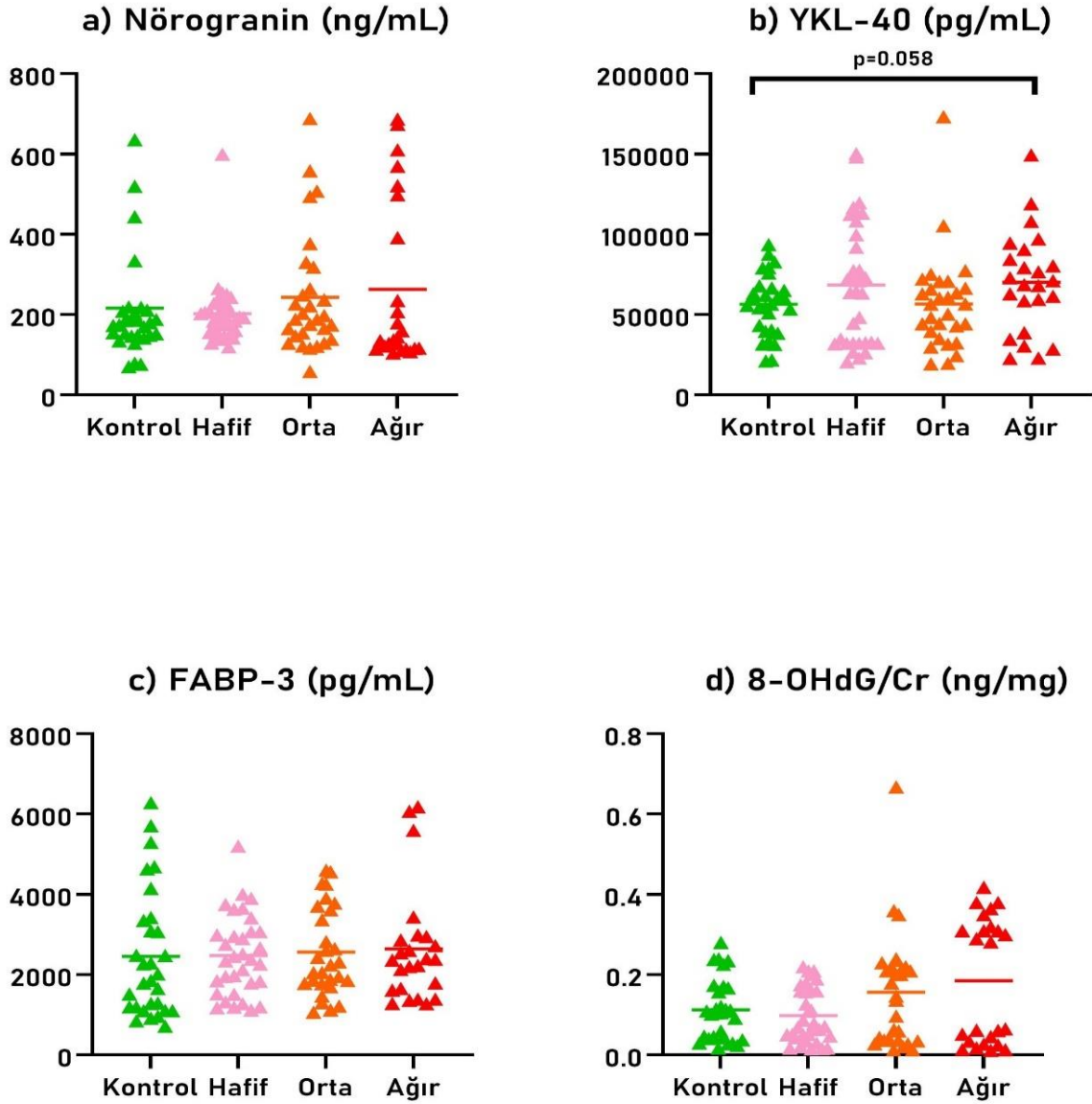
AH alt gruplarındaki total tau düzeyleri kontrol grubuna kıyasla yüksek olarak bulundu (Şekil 4a). Ağır evreli hastalar, hem hafif evre hem de orta evrelilere göre daha yüksek total tau düzeylerine sahipti (sırasıyla $p=0.013$, $p=0.031$; Şekil 4a).

Serum NFL ve oreksin düzeyleri orta ve ağır evreli AH gruplarında kontrol grubuna göre yüksek iken, hafif evreli de bir değişiklik göstermedi (Şekil 4b-4c). Anlamli artışlar ağır evreli AH ile hafif evreli AH arasında da gözlemlendi (Şekil 4b-4c).



Şekil 4: a) Total tau, b) NFL (nörofilament hafif polipeptid), c) Oreksin dağılım grafiği (* $p < 0.05$; renkli çizgiler ortalama değeri göstermektedir)

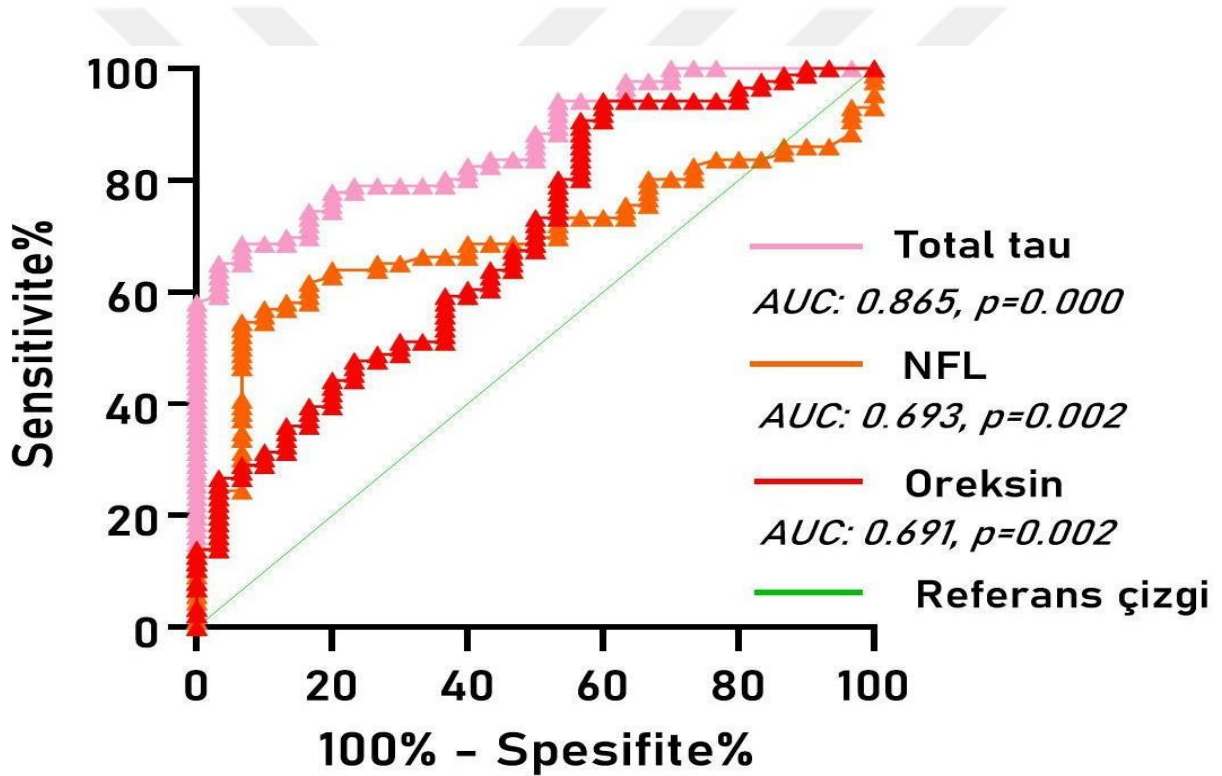
Nörogranin, FABP-3 ve 8-OHdG/Cr düzeylerinde AH evrelerine göre anlamlı bir fark bulunmadı. YKL-40 düzeyleri ağır evreli AH'de kontrol grubuna göre sınırda artış göstermekle birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.058$; Şekil 5b).



Şekil 5: a) Nörogranin, b) YKL-40 (kitinaz-3-benzeri protein 1), c) FABP-3 (yağ asidi bağlayıcı protein-3), d) 8-OHdG/Cr (8-hidroksi-2-deoksiguanozin/kreatinin) dağılım grafiği (renkli çizgiler ortalama değeri göstermektedir)

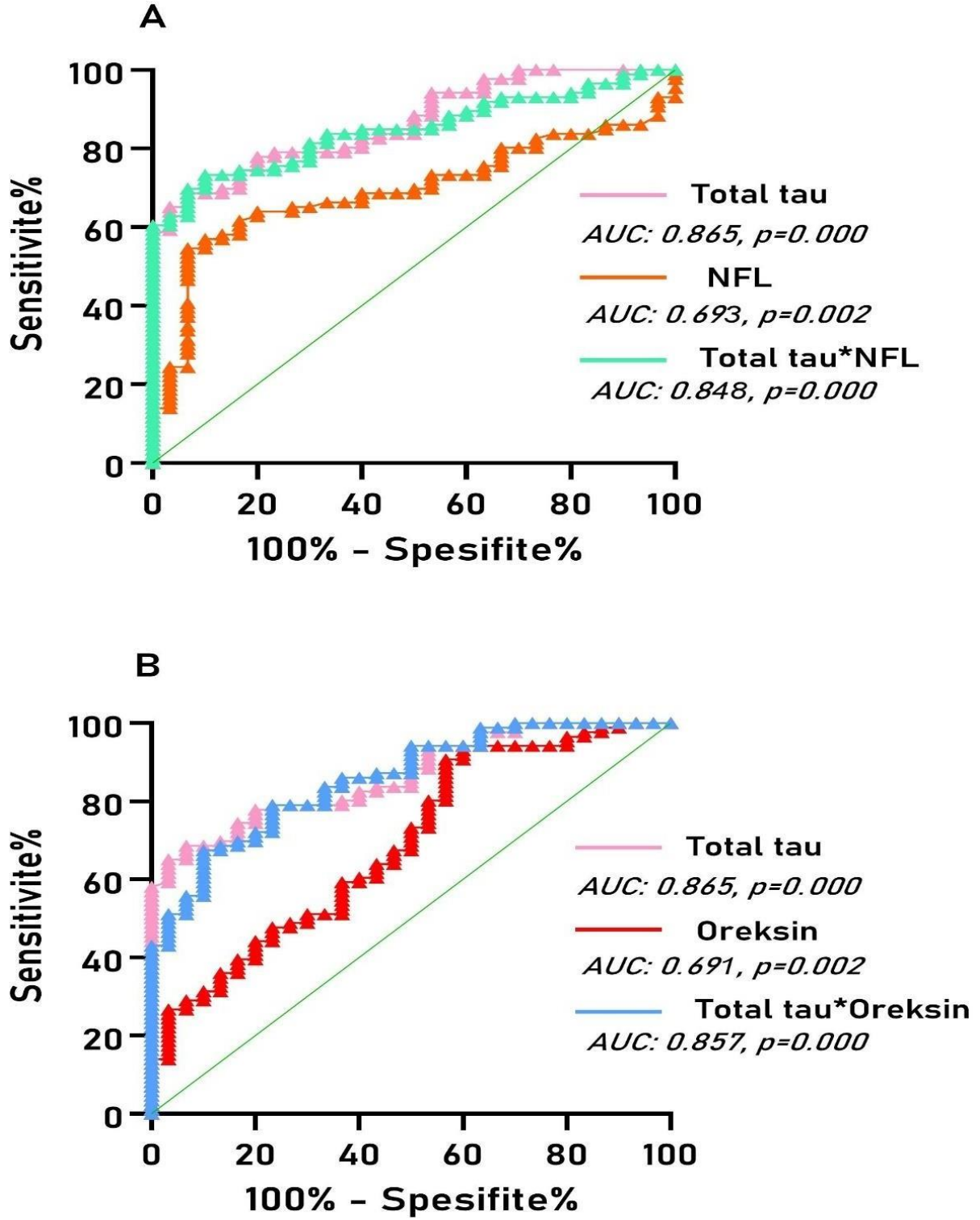
4.4. ROC eğrileri

Total tau, NFL ve oreksinin AH tanısı için biyobelirteç olarak uygunluğunu test etmek amacıyla ROC eğrileri çizildi. Total tau için kesim noktası 71.5 pg/mL olduğunda sensitivite %79.1, spesifite %76.7 olarak bulundu (AUC:0.865, $p=0.000$). NFL için kesim noktası 1.835 pg/mL olduğunda sensitivite %66.3, spesifite %66.7 olarak saptandı (AUC:0.693, $p=0.002$). Oreksin için kesim noktası 1962.725 pg/mL olarak alındığında sensitivite %60.5, spesifite %60 idi (AUC:0.691, $p=0.002$). Bu üç biyobelirteç çarpılarak birleştirilince AUC 0.861 olarak bulundu ($p=0.000$; Şekil 6).



Şekil 6: Alzheimer hastaları ve kontrol grubunu ayırt etmek için total tau, NFL (nörofilament hafif polipeptid), oreksinin performansını gösteren ROC eğrisi

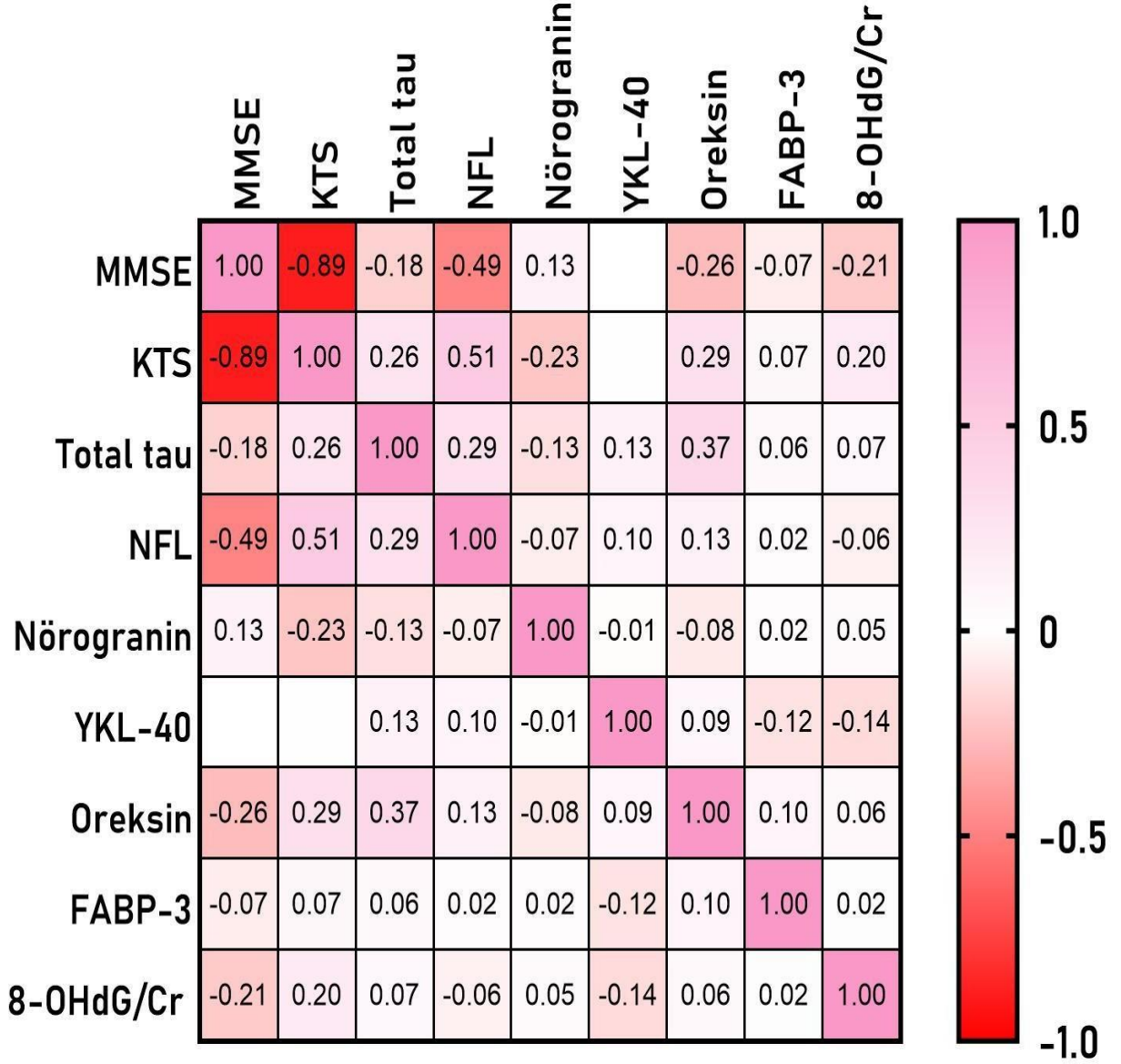
Total tau ve NFL'nin çarpılarak birleştirilmesi sonucunda AUC 0.848 olarak bulundu ($p=0.000$; Şekil 7A). Total tau ve oreksinin çarpılarak birleştirilmesi sonucunda AUC 0.857 olarak bulundu ($p=0.000$; Şekil 7B).



Şekil 7: A) Total tau ve NFL (nörofilament hafif polipeptid)'nin birleştirilmiş ROC eğrisi, B) Total tau ve oreksinin birleştirilmiş ROC eğrisi

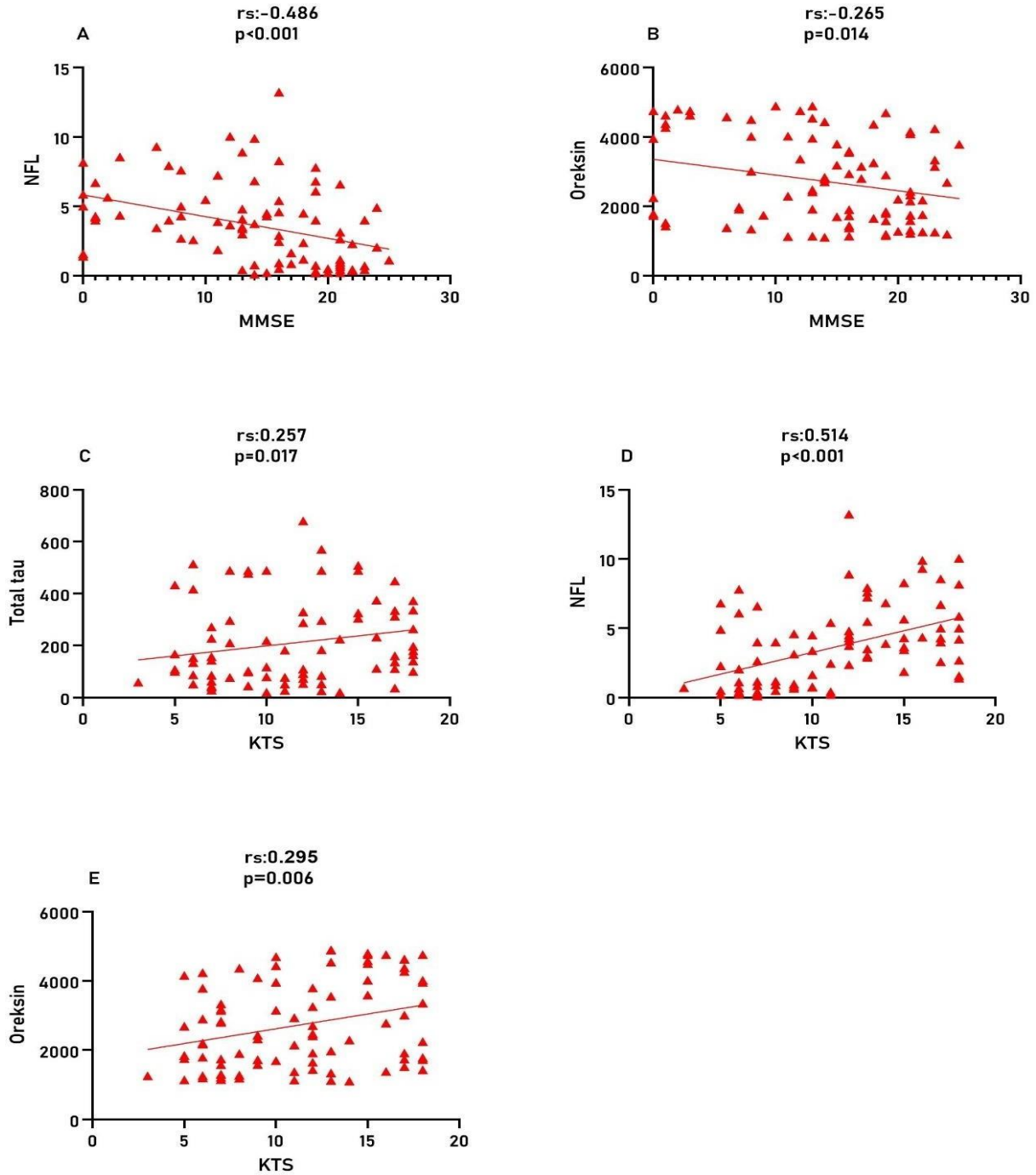
4.5. Korelasyon analizleri

Spearman korelasyon testi ile tüm çalışma grubunda MMSE, KTS ve biyobelirteçler arasındaki ilişki değerlendirildi (Şekil 8).



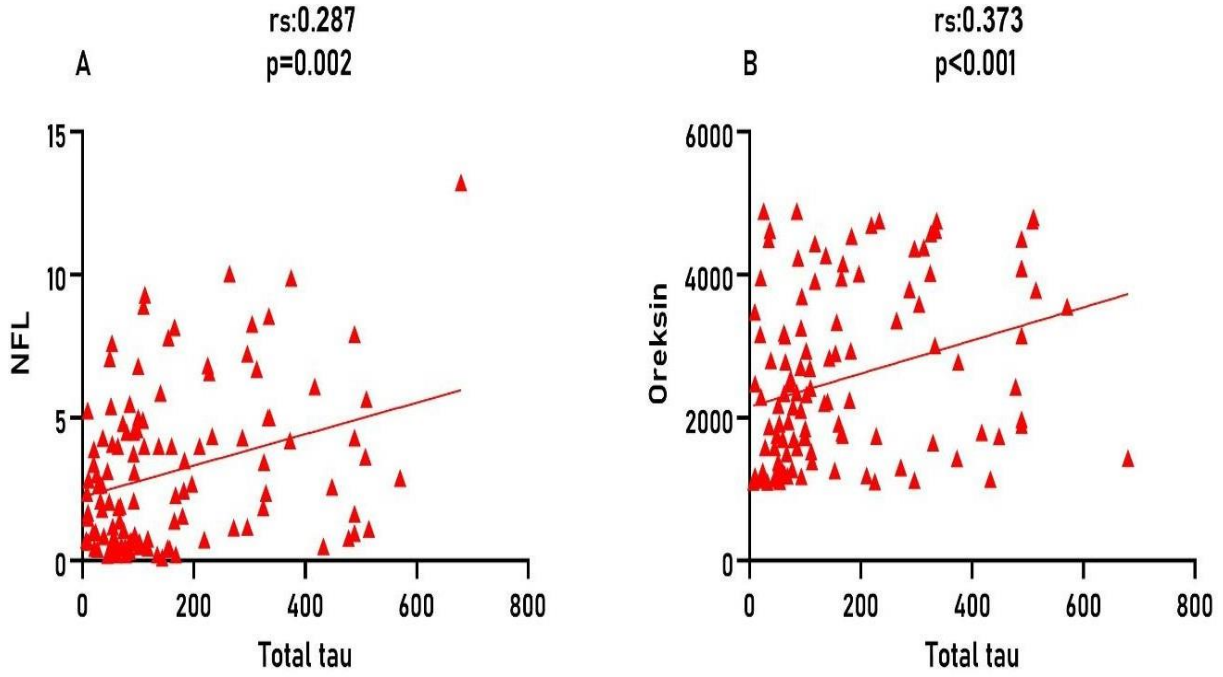
Şekil 8: Spearman korelasyon analizi (renk gradyanı korelasyonun gücünü gösterir) (MMSE: mini-mental durum değerlendirmesi; KTS: kutu toplamaları skoru; NFL: nörofilament hafif polipeptid; YKL-40: kitinaz-3-benzeri protein 1, FABP-3: yağ asidi bağlayıcı protein-3; 8-OHdG/Cr: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin/kreatinin)

NFL ve oreksin düzeyleri MMSE skoru ile negatif yönde bir ilişki gösterdi (sırasıyla $p<0.001$, $p=0.014$). Total tau, NFL, oreksin düzeyleri ise KTS ile pozitif yönde anlamlı ilişki gösterdi (sırasıyla $p=0.017$, $p<0.01$, $p=0.006$; Şekil 9).



Şekil 9: A) MMSE (mini-mental durum değerlendirmesi) ve NFL (nörofilament hafif polipeptid), B) MMSE ve Oreksin, C) KTS (kutu toplamları skoru) ve Total tau, D) KTS ve NFL, E) KTS ve Oreksin korelasyonları

Total tau seviyesi NFL ve oreksin seviyeleriyle pozitif yönde anlamlı ilişki gösterdi (sırasıyla $p=0.002$, $p<0.001$; Şekil 10).



Şekil 10: A) Total tau ve NFL (nörofilament hafif polipeptid), B) Total tau ve oreksin korelasyonları

Glikoz ile trigliserid düzeyleri arasında pozitif, HDL düzeyleri ile negatif yönde ilişki bulundu (sırasıyla $p=0.03$, $p<0.001$). Total kolesterol ile trigliserid ve LDL düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı ilişki bulundu ($p<0.001$). Trigliserid ile LDL düzeyleri arasında pozitif, HDL düzeyleri arasında negatif yönde ilişki gözlemlendi ($p<0.001$; Tablo 8).

Tablo 8: Serum glikoz, total kolesterol, trigliserid ve lipoprotein düzeyleri arasındaki korelasyonlar

	Glikoz (r, p değeri)	Total kolesterol (r, p değeri)	Trigliserid (r, p değeri)	LDL (r, p değeri)	HDL (r, p değeri)
Glikoz	1	0.093 (0.322)	0.201 (0.030)*	0.147 (0.116)	-0.327 (0.000)*
Total kolesterol	0.093 (0.322)	1	0.613 (0.000)*	0.939 (0.000)*	0.057 (0.546)
Trigliserid	0.201 (0.030)*	0.613 (0.000)*	1	0.562 (0.000)*	-0.436 (0.000)*
LDL	0.147 (0.116)	0.939 (0.000)*	0.562 (0.000)*	1	-0.092 (0.329)
HDL	-0.327 (0.000)*	0.057 (0.546)	-0.436 (0.000)*	-0.092 (0.329)	1

*p ve r değerinin hesaplanmasında Spearman korelasyon testi kullanıldı.

Total kolesterol ve LDL ile total tau, NFL ve oreksin düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı. Trigliserid ile total tau ve NFL arasında da pozitif yönde anlamlı ilişki bulundu (Tablo 9). HDL değerleri ile total tau, NFL ve oreksin düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı.

Tablo 9: Serum total tau, NFL (nörofilament hafif polipeptid) ve oreksin düzeyleri ile total kolesterol, trigliserid ve lipoprotein düzeyleri arasındaki korelasyonlar

	Total tau (r, p değeri)	NFL (r, p değeri)	Oreksin (r, p değeri)
Total kolesterol	0.299 (0.001) *	0.247 (0.008) *	0.222 (0.017) *
Trigliserid	0.210 (0.024) *	0.196 (0.035) *	0.061 (0.516)
LDL	0.287 (0.002) *	0.199 (0.032) *	0.258 (0.005) *

*p ve r değerinin hesaplanmasında Spearman korelasyon testi kullanıldı.

5. TARTIŞMA

AH, çok yavaş ilerleme sürecine sahip bir hastalıktır. Klinik semptomlar ortaya çıktıktan sonra saptanan nöropatolojik değişiklikler buzdağının görünen kısmı iken, klinik öncesi dönemde fark edilemeyen bu değişiklikler semptomların ortaya çıkmasından 20 yıl öncesine kadar dayanır. Bu nedenle klinik semptomları olmayıp, AH'ye özgü nöropatolojik bulguları olan demans gelişme riski taşıyan bilişsel açıdan sağlıklı bireylerin incelenmesi önemlidir. Ulusal Yaşlanma Enstitüsü ve Alzheimer Derneği, 2018 yılında bilişsel değerlendirmeye ek olarak, BOS incelemesi ve görüntüleme yöntemleri (PET ve MR) ile amiloidoz, tauopati ve nörodejenerasyon gelişiminin değerlendirilmesini ve hastalığın bu şekilde klinik olarak sınıflandırılmasını önermiştir (ATN sınıflandırması) (84). Bu sınıflandırma sistemi AH için tamamen negatiften (A- T- N-) tamamen pozitif (A+ T+ N+) kadar 8 olası risk profilini tanımlar. Ancak şu anda bu profillerden hangisinin artan AH riski veya bilişsel gerileme ile ilişkili olduğu net olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, BOS örnekleme yüksek invazivliği ve görüntüleme yöntemlerinin maliyetlerinin yüksekliği son zamanlarda araştırmacıları geniş popülasyon taramalarında kullanılacak yeni minimal invaziv ve uygun maliyetli kan ve idrar bazlı biyobelirteçler aramaya yöneltmiştir. Hastalığa doğru tanı koymadan ve bu değişikliklerin meydana gelme sebebini bilmeden uygulanan semptomatik tedaviler etkisiz veya yetersiz olabilir. Bu nedenle nöropatolojik değişiklikler geri döndürülemez hale gelmeden önce hastalığa erken dönemde tanı koymak önem taşımaktadır.

AH'nın etyopatogenezinin karmaşıklığı sebebiyle birden fazla biyobelirtecin eşzamanlı kullanımı tercih edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda nörodejenerasyon, nöroinflamasyon, oksidatif stres, protein klirens bozukluğu ve yağ asidi metabolizması bozukluğu durumlarından her birini yansıtan toplamda 7 parametreyi incelemek istedik. Bu parametrelerden total tau, NFL ve oreksin ile bilişsel gerilemeyi yansıtan klinik demans skoru arasında anlamlı bir korelasyon bulurken, diğer parametrelerde klinikle ilişkili anlamlı bir değişiklik saptamadık.

Tau nöronların hücre iskeleti yapılarında, çekirdeklerde ve sentrozomlarda bulunan mikrotübüler bir proteindir (33). Tau proteini hücre iskeletinin yapısal bütünlüğünde ve aksonal taşımada önemli görevler alır. Tau proteininin asetilasyon ve fosforilasyon gibi anormal posttranslasyonel modifikasyonları arttığında bu proteinin mikrotübüllere bağlanmasının bozulduğu bildirilmiştir. Bağlanmamış fosforile tau, çözünemeyen çift sarmallı nörofilamanlara polimerize olur ve bunu takiben intranöronal yumaklar (NFY) oluşturur. Oluşan NFY'ler aksonal iletinin bozulmasına, hücre hasarına ve sonuç olarak nöron ölümüne

sebepler olur. Hem fosforile tau hem de total tau BOS ve periferik kana salgılanmaktadır. Yapılan çalışmalar periferik kandaki total tau konsantrasyonu ile PET taramasıyla değerlendirilen beyin dokusu total tau seviyeleri arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (38,39). Tau patolojisi A β patolojisine göre klinik ve bilişsel gerileme ile daha çok korele olduğu için (85) çalışmamızda periferik kanda total tau düzeylerinin ölçülmesini tercih ettik ve Alzheimer'lı hastalarda total tau düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu saptadık. Klinik demans skoruna göre incelediğimizde hafif evreden ağır evreye doğru total tau düzeylerinde anlamlı artışlar gözledik. Bulgularımız, Alzheimer hastalarında total tau seviyelerinin arttığını bildiren çalışmaları destekler niteliktedir (86-88). Buna karşın, literatürde serum total tau düzeyleri ile AH arasında açık bir ilişki olmadığını bildiren iki çalışma da mevcuttur (89,90). Alzheimer'lı hastalarda tau proteini beyinde bol miktarda eksprese edilir, dolayısıyla BOS ile periferik kanda konsantrasyonları artar. Bu durum tipik olarak hastalığın ilerleyen aşamalarında nöronal hasar ve beyin atrofisine eşlik etmektedir. Beyin atrofisi bilişsel işlev bozukluğu ile ilişkili olduğundan, periferik kanda total tau konsantrasyonları bilişsel gerilemenin bir ölçütü olarak kabul edilebilir (91). Bu nedenle total tau ölçümü, sadece AH'nin erken evrede tanısı için değil, hastalığın ilerleme aşamasında nörodejenerasyonun dinamik sürecini izlemek için de yararlı olabilir. Çalışmamızda belirlediğimiz kesim değerinde total tau'nun %79.1 sensitivite, %76.7 spesifite ve 0.865 AUC değeri ile sağlıklı kişiler ve Alzheimer hastaları arasında ayırım yapmada değerli bir parametre olduğunu gözlemledik. Bulgularımız bu konudaki birçok çalışma ile uyumludur (86-88).

Nörofilamentler aksonların büyümesi ve stabilitesi için kritik öneme sahip proteinlerdir. Nörofilamentler ara filamentlerdir ve çaplarına göre aktin ile miyozin filamentleri arasında yer alır. Hafif, orta, ağır zincir, α -interneksin ve periferin alt birimlerinden oluşan nörofilamentler arasında hafif zincir (NFL) en küçük birimdir. Nörofilamentler, nöroaksonal hasarın gösterilmesinde aday biyobelirteç olarak kullanılmaktadır ve çeşitli nörodejeneratif, vasküler, travmatik ve inflamatuvar hastalıklarda BOS ve plazmaya yüksek miktarda salgılanmaktadır. Plazmadaki düzeyleri BOS'dan 50 kat daha düşük olmasına karşın, BOS ile plazmadaki konsantrasyonların iyi korele olduğu kanıtlanmıştır (59,60). Çalışmamızda AH grubunda NFL düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu bulundu. Klinik demans skoruna göre değerlendirme yapıldığında ise hafif evreden ağır evreye doğru olmak üzere anlamlı artışlar söz konusuydu. Bununla birlikte, kontrol grubu ile hafif evreli AH arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Bu sonuçlara göre NFL hastalığın erken tanısından çok, takibi için uygun bir parametre gibi gözükmemektedir ve bilişsel gerilemenin ilerlemesi ile ilişkilendirilebilir. Bulgularımıza benzer şekilde, çeşitli çalışmalarda AH'de NFL düzeylerinin yüksek olduğu

bildirilmiş ve bu durumu beyin hipometabolizması, beyin atrofisi ve bilişsel gerileme ile ilişkilendirmiştir (60, 92, 93). Çalışmamızda Alzheimer'lı hastaların serum NFL değerleri ile MMSE skoru arasında negatif, serum NFL ile total tau düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon saptandı. Benzer şekilde bir korelasyon, Mattsson ve ark. (60) tarafından da 2017 yılında gösterilmiştir. NFL ve total taunun birlikte kullanımı 0.848 AUC değeri ile hastalığın tanısının doğruluğunu arttırabilir.

Oreksin sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli olan bir nöropeptiddir. Uyku-uyanıklık döngüsü, yemek yeme, bilişsel düzey, ruh hali değişiklikleri gibi birçok vücut fonksiyonunu düzenler (74). Yaptığımız literatür taramasında Alzheimer hastalarında serum oreksin düzeyini ölçen çalışmaya rastlamadık, fakat BOS oreksin seviyelerinin arttığını bildiren çalışmalar mevcuttu (76,77). Amiloid süreci ile oreksin sistemi arasında etkileşimler olduğunu öne süren çalışmalar bulunmaktadır. Alzheimer'lı hastalardan izole edilen oreksinin APP transgenik farelere infüzyonunun, beyinde A β 'nın artmasına ve amiloid birikimine neden olduğu bildirilmiştir (94). Çalışmamızda AH grubunda oreksin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla yüksek olarak bulundu. Klinik demans skoruna göre değerlendirdiğimizde, ağır evre olgularda hafif evre olanlara göre oreksin düzeyleri daha yüksekti. Bu bulgular, oreksin sisteminin AH'deki nörodejeneratif süreç sırasında giderek düzensizleştiğini göstermektedir. Oreksin seviyelerinde gözlenen bu değişikliklerin altta yatan nörodejeneratif süreçle bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. Oreksinin amiloid dışında tau yolakları ile de bağlantısı olabilir (95). Çalışmamızdaki AH grubunda serum oreksin ile total tau seviyeleri arasında bulunan pozitif ilişki bu bağlantıyı doğrulamaktadır. Buna ek olarak, serum oreksin ile MMSE skoru arasında negatif ilişki saptadık. Bu sonuç oreksin sistem düzensizliğinin, AH'de tau aracılı nörodejenerasyonla ilişkili olabileceğini ve oreksin ile total tau kombinasyonunun hastalığın tanısının doğruluğunu arttırabileceğini düşündürmektedir (AUC:0.857).

Bilişsel bozuklukların tanısında biyokimyasal belirteçlerin önemi giderek artmakla birlikte, bilişsel gerilemeyi yansıtan biyokimyasal belirteçler hala yetersizdir. Sinaps sayısının bilişsel bozuklukların derecesi ile korele olduğu bilinen bir gerçektir (96,97). Bu nedenle, sinaptik bütünlüğü gösteren biyobelirteçlerin bilişsel durumu yansıtmak için uygun olması beklenmektedir. AH ve hafif bilişsel bozukluğu olan hastalarda kontrollerle karşılaştırıldığında yüksek BOS nörogranin seviyeleri birçok çalışmada rapor edilmiştir (98,99). Bu nedenle çalışmamızda sinaptik dejenerasyonu yansıtan nörogranin düzeyleri de incelendi, ancak anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Willemse ve ark. (100) nörograninin iki demans kohortunda AH'yi AH olmayan demanstan ayırmadığını göstermiştir. Bu kohortlardan ilki, yüksek BOS total tau düzeylerine sahip klinik AH tanısı konulan ve Alzheimer olmayan demansları, diğeri ise BOS

biyobelirteçlerinden bağımsız olarak kesin post-mortem AH tanısı olan hastaları içermektedir (100). Bu durum nörograninin beyin dokusunda, BOS'da ve periferik kanda farklı uzunluklarda bulunması ile açıklanabilir; çünkü nörogranin enzimatik olarak bölünür ve sonuçta BOS'a ve periferik kana ulaşan çeşitli uzunluklarda parçalar ortaya çıkar (101). Farklı sonuçların başka bir sebebi de çalışmamızda kullanılan örnek matrisinin farklı olması olabilir.

Nöroinflamasyon, AH patolojisinin ortak bir özelliğidir ve birçok epidemiyolojik çalışma, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların uzun süreli uygulanmasından sonra AH riskinde ve ilerlemesinde bir azalma olduğunu göstermiştir (102). YKL-40, mikroglia farklılaşması ve aktivasyonu için bir belirteçtir ve inflamasyon göstergesi olarak kabul edilir. MSS'nin çeşitli enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan bozukluklarında BOS'da yüksek YKL-40 seviyeleri bulunmuştur. Ayrıca YKL-40'ın BOS konsantrasyonlarının AH'de de yüksek olduğu gösterilmiştir, ancak çelişkili veriler de mevcuttur (103,104). Çalışmamızda özellikle ağır demans olan hastalarda kontrollere kıyasla YKL-40 düzeyleri bir artış eğilimi göstermekle birlikte, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Artış eğilimi ağır demanslı olgularda inflamatuvar sürecin ve proinflamatuvar sinyallerin daha belirgin olduğunu düşündürebilir. Aşırı inflamasyon ve mikroglial aktivasyon ise nörodejenerasyonun şiddetlenmesine, sinaptik plastisitenin bozulmasına ve bilişsel gerilemeye yol açar (105). Ancak çalışmamızda YKL-40 ile klinik demans skoru arasında bir korelasyon bulunmamıştır. YKL-40'ın bir belirteç olarak kullanımının en ciddi sınırlaması, spesifik olmaması gibi gözükmemektedir. Yaşlı popülasyonda oldukça yaygın görülen inflamatuvar ve neoplastik hastalıklar gibi komorbiditeler YKL-40 konsantrasyonlarında artışa yol açabilmektedir. Bu nedenle, YKL-40'ı tanısal bir test olarak kullanırken, biyobelirteç seviyelerinin yanlış yorumlanmasını önlemek için eşlik eden hastalıklar ve kullanılan ilaçlarla ilgili derinlemesine bir tıbbi öykünün alınması gerekli olacaktır. Nöroinflamasyon ve mikroglial aktivasyon, reaktif oksijen radikallerinin birikmesinden dolayı oksidatif beyin hasarına da neden olur. Oksidatif beyin hasarı ve oksidatif stresi yansıtan moleküllerden biri DNA hasarı sonucu oluşan 8-OHdG'dir. 8-OHdG, deoksiguanozin nükleozidine hidroksil radikalının aracılık ettiği bir hasarla oluşur. Beynin yüksek oranda oksijen tüketmesi, kolayca oksitlenebilen lipidlerden oluşması ve diğer organlara göre daha az antioksidan molekül içermesi nedeniyle oksidatif hasara özellikle maruz kaldığı düşünülmektedir. Birçok çalışma, oksidatif stresin erken beyin değişikliklerine neden olabileceğini bildirmiş, 8-OHdG seviyelerinin yaşlanma ve AH gelişimiyle oldukça bağlantılı olduğunu bulmuştur. Bu durum, kontrol gruplarına kıyasla Alzheimer hastalarında 8-OHdG'nin anlamlı artışını gösteren çalışmalarla kanıtlanmıştır (79,80). Çalışmamızda idrar 8-OHdG konsantrasyonlarının gruplar arasında değişiklik göstermediği saptandı. Bulgularımızın önceki

Çalışmalardan farkı 8-OHdG düzeylerinin serum veya BOS’da değil, idrarda çalışılmış olmasıdır, oksidatif DNA hasarı idrara yansımamış olabilir. Bu parametreyle ilgili olarak, BOS veya serum tercih etmememizin nedeni, noninvaziv biyobelirteç arayışı olup, farklı matrisler denemek istememizdir.

FABP-3, lipid metabolizması ile ilişkili nöronal membran hasarını yansıtan bir biyobelirteçtir ve bu parametrenin AH tanısı için kullanılabilirliği araştırılmaktadır. FABP-3 başlangıçta kalp kasından saflaştırılmış, ancak daha sonra yaygın bir doku dağılımına sahip olduğu bulunmuştur. Klinik olarak FABP-3, akut miyokard enfarktüsünden sonra serumda ek bir belirteç olarak kullanılabilir. Birçok alışma, yağ asidi metabolizması ve lipid taşınmasıyla ilgili bir lipid bağlayıcı protein olan FABP-3’ün BOS düzeylerinin, AH’nin erken evrelerinde tanısai değere sahip olabileceğini düşündürmüştür (72,73). Yüksek BOS FABP-3 düzeylerinin erken evrede beyin Aβ yükü ile pozitif yönde korelasyon gösterdiği ve Aβ patolojisi olan bireylerde beyin atrofisii ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (71,72). Buna karşın, Vidal-Pinerio ve ark. (108) BOS’daki FABP-3 düzeylerinin, amiloidopati ve tauopati biyobelirteçlerinden bağımsız olarak bilişsel açıdan sağlıklı yaşlı bireylerde beyin atrofisii öngördüğünü göstermiştir. Bu sonuçlara göre, ölçülen FABP-3 seviyelerinin tamamının serumdaki değil beyinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda gruplar arasında serum FABP-3 düzeylerinde bir fark gözlemedik. Bunun sebebi kullandığımız örneğin BOS yerine serum olması veya kontrol grubundaki kişilerin kardiyovasküler hastalık gibi ek hastalıklarının olması olabilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, dengesiz beslenme ve fiziksel hareketsizlik gibi değiştirilebilir çevresel faktörlerin diyabet, obezite, hiperkolesterolemi veya hipertansiyon gibi bozukluklara ek olarak AH gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (109). Gerçekten, alışmamızda da AH grubunda serum glikoz, total kolesterol ve LDL düzeyleri kontrol grubundan daha yüksek olarak bulundu. Beynin glikoz ihtiyacı insülini bağımsız glikoz taşıyıcıları (GLUT-1, GLUT-3) ile sağlanır (110). İnterstisyel glikoz seviyelerindeki artış, nöronlara anormal derecede yüksek glikoz transferini sağlar ve glikonörotoksiteyi tetikler (111). Glikoz ayrıca poliol yolu, AGE (ileri glikasyon son ürünleri) oluşumu ve MAP kinazların (mitojenle aktive olan protein kinaz) aktivasyonu dahil olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla da nörotoksik etki gösterir (112). Yüksek AGE düzeylerinin, beyinde Aβ birikmesini indüklediği ve Alzheimer hastalarında bilişsel bozukluklarla ilişkilendirildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (113). Lipid metabolizmasındaki hafif değişiklikler de bilişsel işlevler üzerinde derin etkilere neden olur. İnsan beyni vücuttaki kolesterolün yaklaşık %30’unu üretir. Kolesterol, nöronlar ve astrositler için plazma zarının yapısal bütünlüğünün

korunmasında ve membran akışkanlığının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Kolesterol ayrıca, elektrik sinyallerinin sinir sistemi boyunca yayılmasını hızlandırmak için aksonların etrafında yalıtımı sağlayan miyelin kılıfları oluşturmak için kritik öneme sahiptir. Demiyelinizasyon demans patolojisi için bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Kolesterol sinyal iletimi, hücre-hücre adezyonu, lipid/protein ayırmada rol oynayan lipid raflarının bir bileşenidir. Lipid rafları APP, BACE1 ve γ -sekretaz gibi AH ile ilişkili proteinler içermektedir (114). Bunun yanı sıra lipid raflar, A β 'nın ApoE ile etkileşime girmesi için uygun bir ortam sağlar. ApoE'nin yaygın varyantlarından Apo ϵ 4, sporadik AH için en kuvvetli genetik risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar, Apo ϵ 4'ün beyinde A β agregasyonunu ve birikimini desteklediğini göstermektedir (115). Dolayısıyla kolesterol metabolizması beyin fonksiyonunun korunmasında önemli bir rol oynarken, kolesterol düzensizliği AH dahil birçok hastalık için potansiyel bir risk faktörü olarak rol alır. Kolesterol ve AH ile bir başka bağlantı da yalnızca beyinde oluşan kolesterolün oksidasyon ürünü olan 24-hidroksikolesteroldür. Bu oksisterol, kan beyin bariyerinden geçebilir ve beyinden plazmaya kolesterolün bir akış yolunu oluşturabilir ve bu nedenle 24-hidroksikolesterolün plazma seviyesi, beyin kolesterol döngüsünün bir göstergesidir. AH'de 24-hidroksikolesterolün plazma seviyesi, muhtemelen nöronal ölüm ve membran kolesterol döngüsünün bir sonucu olarak artar (116). AH'de, yüksek LDL seviyelerinin aterosklerozun erken inflamatuvar lezyonlarına benzer şekilde vasküler değişiklikleri indüklediği ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir (117). Yakın zamanda yapılan bir prospektif çalışma, serumda yüksek trigliserid düzeylerinin de AH nöropatolojisi için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (118). Daha önce 50 Alzheimer hastası üzerinde yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, Alzheimer hastalarının yüksek bel çevresine sahip olduğu, serum glikoz, trigliserid, LDL seviyelerinin yüksek ve HDL seviyelerinin düşük bulunduğu, bu duruma bağlı olarak AH ile metabolik sendrom arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir (119). Bulgularımız hasta grubunda daha yüksek bulduğumuz serum glikoz, total kolesterol ve LDL düzeyleri AH ile metabolik sendrom arasında bir ilişkiyi desteklemektedir. Oreksinin total kolesterol ve LDL düzeyleriyle anlamlı ilişkisi, total tau ve NFL'nin de total kolesterol, LDL ve trigliserid düzeyleri ile anlamlı ilişkisi bu parametrelerin AH riskini arttıracığı yönündeki hipotezimizi kuvvetlendirmektedir.

Çalışmamızı sınırlayan faktörlere bakıldığında, AH'nin alt grubundaki hasta sayısının az olması, hastalığın metabolik sendrom ile ilişkisini güçlendirmek için gerekli olan insülin, tansiyon ve bel çevresi verilerinin eksik olması ve kontrol grubunda seçtiğimiz ileri yaş popülasyonundaki kişilerde nöropatolojik hastalık dışında ek hastalıkların olması sayılabilir. Bununla birlikte, yaş dikkate alındığında komorbid hastalığı olmayan yaşlı bir kontrol grubu oluşturmak imkansıza yakındır. Çalışmamızın güçlü yönleri ise Alzheimer hastalarının diğer nöropatolojik hastalıklar dışlanarak kesin tanısının konması ve AH ile ilişkili olabilecek birden çok nöropatolojik parametrenin bir arada değerlendirilmesidir.



6. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada Alzheimer hastalarında total tau, NFL ve oreksin seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterildi. Alzheimer'lı hastaların serumlarında total tau-NFL ve total tau-oreksin ilk kez birlikte değerlendirilerek, oluşturulan ROC eğrilerinin parametreleri güçlendirici etkisi olup olmadığı değerlendirildi. Tek başına serum total tau değerlerinin en yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu gözlemlendi. Oreksin ve NFL'nin total tau ile kombine edildiğinde sensitivite ve spesifitelerinin tek başına olana kıyasla daha yüksek olduğu saptandı. Bulgularımız AH'nin erken tanısı için total tauun tek başına yeterli olduğu, bununla birlikte total tau-NFL veya total tau-oreksin biyobelirteç kombinasyonlarının da tarama testi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, hasta grubundaki yüksek serum glikoz, total kolesterol ve LDL düzeyleri AH ile metabolik sendrom arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Buna bağlı olarak yaşam tarzı değişikliklerinin (diyet, egzersiz) AH'yi önleyemese bile, değiştirilebilir risk faktörlerinde bir azalmaya yol açarak hastalık üzerinde olumlu bir etki oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Alzheimer'lı toplam hasta sayısı son derece yeterli olmakla birlikte, AH alt gruplarındaki hasta sayıları arttırılarak gruplar arası parametrelerin değerlendirilmesi gelecekte daha fazla ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Taneli B, Sivrioğlu Y, Taneli T. Alzheimer disease. In: H Aydın, İT Uzbay eds. *Gülhane Psychopharmacology Symposium*. 1. Basım. Ankara: Gülhane Military Medical Academy Printing Office; 1999:31-80.
2. Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J* 1991; 5:278-86.
3. World Health Organization. Risk reduction of cognitive decline and dementia: WHO guidelines. Geneva: World Health Organization; 2019.
4. Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Heal*. 2022; 7: e105-25.
5. Gürvit H, Emre M, Tinaz S ve ark. The prevalence of dementia in an urban Turkish population, *Am J. Alzheimers Dis. Other Demen*. 2008; 23(1): 67-76.
6. Arslantaş D, Özbabalık D, Metintaş S. ve ark. Prevalence of dementia and associated risk factors in Middle Anatolia, Turkey. *Journal of Clinical Neuroscience* 2009; 16(11):1455-9.
7. TÜİK. İstatistiklerle Yaşlılar, 2018. 2019.
8. Barnes J, Bartlett JW, Wolk D, Van der Flier WM, Frost C. Disease Course Varies According to Age and Symptom Length in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2018; 64(2):631-42.
9. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2015; 15:1(1):15056.
10. Kupfer D, Horner MS. *Oxford American Handbook of Psychiatry* 2008; 156.
11. McNaughton D, Knight W, Guerreiro R, Ryan N, Lowe J, Poulter M, et al. Duplication of amyloid precursor protein (APP), but not prion protein (PRNP) gene is a significant cause of early onset dementia in a large UK series. *Neurobiol Aging* 2012; 33(2): 426.e13-21.
12. Theuns J, Brouwers N, Engelborghs S, Sleegers K, Bogaerts V, Corsmit E, et al. Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet*. 2006; 78(6):936-46.
13. Brunkan AL, Goate AM. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem*. 2005; 93(4):769-92.
14. Singleton AB, Hall R, Ballard CG, Perry RH, Xuereb JH, Rubinsztein DC, et al. Pathology of early-onset Alzheimer's disease cases bearing the Thr113-114ins presenilin-1 mutation. *Brain* 2000; 123 12(12):2467-74.

15. Kelleher RJ, Shen J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114:629-31.
16. Lanoiselee HM, Nicolas G, Wallon D, Rovelet-Lecrux A, Lacour M, Rousseau S, Richard AC, Pasquier F, Rollin-Sillaire A, Martinaud O, et al. APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med*. 2017; 14:e1002270.
17. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009; 63:287-303.
18. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2009; 11(2):111.
19. Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, et al. Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimer's & Dementia* 2018; 14(9):1171-83.
20. Wainaina MN, Chen Z, Zhong C. Environmental factors in the development and progression of late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* 2014; 30:253-70.
21. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375(6534):754-60.
22. Kashyap G, Bapat D, Das D, Gowaikar R, Amritkar RE, Rangarajan G, et al. Synapse loss and progress of Alzheimer's disease—A network model. *Sci Rep*. 2019; 9(1):1-9.
23. Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: Beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2014; 129(5):756-69.
24. Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S. Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur J Neurosci* 1999; 11:1907-13.
25. Guo J-T, Yu J, Grass D, De Beer FC, Kindy MS. Inflammation-dependent cerebral deposition of serum amyloid A protein in a mouse model of amyloidosis. *Journal of Neuroscience* 2002; 22(14):5900-9.
26. Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, et al. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol*. 2008; 65(11):1509.
27. Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, et al. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 1992;13(1):179-89.

28. Cummings B, Cotman C. Image analysis of β -amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet* 1995; 346(8989):1524-8.
29. Nielson KA, Cummings BJ, Cotman CW. Constructional apraxia in Alzheimer's disease correlates with neuritic neuropathology in occipital cortex. *Brain Res.* 1996; 741(1-2):284-93.
30. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016; 8(6):595-608.
31. Puzzo D, Argyrousi EK, Staniszewski A, Zhang H, Calcagno E, Zuccarello E, Acquarone E, Fa' M, Puma DDL, Grassi C, et al. Tau is not necessary for amyloid-beta-induced synaptic and memory impairments. *J. Clin. Investig.* 2020; 130:4831-44.
32. Zhang CC, Xing A, Tan MS, Tan L, Yu JT. The role of MAPT in neurodegenerative diseases: Genetics, mechanisms and therapy. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53:4893-904.
33. Castellani RJ, Perry G. Tau Biology, Tauopathy, Traumatic Brain Injury, and Diagnostic Challenges. *J. Alzheimers Dis.* 2019; 67:447-67.
34. Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2010; n7(8):656-64.
35. Grober E, Dickson D, Sliwinski MJ, et al. Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol Aging* 1999; 20:573.
36. Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, et al. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch Neurol* 2004; 61:378.
37. Bateman RJ, Barthélemy NR, Horie K. Another step forward in blood-based diagnostics for Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2020; 26:314-6.
38. Mielke MM, Hagen CE, Xu J, Chai X, Vemuri P, Lowe VJ, Airey DC, Knopman DS, Roberts RO, Machulda MM. Plasma phospho-tau181 increases with Alzheimer's disease clinical severity and is associated with tau- and amyloid-positron emission tomography. *Alzheimers Dement.* 2018; 14:989-97.
39. Park JC, Han SH, Yi D, Byun MS, Lee JH, Jang S, Ko K, Jeon SY, Lee YS, Kim YK, et al. Plasma tau/amyloid- β 1-42 ratio predicts brain tau deposition and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Brain.* 2019; 142:771-86.
40. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* 2016; 12:292-323.
41. Kumar A, Sidhu J, Goyal A. StatPearls Publishing; Treasure Island, FL, USA: 2020. Alzheimer Disease. *StatPearls.* 2020.

42. Apostolova LG. Alzheimer disease. *Continuum*. 2016; 22:419-34.
43. McKhann G, Knopman DS, Chertkow H, Hyman B, Jack CR, Kawas C, Klunk W, Koroshetz W, Manly J, Mayeux R, Mohs R, Morris J, Rossor M, Scheltens P, Carrillo M, Weintrub S, Phelps C. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging/Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dementia* 2011; 7(3):263-9.
44. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) Washington, DC: American Psychiatric Association Publishing 2013.
45. Alzheimer's Association. 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 2019, 15(3):321-87.
46. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E & Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011; 1:a006189.
47. Ardura-Fabregat A, et al. Targeting neuroinflammation to treat Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 2017; 31:1057-82.
48. Pfrieger FW. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol. Life Sci.* 2003; 60:1158-71.
49. Wong MW, et al. Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimers Dement.* 2017; 13:810-27.
50. Tanzi RE & Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005; 120:545-55.
51. Boland B, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018; 17:660-88.
52. Gella A, Durany N. Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Cell Adhes. Migr.* 2009; 3:88-93.
53. Huang W-J, Zhang X, Chen W-W. Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Biomed. Rep.* 2016; 4:519-22.
54. Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Increased Lipid Peroxidation Precedes Amyloid Plaque Formation in an Animal Model of Alzheimer Amyloidosis. *J. Neurosci.* 2001; 21:4183-7.
55. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 2000; 1502:139-44.
56. Moulder KL, et al. Factors influencing successful lumbar puncture in Alzheimer research. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2017; 31:287-94.

57. Sancesario G, Bernardini S. AD biomarker discovery in CSF and in alternative matrices. *Clin. Biochem.* 2019; 72:52-7.
58. Barry DM, et al. Expansion of neurofilament medium C terminus increases axonal diameter independent of increases in conduction velocity or myelin thickness. *J. Neurosci.* 2012; 32:6209-19.
59. Preische O, et al. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2019; 25:277-83.
60. Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H. & Blennow K. Association of plasma neurofilament light with neurodegeneration in patients with Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 2017; 74:557-66.
61. Bos I, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration, synaptic integrity, and astroglial activation across the clinical Alzheimer's disease spectrum. *Alzheimers Dement.* 2019; 15:644-54.
62. Rojas JC, et al. Plasma neurofilament light chain predicts progression in progressive supranuclear palsy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2016; 3:216-25.
63. Rohrer JD, et al. Serum neurofilament light chain protein is a measure of disease intensity in frontotemporal dementia. *Neurology* 2016; 87:1329-36.
64. Hansson O, et al. Blood-based NfL: a biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology* 2017; 88:930-7.
65. Janelidze S, et al. Cerebrospinal fluid neurogranin and YKL-40 as biomarkers of Alzheimer's disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2016; 3:12-20.
66. Wellington H, et al. Increased CSF neurogranin concentration is specific to Alzheimer disease. *Neurology* 2016; 86:829-35.
67. Bonne-Barkay D, Wang G, Starkey A, Hamilton RL. & Wiley CA. In vivo CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J. Neuroinflammation* 2010; 7:34.
68. Gispert JD, et al. The APOE epsilon4 genotype modulates CSF YKL-40 levels and their structural brain correlates in the continuum of Alzheimer's disease but not those of sTREM2. *Alzheimers Dement.* 2017; 6:50-9.
69. Owada Y. Fatty Acid Binding Protein: Localization and Functional Significance in the Brain. *Tohoku J. Exp. Med.* 2008; 214:213-20.
70. Cheng A, Shinoda Y, Yamamoto T, Miyachi H, Fukunaga K. Development of FABP3 ligands that inhibit arachidonic acid-induced α -synuclein oligomerization. *Brain Res.* 2019; 1707:190-7.

71. Chiasserini D, Biscetti L, Eusebi P, Salvadori N, Frattini G, Simoni S, De Roeck N, Tambasco N, Stoops E, Vanderstichele H, et al. Differential role of CSF fatty acid binding protein 3, α -synuclein, and Alzheimer's disease core biomarkers in Lewy body disorders and Alzheimer's dementia. *Alzheimer's Res. Ther.* 2017; 9:52.
72. Olsson B, et al. Cerebrospinal fluid levels of heart fatty acid binding protein are elevated prodromally in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Alzheimers Dis.* 2013; 34:673-9.
73. Chiasserini D, Parnetti L, Andreasson U, Zetterberg H, Giannandrea D, Calabresi P, Blennow K. CSF levels of heart fatty acid binding protein are altered during early phases of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2010; 22:1281-8.
74. Soya S, Sakurai T. Orexin as a modulator of fear-related behavior: hypothalamic control of noradrenaline circuit. *Brain Res.* 2020; 1731:146037.
75. Liguori C, Chiaravalloti A, Nuccetelli M, Izzi F, Sancesario G, Cimini A, Bernardini S, Schillaci O, Mercuri NB, Fabio P. Hypothalamic dysfunction is related to sleep impairment and CSF biomarkers in Alzheimer's disease. *J Neurol.* 2017; 264:2215-23.
76. Heywood WE, et al. CSF pro-orexin and amyloid-beta38 expression in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Neurobiol. Aging.* 2018; 72: 171-6.
77. Gabelle A, et al. Cerebrospinal fluid levels of orexin-A and histamine, and sleep profile within the Alzheimer process. *Neurobiol. Aging.* 2017; 53:59-66.
78. Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Lacramioara Serban I, Stefanescu C, Chirita R. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub* 2013; 25(4):0-409.
79. Markesbery WR, Lovell MA. DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(11-12):2039-45.
80. Leuner K, Hauptmann S, Abdel-Kader R, Scherping I, Keil U, Strosznajder JB, Eckert A, Müller WE. Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(10):1659-76.
81. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12(3):189-98.
82. Güngen C, Ertan T, Eker E, Yaşar R, Engin F. Reliability and validity of the standardized Mini Mental State Examination in the diagnosis of mild dementia in Turkish population. *Türk Psikiyatr Derg.* 2002; 13(4):273-81.
83. O'Bryant SE. Staging Dementia Using Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes Scores. *Arch Neurol* 2008; 65:1091.
84. Hampel H, Cummings J, Blennow K, Gao P, Jack CR, Vergallo A. Developing the ATX(N) Classification for Use across the Alzheimer Disease Continuum. *Nat. Rev.*

Neurol. 2021; 17:580-9.

85. Pais M, Martinez L, Ribeiro O, et al. Early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease: new definitions and challenges. *Braz. J Psychiatry* 2020; 42(4):431-41.
86. Tsai CL, Liang CS, Lee JT, Su MW, Lin CC, Chu HT, et al. Associations between plasma biomarkers and cognition in patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment: a cross-sectional and longitudinal study. *J Clin Med.* 2019; 8:1893.
87. Jiang T, Gong PY, Tan MS, Xue X, Huang S, Zhou JS, et al. Soluble TREM1 concentrations are increased and positively correlated with total tau levels in the plasma of patients with Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res.* 2019; 31:1801-5.
88. Dage JL, Wennberg AMV, Airey DC, Hagen CE, Knopman DS, Machulda MM, Roberts RO, Jack CR Jr, Petersen RC, Mielke MM. Levels of tau protein in plasma are associated with neurodegeneration and cognitive function in a population-based elderly cohort. *Alzheimers Dement* 2016; 12:1226-34.
89. Verberk IMW, Slot RE, Verfaillie SCJ, et al. Plasma amyloid as prescreener for the earliest alzheimer pathological changes. *Ann Neurol* 2018; 84(5):648-58.
90. De Wolf F, Ghanbari M, Licher S, et al. Plasma tau, neurofilament light chain and amyloid- β levels and risk of dementia; a population-based cohort study. *Brain* 2020; 143(4):1220-32.
91. Chiu MJ, Chen YF, Chen TF, Yang SY, Yang FP, Tseng TW, Chieh JJ, Chen JC, Tzen KY, Hua MS, et al. Plasma tau as a window to the brain-negative associations with brain volume and memory function in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Hum. Brain Mapp.* 2014; 35:3132-42.
92. Zetterberg H. Neurofilament light: a dynamic cross-disease fluid biomarker for neurodegeneration. *Neuron* 2016; 91:1-3.
93. Lewczuk P, Ermann N, Andreasson U, et al. Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2018; 10(1):71.
94. Kang JE, et al. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep wake cycle. *Science* 2009; 326:1005-7.
95. Deuschle M, et al. Hypocretin in cerebrospinal fluid is positively correlated with tau and pTau. *Neurosci. Lett.* 2014.
96. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 2007; 68:1501-8.
97. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive

impairment. *Ann Neurol.* 1991; 30:572-80.

98. Mavroudis IA, Petridis F, Chatzikonstantinou S, Kazis D. A meta-analysis on CSF neurogranin levels for the diagnosis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Aging Clin. Exp. Res.* 2019; 1-8.

99. Wang L, Initiative, for the A.D.N. Association of cerebrospinal fluid Neurogranin with Alzheimer's disease. *Aging Clin. Exp. Res.* 2019; 31:185-91.

100. Willemse E, Sieben A, Somers C, Vermeiren Y, De Roeck N, Timmers M, Van Broeckhoven C, De Vil B, Cras P, De Deyn PP, et al. Neurogranin as biomarker in CSF is non-specific to Alzheimer's disease dementia. *Neurobiol. Aging.* 2021;108:99-109.

101. Becker B, Nazir FH, Brinkmalm G, Camporesi E, Kvartsberg H, Portelius E, Boström M, Kalm M, Höglund K, Olsson M, Zetterberg H, Blennow K. Alzheimer-associated cerebrospinal fluid fragments of neurogranin are generated by Calpain-1 and prolyl endopeptidase. *Mol. Neurodegener.* 2018; 13:47.

102. McGeer PL, McGeer EG. The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol.* 2013; 126:479-97.

103. Olsson B, Hertze J, Lautner R, Zetterberg H, Nagga K, Höglund K, et al. Microglial markers are elevated in the prodromal phase of Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Alzheimers Dis.* 2013; 33:45-53.

104. Mattsson N, Tabatabaei S, Johansson P, Hansson O, Andreasson U, Mansson JE, et al. Cerebrospinal fluid microglial markers in Alzheimer's disease: elevated chitotriosidase activity but lack of diagnostic utility. *Neuromolecular Med.* 2011; 13:151-9.

105. Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 2015; 96:29-41.

106. Miskowiak KW, Simonsen AH, Meyer M, Poulsen HE, Wilkan M, Forman J, Hasselbalch SG, Kessing LV, Knorr U. Cerebrospinal fluid erythropoietin, oxidative stress, and cognitive functions in patients with bipolar disorder and healthy control participants: A longitudinal case-control study. *J Psychiatr Res.* 2023; 163:240-6.

107. Khajenobar NB, Mahboob S, Nourazarian A, Shademan B, Laghousi D, Moayed ZB, Hassanpour M, Nikanfar M. Comparison between cerebrospinal fluid and serum levels of myelin-associated glycoprotein, total antioxidant capacity, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2021; 200:106377.

108. Vidal-Piñeiro D, Sørensen Ø, Blennow K, et al. Relationship between cerebrospinal fluid neurodegeneration biomarkers and temporal brain atrophy in cognitively healthy older

adults. *Neurobiol Aging* 2022; 116:80-91.

109. Armstrong RA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019; 57:87-105.
110. Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ. Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27:1766-91.
111. Jacob RJ, Fan X, Evans ML, Dziura J, Sherwin RS. Brain glucose levels are elevated in chronically hyperglycemic diabetic rats: No evidence for protective adaptation by the blood brain barrier. *Metabolism.* 2002; 51:1522-4.
112. Tomlinson DR, Gardiner NJ. Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008; 9:36-45.
113. Li S, Jin M, Zhang D, Yang T, Koeglsperger T, Fu H. & Selkoe DJ. Environmental novelty activates beta2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by Abeta oligomers. *Neuron* 2013; 77: 929-41.
114. El Gaamouch F, Jing P, Xia J, Cai D. Alzheimer's disease risk genes and lipid regulators. *J. Alzheimers Dis.* 2016; 53:15-29.
115. DeMattos RB, Cirrito JR, Parsadanian M, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, et al. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* 2004; 41:193-202.
116. Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lutjohann D, Moore C, et al. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2003; 60:510-5.
117. Chakraborty A, de Wit NM, van der Flier WM, de Vries HE. The blood brain barrier in Alzheimer's disease. *Vascul. Pharmacol.* 2017; 89:12-8.
118. Sun J, Xie Z, Wu Y, Liu X, Ma J, Dong Y, Liu C, Ye M, Zhu W. Association of the triglyceride-glucose index with risk of Alzheimer's disease: a prospective Cohort study. *Am. J. Prev. Med.* 2023.
119. Razay G, Vreugdenhil A, Wilcock G. The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2007; 64 (1):93-6.