

Investigation of Phosphodiesterase 1B Gene Expression Levels on Amyloid Formation Induced by Food Sweeteners Glycation Products

Aykut KÜTÜKOĞLU, Altuğ KÜÇÜKGÜL

Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the effects of methylglyoxal, metabolic end product of high-fructose diets, on in vitro beta amyloid formation, secondary messenger molecule cyclic adenosine monophosphate (cAMP), and phosphodiesterase 1 (PDE1), which is responsible for the breakdown of this molecule. Human Glioblastoma U-87 MG (ATCC HTB-14) cell line was used in the study. Cells were produced in a sterile incubator at 37°C, 5% CO₂ and 95% air in Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM) containing 10% of fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin/ amphotericin B mixture. In the study, different concentrations of methylglyoxal (100-400 µM) were added to the cells sown in 24-wells one day in advance. At the end of the period, MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) reagent was added to the wells to determine the effective concentration of methylglyoxal. Next, PDE1B, PDE1B1 and Aβ1-40 gene expression levels were investigated by real time PCR method. The cAMP protein level was analyzed by ELISA method. In the viability tests, 200 µM concentration of methylglyoxal decreased the cell viability by 28% compared to the control group. This concentration was used as the active concentration and was used for subsequent studies. Again, methylglyoxal was found to increase intracellular cAMP level by 31%. According to the obtained gene expression data, it was found that methylglyoxal was increased Aβ1-40 gene expression by 3.7-fold, whereas PDE1B and PDE1B1 gene expressions were regulated down by 1.6 and 3.3-fold respectively. It is concluded that the fructose diet will have a significant effect on the pathogenesis of Alzheimer's disease in affected individuals. However, further investigations are needed, especially in vivo trials, to fully elucidate the subject.

Keywords: Alzheimer, Amyloid protein, cAMP, Phosphodiesterase

Gıda Tatlandırıcıları Glikasyon Ürünleri Uyarımlı Amiloid Oluşumu Üzerine Fosfodiesteraz 1B Geni Ekspresyon Seviyelerinin Araştırılması

ÖZET

Araştırmada yüksek früktoz diyeti tüketimine bağlı hücrede ortaya çıkan metabolik son ürün metilgliyoksalin in vitro beta amiloid oluşumu, ikincil haberci molekül siklik adenosin 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, içeriğinde %10 oranında 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. Çalışmada 1 gün önceden 24 kuyucuklu besi kaplarına ekilen hücrelere farklı konsantrasyonlarda metilgliyoksal (100- 400 µM) eklendi. Süre sonunda kuyucuklara MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) ayırıcı eklenerek metilgliyoksalin etkin konsantrasyonu tespit edildi. Sonraki denemelerde bu konsantrasyon hücrelere 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 ELISA metoduyla analiz edildi. 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 hücre içi 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 tespit edildi. 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, Amiloid protein, cAMP, Fosfodiesteraz

GİRİŞ

Yaşlanmaya bağlı serbest radikal hipotezi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrelerde birikmesi ve makromoleküllere 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 değişimlerle geri dönüşsüz 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 Aβ amiloid protein oluşumunu sağlayan β amiloid prokürsör proteinin (βAPP) ekspresyon dereceleri artar ve hücrede β amiloid peptidleri birikimi şekillenir (Aliev ve ark. 2009a ve 2009b).

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 (Francis ve ark. 2000). 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 spesifikliği gibi çeşitli açılardan birbirlerinden farklıdır PDE'ler sitozol, plazma

membranları, endoplazmik retikulum, nükleer membranlar ve sitoskeletonda bulunur (Nyby ve ark. 2003) ve hücre içi siklik nükleotid konsantrasyonları, fosforilasyon, düzenleyici proteinler ile etkileşim, Ca²⁺ / kalmodulinin bağlanması ve gen ifadesindeki değişiklikler ile düzenlenir (Cheng ve Grande 2007). 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).

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 (Gomes ve ark. 2005). Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS) yumuşak içeceklerde, kurutulmuş gıdalarda sükröza alternatif olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Brunk ve Terman 2002). Farklı şartlar altında monosakkaritlerin degregasyonu da alfa dikarbonil bileşiklerinin (α-DCS) oluşmasına yol açar (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 2004). Zamora ve ark., (2005) HCSF'nin işleme aşamasında ortaya çıkan α-DCS'lerin; glyoxal, MGO ve 3-deoksiDeritroheksoz-2-uloz (3Deoksiglikoz)un olduğunu rapor etmişlerdir. Metilgliyoksal ve onun glikasyon ürünleri özellikle nervöz dokuda birçok şiddetli patolojik olayların ortaya çıkmasına neden olur (Radu ve ark. 2012). Ancak nörotoksitede MGO' nun moleküler ve biyokimyasal mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır (Brad ve Chantal 2013).

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

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 fötal 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. 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. Araştırmada hücreler kontrol ve MGO uygulanan gruplar olarak ayrıldı.

Viabilite Testi (MTT metodu)

Farklı konsantrasyonlarda (100-400 uM) metilglükoksal hücrelere (12'li pleyt, 3x10⁵ hücre/kuyucuk) uygulanmasından 24 saat sonra, üzerlerindeki medium alınarak üzerlerine içerisinde 20 µL MTT ayırıcı (5 mg/ml PBS'te çözülürerek elde edilecek) bulunan 200 µL taze komple besiyeri eklendi. Hücreler bu solüsyonla 4 h 37°C'de inkübe edildi. MTT kristalleri 100 µL 0.04 M HCL/isopropanol ile 15 dk süreyle 37°C'de çözülürdü. Süre sonunda ependorflara alınan örnekler 12000 rpm ve +4 °C'de santrifüj edilerek ve 570 nm ışık dalga boyunda mikroye okuyucuda (µQuant-SK) okutuldu ve kaydedildi. Bu yöntem ile hem MGO'nun çalışmadaki hücre canlılığına etkileri hemde etkin konsantrasyonu analiz edildi.

Lizat hazırlama ve cAMP konsantrasyonu:

İnkübasyon sürelerinden sonra hücreler buz soğukluğunda PBS ile 3 kez yıkandı. Sonra 1x 10⁷ /ml hücre kitte bulunan 1/5 sulandırılmış lizis buffer ile muamele edildi. Daha sonra

örnekler 3 kez yaklaşık -20°C'de dondur çözündür metoduyla lize edildi. Daha sonra hücre atıklarını uzaklaştırmak için 4°C'de 600g 10 dk santrifüj edildi. Alınan lizat örneklerinden hücre içi cAMP konsantrasyonları hazır ticari cAMP ELİSA kit (RD System, USA) kullanılarak tespit edildi.

Gen ekspresyon analizleri

Polimeraz zincir reaksiyonu için öncelikle Ribonükleik asit (RNA) eldesi hazır ticari kit RiboEx reaktifile (GeneAll-SK) kullanılarak gerçekleştirildi ve RNA saflıkları spektrofotometrede (Shimadzu-UV mini 1240- JAP) (OD260/OD280 nm oranı) belirlendi. Araştırılan genlerin (Aβ1-40, PDE1BG ve PDE1B1) gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ölçüldü. Bu amaçla hazır "Verso sybr green one-step kit" (Thermo, EU) kullanıldı. Araştırmada kullanılan primer dizgeleri aşağıda tablo halinde verilmiştir (Tablo 1). Araştırmada PCR döngüleri RT PCR thermal cyclirında (Bio-RAD- CFX96) olarak cDNA sentezi aşaması 50°C'de 15 dk, start inaktivasyon 95°C'de 15 dk 1'er siklüs olarak gerçekleştirildi, Denatürasyon 95°C'de 15 sn, Yapışma 56°C'de 30 sn, ve uzama ise 72°C'de 30 sn 40 siklüs olarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel 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. Değerler ortalama ± standart hata (S.E) şeklinde verildi.

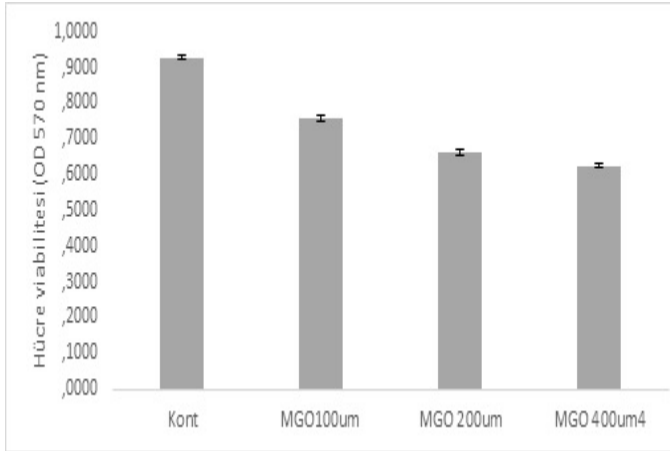
BULGULAR

Viabilite sonuçları

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

Tablo 1. Araştırmada Kullanılan Gen Spesifik "Primer" Dizgeleri

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

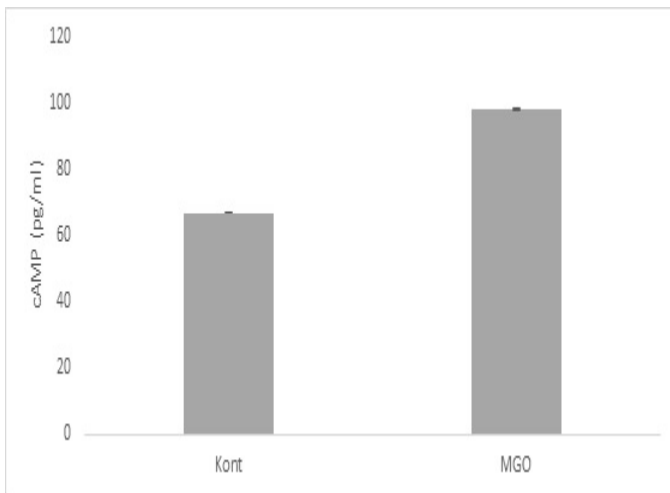


Şekil 1. Farklı Konsantrasyonlarda Metilglyoksal Uygulanımı Hücre Canlılık Oranları (24 saat).

Elde edilen verilere göre konsantrasyon artışına paralel olarak hücre ölüm oranlarının artışı tespit edildi. Özellikle MGO'nun 200 µm 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.

Hücre içi cAMP düzeyleri

Araştırmada 200 µm metilglyoksal 24 saat süreyle hücrelere uygulandı. Süre sonunda alınan örneklerden cAMP düzeyleri ticari kolorometrik kitle ELISA okuyucuda tespit edildi. Her bir deney 3 kez tekrarlandı ($n=5$).



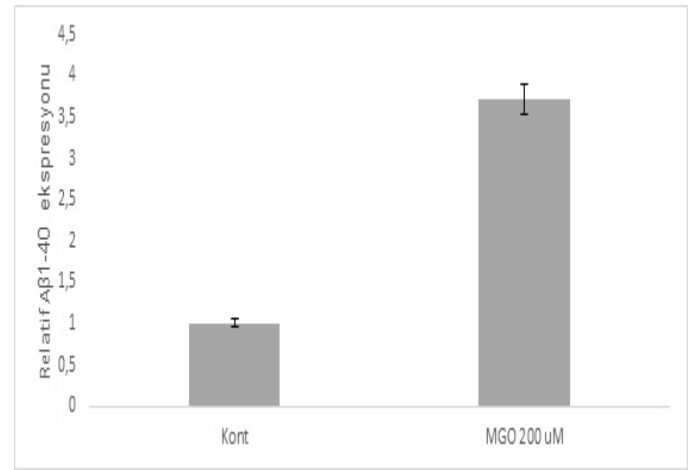
Şekil 2. Metilglyoksal Uygulanımının 24 Saat Uygulanımı Sonunda Hücre içi cAMP Seviyeleri

Elde edilen verilere göre cAMP düzeyi MGO grubunda

($98,01 \pm 3,9$) kontrol grubuna göre ($66,76 \pm 2,78$) kıyaslandığında %31 oranında arttığı tespit edildi.

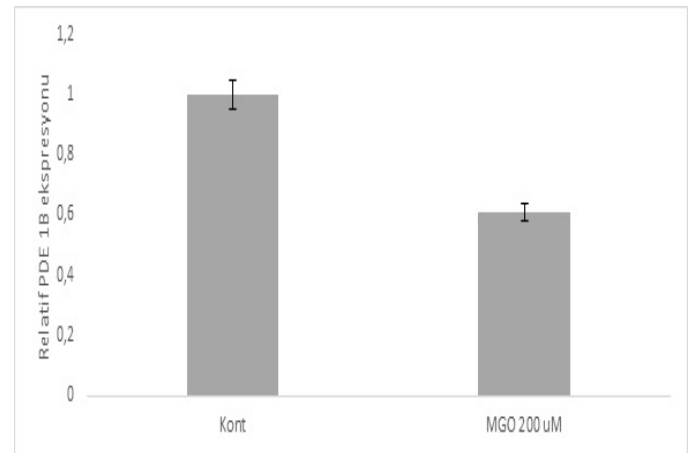
Gen ekspresyon analiz sonuçları

Glioblastomalar metilglyoksalın 24 saat uygulaması sonrasında gruplardan RNA örnekleri alındı ve tek basamaklı syber green kit ve gerçek zamanlı PCR metoduyla Aβ1-40, PDE1 (G) ve PDE1B1 gen ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Araştırmada birbirinden bağımsız 3 örneğin ortalaması alındı ve standart hatalar yüzde olarak verildi.



Şekil 3. 24 Saat Metilglyoksal Uygulanımının Relatif Aβ1-40 Gen Ekspresyon Düzeyleri

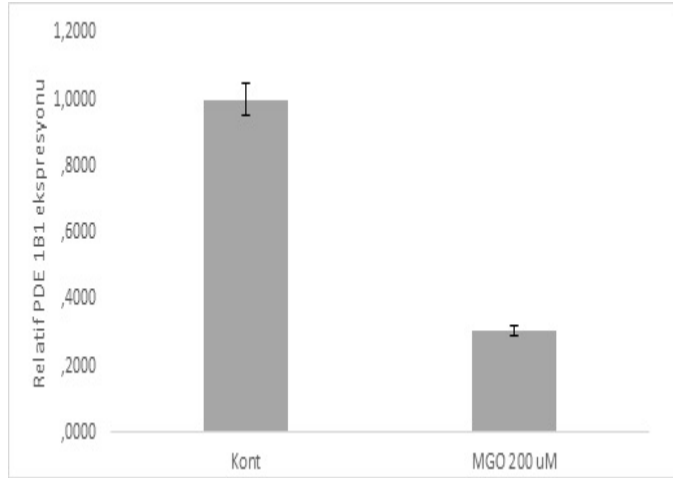
Elde edilen verilere göre MGO'nun Aβ1-40 gen ekspresyon düzeyini, kontrol hücrelerine göre 3.7 kat relatif misli değişimlerle up regüle ettiği tespit edildi.



Şekil 4. 200 µm 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.

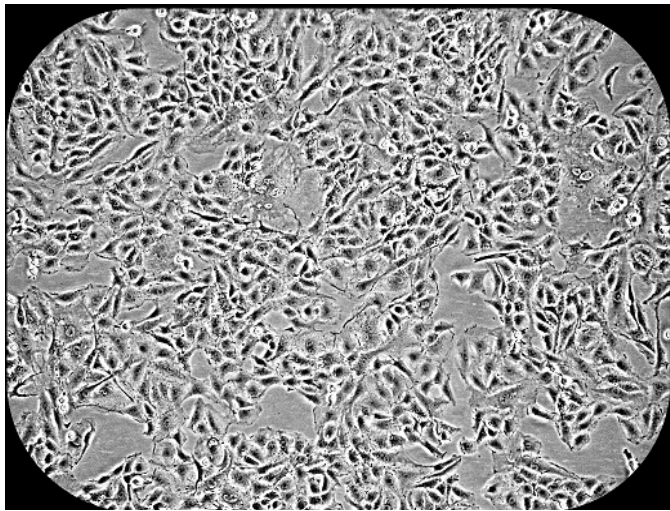


Şekil 5. Kontrol ve Metilglyoksal gruplarında relatif PDE1B1 gen ekspresyon düzeyleri (24 saat)

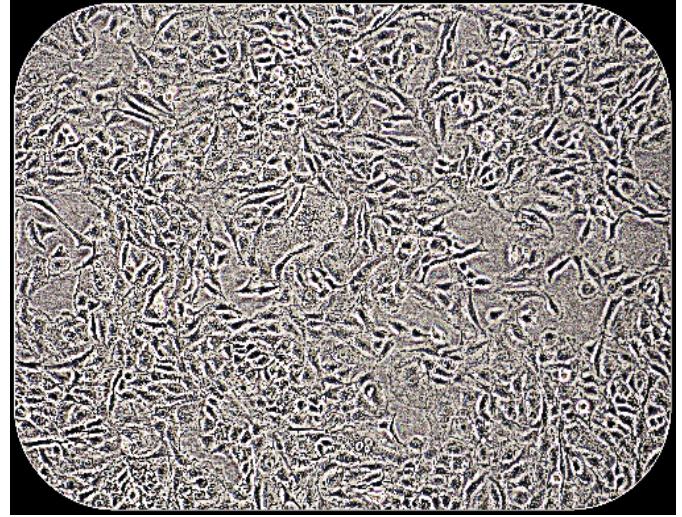
Elde edilen verilere göre MGO'nun PDE1B1 gen ekspresyon düzeyini, kontrol hücrelerine göre 3.3 kat relatif misli değişimlerle down-regüle ettiği görüldü.

Hücre Görüntüleri

Glioblastomalara metilglyoksal 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 6. Metilglyoksal Grubu Hücre Görüntüsü (10x, skala bar 1-50 nm)



Şekil 7. Kontrol Grubu Hücre Görüntüsü (10x, skala bar 1-50 nm).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Metilglyoksal kültüre edilmiş nöroblastomalarda 24 saatte, enerji patlamasına, membran depolarizasyonuna ve glutamate salınımına neden olduğunu gösterilmiştir (Arriba ve ark. 2006; Arriba ve ark. 2007). Araştırmamızda metilglyoksalin uygulanımının doz bağımlı olarak hücre canlılık oranlarını anlamlı düzeyde düşürdüğü tespit edilmiştir. Endojen olarak glikolitik yolun bir yan ürünüdür (Thornalley 2005). Metilglyoksalin damar düz kas hücreleri, endotelial hücreler, rat hepatositleri, plateletler, nöronlar gibi birçok dokuda ROS türlerini arttırdığı rapor edilmiştir (Angeloni ve ark. 2013). Elde ettiğimiz verilere benzer olarak birçok sitotoksitite deneyinde metilglyoksalin hücre içi kalsiyum artışına bağlı olarak oksidatif stresi arttırdığı ve hücre ölümlerini şekillendirdiği rapor edilmiştir. Xie ve ark. (2014) yaptıkları in vitro nöroblastoma hücrelerinde 24 saatlik inkübasyondan sonra metilglyoksalin doz bağımlı olarak anlamlı düzeyde hücre sayısını azalttığını göstermişlerdir. 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.

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. Metilglyoksal, A β 1-42 ve proteinlerin yanlış katlanmasını arttırmakta ve

senil plakların birikimine neden olmaktadır (Srikanth ve ark. 2013). Abramov ve ark. (2004) astrositlerde A β peptit uyarımlı nöronal ölümlerde NADPH oksidazın merkezi rol oynadığını tespit etmişlerdir. Metilglükoksal uyarımlı oksidatif stresin meydana getirdiği nöron kayıplarında iki önemli MAPK üyesi olan JNK ve p38 sinyal yollarının aktivasyonu söz konusudur (Zhu ve ark. 2002). Apoptozun şekillenmesinde α ve β sekretaz aktivasyonu (Shen ve ark. 2008) ile prokürsör amiloid proteinlerin stabilizasyonu ve fosforilasyonu da önemlidir (Colombo ve ark. 2009).

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). Siklik nükleotid seviyeleri büyük ölçüde fosfodiesterazlar (PDE'ler) tarafından yönlendirilen katabolik süreçlerle düzenlenir. Araştırmamızda etkin konsantrasyonda metilglükoksalin hücre içi siklik adenosin monofosfat düzeyini arttırırken, PDE 1B ve PDE1B-1'i azalttığını tespit ettik. Glial hücrelerde cAMP'nin artışına bağlı apoptozun indüklendiği birçok araştırmada rapor edilmiştir (Suzuki ve ark. 2010; Svoboda ve ark. 2007). 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 akümüülasyonuna neden olduğunu rapor etmişlerdir. 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. A β birikimi hücre içi kalsiyum artışına bağlı oksidatif strese neden olur ve nörodejenerasyonu tetikler.

Çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde, oluşturulan

MGO uyarımlı amiloid oluşumunun hücre içi cAMP düzeyini arttırarak apoptozu indüklendiğini 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. Tüm bu bilgilerin ışığında araştırmadan elde edilen verilerden yola çıkarak metilglükoksal uyarımlı hücre kayıplarının ileri mekanizmalarının ortaya konulmasında in vivo ve daha ileri düzey moleküler tekniklerin kullanıldığı denemelere ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abramov AY, Canevari L and Duchen MR. (2004). β -amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience* 24:565-575.
- Aliev G, Liu J, Shenk JC, Fischbach K, Pacheco GJ, Chen SG. (2009a). Neuronal mitochondrial amelioration by feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to aged rats. *J Cell Mol Med* 13(2):320-33.
- Aliev G, Palacios HH, Walrafen B, Lipsitt AE, Obrenovich ME, Morales L. (2009b). Brain mitochondria as a primary target in the development of treatment strategies for Alzheimer disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41(10):1989-2004.
- Al-Malki AL, Barbour EK, Ea H, Moselhy S, ALZahrani AHS, Kumosani TA. (2017). Signaling pathways regulated by brassicaceae extract inhibit the formation of advanced glycated end products in rat brain. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 14(2): 234-240.
- Ames B, Shingenaga M, Park EM. (1991). Oxidation damage and repair: chemical, biological and medical aspects. Elmsford, United Kingdom, Pergamon Press.
- Angeloni C, Turrone S, Bianchi L et al. (2013). Novel targets of sulforaphane in primary cardiomyocytes identified by proteomic analysis. *PLoS ONE* 8(12): 832-833.
- Arriba SG, Krügel U, Regenthal R. et al. (2006). Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 40(5): 779-790.

- Arriba SG, Stuchbury G, Yarin J, Burnell J, Loske C and Munch G. (2007). Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells protection by carbonyl scavengers. *Neurobiol Aging* 28: 1044–1050.
- Brad PD, Chantal AV. (2013). A proposed mechanism for exercise attenuated methylglyoxal accumulation: Activation of the ARE-Nrf pathway and increased glutathione biosynthesis. *Medical Hypotheses* 81: 813–815.
- Brandenburg LO, Konrad M, Wruck CJ, Koch T, Lucius R, Pufe T. (2010). 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* 113: 749–760.
- Brunk UT, Terman A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269: 1996–2002.
- Chen TC, Hinton DR, Zidovetzki R, Hofman FM. (2010). Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab Invest* 78: 165–174.
- Cheng J and Grande JP. (2007). PDE Inhibitors: Novel therapeutic agents for Renal disease, *Exp. Biol. Med* 232: 38–51.
- Christen Y. (2000). Oksidative Stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71: 621–629.
- Colombo A, Bastone A, Ploia C et al. (2009). JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 33: 518–525.
- Dousa TP. (1999). Cyclic-3',5'- nucleotide phosphodiesterases isoenzyme in cell biology and Pathophysiology. *Kidney International* 55(1): 29–62.
- Dutta D, Calvani R, Bernabei R, Leeuwenburgh C, Marzetti E. (2012). Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circ Res*, 110: 1125–1138.
- Francis SH, Turko IV and Corbin JD. (2000). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Relating structure and function. *Progress Nucleic Acid Res. Mol. Biol* 65: 1–52.
- Gomes R, Sousa MS, Quintas A, Cordeiro C, Freire A, Pereira P, Martins A, Monteiro E, Barroso E, Ponces FA. (2005). Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem. J* 385 339–345.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21(9):3017–23.
- Houslay MD, Milligan G. (1997). Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22: 217–224.
- Huang CY, Chau V, Chock PB, Wang JH and Sharma RK. (1981). Mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase: requirement of the binding of four Ca²⁺ to calmodulin for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci* 78: 871– 874.
- Jung HA, Min BS, Yokozawa T, Lee JH, Kim YS, Choi JS. (2009). Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol Pharm Bull* 32(8):1433–8.
- Li L, Yee C and Beavo J A. (1999). CD3- and CD28- dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science* 283: 848–851.
- Mattson MP, Magnus T. (2004). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7: 278–294.
- Nyby MD, Hori MT, Ormsby B, Gabrielian A, Tuck ML. (2003). Eicosapentaenoic acid inhibits Ca²⁺ mobilization and PKC activity in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Hypertens* 16:708–714.
- Polli JW and Kincaid RL. (1992). Molecular cloning of DNA encoding a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci* 89: 11079–11083.
- Qi L, Chen Z, Wang Y, Liu X, Liu X, Ke L, Zheng Z, Lin X, Zhou Y, Wu L, Liu L. (2017). 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* 15:9(2):247–260.
- Qui JS, Qiao JT. (2001). Amyloid beta-protein fragment 31–35 forms ion channels in membrane patch–es excised from

- rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 105: 845-852.
- Radu BM, Dumitrescu DI, Mustaciosu CC, Radu M. (2012). Dual effect of methylgly-oxal on the intracellular Ca²⁺-signaling and neurite outgrowth in mouse sensoryneurons, *Cell. Mol. Neurobiol* 32:1047-1057.
- Shen C, Chen Y, Liu H et al. (2008). Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of-secretase. *The Journal of Biological Chemistry* 283(25): 17721-17730.
- Slowik A, Merres J, Elfggen A, Jansen S, Mohr F, Wruck CJ, Pufe T, Brandenburg LO. (2012). 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* 20: 7:55.
- Srikanth V, Westcott B, Forbes J, Phan TG, Beare R, Venn A, Pearson S, Greenaway T, Parameswaran V, Munch G. (2013). Methylglyoxal, cognitive function and cerebral atrophy in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68: 68-73.
- Suzuki S, Yokoyama U, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kato Y, Kurotani R, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y. (2010). Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J Biol Chem* 285:24248-24259.
- Svoboda N, Zierler S, Kerschbaum HH. (2007). cAMP mediates ammonia-induced programmed cell death in the microglial cell line BV-2. *Eur J Neurosci* 25: 2285-2295.
- Thornalley P.J. (2005). Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043:111-117.
- Wells JN, Baird CE, Wu YJ and Hardman JG. (1975). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activities of pig coronary arteries. *Biochim. Biophys. Acta* 384:430-442.
- Xie B, Lin F, Peng L, Ullah K, Wu H, Qing H and Deng Y. (2014). Methylglyoxal increases dopamine level and leads to oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 46: 950-956.
- Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY. (2005). Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm* 24: 16-22.
- Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G and Smith MA. (2002). The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *NeuroSignals* 11(5): 270-281.