



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

ROFLUMİLAST, ROLİPRAM VE TADALAFİL'İN FARE HİPOKAMPAL
NÖRON (HT-22) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE AMİLOİD BETA PEPTİD İLE
İNDÜKLENEN SESTRİN-2 ÜZERİNE ETKİLERİ

GÖKHAN FAİKOĞLU

DANIŞMAN
PROF. DR. SİBEL ÖZYAZGAN

II. DANIŞMAN
PROF. DR. EMİNE PELİN KELİCEN UĞUR

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ
PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

Bu çalışma 13.01.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Sibel ÖZYAZGAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakülte



Prof. Dr. A. Gökhan AKKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Zeliha YAZICI
Biruni Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Aydın BARLAS
Altınbaş Üniversitesi
Tıp Fakültesi

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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gökhan FAİKOĞLU



İTHAF

Tüm desteğiyle yanımda olan sevgili eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen, her durumda bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren Tez Danışmanım kıymetli hocam Prof. Dr. Sibel Özyazgan'a, yine doktora eğitimim boyunca her zaman ve her konuda öğretmenliği ile bizlere ışık tutan değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. A. Gökhan Akkan'a , Anabilim Dalımızın diğer tüm öğretim üyeleri, asistanları ve personeline;

Tezimin her aşamasına değerli bilimsel katkılarıyla emek veren, tanıdığım ve öğrencisi olabildiğim için kendimi çok şanslı hissettiğim, alçakgönüllülüğü ve içtenliği ile her zaman bana ve eşime örnek olan 2. Tez Danışmanım kıymetli hocam Prof. Dr. Emine Pelin Kelicen Uğur'a;

Hayatımın her anında desteği ve sevgisini esirgemeyen, hayat arkadaşım kıymetli eşim Dr.Kübra Saygısever Faikoğlu' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30620

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alzheimer Hastalığı (AH).....	4
2.2. Alzheimer hastalığı (AH) oluşumu ile ilgili hipotezler	4
2.2.1. Kolinerjik Hipotez.....	4
2.2.2. Aβ Kaskad Hipotezi.....	6
2.2.3. Tau Hipotezi.....	6
2.2.4. Kolesterol Hipotezi	7
2.3. Lizozomlar ve Otofaji.....	8
2.4. Otofaji-Lizozom Yolağı (ALP) ve Alzheimer Hastalığı ile ilişkisi.....	14
2.5. Sestrinler (SESN'ler)	17
2.6. Fosfodiesteraz Enzimi, İnhibitörleri (PDEİ' ler)	21
2.6.1. Fosfodiesteraz Enzimi, İnhibitörleri ve Beyindeki Önemleri	21
2.6.2. Fosfodiesteraz 4 ve inhibitörleri	24
2.6.3. Fosfodiesteraz 5 ve inhibitörleri	26
2.6.4. Fosfodiesteraz 11 ve inhibitörleri	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Hücre Kültürü	29
3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması.....	29
3.1.2. Deneysel AH Hücre Kültürü Modeli için Aβ ₂₅₋₃₅ proteinin hazırlanması:	29

3.1.3. Kimyasallar ve Malzemeler	30
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	31
3.1.5. İstatistiksel Analiz.....	31
3.2. Sitotoksisite Deneyleri	31
3.2.1. Hücre Canlılığının MTT ile ölçülmesi.....	31
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Tedavisi	32
3.3. mRNA- RT-qPCR.....	33
3.3.1. mRNA İzolasyonu.....	33
3.3.1.1. mRNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.....	33
3.3.1.2. cDNA Sentezi.....	33
3.3.1.3. Real-Time qPCR	34
3.3.1.4. Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları	35
3.3.1.5. Relatif Kantitasyon Hesaplanması	36
3.4. Western Blot	36
3.4.1. Hücrelerden Total Protein Ekstrelerinin Elde Edilmesi.....	36
3.4.2. Protein Miktar Ölçümü	37
3.4.3. Protein Elektroforezi	37
3.4.3.1. Protein Örneklerinin Denatüre Edilmesi	37
3.4.3.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS-PAGE Elektroferez	37
3.4.4. Blotlama	38
3.4.5. Antikorla inkübasyon.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Sitotoksisite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
4.2. İn vitro A β ₂₅₋₃₅ ve PDEİ Uygulamalarının RT-qPCR sonuçları:	42
4.3. PDEİ uygulamalarının Western Blot sonuçları:	45
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	57
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	76
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Önemli lizozomal enzimler ve substratları tablosu.....	9
Tablo 2-2. PDE Ailesinin Substrat Çeşitleri ve Dağılımları.	22
Tablo 3-1. Deney gruplarının oluşturulması.....	32
Tablo.3-2. cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri.....	34
Tablo.3-3. cDNA mastermix üzerine eklenen bileşenler.....	34
Tablo 3-4. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları.....	34
Tablo 3-5. Ekpresyon analizi için kullanılan primer bilgileri.....	35
Tablo 3-6. Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bilgileri.....	35
Tablo 3-7. Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları.....	35
Tablo 3-8. Kullanılan primer antikör tablosu.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. AH varlığında nöronal sistemin 3 ana özelliği.	8
Şekil 2-2. Otofajinin farklı tipleri.....	12
Şekil 2-3. Otofajik kesecik oluşumunda rol oynayan mekanizmalar.	13
Şekil 2-4. Alzheimer Hastalığı patogenezinde rol alan başlıca faktörler.....	15
Şekil 2-5. (A) SESN'lerin hedefindeki hastalıklar. (B) ROT'un SESN aktivasyonundaki rolleri.	18
Şekil 2-6. SESN/AMPK/mTOR ilişkisi.....	19
Şekil 4-1(A,B). Fare hipokampal hücre hatlarında (HT-22), artan konsantrasyonlarda PDEİ uygulamalarının hücre canlılığına etkilerini gösteren MTT grafiği.	41
Şekil 4-2. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının <i>SESN2</i> gen ekspresyonuna etkisi.....	42
Şekil 4-3. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının <i>ATG5</i> gen ekspresyonuna etkisi.....	43
Şekil 4-4. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının <i>BECN1</i> gen ekspresyonuna etkisi.....	44
Şekil 4-5. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının <i>SESN2</i> protein ekspresyonuna etkisi.....	45
Şekil 4-6. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının p-AMPK protein ekspresyonuna etkisi.....	46
Şekil 4-7. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının mTOR protein ekspresyonuna etkisi.....	47
Şekil 4-8. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının <i>LC3II</i> protein ekspresyonuna etkisi.....	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- A β Beta-amiloid
 AB Avrupa Birliđi
 ABD Amerika Birleşik Devletleri
 Ach Asetilkolin
 ACTB Beta-aktin insan geni ve protein kısaltması/ human gene and protein abbreviation ACTB/ACTB
 AD Alzheimer's disease
 AH Alzheimer hastalığı
 ALP Autophagy-Lyzosome Pathway; Otofaji-lizozom yolağı
 ALS Amyotrofik lateral skleroz
 AMP Adenozin Mono Fosfat/ Adenosine monophosphate
 AMPK Adenosine monophosphate-activated protein kinase; Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
 APOE Apolipoprotein E
 APP Amiloid prekürsör protein
 APP-CTF amiloid prekürsör proteinin parçalanmış C terminali fragmanı
 APP/PS1 APP^{swE}/PS1^{dE9} (Tg) transgenik fare modeli
 ATCC American Tissue Cell Culture
 ATG5 Otofaji İlişkili Genler 5/ Autophagy Related Genes 5
 ATPaz Adenozin Mono Fosfat Yıkıcı Enzim
 BACE1 Beta Sekretaz 1/ Beta-Secretase 1
 BAP Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
 BDNF Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
 BECN1 BCL2 ile etkileşen protein/ BCL2-interacting protein
 Ca Kalsiyum
 CA1 Hipokampüsün spasyal (uzaysal) öğrenme ve bellek için gerekli olan bölgesi
 cAMP Siklik AMP
 cDNA Tamamlayıcı DNA/ Complementary DNA
 CE Sitoplazmik Ekstre Tamponu /Cytoplasmic Extract
 cGMP Siklik guanozin monofosfat
 CREB Hücresel transkripsiyon faktörü/ Cellular transcription factor
 ÇET Çekirdek Ekstresi Tamponu
 DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium
 DMSO Dimetil sülfoksit
 DNA Deoksiribonükleik Asit
 DNS Tiyenotriazolopirimidinon fosfodiesteraz-1 (PDE1) inhibitörü/
 dNTP mix Deoksiribonükleotid Trifosfatlar
 DS Down sendromu
 DTT Dithiothreitol
 EDTA Etilen diamin tetraasetik asit
 EMA Avrupa İlaç Ajansı
 FBS Fetal bovine serum; Fetal sığır serumu
 FDA U. S. Food and Drug Administration
 FoxO Forkhead box protein
 GDNF Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör/ Glial cell-derived neurotrophic factor
 GSH İndirgenmiş Glutatyon, Glutamilsisteinilglisin/ Glutamylcysteinylglycine

HEPES [4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit](4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)]
 HH Huntington hastalığı
 HT-4 Fare hipokampal nöronal hücre hattı
 HT-22 Fare hipokampal nöronal hücre hattı
 İB İbudilast
 IL İnterlökin
 İUC İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
 KATP ATP-duyarlı K⁺ kanal (KATP) aktivatörü
 KBE Kan beyin engeli
 KCl Potasyum Klorür
 LC3II Microtubule associated protein light chain 3; Mikrotübülle ilişkili protein hafif zinciri 3
 LDH Lizozomal depo hastalıkları
 LDH Laktat dehidrojenaz
 LEV Levosimendan
 LTP Uzun süreli potansiyasyon; Long term potentiation
 MDA Malondialdehit
 MIF Migrasyon inhibitör faktörü
 MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin/ 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
 Mrna Mesajcı Ribonükleik Asit
 MS Multiple sklerosis
 MT1/MT2 Melatonerjik reseptör agonisti
 MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
 mTOR Mammalian target of rapamycin; rapamisin protein kompleksinin memelilerdeki hedefi
 MTORC1 mammalian target of rapamycin complex 1 or mechanistic target of rapamycin complex 1-Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
 NaCl Sodyum Klorür
 NAD⁺ Nikotinamid adenin dinükleotid
 NE Çekirdek Ekstresi Tamponu (Nuclear Extract)
 NFκB aktive B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı/ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 NGF Sinir büyüme faktörü
 NMDA N-metil-D-aspartat
 NO Nitrik Oksit
 NP-40 çeşitli protein yöntemlerinde kullanım için noniyonik bir deterjan
 PAS Fagozomal montaj bölgesi (Phagosomal Assembly Site)
 PH Parkinson hastalığı
 PBS Phosphate buffered saline; Fosfat tamponlu çözelti
 PDE Fosfodiesteraz enzimi
 PDEİ Fosfodiesteraz enzimi inhibitörleri
 PGC1a Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)
 PH Parkinson hastalığı
 PI3K Fosfotidil inositol 3-kinaz
 PKA Protein kinaz A
 PKG Protein kinaz G

PPAR-c Peroksizom proliferatör-aktive reseptör
PSEN1 Presenilin 1
p-AMPK Fosforile (Aktif) Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
p-mTOR Fosforile (Aktif) Rapamisin protein kompleksinin memelilerdeki hedefi
RB1 Buffer RNA Bağlama Tamponu/ RNA Binding Buffer
RNA Ribonükleik Asit
ROT Reaktif oksijen türleri
RNW Buffer Yıkama Tamponu
RQC Ribosome quality control; ribozom kalite kontrol
RT-qPCR Real Time Q-PCR
SE Sitoplazmik ekstre
SESN-2 Sestrin 2
SET Sitoplazmik Ekstre Tamponu
SH-SH5Y İnsan nöroblastoma hücre hatları
SOD Süperoksit Dismutaz
SSS Santral sinir sistemi
SW1 Buffer Yıkama Tamponu
TLR-4 Toll benzeri reseptör 4
TNF α Tümör Nekrozis Faktörü Alfa
ULK-1 Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinazın
UVRAG UV radyasyon direnci ile ilişkili gen
UPS Ubikütin-proteazom sistemi
VIN Vinpocetin
Vps34 Vakuolar Protein Sıralayıcı 34

ÖZET

Faikoğlu, G. Roflumilast, Rolipram Ve Tadalafil'in Fare Hipokampal Nöron (Ht-22) Hücre Kültürlerinde Amiloid Beta Peptid İle İndüklenen Sestrin-2 Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı ve Atlas Biyoteknoloji işbirliği ile Atlas Biyoteknoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmanın amacı; Bu çalışmada amaç, nörodejeneratif hasara ve A β toksisitesine karşı koruyucu olarak arttığı gösterilen, bu etkisinde antioksidan ve otofajiyi indükleyici mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülen sestrin-2'nin nöroprotektif etki için yeni bir hedef olarak ortaya konulması ve bu noktada sestrin-2'nin bu etkisinde rol oynayabileceği düşünülen PDE ile ilişkisinin incelenmesi olmuştur. Alzheimer hastalığı (AH), beyinde amiloid-beta (A β) peptidlerin birikimi ve nörofibriler yumakların oluşumu ile karakterize, bilişsel fonksiyonların azaldığı ve demansın gözlemlendiği nörodejeneratif bir hastalıktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar AH patolojisi ile otofaji yolları arasında da sıkı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Sestrinler (SESN) ise genotoksik ve oksidatif stres gibi çeşitli stres koşullarında artan ve oksidatif stresi baskılayarak etki gösteren proteinlerdir. Çalışmanın sonucunda PDEİ'lerin A β_{25-35} uygulanan hücrelerde farmakolojik etkisini, artan SESN2 ekspresyonunda azalma yaparak ve hücre koruyucu AMPK aktivasyonu ve otofajinin düzenlenmesinde etkin mTOR inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. Nörodejeneratif hasara ve A β toksisitesine karşı koruyucu olarak arttığı gösterilen, bu etkisinde antioksidan ve otofajiyi indükleyici mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülen SESN2'nin PDEİ uygulaması ile azalması PDEİ'lerin hücrede kompensatuvar olarak rol oynadıkları ve SESN2 savunmasına gerek kalmadan koruyucu etki gösterdikleri şeklinde yorumlanabilir. A β_{25-35} uygulaması ile azalan otofaji proteinleri ATG5 ve beclin 1 ve otofaji belirteci LC3II'nin PDEİ uygulaması ile artışı PDEİ'lerin hücreye, koruyucu ve otofajiyi arttırıcı yönde destek verdiklerinin bir kanıtı sayılabilir. Ancak her bir PDEİ'nin otofajinin farklı komponentleri üzerinden etki gösterdiği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Fosfodiesteraz Enzimi İnhibitörleri, Alzheimer Hastalığı, Sestrin-2, Otofaji

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30620

ABSTRACT

Faikoğlu, G. Effects of Roflumilast, Rolipram and Tadalafil on Amyloid Beta Peptide-Induced Sestrin-2 in Mouse Hippocampal Neuron (Ht-22) Cell Cultures. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Pharmacology, Doctoral Thesis. Istanbul.

This study was performed in Atlas Biotechnology Laboratories in collaboration with İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Pharmacology and Atlas Biotechnology. The aim of this study was to present sestrin-2 as a new target for neuroprotective effect and to play a role in this effect of sestrin-2, which was shown to increase protective effect against neurodegenerative damage and A β toxicity and that antioxidant and autophagy inducing mechanisms were responsible for this effect. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the accumulation of amyloid-beta (A β) peptides in the brain and the formation of neurofibrillary tangles which reduced cognitive functions and causes dementia. Recent studies show that there is a close relationship between AD pathology and autophagy pathways. Sestrins (SESN) are the proteins that increase and suppress oxidative stress under various stress conditions such as genotoxic and oxidative stress. As a result of this study, we can say that PDEIs have pharmacological effect in A β ₂₅₋₃₅ treated cells by decreasing increased SESN2 expression and effective mTOR inhibition in cell protection by AMPK activation and regulation of autophagy. Decrease of SESN2 with PDEI application, which has been shown to increase as protective effect against neurodegenerative damage and A β toxicity, which is thought to be responsible for the antioxidant and autophagy inducing mechanisms. It can be interpreted as PDEIs can play a protective role without compensating for SESN2. Increased autophagy proteins ATG5 , beclin-1 and autophagy marker LC3II with PDEI administration are decreased by the application of A β ₂₅₋₃₅. However, it can be said that each PDEI acts on different components of autophagy.

Key Words: Phosphodiesterase enzyme inhibitors, Alzheimer's disease, sestrin-2, autophagy.

Supporting Institution: İUC BAP (Project Number: TDK-2018-30620)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Alzheimer hastalığı (AH), demansın en sık görüldüğü, beyinde amiloid-beta (A β) peptidlerin birikimi ve nörofibriler yumakların oluşumu ile karakterize, nöron kaybı ve inflamasyonun eşlik ettiği, bilişsel fonksiyonların azaldığı, nörodejeneratif hastalıktır. 2019 yılı itibari ile Dünyada 70 milyondan fazla demans hastası olduğu ve bunların üçte ikisinin Alzheimer hastası olduğu Dünya Alzheimer Raporunda bildirilmiştir [1]–[4]

1907 yılında Alois Alzheimer ilk hastalık teşhisini koymasından günümüze kadar geçen 112 yıl içerisinde AH'ye kesin bir tedavi bulunamamıştır.

Epidemiyolojik çalışmalar, AH'nin multifaktöriyel bir hastalık olduğunu göstermektedir. Hastalığın gelişmesinde yaşlanmaya bağlı olarak nöronal, santral ve vasküler bozukluklar önemli role sahiptir. Apolipoproteini kodlayan ve beyinde kolesterol taşınmasında rol alan ApoE geninde ϵ 4 allelini taşıyan bireylerin AH gelişimi açısından 3-15 kat daha yüksek riskli oldukları bulunmuştur [5]. Ayrıca hastalarda hipertansiyon, dislipidemi, diyabet gibi kardiyovasküler hastalık risk faktörlerinin varlığında AH riskinin arttığı da gösterilmiştir [6].

AH tedavisi için Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylı ilaç grupları olan kolinesteraz enzim inhibitörleri, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri ya da bunların kombinasyonları sadece geçici ve semptomatik tedavi sağlayabilmelerinin yanında şiddetli yan etkilere neden olmaktadır [7].

AH'nin en sık görülen demans türü olması nedeniyle yakın gelecekte AH ile daha da sık karşılaşılması olasıdır. Bu nedenle hastalığın patofizyolojik mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması ve bu ışıkta terapötik hedeflerin belirlenmesi elzemdir.

AH'de A β birikimi ve tau fosforilasyonu sonucu nörofibriler yumak oluşumunun nörodejeneratif hasarı başlatan patofizyolojik olaylar olduğu düşünülmektedir [6]. Bir başka deyişle nörodejeneratif protein agregatlarının sentezinde artış ve/veya yıkımında azalma sonucu AH tetiklenmektedir. Bu veriler ışığında A β birikimini veya toksisitesini azaltan ve yıkımını arttıran yaklaşımlar, AH gelişimini önleyebilir ya da yavaşlatabilir[1].

Güncel çalışmalar otofajinin, AH'nın patofizyolojisini oluşturan A β gibi protein agregatlarının lizozomal yıkımla parçalanmasında ve hücreden uzaklaştırılmasında yaşamsal öneme sahip olduğunu bildirmektedir[8]–[12].

Otofaji A β peptid gibi yanlış katlanan nörodejeneratif proteinlerin ve hasarlı organellerin enzimatik yolla parçalanarak hücreden uzaklaştırılmaları için gereklidir [13]. Beyin dokularında A β 'nın aşırı birikimi oksidatif strese neden olarak çoğu hücre içi organellere zarar verebilir. Otofaji hasarlı organellerin ve makromoleküllerin kontrollü uzaklaştırılmasını sağlayarak sinir koruyucu roller üstlenmektedir [14].

Alzheimer hastalarının beyinlerinde etkilenen bölgelerin çekirdek ve mitokondri DNA'ları hasara uğramaktadırlar [15]. Genotoksik ve oksidatif stres gibi çeşitli stres koşullarında artan sestrinler (SESN) oksidatif stresi baskılayarak etki gösteren proteinlerdir [16]. Sestrin-2 (SESN2) memeli hücrelerinde eksprese olan üç adet sestrin izoformundan en çok çalışılmış olanıdır ve hücre koruyucu etkinliğinde, serbest radikalleri süpürücü antioksidan ve otofajiyi indükleyici aktivitelerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir[17-18].

SESN2 stres şartlarında indüklenmektedir [19].Otofaji indüksiyonunu AMP-bağımlı protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ile rapamisininin memelilerdeki hedefi (mammalian target of rapamycin) mTOR'u baskılayarak gerçekleştirmektedir [20], [21]. A β 'nın primer sıçan kortikal hücre kültürlerinde SESN2 artışına sebep olduğu, antioksidan ve otofaji yolaklarını harekete geçirdiği bilinmektedir. Bu veriler SESN2 indüksiyon ya da inhibisyonunun nörodejeneratif bir hastalık olan AH ile ilişkisini işaret etmektedir. SESN2 stres şartlarında p53 ile indüklenerek, AMPK aktivasyonu ile baskılanan mTOR aracılığıyla otofaji indüksiyonunda rol almaktadır [22].

Yapılan çalışmalarda A β 'ya maruziyet farklı sinir hücre kültürlerinin SESN2 ekspresyonunu arttırmış [8],[10] antioksidan ve otofaji yolaklarını harekete geçirmiştir. Bir transgenik AH fare modelinde, hayvanların beyin kortekslerinde SESN2 ekspresyonunda ve otofaji belirteci LC3B-II'de eş zamanlı artış izlenmiştir. Bu veriler SESN2 indüksiyonu ya da inhibisyonunun nörodejeneratif bir hastalık olan AH ile yakın ilişkisini ve bu ilişkide otofaji yolaklarının rol oynadığını göstermektedir[23].

Fosfodiesteraz enzim inhibitörlerinin (PDEİ) nörolojik ve psikiyatrik hastalıklardaki etkilerine vurgu yapan çalışmalar son dönemde gündemdedir[24]. Fosfodiesterazlar (PDE'ler), ikincil ulaklar olan siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfatları (cGMP) kendi inaktif 5'-monofosfatlarına metabolize eden metallofosfohidrolaz enzimleridir[25]. Siklik nükleotid hidrolizinin selektif PDE inhibitörleri ile bloke edilmesinin faydası depresyon, şizofreni, AH ve iskemi gibi çeşitli beyin patolojilerinde görülebilmektedir[26]. Ayrıca resveratrol gibi nonspesifik ve silostazol gibi spesifik iki PDE inhibitörünün, AH hastalık modelleri ve otofaji üzerindeki etkileri bu hipotetik düşüncüyü desteklemektedir[27].

Çalışmamızda amacımız, nörodejeneratif hasara ve A β toksisitesine karşı koruyucu olarak arttığı gösterilen, bu etkisinde antioksidan ve otofajiyi indükleyici mekanizmalardan sorumlu olduğu düşünülen SESN2'nin nöroprotektif etki için yeni bir hedef olarak ortaya konulması ve bu noktada PDEİ'lerin SESN2 üzerinden sinir koruyucu ve otofaji indükleyici farmakolojik rolleri incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı (AH)

Alzheimer hastalığı (AH) bilişsel ve davranışsal yetersizliklerle karakterize en önemli ilerleyici tipte nörodejeneratif bozukluktur [28]. Pek çok genin ve çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan, binlerce genin ekspresyonunun değişebildiği, multiple patojenik yolların eşlik ettiği, nöronlarda β amiloid depolanması, tau hiperfosforilasyonu, inflamasyon, oksidatif stres, enerji metabolizması ve hücrelerin hücre döngüsü ve apoptoza girişlerindeki hatalar ile kendini gösteren, etiyojisi ve patogenezi belirlenemeyen bir hastalıktır [29].

Alzheimer hastalarının otopsi materyallerinden elde edilen veriler hastalığın patolojisinde, amiloid plak ve nörofibriller yumakların varlığını, bu patolojik agregatların belirli dağılım paterni ve yoğunluk sergilediklerini göstermiştir [30]. Moleküler çalışmalar amiloid plakların ana komponentinin amiloid beta ($A\beta$), nörofibriller yumakların ise tau proteini olduğunu göstermiştir [27-28]. Gözlenen bu nöropatolojik oluşumların en fazla hafıza ve bilinçle ilgili beyin bölgesi hipokampüsta izlenmesi AH'nin en belirleyici semptomlarından hafıza kaybı ve görsel-uzaysal yeteneklerde azalma ile yakından ilişkilidir [1].

Demansın en sık nedeni olan, ilerleyici hafıza kaybı ve bilişsel bozulma ile karakterize AH, Dünya' da yaklaşık 44 milyon insanı etkilemektedir [33]. AH ile ilgili bazı araştırmalar etkili bir tedavi bulunmadığı takdirde yaklaşık 65.7 milyon insanın 2030 yılına kadar, 115,4 milyon insanın 2050 yılına kadar demansa yakalanacaklarını bildirmektedir [34]. Hali hazırda günümüzde kullanılan AH'ye yönelik tedaviler sadece klinik semptomları iyileştirmeyi ve bilişsel fonksiyonlardaki kaybı geciktirmeyi hedefleyebilmektedir. Bu sebepten AH patofizyolojisine yönelik ilaç bazlı yeni tedavi seçeneklerine acilen ihtiyaç bulunmaktadır.

2.2. Alzheimer hastalığı (AH) oluşumu ile ilgili hipotezler

2.2.1. Kolinerjik Hipotez

Kolinerjik hipotez, AH patofizyolojisinde sorgulanan hipotezlerin ilki, en eskisi ve en çok irdelenenidir. AH, kolinerjik fonksiyon bozukluğu ve asetil kolin (Ak) sentezinde meydana gelen azalma ile ilişkilendirilmektedir [35]. Presinaptik kolinerjik

terminallerde bulunan nikotirik ve muskaririk asetilkolin reseptörü sayısındaki azalmanın bilişsel işlevi azalttığı yine çalışmalarla gösterilmiştir [32-33].

AH'de Ak sentezinde gerçekleşen azalmanın, kolinasetiltransferaz (KAT) enziminin miktar ve işlevlerinin kolin geri alımının azalmasına, kolinerjik nöron ve aksonlarda oluşan hasarlara, korteks ve hipokampüsa projekte olan kolinerjik nöronlarda meydana gelen kayıplara bağlı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca AH'de öğrenme ve bellek üzerine etkileri bilinen nikotirik (N) reseptörlerde ve presinaptik muskaririk (M2) reseptörlerde kayıplar gözlenirken, postsinaptik M1 muskaririk reseptörlerin yoğunluğunda ise değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir[38].

AH'de gerçekleşen kolinerjik kaybın, bu hastalarda izlenen davranışsal ve psikiyatrik belirtilerden olan depresyon, ajitasyon, anksiyete, psikoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [39]. Kolinerjik disfonksiyon ile beraber serotonerjik ve dopaminerjik nörotransmisyonunda meydana gelen düzensizliklerin ve nöron kayıplarının söz konusu belirtilerin ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir [35-36].

Eksitoksisite mekanizması, kolinerjik hipotez ve nörodejenatif hastalıklar arasındaki ilişkiyi destekleyen yaklaşımlardandır.

Nörodejenatif hastalıklar, nöron kaybına bağlı ilerleyen işlev bozukluğu ve belirli nörolojik hasarlar ile karakterizedir [41]. Güncel çalışmalar uyarıcı amino asitlerin, beyin korteksi ve hipokampüstaki önde gelen uyarıcı nörotransmitterler olarak çalıştıklarını göstermiştir. Öğrenme ve hafıza gibi psikolojik işlevlerde uyarıcı amino asit içeren nöronlar önemli rol oynarlar [42].

Uyarıcı amino asit sisteminin aşırı aktivitesi hücre için zararlıdır. Uyarıcı amino asitlerin toksik etkilerinden kaynaklanan hücre ölümü eksitoksisite olarak tanımlanır. Glutamat, memeli santral sinir sisteminde (SSS) ana uyarıcı nörotransmitterdir. Nöronal eksitotoksisite genellikle aşırı glutamat maruziyetine bağlı iyonların hücreye yoğun olarak girmesinden kaynaklanan nöronların hasarlanması ve ölümünü ifade eder. Eksitoksisiteye bağlı hücre içinde oluşan aşırı kalsiyum yükü nörotoksiktir ve proteinleri, membranları ve nükleik asitleri parçalayan enzimlerin aktivasyonuna neden olmaktadır [38-39].

2.2.2. A β Kaskad Hipotezi

Amiloid kaskad hipotezi hastalığın patogenezi en iyi açıklayan hipotezdir ve bu hipotezde anahtar nokta artmış ve uzun oligomer yapıda A β fibrillerinin oluşmasıdır [44]. Genetik çalışmalar, AH'deki nörodejeneratif olayların, A β peptidi üretimi ve klirensi arasındaki dengesizliğin bir sonucu olduğunu iddia edilmektedir [45].

Tüm AH olgularının %1'inden azı kalıtsal olma (basit Mendelien otozomal dominant geçiş) özelliği taşır [46]. Otozomal dominant geçişten sorumlu olan şimdiye kadar 3 ayrı gen bulunmuştur: amiloid prekürsör protein (APP) geni (21. kromozom), [47] presenilin 1 (PSN1) geni (14. kromozom) [48] ve presenilin 2 (PSN2) geni (1. kromozom) [49].

Ailesel AH'lerin en sık sebebi PSN1'deki mutasyonlardır [46]. PSN1 ve PSN2 genlerinde 160'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Presenilinler APP'nin γ -sekretaz ile bölünmesinden sorumlu atipik aspartil proteaz komplekslerinin merkezi bileşenleridir. A β_{42} / A β_{40} oranı PSN mutasyonları ile artmaktadır [50].

APP'nin bazı enzimler aracılığı ile proteolizi sonucu A β oluşur. Bu işlev nöronal aktivite tarafından düzenlenir ve proteoliz γ -sekretaz, β -sekretaz (BACE1 ya da asp2 ya da memapsin2) ya da α -sekretaz ("TNF α -converting enzyme"=TACE) enzim aktiviteleri tarafından gerçekleşmektedir [27,46].

A β oluşumu özellikle APP genindeki mutasyonlar β - ya da γ -sekretazlar aracılığıyla artmaktadır [47,48] ve sonuç olarak A β fibril oluşumu gerçekleşir [54]. A β 'nin oligomerik formlarda toplanmasıyla oligomerik amiloid fibriller oluşmaktadır [27,28,50,51].

Artmış A β birikimine bağlı olarak AH'nin histopatolojik bulgularından senil plak ve nörofibrillar yumak oluşumları nöronlarda nörotoksik ve nörotropik etkiler oluşturarak nöron kaybına neden olmaktadır.

2.2.3. Tau Hipotezi

Güncel moleküler çalışmalar amiloid plakların ana komponentinin A β , nörofibriller yumakların ise tau proteini olduğunu göstermiştir [28,51]. Tau proteinin hiperfosforilasyonu ve nitrasyonun AH patogeneziinde rol oynayan faktörlerden olduğu [32], yaşlanma ile tau protein aktivitesinde önemli ölçüde azalma gerçekleştiği izlenmektedir [29].

Mikrotübüllerin oluşumunda rol alma ve stabilizasyonlarını koruma taunun bilinen iki ana işlevleridir[56]. Tau olgun bir nöronun en önemli mikrotübül ilişkili proteindir ve taunun hiperfosforilasyonu biyolojik aktivitesini baskılar. Anormal hiperfosforile edilmiş tauların nörofibriler dejenerasyonu AH'de görüldüğü gibi taupatiler denilen ilgili nörodejeneratif hastalıklar ailesinde de saptanmaktadır [57].

Alzheimer hastalarının beyinlerindeki sitozolik anormal hiperfosforile taunun (AHp-tau) % 40 kadarı sitozolde bulunur ve eşleştirilmiş sarmal filamentler/nörofibriller yumakların polimerizasyonunu engellemektedirler [58]–[60]. Ayrıca tübüline bağlanamayan tau mikrotübül oluşumunda fonksiyon gösteremez ve mikrotübül stabilizasyonlarının da inhibe olmasına neden olarak mikrotübül yapılarını bozar [61]–[63].

Tau proteininin anormal şekilde hiperfosforile edilerek filament demetleri halinde toplanması AH'de ve taupatiler adı verilen ilgili nörodejeneratif hastalıklar ailesinde izlenmektedir [64]. Oluşan mikrotübüller çift sarmal veya düz filament şeklindeki nörofibriller yumaklara dönüşerek somatodendritik kompartmanda birikmektedir [65].

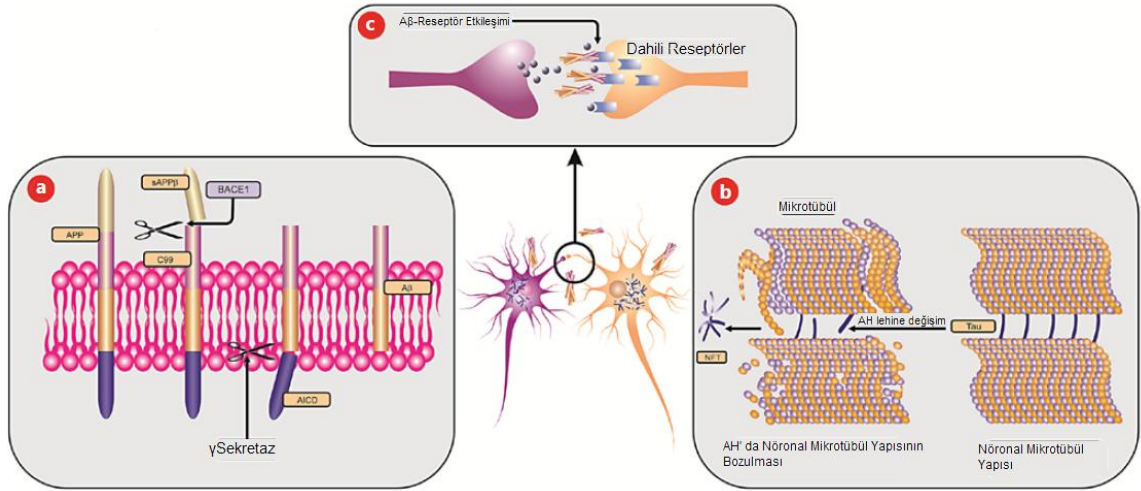
2.2.4. Kolesterol Hipotezi

Yaş, aile öyküsü ve kişinin apolipoproteinE-ε4 (ApoE-ε4) aleline sahip olması AH'nin gelişiminde ortaya konan kesin risk faktörleridir [66], [67]. AH gelişimi açısından apolipoproteini kodlayan *ApoE* geninde ε4 allelini taşıyan bireyler 3-15 kat yüksek risk oranına sahiptirler [5]. Amiloid birikim üzerindeki etkilerine bağlı olarak kolesterolün AH patolojisinde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır [68].

Çalışmalarda beyindeki kolesterol alımı ve taşınmasında ve transgenik farelerde amiloid birikimi için merkezi bir rol oynayan ApoE'nin gerekli olduğu bildirilmektedir [69]. Ek olarak, kolesterolün amiloid üretimini etkilediği [70], [71] ve artmış kolesterol düzeyleri ile AH riskinde artışa neden olduğu da bildirilmektedir.

Özetle genetik, biyokimya ve hücre biyolojisinden elde edilen güçlü kanıtlar AH'nin başlangıcında ve ilerlemesinde Aβ'nin kritik rolünü desteklemektedir [72]. Histolojik açıdan AH'nin ilerlemesi 3 ana nöropatolojik özellik ile ilişkilidir [73], [74].

- a. APP bölünmesi, Aβ'nin ektranöronal oluşumu ve birikmesi.
- b. İntranöronal nörofibriler yumakların oluşumu ve birikmesi.
- c. Aβ birikimi ve reseptörlerle etkileşimi nedeniyle sinaptik fonksiyon bozukluğu.



Şekil 2-1. AH varlığında nöronal sistemin 3 ana özelliği. Sadigh-Eteghad vd [15]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

AH varlığında nöronal sistemin 3 ana özelliği [15]:

- APP bölünmesi ve ekstraneuronal oluşumu ve Aβ birikmesi
- İntranöronal nörofibriller yumakların (NFT)' lerin oluşumu ve birikmesi.
- Aβ birikimi ve reseptörler ile etkileşimi nedeniyle sinaptik fonksiyon bozukluğu.

AH esas olarak neokorteks, hipokampus ve bilişsel işlev için gerekli olan diğer alt kortikal bölgelerde ilerleme ile kendini göstermektedir [75]. Nöropatolojik belirteçlerin ortaya çıkması hastalığın klinik belirti ve semptomlarından yıllar önce ortaya çıktığından AH'nin öngörülebilmesi açısından bu durum yol gösterici olabilir [76]. AH'nin başlangıcında ve ilerlemesinde Aβ peptidi önemli bir risk faktörüdür ve merkezi bir role sahiptir [77]. Sağlıklı bireylerde de üretilen Aβ ancak belirli koşullar altında ekstraneuronal birikerek hastalığın ilerlemesini başlatabilir. Çalışmalar AH'de izlenen nöronal disfonksiyonda Aβ oligomerlerinin rol oynadığını vurgulamaktadır [78][79].

2.3. Lizozomlar ve Otofaji

Otofaji, organel ve makromolekülleri lizozomal olarak parçalayan ve hücre içi homeostaz, farklılaşma ve büyümenin kontrolünde rol alan bir hücre içi olaydır. LC3-I (*microtubule associated protein light chain-3*; mikrotübül ilişkili hafif ağırlıklı zincir) sitozolik protein LC-3II'ye dönüşerek fagoforun membranına bağlanır. Fagofor hücrede biriken makromolekülleri ve yanlış katlanmış protein agregatlarını içine alarak otofagozom yapısını oluşturur. Otofagozom lizozomla birleşerek otolizozomu

oluşturur ve yıkım başlar, böylelikle sinir hücreleri zararlı komponentlere karşı korunur [21][80][81].

Lizozomlar en iyi şekilde ökaryotik hücrelerin primer parçalayıcı bölgesi olarak bilinir. Bu dinamik organeller, 1955 yılında Liège Üniversitesi'ndeki Belçikalı biyokimyacı Christian de Duve tarafından tanımlanmış olan lizozomlar asit fosfataz içeren sitozolik membranla çevrili keselerden oluşan, metabolik olarak yeniden kullanımı mümkün olan, hücrenin yıkım ürünlerinden oluşan tüm makromolekülleri sindirebilen 50'den fazla asit hidrolaz (fosfataz, nükleaz, glikozidaz, proteaz, peptidaz, sülfataz ve lipaz) içeren organellerdir[82][83][84].

Hücre tipine bağlı olarak değişmekle birlikte en sık görülen lizozomal enzimler asit fosfataz, ribonükleaz, deoksiribonükleaz, katepsinler, sülfatazlar, lipazlar ve β -glukuronidazlardır [85][86][87].

Tablo 2-1. Önemli lizozomal enzimler ve substratları tablosu. Dilek Gelmez Beker vd [87]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

	Substrat
Polisakkarit hidroliz edici enzimler	
α -Glukozidaz	Glikojen
α -Fukozidaz	Fukoz
β -Galaktozidaz	Galaktositler
α -Mannosidaz	Mannositler
β -Glukuronidaz	Glukuronitler
Hyaluronidaz	Hyaluronik asit ve kondrotin sülfatlar
Aril sülfataz	Organik sülfatlar
Lizozim	Bakteri hücre duvarı
Protein hidroliz edici enzimler	
Katepsinler	Proteinler
Kollajenaz	Kollajen
Elastaz	Elastin
Peptidazlar	Peptidler
Nükleik asit hidroliz edici enzimler	
Ribonükleaz	RNA
Deoksiribonükleaz	DNA
Lipid hidroliz edici enzimler	
Lipazlar	Trigliseridler ve kolesterol esterleri
Esteraz	Yağ asiti esterleri
Fosfolipaz	Fosfolipidler

Lizozomlar, membran ile çevrili endojen ve ekzojen makromoleküllerin yıkımından sorumlu enzimler içeren veziküllerdir [87]. Lizozomal enzimler granüllü endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra golgi cisimciğinde modifiye edilirler ve lizozomlar içinde mannoz-6-fosfat ile etiketlenerek paketlenirler[88], [89].

Lizozomda bulunan enzimlerin tamamı asit hidrolazdır. Yani asidik ortamda aktif hale gelirlerken bazik ya da nötral ortamda aktivite göstermezler. Lizozom enzimlerinin optimum asiditesi pH 5'tir. Bu sebeple lizozomun pH seviyesinin 5'te sabit tutulması enzimlerin çalışması açısından oldukça önemlidir. Lizozom içi pH'nın 5 olarak kalması, zarda bulunan proton pompalarının sitoplazmadan lizozom içerisine H⁺ pompalaması sayesinde sabit tutulur. Asit hidrolaz enzimlerinin asidik pH'da çalışması hücre açısından ekstra bir koruma yöntemidir. Nötral karaktere sahip olan sitoplazmaya lizozomdan kontrolsüz enzim salınması halinde lizozomal hidrolazlar inaktif halde kalacaklardır. Bu şekilde hücrenin kontrolsüz biçimde otolize uğraması pH farklılığı sayesinde engellenmiş olacaktır.[90].

Lizozom oluşumu da hücre içerisinde meydana gelen başlıca olaylardan bir tanesidir. Lizozom formasyonu, golgi cisimciğinin salgı yolağı ile endositoz yolağının kesişim noktasında başlar. Endositoz sonrası membranın vezikül halinde ayrılmasının ardından ekstrasellüler moleküller kltrin kaplı veziküller içerisinde hücreye alınırlar. Hücre içerisine giren bu vezikül erken endozom ile birleşir. Birleşmenin ardından kltrin kaplı vezikülde bulunan membran bileşikleri plazma membranına geri döner. Bu birleşmenin ardından erken endozomun geç endozoma olgunlaşması gerçekleşir.

Olgunlaşma sırasında meydana gelen en önemli olaylardan biri de vezikül içi pH'nın düşerek yaklaşık 5.5 olmasıdır. Asit hidrolaz enzimlerinin bulunduğu, trans-golgiden ayrılan lizozomal vezikül, üzerinde bulunan mannoz-6-fosfat reseptörleri sayesinde geç endozomun üzerindeki mannoz-6-fosfat rezidülerini tanır, böylece lizozomal vezikül hedeflenmesi doğru şekilde gerçekleşmiş olur. Vezikül içi asiditenin artması sayesinde trans-golgiden salgılanarak lizozomal vezikül içerisinde geç endozoma gelen asit hidrolaz enzimleri birleşmenin ardından yeni oluşan lizozomun lümenine salıverilir. Vezikülden asit hidrolazların salıverilmesinin ardından mannoz-6-fosfat reseptörleri golgi cisimciğine geri dönerler. En son durumda, yeni oluşan lizozomun içinde endositozla hücre içerisinde alınmış ekstrasellüler molekül ve trans-golgiyen gelen asit

hidrolazlar bulunur ve lizozomun içerisinde ekstrasellüler molekülün sindirimi gerçekleşir [90], [91].

Endositoz dışında lizozomlar materyalleri fagositoz ve otofaji yolları ile sindirirler. Fagositozda makrofajlar gibi özelleşmiş hücreler bakteri, hücre artıkları ve yaşlı hücreler gibi vücuttan uzaklaştırılması gereken büyük parçacıkları içlerine alarak parçalarlar. Hücrenin kendi bileşenlerinin ve sitoplazmik organellerin kademeli döngüsünün gerçekleştiği otofajiden de lizozomlar sorumludurlar.

'Otofaji' terimi, Yunanca kökenli bir terim olup 'kendini yeme' anlamına gelmektedir. İlk olarak 1963 yılında Christian de Duve tarafından sıçan karaciğer epitel hücrelerinde keşfedilmiştir [92]. Otofaji hasarlı hücresel proteinleri ve organelleri ortadan kaldıran evrimsel bir süreçtir [93]. Hücre içeriğinin parçalanması ve geri dönüştürülmesinin başlıca yoludur [94].

Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yoksunluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği, böylelikle hücre homeostazının korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir [95], [96]. Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur [96], [97]. Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir [98].

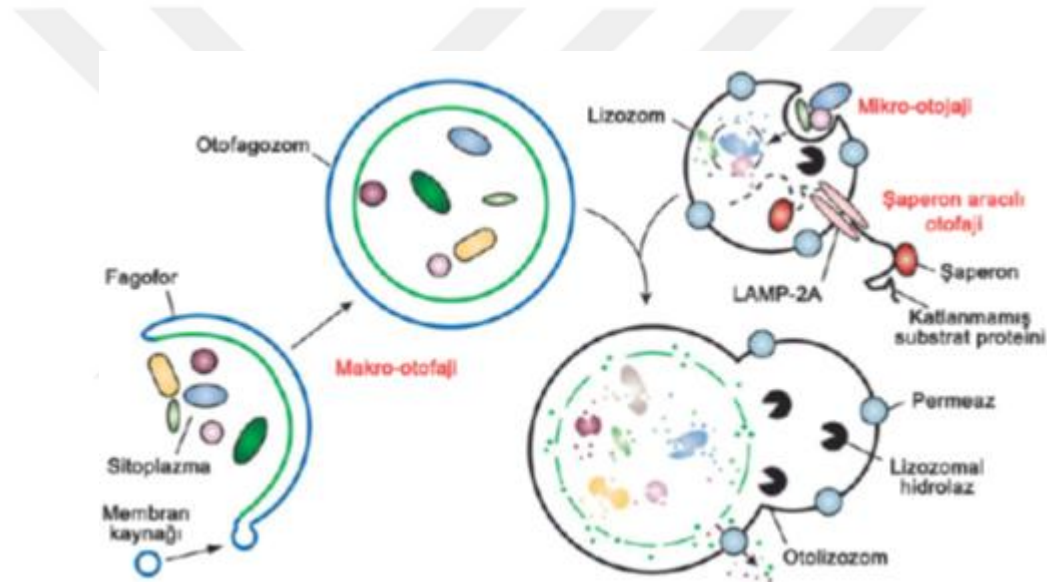
Ökaryotik hücrelerde otofaji oluşma şekline göre makro-otofaji, mikro-otofaji ve şaperon aracılı otofaji olarak sınıflandırılır [99], [100]. Bunların hepsi lizozomda sitozolik bileşenlerin proteolitik bozunmasını teşvik eder ve otofaji ile ilişkili genler (*autophagy related genes*; Atg) ve bunlar aracılı enzimler vasıtasıyla düzenlenir [101]–[104].

Otofaji üç farklı şekilde gerçekleşebilir,

1) *Mikro-otofaji*: Küçük parçacıkların membranda oluşan girintiyle lizozom içine alınıp degradasyonunun yapılmasıdır.

2) *Makro-otofaji*: Otofajik hücre ölümünü oluşturan temel mekanizmadır. Daha büyük parçacıkların, organellerin otofagozom içine alınıp daha sonra lizozomlarla birleşerek meydana gelen degradasyondur.

3) *Şaperon aracılı otofaji*: Belli bir peptid sekanslı sitozolik proteinlerin moleküler şaperonlarla kompleks olan ısı şoku proteinleri (*heat shock proteins*; Hsp73 tarafından tanınması ve lizozomlara taşınmasıdır [96], [105]–[107].

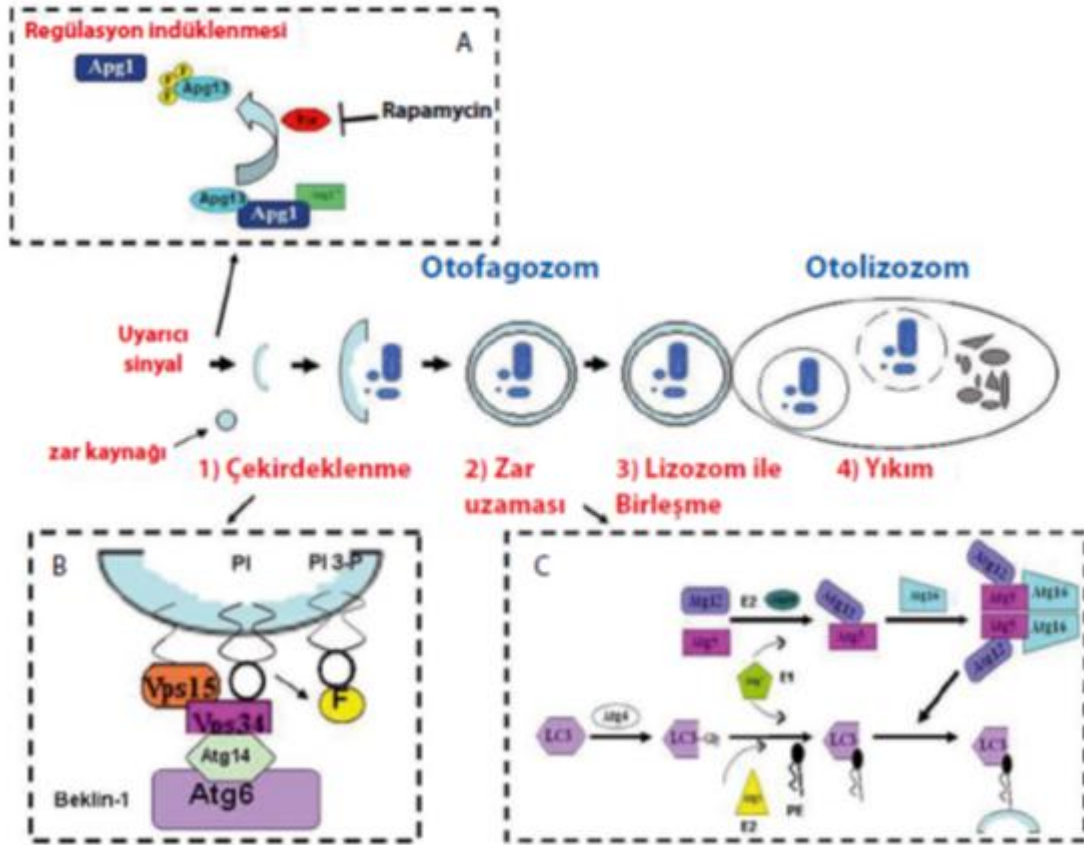


Şekil 2-2. Otofajinin farklı tipleri. Mizushima vd [97]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

Otofaji-lizozom yolağı (*Autophagy-Lysosome Pathway*; ALP) olarak da adlandırılan bu sürecin moleküler düzeyde beş temel aşaması olduğu bildirilmektedir:

1. Fagofor oluşumu;
2. Otofaji-ilişkili proteinlerin (Atg5-Atg12) konjugasyonu, Atg16L ile etkileşim;
3. Mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3 [LC3/II(*Microtubule-associated protein*)]'ü işleme ve uzayan fagofor membranı içine sokma;
4. Parçalanma için rastgele veya seçici hedeflerin yakalanması;

5.Otofagozomun lizozomla füzyonu, ardından yakalanan moleküllerin lizozomal proteazlar ile proteolitik parçalanması [21], [80], [81].



Şekil 2-3. Otofajik kesecik oluşumunda rol oynayan mekanizmalar. Devrim Öz Arslan vd [108]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır. A. mTOR kompleksi; B. Lipid kinaz Vpc 34, düzenleyici enzim Vpc 15 ve Atg6' dan (beklin-1) oluşan PI3K kompleksi. İki ubikütin benzeri mekanizmanın rol oynadığı zar uzaması.

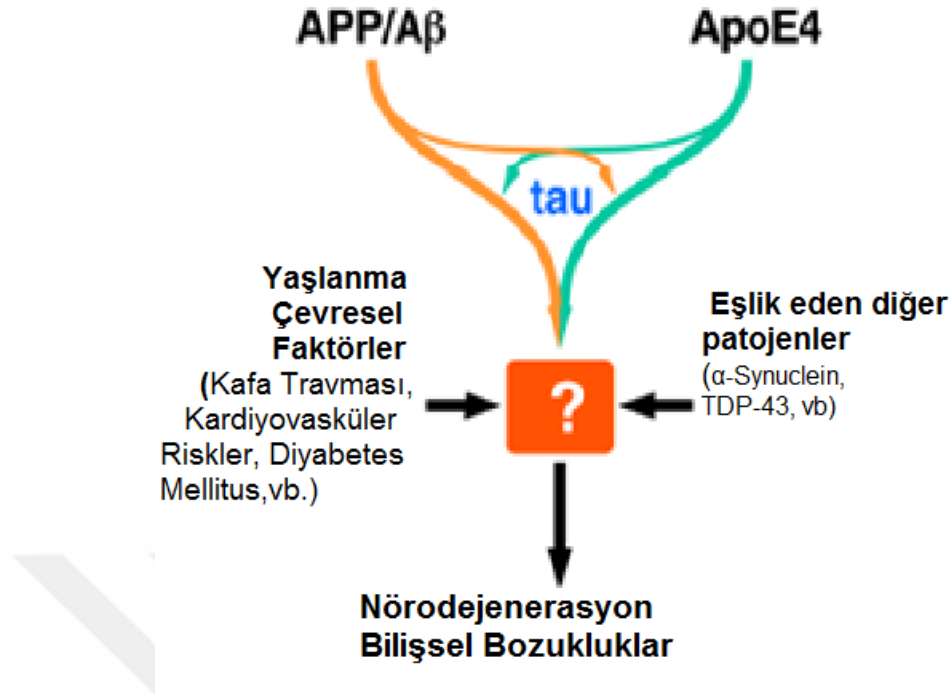
ALP, proteinlerin kalite kontrolünden sorumlu bir yolaktır ve hasarı, toksik proteinlerin, fonksiyon görmeyen mitokondri gibi hasarlı organellerin birikimine neden olarak nörodejeneratif hastalıkların gelişimi ve ilerlemesine neden olmaktadır. Mitokondri hasarı nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde başı çekmektedir [109]. Mitokondri hasarı hücrede enerji yoksunluğuna, serbest radikal üretiminde artışa, proapoptotik faktörlerin mitokondri dışına sızmasına, oksidatif strese ve AH, Parkinson Hastalığı (PH), Huntington Hastalığı (HH), Amiloid Lateral Sklerozis ve Down sendromu gibi nörodejeneratif hastalıklarda gözlenen hücre ölümüne neden olmaktadır[110].

Ribozomal stres durumunda ise ribozom kalite kontrol (*ribosome quality control*; RQC) sistemi hasarlanmaktadır. Mitokondri ile benzer olarak RQC mekanizması aşırı sentezlenen proteinlerin birikimini önleyen bir sistemdir. RQC'deki işlev bozukluğu da düzensiz proteinlerin birikimine ve sinir hasarına neden olur [111]. Çok sayıda araştırma sinir hücrelerinde yaşlanma, spontan apoptoz ve hasarlı otofajinin nörodejerasyona neden olduğunu kanıtlamaktadır[112]. SSS'de hücre içinde birikmiş A β , tau, α -sinüklein gibi yanlış katlanan ve agregre proteinler çeşitli yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir ve AH'nin erken döneminde A β 'nin oligomerizasyonu A β birikiminde kritik öneme sahiptir. Otofaji, AH'nin patolojisini oluşturan A β gibi protein agregatlarının lizozomal yıkımla parçalanmasında ve hücreden uzaklaştırılmasında yaşamsal öneme sahiptir [80].

2.4. Otofaji-Lizozom Yolağı (ALP) ve Alzheimer Hastalığı ile ilişkisi

AH bilişsel ve davranışsal yetersizliklerle karakterize olan en önemli ilerleyici nörodejeneratif bozukluktur [28].Hastalıklı beyin dokularında APP gibi proteinlerinden köken alan A β plakları ve hücre içi nörofibriler yumakların birikimi gözlenmektedir. A β plaklar, APP'nin anormal işlemesi ve aşırı üretiminden dolayı birikir [113]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hücre içi anormal protein temizleme temel yollarındaki (übikülin proteazom sistemi ve otofaji) aksaklıkların, hastalık oluşum ve ilerlemesine katkıda bulunduğuna işaret etmektedir[114].

AH muhtemelen APP/A β , ApoE4, tau, α -sinüklein, TDP-43, yaşlanma ve çeşitli komorbiditeler dahil olmak üzere birçok faktör arasındaki ortak patojenik etkileşimlerden kaynaklanır. Bu faktörlerin nöron fonksiyonlarını ve sağlıklarını tam olarak nasıl etkiledikleri ile ilgili yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır [114].



Şekil 2-4. Alzheimer Hastalığı patogeneğinde rol alan başlıca faktörler. Huang Y vd [114]'nden Türkçeye uyarlanmıştır.

Nörodejeneratif hastalıkların temelini oluşturan protein üretimi ile yıkımı arasındaki dengesizlik protein cisimciklerinin birikimi ile sonuçlanmaktadır ve bunlar arasında A β ve tau birikimini içeren AH öne çıkmaktadır. Lizozomal otofaji bu protein cisimciklerinin başlıca yıkım sistemlerindedir. Otofajinin sinir koruyucu rollerinin başında hasarlı organellerin ve makromoleküllerin kontrollü uzaklaştırılması gelmektedir. Hücre içinde hasarlanmış organeller ile yanlış katlanmış ve aşırı birikmiş proteinler gibi hücre içi yoğun stoplazmik materyalleri parçalayarak hücre homeostazını sağlayan önemli bir yolların başında ALP gelmektedir. AH gibi nörodejeneratif hastalıkların bir sebebi de bu yıkım mekanizmalarındaki hasar olabilmektedir [14], [79], [115]–[114]. Güncel birçok çalışma AH patolojisi ile otofaji yolları arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir [119]–[123].

APP'nin β - ve γ - sekretazlar tarafından ardışık bölünmesiyle başta nöronal endositik kompartmanlarda olmak üzere A β üretilir [124], [125]. Oligomerik, protofibriler ve fibriler yapılara sahip çeşitli A β türleri, monomerik A β 'nin hızla birikimine bağlı oluşan bir dizi olaylar neticesinde oluşurlar [124], [126], [127]. A β birikimin son aşamasında, senil plaklar β -katmanlarını içeren diğer proteinlerle birleşerek oluşur. Peptid bağları,

proteazların erişimini sınırlayan bir hidrojen ağına bağlanır, bu da A β plaklarının *in vivo* stabilitesini desteklediğinden β -katmanlı yapılar proteolize karşı dirençlidir. *In vitro* [128], [129] ve *in vivo* [130], [131] olarak A β plakları bazı koşullar altında parçalanabilmektedir. Makrofajlar ve mikroglia hücreleri üzerindeki hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan fibriler A β endositozla lizozoma gönderilirler [131], [132]. Mikroglia hücreleri gibi fagositik hücreler beyinde belli koşullar altında fibriler A β 'yi parçalayabilmektedirler [130]. Hücre kültürlerinde aktive edilmiş mikrogliaların fibriler A β 'yi çok zayıf bir şekilde parçalamalarının sebebi zayıf lizozomal asidifikasyona (pH > 6) sahip olmalarıdır [128], [129]. Çoğu hücre, lizozomal enzimlerin maksimum aktivitesi için gerekli olan 4.5-5 lizozomal pH düzeylerine sahiptir [133]. Ayrıca makrofaj-koloni uyarıcı faktör gibi mikroglial fonksiyonun aktivatörleri ile tedaviyi takiben, mikroglia, lizozomlarını tamamen asidifiye edebilmekte ve fibriler A β 'yi verimli bir şekilde sindirebilmektedir [129].

AH'de lizozomal yıkım mekanizması etkinliğini kaybederek hücrel proteinlerin ve A β 'nin yüksek miktarlarda birikimine neden olmaktadır [134]. A β degradasyonunda ana hücrel yolaklardan biride ALP'dir. Hücre içi otofagozomların parçalanmak üzere lizozomlara taşınmasını makro-otofaji olarak isimlendirilmektedir ve birçok çalışma AH'nin beyinlerinde makro-otofajinin hasarlandığı ve böylece A β içeren otofajik vakuollerin birikerek nörodejeneratif patolojiyi arttırdığı bildirilmiştir [80]. Bu veriler ışığında A β 'nin ALP aracılı degradasyonunun artışına odaklanan tedavi yaklaşımları kabul görmektedir [80], [115]. Otofaji A β agregatlarını uzaklaştırarak sağlıklı nöronları A β sitotoksitesinden koruyan bir mekanizmadır.

Otofagozom oluşumu rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mammalian target of rapamycin- mTOR) ve çeşitli Atg'ler ile düzenlenir ve bu olayda görev alan LC3B-I'nın posttranslasyonel olarak LC3B-II'ye dönüşen sitozolik bir Atg olduğu gösterilmiştir [135]. Vücut metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olan AMP-Aktive Edici Protein Kinaz (AMP-activated protein kinase-AMPK)'nin aktivasyonunun, otofagozom oluşumunun ana blokörü mTOR'u baskılayarak otofajiyi indüklediği bilinmektedir. Çalışmalarda AMPK aktivatörlerinin mTOR sinyalini inhibe ederek otofajiyi arttırdığı ve lizozomal sistem tarafından A β yıkımını tetiklediği, A β 'nin mTOR'u arttırdığı, A β seviyesindeki azalmanın mTOR'u azalttığı, mTOR-A β ilişkisini bildirmektedir [135]–[138].

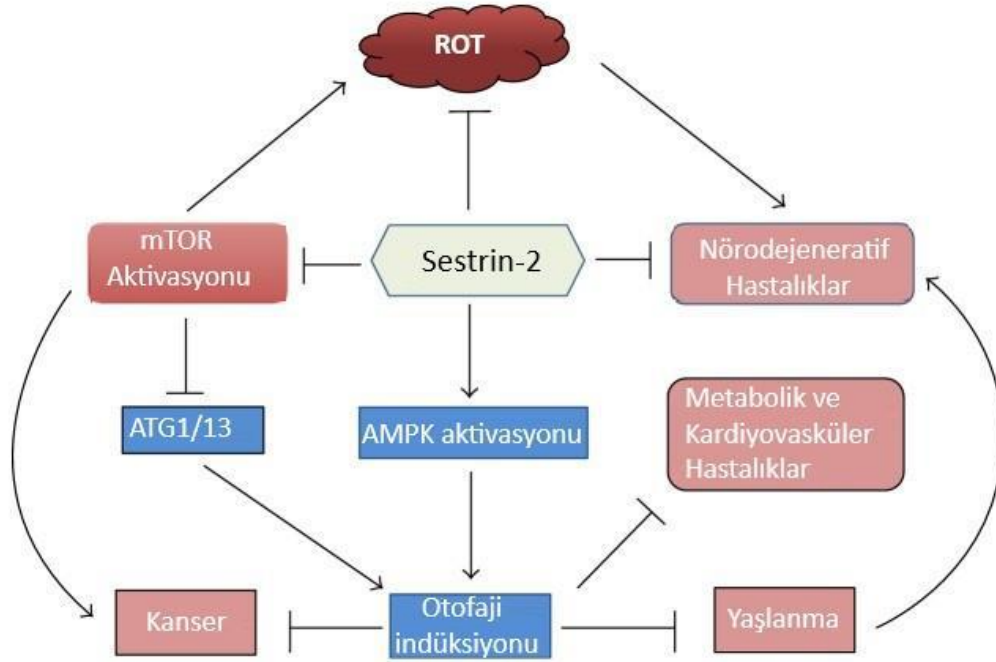
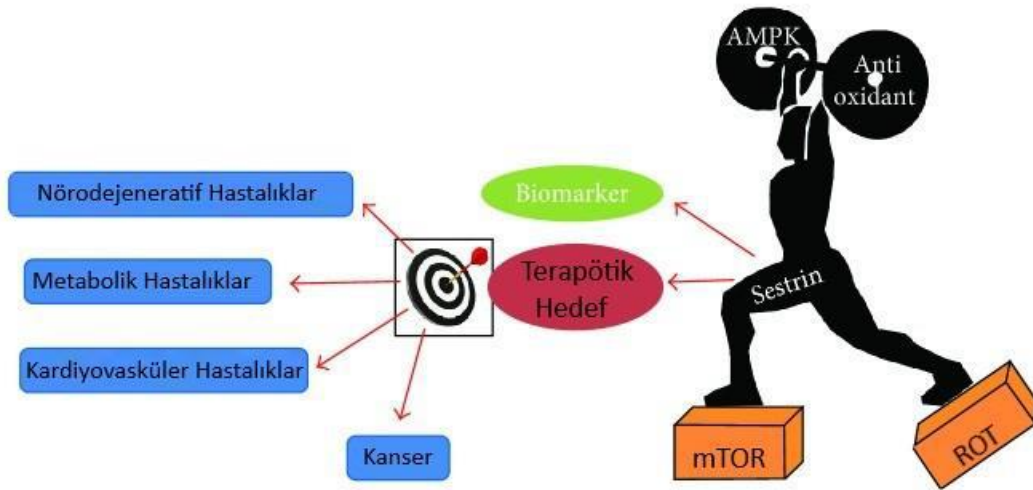
2.5. Sestrinler (SESN'ler)

Otofaji indüksiyonu, stres şartlarında indüklenen sestrinler (SESN2) [139], AMPK aktivasyonu ile mTOR'u baskılaması neticesinde gerçekleşmektedir [140], [141].

SESN gen ailesi *SESN1*, *SESN 2* ve *SESN3* [139], [142], [143] olmak üzere 3 üyeden oluşmaktadır ancak *Drosophila melanogaster* and *C. elegans*'ta sadece 1 *SESN* geni mevcuttur [144].

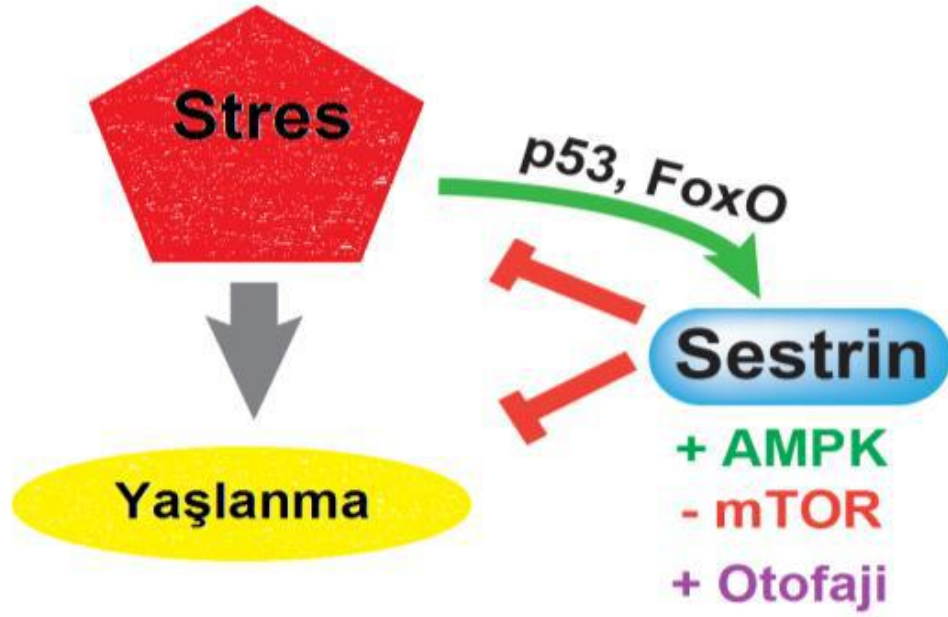
Primer sıçan kortikal hücre kültürlerinde A β 'nın SESN2 artışına sebep olduğu, antioksidan ve otofaji yollarını harekete geçirdiği gözlenmiştir. Bu bulgular SESN2 indüksiyon ya da inhibisyonunun nörodejeneratif bir hastalık olan AH ile yakın ilişkili seyrettiğini göstermektedir [22].

Memeli hücrelerinde eksprese olan üç adet SESN izoformundan (SESN1, SESN2, SESN3) [143] en çok çalışılan SESN2'nin hücre koruyucu etkinliğinde, serbest radikalleri süpürücü, antioksidan ve otofajiyi indükleyici aktivitelerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir [17], [18], [22].



Şekil 2-5. (A) SESN'lerin hedefindeki hastalıklar. (B) ROT'un SESN aktivasyonundaki rolleri. Pasha vd [145]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

SESN'lerin tüm izoformları yüksek antioksidan kapasiteye sahiptirler [146] ve genotoksisite ve oksidatif stres gibi çeşitli stres koşullarında artan ve oksidatif stresi baskılayarak etki gösteren proteinlerdir [142]. Stres şartlarında p53 ile indüklenen SESN2 [139], AMPK aktivasyonu ile mTOR'u baskılayarak otofaji indüksiyonuna neden olur [140], [141], ve bu etkisini redoks düzenleyici aktivitelerinden bağımsız olarak AMPK aktivasyonu yolu ile mTOR aktivitesini baskılayarak gerçekleştirir.



Şekil 2-6. SESN/AMPK/mTOR ilişkisi. Lee vd [147]'nden Türkçe'ye uyarlanmıştır.

DNA hasarına neden olan genotoksik bileşikler olan ROT, reaktif nitrojen türleri (RNT), reaktif karbonil türleri, lipid peroksidasyon ürünleri, DNA alkilleyici bileşiklere maruziyet metabolik strese neden olabilmektedir [17], [148], [149]. Metabolik stresin meydana getirdiği aşırı genotoksik hasar hücre döngüsünü inhibe ederken proapoptotik, tümör baskılayıcı p53 gibi DNA hasarını algılayan sinyal yollarının *up*-regülasyonuna da neden olur. Gama radyasyonu, UV ve genotoksik metabolitler, hipoksi p53 aracılığı ile *SESN1* ve *SESN2* transkripsiyonunu uyarır. *SESN2* ilk defa insan nöroblastoma hücrelerinde hipoksinin aktive ettiği gen olarak izole edilmiştir. Oksidatif stres, ROT ve RNT metabolizmasındaki dengesizlik ve hücrenin ROT, RNS ve diğer reaktif metabolik ara ürünleri detoksifiye etme yeteneğindeki hasarı ifade eder. ROT, nöronlarda NMDA reseptör aktivasyonu sonucunda CCAAT/*enhancer*-bağlayan protein- β (C/EBP β) adındaki transkripsiyon faktörü aracılığıyla *SESN2*'yi indükler [150]. Oksidatif stres SESN ailesinin tüm üyelerini indükler. Çalışmalarda bu cevabın AMPK/mTOR sinyal yolağı tarafından düzenlendiği bildirilmiştir [147]. SESN'ler ROT üretimini arttıran mTOR hiperaktivitesini de engellerler. SESN'e bağımlı AMPK aktivasyonu ve mTORC1 aktivitesinin baskılanması, bazal otofajinin sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir [151]. SESN'lerin AMPK/mTOR düzenleyici aktiviteleri aşırı üretilen ROT'un önlenmesi açısından önemlidir. SESN'ler, elektron sızdırarak patojenik miktarda ROT üreten fonksiyonu bozulmuş mitokondrinin otofajik eliminasyonunda önemlidirler

[152]. *SESN*-yetersiz *Drosophila*'da anormal ROT üreten mitokondri birikimi gözlenmiş ve bu birikim farmakolojik mTOR inhibitörleri ile durdurulabilmiştir [147]. *SESN*'e bağlı mTOR inhibisyonu, antioksidan genleri inhibe eden proteinlerin otofaji aracılı yıkımı için de önemlidir. AMPK aktivasyonu yoluyla *SESN2*, patojenik miktarda ROT üreten enzimleri inhibe edebilmektedir [146]. *SESN*'lerin antioksidan aktiviteleri, p53 ve FoxO (*Forkhead box protein*) transkripsiyon faktörleri yoluyla da düzenlenmektedir. Yüksek seviyede oksidatif stres, p53 ve FoxO bağımlı apoptotik gen transkripsiyonu yoluyla hücre ölümüne neden olurken, düşük seviyede oksidatif stres *SESN*'leri uyararak oksidatif stresi azaltmakta ve hücre ölümünü önlemektedir [148], [149], [153]. Böylelikle *SESN*'ler hücre yaşamsallığı ve fonksiyonunda rol alan genetik bileşenler gibi hareket ederek, oksidatif stresin kaçınılmaz sonuçlarını elimine etmektedirler. Yapılan çalışmalar *SESN*'lerin antioksidan, AMPK aktivatörü, mTORC1 baskılayıcısı ve otofaji uyarıcı etkilerine ek olarak yaşlanmayı geciktirici ve yaşa bağlı hastalıkları baskılayıcı özellikleri üzerinde de bildirmektedirler [134], [154]–[156]. *SESN*-yetersiz *Drosophila* ve fare modellerinde endojen *SESN* aktivitesinin yaş ve obezite bağımlı hastalıkları önlediği gösterilmiştir. Bu modellerde *SESN* inaktivasyonu AMPK'nın kronik inaktivasyonuna, mTOR'un aktivasyonuna, dokularda yağ birikimine, kan şekerinde yükselmeye, iskelet ve kalp kası hasarına neden olmuştur[147]. Bu hayvan modellerinde ayrıca otofajinin kritik düzenleyicisi Atg1 inaktivasyonunun da gözlenmesi *SESN* geninin fonksiyonel önemi hakkında bilgi vermektedir [147]. AH [157] ve PH [158] gibi yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stres artmaktadır. İskemik hasarlı fare beyinde *SESN2* ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [142], [159]. *SESN*'lerin antioksidan ve özellikle otofajiyi uyarıcı etkileri nörodejeneratif hastalıklardaki önemlerini arttırmaktadır. Ancak buna rağmen AH'daki fonksiyonları ile ilgili pek az sayıda araştırma mevcuttur. CHP 134 nöroblastoma hücrelerine AH'den sorumlu A β_{1-42} uygulaması *SESN2* ekspresyonunu arttırmıştır [119], [121]. Primer sıçan kortikal sinir hücre kültürlerinde A β 'nın *SESN2* artışına sebep olduğu, antioksidan ve otofaji yollarını harekete geçirdiği gözlenmiştir. Transgenik AH hayvan modeli olan 12 aylık APP^{sw}/PSEN1^{de9} fare korteksinde *SESN2* ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Aynı hayvan modelinde ve fare kortikal hücre kültüründe ve otofagozom belirteci LC3B-II'de de eş zamanlı artış gözlenmiştir. A β 'nın yaptığı *SESN2* artışının *SESN2* siRNA ile geri döndüğü ve LC3B-II azalmasının da bu geri dönüşe eşlik ettiği bildirilmiştir. Tüm bunlara ek olarak *SESN2*

knock-down'ı ve otofajinin bafilomisin A ile farmakolojik inhibisyonu A β ' ile oluşturulan sinir hasarını kuvvetlendirmiştir. Bu bulgular SESN2 indüksiyon ya da inhibisyonunun nörodejeneratif bir hastalık olan AH ile yakın ilişkisini ve bu ilişkide otofaji yollarının rol oynadığını göstermektedir[27].

2.6. Fosfodiesteraz Enzimi, İnhibitörleri (PDEİ' ler)

2.6.1. Fosfodiesteraz Enzimi, İnhibitörleri ve Beyindeki Önemleri

Fosfodiesterazlar (PDE'ler), ikincil ulaklar olan siklik adenzin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfatları (cGMP) kendi inaktif 5'-monofosfatlarına metabolize eden metallofosfohidrolaz enzimleridir. Diğer bir deyişle PDE'ler, ikincil ulak siklik nükleotidlerden cAMP ve cGMP'nin kendi asiklik türevlerine (AMP, GMP) hidrolizini katalize eden enzimlerdir.

Tek tek PDE izoformlarını kodlayan ve 21 memeli genini kapsayan 11 gen ailesi tanımlanmıştır. PDE'ler, farklı posttranslasyonel modifikasyonlara göre sınıflandırılmışlardır: 11 yapısal olarak benzer, işlevsel olarak farklı aileye (PDE1-PDE11) ayrılırlar ve hidrolizine neden oldukları siklik nükleotid substratına (cAMP ve / veya cGMP) göre tanımlanırlar. Bazı PDE'ler spesifik olarak cAMP'yi (PDE4, PDE7 ve PDE8) hidrolize ederken, diğerleri cGMP'yi (PDE5, PDE6 ve PDE9) hidrolize eder. Diğerleri ise her iki siklik nükleotidi de hidrolize eder (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 ve PDE11. Bu enzimlerin tümü beyinde de eksprese edilmektedir [160].

Tablo 2-2. PDE Ailesinin Substrat Çeşitleri ve Dağılımları. M.D. Houslay vd [160]'nden Türkçeye uyarlanmıştır.

PDE	Substrat Çeşitleri	Ana Doku Lokalizasyonu
1	cGMP>cAMP	Beyin,kalp, damar düz kası
Tablo 1 PDE Ailesinin Substrat Çeşitleri ve Dağılımları		
2	cGMP=cAMP	Adrenal korteks, beyin,kalp, korpus kavernozum
3	cAMP/cGMP	Kalp, korpus kavernozum, karaciğer,pankreas, damar düz kası, plateletler
4	cAMP	Akciğer, mast hücreleri, damar düz kası
5	cGMP	Korpus kavernozum, Akciğer, damar düz kası, plateletler, beyin, özofagus
6	cGMP>cAMP	Retina
7	cAMP>>cGMP	İskelet kası, T hücreleri
8	cAMP	Testis,Tiroid
9	cGMP	Genel olarak exprese edilir, özel olarak tanımlanmamış.
10	cGMP>cAMP	Beyin, testis
11	cAMP=cGMP	İskelet kası, prostat, karaciğer, böbrek,hipofiz, testis

Beyinde spesifik PDE inhibitörleri kullanılarak yapılan ilk fonksiyonel *in vivo* bölgesel taramalarda kortekste PDE1, 2 ve 5/9'un cGMP'yi parçaladığı, PDE9'un hipokampüste majör rol oynadığı, PDE5/9 ve PDE1'in en çok aktif olan PDE'ler olduğu ancak PDE2 ve 3'ün de degradasyona katıldığı, beyincikte PDE5/9'un cGMP'yi hidroliz eden ana enzim olduğu ancak PDE1 ve 4'ün de önemli oranda parçalanmaya katkıda bulunduğu bildirilmiştir [161].

PDE izoformları türe özgü (sıçan, fare, insan) ekspresyon paterni göstermektedir. PDE1B, PDE1C, PDE2A, PDE4A, PDE4D, PDE5A, PDE7A, PDE8A, PDE8B, PDE10A ve PDE11A'nın mRNA ekspresyonları, en az bir ila dört beyin bölgesinde (hipokampus, korteks, striatum ve serebellumda) yaşa bağlı artış ya da azalma göstermektedir. PDE1A, PDE3A, PDE3B, PDE4B, PDE7A, PDE7B ve PDE9A'nın

mRNA ekspresyonları ise yaşla değişmemektedir. PDE11A4, PDE8A3, PDE8A4/5 ve PDE1C1'in protein ekspresyonları yaşa bağlı olarak artmaktadır. Yaşa bağlı PDE değişiklikleri sadece ekspresyon düzeyinde değil PDE'nin bölgesel yerleşiminde de göze çarpmaktadır [162].

PDE inhibitörleri, pulmoner hipertansiyon (PDE5 inhibitörü sildenafil), erektil disfonksiyon (PDE5 inhibitörleri sildenafil, vardenafil, tadalafil), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) (PDE4 inhibitörü roflumilast), sedef hastalığı ve psoriatik artrit (PDE4 inhibitörü apremilast) ve kalp yetmezliği (PDE3 inhibitörü milrinon) gibi bir dizi hastalık için tedavi potansiyeli göstermişlerdir. Ancak son zamanlarda PDE inhibitörlerinin nörolojik ve psikiyatrik hastalıklardaki etkilerine de vurgu yapan çalışmalar gündemdedir. Siklik nükleotid hidrolizinin selektif PDE inhibitörleri ile bloke edilmesinin faydası depresyon, şizofreni, AH ve iskemi gibi çeşitli beyin patolojilerinde görülebilmektedir. Üstelik PDE inhibitörleri, beyinde sıklıkla gözlenen bilişsel azalma ve duygulanım bozukluklarının tedavisinde terapötik araçlar olarak düşünülmüştür. Günümüzde PDE inhibitörlerinin hem yaşa bağlı bilişsel azalma hem de AH'nin tedavisinde potansiyel tedavi stratejisi olarak kullanılması kayda değer bulunmaktadır. cAMP ve cGMP'nin nöronal plastisite üzerindeki varsayılan etkileri nedeniyle, PDE inhibitörleri, SSS bozuklukları için potansiyel yararlar sağlayabilirler. İnsan beyinde bol miktarda PDE ekspresyonunun gösterilmesi, sinir iletiminde ve sinaptik plastisitede etkin siklik nükleotidlerin metabolizasyonu için gerekli olduklarına işaret etmektedir. Bu da nörolojik ve psikiyatrik bozuklukların tedavisi için uygun beyin penetrasyonuna sahip selektif PDE inhibitörlerini keşfetme çabalarını haklı kılmaktadır. Beyin penetrasyonu olan PDE 10A inhibitörleri şizofreni ve HH tedavisinde ilaç adayları olarak açıklanmışlardır. Bunun yanı sıra PDE 9A inhibitörleri bilişsel bozuklukların tedavisinde aday gösterilmiştir. Bu bulgular, cGMP ve cAMP'in bellek üzerinde farklı bölge ve zamanlardaki etkilerini işaret etmektedir. Siklik nükleotidleri seçici olarak hidroliz eden PDE'lerin inhibisyonunun, bellek performansını arttırmak için güvenilir bir yöntem olabileceği öne sürülmüştür. Duygulanım bozuklukları ve/veya bilişsel işlevleri etkileyen hastalıkların terapötik hedefleri açısından PDE'lerin potansiyellerine olan ilgi artmaktadır[26]. Genel olarak PDE'ler, hücre çoğalması ve farklılaşması, gen ekspresyonu, inflamasyon, apoptoz ve metabolizma gibi sayısız fizyolojik süreçlere katılırlar. Beyinde, cAMP/protein kinaz A (PKA)/cAMP'ye

duyarlı element bağlayan protein (CREB) ve cGMP/protein kinaz G (PKG)/CREB sinyal yollarının aktivasyonu, uzun süreli potansiyasyon (*long term potentiation*; LTP) bilişsel hafıza ve bellek oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. İkincil ulak cAMP, PKA aracılığıyla CREB’i aktive eder ve böylelikle beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi sinaptik plastisiteyle ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenleyebilir. cAMP/PKA/CREB yolağı, hafızanın nörofizyolojik kontrolünü sağlayan LTP’nin arttırılmasında rol oynar[163].

2.6.2. Fosfodiesteraz 4 ve inhibitörleri

cAMP sinyal aktivasyonunun hafıza fonksiyonlarını ve sinaptik plastisiteyi arttırdığı gösterilmiştir. Seçici PDE4 inhibitörlerinin cAMP hidrolizinin inhibisyonunun ardından cAMP/PKA/CREB yolağının aktivasyonu ile bilişsel faaliyet artışını gerçekleştirdikleri öne sürmektedir [163]. PDE4 inhibisyonunun da hipokampüste cAMP seviyesini arttırarak PKA/CREB fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu sinyal kaskadı hipokampüste LTP'nin sürdürülmesi ve hafızanın düzenlenmesinde elzemdir. PDE4 inhibitörleri nörolojik hastalıklarda ve spinal kord hasarı, travmatik beyin hasarı, AH, major depresif hastalık, multiple skleroz ve iskemik inme gibi inflamasyonun da eşlik ettiği hastalıkların çalışıldığı hayvan modellerinde etkinlik göstermişlerdir.

Sıçanlarda subaraknoid kanama modelinde gelişen serebral inflamasyon üzerine roflumilastın etkileri araştırılmış ve nörolojik hasarı ve inflamatuvar sitokinlerden IL-1 β , IL-6 ve TNF α seviyelerini ve apoptotik nöron sayılarını anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir.[164].

Non-emetik dozda kemirgenlerde roflumilastın hafıza fonksiyonlarını geliştirdiği gözlenmiştir [165]. İnsanlarda orta bilişsel hasar ve AH’da roflumilastın faz I ve II klinik denemeleri sürmektedir [166]. Roflumilast yüksek selektiviteye sahip ikinci jenerasyon PDE4 enzim inhibitörüdür. Hipertansiyon, bilişsel hasar ve demansın yaygın risk faktörlerinden biridir. Altta yatan moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılamamakla birlikte derin serebral bölgelerde iskemik hasara neden olduğu bilinmektedir. Hipertansif sıçanlarda rolipram ve roflumilastın PDE4 inhibisyonu yaparak öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki bozulmaları düzelttiği gözlenmiştir [167]. Travmatik beyin hasarında (TBH) hafıza hasarı oluşmaktadır ve rodentlerde TBH’ya özellikle hipokampus duyarlıdır. LTP, hipokampal sinaptik plastisitenin

hücresel düzeyde çalışılmasında önemlidir. TBH'da LTP'nin oluşması ve devamında anahtar rol oynayan transmembranal reseptör AMPA-GluR1 alt ünitesinin ekspresyonu ve fosforilasyonunda düşme gözlenmiştir. Ayrıca TBH'da ikincil ulak cAMP 'nın nöron plastisitesini koruduğu ve LTP'nin sürekliliğini sağladığı gözlenmiştir. Bu veriler ışığında TBH'da cAMP yolağının modülasyonunun TBH sonrası hafıza fonksiyonlarını düzenlemede terapötik yararı olabileceği düşünülmüştür. cAMP'nin PDE4 inhibisyonu ile artırılması sonucu AH, şizofreni ve yaşlanmaya bağlı bilişsel hasarda azalma meydana geldiği ile ilgili çalışmalar mevcuttur. PDE4 inhibitörü roflimulast KOAH tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Organotipik hipokampal kültürlerde 1 nM roflimulastın TBH'dan 24 saat önce ve 6 saat sonra nöronal plastisiteyi, AMPA-GluR1 fosforilasyonunu ve ekspresyonunu ve LTP'yi koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca KOAH nedeniyle roflimulast kullanan hastaların beyinlerindeki serbest ilaç konsantrasyonu 10,37 nM'dir ve 1 nM etkin konsantrasyonun üzerindedir. Bu da bu PDE4 inhibitörü ile yapılacak bilişsel tedavi çalışmalarında dozun daha da arttırılabilmesine olanak vermektedir. Yapılan çalışmada PDE10A inhibitörü papaverinin ise hasar sonrası plastisite üzerine koruyuculuğu olmadığı bulunmuştur. Bu farklılık bu inhibitörlerin etkilediği alt yolakların farklı olabileceği olarak yorumlanmıştır ve alt yolaklarla ilgili ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu konusuna vurgu yapılmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, roflimulastın sinaptik plastisitede koruyucu rol oynayan diğer proteinlerin ekspresyonlarında da artış yapabileceği yönündedir [24].

Selektif PDE4 inhibitörü rolipram ise, bilişsel çalışmalarda geniş çapta test edilmiştir [168]. Nesne tanıma testinde rolipram tedavisi, rodentlerde (sıçan/fare) hafıza fonksiyonlarını arttırmıştır [169]. Rolipramın skopolamin ile oluşturulan hafıza hasarını düzelttiği gözlenmiştir. Rolipram tedavisinin sıçanlarda A β ile indüklenen bilişsel hasarı ve nöroinflamasyonu da geri çevirdiği gözlenmiştir. Hipokampus kesitlerinde rolipramın özellikle cAMP düzeyinde yüksek, cGMP düzeyinde daha sınırlı artış yaptığı ve bu artışın özellikle hipokampal astrositlerde gerçekleştiği gösterilmiştir [169].

Rolipram kemirgen omurilik hasarı modellerinde aksonal büyüme ve nöron canlı kalımını arttırmış [170] ve HH fare modelinde atrofi gelişimini geciktirmiştir [171].

Beyne penetre olabilen selektif PDE4 inhibitörü GSK356278'in ise klinik öncesi testlerde anksiyolitik ve bilişsel fonksiyonları geliştirdiği gözlenmiştir [167].

2.6.3. Fosfodiesteraz 5 ve inhibitörleri

AH'da A β birikimi sonucu sinir hücrelerinin fonksiyon bozukluğuna, ölümüne ve sinir hasarına neden olan nöroinflamatuvar olaylarda cGMP, PKG ve PDE5 enziminin rol oynadığı bildirilmektedir. Sıçanlarda yaşla birlikte PDE5 mRNA seviyesinde düşüş tespit edilmiştir. Bu kaskadın manipülasyonunun patolojik olayları geciktireceği ve AH'yi uzun vadede geciktireceğine dair varsayımlar öne sürülmüşse de moleküler mekanizmaya yönelik detaylı stratejilere gereksinim duyulmaktadır. A β birikimi ve sonrasında gelişen sinaptik hasar cGMP ve PKG aracılı sinyallerin *down-regülasyonu* ile ilişkilendirilmektedir. cGMP öğrenme, hafıza, nöronal plastisite ve LTP gibi beyin fonksiyonlarını kontrol eden önemli bir bileşen olduğu için, cGMP AH'da A β aracılı hafıza hasarında yararlı etki gösterebilir. cGMP, AH'ye karşı immün cevap ve bilişsel hastalıklarla ilişkili anahtar sitokin olan NF κ B ve alt yolağı CREB ekspresyonunu ve kısmi fosforilasyonunu etkileyerek antiinflamatuvar cevapları kontrol edebilir. PDE5 hücre içi cGMP konsantrasyonunu kontrol eden kritik enzimdir. PDE5'in üç varyantı PDE5A1, A2 ve A3 beyinde özellikle hipokampus, korteks ve bilişsel ve duyuşsal fonksiyonları yürüten diğer beyin bölgelerinde lokalizedirler. Klinik öncesi çalışmalar selektif PDE5 inhibitörlerinden hem erkek erektil disfonksiyon hem de pulmoner hipertansiyon tedavisi için onaylanmış sildenafil (Viagra®; Pfizer) ve vardenafil (Levitra®; Bayer)'in yaşlı hayvanlarda hipokampal cGMP'yi arttırarak hafıza fonksiyonlarını güçlendirdiğini göstermiştir. Sildenafilin, AH transgenik (tg) APP/PS1 farelerde hafıza hasarını ve cGMP/PKG/pCREB kaskadındaki fonksiyon bozukluğunu geri çevirdiği ve hipokampüste hem çözümler A β_{1-40} hem de A β_{25-35} seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [172]. Sildenafil'den daha uzun yarılanma ömrüne sahip ve kronik tedavilerde daha güvenli kullanıma sahip bir diğer potent PDE5 inhibitörü tadalafilin de AH farelerde kan-beyin engelini geçerek tau fosforilasyonunu azalttığı, A β yükünü arttırmadığı ve bilişsel faaliyetlerde düzelmeye yaptığı gösterilmiştir. Tadalafilin hipokampal CA1 nöronlarında iskeminin indüklediği apoptotik süreci baskılayarak sinir koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [173].

Sildenafilin presinaptik veya postsinaptik bir mekanizma yoluyla nesne tanıma ve bellek pekiştirmenin erken evrelerini geliştirdiği varsayılmaktadır. Presinaptik mekanizma nitrik oksit (NO)/cGMP sinyal yolağı ile postsinaptik mekanizma da cCMP/PKG/CREB sinyal yolağı ile gerçekleşmektedir [174].

Bir HH modeli olan 12 haftalık tgR6/1 farelerde hipokampus cGMP ve NO düzeylerinin normalin üç katı azaldığı ve obje tanıma hafızası ve pasif kaçınma davranışında hasar olduğu gözlenmiş ve tek enjeksiyonluk 3 mg/kg i.p. sildenafil tedavisi ile bu parametrelerde düzelme gözlenmiştir [175].

Eretil disfonksiyon tedavisindeki etkinlikleri kanıtlanan PDE5 inhibitörlerinin bilişsel fonksiyonları arttırmaya yönelik çalışmalar için aday ilaçlar olabilecekleri düşünülmektedir.

2.6.4. Fosfodiesteraz 11 ve inhibitörleri

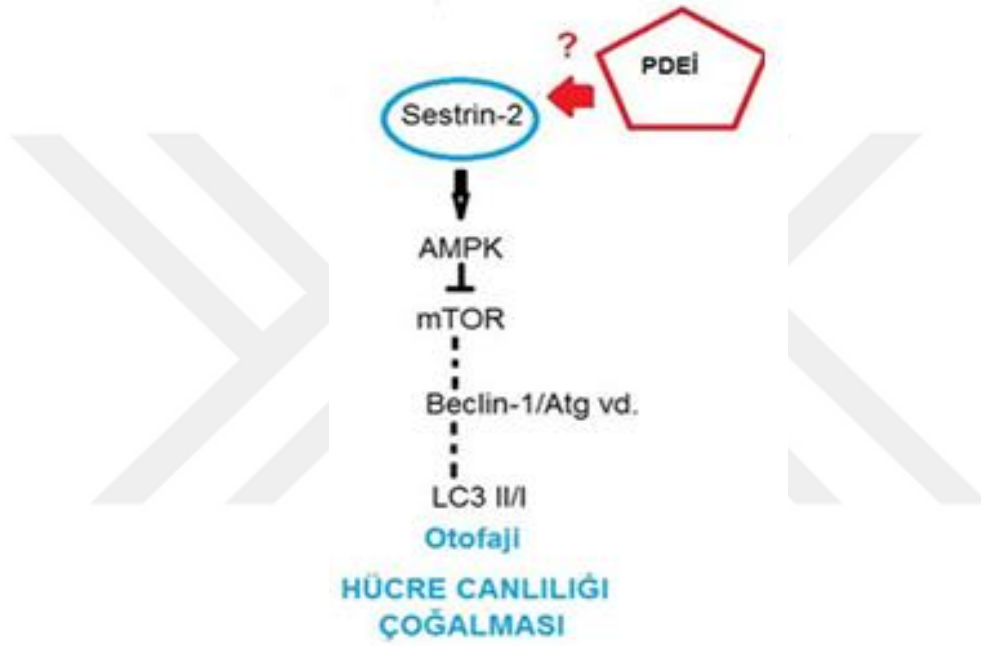
PDE11 en son keşfedilen PDE ailesidir. İnsanlarda *PDE11A* geni hem cAMP hem de cGMP'yi hidroliz eden çift özgülük enzimlerinden oluşan dört izoformu kodlar. PDE11A, iskelet kası, prostat, testis, beyin, böbrek, karaciğer, pankreas, lenfoid hücreler ve hipofiz ve adrenal bezlerde eksprese edilir ancak PDE11'in bu dokulardaki biyolojik rolleri, seçici inhibitörlerin bulunmaması nedeniyle anlaşılamamıştır [176].

Oldukça selektif bir PDE5 inhibitörü olan tadalafilin PDE11'i de yüksek oranda inhibe ettiği gözlenmiştir [177]. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında, *PDE11A* genetik defekti majör depresyon, bipolar bozukluk, astım, adrenal, testis ve prostat kanserleriyle bağlantılı bulunmuştur. *PDE11A4* izoformu kemirgen ve insanda hipokampal formasyonda bulunur ve dorsal hipokampüse göre ventral hipokampüste 3-10 kat fazla eksprese edilir [162], [178] ve periferik organlarda ekspresyonları yok ya da yok denecek kadar azdır [178]. PDE11A'nın sosyal davranış ve majör depresyonla [179], intihar eğilimi [180] ve lityuma cevap verilebilirlikle ilişkisi bulunmaktadır [181]. PDE11A4, oksitosin sinyal yolağı ve beyinde sosyal davranışın şekillenmesinde anahtar rol oynamaktadır [182].

Bununla birlikte, yaşlı rodent hipokampusünde gençlere göre PDE11A4 protein ekspresyonunda yaşa bağlı olarak gelişen artış, bu beyin bölgelerinde PDE11A4 enziminin sadece ekspresyonunda değil dağılımında da değişiklikler olduğunu

göstermektedir [162]. Bu bulgular PDE11A'nın nöropsikiyatrik, sinir gelişimini etkileyen ve yaşla ilgili hastalıklarda yeni bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir [183]

Tüm bu bilgilerin ışığında amacımız; nörodejeneratif hasara ve A β toksisitesine karşı koruyucu olarak arttığı gösterilen SESN2'nin, sinir koruyucu etki için yeni bir hedef olarak ortaya konulması ve PDEİ'lerin SESN2 üzerinden olası etkilerinin incelenmesidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Harisson tarafından 1907 yılında hayvan hücrelerinin, canlı vücudunun dışında incelenebilmesi amacıyla hücre kültürünü keşfetmiştir. Hücrenin vücut dışında kültüre edilmesi, vücudun normal homeostazı nedeniyle ortaya çıkacak sistemik değişikliklere yol açmasından ve bunların deney üzerinde olumsuz etkilerinden bağımsız olarak, hücreyi inceleme imkânı sağlamıştır. Earle ve arkadaşları 1943 yılında farelerde tümör hücrelerini izole edebilmeyi başarmış ve 1961 yılında Leonard Hayflick hücrelerin, kültür ortamında sınırlı yaşam süresine sahip olduklarını rapor etmiştir. Bu konu üzerine yapılan çalışmaların giderek ilerlemesiyle, hücre içerisinde gerçekleşen aktiviteleri, hücrenin bulunduğu ortam, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bunlara karşı verilen tepkileri hücresel boyutta inceleme ve değerlendirilebilme imkânı sağlamıştır[184].

Çalışmamızda kullanılan fare hipokampal nöron (HT-22) hücreleri Atlas Biyoteknoloji AŞ'den temin edilmiş, deneyler Atlas Biyoteknoloji AŞ'de bulunan Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler, 25 cm² flask steril hücre kültürü petrilerinde, %10 fetal sıgır serumu (fetal bovine serum; FBS), %1 L-glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kültür ortamında %5 karbondioksit (CO₂) inkübatöründe yetiştirildiler. Hücreler, petriyi %80 oranında kapladıklarında Tripsin/Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) ile kaldırılarak ihtiyaç duyulan grup sayısına göre pasajlandılar. Kontrol grubu dimetil sülfoksit (DMSO) ile muamele edildi.

3.1.2. Deneysel AH Hücre Kültürü Modeli için A β ₂₅₋₃₅ proteinin hazırlanması:

Ticari olarak satın alınan liyofilize haldeki A β ₂₅₋₃₅ (\geq 97% HPLC, A4559-1MG, Sigma-Aldrich-131602-53-4), nörotoksisite çalışmalarında gerekli liyofilize peptid agregatları steril saf su ile çözülerek 1 mg/ml konsantrasyonda stok hazırlandı.

3.1.3. Kimyasallar ve Malzemeler

Capricorn-DMEM-HA (Capricorn Scientific) Capricorn-L-Glutamin-GLN B (Capricorn Scientific), Capricorn-Tripsin EDTA-TRY-1B (Capricorn Scientific), Capricorn-FBS Heat inactivated-FBS-HI-11B (Capricorn Scientific), Capricorn-PBS-PBS-1A (Capricorn Scientific)

Qubit assay tüpleri (500'lük set, Cat. No. Q32856- Thermo Fisher Scientific) ya da Axygen PCR-05-C tüpleri (VWR, part no. 10011-830- PCR-05-C Corning), Güçlendirilmiş kemilüminesans substratı (ECL "Invitrogen, Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit WP20005")

mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyaller RiboEx (Cat No:301-001, Gene All), Hybrid-R (Cat No: 305-101, Gene All), cDNA Sentezi İçin Kullanılan Materyaller HyperScript™ First strand synthesis kit (Cat No:601-005, Gene All), cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri RNA örneği, Primer, dNTP mix, RNase-Free Distilled Water, RTase Reaksiyon Buffer, DTT, Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Real-Time qPCR İçin Kullanılan Materyaller RealAmp™ SYBR qPCR Master mix (Cat No:801-051, Gene All), Primerler (ATG5-F, ATG5-R, ACTB-F, ACTB-R, BECN1-F, BECN1-R, SESN2-F, SESN2-R Sentebiolab), Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix Bileşenleri (MasterMix (with SYBR-Green), ROX Dye, Forward Primer, Reverse Primer, cDNA Template, RNase-Free Distilled Water)

Western blot için kullanılan materyaller ProtinEx Total Protein Extraction Solution (GeneAll, Cat No: 701-001), Protein miktar ölçümü kiti Qubit® Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33211), NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, Cat No: NP0004), NuPAGE Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, Cat No: B0004), Bis-Tris gradient jeli (Invitrogen, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel), MES Running Buffer'dan (ThermoFisher, B0002), marker (NZY Colour Protein Marker II), Iblot transfer stack Nitrocellulose (NC) kitinde (Invitrogen, IB23001), Beta Actin (Cat No: E-AB-30422, Elabscience), AMPK α 1/2 (Cat No: BT-AP09795, Bt-Laboratory), AMPK α 1/2 (Thr183/172) (Cat No: BT-PHS00575 Bt-Laboratory), LC3A (Cat No: BT-MCA0986 Bt-Laboratory), mTOR (Cat No: BT- AP05645 Bt-Laboratory), mTOR (phospho ser2448) (Cat No: BT- PHS00176 Bt-Laboratory), SESTRIN-2 (Cat No: BT- AP09794 Bt-Laboratory), Western Breeze Kit (Chromogenic Immunodetection

System, Rabbit Primary Antibody Cat: WB7105, Invitrogen), “Invitrogen, Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit WP20005”

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Laminar akım kabini (Nüve, Türkiye), CO₂ inkübatörü (Sanyo, Japonya), faz kontrast mikroskopu (Leica, Almanya), otoklav (Nüve, Türkiye), su banyosu (Nüve, Türkiye), ultrasonik homojenizatör (Omni, ABD), soğutmalı santrifüj (Kubota, Japonya), vorteks (FinePCR, Kore), orbital çalkalayıcı (FinePCR, Kore), membran görüntüleme cihazı (Kodak, ABD), spektrofotometrik mikropalak okuyucu (Heales, MB-530, China).

3.1.5. İstatistiksel Analiz

Çoklu grupların istatistiksel karşılaştırılması GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak iki yönlü ANOVA ve Tukey testleri ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. *P < 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2. Sitotoksikite Deneyleleri

3.2.1. Hücre Canlılığının MTT ile ölçülmesi

Hücre canlılığının kolorimetrik ölçümüne dayanan MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] deneyi, suda çözündüğünde sarı renkli görünümüne sahipken, mitokondriyal redüktaz aktivitesiyle hücrelerin canlılığıyla orantılı olarak çözünemeyen mor renkli Formazan'a dönüşür ve kantitatif bir ölçüm sağlar. %70'in altında kalan değerler sitotoksik kabul edilmektedir.

HT-22 hücreleri %80 kaplama oranına ulaştıktan sonra besi yerleri aspire edilerek PBS çözeltisi ile yıkandı, 300 µl Tripsin-EDTA eklendi ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe 1-2 dakika (dk) inkübe edildi. Kaldırma işlemi faz-kontrast mikroskopunda kontrol edildi. Üzerlerine taze hazırlanan hücre besiyeri eklenerek enzim reaksiyonu durduruldu ve 15 ml'lik falkona aktarılarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücre pelleti 1 ml besiyerinde dağıtıldı. Hücre sayım cihazında (Cell counter, BioRad) hücre sayımı yapıldı ve hücre sayısı 10⁵ hücre/ml olacak şekilde besiyeri eklendi. Pipetleme yapılarak eşit bir şekilde 96 kuyucuklu kostarlara her kuyucukta 10⁴ hücre/ml (100 µl) olacak şekilde ekim yapıldı.

24 saat sonra eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak taze hazırlanmış besiyeri eklendi. Hücreler taşıyıcı (%0.1 DMSO) ve PDEİ'lerinin (ROL; 3 μ M, 10 μ ,30; TAD 0.75, 1.53nM, 3nM, RF 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) farklı konsantrasyonlarıyla 32 saat inkübasyona bırakılarak deney grupları oluşturuldu. Bu konsantrasyon aralıkları PDEİ'lerin literatürdeki etkin konsantrasyonlarını içeren aralıklardır. (32 saatlik süre A β 'nin 2.5, 5, 10 μ M konsantrasyonlarda 24, 32, 48 saat sürelerde SESN2 artışındaki 5 μ M'lık konsantrasyonda maksinin yaptığı artıştan yola çıkılarak belirlendi.) Süre sonunda hücrelerden besiyerleri aspire edildi. MTT (mg/ml) MEM'de çözüldü, 0.22 μ 'luk filtreden geçirildi ve her bir kuyucuğa 50 μ l eklendi. 37°C'lik CO2 inkübatöründe hücreler MTT çözeltisi ile 3 saat inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucukta mor renkli çökteller gözlemlendi ve sıvı kısım aspire edildi. Kuyucuk diplerindeki çöktellerin üzerine 100 μ l izopropanol eklenerek homojen bir karışım oluşuncaya kadar pipetleme yapıldıktan sonra Microplate Reader'da 570 nm absorbans değerinde okutuldu.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Tedavisi

Deney grupları aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Tablo 3-1. Deney gruplarının oluşturulması.

Deney grupları; (n=3)		Deney grupları; (n=3)	
1	Kontrol (%0.1 DMSO)	2	A β ₂₅₋₃₅ (5 μ M; 32 saat)
3	Tadalafil 1,53 nM	4	A β ₂₅₋₃₅ (5 μ M; 32 saat) + Tadalafil 1,53 nM
5	Roflimulast 5 μM	6	A β ₂₅₋₃₅ (5 μ M; 32 saat) + Roflimulast (5 μM)
7	Rolipram 10 μM	8	A β ₂₅₋₃₅ (5 μ M; 32 saat) + Rolipram 10 μM

Çözücü olarak tüm PDEİ'lerde DMSO kullanıldı. Kontrol grubunda ve PDEİ'lerin yer aldığı tedavi gruplarının besiyerlerinde son DMSO konsantrasyonu %0.1 olarak ayarlandı.

3.3. mRNA- RT-qPCR

3.3.1. mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu için aşağıda markası, adı ve katalog numarası verilen materyaller kullanılmıştır.

3.3.1.1. mRNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hücre homojenizasyonu: 1×10^7 kültür hücresi üzerine 1 ml RiboEx eklendi ve pipetaj yapılarak karışması sağlandı.
2. Oda ısısında 5 dk inkübe edildi.
3. Karışım 11.000rpm, 10 dk, 4°C koşullarında santrifüj yapıldı ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Karışım üzerine 200 µl kloroform eklendi karıştırıldı, 2 dk inkübe edildi.
5. +4°C de $12.000 \times g$ 'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı.
6. Süpernatantın hacmi kadar RB1 Buffer (RNA Binding Buffer; RNA Bağlama Tamponu) eklendi. Pipetleme yapılarak karıştırıldı.
7. 700 µl karışım kolona aktarıldı.
8. $10.000 \times g$ 'de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
9. Karışımdan kalan miktar olması durumunda 7-8 işlemler tekrarlandı.
10. Kolon üzerine 500 µl SW1 Buffer(Yıkama Tamponu) eklendi.
11. $10.000 \times g$ de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
12. Kolon üzerine 500 µL RNW Buffer(Yıkama Tamponu) eklendi.
13. $10.000 \times g$ de 30 sn santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
14. Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için $10.000 \times g$ de 1 dk santrifüj yapıldı. Daha sonra kolon temiz bir tüpe alındı.
15. Kolon üzerine 50 µl RNase-free su eklendi ve 1dk oda sıcaklığında bekletildi.
16. Sonra $10.000 \times g$ de 1 dk santrifüj yapılarak elde edilen mRNA örnekleri -80°C sıcaklıkta donduruldu.

3.3.1.2. cDNA Sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo.3-2. cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri.

Bileşen	Hacim
RNA örneği	2 µl
Primer	1 µl
dNTP mix	1 µl
RNase-Free Distilled Water	10 µl

2. cDNA *mastermix* hazırlandıktan sonra 65 °C sıcaklıkta 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışım buz üzerine alındı.

3. Aşağıdaki tabloda adı ve miktarları belirtilen bileşenler cDNA *mastermix* üzerine eklendi ve homojen olarak karışması saplandı.

Tablo.3-3. cDNA mastermix üzerine eklenen bileşenler.

Bileşen	Hacim
10X RTase Reaksiyon Buffer	2
0.1 M DTT	2
Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1

4. cDNA sentezi için *mastermix* hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3-4. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları.

cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları		
	Adım 1	Adım 2
Sıcaklık (°C)	55	85
Süre	60 dk.	5 dk

3.3.1.3. Real-Time qPCR

cDNA elde edildikten sonra Real Time RT-qPCR aşamasına geçilmiştir. RT-qPCR için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Elde edilen cDNA örnekleri RT-qPCR aşamasına kadar -80°C sıcaklıkta donduruldu. Ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3-5. Ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri

Primer Adı	Primer Dizisi	Sentezleyen Firma
ATG5-F	GCAGATGGACAGTTG CACACAC	Sentebiolab
ATG5-R	GAGGTGTTTCCAACA TTGGCTCA	Sentebiolab
ACTB-F	CACCATTGGCAATGA GCGGTTC	Sentebiolab
ACTB-R	AGGTCTTTGCGGATG TCCACGT	Sentebiolab
BECN1-F	CTGGACACTCAGCTC AACGTCA	Sentebiolab
BECN1-R	CTCTAGTGCCAGCTCC TTTAGC	Sentebiolab
SESN2-F	AGATGGAGAGCCGCT TTGAGCT	Sentebiolab
SESN2-R	CCGAGTGAAGTCCTC ATATCCG	Sentebiolab

Tablo 3-6. Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bilgileri

MasterMix Bileşenleri	Hacim
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µl
ROX Dye	1 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA Template	4 µl
RNase-Free Distilled Water	3 µl
TOPLAM	20 µl

Mastermix hazırlandıktan sonra RT-qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. RT-qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. RT-qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.4. Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları

Tablo 3-7. Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları

RT-qPCR Step	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Initial Denaturation	95	300 sn.	1
Denature	95	15 sn.	40
Anneal	55 - 68	60 sn.	40
Melting Curve	65 - 95	2 - 5 sn./step	1

3.3.1.5. Relatif Kantitasyon Hesaplanması

mRNA ekspresyonları kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta Ct$ Yöntemi” kullanılmıştır. $\Delta\Delta Ct$ hesaplaması aşağı açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans RNA için RT-qPCR sonucunda Ct değerleri elde edilmiştir.
2. Hedef grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup ΔCt değerleri elde edilmiştir.
3. Referans grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak referans grup ΔCt değerleri elde edilmiştir.
4. Hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri elde edilmiştir.
5. $\Delta\Delta Ct$ değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (*fold change*) hesaplanması yapılmıştır.
6. *Fold change* değeri 1'in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. *Fold change* değeri 1'in altında çıkması durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

3.4. Western Blot

3.4.1. Hücrelerden Total Protein Ekstrelerinin Elde Edilmesi

$A\beta_{25-35}$ uygulamaları ve/veya eş zamanlı PDEİ tedavileri sonrasında hücrelerin morfolojik özellikleri faz-kontrast mikroskopunda kontrol edildi. İlk olarak 25 cm² flasktan besiyeri aspire edildi ve 800 μ L steril soğuk fosfat tamponlu salin çözeltisi (Phosphate Buffered Saline; PBS) eklenerek bir kez yıkama yapıldı. 1 ml ProtinEx Total Protein Extraction Solution (GeneAll, Cat No: 701-001) eklenerek pipetaj yapıldı. 16.000 rpm'de +4 °C'de 15 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Çalışma buz üzerinde yapıldı.

3.4.2. Protein Miktar Ölçümü

Protein miktar ölçümü Qubit® Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33211) kiti kullanılarak Qubit® 3.0 Fluorometer cihazı (Thermo Fisher Scientific, Cat No: Q33216) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.3. Protein Elektroforezi

3.4.3.1. Protein Örneklerinin Denatüre Edilmesi

Protein örneği (50 µg) üzerine 4X NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, Cat No: NP0004) (5 µl), 10X NuPAGE Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, Cat No: B0004) (2 µl) ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde distile su eklendi. Hazırlanan karışım 70 °C'de 10 dk inkübe edildi ve ardından 2 dk buz üzerine alındı.

3.4.3.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS-PAGE Elektrofrez

1. *Buffer core* dikey jel sistemi tankı (XCell SureLock, Invitrogen) içerisine yerleştirildi. %4-12'lik Bis-Tris gradient jeli (Invitrogen, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel) plastik ambalajından çıkartılıp, jel kaseti üzerinde yer alan beyaz bant söküldü ve jel kuyucuklarını bozmadan jel tarağı dikkatlice çıkarıldı.

2. Jel kasetinin alçak kısmı *buffer Core*'a bakacak şekilde dikey jel sistemi tankı içerisine yerleştirildi. Diğer tarafa diğer jel kasetini alçak kısmı *buffer core*'a bakacak şekilde yerleştirildi.

3. Jel sıkıştırma aparatına dikey jel tankı (Gel tension wedge) yerleştirilip herhangi bir dengesizlik engellendi.

4. 20X MES Sürüklenme Tamponundan (*MES Running Buffer*; ThermoFisher, B0002) 25 ml alıp bir mezür'e eklendi ve üzerine 475 ml distile su ekleyerek 1X MES buffer'a sulandırıldı.

5. Hazırlanan sürüklenme tamponu ile ilk önce *buffer core* içinde kalan üst tampon çözelti odasını jel kuyucuklarının üzerini 0.5 cm üzerine kadar dolduruldu. Kalan tampon çözeltisi alt buffer odasına ilave edildi.

6. Örnekleri yüklemeye önce 200 µl'lik pipete temiz bir pipet ucu takıldı ve kuyucuklar pipetaj yapılarak temizlendi.

7. Jel kasetinde yer alan kuyucuklardan en baştaki ve en sondakine 5 µl marker (NZY Colour Protein Marker II, Katolog numarası: MB090, Nyztech, Portekiz) yüklendi.

8. Kalan kuyuculara hazırlanan protein örneğinden 50 µg/20 µl protein örneği yüklendi.

3.4.4. Blotlama

1. Yürütme işlemi sonunda jel güç kaynağı ve dikey jel sisteminin elektrot kablolarını güç kaynağından çıkarılıp kapağı açıldı. Jel sıkıştırma aparatı çıkarıldıktan sonra jel kaseti çıkarıldı.

2. Jel kaseti, jel bıçağı kullanılarak kenar bağlantıları kopartılarak açıldı. Jelin tarak kısımları ve alt tarafındaki kalın jel kesilerek uzaklaştırıldı. İçerisinde distile su bulunan bir kap içerisine dikkatlice atıldı.

3. Blotlama için Iblot Gel Transfer Sistemi kullanıldı. Iblot transfer stack Nitrocellulose (NC) kitinde (Invitrogen, IB23001) yer alan *anot stack* kutudan çıkartılıp üzerinde yer alan jelatin açıldı. *Anot stack* plastiği ile birlikte cihaza yerleştirildi. *Anot stack* üzerinde yer alan membran üstüne dikkatli bir şekilde jel yerleştirildi. Kit içerisinde yer alan filtre kağıdı distile su ile ıslatıldı. Jelin üstüne ıslak filtre kâğıdı koyuldu. Hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Kit içerisinde yer alan *katot stack* kutudan çıkartılıp üzerinde yer alan jelatin açıldı. Katot stack plastiğinden uzaklaştırıldı ve bakır yüzey yukarı, jelimsi yüzey ıslak filtre kağıdına bakacak şekilde filtre kağıdının üzerine dikkatlice yerleştirildi. *Jel Merdanesi* kullanarak hava kabarcıklarını tekrar uzaklaştırıldı. Kit içerisinde yer alan sünger üzerindeki metal, Iblot cihaz kapağının sağ tarafında yer alan elektrota denk gelecek şekilde kapağa yerleştirildi ve kapağı dikkatlice kapatıldı. Program düğmesinden P3 programı seçildi ve 7 dk'lık sürede işlem tamamlandı.

4. Membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alındı.

3.4.5. Antikorla inkübasyon

Kullanılan primer antikor bilgileri aşağıdaki tablodaki gibidir.

Tablo 3-8. Kullanılan primer antikor tablosu

Marka	Cat No	Kitin Adı	Dilüsyon Oranı
Elabscience	E-AB-30422	Beta Actin	1:1000
Bt-Laboratory	BT-AP09795	AMPK α 1/2	1:1000
Bt-Laboratory	BT-PHS00575	AMPK α 1/2 (Thr183/172)	1:1000
Bt-Laboratory	BT-MCA0986	LC3A	1:1000
Bt-Laboratory	BT-AP05645	mTOR	1:1000
Bt-Laboratory	BT-PHS00176	mTOR (phospho ser2448)	1:1000
Bt-Laboratory	BT-AP09794	SESTRIN-2	1:1000

1. Primer antikor inkübasyonu için Western Breeze Kit kullanıldı (Invitrogen, Chromogenic Immunodetection System, Rabbit Primary Antibody Cat: WB7105).
2. Bloklama için; dilüent A: 2 ml, dilüent B: 3 ml, distile su: 5 ml eklendi ve 90 dk yavaş shakerda bekletildi. Fosforile antikorların bloklamasında PBS içinde hazırlanan %2 lik PBS-sığır serumu albümini (*Bovine Serum Albumin*; BSA) karışımı kullandı.
3. Bu aşamadan sonra membran 20 ml distile su ile 2x5 dk yıkandı.
4. Primer antikorlar tarif üzerine, belirtilen oranda sulandırıldı ve gece boyu +4°C'de bekletildi.
5. Membran 3x5 dk distile su ile hızlı devirde çalkalayıcıda yıkandıktan sonra üzerine 10 ml sekonder antikor eklendi ve 45 dk yavaş devirde çalkalayıcıda bekletildi.
6. Daha sonra membran 3x5 dk 20 ml Antibody Wash ile çalkalayıcıda yıkandı.
7. 2X2 dk 20ml distile su ile hızlı shakerda yıkandı.
8. Kemiluminesan kullanılmasıyla birlikte 2.375 μ l subtrate ve 0.125 μ l enhancer mix yapılarak membrana eklendi.
9. Görüntüleme cihazı olarak *GEN-BOX Imager CFX* kullanıldı.
10. Görüntüleme sonrası membranlar 2x2 dk 20ml distile su ile hızlı devirde çalkalayıcıda yıkandı.
11. Elde edilen sonuçlar Image J programıyla analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

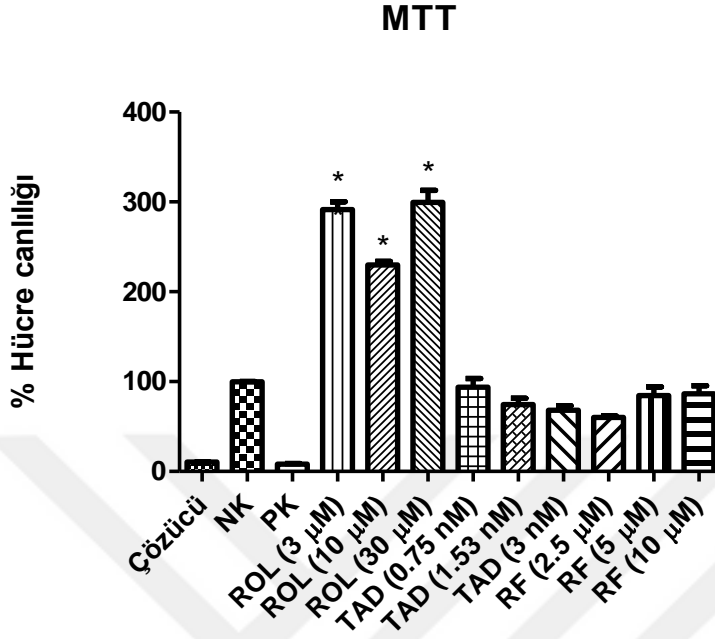
Fare hipokampal hücre hatları (HT-22), PDEİ'lerin (ROL; 3µM, 10 µM,30 µM; TAD 0.75, 1.53nM, 3nM, RF 2.5 µM, 5 µM, 10 µM) farklı konsantrasyonlarıyla ve Aβ₂₅₋₃₅'in 5 µM konsantrasyonu ile 32 saat inkübasyona bırakılarak hücre sağ kalımları negatif ve pozitif kontrolle karşılaştırmalı olarak MTT yöntemi ile ölçüldü.

PDEİ'lerin farklı konsantrasyonları ROL uygulanan tüm konsantrasyonlarda (3µM, 10 µM, 30 µM) negatif kontrolle karşılaştırıldığında hücre canlılığında artış yapmıştır (p<0.05; n=4). Bu sonuç ROL'un hücre proliferasyonunu arttırıcı etkilerinden kaynaklanabilir (Şekil 4.1A). TAD (0.75, 1.53nM, 3nM) ve (RF 2.5 µM, 5 µM, 10 µM) negatif kontrolle karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı bir azalma yapmamışlardır (Şekil 4.1A; p>0.05; n=4).

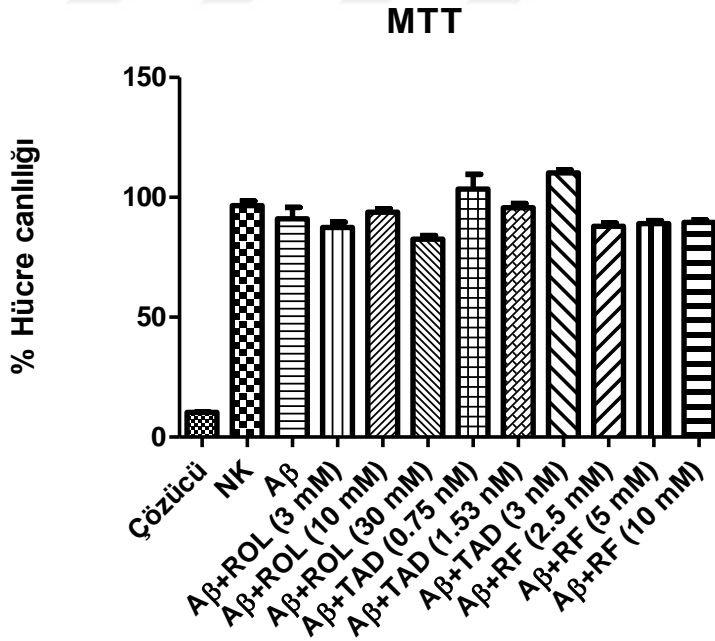
Hücrelere tek başına Aβ₂₅₋₃₅ uygulaması ve PDEİ'ler ile beraber uygulaması hücre canlılığında anlamlı azalmaya neden olmamıştır (Şekil 4.1B; p>0.05; n=4).

Hücrelere tek başına Aβ₂₅₋₃₅'in 5 µM konsantrasyonda, 32 saatlik uygulaması ve PDEİ'ler ile beraber uygulaması hücre canlılığında anlamlı azalmaya neden olmamıştır (Şekil 4.1B; p>0.05; n=4).

A



B



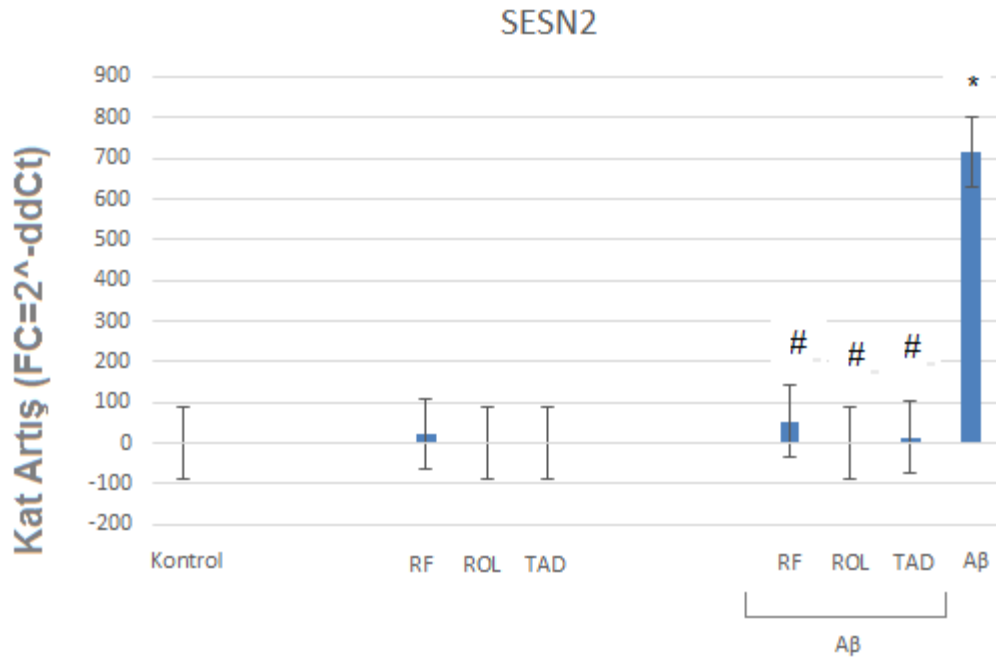
Şekil 4-1(A,B). Fare hipokampal hücre hatlarında (HT-22), artan konsantrasyonlarda PDEİ uygulamalarının hücre canlılığına etkilerini gösteren MTT grafiği. Hücreler, 32 saat boyunca ROL (3µM, 10 µM,30 µM); TAD (0.75nM,

1.53nM, 3nM), RF (2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) ve A β_{25-35} 'in (5 μ M) ile tedavi edildiler. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmiştir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama \pm SH'ı olarak ifade edildi (* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında P <0.01).

A β_{25-35} 'in artan konsantrasyonları (2.5; 5; 10 μ M) HT-22 hücrelerine uygulanarak hücre canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.2; n=3; P>0.05).

PDEİ'lerin literatürdeki etkin konsantrasyonları (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) ve A β_{25-35} 5 μ M konsantrasyonda sitotoksik etki göstermedikleri için deneylere bu konsantrasyonlarla devam edilmiştir (Şekil 4.1A).

4.2. İn vitro A β_{25-35} ve PDEİ Uygulamalarının RT-qPCR sonuçları:

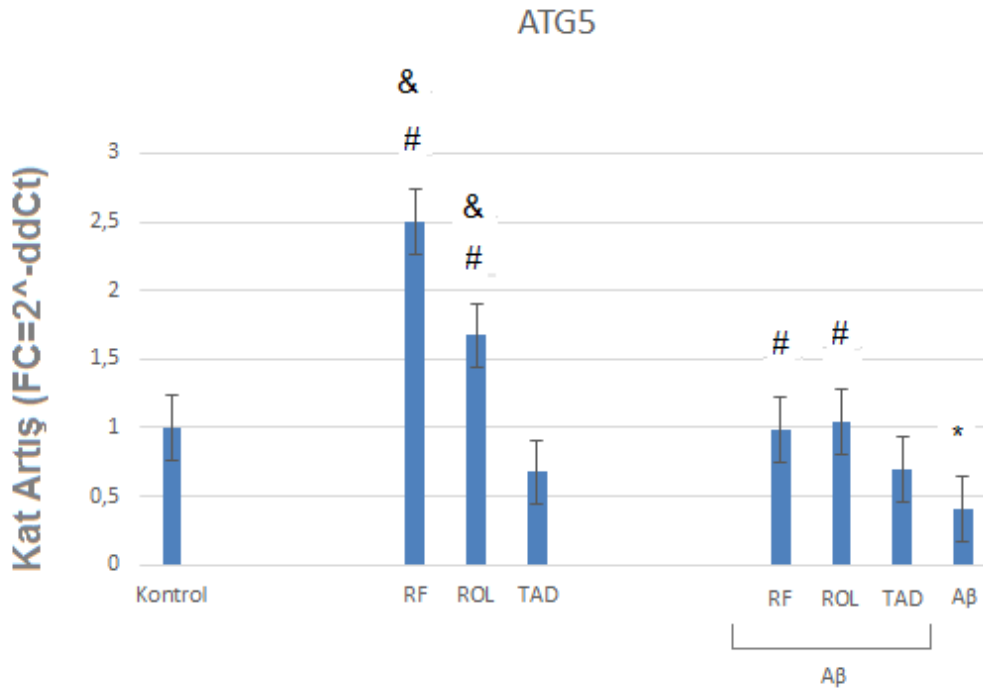


Şekil 4-2. PDEİ ve A β_{25-35} uygulamasının *SESN2* gen ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), A β_{25-35} (5 μ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) tedavisinin *SESN2* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren RT-qPCR grafiği. mRNA ekspresyonlarının kantitasyonu *ACTB* transkripti referans olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Hücreler, 32 saat boyunca 5 μ M A β_{25-35} 'e maruz bırakılmış ve/veya 5 μ M A β_{25-35} ve PDEİ (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir.

Hücrelerin 32 saat boyunca 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ ile inkübasyonları, *SESN2* gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur. RF (5 μM), ROL (10 μM) ve TAD (50 μM) tek başına *SESN2* ekspresyonunu kontrol değerlerinde tutarken, bu PDEİ'lerin $\text{A}\beta_{25-35}$ ile birlikte uygulaması $\text{A}\beta_{25-35}$ ile artan *SESN2* ekspresyonunu kontrol değerlerine çekmiştir.

Özetle RT-qPCR sonuçlarına göre $\text{A}\beta_{25-35}$ (5 μM ; 32 saat) uygulaması *SESN2* gen ekspresyonunda artışa neden olmuş (* $P<0.05$), $\text{A}\beta_{25-35}$ ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, artan *SESN-2* ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur (# $P<0.05$).

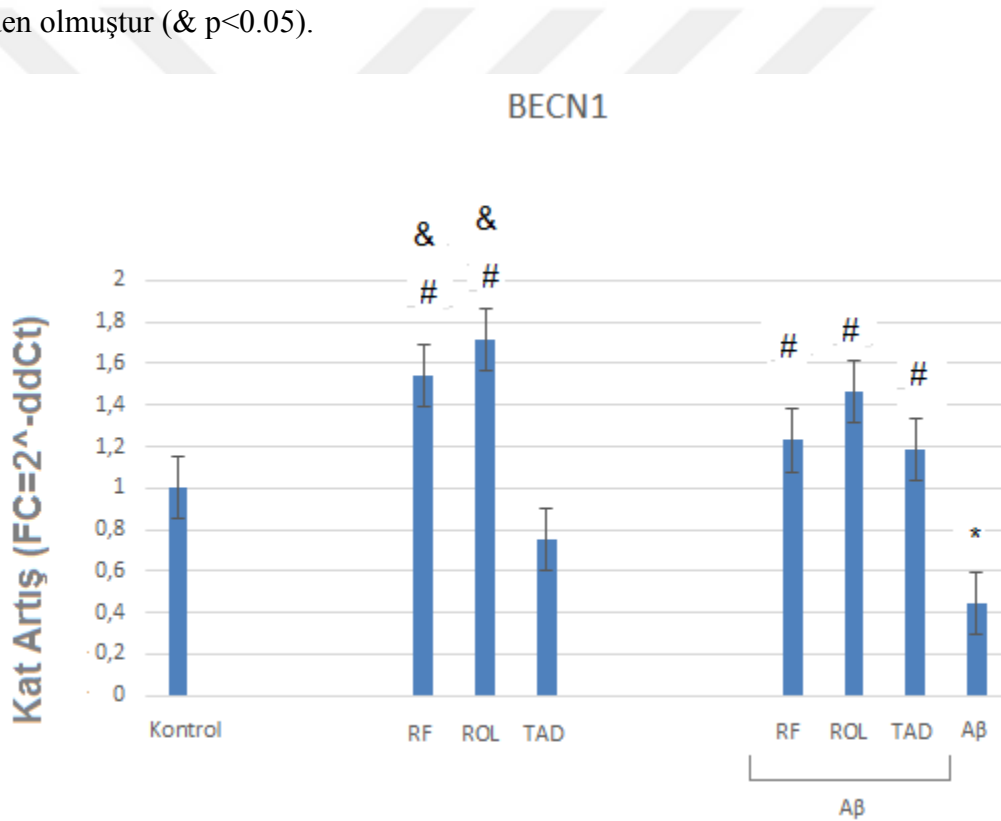


Şekil 4-3. PDEİ ve $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulamasının ATG5 gen ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), $\text{A}\beta_{25-35}$ (5 μM) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (ROL; 10 μM); TAD (1.53 nM), RF (5 μM) tedavisinin ATG5 gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren RT-qPCR grafiği mRNA ekspresyonlarının kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Hücreler, 32 saat boyunca 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ ve PDEİ (ROL; 10 μM); TAD (1.53nM), RF (5 μM) uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler tek bir deneyden alınmıştır.

Hücrelerin 32 saat boyunca 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ ile inkübasyonları, otofaji ile ilişkili ATG5 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. RF (5 μM) ve ROL (10 μM), tek başlarına ATG5 ekspresyonunu kontrole göre arttırırken (* $p<0.05$), $\text{A}\beta_{25-35}$ ile birlikte uygulamaları $\text{A}\beta_{25-35}$ ile azalan ATG5 ekspresyonunu kontrol değerlerine çekmiştir (# $P<0.05$). TAD (50 μM) tek başına kontrole göre ATG5 ekspresyonunu ve $\text{A}\beta_{25-35}$ ile birlikte uygulaması ATG ekspresyonunu değiştirmemiştir.

Özetle $\text{A}\beta_{25-35}$ (5 μM ; 32 saat) uygulaması ATG-5 gen ekspresyonunu kontrole göre azaltmış (* $p<0.05$), $\text{A}\beta_{25-35}$ ile eř zamanlı RF(5 μM) ve ROL (10 μM) uygulaması, azalan ATG-5 gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur (# $P<0.05$). Tek başına RF (5 μM), ROL (10 μM) uygulaması TAD (50 μM)'a göre ATG5 gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur (& $p<0.05$).



şekil 4-4. PDEİ ve $\text{A}\beta_{25-35}$ uygulamasının BECN1 gen ekspresyonuna etkisi.

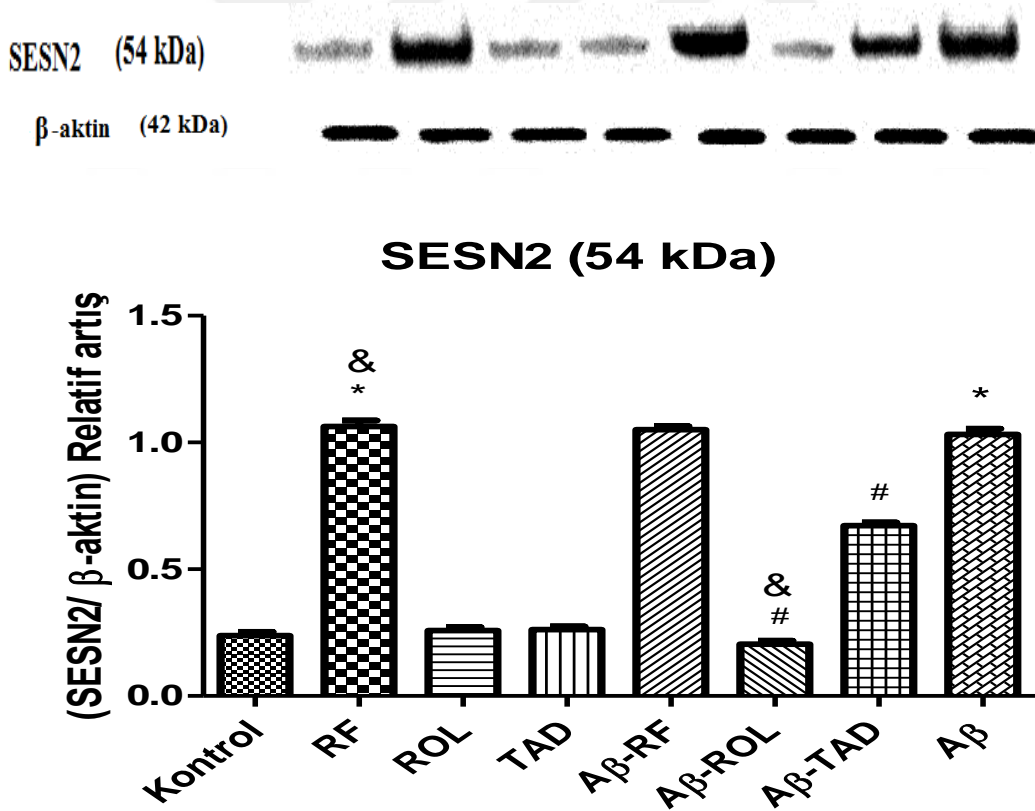
Fare hipokampal nörön hücrelerinde (HT-22), $\text{A}\beta_{25-35}$ (5 μM) uygulamasının ve/veya eř zamanlı PDEİ (ROL; 10 μM); TAD (1.53nM), RF (5 μM) tedavisinin BECN1 gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini gösteren RT-qPCR grafiği mRNA ekspresyonlarının kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Hücreler, 32 saat boyunca 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ ve

PDEİ (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler tek bir deneyden alınmıştır.

Hücrelerin 32 saat boyunca 5 μ M $A\beta_{25-35}$ ile inkübasyonları, otofaji ile ilişkili *BECN1* gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. ROL (10 uM) ve RF (5 uM), tek başlarına kontrole göre *BECN1* ekspresyonunda artış yaparken, TAD (50 uM) tek başına beklin-1 gen ekspresyonunu değiştirmemiştir. Her üç PDEİ'nin de $A\beta_{25-35}$ ile beraber uygulaması $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı *BECN1* azalmasını engellemiştir

Özetle $A\beta_{25-35}$ (5 μ M; 32 saat) uygulaması *BECN1* gen ekspresyonunu azaltmış (* $P<0.05$), $A\beta_{25-35}$ ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, azalan *BECN1* ekspresyonunda artışa neden olmuştur (# $P<0.05$). Tek başına RF (5 uM), ROL (10uM) uygulaması TAD (50 uM)'a göre *BECN1* gen ekspresyonunda artışa neden olmuştur (& $p<0.05$).

4.3. PDEİ uygulamalarının Western Blot sonuçları:

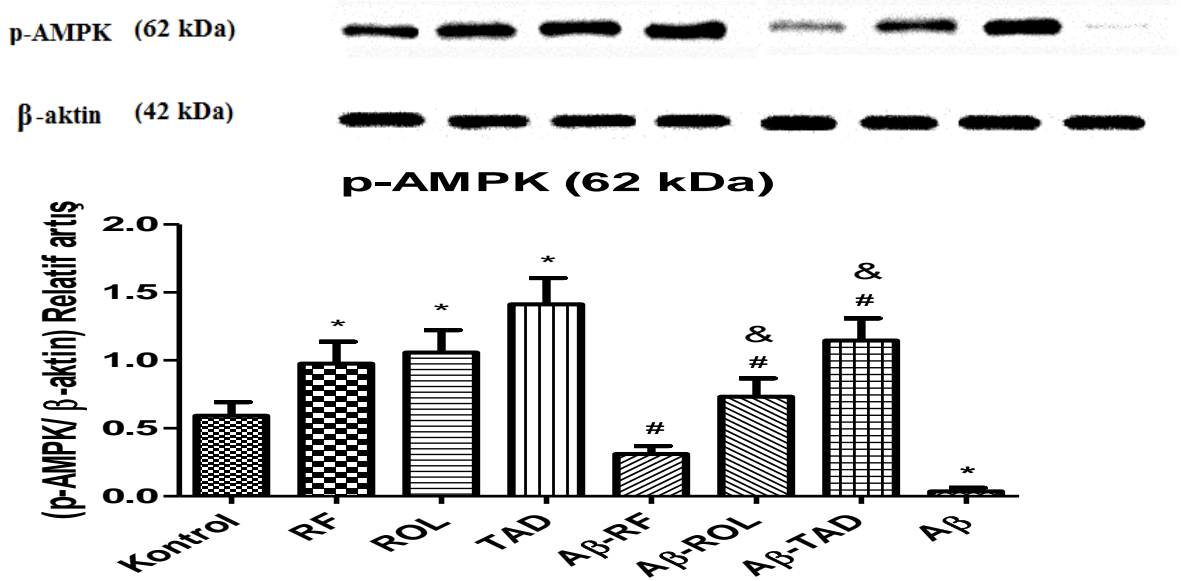


Şekil 4-5. PDEİ ve $A\beta_{25-35}$ uygulamasının SESN2 protein ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), $A\beta_{25-35}$ (5 μ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) tedavisinin SESN2 protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı SESN2 yoğunlukları (B). Bantlar iç standart β -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5 μ M $A\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5 μ M $A\beta_{25-35}$ ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama \pm SH'ı olarak ifade edildi (* $p < 0.05$ Kontrol grubuna göre anlamlıdır; # $p < 0.05$ 10 μ M $A\beta_{25-35}$ grubuna göre anlamlıdır).

Western blot sonuçlarına göre $A\beta_{25-35}$ (5 μ M; 32 saat) uygulaması SESN2 protein ekspresyonunda kontrole göre anlamlı artışa neden olmuştur (* $p < 0.05$).

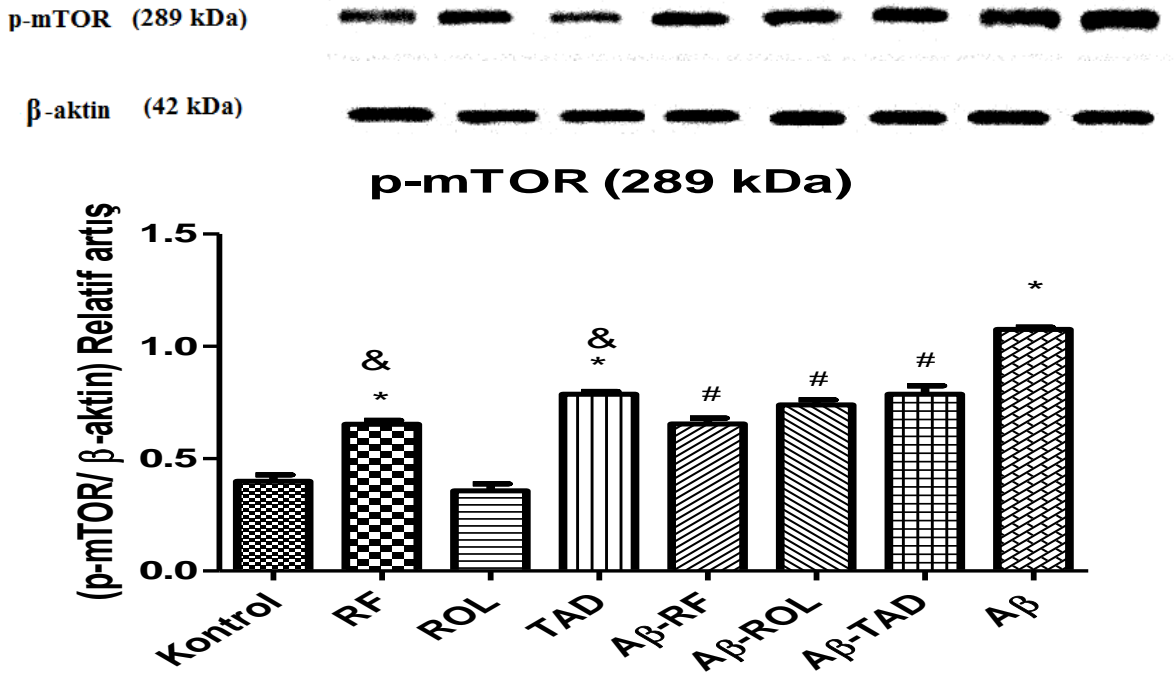
ROL (10 μ M) ve TAD (53 μ M) tek başlarına SESN2 seviyelerinde kontrole göre anlamlı değişiklik yapmazlarken $A\beta_{25-35}$ ile beraber uygulamaları $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı SESN2 artışını azaltmışlardır (# $p < 0.05$). RF (5 μ M) ise tek başına SESN2 artışına neden olmuş (* $p < 0.01$), $A\beta_{25-35}$ ile beraber uygulaması $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı SESN2 artışını değiştirmemiştir. Bu bize RF (5 μ M)'nin SESN2 üzerinde direkt etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu veri RT-qPCR çalışmaları ile de uyumludur. ROL (10 μ M)'in $A\beta_{25-35}$ ile beraber uygulaması, TAD (53 μ M)'in $A\beta_{25-35}$ ile beraber uygulamasına göre SESN2 proteininde daha anlamlı bir azalma gerçekleştirmiştir (& $p < 0.01$). RF (5 μ M)'in tek başına SESN2 artışına neden olduğu (& $p < 0.01$), diğer PDEİ'lerin tek başına bu etkiyi oluşturmadıkları gözlenmiştir.



Şekil 4-6. PDEİ ve $A\beta_{25-35}$ uygulamasının p-AMPK protein ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), $A\beta_{25-35}$ (5 μ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) tedavisinin p-AMPK protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı p-AMPK yoğunlukları (B). Bantlar iç standart β -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5 μ M $A\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5 μ M $A\beta_{25-35}$ ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama \pm SH'ı olarak ifade edildi (* $p < 0.05$ Kontrol grubuna göre anlamlıdır;; # $p < 0.05$ 10 μ M $A\beta_{25-35}$ grubuna göre anlamlıdır).

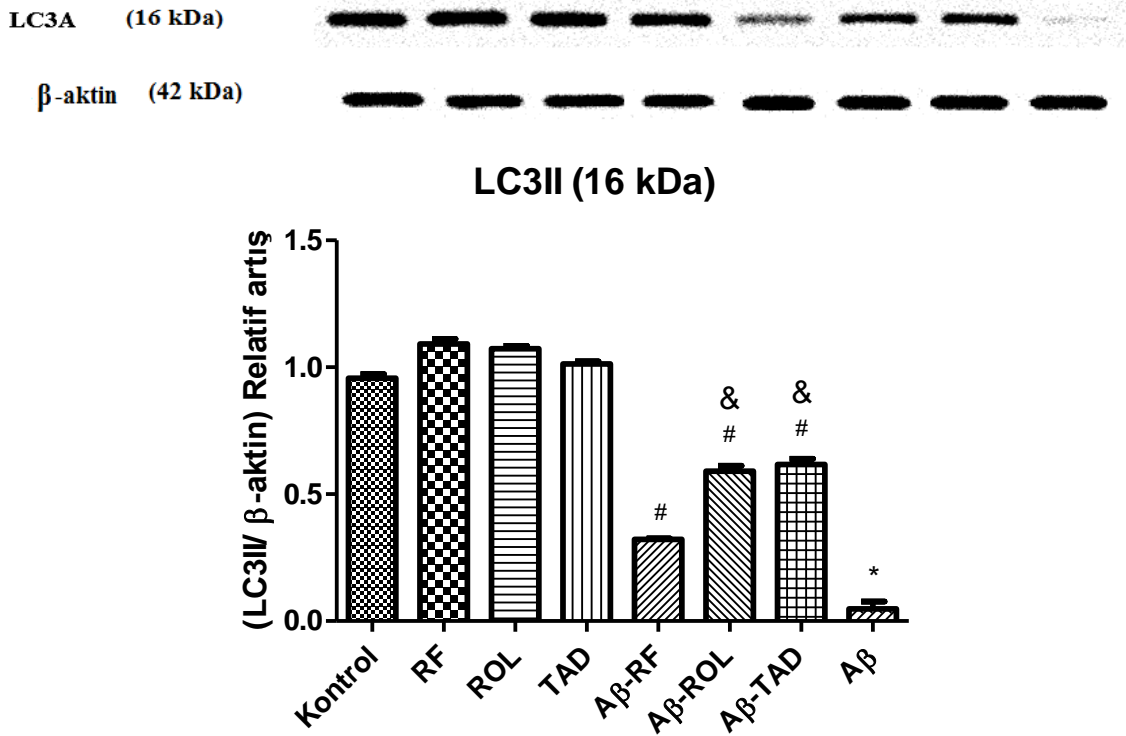
Hücrelerin 32 saat boyunca 5 μ M $A\beta_{25-35}$ ile inkübasyonları, hücre proliferasyonunu indükleyici ve hücre koruyucu AMPK ve aktif AMPK (p-AMPK) 'nın ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. ROL (10 uM), RF (5 uM) ve TAD (50 uM), tek başlarına kontrole göre p-AMPK seviyelerinde artış yaparken (* $p < 0.05$) AMPK seviyelerini değiştirmemiştir. PDEİ'lerin $A\beta_{25-35}$ ile eş zamanlı uygulamaları $A\beta_{25-35}$ 'in neden olduğu AMPK ve p-AMPK azalmasını engellemiştir (# $p < 0.05$). ROL (10 uM) ve TAD (50 uM)'in $A\beta_{25-35}$ ile eş zamanlı uygulamaları, RF (5 uM)'in $A\beta_{25-35}$ ile eş zamanlı uygulamasına göre p-AMPK üzerinde daha anlamlı artışa neden olmuştur (& $p < 0.05$).



Şekil 4-7. PDEİ ve $A\beta_{25-35}$ uygulamasının mTOR protein ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), $A\beta_{25-35}$ (5 μ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) tedavisinin mTOR protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı mTOR yoğunlukları (B). Bantlar iç standart β -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5 μ M $A\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5 μ M $A\beta_{25-35}$ ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama \pm SH'ı olarak ifade edildi (* $p<0.05$ Kontrol grubuna göre anlamlıdır;; # $p<0.05$ 10 μ M $A\beta_{25-35}$ grubuna göre anlamlıdır).

Hücrelerin 32 saat boyunca 5 μ M $A\beta_{25-35}$ ile inkübasyonları, hücre proliferasyonunu ve canlılığını azaltan mTOR ve aktif mTOR (p-mTOR)'un ekspresyonunda artışa neden olmuştur. RF (5 μ M) ve TAD (50 μ M), tek başlarına kontrole göre p-mTOR seviyelerinde artış yaparken (* $p<0.05$) mTOR seviyelerini değiştirmemiştir. PDEİ'lerin $A\beta_{25-35}$ ile eş zamanlı uygulamaları $A\beta_{25-35}$ 'in neden olduğu p-mTOR artışını anlamlı bir şekilde azaltmışlar (# $p<0.05$), mTOR seviyelerini değiştirmemişlerdir. RF (5 μ M) ve TAD (50 μ M) tek başlarına ROL (10 μ M)'a göre p-mTOR üzerinde anlamlı artışa neden olmuştur (& $p<0.05$).



Şekil 4-8. PDEİ ve $A\beta_{25-35}$ uygulamasının LC3II protein ekspresyonuna etkisi.

Fare hipokampal nöron hücrelerinde (HT-22), $A\beta_{25-35}$ (5 μ M) uygulamasının ve/veya eş zamanlı PDEİ (ROL; 10 μ M); TAD (1.53nM), RF (5 μ M) tedavisinin LC3II protein ekspresyonunu gösteren Western blot bantları (A) ve karşılaştırmalı LC3II yoğunlukları (B). Bantlar iç standart β -aktine göre normalize edilmişlerdir. Hücreler, 32 saat boyunca 5 μ M $A\beta_{25-35}$ 'e maruz bırakılmış ve/veya 5 μ M $A\beta_{25-35}$ ve PDEİ uygulamasına tabi tutulmuşlardır. Kontrol grupları ise %0.1 DMSO ile inkübe edilmişlerdir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama \pm SH'ı olarak ifade edildi (* $p<0.05$ Kontrol grubuna göre anlamlıdır;; # $p<0.05$ 10 μ M $A\beta_{25-35}$ grubuna göre anlamlıdır).

HT-22 hücrelerinde LC3 tek bant (II) olarak gözlenmiştir. Tek başına PDEİ (ROL (10 μ M), RF (5 μ M) ve TAD (50 μ M)), uygulamaları LC3II protein ekspresyonunda değişikliğe neden olmazken, LC3II protein ekspresyonu, $A\beta_{25-35}$ uygulaması ile anlamlı olarak azalmış (* $p<0.05$), $A\beta_{25-35}$ ve eş zamanlı PDEİ uygulaması $A\beta_{25-35}$ 'in neden olduğu LC3II protein ekspresyonunu anlamlı şekilde artmıştır (# $p<0.05$). ROL (10 μ M) ve TAD (50 μ M)'in), $A\beta_{25-35}$ ile beraber uygulamaları, RF (5 μ M)'in $A\beta_{25-35}$ ile beraber uygulamalarından daha anlamlı LC3II protein ekspresyonuna neden olmuştur (& $p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, AH'nin patogenezinin sorumlu nörotoksik protein A β ₂₅₋₃₅ uygulanan hipokampal nöron (HT-22) hücre kültürlerinde roflumilast (RF), rolipram (ROL) ve tadalafilin (TAD) nöron koruyucu sestrin-2 (SESN2) üzerine etkilerini göstermektir. Elde ettiğimiz bulgularda, 32 saat süresince 5 μ M A β ₂₅₋₃₅ uygulanan hipokampal nöron (HT-22) hücre kültürlerinde SESN2 ekspresyonunda artış gözlenmiş, A β ₂₅₋₃₅ ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, artan SESN2 gen ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur. A β ₂₅₋₃₅ (5 μ M; 32 saat) uygulaması otofaji ilişkili ATG5, beclin-1 ve LC3II ekspresyonunu azaltmış, A β ₂₅₋₃₅ ile eş zamanlı PDEİ uygulaması, azalan ATG5, beclin-1 ve LC3II ekspresyonunda artışa neden olmuştur.

AH bilişsel ve davranışsal yetersizliklerle karakterize en önemli ilerleyici tipte nörodejeneratif bozukluktur [28]. Pek çok genin ve çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan, binlerce genin ekspresyonunun değişebildiği, multiple patojenik yolların eşlik ettiği, nöronlarda A β depolanması, tau hiperfosforilasyonu, inflamasyon, oksidatif stres, enerji metabolizması ve hücrelerin hücre döngüsü ve apoptoza girişlerindeki hatalar ile kendini gösteren, etiyojisi ve patogenezi belirlenemeyen bir hastalıktır [29]. AH'de ekspresyonu değişen genlerden birinin de *SESN*'ler olduğu vurgulanmaktadır. *SESN*'ler yüksek antioksidan kapasiteye sahip [146], genotoksisite ve oksidatif stres gibi çeşitli stres koşullarında artan ve oksidatif stresi baskılayarak etki gösteren SESN proteinlerini kodlar [142]. Memeli hücrelerinde eksprese olan üç adet SESN izoformundan (SESN1, SESN2, SESN3) [143] en çok çalışılan SESN2'nin hücre koruyucu etkinliğinde, serbest radikalleri süpürücü, antioksidan ve otofajiyi indükleyici aktivitelerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir [17], [18], [22]. Primer sıçan kortikal hücre kültürlerinde A β 'nın SESN2 artışına sebep olduğu, antioksidan ve otofaji yollarını harekete geçirdiği gözlenmiştir. Bu bulgular SESN2 indüksiyon ya da inhibisyonunun nörodejeneratif bir hastalık olan AH ile yakın ilişkili seyrettiğini göstermektedir [22]. Bizim çalışmamızın hem RT-qPCR sonuçlarına göre hem de Western blot sonuçlarına göre A β ₂₅₋₃₅ (5 μ M; 32 saat) uygulaması SESN2 protein ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Bu bulgular literatürle uyumludur.

Stres şartlarında p53 ile indüklenen SESN2 [139], AMPK aktivasyonu ile mTOR'u baskılayarak otofaji indüksiyonuna neden olur [140], [141], ve bu etkisini redoks

düzenleyici aktivitelerinden bağımsız olarak AMPK aktivasyonu yolu ile mTOR aktivitesini baskılayarak gerçekleştirir. SESN'e bağlı mTOR inhibisyonu, antioksidan genleri inhibe eden proteinlerin otofaji aracılı yıkımı için de önemlidir. AMPK aktivasyonu yoluyla SESN2, patojenik miktarda ROT üreten enzimleri inhibe edebilmektedir [146]. SESN'lerin antioksidan aktiviteleri, p53 ve FoxO (*Forkhead box protein*) transkripsiyon faktörleri yoluyla da düzenlenmektedir. Yüksek seviyede oksidatif stres, p53 ve FoxO bağımlı apoptotik gen transkripsiyonu yoluyla hücre ölümüne neden olurken, düşük seviyede oksidatif stres SESN'leri uyararak oksidatif stresi azaltmakta ve hücre ölümünü önlemektedir [148], [149], [153]. Biz çalışmamızda A β_{25-35} (5 μ M; 32 saat) uygulaması ile SESN2 ekspresyonunda artış görürken aktif form AMPK (p-AMPK) ekspresyonunda azalma ve aktif form mTOR (p-mTOR) ekspresyonunda ise artış gözlemledik. A β_{25-35} uygulaması ile oluşan düşük seviyede oksidatif stresin hücre tarafından algılandığını ve kompensatuvar olarak SESN2 artışını tetiklediği düşünülebilir. A β_{25-35} 'nin p-AMPK protein ekspresyonunda azalma ve p-mTOR ekspresyonunda ise artış yapmasını, A β_{25-35} 'nin bu proteinlere direkt etkisi olarak yorumladık. A β_{25-35} uygulaması ile artan SESN2 ekspresyonu p-AMPK ekspresyonunu tetiklemekte ve p-mTOR ekspresyonunu baskılamakta yetersiz kalmış ve ortaya A β_{25-35} 'in direkt etkisi çıkmış olabilir (Şekil 4-6 ve 4-7).

Nörodejeneratif hastalıkların temelini oluşturan protein üretimi ile yıkımı arasındaki dengesizlik protein cisimciklerinin birikimi ile sonuçlanmaktadır ve bunlar arasında A β ve tau birikimini içeren AH öne çıkmaktadır. Lizozomal otofaji bu protein cisimciklerinin başlıca yıkım sistemlerindedir. Otofajinin sinir koruyucu rollerinin başında hasarlı organellerin ve makromoleküllerin kontrollü uzaklaştırılması gelmektedir. Hücre içinde hasarlanmış organeller ile yanlış katlanmış ve aşırı birikmiş proteinler gibi hücre içi yoğun stoplazmik materyalleri parçalayarak hücre homeostazını sağlayan önemli bir yolakların başında ALP gelmektedir. AH gibi nörodejeneratif hastalıkların bir sebebi de bu yıkım mekanizmalarındaki hasar olabilmektedir [83], [115]–[118], [185]. Güncel birçok çalışma AH patolojisi ile otofaji yolları arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir [119]–[123]. Hücrede enerjiye duyarlı ana molekül olan AMPK'nın aktivasyonu mTOR kompleksini baskılayarak otofaji ilişkili mekanizmalarla nöral enerji statüsünü yükseltmektedir. AMPK aktivasyonu mTOR'u inhibe ederek otofajiyi uyarmakta ve nöronal fonksiyonları korumaktadır [186]. mTOR

otofajide ana negatif regülatördür. Çalışmalarda mTOR sinyalinin, Alzheimer hastalarının beyinlerinin seçilmiş bölgelerinde hiperaktif olduğunu ve otofajinin baskılandığını göstermiştir [187], [188]. Bir çalışmada Tg2576 farelerinin beyinlerinde, mTOR sinyali ve hipokampustaki gen ekspresyonu genetik olarak azaltılarak otofaji indüksiyonu arttırılmış ve [189] A β birikimi düşürülerek bellek bozukluklarından korunmuştur [190]. Çalışmamızda hücrelerin 32 saat boyunca 5 μ M A β_{25-35} ile inkübasyonları, hücre proliferasyonunu indükleyici ve hücre koruyucu aktif AMPK (p-AMPK)'nın ekspresyonunda azalmaya neden olarak AMPK'nın mTOR üzerindeki baskısını kaldırmış ve otofaji inhibitörü mTOR (p-mTOR)'un aktivitesinde artışa neden olmuş olabilir (Şekil 4-6 ve 4-7). HT-22 hücrelerinin A β_{25-35} ile inkübasyonu SESN2 ekspresyonunda artış yapsa da p-AMPK artışını tetiklemeye yetmemiş, p-AMPK azalarak p-mTOR üzerindeki baskısını yitirmiş ve p-mTOR artışı meydana gelmiş olabilir.

AH'de lizozomal yıkım mekanizmasının etkinliğini kaybetmesine bağlı olarak hücrel proteinler ve A β yüksek miktarlarda beyinde birikir [134]. A β degradasyonunda ana hücrel yollardan biri de ALP'dir. Hücre içi otofagozomların parçalanmak üzere lizozomlara taşınması makrootofaji olarak isimlendirilmektedir ve birçok çalışma AH'nin beyinlerinde makro-otofajinin hasarlandığı ve böylece A β içeren otofajik vakuollerin birikerek nörodejeneratif patolojiyi arttırdığı bildirilmiştir [80]. Bu veriler ışığında A β 'nin ALP aracılı degradasyonunun artışına odaklanan tedavi yaklaşımları kabul görmektedir [80], [115]. Otofaji A β agregatlarını uzaklaştırarak sağlıklı nöronları A β sitotoksitesinden koruyan bir mekanizmadır.

Otofagozom oluşumu mTOR ve çeşitli Atg'ler tarafından düzenlenir. Otofagozom oluşumu sırasında görev alan LC3B-I posttranslasyonel olarak LC3B-II'ye dönüşen sitozolik bir Atg'dir [135]. Vücut metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olan AMPK'nın aktivasyonunun, otofagozom oluşumunun ana blokörü mTOR'u baskılayarak otofajiyi indüklediği bilinmektedir. Çalışmalarda AMPK aktivatörlerinin mTOR sinyalini inhibe ederek otofajiyi arttırdığı ve lizozomal sistem tarafından A β yıkımını tetiklediği, A β 'nin mTOR'u arttırdığı, A β seviyesindeki azalmanın mTOR'u azalttığı, mTOR-A β ilişkisini bildirilmektedir [135], [137], [138], [191]. CHP 134 nöroblastoma hücrelerine AH'den sorumlu A β_{1-42} uygulaması SESN2 ekspresyonunu arttırmıştır [119], [121]. Primer sıçan kortikal sinir hücre kültürlerinde A β 'nin SESN2

artışına sebep olduğu, antioksidan ve otofaji yollarını harekete geçirdiği gözlenmiştir. Transgenik AH hayvan modeli olan 12 aylık APP^{swe}/PSEN1^{dE9} fare korteksinde SESN2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Aynı hayvan modelinde ve fare kortikal hücre kültüründe ve otofagozom belirteci LC3B-II'de de eş zamanlı artış gözlenmiştir. A β 'nin yaptığı SESN2 artışının SESN2 siRNA ile geri döndüğü ve LC3B-II azalmasının da bu geri dönüşe eşlik ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmalar özellikle AH gibi hastalıklarda nöron koruyucu yollarla otofaji yolları arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Biz de çalışmamızda, nörodejeneratif hasara ve A β toksisitesine karşı koruyucu olarak arttığı gösterilen, bu etkisinde antioksidan ve otofajiyi indükleyici mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülen SESN2'yi nöroprotektif etki için yeni bir hedef olarak ortaya koyarak PDE'ler ile ilişkisini inceledik. Literatürde, bazı PDEİ'lerin nörodejeneratif hastalıklardaki koruyucu etkileri ile ilgili çalışmalar ve bu etkileri gerçekleştirmelerini sağlayan moleküler mekanizmaların açığa kavuşturulması gerekliliğine olan ihtiyaç bizi bu araştırmaya itmiştir. Öncelikle sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilerek PDEİ'lerin hücre canlılığına olan etkileri ve uygun konsantrasyonları bulunmuştur. PDEİ'ler literatürdeki terapötik konsantrasyonlarını içeren logaritmik ve numerik aralıklardaki tüm konsantrasyonlarında hücre canlılığını arttırmıştır. Bu sonuç PDEİ'lerin hücre proliferasyonunu arttırıcı etkilerinden kaynaklanabilir (Şekil 4.1A).

Nonspesifik PDE inhibitörü (PDEİ) olan bitkisel polifenol resveratrol'un AMPK aktivasyonu yaparak nörit uzaması ve nöral plastisiteye neden olduğu gösterilmiştir [192], [193]. PC12 hücrelerinde A β ₂₅₋₃₅ ile oluşturulan nörotoksitenin resveratrol ile indüklenen otofaji yoluyla azaldığı gösterilmiştir [194]. Spesifik PDE3 inhibitörü silostazolun nöronal hücrelerde endojen A β üretimini baskıladığı [195] gösterilmiştir. Aynı nöron hücrelerine dışarıdan A β ₁₋₄₂ uygulaması ile ya da transgenik olarak endojen A β sentezleyen hatlarında beclin-1, ATG5, LC3-II gibi otofaji proteinlerinin ekspresyonlarının silostazol tedavisi ile arttığı gösterilmiştir [196]. Bu verilerden hareketle biz çalışmamızda iki PDE4 inhibitörü ve bir PDE5 inhibitörünün *in vitro* AH modelinde SESN2, beclin-1, ATG5 ve LC3-II ekspresyonlarına olan etkilerini inceledik.

cAMP'nin PDE4 inhibisyonu ile arttırılması sonucu AH, şizofreni ve yaşlanmaya bağlı bilişsel hasarda azalma meydana geldiği ile ilgili çalışmalar mevcuttur. PDE4

inhibitörleri nörolojik hastalıklarda ve spinal kord hasarı, TBH, AH, major depresif hastalık, MS ve iskemik inme gibi inflamasyonunda eşlik ettiği hastalıkların çalışıldığı hayvan modellerinde etkinlik göstermişlerdir. Roflumilast (RF) yüksek selektiviteye sahip ikinci jenerasyon PDE4 enzim inhibitörüdür. Sıçanlarda subaraknoid kanama modelinde gelişen serebral inflamasyon üzerine RF'nin etkileri araştırılmış ve nörolojik hasarı ve inflamatuvar sitokinlerden IL-1 β , IL-6 ve TNF α seviyelerini ve apoptotik nöron sayılarını anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir [164]. Non-emetik dozda kemirgenlerde RF'nin hafıza sonksiyonlarını geliştirdiği gözlenmiştir [165]. İnsanlarda orta bilişsel hasar ve AH'da RF'nin faz I ve II klinik denemeleri sürmektedir [166]. Hipertansif sıçanlarda RF'nin PDE4 inhibisyonu yaparak öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki bozulmaları düzelttiği gözlenmiştir [167]. PDE inhibisyonu TBH'da da denenmiştir. TBH'da ikincil ulak cAMP 'nın hipokampüste nöronal plastisiteyi koruduğu ve LTP'nin sürekliliğini sağladığı gözlenmiştir. Biz çalışmamızda RF (5 μ M)'nin tek başına SESN2 protein ekspresyonunu arttırdığını gözlemledik. RF (5 μ M) HT22 hücrelerinde, 5 μ M A β ₂₅₋₃₅'in yaptığı *SESN2* gen ekspresyonundaki artışı azaltmış (Şekil 4-2), protein ekspresyonundaki artışı ise değiştirmemiştir. RF'ın bu SESN2'yi tek başına arttırıcı etkisini hücre içi endojen koruyucu yollara direkt etkisi olarak yorumlamak mümkündür. RF tek başına p-AMPK ve p-mTOR ekspresyonunu değiştirmemiş, A β ₂₅₋₃₅'in yaptığı p-AMPK ekspresyonundaki azalmayı ve p-mTOR ekspresyonundaki artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde geri döndürmüştür (Şekil 4-6 ve 4-7). RF tek başına otofaji proteinlerinden *ATG5* ve *BECN1* gen ekspresyonunda artışa neden olmuş, bu genlerde A β ₂₅₋₃₅'in yaptığı azalmayı geri çevirmiştir. RF, otofaji belirteci LC3II'yi tek başına değiştirmemiş, A β ₂₅₋₃₅'in yaptığı LC3II azalmasını anlamlı olarak geri çevirmiştir (Şekil 4-8).

PDE4 inhibitörü rolipram (ROL) da, bilişsel çalışmalarda geniş çapta test edilmiştir [197]. Nesne tanıma testinde ROL tedavisi ile rodentlerde (sıçan/fare) hafıza fonksiyonlarında artış gözlenmiştir [169]. ROL'un skopolamin ile oluşturulan hafıza hasarını düzelttiği gözlenmiştir. ROL tedavisinin sıçanlarda A β ile indüklenen bilişsel hasarı ve nöroinflamasyonu da geri çevirdiği gözlenmiştir. Hipokampus kesitlerinde ROL'un özellikle cAMP düzeyinde yüksek, cGMP düzeyinde daha sınırlı artış yaptığı ve bu artışın özellikle hipokampal astrositlerde gerçekleştiği gösterilmiştir [25]. ROL kemirgen omurilik hasarı modellerinde aksonal büyümeyi

ve nöronal sağ kalımı arttırmış [170]. ROL, HH fare modelinde atrofi gelişimini geciktirmiştir [171]. Hipertansif sıçanlarda RF'nin yanı sıra ROL'un da PDE4 inhibisyonu yaparak öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki bozulmaları düzelttiği gözlenmiştir [167]. Çalışmamızda ROL (10 μ M)'un tek başına *SESN2* gen ekspresyonunu ve protein ekspresyonunu değiştirmemiş, beraber uygulandığı 5 μ M $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı *SESN2* protein ekspresyonundaki artışı ise geri çevirmiştir (Şekil 4-5). ROL tek başına p-AMPK ve p-mTOR ekspresyonunu değiştirmemiş, $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı p-AMPK ekspresyonundaki azalmayı ve p-mTOR ekspresyonundaki artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde geri döndürmüştür (Şekil 4-6 ve 4-7). ROL tek başına otofaji proteinlerinden ATG5 ve BECN1 gen ekspresyonunda artışa neden olmuş, bu genlerde $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı azalmayı geri çevirmiştir. ROL, otofaji belirteci LC3II'yi tek başına değiştirmemiş, $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı LC3II azalmasını anlamlı olarak geri çevirmiştir (Şekil 4-8).

PDE5, hücre içi cGMP konsantrasyonunu kontrol eden kritik enzimdir. PDE5'in üç varyantı PDE5A1, A2 ve A3 beyinde özellikle hipokampus, korteks ve bilişsel ve duyuşsal fonksiyonları yürüten diğer beyin bölgelerinde lokalizedirler. Sildenafil, AH tgAPP/PS1 farelerde hafıza hasarını ve cGMP/PKG/pCREB kaskadındaki fonksiyon bozukluğunu geri çevirdiği ve hipokampüste hem çözümlenür $A\beta_{1-40}$ hem de $A\beta_{25-35}$ seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [172]. Sildenafilin presinaptik veya postsinaptik bir mekanizma yoluyla nesne tanıma ve bellek pekiştirmenin erken evrelerini geliştirdiği varsayılmaktadır. Presinaptik mekanizma nitrik oksit (NO)/cGMP sinyal yolağı ile postsinaptik mekanizma da cGMP/PKG/CREB sinyal yolağı ile gerçekleşmektedir [174]. Sildenafilden daha uzun yarılanma ömrüne sahip ve kronik tedavilerde daha güvenli kullanıma sahip bir diğer potent PDE5 inhibitörü tadalafil (TAD)'in de AH farelerde KBE'yi geçerek tau fosforilasyonunu azalttığı, $A\beta$ yükünü arttırmadığı ve bilişsel faaliyetlerde düzelme yaptığı gösterilmiştir. TAD'ın hipokampal CA1 nöronlarında iskeminin indüklediği apoptotik süreci baskılayarak sinir koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [173]. Biz çalışmamızda TAD (50 μ M)'nin tek başına *SESN2* gen ve protein ekspresyonunu değiştirmedini (Şekil 4-2 ve 4-5) gözlemledik. TAD (50 μ M) HT22 hücrelerinde, 5 μ M $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı *SESN2* gen ekspresyonundaki (Şekil 4-2) ve protein ekspresyonundaki artışı geri çevirmiştir. TAD tek başına p-AMPK ve p-mTOR ekspresyonunu arttırmış, $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı p-AMPK ekspresyonundaki azalmayı ve p-mTOR

ekspresyonundaki artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde geri döndürmüştür (Şekil 4-6 ve 4-7). TAD (50 μ M) tek başına otofaji proteinlerinden *ATG5* ekspresyonu değiştirmemiş ve $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı *ATG5* azalmasını anlamlı olarak geri çevirememiştir. TAD (50 μ M) tek başına otofaji proteinlerinden *BECN1* gen ekspresyonunu değiştirmemiş, bu gende $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı azalmayı geri çevirmiştir. TAD (50 μ M) otofaji belirteci LC3II'yi tek başına değiştirmemiş, $A\beta_{25-35}$ 'in yaptığı LC3II azalmasını anlamlı olarak geri çevirmiştir (Şekil 4-8).

Bu bulgular doğrultusunda, bahsi geçen PDEİ'lerin $A\beta_{25-35}$ uygulanan hücrelerde farmakolojik etkisini, artan SESN2 ekspresyonunda azalma yaparak ve hücre koruyucu AMPK aktivasyonu ve otofajinin düzenlenmesinde etkin mTOR inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. Nörodejeneratif hasara ve $A\beta$ toksisitesine karşı koruyucu olarak arttığı gösterilen, bu etkisinde antioksidan ve otofajiyi indükleyici mekanizmaların sorumlu olduğu düşünülen SESN2'nin PDEİ uygulaması ile azalması PDEİ'lerin hücrede kompensatuvar olarak rol oynadıkları ve SESN2 savunmasına gerek kalmadan koruyucu etki gösterdikleri şeklinde yorumlanabilir. $A\beta_{25-35}$ uygulaması ile azalan otofaji proteinleri *ATG5* ve beclin 1 ve otofaji belirteci LC3II'nin PDEİ uygulaması ile artışı PDEİ'lerin hücreye, koruyucu ve otofajiyi artırıcı yönde destek verdiklerinin bir kanıtı sayılabilir. Ancak her bir PDEİ'nin otofajinin farklı komponentleri üzerinden etki gösterdiği söylenebilir.

İleriki çalışmalarımızda, $A\beta_{25-35}$ uygulaması ile eş zamanlı olarak PDEİ ile tedavi edilen hücrelerde SESN2 susturması yapılan hücrelerde beclin-1, *ATG5* ve LC3II ekspresyon düzeylerine bakmayı amaçlamaktayız. Böylelikle PDEİ'lerin koruyucu ve kompensatuvar etkilerinde SESN2'nin rolünü daha detaylı açıklama olanağı bulabileceğiz.

KAYNAKLAR

- [1] J. Götz, A. Eckert, M. Matamales, L. M. Ittner, and X. Liu, “Modes of A β toxicity in Alzheimer’s disease,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 20. pp. 3359–3375, Oct-2011.
- [2] D. International, “World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia; World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia.”
- [3] H. Akiyama *et al.*, “Inflammation and Alzheimer’s disease,” *Neurobiology of Aging*, vol. 21, no. 3. Elsevier Inc., pp. 383–421, 2000.
- [4] D. J. Selkoe, “The cell biology β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer’s disease,” *Trends in Cell Biology*, vol. 8, no. 11. pp. 447–453, 01-Nov-1998.
- [5] D. Harold *et al.*, “Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer’s disease,” *Nat. Genet.*, vol. 41, no. 10, pp. 1088–1093, Oct. 2009.
- [6] B. Duthey, “Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias,” 2013.
- [7] “Alzheimer’s Association | Alzheimer’s Disease & Dementia Help.” [Online]. Available: <https://www.alz.org/>. [Accessed: 08-Dec-2019].
- [8] T. Hara *et al.*, “Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice,” *Nature*, 2006.
- [9] J. N. Keller, K. B. Hanni, and W. R. Markesbery, “Impaired proteasome function in Alzheimer’s disease,” *J. Neurochem.*, 2000.
- [10] J. R. Kim *et al.*, “Identification of amyloid β -peptide responsive genes by cDNA microarray technology: Involvement of RTP801 in amyloid β -peptide toxicity,” *Exp. Mol. Med.*, 2003.
- [11] S. Majumder, A. Richardson, R. Strong, and S. Oddo, “Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits,” *PLoS One*, 2011.

- [12] R. A. Nixon, "Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease," *Journal of Cell Science*. 2007.
- [13] A. Caccamo, E. Ferreira, C. Branca, and S. Oddo, "p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy," *Mol. Psychiatry*, 2017.
- [14] M. Martinez-Vicente, "Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation," *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015.
- [15] S. Sadigh-Eteghad, B. Sabermarouf, A. Majdi, M. Talebi, M. Farhoudi, and J. Mahmoudi, "Amyloid-beta: A crucial factor in Alzheimer's disease," *Medical Principles and Practice*. 2015.
- [16] A. V. Budanov *et al.*, "Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability," *Oncogene*, 2002.
- [17] A. V. Budanov, A. A. Sablina, E. Feinstein, E. V. Koonin, and P. M. Chumakov, "Regeneration of Peroxiredoxins by p53-Regulated Sestrins, Homologs of Bacterial AhpD," *Science (80-.)*, 2004.
- [18] J. H. Lee, R. Bodmer, E. Bier, and M. Karin, "Sestrins at the crossroad between stress and aging," *Aging (Albany. NY)*, 2010.
- [19] S. Velasco-Miguel *et al.*, "PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes," *Oncogene*, 1999.
- [20] C. C. Chen *et al.*, "FoxOs Inhibit mTORC1 and Activate Akt by Inducing the Expression of Sestrin3 and Rictor," *Dev. Cell*, 2010.
- [21] A. V. Budanov and M. Karin, "p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling," *Cell*, 2008.
- [22] J. H. Lee, A. V. Budanov, and M. Karin, "Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging," *Cell Metabolism*, vol. 18, no. 6. pp. 792–801, 03-Dec-2013.
- [23] Y. S. Chen, S. Der Chen, C. L. Wu, S. S. Huang, and D. I. Yang, "Induction of sestrin2 as an endogenous protective mechanism against amyloid beta-peptide neurotoxicity in primary cortical culture," *Exp. Neurol.*, 2014.

- [24] E. W. Vogel, F. N. Morales, D. F. Meaney, C. R. Bass, and B. Morrison, "Phosphodiesterase-4 inhibition restored hippocampal long term potentiation after primary blast," *Exp. Neurol.*, vol. 293, pp. 91–100, Jul. 2017.
- [25] van Staveren WC, Markerink-van Ittersum M, H. W. Steinbusch, and de Vente J, "The effects of phosphodiesterase inhibition on cyclic GMP and cyclic AMP accumulation in the hippocampus of the rat.," *Brain Res.*, vol. 888, no. 2, pp. 275–286, Jan. 2001.
- [26] A. T. Bender and J. A. Beavo, "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use," *Pharmacological Reviews*. 2006.
- [27] Y. S. Chen, S. Der Chen, C. L. Wu, S. S. Huang, and D. I. Yang, "Induction of sestrin2 as an endogenous protective mechanism against amyloid beta-peptide neurotoxicity in primary cortical culture," *Exp. Neurol.*, vol. 253, pp. 63–71, Mar. 2014.
- [28] Y. Gao, L. Tan, J.-T. Yu, and L. Tan, "Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies," *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 15, no. 3, Jan. 2018.
- [29] D. Mastroeni, A. Grover, E. Delvaux, C. Whiteside, P. D. Coleman, and J. Rogers, "Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*. 2011.
- [30] H. Braak and E. Braak, "Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes," *Acta Neuropathologica*, vol. 82, no. 4. Springer-Verlag, pp. 239–259, Sep-1991.
- [31] C. Haass and D. J. Selkoe, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007.
- [32] M. A. Meraz-Ríos, K. I. Lira-De León, V. Campos-Peña, M. A. De Anda-Hernández, and R. Mena-López, "Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease," *Journal of Neurochemistry*. 2010.
- [33] Y. Yoshiyama, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, "Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2013.

- [34] M. Wortmann, "Dementia: A global health priority - Highlights from an ADI and World Health Organization report," *Alzheimer's Research and Therapy*. 2012.
- [35] A. Contestabile, "The history of the cholinergic hypothesis," *Behavioural Brain Research*. 2011.
- [36] P. J. Whitehouse *et al.*, "Reductions in Acetylcholine and Nicotine Binding in Several Degenerative Diseases," *Arch. Neurol.*, 1988.
- [37] A. Nordberg, I. Alafuzoff, and B. Winblad, "Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: Changes with aging and dementia," *J. Neurosci. Res.*, 1992.
- [38] A. Fisher, "Cholinergic Treatments with Emphasis on M1 Muscarinic Agonists as Potential Disease-Modifying Agents for Alzheimer's Disease," *Neurotherapeutics*, 2008.
- [39] G. T. Grossberg, "The ABC of Alzheimer's disease: Behavioral symptoms and their treatment," *Int. Psychogeriatrics*, 2002.
- [40] Y. Tanaka *et al.*, "Decreased striatal D2 receptor density associated with severe behavioral abnormality in Alzheimer's disease," *Ann. Nucl. Med.*, 2003.
- [41] S. M. Hague, S. Klaffke, and O. Bandmann, "Neurodegenerative disorders: Parkinson's disease and Huntington's disease," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2005.
- [42] X. X. Dong, Y. Wang, and Z. H. Qin, "Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases," *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009.
- [43] L. Berliocchi, D. Bano, and P. Nicotera, "Ca²⁺ signals and death programmes in neurons," in *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, vol. 360, no. 1464, pp. 2255–2258.
- [44] "(No Title)." [Online]. Available: http://geriatri.dergisi.org/uploads/pdf/pdf_TJG_109.pdf. [Accessed: 08-Dec-2019].
- [45] S. H. Barage and K. D. Sonawane, "Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease," *Neuropeptides*. 2015.

- [46] M. Goedert and M. G. Spillantini, "A century of Alzheimer's disease," *Science*, 2006.
- [47] A. Goate *et al.*, "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease," *Nature*, 1991.
- [48] R. Sherrington *et al.*, "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease," *Nature*, 1995.
- [49] E. Levy-Lahad *et al.*, "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus," *Science* (80-.), 1995.
- [50] M. Citron *et al.*, "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice," *Nat. Med.*, 1997.
- [51] J. R. Cirrito *et al.*, "Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- β levels in vivo," *Neuron*, 2005.
- [52] X. D. Cai, T. E. Golde, and S. G. Younkin, "Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor," *Science* (80-.), 1993.
- [53] M. Citron *et al.*, "Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production," *Nature*, 1992.
- [54] T. Wisniewski, J. Ghiso, and B. Frangione, "Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991.
- [55] P. T. Lansbury, "Inhibition of amyloid formation: A strategy to delay the onset of Alzheimer's disease," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997.
- [56] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner, "A protein factor essential for microtubule assembly," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975.
- [57] K. Iqbal, F. Liu, C.-X. Gong, and I. Grundke-Iqbal, "Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies," *Curr. Alzheimer Res.*, 2010.

- [58] E. Kopke, Y. C. Tung, S. Shaikh, C. A. Del Alonso, K. Iqbal, and I. Grundke-Iqbal, "Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease," *J. Biol. Chem.*, 1993.
- [59] K. Iqbal *et al.*, "DEFECTIVE BRAIN MICROTUBULE ASSEMBLY IN ALZHEIMER'S DISEASE," *Lancet*, 1986.
- [60] C. Bancher *et al.*, "Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease," *Brain Res.*, 1989.
- [61] A. D. C. Alonso, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, "Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994.
- [62] B. Li, M. O. Chohan, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, "Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau," *Acta Neuropathol.*, 2007.
- [63] J. Z. Wang, C. X. Gong, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, "Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 9, pp. 4854–4860, 1995.
- [64] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, and L. I. Binder, "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1986.
- [65] M. Barron, J. Gartlon, L. A. Dawson, P. J. Atkinson, and M. C. Pardon, "A state of delirium: Deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease," *Exp. Gerontol.*, 2017.
- [66] L. Amaducci, M. Falchini, and A. Lippi, "Descriptive epidemiology and risk factors for Alzheimer's disease," *Acta Neurol. Scand.*, 1992.
- [67] C. M. van Duijn, T. Stijnen, and A. Hofman, "Risk factors for Alzheimer's disease: overview of the EURODEM collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group," *Int J Epidemiol*, vol. 20 Suppl 2, pp. S4-12, 1991.

- [68] M. A. Pappolla *et al.*, “Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology.,” *Neurology*, vol. 61, no. 2, pp. 199–205, Jul. 2003.
- [69] K. R. Bales *et al.*, “Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition,” *Nature Genetics*, vol. 17, no. 3, pp. 263–264, 1997.
- [70] M. Simons, P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C. G. Dotti, and K. Simons, “Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6460–6464, May 1998.
- [71] E. R. Frears, D. J. Stephens, C. E. Walters, H. Davies, and B. M. Austen, “The role of cholesterol in the biosynthesis of β -amyloid,” *Neuroreport*, vol. 10, no. 8, pp. 1699–1705, Jun. 1999.
- [72] P. H. St George-Hyslop and A. Petit, “Molecular biology and genetics of Alzheimer’s disease,” *Comptes Rendus - Biologies*, vol. 328, no. 2, Elsevier Masson SAS, pp. 119–130, 2005.
- [73] D. A. Butterfield and D. Boyd-Kimball, “Amyloid β -Peptide(1-42) Contributes to the Oxidative Stress and Neurodegeneration Found in Alzheimer Disease Brain,” *Brain Pathol.*, vol. 14, no. 4, pp. 426–432, Apr. 2006.
- [74] L. M. Ittner *et al.*, “Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in alzheimer’s disease mouse models,” *Cell*, vol. 142, no. 3, pp. 387–397, Aug. 2010.
- [75] P. I. Moreira, C. Carvalho, X. Zhu, M. A. Smith, and G. Perry, “Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer’s disease pathophysiology,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1802, no. 1, pp. 2–10, Jan-2010.
- [76] A. Nordberg, “Amyloid plaque imaging in vivo: Current achievement and future prospects,” *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 35, no. SUPPL. 1, Mar. 2008.
- [77] M. A. Findeis, “The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer’s disease,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 116, no. 2, pp. 266–286, Nov-2007.

- [78] F. Bao, L. Wicklund, P. N. Lacor, W. L. Klein, A. Nordberg, and A. Marutle, "Different β -amyloid oligomer assemblies in Alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity," *Neurobiol. Aging*, vol. 33, no. 4, pp. 825.e1-825.e13, 2012.
- [79] T. J. Esparza *et al.*, "Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls," *Ann. Neurol.*, vol. 73, no. 1, pp. 104–119, Jan. 2013.
- [80] H. Martini-Stoica, Y. Xu, A. Ballabio, and H. Zheng, "The Autophagy-Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective," *Trends in Neurosciences*, vol. 39, no. 4. Elsevier Ltd, pp. 221–234, 01-Apr-2016.
- [81] D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, "Autophagy: cellular and molecular mechanisms. The Journal of Pathology, 221, 3–12. <http://doi.org/10.1002/path.2697>," *J. Pathol.*, vol. 221, no. 1, pp. 3–12, 2010.
- [82] C. de Duve, "The lysosome turns fifty," *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 847–849, Sep. 2005.
- [83] C. de Duve and R. Wattiaux, "Functions of Lysosomes," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 28, no. 1, pp. 435–492, Mar. 1966.
- [84] C. de DUVE, "Lysosomes revisited," *Eur. J. Biochem.*, vol. 137, no. 3, pp. 391–397, 1983.
- [85] D. M. Lowe and V. U. Fossato, "The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon," *Aquat. Toxicol.*, vol. 48, no. 2–3, pp. 75–85, Mar. 2000.
- [86] L. C. U. Junqueira, J. Carneiro, and R. O. Kelley, *Basic histology, Volume 7. Pp. 235 table 12-2*. Appleton & Lange, 1992.
- [87] "(No Title)."
- [88] G. M. Pastores, P. A. Torres, and B. J. Zeng, "Animal models for lysosomal storage disorders," *Biochemistry (Moscow)*. 2013.
- [89] K. V Figura and A. Hasilik, "Lysosomal Enzymes and their Receptors," *Annu. Rev. Biochem.*, 1986.

- [90] “(No Title).” [Online]. Available: <http://guncel.tgv.org.tr/journal/68/pdf/100492.pdf>. [Accessed: 09-Dec-2019].
- [91] D. Stanasic, “THE CELL Molecular Biology of Fifth Edition.” .
- [92] R. L. Deter and C. De Duve, “Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes.,” *J. Cell Biol.*, vol. 33, no. 2, pp. 437–449, 1967.
- [93] E. Ferraro and F. Cecconi, “Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007.
- [94] N. Mizushima, “Autophagy: Process and function,” *Genes and Development*, vol. 21, no. 22. pp. 2861–2873, 15-Nov-2007.
- [95] Y. Ohsumi, “Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, no. 3. pp. 211–216, Mar-2001.
- [96] T. Shintani and D. J. Klionsky, “Autophagy in health and disease: A double-edged sword,” *Science*, vol. 306, no. 5698. pp. 990–995, 05-Nov-2004.
- [97] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, “Autophagy fights disease through cellular self-digestion,” *Nature*, vol. 451, no. 7182. pp. 1069–1075, 28-Feb-2008.
- [98] Z. Yang and D. J. Klionsky, “Eaten alive: A history of macroautophagy,” *Nature Cell Biology*, vol. 12, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 814–822, 2010.
- [99] N. Mizushima, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, “The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 107–132, Nov. 2011.
- [100] D. J. Klionsky, “The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. 1, pp. 7–18, Jan. 2005.
- [101] A. C. Massey, C. Zhang, and A. M. Cuervo, “Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease,” *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 73. pp. 205–235, 2006.
- [102] Z. Xie and D. J. Klionsky, “Autophagosome formation: Core machinery and adaptations,” *Nature Cell Biology*, vol. 9, no. 10. pp. 1102–1109, Oct-2007.

- [103] J. Lee, S. Giordano, and J. Zhang, “Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling,” *Biochemical Journal*, vol. 441, no. 2. pp. 523–540, 15-Jan-2012.
- [104] N. Mizushima, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, “Autophagosome formation in mammalian cells,” *Cell Structure and Function*, vol. 27, no. 6. pp. 421–429, Dec-2002.
- [105] A. E. Majeski and J. Fred Dice, “Mechanisms of chaperone-mediated autophagy,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 36, no. 12. pp. 2435–2444, Dec-2004.
- [106] G. Kroemer, G. Mariño, and B. Levine, “Autophagy and the Integrated Stress Response,” *Molecular Cell*, vol. 40, no. 2. pp. 280–293, Oct-2010.
- [107] M. Mehrpour, A. Esclatine, I. Beau, and P. Codogno, “Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells,” *Cell Res.*, vol. 20, no. 7, pp. 748–762, 2010.
- [108] “(No Title).” [Online]. Available: http://research.sabanciuniv.edu/17390/1/pdf_AUD_97.pdf. [Accessed: 09-Dec-2019].
- [109] G. M. Palomo and G. Manfredi, “Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: The role of mitochondria quality control,” *Brain Research*, vol. 1607. Elsevier B.V., pp. 36–46, 14-May-2015.
- [110] M. Akbar *et al.*, “Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress,” *Brain Res.*, vol. 1637, pp. 34–55, Apr. 2016.
- [111] Y. J. Choe *et al.*, “Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress,” *Nature*, vol. 531, no. 7593, pp. 191–195, Mar. 2016.
- [112] D. J. Colacurcio and R. A. Nixon, “Disorders of lysosomal acidification—The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease,” *Ageing Research Reviews*, vol. 32. Elsevier Ireland Ltd, pp. 75–88, 01-Dec-2016.

- [113] “Türkiye Klinikleri Pharmacology - Special Topics 2017 - Volume 5 Issue 1 | Journals | Türkiye Klinikleri.” [Online]. Available: <https://www.turkiyeklinikleri.com/journal/pharmacology-special-topics/1304-4257/issue/2017/5/1-0/en-index.html/>. [Accessed: 09-Dec-2019].
- [114] Y. Huang and L. Mucke, “Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies,” *Cell*, vol. 148, no. 6. pp. 1204–1222, 16-Mar-2012.
- [115] Y. Lim, H. Cho, and E. K. Kim, “Brain metabolism as a modulator of autophagy in neurodegeneration,” *Brain Research*, vol. 1649. Elsevier B.V., pp. 158–165, 15-Oct-2016.
- [116] J. Brettschneider, K. Del Tredici, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, “Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: A focus on human studies,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 16, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 109–120, 01-Jan-2015.
- [117] M. S. Forman, J. Q. Trojanowski, and V. M. Y. Lee, “Neurodegenerative diseases: A decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs,” *Nature Medicine*, vol. 10, no. 10. pp. 1055–1063, Oct-2004.
- [118] M. Usenovic and D. Krainc, “Lysosomal dysfunction in neurodegeneration: The role of ATP13A2/PARK9,” *Autophagy*, vol. 8, no. 6, pp. 987–988, 2012.
- [119] T. Hara *et al.*, “Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice,” *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 885–889, Jun. 2006.
- [120] J. N. Keller, K. B. Hanni, and W. R. Markesbery, “Impaired proteasome function in Alzheimer’s disease,” *J. Neurochem.*, vol. 75, no. 1, pp. 436–439, 2000.
- [121] J. R. Kim *et al.*, “Identification of amyloid β -peptide responsive genes by cDNA microarray technology: Involvement of RTP801 in amyloid β -peptide toxicity,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 35, no. 5, pp. 403–411, Oct. 2003.
- [122] S. Majumder, A. Richardson, R. Strong, and S. Oddo, “Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, Sep. 2011.

- [123] R. A. Nixon, "Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease," *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 23, pp. 4081–4091, 01-Dec-2007.
- [124] C. Haass and D. J. Selkoe, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 2, pp. 101–112, Feb-2007.
- [125] R. H. Takahashi *et al.*, "Intraneuronal Alzheimer $A\beta_{42}$ accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology," *Am. J. Pathol.*, vol. 161, no. 5, pp. 1869–1879, 2002.
- [126] M. P. Mattson, "<ArticlesNature2004Mattson.pdf>," *Nature*, vol. 431, no. 7004, pp. 631–640, 2004.
- [127] D. M. Walsh, A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron, and D. B. Teplow, "Amyloid β -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 35, pp. 22364–22372, Aug. 1997.
- [128] A. Majumdar *et al.*, "Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils," *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, no. 4, pp. 1490–1496, Apr. 2007.
- [129] A. Majumdar, E. Capetillo-Zarate, D. Cruz, G. K. Gouras, and F. R. Maxfield, "Degradation of Alzheimer's amyloid fibrils by microglia requires delivery of CIC-7 to lysosomes," *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 10, pp. 1664–1676, May 2011.
- [130] T. Wisniewski, J. Ghiso, and B. Frangione, "Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 180, no. 3, p. 1528, Nov. 1991.
- [131] V. Boissonneault, M. Filali, M. Lessard, J. Relton, G. Wong, and S. Rivest, "Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on β -amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease," *Brain*, vol. 132, no. 4, pp. 1078–1092, 2009.
- [132] D. M. Paresce, R. N. Ghosh, and F. R. Maxfield, "Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid β -protein via a scavenger receptor," *Neuron*, vol. 17, no. 3, pp. 553–565, 1996.

- [133] S. Solé-Domènech, D. L. Cruz, E. Capetillo-Zarate, and F. R. Maxfield, “The endocytic pathway in microglia during health, aging and Alzheimer’s disease,” *Ageing Research Reviews*, vol. 32. Elsevier Ireland Ltd, pp. 89–103, 01-Dec-2016.
- [134] M. Hansen, “Autophagy - An Emerging Anti-Aging Mechanism?,” *J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. s4, no. 01, 2012.
- [135] A. Caccamo, S. Majumder, A. Richardson, R. Strong, and S. Oddo, “Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and Tau: Effects on cognitive impairments,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 17, pp. 13107–13120, Apr. 2010.
- [136] “Comprehending Human Disorders: Focus on Reactive Oxygen Species. | Request PDF.” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/283119636_Comprehending_Human_Disorders_Focus_on_Reactive_Oxygen_Species. [Accessed: 09-Dec-2019].
- [137] R. A. Nixon, “The role of autophagy in neurodegenerative disease,” *Nature Medicine*, vol. 19, no. 8. pp. 983–997, Aug-2013.
- [138] D. S. Yang *et al.*, “Defective macroautophagic turnover of brain lipids in the TgCRND8 Alzheimer mouse model: Prevention by correcting lysosomal proteolytic deficits,” *Brain*, vol. 137, no. 12, pp. 3300–3318, Dec. 2014.
- [139] S. Velasco-Miguel *et al.*, “PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes,” *Oncogene*, vol. 18, no. 1, pp. 127–137, Jan. 1999.
- [140] A. V. Budanov and M. Karin, “p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling,” *Cell*, vol. 134, no. 3, pp. 451–460, Aug. 2008.
- [141] C. C. Chen *et al.*, “FoxOs Inhibit mTORC1 and Activate Akt by Inducing the Expression of Sestrin3 and Rictor,” *Dev. Cell*, vol. 18, no. 4, pp. 592–604, Apr. 2010.

- [142] A. V. Budanov *et al.*, “Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability,” *Oncogene*, vol. 21, no. 39, pp. 6017–6031, 2002.
- [143] H. Peeters *et al.*, “PA26 is a candidate gene for heterotaxia in humans: Identification of a novel PA26-related gene family in human and mouse,” *Hum. Genet.*, vol. 112, no. 5–6, pp. 573–580, May 2003.
- [144] J. H. Lee *et al.*, “Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies,” *Science (80-.)*, vol. 327, no. 5970, pp. 1223–1228, Mar. 2010.
- [145] M. Pasha, A. H. Eid, A. A. Eid, Y. Gorin, and S. Munusamy, “Sestrin2 as a Novel Biomarker and Therapeutic Target for Various Diseases,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017.
- [146] S. H. Bae *et al.*, “Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of keap1 and prevent oxidative liver damage,” *Cell Metab.*, vol. 17, no. 1, pp. 73–84, Jan. 2013.
- [147] J. H. Lee, R. Bodmer, E. Bier, and M. Karin, “Sestrins at the crossroad between stress and aging,” *Aging (Albany. NY)*, vol. 2, no. 6, pp. 369–374, 2010.
- [148] J. Hagenbuchner, A. Kuznetsov, M. Hermann, B. Hausott, P. Obexer, and M. J. Ausserlechner, “FOXO3-induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L11 (Bim) and SESN3,” *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 5, pp. 1191–1203, Mar. 2012.
- [149] V. Nogueira *et al.*, “Akt Determines Replicative Senescence and Oxidative or Oncogenic Premature Senescence and Sensitizes Cells to Oxidative Apoptosis,” *Cancer Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 458–470, Dec. 2008.
- [150] S. Papadia *et al.*, “Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses,” *Nat. Neurosci.*, vol. 11, no. 4, pp. 476–487, Apr. 2008.
- [151] M. C. Maiuri *et al.*, “Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2,” *Cell Cycle*, vol. 8, no. 10, pp. 1571–1576, May 2009.
- [152] M. Ishihara *et al.*, “Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury,” *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 305, no. 4, May 2013.

- [153] A. A. Sablina, A. V. Budanov, G. V. Ilyinskaya, L. S. Agapova, J. E. Kravchenko, and P. M. Chumakov, "The antioxidant function of the p53 tumor suppressor," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 12, pp. 1306–1313, Dec. 2005.
- [154] D. E. Harrison *et al.*, "Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice," *Nature*, vol. 460, no. 7253, pp. 392–395, Jul. 2009.
- [155] W. Mair *et al.*, "Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTCL-1 and CREB," *Nature*, vol. 470, no. 7334, pp. 404–408, Feb. 2011.
- [156] J. E. Wilkinson *et al.*, "Rapamycin slows aging in mice," *Aging Cell*, vol. 11, no. 4, pp. 675–682, Aug. 2012.
- [157] H. W. Querfurth and F. M. LaFerla, "Alzheimer's disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 362, no. 4. Massachusetts Medical Society, pp. 329–344, 28-Jan-2010.
- [158] A. H. V. Schapira and E. Tolosa, "Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: Implications for treatment," *Nature Reviews Neurology*, vol. 6, no. 6. pp. 309–317, Jun-2010.
- [159] A. V. Budanov, J. H. Lee, and M. Karin, "Stressin' Sestrins take an aging fight," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 2, no. 10. pp. 388–400, Oct-2010.
- [160] M. D. Houslay and G. Milligan, "Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 22, no. 6, pp. 217–24, Jun. 1997.
- [161] A. Marte, O. Pepicelli, A. Cavallero, M. Raiteri, and E. Fedele, "In vivo effects of phosphodiesterase inhibition on basal cyclic guanosine monophosphate levels in the prefrontal cortex, hippocampus and cerebellum of freely moving rats," *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, no. 15, pp. 3338–3347, 2008.
- [162] M. P. Kelly *et al.*, "Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 2, pp. 383–397, Feb. 2014.

- [163] B. E. Lonze and D. D. Ginty, "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system," *Neuron*, vol. 35, no. 4. Cell Press, pp. 605–623, 15-Aug-2002.
- [164] Q. Wu *et al.*, "Roflumilast Reduces Cerebral Inflammation in a Rat Model of Experimental Subarachnoid Hemorrhage," *Inflammation*, vol. 40, no. 4, pp. 1245–1253, Aug. 2017.
- [165] S. S. L. Jabaris *et al.*, "Phosphodiesterase-4 inhibitors ameliorates cognitive deficits in deoxycorticosterone acetate induced hypertensive rats via cAMP/CREB signaling system," *Brain Res.*, vol. 1622, pp. 279–291, Oct. 2015.
- [166] J. Prickaerts, P. R. A. Heckman, and A. Blokland, "Investigational phosphodiesterase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 26, no. 9. Taylor and Francis Ltd, pp. 1033–1048, 02-Sep-2017.
- [167] S. G. S. L. Jabaris, H. Sumathy, R. S. Kumar, S. Narayanan, S. Thanikachalam, and C. S. Babu, "Effects of rolipram and roflumilast, phosphodiesterase-4 inhibitors, on hypertension-induced defects in memory function in rats," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 746, pp. 138–147, Jan. 2015.
- [168] A. Blokland, R. Schreiber, and J. Prickaerts, "Improving Memory: A Role for Phosphodiesterases," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 12, no. 20, pp. 2511–2523, Jun. 2006.
- [169] K. Rutten, J. L. Basile, J. Prickaerts, A. Blokland, and J. A. Vivian, "Selective PDE inhibitors rolipram and sildenafil improve object retrieval performance in adult cynomolgus macaques," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 196, no. 4, pp. 643–648, Mar. 2008.
- [170] E. Nikulina, J. L. Tidwell, H. N. Dai, B. S. Bregman, and M. T. Filbin, "The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 23, pp. 8786–8790, Jun. 2004.
- [171] Z. DeMarch, C. Giampà, S. Patassini, G. Bernardi, and F. R. Fusco, "Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease," *Neurobiol. Dis.*, vol. 30, no. 3, pp. 375–387, Jun. 2008.

- [172] J. Zhang *et al.*, “Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil prevents neuroinflammation, lowers beta-amyloid levels and improves cognitive performance in APP/PS1 transgenic mice,” *Behav. Brain Res.*, vol. 250, pp. 230–237, Aug. 2013.
- [173] C. García-Barroso *et al.*, “Tadalafil crosses the blood–brain barrier and reverses cognitive dysfunction in a mouse model of AD,” *Neuropharmacology*, vol. 64, pp. 114–123, Jan. 2013.
- [174] T. Kleppisch and R. Feil, “cGMP signalling in the mammalian brain: Role in synaptic plasticity and behaviour,” *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 191, pp. 549–579, 2009.
- [175] A. Saavedra, A. Giralt, H. Arumí, J. Alberch, and E. Pérez-Navarro, “Regulation of Hippocampal cGMP Levels as a Candidate to Treat Cognitive Deficits in Huntington’s Disease,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013.
- [176] K. Loughney, J. Taylor, and V. A. Florio, “Original research: 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: Localization in human tissues,” *Int. J. Impot. Res.*, vol. 17, no. 4, pp. 320–325, Jul. 2005.
- [177] E. Bischoff, “Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition,” *Int. J. Impot. Res.*, vol. 16, no. SUPPL. 1, Jun. 2004.
- [178] M. Kelly, “Does Phosphodiesterase 11A (PDE11A) Hold Promise as a Future Therapeutic Target?,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, no. 3, pp. 389–416, Dec. 2014.
- [179] M. Cabanero, G. Laje, S. Detera-Wadleigh, and F. J. McMahon, “Association study of phosphodiesterase genes in the sequenced treatment alternatives to relieve depression sample,” *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 19, no. 3, pp. 235–238, Mar. 2009.
- [180] H. Coon *et al.*, “Genetic risk factors in two Utah pedigrees at high risk for suicide,” *Transl. Psychiatry*, vol. 3, Nov. 2013.
- [181] J. Mertens *et al.*, “Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder,” *Nature*, vol. 527, no. 7576, pp. 95–99, Nov. 2015.

- [182] S. Hegde *et al.*, “PDE11A regulates social behaviors and is a key mechanism by which social experience sculpts the brain,” *Neuroscience*, vol. 335, pp. 151–169, Oct. 2016.
- [183] M. P. Kelly, “A role for phosphodiesterase 11A (PDE11A) in the formation of social memories and the stabilization of mood,” in *Advances in Neurobiology*, vol. 17, Springer New York LLC, 2017, pp. 201–230.
- [184] Z. G. Koçaklı, K. Akıllıoğlu, and A. Doğan, “Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü,” *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, 2015.
- [185] “Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. - PubMed - NCBI.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843774>. [Accessed: 09-Dec-2019].
- [186] J. A. Godoy, J. A. Rios, J. M. Zolezzi, N. Braidy, and N. C. Inestrosa, “Signaling pathway cross talk in Alzheimer’s disease,” *Cell Commun. Signal.*, 2014.
- [187] W. L. An *et al.*, “Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer’s disease,” *Am. J. Pathol.*, vol. 163, no. 2, pp. 591–607, Aug. 2003.
- [188] J. J. Pei and J. Hugon, “mTOR-dependent signalling in Alzheimer’s disease,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008.
- [189] A. Caccamo, V. De Pinto, A. Messina, C. Branca, and S. Oddo, “Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer’s disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature,” *J. Neurosci.*, 2014.
- [190] Q. Li, Y. Liu, and M. Sun, “Autophagy and Alzheimer’s Disease,” *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017.
- [191] S. H. Barage and K. D. Sonawane, “Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer’s disease,” *Neuropeptides*, vol. 52. Churchill Livingstone, pp. 1–18, 2015.
- [192] “Díaz et al. 2016 Nature | Request PDF.” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/290435257_Diaz_et_al_2016_Nature. [Accessed: 09-Dec-2019].

- [193] R. Frazzi, R. Valli, I. Tamagnini, B. Casali, N. Latruffe, and F. Merli, “Resveratrol-mediated apoptosis of hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation,” *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 5, pp. 1013–1021, Mar. 2013.
- [194] H. Deng and M. tian Mi, “Resveratrol Attenuates $A\beta_{25-35}$ Caused Neurotoxicity by Inducing Autophagy Through the TyrRS-PARP1-SIRT1 Signaling Pathway,” *Neurochem. Res.*, vol. 41, no. 9, pp. 2367–2379, Sep. 2016.
- [195] H. R. Lee *et al.*, “Cilostazol suppresses β -amyloid production by activating a disintegrin and metalloproteinase 10 via the upregulation of SIRT1-coupled retinoic acid receptor- β ,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 92, no. 11, pp. 1581–1590, 2014.
- [196] H. R. Lee *et al.*, “Cilostazol upregulates autophagy via SIRT1 activation: Reducing amyloid- β peptide and APP-CTF β levels in neuronal cells,” *PLoS One*, vol. 10, no. 8, Aug. 2015.
- [197] “Blokland A, Schreiber R, Prickaerts J. Improving memory: a role for phosphodiesterases. *Curr Pharmacol Design* 2006; 12: 2511–2523.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ROFLUMİLAST, ROLİPRAM VE TADALAFİL'İN FARE HİPOKAMPAL NÖRON (HT-22) HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE AMİLOİD BETA PEPTİD İLE İNDÜKLENEN SESTRİN-2 ÜZERİNE ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

%17	%16	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%13
2	guncel.tgv.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	LİMAN, Narin and SUNA, Duygu Cemre. "HÜCRE KORUYUCU BİR MEKANİZMA: OTOFAJİ", Fırat Üniversitesi, 2017. Yayın	<%1
6	Submitted to Eastern Mediterranean University Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.klinikgelisim.org.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gökhan	Soyadı	Faikoğlu
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	08.01.1979
Uyruğu	T.C	TC Kim No	54793069058
Email	gokhan.faikoglu@gmail.com	Tel	05330908109

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.U.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AbD	2020
Yük.Lis.		
Lisans	Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi	2009
Lise	Kültür Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Medikal Müdür	Recordati İlaç	2019-...
2.	Ürün Müdürü	Abbott İlaç	2018-2019
3.	Medikal Müdür	Abbott İlaç	2017-2019
4.	Medikal Müdür	Bilim İlaç	2016-2017
5.	Aile Hekimi	T.C Sağlık Bakanlığı	2009-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	ÇOK İYİ	ÇOK İYİ	ÇOK İYİ		YDS 71.25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

-25. Ulusal Farmakoloji Kongresi 3-7 Kasım 2019, Kuşadası/Sözlü Bildiri

SS-54-Roflumilast, Rolipram ve Tadalafil'in Fare Hipokampal Nöron Hücre Kültürlerinde Amiloid Beta Peptid ile İndüklenen Sestrin-2 Üzerine Etkileri.

Gökhan Faikoğlu, Kübra Saygısever Faikoğlu, Hande Çelik, Hande Karahan, Pelin Kelicen Uğur, Ahmet Gökhan Akkan,Sibel Özyazgan

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Yürüyüş yapmak, kitap okumak

