



## ARAŞTIRMA / RESEARCH

# Alzheimer hastalığında doublecortin-like kinaz-1 düzeyleri ve oksidan durumu

## Doublecortin-like kinase 1 levels and oxidant status in Alzheimer's disease

Savaş Güzel<sup>1</sup>, Özlem Yıldız<sup>1</sup>, Aysun Ünal<sup>2</sup>, Ali Rıza Kızıler<sup>3</sup>, Tevfik Gülyaşar<sup>4</sup>, Eda Çelik Güzel<sup>5</sup>, Çiğdem Fidan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Nöroloji Anabilim Dalı; <sup>3</sup>Biofizik Anabilim Dalı; <sup>4</sup>Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Tekirdağ, Turkey  
<sup>5</sup>Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı; Edirne, Turkey

*Cukurova Medical Journal 2017;42(4):687-693.*

### Abstract

**Purpose:** Alzheimer disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that affects the neurons in various parts of the central nervous system. Recently discovered protein Doublecortin like kinase-1 (DCLK-1) is one of the microtubule-associated protein. Our goal is to investigate the relationship of the role of the DCLK-1 in AD disease and oxidative stress.

**Material and Methods:** The study included Alzheimer-disease-diagnosed 60 patients admitted to the clinic with memory disorders, and 30 healthy subjects. In the serum of patient and control group, DCLK-1, tau protein and zinc levels were measured. To assess the presence of oxidative stress, malondialdehyde (MDA), protein carbonyl group (PCG), protein thiol groups (PTG), glutathione (GSH) and catalase levels were detected. Dementia level was staged with Mini-Mental State Examination (MMSE) and Dementia Clinical Staging Scale (CDR).

**Results:** Serum DCLK-1 and tau levels were determined significantly higher in AD compared to the control group). In the group with AD, levels of MDA, and PCG levels were significantly higher and GSH, catalase levels were determined significantly lower. DCLK-1 and MDA levels were determined significantly higher in the group with severe AD compared to the group with mild AD. In AD group, a positive correlation between DCLK-1 and, CDR and MDA; and negative correlation was found between MMSE and B12 vitamin

**Conclusions:** The presence of a relation with increase in DCLK1 levels in AD and risk factors shows that it can be a new marker in assessing the disease.

**Key words:** Alzheimer's disease, DCLK-1, tau, zinc, oxidative stress.

### Öz

**Amaç:** Alzheimer hastalığı (AH); merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında nöronları etkileyen progresif bir nörodejeneratif hastalıktır. Yeni keşfedilen bir protein olan Doublecortin like kinaz-1 (DCLK-1) mikrotübül ilişkili proteinlerden biridir. Amacımız AH'de DCLK-1'in rolünü ve oksidatif stresle ilişkisini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma grubu bellek bozuklukları nedeniyle polikliniğe başvuran AH tanısı konan 60 hasta ve 30 sağlıklı bireyden oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubunun serumlarında DCLK-1, tau protein ve çinko düzeyleri ölçüldü. Oksidatif stresin varlığını değerlendirmek için malondialdehit (MDA), protein karbonil grup (PCG), protein tiyol grup (PTG), glutatyon (GSH) ve katalaz düzeyleri saptandı. Demans derecesi Mini Mental Durum Muayenesi (MMSE) ve Demans Klinik Evrelendirilme Ölçeği (CDR) ile evrelendirildi.

**Bulgular:** Serum DCLK-1 ve tau düzeyleri AH'da kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı. AH olan grupta MDA, PCG düzeyleri anlamlı olarak yüksek ve GSH, katalaz düzeyleri anlamlı olarak düşük saptandı. DCLK-1 ve MDA düzeyleri ciddi AH olan grupta hafif gruba göre anlamlı olarak yüksek saptandı. AH grubunda DCLK-1 ile CDR ve MDA arasında pozitif korelasyon ve çinko, MMSE ve B12 vitamini değerleri arasında negatif korelasyon saptandı

**Sonuç:** AH'da DCLK-1 düzeylerinin artışı ve risk faktörleri ile ilişkili bulunması hastalığın değerlendirilmesinde yeni bir belirteç olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Alzheimer Hastalığı, DCLK-1, tau, çinko, oksidatif stress.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Savaş Güzel, Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tekirdağ, Turkey. E-mail: savasguzel@yahoo.com  
Geliş tarihi/Received: 02.01.2017 Kabul tarihi/Accepted: 14.03.2017

## GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH); merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları nedeni ile ortaya çıkan bilişsel işlevlerde azalma ile karakterize progresif nörodejeneratif bir hastalıktır<sup>1,2</sup>. AH'nın etyopatogenezinde genetik, beta-amiloid nörotoksitesisi, endojen toksinler, glutamat nörotoksitesisi, inflamasyon, eser elementler veya serbest radikallerin aracılık ettiği nörotoksisite gibi birçok neden suçlanmıştır<sup>3</sup>. Önerilen mekanizmalardan "anormal protein modifikasyonları" ve "oksidatif stres" teorisi son yıllarda öne çıkmaktadır<sup>3-5</sup>.

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya fazla sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan güçlü reaktif metabolitlerdir. Fizyolojik metabolizmada sentezlenebildikleri gibi eksojen olarak da alınabilirler<sup>6,7</sup>. Serbest radikaller; membran fosfolipidleri, proteinler ve DNA gibi birçok moleküle etki ederek yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere yol açarlar. Başta beyin dokusu olmak üzere birçok doku ve hücrelerde fonksiyon kayıp ve bozukluklarının oluşumunda rol oynayabilir<sup>6</sup>. Organizmada oluşan serbest radikaller; katalaz ve GSH-Px gibi enzimlerle ve C ve E gibi vitaminler ve GSH gibi küçük molekül ağırlıklı radikal tutucular ile temizlenir<sup>8,9,10</sup>.

Çinko ön beyindeki nöronların sinaptik veziküllerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve miyelinsasyon, motor gelişim ve nörotransmitter salınımı süreçlerine katılır<sup>11</sup>. Çeşitli hayvan modellerinde çinko eksikliğinin azalmış bilişsel gelişim ile ilgili olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda, çinko eksikliğinin hafıza, öğrenme yeteneği, dil ve zeka dejenerasyonu değişikliklerini etkileyebildiği bildirilmiştir<sup>12</sup>.

AH'nın patofizyolojisinde tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ve amiloid prokürsor proteinlerinin parçalanmış ürünlerinin (Amiloid beta42) birikimi ile karakterize bir hastalıktır<sup>13,14</sup>. Ancak bu hastalıkta proteinlerin bu şekilde modifikasyona uğramalarının nedenlerinin ve bunun hastalığın kliniğine yansımaları ile ilgili olaylar henüz yeterince açıklanamamış değildir. Bu modifikasyonları ortaya çıkışı ile ilgili en önemli hipotezlerden biri oksidatif stres artışı ve eser elementlerin etkisidir<sup>4,5,15</sup>.

AH'nda nöronların mikrotübüllerinde defektler olduğu bilinmektedir<sup>13</sup>. Yeni keşfedilen bir protein

olan DCLK-1 mikrotübül ilişkili proteinlerden biridir<sup>16</sup>. Gelişmekte olan memeli sinir sisteminde ve nöronal migrasyonda önemlidir<sup>17</sup>. N-terminal bölgesi mikrotübül bağlanmasından sorumludur ve C-terminal bölgesi de serin-treonin kinaz bölgesi içermektedir<sup>16,18,19</sup>. Son yıllarda DCLK1'in kognitif davranışlar, şizofreni ve dikkat eksikliği olan hiperaktivite eksikliği ile ilgili ilişkili olduğu bildirilmiştir<sup>20,21</sup>. Fakat DCLK-1 düzeylerinin AH'nın patofizyolojisindeki rolü ile ilgili henüz yeterince veri ortaya konmamıştır. Ancak DCLK-1 ve doublekortinin AH ile ilişkili olduğunu düşündürecek ipuçları vardır<sup>22</sup>.

Amacımız AH'da DCLK-1 düzeylerinin saptanması ve hastalığın klinik durumlarıyla arasındaki ilişkinin incelenmesidir. Ayrıca bu molekül üzerine oksidatif stres ve çinko (Zn) düzeylerinin etkisi araştırılacaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grubu Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Nöroloji Polikliniği'ne başvuran Alzheimer tanısı konan 60 hasta (yaş ortalaması 77.44±8.56) ve 30 sağlıklı bireyden oluşturuldu (yaş ortalaması 74.52 ± 5.14). AH'nın tanısı DSM-IV ve NINCDS-ADRA kriterlerine göre kondu<sup>23,24</sup>. AH dışındaki diğer nörolojik bozukluklar ve/veya psikiyatrik bozukluklar, klinik düzeyde depresyonu bulunan hastalar ile birlikte beyin tümörü, subdural hematoma ve kronik alkolizm gibi kognitif fonksiyonların bozulduğu durumlar çalışmaya dahil edilmedi. Aynı zamanda ağır hiperlipidemili (total kolesterol >300 mg/dl, trigliserid >300 mg/dl) olgular ve antioksidan kullananlar çalışma kapsamına alınmadı. Hastalık süresi 8.4±4.7 yıl olarak bulundu. Demans derecesi Demansın Klinik Evrelendirilmesi Ölçeği (CDR) ile evrelendirildi. Hastaların demans derecesi hastalık seyrine göre erken, orta ve ileri evre olmak üzere sınıflandırıldı. Çalışmaya Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmaya Etik Kurul'un (29.02.2012 tarih ve 2012/06/01/06 sayılı) onayı ile başlandı. Tüm katılımcılardan yazılı onamları alındı.

### Laboratuvar analizi

Hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan açık kan örnekleri 3000 rpm'de +4°C de santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Eritrositler serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve supernatant kısımları atıldı. Eritrositler ve plazma örnekleri 80°C'de analiz yapılmaya kadar saklandı. Serum DCLK-1 düzeyleri USCN Life ELISA kit ile ölçüldü. Çalışma kitinin

ölçüm sınırı 0.055 ng/mL idi. Ölçüm içi ve ölçümler arası değişkenlik katsayıları sırasıyla % 10 ve % 12'den düşüktü. Serum tau düzeyleri Immün diagnostik - Cusabio ELISA kit ile ölçüldü. Ölçüm içi ve ölçümler arası değişkenlik katsayıları sırasıyla % 8 ve % 10'dan düşüktü. Çalışma kitinin ölçüm sınırı 3,9 pg/mL idi.

Serum örneklerinden Shimadzu Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (AA-680, Tokyo, Japan) ile serum çinko düzeyleri ölçüldü Titrisol 1000±0.002 gr (Merck) standart stok solüsyondan 0.5 ve 1 mg/l'lik standart çözeltiler hazırlandı. Blank olarak çift distile su kullanıldı. Çinkoya ait özel dalga boyunda ışık veren HCL (Hallow Cathod Lamp) lamba, hava-asetilen gaz karışımı, slit aralığı ve BGC (Back Ground Correction) modları cihaz üzerinde seçildi. Blank ve standart çözeltiler cihaza verilerek kalibrasyon grafikleri çizdirildi. Sonuçlar µg/dl olarak hesaplandı.

### Oksidan durumu parametrelerinin ölçümü

Eritrosit GSH konsantrasyonu Beutler'in yöntemine göre 5'5'-ditiyotrobenzoik asit ile renk oluşturularak ölçüldü<sup>25</sup>. Katalaz ölçümü Goth ve ark'nın metoduyla<sup>26</sup>, serum protein karbonin grup ölçümü Reznick ve arkadaşlarının metoduyla spektrofotometrik olarak saptandı<sup>27</sup>. Serum MDA

düeyleri Buege and Aust'un spektrofotometrik metodu ile saptandı<sup>28</sup>. Diğer biyokimyasal parametreler (total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid, glukoz); Beckman Coulter AU 680 (Germany) biyokimya otoanalizörü ile fotometrik yöntemler kullanılarak orijinal ambalajındaki Beckman coulter ticari kitleri ile ve B 12 vitamini düzeyleri Cobas e411 cihazı ile elektrokemiluminesans yöntemi ile (Roche Diagnostics) ölçüldü.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için; tüm gruplarda Kolmogorov-Smirnov testi yapılarak parametrik dağılım ve non-parametrik dağılım gösterenler tespit edildi. Parametrelerde gruplar arası farklılığın incelenmesi amacıyla; parametrik dağılım gösteren testler için Independent-t testi, non-parametrik dağılım gösteren testler için Mann-Withney U testi kullanıldı. Gruplar içinde incelenen parametreler arasındaki ilişkileri saptamada; normal dağılımlar için Pearson korelasyon analizi, normal olmayanlar için Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Stepwise regresyon analizi ve reciever operator characteristics eğrisi (ROC) ile hasta grubu risk faktörleri açısından değerlendirildi. Tüm istatistik analizler için SPSS 18.0 programı kullanıldı, p değerlerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Tablo 1. Alzheimer hastalığı ve kontrol grubunun klinik ve laboratuvar bulguları**

Parametre	Kontrol Grubu (n=30)	Alzheimer Hastalığı (n=60)
Yaş (yıl)	77.44 ± 8.56	74.52 ± 5.14
BKİ (kg/m <sup>2</sup> )	26.71 ± 2.61	27.44 ± 3.24
SKB (mmHg)	120 (90-130)	135 (115-200)
DKB (mmHg)	80 (60-90)	92 (70-150)
Glukoz (mg/dl)	90.26 ± 11.64	101.08 ± 16.44
Trigliserid (mg/dl)	133.87 ± 89.37	132.80 ± 60.56
T Kol (mg/dl)	209.09 ± 50.56	213.47 ± 46.99
HDL (mg/dl)	48.6 ± 14.21	52.14 ± 14.32
LDL (mg/dl)	133.64 ± 37.98	138.08 ± 41.58
Vitamin B12 (pg/mL)	348.49 ± 182.39	300.6 ± 237.52
MMSE Skoru	26 (24.00-30.00)	10 (18-30) ***
CDR	-	1.82 ± 0.58
Çinko (µg/dL)	183.43 ± 47.92	150.21 ± 42.44*
DCLK-1 (ng/mL)	1.71 (0.19 – 7.92)	3.13 (0.25 – 9.62)**
Tau (pg/mL)	20.27 ± 6.02	28.17 ± 7.15 ***

BKİ, Beden Kitle İndeksi; SKB, Sistolik Kan Basıncı; DKB, Diastolik Kan Basıncı; T Kol, Total Kolesterol; HDL-C, Yüksek-Dansiteli Lipoprotein; LDL-C, Düşük-Dansiteli Lipoprotein MMSE, Mini-Mental Durum Değerlendirmesi; CDR, Klinik Demans Skoru; DCLK1, Doublecortin-Like Kinase 1.

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001;

## BULGULAR

Çalışmamızda AH'li ve kontrol grubunun klinik bulguları ve laboratuvar sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Serum DCLK-1 ve tau düzeyleri AH'da kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla  $P<0.01$ ,  $p<0.001$ ). Çinko düzeyleri ve MMSE skorları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı (sırasıyla  $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ).

Oksidan statü değerlendirildiğinde: AH olan grupta MDA, PCG düzeyleri anlamlı olarak yüksek ve GSH, katalaz düzeyleri anlamlı olarak düşük saptandı (sırasıyla  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) (Tablo 2). CDR skorlaması ile AH grubu hafif, orta ve ciddi olmak üzere üç gruba ayrıldı. DCLK-1 ve MDA düzeyleri ciddi AH olan grupta hafif gruba göre anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla  $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 2. Alzheimer hastalığı ve kontrol grubunda oksidatif stress parametrelerinin karşılaştırılması**

Parametre	Kontrol Grubu (n=30)	Alzheimer Hastalığı (n=60)
MDA ( $\mu\text{M}$ )	3.22 $\pm$ 0.63	4.27 $\pm$ 0.92 **
PCG nmol/mg protein	1.13 $\pm$ 0.3	1.39 $\pm$ 0.39*
Tiol Grup ( $\mu\text{M}$ )	337.9 $\pm$ 52.17	301.66 $\pm$ 53.15
Katalaz (kU/L)	51.14 $\pm$ 12.3	40.37 $\pm$ 9.75**
GSH (mg/gHb)	3.67 $\pm$ 0.87	3.16 $\pm$ 0.26*

Malondialdehit; MDA, Protein Karbonil Grup; PCG, Glutasyon; GSH,  
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Tablo 3. Alzheimer hastalarının CDR skorlamasına göre laboratuvar bulguları**

Parameters	Hafif (n=20)	Orta (n=29)	Ciddi (n=11)
MDA ( $\mu\text{M}$ )	3.23 $\pm$ 0.62	4.30 $\pm$ 0.92	4.9 $\pm$ 1.01 b*
PCG (nmol/mg protein)	1.23 $\pm$ 0.38	1.41 $\pm$ 0.39	1.55 $\pm$ 0.41
Tiol Grup ( $\mu\text{M}$ )	294.92 $\pm$ 50.89	304.676 $\pm$ 56.12	296.65 $\pm$ 38.24
Katalaz (kU/L)	37.91 $\pm$ 9.41	38.86 $\pm$ 9.02	39.93 $\pm$ 10.06
Vitamin B12 (pg/mL)	371.16 $\pm$ 253.99	336.17 $\pm$ 233.77	273.45 $\pm$ 148.35
Çinko ( $\mu\text{g/dL}$ )	154.80 $\pm$ 31.99	149.12 $\pm$ 4.12	143.65 $\pm$ 56.46
GSH (mg/gHb)	3.17 $\pm$ 0.28	3.16 $\pm$ 0.24	3.11 $\pm$ 0.24
DCLK-1 (ng/mL)	0.74 $\pm$ 0.32	3.43 $\pm$ 2.5	4.89 $\pm$ 2.56 b**
Tau (pg/mL)	26.14 $\pm$ 6.01	29.35 $\pm$ 7.6	29.44 $\pm$ 8.67

Malondialdehit; MDA, Protein Karbonil Grup; PCG, Glutasyon; GSH, DCLK1, Doublecortin-Like Kinaz 1; a: Hafif olan grup ile Orta grup arasında, b: Hafif olan grup ile Ciddi grup arasında, c: Orta olan grup ile Ciddi grup arasında.  
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

AH olan gruba uygulanan korelasyon analizinde; DCLK-1 ile CDR ve MDA arasında pozitif korelasyon ve çinko, MMSE ve B12 vitamini değerleri arasında negatif korelasyon saptandı ( $r=0,502$ - $p<0.01$ ;  $r=0,362$ - $p<0.01$ ;  $r=-0,405$ - $p<0.01$ ;

$r=-0,369$ - $p<0.01$ ;  $r=-0,464$ - $p<0.01$ ) (Tablo 4). AH'li olan grupta uygulanan stepwise regresyon analizinde; DCLK-1 ile vitamin B12 ( $p=0,008$ ), CDR ( $p=0,001$ ) ve çinko ( $p=0,005$ ) arasında anlamlı bir ilişki bulundu (Tablo 5)

**Tablo 4. Alzheimer hasta grubunda korelasyon analizi bulguları (r değeri)**

	DCLK1
CDR	0.502**
Vitamin B12	-0.464**
MDA	0.362**
Çinko	-0.405**
MMSE	-0.369**

Klinik Demans Skoru: CDR, Malondialdehit; MDA, Mini-Mental Durum Değerlendirmesi:MMSE.  
\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Table 5. Stepwise regresyon analizi ile üç faktör ve DCLK-1 düzeylerinin korelasyonu**

	Regresyon katsayısı	Standard hata	P value
(Sabit)	3.965	1.408	0.008
Vitamin B12	-0.004	0.001	0.008
CDR	1.695	0.473	0.001
Çinko	-0.020	0.007	0.005

AH'li olan grupta uygulanan ROC analizi bulguları değerlendirildi. AH'li hastalarda biyobelirteçlerin etkililiğini öngörmeye tau, DCLK-1, Vitamin B12 ve çinko parametreleri için ROC analizi yapıldı. Analiz sonucunda tau (Eğri altındaki alan (AUC)=0.807 %95 CI= 0.702-0.908) ve DCLK-1 (AUC=0.723

%95 CI=0.610-0.837) parametrelerinin öngörmeye tanılabilirliğinin anlamlı olduğu görüldü. Ancak vitamin B12 ve çinko değişkenleri için AUC değerleri, ROC eğrisi altında kalan alanların kabul değeri olan 0.700' ün altında bulundu (Tablo 6).

**Tablo 6. Biyobelirteçler ile risk gruplarının ROC analiz sonuçları**

Parametre	AUC	Std. Error	p	95% Confidence Interval	
				Alt limit	Üst limit
Tau	0.807	0.051	0.000	0.706	0.908
DCLK-1	0.723	0.058	0.001	0.610	0.837
B12	0.362	0.063	0.045	0.240	0.485
Çinko	0.278	0.057	0.001	0.165	0.390

AUC: Eğri altında kalan alan (>0.70 geçerli alan)

## TARTIŞMA

AH'nın patogenezi hakkında birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır. Hastalığın patofizyolojisini açıklamak için birçok teori ortaya atılmıştır<sup>3,15</sup>. Ancak hangi neden ve/veya nedenlerin bu süreçteki ne ölçüde etkili olduğu tartışmalıdır. AH'da en dikkat çekici durum nöronlarda anormal proteinlerin birikimidir. Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ve amiloid prekürsör proteinlerinin parçalanmış ürünlerinin (beta42) birikimi gösterilmiştir<sup>13,14</sup>. Modifiye proteinlerin oluşumunda serbest radikallerin ve eser elementlerin rolü birçok çalışmada gösterilmiştir<sup>4,5,10,12</sup>. Bizim çalışmamızda da AH'da beklendiği gibi tau düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanması bu sonucu desteklemektedir (p<0.01).

Nöronların en önemli işlevi nörotransmitter salınımı ve geri alınımıdır. Bu nedenle nöronların mikrotübül fonksiyonu oldukça gelişmiştir<sup>29</sup>. DCLK-1 mikrotübüllerle ilişkili proteinlerden biridir ve nöronlarda kritik rolleri vardır<sup>16,17</sup>. Ancak AH'da henüz DCLK-1 düzeylerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda DCLK-1, AH'li grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı (p<0.01) (Tablo 1). Bu sonuç AH'nin patofizyolojisinde rol oynayabileceğini

göstermektedir. İlginç şekilde Xia ve ark.'nın<sup>30</sup> Parkinson oluşturulmuş hayvan modellerinde yaptıkları proteomik çalışmasında DCLK-1 düzeylerinin varlığını göstermişlerdir. Aynı zamanda Jeong ve ark.<sup>22</sup> Alzheimer oluşturulmuş mice modelinde DCLK-1 ile ilişkili olan doublecortinin immun reaktivitesinin arttığını göstermiştir. Bu bulguları destekler şekilde DCLK-1'in kinaz domainin aşırı ekspresyonunun GABA-erjik nörotransmisyon yolağında ve mikrotübül ilişkili proteinlerin transportunda anormalliklere yol açtığı gösterilmiştir<sup>31</sup>. Dolayısıyla bu sonuçlar doublecortin ve DCLK-1'in AH'nin patofizyolojisinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda CDR skorlaması ile AH grubu hafif, orta ve ciddi olmak üzere üç gruba ayrıldığında, DCLK-1 düzeyleri ciddi AH olan grupta hafif gruba göre anlamlı olarak yüksek saptandı (Tablo 3). Dolayısıyla hastalık aktivitesi arttığında DCLK-1 düzeylerinde buna paralel olarak arttığı görülmektedir. Ciddi AH olan grupta hafif gruba göre tau düzeylerinde artış görülmüştür ancak bu artış istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmamıştır.

Çinko eksikliği ile AH arasında önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır ve AH olanlarda serum çinko düzeyleri anlamlı olarak düşük saptanmıştır<sup>11,32,33</sup>. Bulgularımız bu çalışmaları destekler şekilde çinko

düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ( $p<0.05$ ) (Tablo 1).

Oksidatif stress serbest radikallerin arttığı ve antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucu hücresel düzeyde hasarla sonuçlanan önemli bir patofizyolojik olaydır. Serbest radikallerin açığa çıkması; lipid peroksidasyonuna ve hücre zarı ve proteinlerin oksidatif hasarına yol açar<sup>4,6</sup>. Çalışmamızda serbest radikallerin lipidler ve proteinleri etkilemesi ile oluşan MDA ve protein karbonil grup düzeyleri AH grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 2). Özellikle MDA düzeylerinin ciddi AH'li grupta hafif gruba göre anlamlı olarak yüksek saptanması hastalık şiddeti artıkça oksidatif hasarın arttığını doğrulamaktadır (Tablo 3). AH'da gösterdiğimiz serbest radikal hasar ürünlerinin artışı diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur<sup>34,35,36</sup>. Çalışmamızda; antioksidan kapasiteyi gösteren GSH ve katalaz düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 2). Yapılan çalışmalarda; benzer şekilde kandaki antioksidan maddeler ve enzimlerin düzeylerini AH'da düştüğü gösterilmiştir<sup>37</sup>. Bu bulguların sonucunda AH'da oksidatif stresin artışı açıkça görülmektedir. Korelasyon analizinde DCLK-1 ile MDA düzeyleri arasında pozitif bir ilişki gösterildi. Dolayısıyla DCLK-1 düzeylerindeki değişimin serbest radikal artışından etkilenebileceğini düşündürmektedir.

DCLK-1 ile CDR ve arasında pozitif korelasyon ve çinko, MMSE ve B12 vitamini değerleri arasında negatif korelasyon varlığının gösterilmesi oldukça dikkat çekici bir bulgudur (Tablo 4). AH'li olan grupta uygulanan stepwise regresyon analizinde; DCLK-1 ile vitamin B12, CDR ve çinko arasında anlamlı bir ilişki bulunması bu ilişkinin varlığını önemli şekilde desteklemektedir (Tablo 5). Dolayısıyla AH için risk faktörü olan B12 vitamini ve çinko eksikliği arasındaki bu sonuçlar DCLK-1'in AH'nin patofizyolojisinde etkin bir rol oynayabileceğini göstermektedir. AH'li olan grupta uygulanan ROC analizinde tau ile birlikte tanısıl değerinin yeterli kabul edilen değer üstünde bulunması oldukça dikkat çekicidir (AUC>0.700) (Tablo 6).

Çalışmamızın bazı sınırlamaları vardı. Öncelikle AH'nin serumları elde edilerek çalışılmıştır. Parametrelerin hastaların beyin omurilik sıvısında (BOS) çalışılmaması bir eksiklik. Ancak BOS örneği almak etik olarak uygun olmadığı için yalnızca periferik kan örneği ile çalışılmıştır.

Sonuç olarak çalışmamız beyinde bulunan mikrotübül ilişkili protein olan serum DCLK-1 düzeylerini AH'li hasta grubunda değerlendiren ilk çalışmadır. DCLK-1 düzeylerinin AH'da kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı. Aynı zamanda DCLK-1 düzeyleri ciddi AH olan grupta hafif gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Dolayısıyla hastalık aktivitesi arttığında DCLK-1 düzeylerinde buna paralel olarak arttığı görüldü. Korelasyon analizinde DCLK-1 ile MDA düzeyleri arasında pozitif bir ilişki gösterildi. Bu bulgu DCLK-1 düzeylerindeki değişimin serbest radikal artışından etkilenebileceğini düşündürmektedir. DCLK-1'in AH risk faktörleri (vitamin B12 ve çinko eksikliği) ile ilişkisinin gösterilmesi oldukça önemlidir. Bulgularımıza göre AH'da DCLK-1'in rolü olduğu aşıkardır ancak bu rolün desteklenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### Finansal Destek

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin NKUBAP.00.20.YL.12.01 nolu protokolü ile desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Gilman S. Alzheimers disease. *Perspect Biol Med.* 1997;40:230-45.
2. Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.* 2006;57:513-33.
3. Markesbery WR, Ehmann WD (Çev. B Bilgiç). Alzheimer Hastalığında oksidatif gerilim. In Alzheimer Hastalığı (Eds RD Terry, R Katzman, KL Bick, SS Sisodia (Çev. Ed. H Gürvit):401-14. İstanbul, Yelkovan Yayıncılık, 2001.
4. Smith MA, Nunomura A, Lee HG, Zhu X, Moreira PI, Avila J et al. Chronological primacy of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 2005;26:579-80.
5. Repetto MG, Reides CG, Evelson P, Kohan S, de Lustig ES, Llesuy SF. Peripheral markers of oxidative stress in probable Alzheimer patients. *Eur J Clin Invest.* 1999;29:643-9.
6. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Ankara, Mimoza Yayınları, 1995.
7. Nizamloğlu M, Tiftik MA. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin vitamin E ve selenyum ile ilişkisi. *Türk Vet Hek Derg.* 1992;1:10-3.
8. Mason RP, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membran structure small angle X-ray diffraction analyses. *Free Radic Biol Med.* 1997;3:419-25.
9. Delibaş N, Özcankaya R, Özgüner MF, Boz F.

- Bilişsel durum değişiklikleri, depresif ve psikotik belirtilerle serbest radikal aktivitesinin ilişkisi. *Türk Psikiyatri Derg.* 1996;1:46-52.
10. Mahadik SP, Mukherjee S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia. *Schizophr Res.* 1996;1:1-17.
  11. Takeda A, Tamano H. Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. *Brain Res Rev.* 2009;62:33-44.
  12. Bhatnagar S, Taneja S. Zinc and cognitive development. *Br J Nutr.* 2001;85:139-45.
  13. Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry.* 2009;51:55-61.
  14. Octave JN, Pierrot N. Alzheimer's disease: cellular and molecular aspects. *Bull Acad Natl Med.* 2008;192:323-31.
  15. Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 1999;9:133-46.
  16. Burgess HA, Reiner O. Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones. *Mol Cell Neurosci.* 2000;16:529-41.
  17. Nawabi H, Belin S, Cartoni R, Williams PR, Wang C, Latremolière A et al. Doublecortin-like kinases promote neuronal survival and induce growth cone reformation via distinct mechanisms. *Neuron.* 2015;88:704-19.
  18. Burgess HA, Reiner O. Cleavage of doublecortin-like kinase by calpain releases an active kinase fragment from a microtubule anchorage domain. *J Biol Chem.* 2001;276:36397-403.
  19. Koizumi H, Fujioka H, Togashi K, Thompson J, Yates JR, Gleeson JG et al. DCLK1 phosphorylates the microtubule-associated protein MAP7D1 to promote axon elongation in cortical neurons. *Dev Neurobiol.* 2016;9. doi: 10.1002/dneu.22428.
  20. Le Hellard S, Havik B, Espeseth T, Breilid H, Lovlie R, Luciano M et al. Variants in doublecortin- and calmodulin kinase like 1, a gene up-regulated by BDNF, are associated with memory and general cognitive abilities. *PLoS One.* 2009;4:e7534.
  21. Havik B, Degenhardt FA, Johansson S, Fernandes CP, Hinney A, Scherag A et al. DCLK1 variants are associated across schizophrenia and attention deficit/hyperactivity disorder. *PLoS One.* 2012;7:e35424.
  22. Jeong YH, Kim JM, Yoo J, Lee SH, Kim HS, Suh YH. Environmental enrichment compensates for the effects of stress on disease progression in Tg2576 mice, an Alzheimer's disease model. *J Neurochem.* 2011;119:1282-93.
  23. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th Edition Text Revision (DSM IV TR). Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000.
  24. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ARDRA work group under the auspices of department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology.* 1984;34:939-44.
  25. Beutler E, Duron E, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-8.
  26. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.* 1991;196:143-51.
  27. Reznick Z, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.
  28. Beuge JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
  29. Gardiner J, Overall R, Marc J. The microtubule cytoskeleton acts as a key downstream effector of neurotransmitter signaling. *Synapse.* 2011;65:249-56.
  30. Xia Q1, Liao L, Cheng D, Duong DM, Gearing M, Lah JJ et al. Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. *Front Biosci.* 2008;13:3850-6.
  31. Pedotti P, t Hoen PA, Vreugdenhil E, Schenk GJ, Vossen RH, Ariyurek Y et al. Can subtle changes in gene expression be consistently detected with different microarray platforms? *BMC Genomics.* 2008;9:124.
  32. Brewer GJ, Kanzer SH, Zimmerman EA, Molho ES, Celmins DF, Heckman SM et al. Subclinical zinc deficiency in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2010;25:572-75.
  33. Dong J, Robertson JD, Markesbery WR, Lovell MA. Serum zinc in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008;15:443-50.
  34. Praticò D, Clark CM, Liun F, Rokach J, Lee VY, Trojanowski JQ. Trojanowski. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment. A possible predictor of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002;59:972-6.
  35. Baldeiras I, Santana I, Proença MT, Garrucho MH, Pascoal R, Rodrigues A, et al. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008;15:117-28.
  36. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, et al. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology.* 2005;64; 1152-6.
  37. Fernandes MA, Santana I, Januario C, Cunha L, Oliveira CR. Decreased superoxide dismutase in erythrocytes from patients with Alzheimer's disease. *Med Sci Res.* 1993;21:679-682.