

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI



**“GIDA TATLANDIRICILARI GLİKASYON ÜRÜNLERİ UYARIMLI AMİLOİD
OLUŞUMU ÜZERİNE FOSFODİESTERAZ 1B GENİ EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI”**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aykut KÜTÜKOĞLU

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KÜÇÜKGÜL

HATAY/2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI



**“GIDA TATLANDIRICILARI GLİKASYON ÜRÜNLERİ UYARIMLI AMİLOİD
OLUŞUMU ÜZERİNE FOSFODİESTERAZ 1B GENİ EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI”**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aykut KÜTÜKOĞLU

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KÜÇÜKGÜL

HATAY/2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**“GIDA TATLANDIRICILARI GLİKASYON ÜRÜNLERİ UYARIMLI AMİLOİD
OLUŞUMU ÜZERİNE FOSFODİESTERAZ 1B GENİ EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI”**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aykut Kütükoğlu

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından .././.... günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

.....
.....
.....
.....
.....

Bu tez enstitümüz Biyokimya (VET) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

.....

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezım süresince yanımda olan, her türlü bilgi ve birikimini benden esirgemeyen danışmanım, Syn. Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KÜÇÜKGÜL'e, Biyokimya A.D. öğretim üyelerinden Syn. Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Mustafa İŐGÖR'e çok teşekkür ederim. Ayrıca bu süreçte maddi ve manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen, Remzi-Kiraz KÜTÜKOĞLU, Elif Sena KÜTÜKOĞLU, Erkut KÜTÜKOĞLU ve Duru KÜTÜKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ.....	3
2. GENEL BİLGİ.....	4
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
3.1. Hücre Kültürü.....	15
3.2. MTT Viabilite Testi.....	16
3.3. Lizat hazırlama ve cAMP konsantrasyonu.....	16
3.4. RNA izolasyonu ve qRT-PCR.....	17
3.5. Kongo Red Boyama ile Amiloid Görüntüleme.....	18
3.6. İstatiksel Metot.....	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. Viabilite Sonuçları.....	20
4.2. Hücre içi cAMP Düzeyleri.....	21
4.3. Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	22
4.4. Hücre Görüntüleri.....	25
4.5. Kongo Red ile Amiloid Görüntülemeleri.....	27
5. TARTIŞMA.....	29
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	34
7. KAYNAKLAR.....	35
EKLER	
EK – 1	
EK – 2	
ÖZGEÇMİŞ.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Amiloid plakları birikimi uyarımlı ROS ve RNS oluşumu.....	5
Şekil 2.2 Metilglioksal uyarımlı ERK ve glioksalaz enzim sistemi.....	7
Şekil 2.3 Hücre içi apoptotik sinyal iletimi.....	8
Şekil 2.4 A β birikimi ve kalsiyum uyarımlı apoptosis.....	9
Şekil 2.5 Kalsiyum kalmodulin bağımlı PDE-1.....	11
Şekil 2.6 Metilglioksal uyarımlı hastalıklar.....	13
Şekil 2.7 MGO'nun hücre içi glioksalaz enzim sistemiyle.....	14
Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda metilglioksal uygulanımı hücre canlılık oranı.....	20
Şekil 4.2 Metilglioksal uygulanımının 24 saat uygulanımı sonucu hücre içi cAMP seviyeleri.....	21
Şekil 4.3 24 saat metilglioksal uygulanımının relatif A β 1-40 gen ekspresyon düzeyleri.....	22
Şekil 4.4 20 uM Metilglioksal uygulanımı ile relatif PDE1B1 gen ekspresyon düzeyleri...	23
Şekil 4.5 Kontrol ve metilglioksal gruplarında relatif PDE1B1 gen ekspresyon düzeyleri...	24
Şekil 4.6 Metilglioksal grubu görüntüsü.....	25
Şekil 4.7 Kontrol grubu hücre görüntüsü.....	26
Şekil 4.8 Kontrol grubu hücrelerde kongro red boyama görüntüsü.....	27
Şekil 4.9 MGO grubu hücrelerde kongro red boyama görüntüsü.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Deneysel çalışma düzeni.....	15
Çizelge 2. Araştırmada kullanılan gen spesifik primerlar.....	18



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

FBS	: Fötal sığır serumu
E-MEM	: Eagle's minimum essential medium
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
Apo E	: Apolipoprotein E
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
AD	: Alzheimer disease
GLP-1	: Glukagon like peptid 1
PKA	: Protein kinaz A
PI3K	: Fosfoinozitol 3 kinaz
ERK	: Ekstra selüler sinyal düzenleyici faktör
NAPKs	: Nitrojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz
JNK	: c-Jun amino terminal kinaz
NFKB	: Nükleer faktör kappa B
Cyt-c	: Sitokrom c
PDE	: Fosfodiesteraz
MGO	: Metilglioksal

ÖZET

Araştırmada yüksek früktoz diyeti tüketimine bağlı hücrede ortaya çıkan metabolik son ürün metilgliyoksalin in vitro beta amiloid oluşumu, ikincil haberci molekül siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve bu molekülün parçalanmasını sağlayan fosfodiesteraz 1 (PDE1) üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada insan orijinli glioblastoma U-87 MG (ATCC HTB-14) hücre hattı kullanıldı. Hücreler, 25 cm² lik flasklarda ve içeriğinde %10 oranında fetal sıgır serumu (FBS) ve penisilin/ streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunduran Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM) besi ortamında, 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava bulunduran steril inkübatörde üretildi. Çalışmada 1 gün önceden 24 kuyucuklu besi kaplarına ekilen hücelere farklı konsantrasyonlarda metilgliyoksal(100- 400 µm) eklendi. Süre sonunda kuyucuklara mtt ayırıcı eklenerek metilgliyoksalin etkin konsantrasyonu tespit edildi. Sonraki denemelerde bu konsantrasyon hücelere uygulanarak 24 saatin sonunda alınan RNA örneklerinden PDE 1B, PDE 1B1 ve Aβ1-40 gen ekspresyon düzeyleri real time PCR metoduyla araştırıldı. Yine alınan protein örneklerinden cAMP düzeyi ise ELİSA metoduyla analiz edildi. İnkübasyon süresi sonunda gruplardan hücre yoğunluk ve Kongo red boyaması ile amiloid birikim görüntüleri fotoğraflandı.

Araştırmada yapılan canlılık kontrollerinde metilgliyoksalin 200 µM konsantrasyonu kontrol grubuna göre hücreleri %28 oranında azalttığı gözlemlendi. Bu konsantrasyon etkin konsantrasyon olarak kabul edilerek sonraki çalışmalar için kullanıldı. Yine metilgliyoksalin hücreiçi cAMP düzeyini %31 oranında arttırdığı tespit edildi. Elde edilen gen ekspresyon verilerine göre metilgliyoksal Aβ1-40 gen ekspresyonunu 3.7 kat arttırırken, sırasıyla PDE1B ve PDE1B1 gen ekspresyonlarını ise 1.6 ve 3.3 kat baskıladığı ettiği tespit edildi. Çalışmada Kongo red boyaması sonucunda metilgliyoksal eklenen hücrelerin merkezlerinin mavi renkte ve periferlerinde ise sarı, yoğunlaşmış amiloid birikimlerinin olduğu gözlemlendi.

Yapılan araştırmada fruktoz diyetinin etkilenen bireylerde Alzheimer hastalığının patogenezinde anlamlı derecede etkileyeceği kanısına varıldı. Ancak konunun tam aydınlatılması için başta *in vivo* denemeler olmak üzere ve daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Alzheimer, cAMP, fosfodiesteraz, amiloid protein

ABSTRACT

This research aimed to investigate the effects of methylglyoxal, which is a metabolic end product in the cell due to high fructose diet consumption, on beta-amyloid formation in vitro, secondary messenger molecule cyclic adenosin monophosphate (cAMP) and its effect on phosphoesterase 1 (PDE1), which degrades this molecule.

Human glioblastoma U-87 MG (ATCC HTB-14) cell line was used in the study. Cells were maintained in a sterile incubator at 37 ° C, 5% CO₂ and 95% air in Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM) medium containing 25% fetal bovine serum and 10 % fetal bovine serum (FBS) and penicillin / streptomycin / amphotericin B mixture. Methylglyoxal was added at different concentrations (100-400 µM) to the cells cultured in 24-well flask one day before. At the end of the period, the effective concentration of methylglyoxal was determined by adding MTT reagent to the wells. In subsequent experiments, this concentration was applied to the cells, and the expression levels of PDE 1B, PDE 1B1 and Aβ1-40 gene from the RNA samples taken at the end of 24 hours were investigated using real time PCR method. Again, cAMP levels of the protein samples were analyzed by ELISA method. At the end of the incubation period, groups of cells were photographed for amyloid aggregation images with cell density and Congo red staining.

In the viability tests performed in the study, it was observed that the concentration of 200 µM of methylglyoxal decreased the cells by 28% compared to the control group. This concentration was taken as the effective concentration and used for further studies. Again, it was determined that methylglyoxal increased the cellular cAMP level by 31%. According to the obtained gene expression data, methylglyoxal increased the Aβ1-40 gene expression 3.7-fold, while the PDE1B and PDE1B1 gene expressions were downregulated 1.6 and 3.3-fold, respectively. In the study, it was observed that as a result of the Congo red dyeing, the centers of the methylglyoxal-added cells were surrounded by blue color and the peripheries were surrounded by yellow-colored condensed amyloid aggregates

In the present thesis, it was concluded that the fructose diet would significantly affect the pathogenesis of Alzheimer's disease in affected individuals. However, in order to fully illuminate the subject, further research is needed, especially in vivo experiments.

Key words: Alzheimer, cAMP, phosphodiesterase, amyloid protein

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı yaşlanmaya bağlı ortaya çıkan ilerleyici bir hastalıktır(Christen., 2000). Bu hastalıktan 2050 yılında dünya çapında yaklaşık 100 milyon insanın etkileneceği tahmin edilmektedir.

Alzheimer hastalığı, duygusal ve davranışsal birçok bulgular ile psikolojik bozukluklara neden olmaktadır. Alzheimer hastalığının patogenezinde inter- ve intraselüler aralıkta yanlış katlanmış amiloid protein birikimleriyle karakterizedir. Hastalığın ilerlemesinde oksidatif stres ve apoptozis anhtar rol oynamaktadır. Etkilenen hücrelerde beta sekretaz stimülasyonu oksidatif stresle tetiklenmekte ve apoptozis meydana gelmektedir. Özellikle süperoksit anyonu birikimi bu olguda ana rolü oynamaktadır. Hücre içi ikincil haberciler apoptozuda içine alan birçok biyofonksiyonda aracı molekül olarak yer almaktadır. Fosfodiesterazlar ise doku bağımlı olarak bu ikincil habercilerin hücre içi konsantrasyonunu modüle eden enzimlerdir. PDE 1 daha çok beyin dokusunda cAMP çalışan proteaz nitelikli enzim ailesidir. Son yıllarda araştırmalar amiloidogenezde ikincil habercilerin patogeneizde etkinlik rolü üzerine yoğunlaşmışlardır.

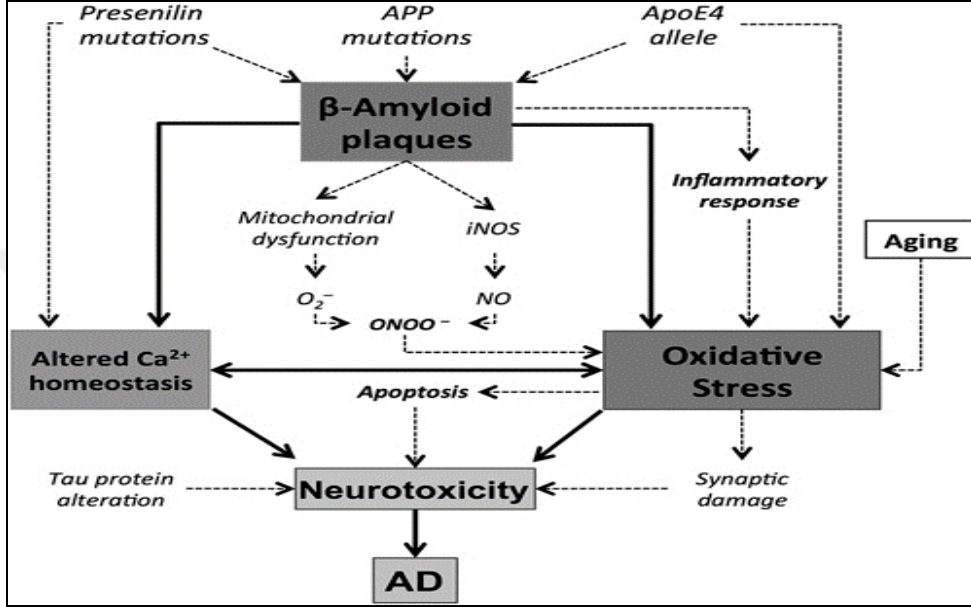
Bu tez çalışmasında İnsan menşeyli glioblastoma (A549) hücre hattının kullanılarak, karbonil bileşiklerden metilgliyoksalin hücre canlılığı ve ikincil haberci moleküller üzerine etkileri biyokimyasal ve moleküler teknikler kullanılarak araştırıldı.

2. GENEL BİLGİ

Alzheimer hastalığının meydana gelmesinde birçok gen rol oynar. Bu genlerden bazıları özellikle hastalığın erken aşamasında kromozom 21'de lokalize olan amiloid prokürsör proteini kodlayan genlerle, kromozom 1 ve 14 lokalize olan presenilin 1 ve 2, hastalığın oluşmasında önemli role sahiptirler. Sporadik ve geç aşamada ise kromozom 19 da lokalize olan apolipoprotein E(ApoE) ile alfa-2-macroglobulin genleri söz sahibidir. AD'in 2 temel belirteci olansenil plakların ve nörofibriler düğümlerin oluşmasından sorumludur. Özellikle de amiloidogenezde 42-43 aminoasitten oluşan β amiloid peptitler patogeneze sorumlu. 40 aminoasitlik peptitler patolojik değildir (Younkin ve ark., 1998).

Yaşlanmaya bağlı serbest radikal hipotezi(uzun sürelerde oluşur), yaşlanmayla ROS hücrelerde (özellikle nöronlarda) birikmesi ve hücrelerin makromoleküllerine(nükleus, mitokondrial DNA, membran lipidleri ve sitoplazmik proteinlere gibi) hasar vererek ortaya çıkar. ROS ve serbest radikallerin üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengesizlik AD'de içeren nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ile doğrudan ilişkilidir(Halliwell ve Gutteridge, 1989). Serbest radikaller, aslında potansiyel zararlı faktörlerdir. Hücreleri öldürürler ve hergün DNA'da yaklaşık 10,000 bazlık değişimlere neden olarak geri dönüşümsüz hasarlara neden olurlar(Ames ve ark., 1991). Araştırmaların çoğunda AD; yangı, oksidatif ve nitrazif stres ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Jung ve ark., 2009). Fizyolojik yaşlanmaya süresince AD gibi yaşlanmayla ortaya çıkan bazı nörodejeneratif hastalıklarda hücreler için gerekli enerji, hasarlanmış mitokondrilerden temin edilemez(Hirai ve ark., 2001) Böylelikle AD için bu durum hastalığın gelişiminde patogenezinde anahtar rol oynar. Nöronlar oksidatif strese yüksek enerji tüketimi ve membranlarında yüksek miktarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerine sahip olduklarından diğer organ ve dokulara göre GSH aktivitesinin düşük oranlarda olmasından dolayı (Christen, 2000). ROS uyarımlı oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Beyindeki nöronlar kendilerini oksidatif stresin yıkıcı etkilerini tamir etmeye çalışırken hücrede A β amiloid protein oluşumunu sağlayan β amiloid prokürsör proteinin (β APP) ekspresyon dereceleri artar ve hücrede β amiloid peptitleri birikimi şekillenir (Aliyev ve ark., 2009A; Aliyev ve ark., 2009B). Bu olgu mitokondriden süperoksit gibi serbest radikallerin sitoplazmaya salınmasıyla meydana gelir ve ATP moleküllerinin üretim seviyelerinin azalmasıyla sonuçlanır. AD gelişmesindeki mitokondrial hasar

hipotezini oluşturmaktadır (Manczak ve ark., 2004). Beyin nitrik oksit sentazların ürettiği nitrik oksit artışına bağlı olarak oksidatif strese maruz kalabilir(Sheng ve ark., 2009). Oksidatif strese bağlı olarak mitokondriyal membran kaybına bağlı olarak sitoplazmaya sitokrom c salınımı sonucu şekillenen nöronal apoptoz Bcl-2 proteinleri tarafından düzenlenir (Vrabec ve ark., 2003; Dumont ve ark., 2009).



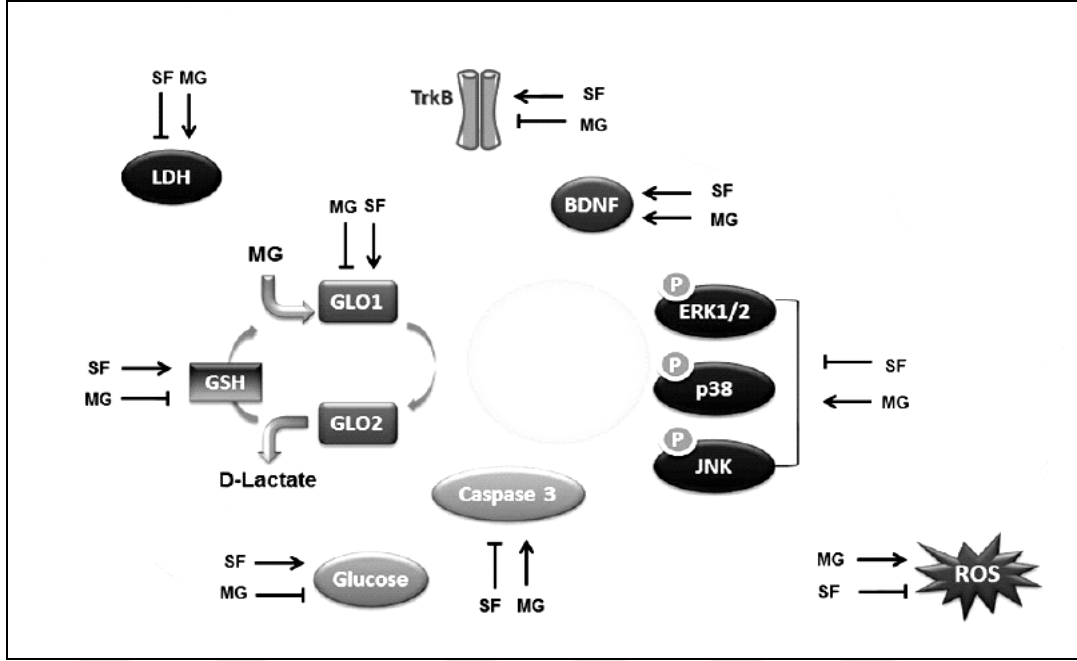
Şekil 2.1 Amiloid plakları birikimi uyarımlı ROS ve RNS oluşumu (Yuste ve ark., 2015)

Alzheimer modelinde, Glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) analoglarının sinaptik geçirgenliği artırma, sinaps kaybından nöronları koruma, amiloid plak seviyelerini azaltma ve çözünebilen amiloid oligomer seviyelerini azaltma gibi birçok nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. GLP-1 önemli fizyolojik etkilere sahip hücre içi sinyal peptididir (Sharma ve ark., 2014). GLP-1 sinyali etkisi diğer büyüme faktörlerin salınımını uyarır. GLP-1 reseptör (GLP-1R) aktivasyonu adenilat siklazı aktive eder ve cAMP seviyelerini artırır. Protein kinaz A (PKA) ve fosfoinozitol 3 kinaz (PI3k) sinyal yolu, aktive olan kaspaz 3 uyarımlı apoptozu baskılar (Perry ve ark., 2003). GLP-1R aktivasyonu ekstraselüler sinyal düzenleyici faktör (ERK) sinyalini artırır ve total ERK/pERK oranını yükseltir (Jolivalt ve ark., 2011).

Son yapılan araştırmalarda AD’de ekstraselüler sinyal tarafından düzenlenen kinaz (ERK) ve mitojen tarafından aktifleştirilen protein kinazlarının (MAPKs) yüksek derecede aktive olduğu rapor edilmiştir (Ashabi ve ark., 2012). MAPK sistemi; ERK, c-Jun amino terminal kinaz (JNK) ve P38 olarak tanımlanan 3 hücreiçi sinyal medyatöründen

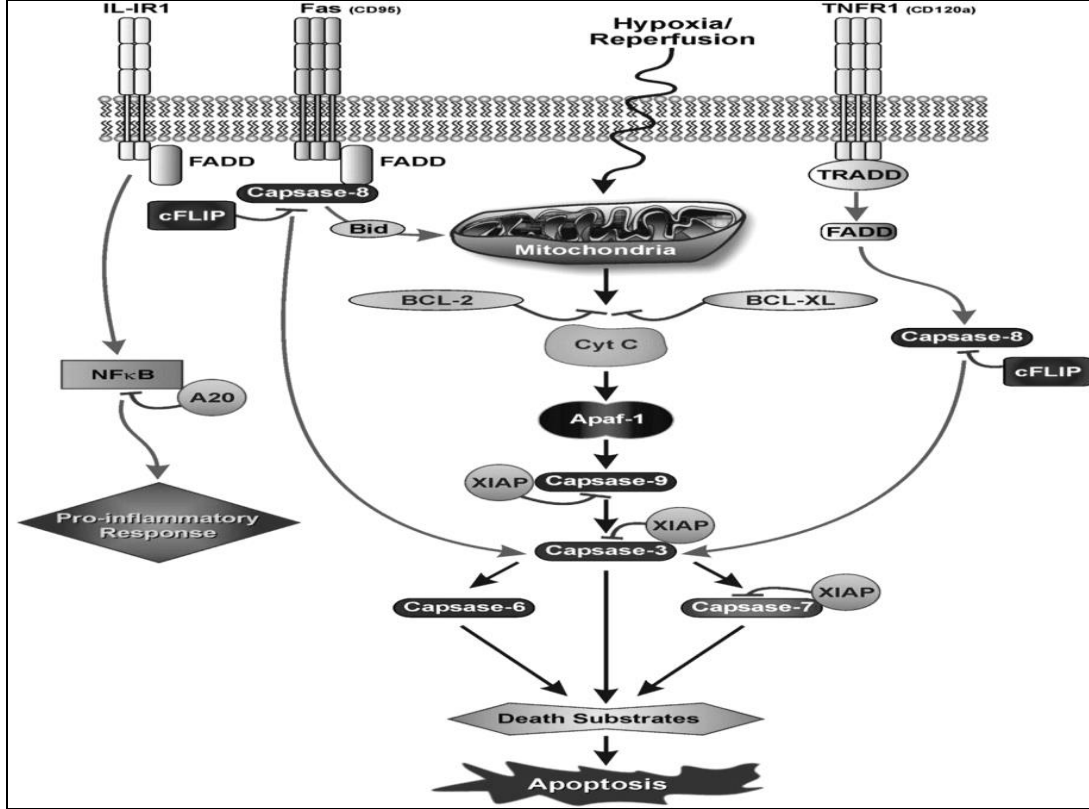
oluşmaktadır. ERK1/2'nin aktivasyonu nöron veya nöron dışı dokularda gen ekspresyonunda değişimler ile membran reseptör ve kanallarının translasyon sonrası düzenlenmesini sağlar. ERK1/2'nin etkisi hafıza, kavrama ve öğrenme gibi pek çok nöronal fonksiyonlarda söz sahibidir (Ji, 2004; Ashabi ve ark., 2012). P38 serin/treonin kinazların bir grup üyesidir. Ölüm sonrası Alzheimer hastalıklı insanlarda ve kontrol beyin dokuları karşılaştırıldığında, AD'li örneklerde P38'in yüksek aktivasyona sahip olduğu rapor edilmiştir (Sheng ve ark., 2001). Ashabi ve ark. (2013), AD'a bağlı hafıza kaybının önlenmesinde MAPK inhibitörlerinin potansiyel bir araç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır. ERK1/2, MAPK sinyal yolağında merkezi bir rol oynar. Nöronlarda MAPK aktivasyonu sonucu apoptoz şekillenir (Murray ve ark., 1998). Perry ve ark., (1999) Alzheimer hastalığında fosforillenmiş ERK'in hipokampal nöronların alt popülasyonlarında nörofibriler dejenerasyonun ve granüler görünümün şekillenmesinden sorumlu olduğunu tarafından rapor edilmiştir. Birçok çalışmada ERK aktivasyonunun amiloid β proteinlerinin hücre içi artışlarıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ferrer ve ark., 2001).

Beyinde aktive olan P38 kinaz, patogenetik olguların devamlılığını arttıran NF κ B (Nükleer faktör kappaB) uyarımlı inflamasyonu ve hücre ölüm yollarını uyarır. NF κ B yangısal ve bağışıklık yanıtlarını içeren genlerinin ekspresyonlarını düzenleyen anahtar bir transkriptör faktördür (Celec, 2004). AD'de P38'in immuno-reaktivitesindeki artışların olduğu, özellikle de hipokampal ve kortikal bölgelerde oluşan nörofibrilerin hastalığın patogenezinin gelişiminde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Sun ve ark., 2003; Kelleher ve ark., 2007). Sharma ve ark., (2014) *in vitro* nöron kültürü çalışmasında MGO'nun anlamlı derecede hücre kaybına neden olduğunu, Bax ve Bik gibi apoptozu uyarıcı protein seviyelerini anlamlı derecede arttırdığını ve ERK ile cAMP seviyelerini azaltarak toksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Dhar ve ark., (2008) yüksek fruktoz diyetiyle oluşturdukları *in vivo* modelde MGO'nun aort ve böbrekte GSH ve ERK'i azaltırken, NF κ B'yi uyararak yangı ve oksidatif strese neden olduğunu göstermişlerdir.



Şekil 2.2 Metilglyoksal uyarımlı erk ve glyoksalaz enzim sistemi (Angeloni ve ark., 2015).

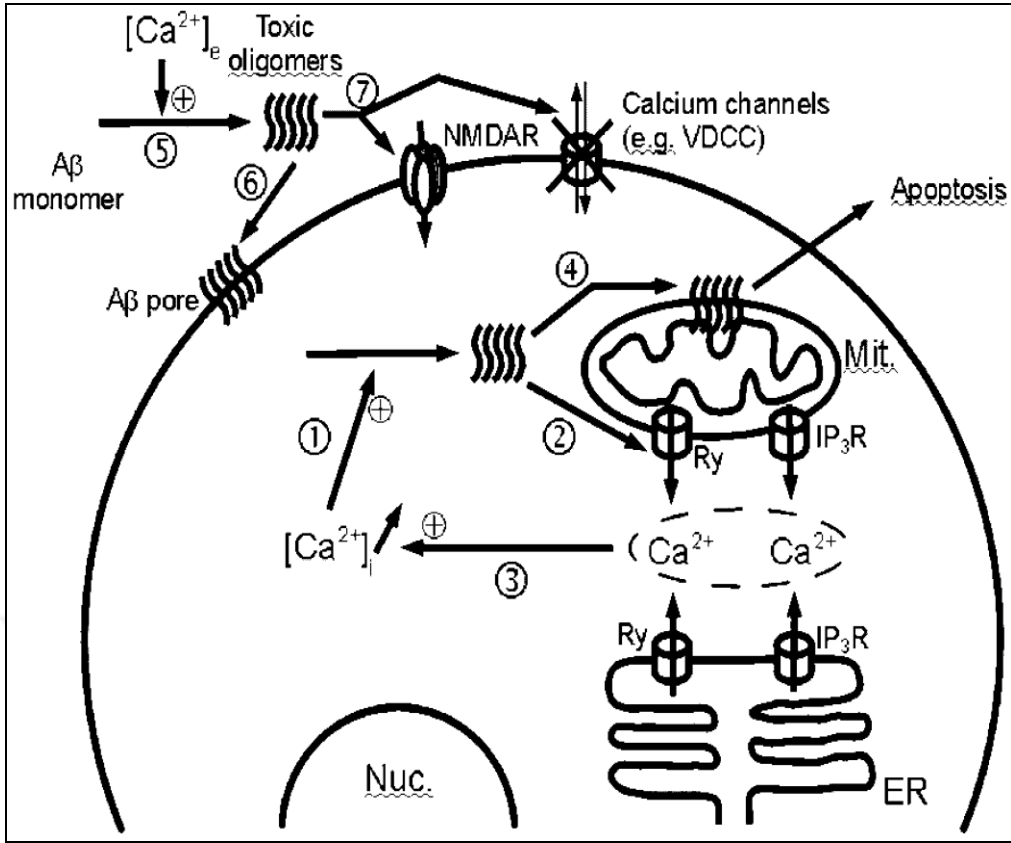
Apoptoz, istenmeyen hasarlı ve hastalıklı hücrelerin bertaraf edilmesini sağlayan bir savunma sistemidir (Degterev ve ark. 2003). Apoptozda mitokondrinin oksidatif yanıtı olarak membran geçirgenliği artarak sitozole Bax proteini geçişi ve özellikle intermembran aralığa sitokrom c (cyt-c) salınımına neden olarak hücre de programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozun ölüm sinyalleri uyarılmış olur (Jurgensmeier ve ark., 1998; Shimizu ve ark., 1999). Sitozole salınan sitokrom-c (Cyt-c), apoptotik proteazı aktive eden faktör (APAF-1), Prokaspaz-9 ve ATP'den oluşan bir kompleks yapı meydana getirerek "apoptozom" olarak bilinen sitozolde apoptotik cisimciklerin oluşumuna neden olur. Apoptozom prokaspaz 3'ün aktivasyonunu takip eden prokaspaz 9 otoaktivasyonuna neden olur. Aktif kaspaz 3 tarafından aktive edilen DNA'az enzimlerini uyararak apoptoz sürecinin yine başlıca belirteçlerinden olan DNA kırıklarına neden olur(Slee ve ark., 1999).



Şekil 2.3 Hücre içi apoptotik sinyal iletimi (Emamaulee ve Shapiro, 2006)

Nöronlarda oligomerik amiloid β proteinlerinin oluşumu L tip voltaj bağlı Ca^{+2} kanallarının açılmasına ve hücre içi Ca^{+2} girişini artırmaktadır. Bu olgu alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayan apoptozisin şekillenmesinde önemlidir (Mattson, 2004; Demuro ve ark., 2005).

Hücre içi Ca^{+2} artışı, endoplazmik retikulum stresine yol açarak, apoptozis uyarılır. Hücre içi kalsiyum seviyeleri, endoplazmik retikulum(ER) membranı kadar mitokondrial dış membran yaprağında da lokalize olan proapoptotik ve antiapoptotik proteinleri kapsayan Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir(Garrido ve ark., 2006). Bcl-2 proteininin etkisi ER ve mitokondriye tekrar Ca^{+2} akışını sağlayarak Bax ve Bad proteinleri uyarımlı apoptozu engeller (Chen, et al., 2004, Thomenius, et al., 2003) .

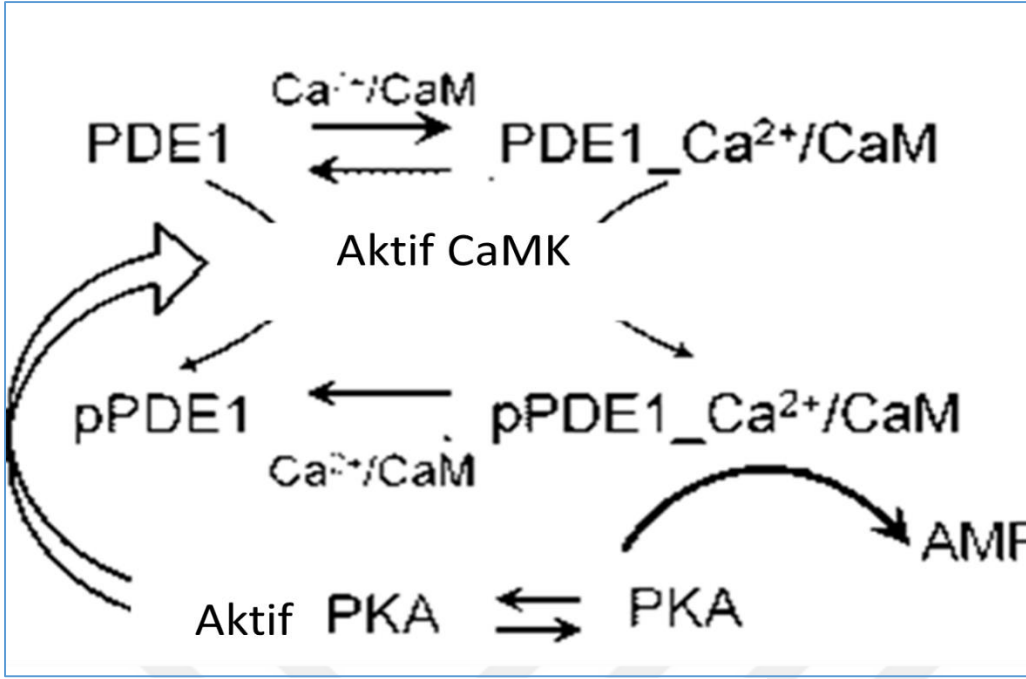


Şekil 2.4 Aβ birikimi ve kalsiyum uyarımlı apoptozis (Itkin ve ark., 2011).

Siklik adenozin monofosfat ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) inflamasyon (Dousa, 1999), çevreye uyum, görüş, immün yanıt (Li ve ark., 1999), visseral motilite, kalp kan atımı, üreme faaliyetleri ve damarsal direnç gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynayan hücre içi ikinci habercilerdir. Bu moleküllerin hücre içi seviyeleri PDEs olarak bilinen bir enzim ailesi tarafından kontrol edilir. PDE'ler metallofosfohidrolazların bir süperfamilyasını oluştururlar. Özellikle cAMP ve cGMP'nin 5¹ nükleotidine uyumlu sekanslara sahiptirler ve birçok değişik uyarımlarla ikincil habercilerin nükleotid dizgelerinin yarısına kadar bağlanarak bu molekülleri kırma yoluyla baskırlar (Francis ve ark., 2000). Fosfodiesterazlar, birçok uyarandan cAMP ve / veya cGMP'nin hücre içi seviyelerinin modülasyonunda kritik belirteçlerdir (Francis ve ark., 2000). Bu nedenle, hali hazırda mevcut olan PDE'ler, cAMP ve cGMP'nin parçalanması yoluyla hücre sinyalinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar (Hetman ve ark., 2000). Fosfodiesteraz inhibitörleri, PDE izoenzimlerini hedefleyen ve ikincil habercilerin (cAMP ve cGMP) metabolizmasını inhibe eden ve böylece ilgili hücrenin türü tarafından belirlenen ve biyolojik etkiyi uzatan terapötik maddelerdir.

Yapılan güncel araştırmalarda, selektif veya nonselektif PDE inhibitörleri cinsel işlev bozukluğu, Alzheimer hastalığı, COPD gibi çeşitli hastalıkların potansiyel tedavi

seçenekleri olarak araştırılmaktadır. Yeni sentezlenmiş güçlü ve izoenzim seçici PDE inhibitörleri ile spesifik olarak up-regüle olmuş PDE izoenzimleri inhibe edilerek hücre içi sinyalleme selektif olarak restore edilebilmekte ve azalan yan etkilerle tedavi sağlamak mümkün olabilmektedir (Lugnier ve ark., 2006). Fosfodiesterazlar, 11 gen ailesini (PDE1-11) temsil eden geniş ve karmaşık bir enzim familyasıdır. PDE ailelerinin her biri bir ila dört gen içerir ve birçok gen çok sayıda izoformun ekspresyonundan sorumludur. PDE enzim ailesinin tüm üyeleri, lokalizasyon veya doku dağılımı, düzenleme modu ve inhibitör spesifikliğı gibi çeşitli açılardan birbirlerinden farklıdır PDE'ler sitozol, plazma membranları, endoplazmik retikulum, nükleer membranlar ve sitoskeletoada bulunur (Nyby ve ark.2003; Houslay ve ark., 2009) ve hücre içi siklik nükleotid konsantrasyonları, fosforilasyon, düzenleyici proteinler ile etkileşim, Ca⁺ / kalmodulinin bağlanması ve gen ifadesindeki değişiklikler ile düzenlenir (Cheng ve Grande, 2007). PDE3, PDE4, PDE7 ve PDE8 izoenzimleri sadece cAMP'yi (cAMP-PDE) hidrolize ederken, PDE5, PDE6 ve PDE9 sadece cGMP'yi (cGMP-PDE) hidrolize eder. PDE1 ve PDE2 izoenzimleri ise her iki nükleotiti de substrat olarak kabul eder. PDE1 kromatografi yöntemiyle ilk olarak damar düz kaslarından izole edilmişlerdir. Bu enzim fraksiyonu özellikle ikinci haberci uyarım sistemlerinden bir olan kalsiyum kalmodulin (Ca²⁺/CaM) tarafından aktive edilir ve Ca²⁺/CaM bağlı fosfodiesterazlar olarak bilinir(Wells ve ark., 1975). CaM-PDE'yi tam olarak aktive etmek için dört Ca²⁺ iyonunun kalmodulin'e kooperatif bağlanması gerekmektedir (Huang ve ark., 1981). PDE1 sitozoliktir ve en yüksek bulunduğu ve işlev yaptığı organ insanda beyin ve sperm hücreleridir (Polli ve Kincaid, 1992).



Şekil 2.5 Kalsiyum kalmodulin bağımlı PDE1 (Kitagawa ve ark., 2009)

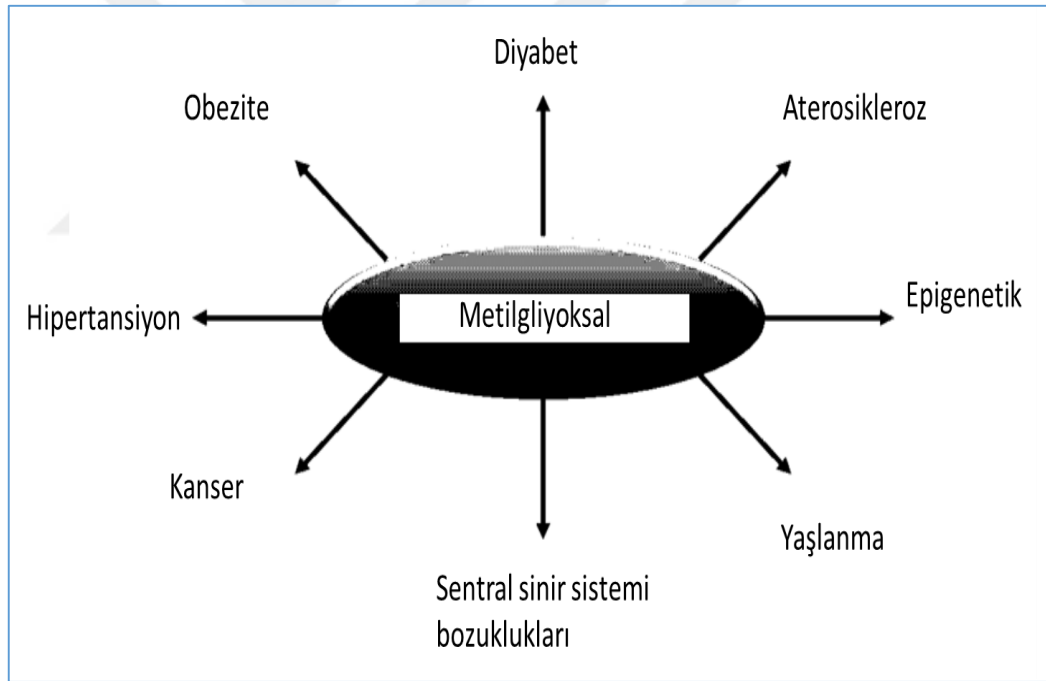
Fosfodiesteraz enzim ailesinde, PDE1A, PDE1B ve PDE1C olmak üzere 3 izoenzim bulunmaktadır. PDE1B1, mRNA'sı yoğun olarak insan beyninde serebellum, hipokampus, caudata kısmının nöronal hücrelerinde ve purkinje hücrelerinde bulunurlar (Yu ve ark., 1997). PDE1 spesifik inhibitörlerinin klinik olarak demensiya ve hafıza kaybının giderilmesinde kullanılmaktadırlar (Ghosh ve ark., 2009). PDE1'in bir dizi fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynadığı belirtilmiştir. PDE1A büyük olasılıkla vasküler düz kas kasılmasını düzenler ve kronik nitrogliserin tedavisine yanıt olarak sıçan aortunda up-regüle olduğu bulunmuştur. Ayrıca sperm fonksiyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. PDE1B mRNA, PHA veya anti-CD3 / CD28 ile aktive edilmiş insan T-lenfositlerinde indüklenir ve alerjik hastalıklarda rol oynayan IL-13 düzenlemesinde görev aldığı bilinmektedir (Konda ve Watanebe, 2001). Jiang (1996), kalıcı hücre dizilerinde yaptığı araştırmada, PDE1B1 inhibisyonunun insan lösemik hücrelerinde apoptosisi indükleyebileceğini göstermiştir. PDE1B'den yoksun farelerin, dopamin agonistine tepki olarak aşırı lokomotor hiperaktivite sergilediği ve bozulmuş görsel kabiliyet sergilediği gözlemlenmiştir (Reed ve ark., 2002). PDE1C'nin düz kas proliferasyonunun önemli bir regülatörü olduğuna inanılmaktadır (Rosman ve ark., 1997) ve proliferatif düz kas hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. PDE1C'nin indüksiyonu, arteriyel düz kas hücresi proliferasyonunu (Rybalkin ve ark.,2002) artırır ve glikoz uyarımlı insülin sekresyonunu baskılar (Han ve ark., 1999). Fosfodiesteraz 1C'nin inhibisyonunun, aterosklerozun patofizyolojisine önemli ölçüde katkıda bulunan düz kas hücresi

proliferasyonunun varsayılan inhibisyonundan dolayı yararlı etkiler oluşturabileceği tahmin edilmektedir. PDE1C'nin diğer olası rolleri arasında koku alma, sperm fonksiyonunun düzenlenmesi ve nöronal sinyalizasyon bulunmaktadır (Sonnenburg ve ark., 1995).

Fosfodiesteraz 1 inhibitörlerinden, Vinpocetin (Marka isimleri: Cavinton, Intellectol; Kimyasal adı: Etil Apovinsaminat) Vinpocetin, “periwinkle” bitkisinden ekstrakte edilen vinkaminin yarı sentetik bir türevidir. Serebral kan akışını artırır ve hafızayı iyileştirdiği söylenir. Yaklaşık 10^{-5} M IC50 değerine sahip bir PDE1 inhibitörüdür. Bu madde gıda takviyesi olarak yaygın bir şekilde satılmaktadır. Bununla birlikte, yan etkileri konusunda bazı tartışmalar olduğu görülmektedir ve bu nedenle düşük başlangıç dozu tavsiye edilmektedir. Ayrıca agranülositoz'a yol açtığı da iddia edilmektedir (Sonnenburg ve ark., 1995). Vinpocetin, fiziksel egzersizlerden sonra kasların beslenmesini iyileştirmek için birçok performans arttırıcı takviye gıdalar içerisine katıldığı bilinmektedir. Fosfodiesterazlar (PDE'ler), PDE inhibitörü tabanlı antiparazitik ilaçlar ve sıtmanın çeşitli ajanlarının genomları için ilginç potansiyel hedefler olarak görülmüştür. Son zamanlarda ICOS Corporation tarafından yeni bir PDE1 inhibitörü olan IC224 geliştirilmiştir (Synder ve ark., 2005). Bu vesileyle PDE1 aktivitesinin karakterize edilmesi ve patofizyolojide PDE1'in çeşitli rollerinin açık bir şekilde ortaya konulması hedeflenmektedir.

Son zamanlarda reaktif karbonil bileşiklerinin yaşlanmada, AD'de ve diğer nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda rol oynadığı birçok araştırmada rapor edilmiştir. Protein glikasyonu insanlarda birçok hastalığın özellikle de nörodejeneratif amiloid tip hastalıklar ve yaşlılık ilişkili hastalıkların gelişimi ile oluşumunda oldukça önemli bir paya sahiptir (Smith ve ark 1994; Gomes ve ark., 2005). Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) yumuşak içeceklerde, kurutulmuş gıdalarda sükroza alternatif olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Brunk ve ark., 2002). HFCS az miktarda bazı oligosakkaritleri, temel olarak glikoz ve fruktoz içeren sıvı tatlandırıcılardır. Mısır nişastasının hidroliziyle glukozun fruktoza enzimatik izomerizasyonu ile üretilirler (Shigenaga ve ark., 1994). HFCS-42 ve HFCS-55 ticari ürünlerde sırasıyla %42 ve %55 oranında fruktoz içerirler. HFCS'nin ısıtma işlem sonucu, şekerin hidroliz ve izomerizasyon işlemleriyle degregasyonu şekillenir. Farklı şartlar altında monosakkaritlerin degregasyonu da alfa dikarbonil bileşiklerinin (α -DCS) oluşmasına yol açar (Moreira ve ark., 2007; Dutta ve ark., 2012). α -DCS'ler kolaylıkla proteinleri modifiye edebilen çok reaktif yapılardır ve glikasyonun

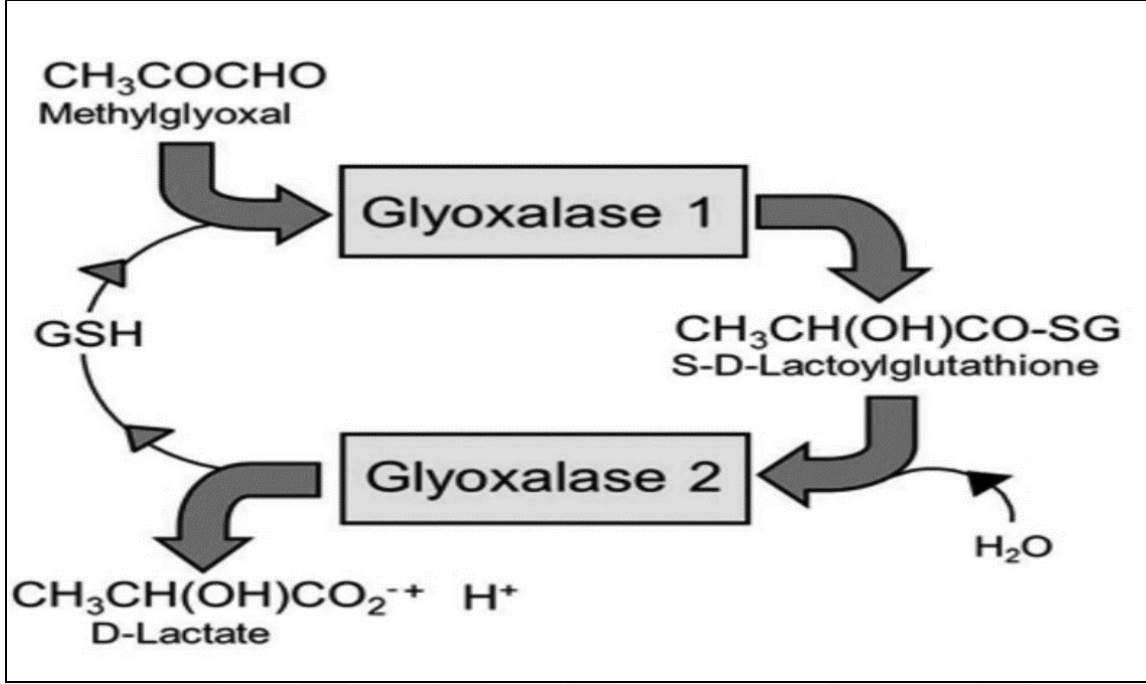
son ürünlerinin (AGEs) oluşumuna neden olurlar(Mattson ve Magnus, 2006; Fukui ve ark., 2001). Zamora ve ark., (2005) HCSF'nin işlenme aşamasında ortaya çıkan α -DCS'lerin; glyoxal, MGO ve 3-deoksiDeritroheksoz-2-uloz (3Deoksiglikoz)'un olduğunu rapor etmişlerdir. Ökaryotik hücrelerde MGO, glikolizisin dihidroksiasetonfosfat ve D-gliseraldehit-3-fosfat'ın oluşum aşamasında üretilir. Temel hücreiçi glikasyon ürünüdür. Hücrenel lipidlerin, nükleik asitlerin ve proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek MGO'dan türemiş kompleks glikasyon son ürünlerinin (MAGE) kaynağını teşkil eder. Metilgliyoksal ve onun glikasyon ürünleri özellikle nervöz dokuda birçok şiddetli patolojik olayların ortaya çıkmasına neden olur (Bierhaus ve ark., 2012; Radu ve ark., 2012). Ancak nörotoksitede MGO' nun moleküler ve biyokimyasal mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır (Li ve ark., 2011; Brad ve Chantal, 2013). Bununla birlikte bu ürünlerin hücrede ölüm sinyal iletim yollarını uyararak sitotoksik etkiler gösterdiği yapılan birçok araştırmada rapor edilmiştir (Serrano ve ark., 2004; Siqueira ve ark., 2005).



Şekil 2.6. Metilgliyoksal uyarımlı hastalıklar (Maessen ve ark., 2015).

Metilgliyoksal, glyoxalaz sisteme bağlı GSH tarafından detoksifiye edilir. GSH'un biyosentezi ve tekrar tekrar üretilip kullanılması antioksidan yanıtı elementi nükleer solunum faktör yolu (ARE-NRF) tarafından gerçekleştirilir (Ha ve ark., 2006; Kim ve ark., 2011). Nükleer ilişkili eritroidfaktör-2(Nrf-2) oksidanlara karşı hücre içerisinde antioksidan ve detoksifikasyon genlerin ekspresyonunu uyararak sitozolik bir proteindir (Boutten ve ark., 2011). Nrf-2 ve NF κ B iki stres duyarlı transkriptör faktörlerdir. Uyarıcı

faktörler ve elektrolitler tarafından PKA (protein kinaz A)'nın uyarımı ile Nrf-2'nin çekirdeğe translokasyonu γ -glutamyl-cysteinyl-glycine (GSHs) içeren antioksidan faktörlerin uyarımını sağlar (McMahon ve ark., 2003). MGO kaynaklı ve onun glikasyon ürünleriyle ilişkili hücrel komplikasyonların hafifletilmesinde bu hücre içi sinyal iletim sistemi anahtar rol oynar (Sriwijikamol ve ark., 2007).



Şekil 2.7 MGO'nun hücre içi glyoksalaz enzim sistemiyle (Rabbani ve Thornalley, 2014).

Glioksalaz sistem; glioksalaz I ve II enzimlerden oluşmaktadır. Sitotoksik MGO ve MGO'dan türeyen glikasyon ürünlerine karşı en etkili defans sistemini oluştururlar (Nakadate ve ark., 2009). GI, GSH'ı bir kosubstrat gibi kullanır ve MGO'yu S-D-laktoglutatyona dönüştürür. GII ise thioester S-D-laktoglutatyonu zararsız D-laktata çevirirken ayrıca GSH tekrar kullanılmasını sağlayacak rejenerasyonunu gerçekleştirir (Rabbani ve ark., 2012). Metilgliyoksalin özellikle sitotoksik etkilerini protein glikasyonu ile gösterir. Son zamanlarda birçok araştırmada metilgliyoksalin detoksifikasyonunda polifenolik bileşik kullanılmıştır. Örneğin Maruf ve ark., (2014) yaptıkları araştırmada MGO uyarımlı sitotoksitede ferulik asit ve onun polifenollerinin gerek oksijen radikallerinin oluşumunu engellediği ve antioksidan sistemi uyararak (özellikle GSH sistemi) detoksifiye ettiğini göstermişlerdir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü (*in vitro* çalışma)

Araştırmada insan orijinli glioblastoma U-87 MG (ATCC HTB-14) hücre hattı kullanıldı. Hücreler, polietilenimin(sodyum borat buffer içerisinde 0.2 mg/ml, pH 8.3) ile kaplı 25 cm² lik flasklarda ve içeriğinde %10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin/ streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunduran Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM) besi ortamında, 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava bulunduran steril inkübatörde üretildi. Hücreler flask tabanına %80-90 oranında yayıldıklarında tripsinize (%0,025 Tripsin/EDTA) edilerek kaldırılacak ve 1:5 oranında pasajlandı. Mikroskop altında daha sonra hücre sayımı tripan mavisi boyası ile bir hemositometre yardımıyla belirlenerek deneme grupları için ihtiyaç duyulan hücre sayısı flasklara eklenerek çalışma başlatıldı.

Deney gruplarının oluşturulması:

In vitro çalışma deneme grupları Çizelge 1.' de verilmiştir. Araştırmada öncelikle MGO'nin etkin konsantrasyon ve zaman çalışmaları viyabilite testleriyle ortaya konuldu.

Çizelge 1. Deneysel çalışma düzeni

Deneysel Çalışma Düzeni	
Deneme Grupları	Tekrar Sayısı
Deneme Grubu 1: Kontrol grubu	7
Deneme Grubu 2: Metilglioksal (MGO) uygulanan grup	7

3.2. Viabilite Testi (MTT metodu)

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT-Fluka, USA) kullanılarak bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin sahip olduğu mitokondrial redüktazların bileşikteki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi prensibiyle hücre canlılık oranı tespiti kantitatif olarak saptanabilmektedir. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Çalışma Papachristou ve ark., (2013) uyguladığı metod takip edilerek gerçekleştirilecektir. Bu metotta kısaca farklı konsantrasyonlarda (100-400 μ M) metilglisyoksal hücrelere (12'li pleyt, 3×10^5 hücre/kuyucuk) uygulanmasından 24 saat sonra, üzerlerindeki medium alınarak üzerlerine içerisinde 20 μ L MTT ayıracı (5 mg/ml PBS'te çözdürülerek elde edilecek) bulunan 200 μ L taze komple besiyeri eklendi. Hücreler bu solüsyonla 4 h 37 $^{\circ}$ C'de inkübe edildi. MTT kristalleri 100 μ L 0.04 M HCL/isopropanol ile 15 dk süreyle 37 $^{\circ}$ C'de çözdürüldü. Süre sonunda ependorflara alınan örnekler 12000 rpm ve +4 $^{\circ}$ C'de santrifüj edilerek ve 570 nm ışık dalga boyunda mikropleyt okuyucuda (μ Quant-SK) okutuldu ve kaydedildi. Bu yöntem ile hem MGO'nun çalışmadaki hücre canlılığına etkileri hemde etkin konsantrasyonu analiz edildi.

3.3. Lizat hazırlama ve cAMP konsantrasyonu:

İnkübasyon sürelerinden sonra hücreler buz soğukluğunda PBS ile 3 kez yıkandı. Sonra 1×10^7 /ml hücre kitte bulunan 1/5 sulandırılmış lizis buffer ile muamele edildi. Daha sonra örnekler 3 kez yaklaşık -20 $^{\circ}$ C'de dondur çözündür metoduyla lize edildi. Lizasyon işlemi mikroskop altında tripan blue eklemesiyle kontrol edildi. Hücre içi mavi görüntü lizisin başarılı olduğunu tespit etmek için kriter olarak kullanıldı. Daha sonra hücre atıklarını uzaklaştırmak için 4 $^{\circ}$ C'de 600g 10 dk santrifüj edildi. Sonrasında örnekler hızlı bir şekilde ELİSA kit (RD System, USA) prosedürüne geçirildi. Bu methodda öncelikle reagenlar, örnekler ve standartlar hazırlandı. Herbir kuyucuğa 50 ul primer antikor solüsyonu eklendi. Daha sonra stripe kaplanan kuyucuklar çalkalayıcıyla 1 saat süreyle oda ısısında maruz bırakıldı. Süre sonunda yıkama işlemleri olarak kitteki yıkama solüsyonları kullanılarak 3 kez gerçekleştirildi. Son yıkamadan sonra pleyt ters çevirilerek kurumaya bırakıldı(10 dk). Tüm kuyucuklara cAMP kongugated solüsyonu eklendi. Daha sonra 15 dk içerisinde ilgili kuyucuklara örnekler ve standartlar 100'er ul eklendi. Daha sonra blank olarak seçilen kuyucuğa 100 ul kalibratör maruziyeti gerçekleştirildi. Sonrasında kuyucuklar tekrar stripe kapatılarak 2 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

Daha sonra 4 kez yıkama gerçekleştirildi. Sonra 200 ul substrat solüsyonu herbir kuyucuğa eklenerek karanlık ortamda 30 dk süresince tutuldu. Sonraki basamakta ise kuyucuklara 100 ul stop solüsyonu eklenerek kuyucuktaki rengin maviden sarıya dönmesi sağlandı. İşlemin sonunda 30 dk içerisinde pleyt ELİSA okuyucuya(uQuant-SK) yerleştirilerek 450 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi.

3.4. RNA izolasyonu ve qRT-PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu için öncelikle Ribonükleik asit (RNA) eldesi hazır ticari kit kullanılarak gerçekleştirildi ve RNA saflıkları spektrofotometrede (Shimadzu-UV mini 1240- JAP)(OD₂₆₀/OD₂₈₀ nm oranı) belirlendi. Bu yöntemde 75 cm²'lik flasklarda 24 saat süreli inkübasyondan sonra alınan 7x10⁶/ml hücreler, 1 ml RiboEx reaktifıyla (GeneAll-SK) homojenize edildi ve oda ısısında 5 dk bekletildi. Sonra 4⁰C' de 12000g 10 dk santrifij edildikten sonra süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0,2 ml kloroform eklenerek 2 dk oda ısısında tutuldu. Daha sonra 4⁰C' de 12000g 15 dk santrifüjden sonra renksiz süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine her 1 ml RiboEx reaktifine 0,5 ml isopropil alkol eklendi. Daha sonra örnekler 10dk oda ısısında bekletildi. 4⁰C' de 12000g 10 dk santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı. Tüp dibinde kalan RNA DNA karışımı pelet 1ml'lik %75 etanolle yıkanarak tekrar 7500 x g santrifüjle 5 dk'da pelet oluşması sağlandı. Elde edilen RNA örneklerine 1'er ml "DEPC Water" eklenerek RNA'ların sulandırılması sağlandı. Elde edilen RNA örneklerinden RNA saflıkları tüm örneklerde eşik değeri olan 1,7'den yüksek olarak tespit edildi. Daha sonra PCR reaksiyonlarına geçildi. Bu amaçla araştırılan genlerin (Aβ1-40, PDE1B_G ve PDE1B₁) gen ekspresyon düzeyleri bu methodla ölçüldü. Bu amaçla hazır "Verso sybr green one-step kit" (Thermo, EU) kullanıldı. Herbir reaksiyon tüpü totalde 25 ul (Verso enzim mix-0,25 ul, 2x1-stepqPCR SYBR Mix-12,5ul, RT Enhancer-1,25 ul, Reverse primer 1,75 ul, Forward primer 1,75 ul, 1ng RNA konsantrasyonuna denk gelen template RNA ve 25 ul hacime tamamlayan DEPC water) eklendi. Araştırmada kullanılan primer dizgeleri aşağıda çizelge halinde verilmiştir(Çizelge 2.). Araştırmada PCR döngüleri RT PCR thermal cyclırında (Bio-RAD- CFX96) olarak cDNA sentezi aşaması 50⁰C'de 15 dk, start inaktivasyon 95⁰C'de 15 dk 1'er siklüs olarak gerçekleştirildi, Denatürasyon 95⁰C'de 15 sn, Yapışma 56⁰C'de 30 sn, ve uzama ise 72⁰C'de 30 sn 40 siklüs olarak gerçekleştirildi.

Çizelge 2. Araştırmada kullanılan gen spesifik primerler

Gen	Reverse	Forward
Aβ1-40(Metabion-EU)	5 ¹ –ATG GAT CCT TAC GCT ATG ACA ACA CCG AA- 3 ¹	5 ¹ –TCA CTC GAG ATT GGA TGC AGA ATT CCG ACA T- 3 ¹
PDE1B (Microsynth-EU)	5 ¹ –CAC TGT GGG AAT CTT GAA GCG GCT GAT C- 3 ¹	5 ¹ –CCT CCA CCT TCA CCC AGC AG- 3 ¹
PDE1B1(Microsynth-EU)	5 ¹ –CTG AGC ATG GAG CTG TCC - 3 ¹	5 ¹ –CAG AGA CCG AAG CTT AAT CC- 3 ¹
GAPDH (Thermo, EU)	5 ¹ -CAT TGA ACT TGC CGT GGG TA-3 ¹	5 ¹ -GCTACC AGG GCT GCC TTC T -3 ¹

3.5. Kongo Red Boyama ile Amiloid görüntüleme:

Amiloid gösterimi hazır ticari kitler(Bio OPTİCA, İT) kullanılarak gerçekleştirildi. İnkübasyon sürelerinden sonra hücreler, flaskı kaplayacak şekilde ksilolde deparafinize edildikten sonra kitteki 3 ml A reagent (Kongo red solüsyonu) eklendi ve 15 dk beklendi. Daha sonra flasklar distile su ile yıkandı. Sonrasında Reagent B (Alkalin dönştürü buffer) solüsyonu 10 damla flaska verildi ve 30 sn bekletildi. Sonrasında 5 dk süresince akar suda yıkama gerçekleştirildi. Sonra flasklara reagent C(fosfat buffer solüsyonu) 10 damla eklenerek 2 dk bekletildi. Flask içerisindeki sıvı atılarak yerine Reagent D (Mayer's hemtoksilen) 5 dk bekletildi. İşlemler sonucunda invert mikroskop (Olympos CKX414) altında incelenmesi yapıldı. Amiloid birikimleri kırmızıya dönük sarı renkte görünürken, hücre çekirdekleri mavi olduğu gözlemlendi. Sıralanan işlemler sonrası, 24 saat süreyle etkin konsantrasyonda metilgliyoksal kullanılan U87 MG hücreleri invert mikroskopta (Olympus CK40, JP) 20x büyütmeyle fotoğraflandı (Fotoğraf skala bar 1-100 nm). Yine glioblastomalara metilgliyoksal uygulandıktan 24 saat süre sonunda invert mikroskopun 10x objektifiyle hücre yoğunlukları fotoğraflandı (Fotoğraf skala bar, 1-50 nm).

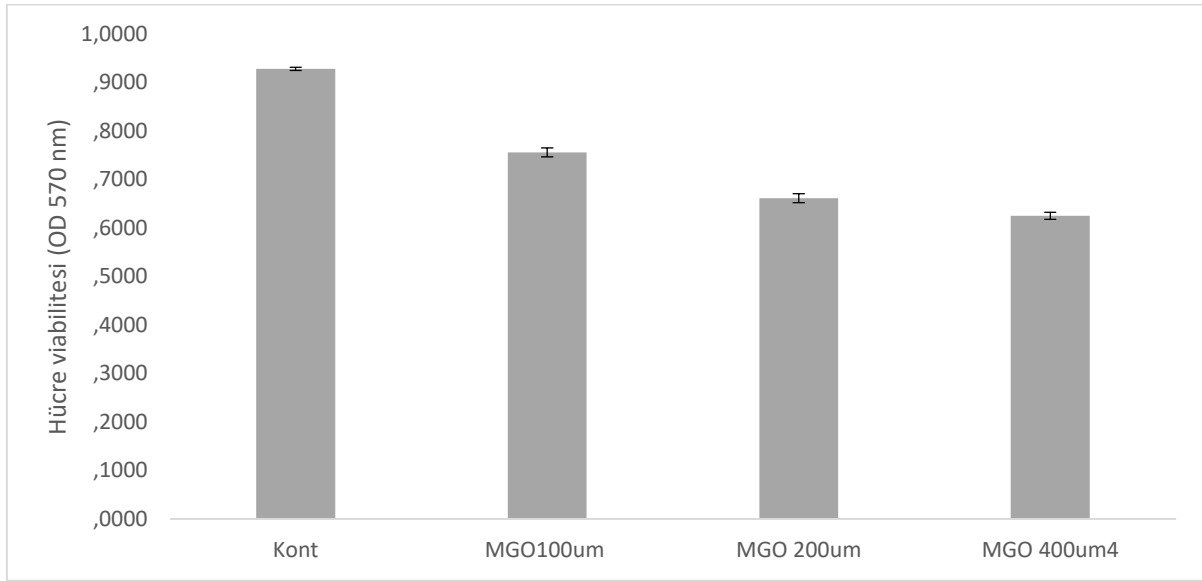
3.6. İSTATİSTİKSEL METOT Araştırmada elde edilen veriler, SPSS 21.0 programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi ile gerçekleştirildi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile yapıldı. $p < 0.05$ ve altı değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Deęerler ortalama \pm standart hata (S.E) şeklinde verildi.



4. BULGULAR

4.1. Viabilite sonuçları

İnsan glioblastoma hücrelerine farklı konsantrasyonlarda metilgliyoksal (MGO) uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda gruptaki hücre canlılık oranları MTT metoduyla araştırıldı.

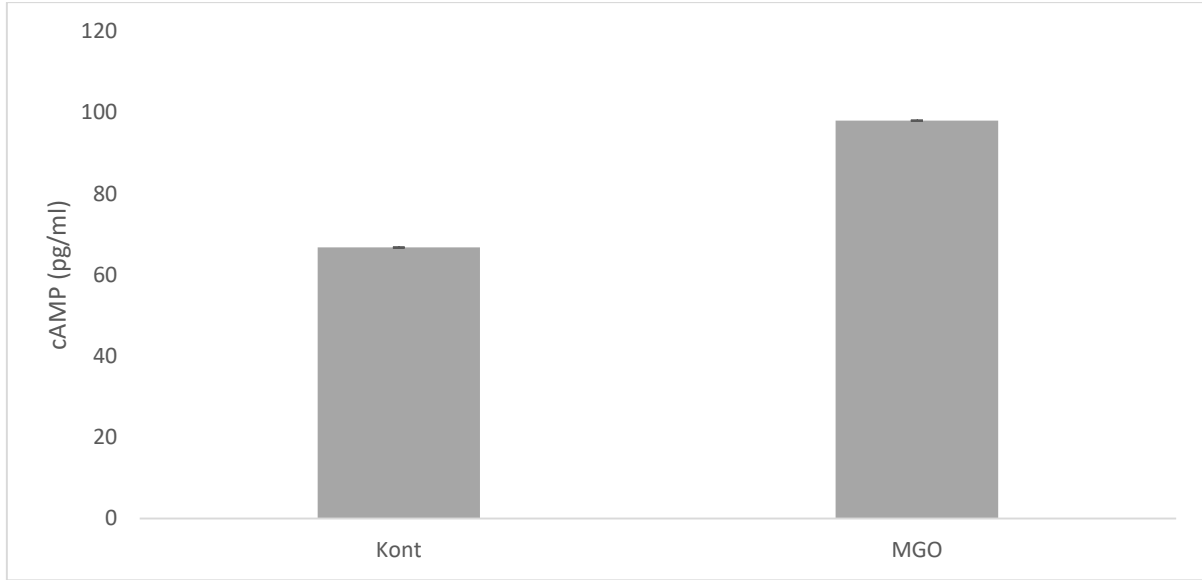


Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda metilglyoksal uygulanımı hücre canlılık oranları(24 saat).

Elde edilen verilere göre konsantrasyon artışına paralel olarak hücre ölüm oranlarının artışı tespit edildi. Özellikle MGO'nun 200 μ m konsantrasyonu uygulanan grupta($0,6613 \pm 0,1853$) kontrol grubuna ($0,9278 \pm 0,00519$) göre %28 oranında hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi($n=5$, $p<0,005$). Bu konsantrasyon etkin doz olarak seçildi ve diğer çalışmalar için kullanıldı.

4.2. Hücreiçi cAMP düzeyleri

Araştırmada 200 um metilglyoksal 24 saat süreyle hücelere uygulandı. Süre sonunda alınan örneklerden cAMP düzeyleri ticari kolorometrik kitle ELİSA okuyucuda tespit edildi. Herbir deney 3 kez tekrarlandı (n=5).

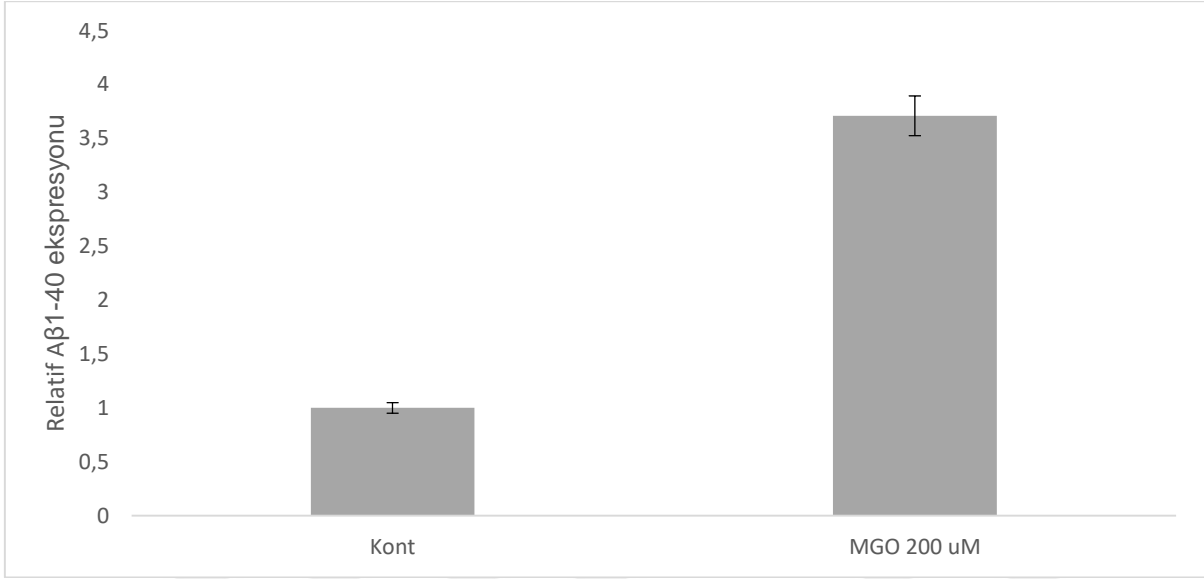


Şekil 4.2. Metilglyoksal uygulananının 24 saat uygulanımı sonunda hücreiçi cAMP seviyeleri.

Elde edilen verilere göre cAMP düzeyi MGO grubunda(98,01±3,9) kontrol grubuna göre (66,76±2,78) kıyaslandığında %31 oranında arttığı tespit edildi.

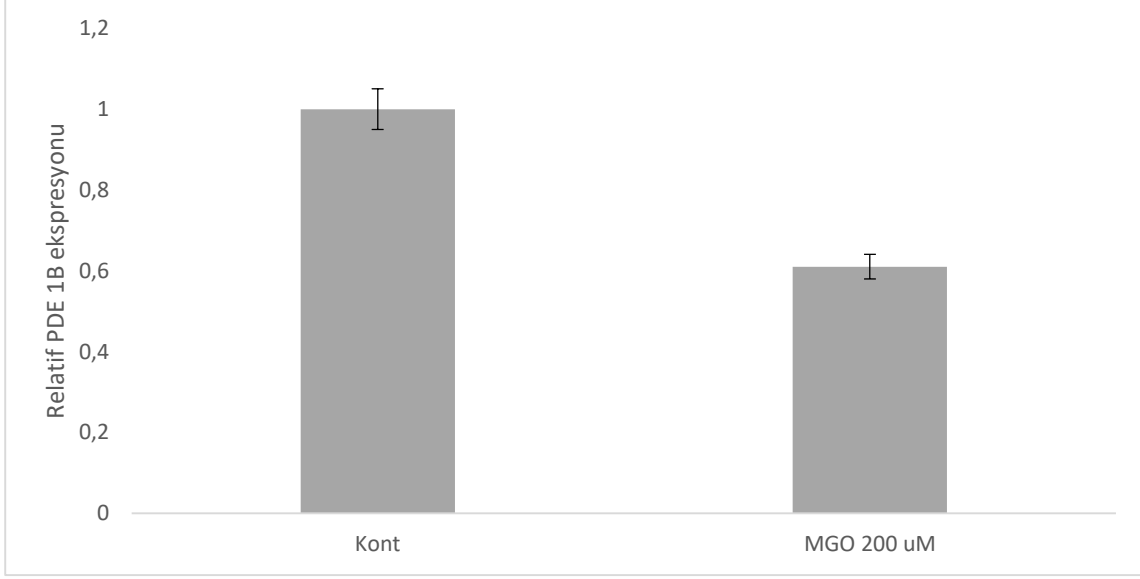
4.3. Gen ekspresyon analiz sonuçları

Glioblastomalar metilglyoksalin 24 saat uygulaması sonrasında gruplardan RNA örnekleri alındı ve tek basamaklı syber green kit ve gerçek zamanlı PCR metoduyla A β 1-40, PDE1(G) ve PDE1B1 gen ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Araştırmada birbirinden bağımsız 3 örneğin ortalaması alındı ve standart hatalar yüzde olarak verildi.



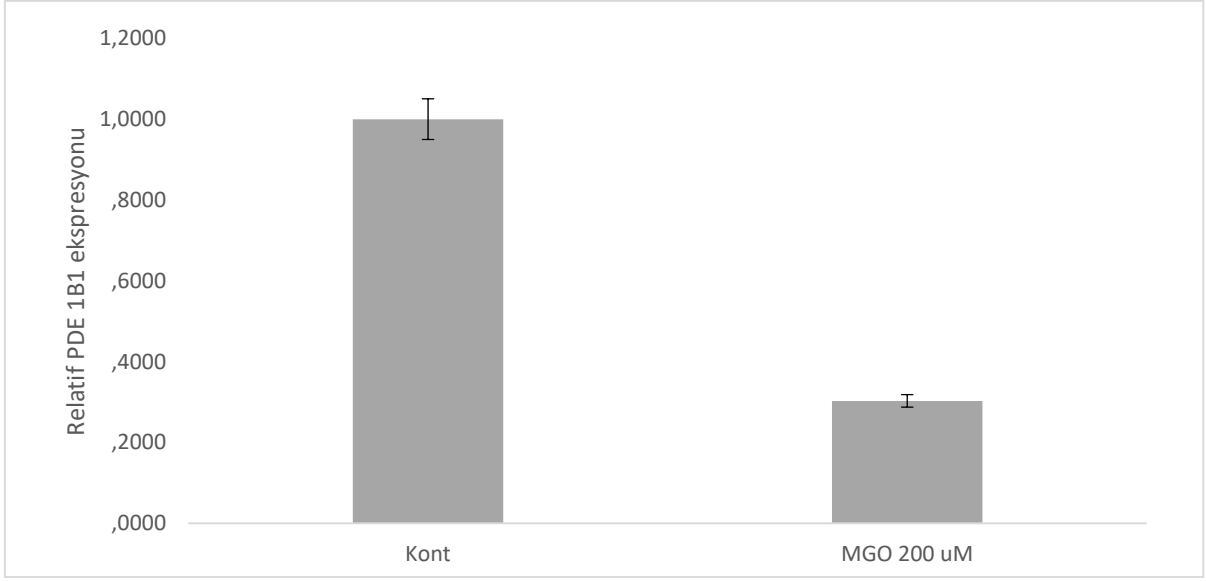
Şekil 4.3. 24 saat Metilglyoksal uygulananının relatif A β 1-40 gen ekspresyon düzeyleri

Elde edilen verilere göre MGO'nun A β 1-40 gen ekspresyon düzeyini, kontrol hücrelerine göre 3.7 kat relatif misli değişimlerle up regüle ettiği tespit edildi.



Şekil 4.4. 200 um Metilglyoksal uygulanımı ile relatif PDE1B gen ekspresyon seviyeleri (24 saat).

Çalışmada alınan sonuçlara göre MGO'nun PDE1B gen ekspresyon düzeyini 1,6 kat relatif misli değişimlerle down regüle ettiği bulundu.

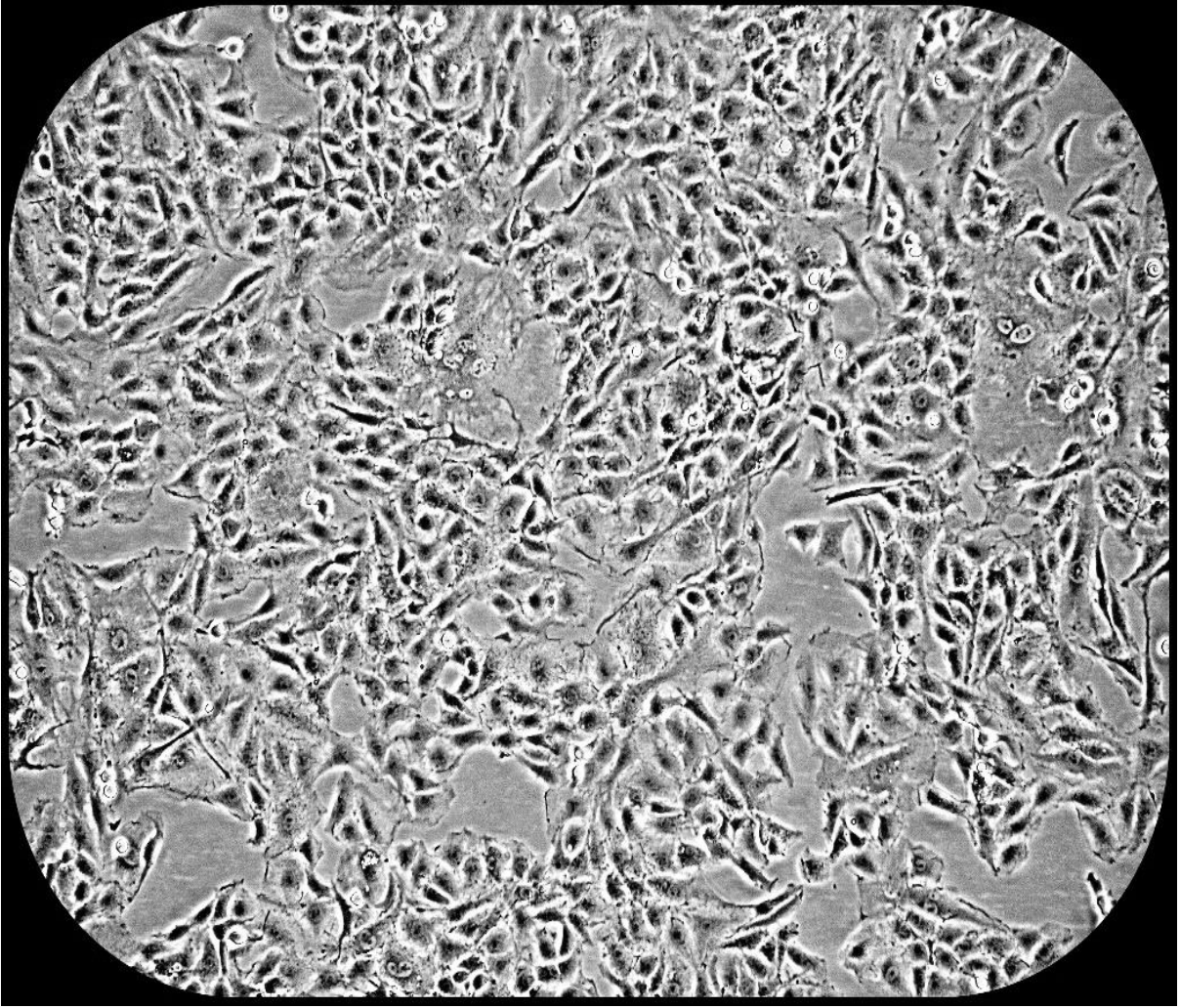


Şekil 4.5. Kontrol ve Metilglyoksal gruplarında relatif PDE1B1 gen ekspresyon düzeyleri (24 saat)

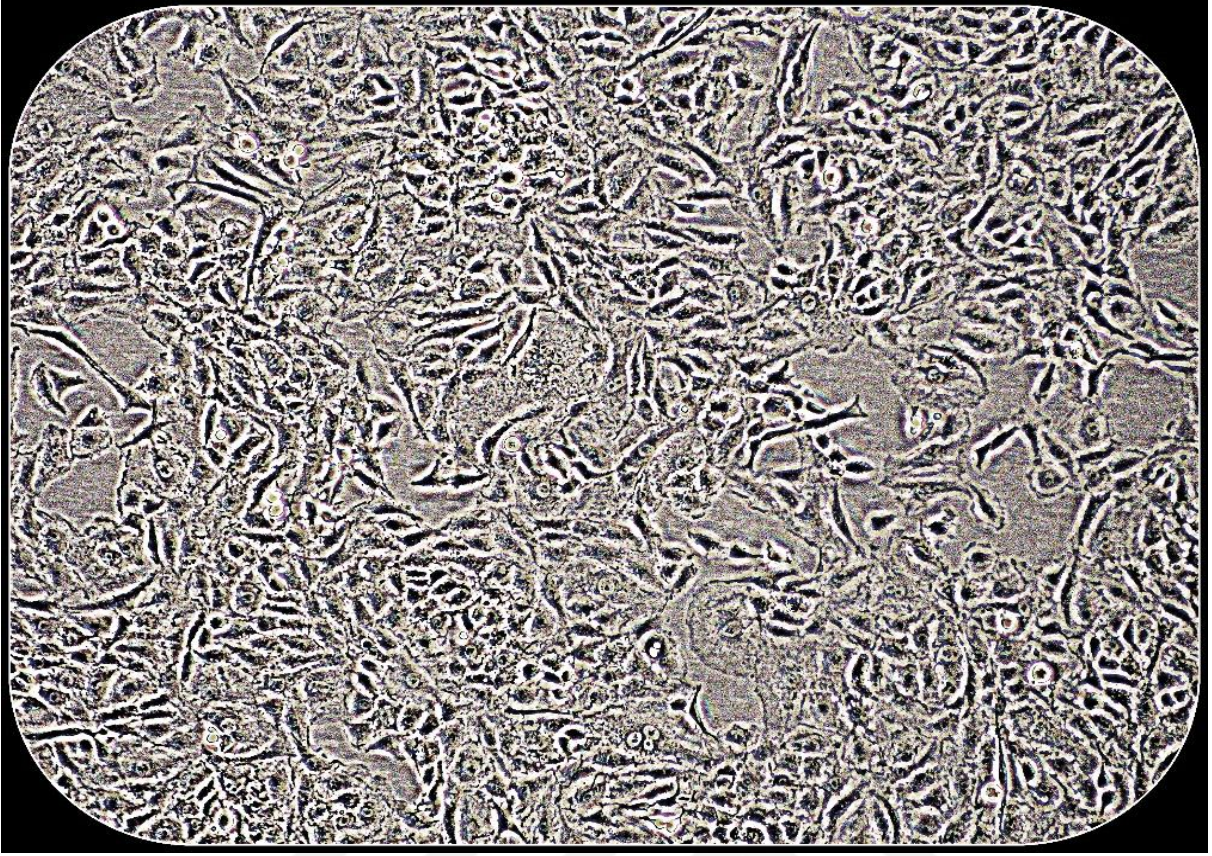
Elde edilen verilere göre MGO'nun PDE1B1 gen ekspresyon düzeyini, kontrol hücrelerine göre 3.3 kat relatif misli değişimlerle down-regüle ettiği görüldü.

4.4. Hücre Görüntüleri

Glioblastomalara metilgliyoksal uygulandıktan 24 saat süre sonunda invert mikroskopun(Olympus CK40, JP) 10x objektifiyle hücre yoğunlukları fotoğraflandı. Araştırmada elde edilen verilere göre MGO uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde alan boşluklarının(hücre kayıpları) artmış olduğu gözlemlendi.

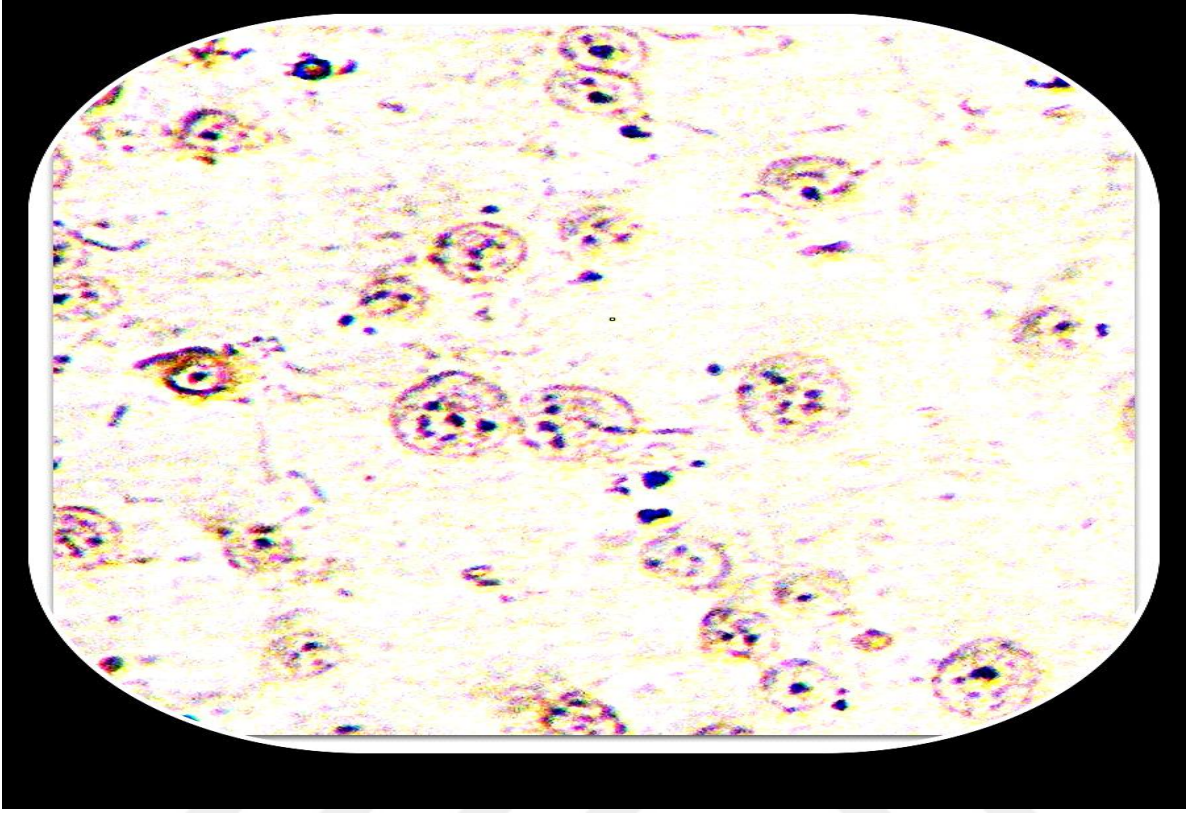


Şekil 4.6 . Metilgliyoksal grubu hücre görüntüsü (10x, skala bar 1-50 nm).



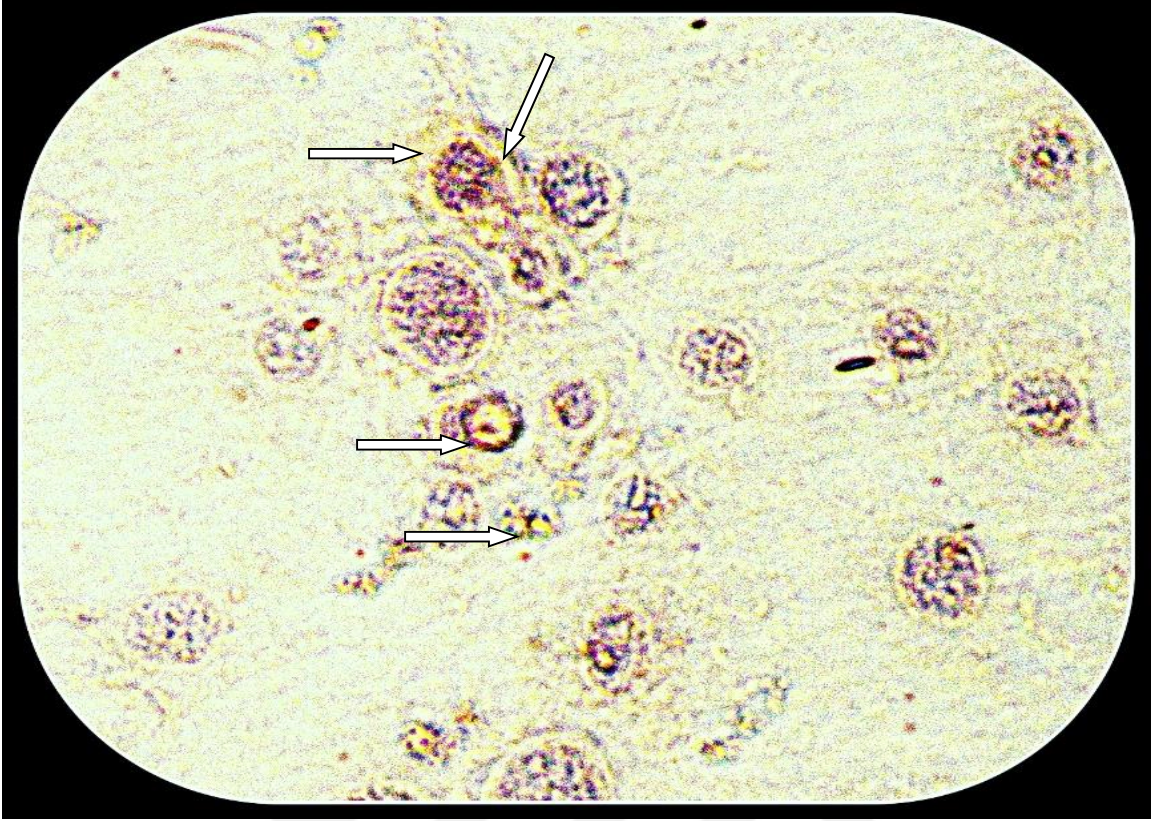
Şekil 4.7. Kontrol grubu hücre görüntüsü (10x, skala bar 1-50 nm).

4.5. Kongo Red ile Amiloid Görüntülemeleri



Şekil 4.8. Kontrol grubu hücrelerde kongo red boyama görüntüsü (20x, skala bar 1-100 nm)

Hücreler metilglisyoksalle 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda herbir kuyucuğa ticari olarak kit haline getirilmiş sıralı boyamalarla kongo red prosedürüne uygun olarak uygulandı. Sonra yine invert mikroskopla 20x görüntüler alındı ve kaydedildi. Kitteki boyamalardan sonra hücre içerisinde veya periferindeki sarı odaklı yoğunlaşmalar amiloid birikimini göstermektedir.



Şekil 4.9..MGO grubu hücrelerde kongro red boyama görüntüsü (20x, skala bar 1-100 nm)

Araştırmada 24 saat MGO uygulanan grupta hücrelerin merkezinde mavimsi odaklar ve periferlerinde ise sarı renkte boyanmaların yoğun olduğu gözlenirken kontrol hücrelerinde ise herhangi bir boyama olmadığı görüldü (amiloid protein birikimleri oklar ile gösterilmiştir).

5- TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı hücre dışı amiloid- β (A β) birikimi ve nöronlar içinde nörofibriler düğümlerin oluşumuyla ile karakterize, ilerleyici nörodejeneratif hastalıktır. Günümüzde demenstan etkilenen 60 yaş üstü bireylerin yaklaşık 40 milyon civarındadır. Bununla birlikte sayının her 20 yılda bir ikiye katlanması öngörülmektedir (Bendlin ve ark., 2010). Demans vakalarının en baskın nedenlerinin yaklaşık %50-70'ini Alzheimer hastalığı oluşturmaktadır (Cankurtaran ve Arıoğlu, 2005). Amiloidogenezde 42-43 aminoasitten oluşan β amiloid peptitler patogenezden sorumludur. (Younkin ve ark., 1998).

Birçok araştırma, AD patofizyolojisinin şekillenmesinde reaktif oksijen türleri üretimi ve endojen antioksidan sistem arasındaki dengesizliğin sonucu meydana geldiğini göstermiştir (Cross ve ark., 1987; Tarozzi, ve ark., 2013). Glukoz metabolizmasında metilgliyoksal gibi reaktif karbonil bileşikler ortaya çıkabilir ve AD'de bilişsel hasarın patomekanizmasında önemli rol oynayabilir (Pratico, 2008; Gella ve Durany, 2009; Matafome ve ark., 2013). Reaktif metilgliyoksal, aerobik glikoliziste trioz fosfat enzimi (dihidro aseton fosfat ve d-gliseraldehit fosfat üretimini) aracılı reaksiyonların ürünü olarak kendiliğinden oluşabildiği gibi, pentoz askorbat ve lipidlerin oksidatif indirgenmesine bağlı olarak ortaya çıkabilir (Degenhardt, ve ark., 1998; Desai ve ark., 2008). Metilgliyoksal kültüre edilmiş nöroblastomalarda 24 saatte, enerji patlamasına, membran depolarizasyonuna ve glutamate salınımına neden olduğunu gösterilmiştir (Arriba ve ark., 2007; Arriba ve ark., 2008). Metilgliyoksal, oksidatif stresi tetikleyerek nörodejenerasyona ve hücre ölümlerine katkıda bulunabilir (Amicarelli, ve ark., 2003; Kikuchi ve ark; 1999; Shinpo ve ark., 2000). MGO tarafından üretilen ROS, güçlü bir nörotoksin gibi serbest radikallerin ve glikasyonların şekillenmesine neden olarak sonuçta Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların meydana gelmesine zemin hazırlar (Arriba ve ark 2007). Araştırmamızda metilgliyoksalın uygulanımının doz bağımlı olarak hücre canlılık oranlarını anlamlı düzeyde düşürdüğü tespit edilmiştir. Endojen olarak glikolitik yolun bir yan ürünüdür (Thornalley, 2005). Metilgliyoksal, AD gibi birçok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde rol alan, özellikle başta proteinler olmak üzere hücresel diğer molekülleri glikasyona uğratabilir (Ramasamy ve ark., 2005). Metilgliyoksalın damar düz kas hücreleri, endotelial hücreler, rat hepatositleri, plateletler, nöronlar gibi birçok dokuda ROS türlerini arttırdığı rapor edilmiştir (Angeloni ve ark., 2013). MGO oksidatif stresi uyarak nörodejenerasyona neden olabilir

(Amicarelli, ve ark., 2003; Kikuchi ve ark., 1999; Shinpo ve ark., 2000; Huang ve ark., 2012; Chen ve ark., 2006). Elde ettiğimiz verilere benzer olarak birçok sitotoksitite deneyinde metilglyoksalin hücre içi kalsiyum artışına bağlı olarak oksidatif stresi arttırdığı ve hücre ölümlerini şekillendirdiği rapor edilmiştir (Annunziatove ark., 2003). Xie ve ark., 2014 yaptıkları *in vitro* nöroblastoma hücrelerinde 24 saatlik inkübasyondan sonra metilglyoksalin doz bağımlı olarak anlamlı düzeyde hücre sayısını azalttığını göstermişlerdir. Jan ve ark., 2005 yaptıkları araştırmada, MDCK hücre kültüründe metilglyoksalin hem doz bağımlı hemde süre bağımlı olarak hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığını rapor etmişlerdir. Tajes ve ark., (2014) yaptıkları *in vitro* çalışmada metilglyoksalin artan dozlarda hücre içi bax protein düzeyini arttırmasına karşın Bcl-2 düzeyini ise azaltarak ve kaspaz 3 aktivitesini arttırarak nöronlarda apoptoz şekillendiğini rapor etmişlerdir. Yine Chen ve ark. (2010) primer hipokampal nöron kültüründe MG'nin kaspaz 3 aktivasyonuna ve Bcl-2/Bax oranını azaltarak apoptotik hücre ölümünün uyarıldığını göstermişlerdir. Radu ve ark., (2012) 250 uM ve yüksek dozlarının nöronlarda anlamlı düzeyde hücre sayısını azalttığını göstermişlerdir. Du ve ark. (2000), 200-500 uM metilglyoksalin jurkat hücrelerini anlamlı düzeyde apoptoza uğrattığını belirtmişlerdir. Oksidatif stress A β kaynaklı nörodejeneratif hastalıklarda nöronal apoptozun meydana gelmesinde, NADPH oksidaz aktivasyonu ile üretilen reaktif oksijen türleri ve mitokondrial biyoenerjik potansiyellerin önemli rolleri bulunmaktadır (Cross ve ark., 1987; Tarozzi ve ark., 2013; Abramov ve ark., 2004; Motori ve ark., 2013). AD ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda, süperoksit ve peroksinitrit gibi reaktif ve nitrojen oksijen türleri AGE'lerin birikimi ve protein katlanmalarını etkilerler (Loske ve ark., 1998). Metilglyoksal süperoksit dismutazın kofaktörlerinden olan Cu ve/veya Zn ile kovalent bağlanarak enzimi inaktif hale getirerek, mitokondriyal süperoksit üretimini arttırmaktadır (Kang, 2003; Rosca ve ark., 2005; Rabbani ve Thornalley, 2008;).

Beta amiloid peptidinin şekerlerle inkübasyonu, metilglyoksal gibi yüksek moleküler yoğunluklu oligomerlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu oligomerler ve agregatlar, hidrofobik yüzeylerinin varlığı nedeniyle hücre zarları ile etkileşim yaparak fonksiyon kaybına hatta hücrede toksititeye neden olabilir (Stefani ve Dobson 2003). Araştırmamızda hücre canlılık testleriyle tespit edilen konsantrasyonda U87 hücrelerine MGO uygulandı. İnkübasyon süresinden sonra metilglyoksalin amiloid plaklarını ve A β (1-42) peptitlerini anlamlı düzeyde arttırdığı gözlemlendi. Amiloid β (A β), amiloid- β protein öncüsünün (APP) proteolitik parçalanması ile üretilen 40-42 amino grup asitli bir

peptittir ve nörotik plakların ana bileşenlerinden biridir. $A\beta$ sitotoksiktir ve oksidatif stresi uyararak nörodejeneratif değişikliklere neden olabilir (Loo ve ark., 1993; Walsh ve ark., 2002). Metilgliyoksal, $A\beta$ 1-42 ve proteinlerin yanlış katlanmasını arttırmakta ve senil plakların birikimine neden olmaktadır (Fawver ve ark., 2012; Srikanth ve ark., 2013). Abramov ve ark., (2004) astrositlerde $A\beta$ peptit uyarımlı nöronal ölümlerde NADPH oksidazın merkezi rol oynadığını tespit etmişlerdir. Metilgliyoksal uyarımlı oksidatif stresin meydana getirdiği nöron kayıplarında iki önemli MAPK üyesi olan JNK ve p38 sinyal yollarının aktivasyonu söz konusudur (Zhu ve ark., 2002; Hashimoto ve ark., 2003; Puig ve ark., 2004; Chiarini ve ark., 2009). Apoptozun şekillenmesinde α ve β sekretaz aktivasyonu (Tamagno ve ark., 2005; Shen ve ark., 2008) ile prokürsör amiloid proteinlerin stabilizasyonu ve fosforilasyonu da önemlidir (Muresan ve Muresan, 2007; Colombo ve ark., 2009).

Siklik AMP yolağı, adenilat siklaz enzimi katalizörlüğünde ATP'den cAMP oluşumuyla gerçekleştirilir. cAMP'nin hücre içi etkilerine cAMP bağımlı protein kinaz (protein kinaz A) aracılık eder. cAMP protein kinaz A'ya bağlandığında katalitik alt birimleri ayrılır ve her biri hedef proteinlerdeki serin kalıntılarını fosforiller veya hücre çekirdeğine göç eder. Çoğu çalışma, yükseltilmiş cAMP seviyelerini protein kinaz A'nın aktivasyonuna bağlamış olmasına rağmen, cAMP ayrıca, siklik nükleotid geçitli iyon kanallarını doğrudan aktive edebilir ve GTP değişim faktörlerinin aktivasyonu yoluyla sinyal verebilir. (Cheng ve Grande, 2007). Tüm doku hücrelerinde bulunan ikinci mesajcı cAMP, hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenleyen ana hücre içi faktörlerden biri olduğu için, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ve patogenezinin anlaşılmasında potansiyel bir hedefini oluşturmaktadır (Houslay ve Milligan, 1997). Siklik AMP sinyali, adenil siklazın plazma zarı lokalizasyonu ve protein kinaz A'yı spesifik hücre içi lokasyonlara bağlayan iskelet proteinlerinin ekspresyonu yoluyla bölümlere ayrılır (Cheng ve Grande, 2007; Kierszenbaum ve ark., 2007). Siklik nükleotid seviyeleri büyük ölçüde fosfodiesterazlar (PDE'ler) tarafından yönlendirilen katabolik süreçlerle düzenlenir.

Araştırmamızda etkin konsantrasyonda metilgliyoksalin hücre içi siklik adenozin monofosfat düzeyini arttırırken, PDE 1B ve PDE1B-1'i azalttığını tespit ettik. Glial hücrelerde cAMP'nin artışına bağlı apoptozun indüklendiği birçok araştırmada rapor edilmiştir (Chen ve ark., 1998; Kumar ve ark., 2004; Linden ve ark., 2005; Chan ve ark., 2007; Svoboda ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2007; Suzuki ve ark., 2010). İnsel ve ark.,

(2012), özellikle olgunlaşmamış lenfoid hücrelerde, belirli nöronal hücrelerde ve kardiyak miyositlerde cAMP-artışına bağlı apoptozun arttığını belirtmişlerdir. Metilgliyoksalin programlanmış hücre ölümüne hücre tipine bağlı olarak neden olduğu bildirilmiştir (Okado ve ark., 1996; Kang ve ark., 1996; Suzuki ve ark., 2000). Jan ve ark., (2005) yaptıkları diabetik modelde metilgliyoksal uyarımlı hücre içi kalsiyum artışına bağlı olarak böbrek ve retinal dokularda hasar oluşturduğunu ancak iki farklı kan hücrelerini ve sarkoma hücre hattını ise etkilemediğini ortaya koymuşlardır (Jan ve ark., 2005). Yine aynı çalışmada MDCK hücrelerinde metilgliyoksalin konsantrasyonla paralel olarak fosfolipaz c'den bağımsız olarak mitokondriden kalsiyum salınımını ve ekstraselülerden hücre içine kalsiyum girişini arttırarak apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Al-Malki ve ark. (2017) yaptıkları CdCl₂ aracılı AGEs artışına bağlı diabetik nöropati modelinde reaktif karbonil bileşiklerinin cAMP düzeyini arttırdığını rapor etmişlerdir. Slowik ve ark., (2012), rat glial ve HEK 293 hücrelerinde A β 1-42 uyarımlı sinyalin hücre içi extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) fosforile ederek cAMP seviyelerini arttırdığını rapor etmişlerdir. Yine Brandenburg ve ark., (2010), astrositlerde A β 1-42 peptitlerinin ERK 1/2 fosforilasyonu sonucu hücre içi cAMP akümülyasyonuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. Tau hiperfosforilasyonu, AD'nin gelişiminde patolojik bir belirteç ve erken bir olaydır [Chou ve ark., 2011; Riederer ve ark., 2001)]. Qi ve ark., 2017 yaptıkları *in vivo* çalışmada MG'nin özellikle hipokamal nöronlarda tau protein formasyonu ve hiperfosforilasyonu ile kaspaz 3 aktivasyonu sonucu hücre ölümlerinin anlamlı düzeyde arttığını göstermişlerdir. Tau fosforilasyonu siklin bağımlı kinaz, cAMP bağımlı protein kinaz ve stress tarafından active edilen protein kinaz gibi kinazlar ve fosfatlar tarafından düzenlenir (Yu ve ark., 200; Qi ve ark., 2016; Ferrer ve ark., v 2005; Mazanetz ve ark., 2007). A β birikimi hücre içi kalsiyum artışına bağlı oksidatif strese neden olur ve nörodejenerasyonu tetikler (Qi ve Qiao, 2001). Birçok farklı hücrede farklı konsantrasyonlarda metilgliyoksal kullanılmıştır. Cook ve ark., (1998) 1 mM konsantrasyondaki MGO'nun rat pankreatik B hücrelerinde, hızlı depolarizasyona neden olarak hücrelere Ca girişinin arttığını rapor etmişlerdir. Son zamanlarda birçok çalışmada hücre içi cAMP artışının apoptotik süreci uyardığı bildirilmiştir. Ayrıca A β birikimlerinin intraselüler kalsiyum artışına neden olacağı ve oksidatif stres ile nörodejenerasyonun uyarıldığını bildirmişlerdir (Qui ve ark., 2001).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen verilerin incelendiğinde oluşturulan diabet modelinde leptin düzeyleri arve doz bağımlı olarak hücre ölümlerini arttırdığını bununla birlikte hücre içi cAMP düzeyini artırarak apoptozu indüklediğini ortaya koyduk. Bununla birlikte araştırmamızdaki PDE bulguları ilk veri niteliğindedir. Yine cAMP artışının özellikle glial hücrelerde ekspresyonunun yoğun olduğu PDE 1 ve alt izoenzimlerinin down regülasyonu sonuçlarımızın doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Ayrıca metilglıyoksalın Aβ peptit üretimini uyarılmış olması hücre ölümlerinin artışında önemli olabileceğide gerçekleştirilen, kongo red boyamalarıyla tespit edilerek ortaya konulmuştur. Tüm bu bilgilerin ışığında araştırmadan elde edilen verilerden yola çıkarak metilglıyoksal uyarımlı hücre kayıplarının ileri mekanizmalarının ortaya konulmasında in vivo ve daha ileri düzey moleküler tekniklerin kullanıldığı denemelere ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. **Abramov** A. Y., Canevari L. and Duchen M. R., “ β -amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase,” *Journal of Neuroscience*, **2004**: s. 24:565–575.
2. **Aliev** G., Liu J., Shenk J.C., Fischbach K., Pacheco G.J., Chen S.G.. Neuronal mitochondrial amelioration by feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to aged rats. *J Cell Mol Med*; **2009A**, s. 13(2):320-33.
3. **Aliev** G., Palacios H.H., Walrafen B., Lipsitt A.E., Obrenovich M.E., Morales L.. Brain mitochondria as a primary target in the development of treatment strategies for Alzheimer disease. *Int J Biochem Cell Biol*; **2009B**, 41(10):1989-2004.
4. **Al-Malki** A.L., Barbour E.K., Ea H., Moselhy S., ALZahrani A.H.S., Kumosani T.A. Signaling pathways regulated by brassicaceae extract inhibit the formation of advanced glycated end products in rat brain. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. **2017** s.13;14(2):234-240.
5. **Ames** B., Shingenaga M., Park E.M. Oxidation damage and repair: chemical, biological and medical aspects. Elmsford, United Kingdom: **1991**. Pergamon Press.
6. **Amicarelli** F., Colafarina S., Cattani F. et al., “Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury,” *Free Radical Biology and Medicine*, **2003**, s. 35(8):856–871.
7. **Angeloni** C. , Malaguti M., Hrelia S. Antglycative activity of sulforaphane: a new avenue to counteract neurodegeneration? *Neural regeneration research*. **2015**, s, 10(11): 1750-1751.
8. **Angeloni** C., Turroni S., Bianchi L. et al., “Novel targets of sulforaphane in primary cardiomyocytes identified by proteomic analysis,” *PLoS ONE*, **2013**, 8, (12): 832-833,.
9. **Arriba** S. G., Krügal U., Regenthal R. et al., “Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity,” *Free Radical Biology and Medicine*”, **2006**, 40(5), 779–790.
10. **Arriba** SG, Stuchbury G, Yarin J, Burnell J, Loske C and Munch G. Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells protection by carbonyl scavengers. *Neurobiol Aging*. **2007**, 28: 1044–1050.
11. **Arriba**. G., Stuchbury G., Yarin J., Burnell J., Loske C., and Munch G., “Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells-protection by carbonyl scavengers,” *Neurobiology of Aging*, 2007, 28, (7), pp. 1044–1050.
12. **Ashabi** G., Ramin M., Azizi P., Taslimi Z., Alamdary S.Z., Haghparast A. et al. ERK and p38 inhibitors attenuate memory deficits and increase CREB phosphorylation and PGC-1 alpha levels in Abeta injected rats. *Behav Brain Res*. **2012**, 232:165–73.
13. **Ashabi** G, Alamdary SZ, Ramin M, Khodaghali F. Reduction of hippocampal apoptosis by intracerebroventricular administration of extracellular signal-regulated protein kinase and/or p38 inhibitors in amyloid beta rat model of Alzheimer's disease: involvement of nuclear-related factor-2 and nuclear factor- κ B. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **2013**, 112(3):145-55.
14. **Bendlin** BB, Carlsson CM, Gleason CE, Johnson SC, Sodhi A, Gallagher CL, et al. Midlife predictors of Alzheimer's disease. *Maturitas*. **2010**; 65(2): 131-7.
15. **Bierhaus** A., Fleming T., Stoyanov S., Leffler A., Babes A., Neacsu C., Sauer S.K., Eberhardt M., Schnolzer M., Lasitschka F., Neuhuber W.L., Kichko T.I., Konrade I., Elvert R., Mier W., Pirags V., Lukic I.K,

- Morcos M., . Dehmer T, Rabbani N., Thornalley P.J., . Edelstein D, Nau C., Forbes J., . Humpert P.M, Schwaninger M., Ziegler D., Stern D.M., Cooper M.E., Haberkorn U., . Brownlee M, Reeh P.W., Nawroth P.P., Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy, *Nat. Med.* 2012. s: 18, 926–933.
16. **Boutten A.**, Goven D., Artaud-Macari E., Boczkowski J., Bonay M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in Molecular Medicine.* **2011.** s. 17, 363-371.
 17. **Brad P.D.**, Chantal A.V. A proposed mechanism for exercise attenuated methylglyoxal accumulation: Activation of the ARE-Nrf pathway and increased glutathione biosynthesis. *Medical Hypotheses.* **2013,** s. 81: 813–815.
 18. **Brandenburg LO,** Konrad M, Wruck CJ, Koch T, Lucius R, Pufe T: Functional and physical interactions between formyl-peptide-receptors and scavenger receptor MARCO and their involvement in amyloid beta 1-42- induced signal transduction in glial cells. *J Neurochem,* **2010.** s. 113: 749–760.
 19. **Brunk U.T., Terman A.** The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem;* **2002,** s. 269: 1996–2002.
 20. **Cankurtaran M.,** Arioğlu S. Demans ve Alzheimer hastalığı ecza akademisi. **2002.** 28 Şubat 2014.
 21. **Cankurtaran M.,** Arioğul S. Demans ve alzheimer hastalığı. *Misem.* **2005.** s. 11(12): 22-57.
 22. Cankurtaran M., Şahin Cankurtaran E. Demansa bağlı davranış bozuklukları ve deliryum. İç Hastalıkları Dergisi **2008.** s.15: 33-43.
 23. **Celec P.** Nuclear factor kappa B–molecular biomedicine: the next generation. *Biomed Pharmacother* 2004, s. 58: 365–71.
 24. **Chan A.S.,** Ng, L.W., Poon, L.S., Chan, W.W. & Wong, Y.H.. Dopaminergic and adrenergic toxicities on SK-N-MC human neuroblastoma cells are mediated through G protein signaling and oxidative stress. *Apoptosis.* **2007,** s. 12.167–179.
 25. **Chen K.,** Maley J., and Yu P. H., “Potential implications of endogenous aldehydes in β -amyloid misfolding, oligomerization and fibrillogenesis, *Journal of Neurochemistry,* **2006,** s. 99 (5):1413–1424,
 26. **Chen, R.;** Valencia, I.; Zhong, F.; McColl, K. S.; Roderick, H. L.; Bootman, M. D.; Berridge, M. J.; Conway, S. J.; Holmes, A. B.; Mignery, G. A.; Velez, P. and Distelhorst, C. W. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate, *J Cell Biol.* **2004.** 166 (2), 193-203.
 27. **Chen, T.C.,** Hinton, D.R., Zidovetzki, R. & Hofman, F.M. 1998. Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest.* s. 78: 165–174.
 28. **Cheng J.** and Grande J.P. PDE Inhibitors: Novel therapeutic agents for Renal disease, *Exp. Biol. Med.,***2007.**s. 232: 38-51.
 29. **Cheng JC,** Esparza S, Sandoval S ve ark. Potential role of CREB as a prognostic marker in acute myeloid leukemia. *Future Oncology.* **2007,** s. 3 (4): 475-480.
 30. **Chiarini A.,** Dal Pra I, Marconi M., Chakravarthy B., Whitfield J. F. and Armato U., “Calcium-sensing receptor (CaSR) in human brain’s pathophysiology: Roles in late-onset Alzheimer’s disease (LOAD),”*Current Pharmaceutical Biotechnology.* **2009.** s. 10(3), 317–326.

31. **Chou** JL, Shenoy DV, Thomas N, Choudhary PK, Laferla FM, Goodman SR, Breen GA. Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Proteomics* **2011**; s. 74: 466-479.
32. **Christen** Y. Oksidative Stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 2000. s. 71: 621-629.
33. **Colombo** A., Bastone A., Ploia C. et al., "JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease," *Neurobiology of Disease.* **2009.** s. 33: 518–525,
34. **Cook** LJ, Davies J, Yates AP, Elliott AC, Lovell J, Joule JA, Pemberton P, Thornalley PJ, Best L Effects of methylglyoxal on rat pancreatic beta-cells. *Biochem Pharmacol.* 1998. s. 55:1361–1367
35. **Cross** C. E., Halliwell B., Borish E. T. et al., "Oxygen radicals and human disease. Davis conference," *Annals of Internal Medicine,* **1987,** s. 107 (4) 526–545.
36. **Degenhardt** T. P., Thorpe, S. R. and Baynes J. W., "Chemical modification of proteins by methylglyoxal," *Cellular and Molecular Biology,* **1998,** s. 44 (7): 1139–1145,.
37. **Degterev** A., Boyce M., Yuan J. A. decade of caspases. *Oncogene,* **2003.** s. 2(2):8543-8567.
38. **Demuro** A., Mina E., Kaye R., Milton S. C., Parker I. and Glabe C. G. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **2005.** 280 (17): 294–17 300.
39. **Desai** K. K. and Miller B. G., "A metabolic bypass of the triosephosphate isomerase reaction," *Biochemistry,* **2008.** s.47(31):7983–7985,
40. **Dhar** A, Desai K, Kazachmov M, Yu P, Wu L. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors. *Metabolism.* 2008, s. 57(9):1211-20.
41. **Dousa** T. P.. Cyclic-3',5'- nucleotide phosphodiesterases isoenzyme in cell biology and Pathophysiology. *Kidney International.* **1999,** s. 55(1): 29-62.
42. **Dousa** T. P. Cyclic-3',5'- nucleotide phosphodiesterases isoenzyme in cell biology and Pathophysiology Hetman JM, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH, et al. Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **2000.** (97), 12891-5.
43. **Du** J, Suzuki H, Nagase F, Akhand AA, Yokoyama T, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T cells by activating c-jun N-terminal kinase. *J Cell Biochem.* 2000, s. 77: 333–344.
44. **Dumont** M., Ho D.J, Calingasan N.Y, Xu H., Gibson G., Beal M.F.. Mitochondrial dihydrolipoyl succinyltransferase deficiency accelerates amyloid pathology and memory deficit in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *Free Radic Biol Med;* **2009.** s. 47(7):1019-27.
45. **Dutta** D., Calvani R., Bernabei R., Leeuwenburgh C., Marzetti E.. Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circ Res;* 2012. s. 110: 1125–1138.
46. **Emamullee** JA, Shapiro AM. Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. **2006** s. 55(7):1907-14.
47. **Fawver** JN, Schall HE, Petrofes Chapa, RD, Zhu X, Murray IV. Amyloid-beta metabolite sensing: biochemical linking of glycation modification and misfolding. *J Alzheimers Dis* **2012,** s. 30: 63-73.
48. **Ferrer** I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, Avila J. Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* **2005;** s. 2: 3-18.

49. **Ferrer I.**, Blanco R., Carmona M., Ribera R., Goutan E., Puig B. Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Pathol*; **2001**. s.11:144–58.
50. **Francis S.H.**, Turko I.V. and Corbin J.D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Relating structure and function. *Progress Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*,**2000**, s. 65: 1-52.
51. **Fukui K.**, Onodera K., Shinkai T., Suzuki S., Urano S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann N Y Acad Sci*; **2001**, s. 928: 168–175.
52. **Garrido, C.**; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P. E.; Didelot, C. and Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria, *Cell Death Differ.* 2006. 13 (9):1423-33.
53. **Gella A.**, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adh Migr* **2009**, s. 3: 88-93.
54. **Ghosh A.**, Bera S, Ray S., Banerjee T., and Ray M. Methylglyoxal Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in Sarcoma Published in Russian in *Biokhimiya*, **2011**. s. 7 (10), 1428-1436.
55. **Gomes R.**, Sousa M. S., A. Quintas, Cordeiro C., Freire A., Pereira P., Martins A., Monteiro E., Barroso E., Ponces F. A. Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy, *Biochem. J.* **2005**. s. 385 339–345.
56. **Ha K.**, Chen Y., Sternberg P. Increased glutathione synthesis through an ARE-Nrf1-dependent pathway by zinc in the RPE: Implication for protection against oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; **2006** s. 47:2709–15.
57. **Halliwell B.**, Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press. **1989**.
58. **Han P.**, Werber J., Surana M., Fleischer N. And Michaeli T. The calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE1C downregulates glucose-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.*,1999. 274, 22337– 22344.
59. **Hashimoto Y.**, Tsuji O., Niikura T. et al., “Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 84, no. 4, pp. 864–877, 2003.
60. **Hetman JM**, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH, et al. Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, s. 97:12891-5.
61. **Hirai K.**, Aliev G., Nunomura A., Fujioka H., Russell R.L., Atwood C.S.. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **2001**, s. 21(9):3017-23.
62. **Houslay M.D.**, Sullivan M., Bolger G.B. The multienzyme PDE4 cyclic adenosine Rumi Ghosh et al /*Int.J. PharmTech Res.*2009,1(4) 1157 monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. *Adv. Pharmacol.*,**1998**, s. 44,225–342.
63. **Houslay MD**, Milligan G: Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* **1997**, s.22: 217-224.

64. **Huang** C.Y., Chau V., Chock P.B., Wang J.H. and Sharma R.K. Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: requirement of the binding of four Ca²⁺ to calmodulin for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, s.78: 871– 874.
65. **Huang** X., Wang F., Chen W., Chen Y., Wang N. and von Maltzan K. “Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal,” *Brain Research*, **2012**, s . 1469: 82–91,.
66. **Itkin** A, Dupres V, Dufrêne YF, Bechinger B, Ruyschaert JM, Raussens V. Calcium ions promote formation of amyloid β -peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PLoS One*. **2011**, s. 6(3) 18250-18255.
67. **Ji** R.. Mitogen-activated protein kinases as potential targets for pain killers. *Curr Opin Investig Drugs*. **2004**,s. 5:71.
68. **Jan** C.R., Chen C.H., Wang S.C., Kuo S.Y. Effect of methylglyoxal on intracellular calcium levels and viability in renal tubular cells. *Cell Signal*. **2005**, s. 17(7):847-55.
69. **Jiang** X., Li J., Paskind M. and Epstein P.M. Inhibition of calmodulin-dependent phosphodiesterase induces apoptosis in human leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, s. 93: 11236– 11241.
70. **Jolival** CG, Fineman M, Deacon CF, Carr RD, Calcutt NA. GLP-1 signals via ERK in peripheral nerve and prevents nerve dysfunction in diabetic mice. *Diabetes Obes Metab*. 2011, s. 13(11):990-1000.
71. **Jung** H.A., Min B.S., Yokozawa T., Lee J.H., Kim Y.S., Choi J.S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of Coptidis Rhizoma alkaloids. *Biol Pharm Bull*. **2009**, s.32(8):1433-8.
72. **Jurgensmeier** J.M., Xie Z., Deveraux Q., 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **1998**, s. 95: 4997–5002.
73. **Kanda** N. and Watanabe S. Regulatory roles of adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterases 1 and 4 in interleukin-13 production by activated human T cells. *Biochem. Pharmacol*. **2001**,s.62: 495–507.
74. **Kang** J. H. “Modification and inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by methylglyoxal,” *Molecules and Cells*, **2003**.s. 15(2) 194–199,
75. **Kang** Y., Edwards L.G., Thornalley P. Leuk J., *Res*. **1996**, s.20:397.
76. **Karaman** Y. Alzheimer hastalığı ve diğer demanslar. *Kayseri: Lebib Yalkın Matbaası*; **2002**. s. 151-59.
77. **Kelleher** I., Garwood C., Hanger D.P., Anderton B.H., Noble W. Kinase activities increase during the development of tauopathy in htau mice. *J Neurochem*.**2007**, s. 103:2256–67.
78. **Kierszenbaum** AL. Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology. Second edition. *Canada: Elsevier* **2007**;s. 1: 85-104.
79. **Kikuchi** S. , Shinpo K., Moriwaka F., Makita Z., Miyata, T. And Tashiro K. “Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-deoxyglucosone on cultured cortical neurons: synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases,” *Journal of Neuroscience Research*, **1999**.s. 57(2),. 280–289,
80. **Kim** AD, Zhang R, Kang K, You H, Hyun J. Increased glutathione synthesis following Nrf2 activation by vanadyl sulfate in human Chang liver cells. *Int J Mol Sci*. **2011**. s. 12:8878–94.

81. **Kitagawa** Y. , Hirano T. , Kawaguchi S. , Prediction and validation of a mechanism to control the threshold for inhibitory synaptic plasticity. *Molecular Systems Biology*. **2009**, s. 5: 280
82. **Kumar**, B., Hanson, A.J. & Prasad, K.N. Sensitivity to proteasome to its inhibitors increases during cAMP-induced differentiation of neuroblastoma cells in culture and causes decreased viability. *Cancer Lett* **2004**. s. 204: 53–59.
83. **Li** L., Yee C. and Beavo J. A. CD3- and CD28- dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science*, **1999**. s.283: 848–851.
84. **Li**, G., Chang M, Jiang, H., Xie H., Dong Z. and Hu L.. Proteomics analysis of methylglyoxal-induced neurotoxic effects in SH-SY5Y cells. *Cell Biochem Funct*, **2011**. s. 29: 30–35.
85. **Linden**, R., Martins, R.A. & Silveira, M.S. Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. **2005**. s.24, 457–491.
86. **Loo** D. T., Copani A., Pike C. J., Whitemore E. R., Walencewicz A. J., and Cotman C. W., “Apoptosis is induced by β - amyloid in cultured central nervous system neurons,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.**1993**.s. 90(17):7951–7955,
87. **Loske** C., Neumann A., Cunningham A. M. et al., “Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by, oxidative stress,” *Journal of Neural Transmission*, 1998. s. 105(8): 1005–1015,
88. **Lugnier** C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol.Therapeutics*, **2006**, s.109: 366 – 398.
89. **Manczak** M., Park B.S., Jung Y., Reddy P.H. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromolecular Med*; **2004**. s. 5(2):147-62.
90. **Maruf** AA, Lip H, Wong H, O'Brien PJ. Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*. **2014** s.2797(14):356-361.
91. **Matafome** P, Sena C, Seica R. Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine* **2013**,s. 43: 472-484.
92. **Mattson** M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. **2004**. s. 430:631–639.
93. **Mattson** M.P., Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci*; **2004**. s. 7: 278-294.
94. **Mazanetz** MP, Fischer PM. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2007**. s. 6: 464-479.
95. **McMahon** M., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*. **2003**, s. 278:21592
96. **Moreira** P.I., Siedlak S.L., Wang X. et al. Autophagocytosis of mitochondria is prominent in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*; **2007**. s. 66: 525–532.
97. **Motori** E., Puyal J., Toni N. et al., “Inflammation-induced alteration of astrocyte mitochondrial dynamics requires autophagy for mitochondrial network maintenance,” *Cell Metabolism*, 2013, s. 18 (6): 844–859.
98. **Moulton** P.V. and Yang W. Air pollution, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease. *Journal of Enviromental and Public Health*. **2012**.

99. **Muresan Z.** and Muresan V., “The amyloid- β precursor protein is phosphorylated via distinct pathways during differentiation, mitosis, stress, and degeneration,” *Molecular Biology of the Cell*, **2007**, s. 18(10): 3835–3844,.
100. **Murray B.**, Alessandrini A., Cole A.J., Yee A.G., Furshpan E.J.. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci USA*; **1998**, s. 95: 11975–80.
101. **Nakadate Y.**, Uchida K., Shikata K., Yoshimura S., Azuma M., Hirata T., Konishi H., Kiyama H., Tachibana T. The formation of argpyrimidine, a methylglyoxal-arginine adduct, in the nucleus of neural cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**, s. 378: 209–212.
102. **Nyby M.D.**, Hori M.T., Ormsby B., Gabrielian A., Tuck M.L. Eicosapentaenoic acid inhibits Ca²⁺ mobilization and PKC activity in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Hypertens.*, **2003**, s.16:708–714.
103. **Okado A.**, Kawasaki Y., Hasuike Y., Takahashi M., Teshima T., Fujii J., Taniguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1996**. s.1: 225- 219.
104. **Papachristou F.**, Chatzaki E., Petrou A., Kougioumtzi I., Katsikogiannis N., Papalambros A., Tripsianis G., C. Simopoulos C., ve Tsaroucha A. K., Time course changes of anti- and pro-apoptotic proteins in apigenin-induced genotoxicity. *Chinese Medicine*. **2013**,s. 8:9
105. **Paul A.** Insel,1,2 Lingzhi Zhang,1 Fiona Murray,1,2 Hiroshi Yokouchi,1 and Alexander C. Zamboni1 Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second Messenger. *Acta Physiol (Oxf)*. **2012**. s. 204(2): 277-287.
106. **Perry G.**, Roder H., Nunomura A., Takeda A., Friedlich A.L., Zhu X. et al. Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *NeuroReport*. **1999**. s. 10:2411–5.
107. **Polli J.W.** and Kincaid R.L. Molecular cloning of DNA encoding a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1992** .s. 89: 11079–11083.
108. **Pratico D.** Oxidative stress hypothesis in Alzheimer’s disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci*. **2008**, s. 29: 609-615.
109. **Puig B.**, Gomez-Isla T., E. Rib’e et al., “Expression of stressactivated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding β A plaques in APP Tg2576 mice,” *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **2004**. s. 30 (5): 491–502
110. **Qi JS,** Qiao JT. Amyloid beta-protein fragment 31-35 forms ion channels in membrane patches excised from rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. **2001**, s.105: 845-852.
111. **Qi L,** Chen Z, Wang Y, Liu X, Liu X, Ke L, Zheng Z, Lin X, Zhou Y, Wu L, Liu L. Subcutaneous liraglutide ameliorates methylglyoxal-induced Alzheimer like tau pathology and cognitive impairment by modulating tau hyperphosphorylation and glycogen synthase kinase-3 β . *Am J Transl Res*. **2017**.s. 15;9(2):247-260.
112. **Qi LQ,** Ke LF, Liu XH, Liao LM, Ke SJ, Liu XY, Wang YP, Lin XW, Zhou Y, Wu LJ, Chen Z, Liu LB. Subcutaneous administration of liraglutide ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3 β pathway in an amyloid β protein induced Alzheimer dis-ease mouse model. *Eur J Pharmacol*. **2016**; s. 783: 23-32.
113. **Rabbani N.** and Thornalley P. J., “Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress,” *Biochemical Society Transactions*, **2008**. s. 36(5):1045–1050,

114. **Radu** B.M., Dumitrescu D.I., Mustaciosu C.C., Radu M., Dual effect of methylgly-oxal on the intracellular Ca²⁺ signaling and neurite outgrowth in mouse sensory neurons, *Cell. Mol. Neurobiol.* **2012** s.32:1047–1057.
115. **Ramasamy** R., Vannucci S. J., Yan S. S. D., H erold K., Yan S. F. and Schmidt A.M., “Advanced glycation end products an RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration and inflammation,” *Glycobiology*, **2005**. s. 15(7):16 28.
116. **Reed** T.M., Repaske D.R., Snyder G.L., Greengard P. and Vorhees C.V. Phosphodiesterase 1B knockout mice exhibit exaggerated locomotor hyperactivity and DARPP-32 phosphorylation in response to dopamine agonists and display impaired spatial learning. *J. Neurosci.*, **2002**, s.22: 5188– 5197.
117. **Riederer** BM, Mourton-Gilles C, Frey P, Dela-courte A, Probst A. Differential phosphoryla-tion phosphoryla-tion of tau proteins during kitten brain deve-lopment and Alzheimer’s disease. *J Neurocytol* **2001**.s. 30: 145-158.
118. **Rosca** M. G., Mustata T. G., Kinter M. T. et al., “Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation,” *The American Journal of Physiology: Renal Physiology*, **2005**. 289(2): 420–F430,
119. **Rosman** G.J, Martins T.J., Sonnenburg W.K., Beavo J.A., Ferguson K., Loughney K. Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene*, **1997**, s.191: 89-95.
120. **Rybalkin** S.D., Rybalkina I., Beavo J.A. and Bornfeldt K.E. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.*, 2002, 90, 151– 157.
121. **Selekler** K. Alzheimer orta yaşta başlar. *İstanbul: Alfa Yayınları; 2012*. s. 45-48.
122. **Selekler** K. Alzheimer ve diğer demanslar (Modern tıp seminerleri:26).*Ankara: Güneş Kitapevi Yayınları; 2003*. s. 9-13.
123. **Serrano** F., Klann E.. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev;* **2004**, s.3: 431–443.
124. **Sharma** M. K.. and Jalewa J., Hölscher C. Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide on SH-SY5Y cells exposed to methylglyoxal stress. *Journal of Neurochemistry*, **2014**. s.128(3): 459–471.
125. **Shen** C., Chen Y., Liu H. et al., “Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of γ -secretase,” *The Journal of Biological Chemistry*, **2008**. s. 283(25): 17721–17730.
126. **Sheng** J.G., Jones R.A., Zhou X.Q., McGinness J.M., Van Eldik L.J., Mrak R.E. et al. Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer’s disease: potential significance for tau protein phosphorylation. *Neurochem Int;* **2001**. s. 39:341–8.
127. **Shigenaga** M.K., Hagen T.M., Ames Bi.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA;* **1994**. s. 91: 10771–10778.
128. **Shimizu**, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* s.399: 483–487.
129. **Shinpo** K., Kikuchi S., Sasaki H., Ogata A., Moriwaka F., and Tashiro K., “Selective vulnerability of spinal motor neurons to reactive dicarbonyl compounds, intermediate products of glycation, in vitro: implication of inefficient glutathione system in spinal motor neurons,” *Brain Research*, **2000**. s. 861(1):151– 159.
130. **Siqueira** I.R, Fochesatto C., de Andrade A. et al. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci;* **2005**. s. 23: 663–671.

131. **Slee**, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade; hierarchical activation of caspase-2,-3,-6,-7,-8 and-10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **1999**. s.144:281–292.
132. **Slowik** A, Merres J, Elfgen A, Jansen S, Mohr F, Wruck CJ, Pufe T, Brandenburg LO. Involvement of formyl peptide receptors in receptor for advanced glycation end products (RAGE)--and amyloid beta 1-42-induced signal transduction in glial cells. *Mol Neurodegener.* **2012** s. 20: 7:55.
133. **Smith** M.A., Taneda S., Richey P.L., Miyata S., Yan, S.D. Stern D., Sayre L.M., Monnier V.M., Perry G. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**. s. 91:5710–5714.
134. **Snyder** P.B., Esselstyn J.M., Loughney K., Wolda S.L., and Florio V.A. The role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the regulation of adipocyte lipolysis. *J. Lipid Res.*, **2005**. s. 46: 494– 503.
135. **Sonnenburg** W. K., Seger D., Kwak K.S., Huang J., Charbonneau H. and Beavo J.A. Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases, *J. Biol. Chem.*, **1995**, s. 270: 30989– 31000.
136. **Srikanth** V, Westcott B, Forbes J, Phan TG, Beare R, Venn A, Pearson S, Greenaway T, Parameswaran V, Munch G. Methylglyoxal, cognitive function and cerebral atrophy in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **2013**. s. 68: 68-73.
137. **Sriwijitkamol** A., Coletta D., Wajcberg E., et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, **2007**. s. 56:836–48.
138. **Stefani** M, Dobson CM Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med.* **2003**. s. 81:678–699.
139. **Sun** A., Liu M., Nguyen X.V., Bing G. P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol*, **2003**. 183:394–405.
140. **Suzuki**, S., Yokoyama, U., Abe, T., Kiyonari, H., Yamashita, N., Kato, Y., Kurotani, R., Sato, M., Okumura, S. & Ishikawa, Y. Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J Biol Chem.* **2010**.s. 285:24248–24259.
141. **Svoboda**, N., Zierler, S. & Kerschbaum, H.H.. cAMP mediates ammonia-induced programmed cell death in the microglial cell line BV-2. *Eur J Neurosci*.s. **2007**. S.25: 2285–2295.
142. **Tajes** M, Eraso-Pichot A, Rubio-Moscardó F, Guivernau B, Bosch-Morató M, Valls-Comamala V, Muñoz FJ. Methylglyoxal reduces mitochondrial potential and activates Bax and caspase 3 in neurons: Implications for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **2014**. 19(580):78-82.
143. **Tamagno** E., Parola M., Bardini P. et al., “ β -site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways,” *Journal of Neurochemistry*, **2005**. 92(3) 628–636,
144. **Tarozzi** A., Angeloni C., Malaguti M., Morroni F., Hrelia S., and Hrelia P., “Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**, s.1: 1-10.
145. **Thomenius** M. J., Wang N. S., Reineks E. Z., Wang, Z. and Distelhorst C. W. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins, *J Biol Chem.***2003**. s.278(8), :6243-50.

146. **Thornalley** P. J., “Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2005**.s.1043:111–117,
147. **Vrabec** J.P., Lieven C.J., Levin L.A. Cell-type-specific opening of the retinal ganglion cell mitochondrial permeability transition pore. *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.* s. **2003**. 44(6):2774–82.
148. **Walsh** D. M. Klyubin, I., Fadeeva J. V., Rowan M. J., and Selkoe D. J. “Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition,” *Biochemical Society Transactions*, **2002**. 30 (4):552–557,
149. **Wells** J.N., Baird C.E., Wu Y. J. and Hardman J.G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activities of pig coronary arteries. *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**. s. 384:430– 442.
150. **Xie** B., Lin F., Peng L., Ullah K., Wu H., Qing H. and Deng Y. Methylglyoxal increases dopamine level and leads to oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Acta Biochim Biophys Sin.* **2014**, s. 46: 950–956.
151. **Younkin** S.M., Tanzi R.E., Christen Y. eds. Presenilins and Alzheimer’s disease. *Heidelberg, Germany: Springer-Verlag*.**1998**.
152. **Yu** M., Zheng X., Witschi H., Pinkerton K.E. The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental pollutants. *Toxicol. Sci.*,s. **2002**. 68, 488–497.
153. **Yu** Y, Run X, Liang Z, Li Y, Liu F, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J Neurochem.* **2009**. s. 108: 1480-1494.
154. **Yuste** JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* **2015**.s. 17;9:322.
155. **Zamora** Z.B., Borrego A., Lopez O.Y. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm*; **2005**. s. 24: 16–22.
156. **Zhao**, L., Qian, Z.M., Zhang, C., Wing, H.Y., Du, F. & Ya, K. Amyloid beta-peptide 31-35-induced neuronal apoptosis is mediated by caspase-dependent pathways via cAMP-dependent protein kinase A activation. *Aging Cell.* **2007**. s. 7, 47–57.
157. **Zhu** X., Lee H.-G., Raina A. K., Perry G., and Smith M. A., “The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer’s disease,” *NeuroSignals*, **2002**. 11(5): 270–281,

8. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında doğdu. Üniversiteye kadar olan öğrenim hayatını Adana'nın Kozan ilçesinde tamamladı. 2007 yılında Mustada Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesini kazandı. 2013 yılında bu üniversiteden mezun oldu. 2013 yılında mezun olduktan sonra halen çalışmakta olduğu özel kanatlı firmasında işe başladı. 2014 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesinde Biyokimya ABD.'da yüksek lisansa başladı. 2016 yılında evlendi ve bir çocuk babası.

