İNSAN İMMÜNOGLOBULİN G'NİN GLİKASYONU VE ANTİJEN BAĞLANMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

FERYAL ZELİHA AKAY

AĞUSTOS 2023

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN İMMÜNOGLOBULİN G'NİN GLİKASYONU VE ANTİJEN BAĞLANMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

FERYAL ZELİHA AKAY

DİCLE ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM VE SINAV YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
KİMYA ANA BİLİM DALINDA YÖK 100/2000 ÖNCELİKLİ TEMATİK ALAN PROGRAMI KAPSAMINDA
DOKTORA TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

AUGUST 2023

DİYARBAKIR

İNSAN İMMÜNOGLOBULİN G'NİN GLİKASYONU VE ANTİJEN BAĞLANMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Feryal Zeliha AKAY tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma, aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Kimya Ana Bilim Dalı**'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ
Müdür, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Prof. Dr. Göksel KIZIL
Danışman, **Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi**

Prof. Dr. Beran YOKUŞ
İkinci Danışman, **Biyokimya Bölümü, Dicle Üniversitesi**

Sınav Jürisi:

Prof. Dr. Veysel TOLAN (*)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Göksel KIZIL (**)
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. M. Hüseyin ALKAN
Biyokimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Tarık ARAL
Kimya Bölümü, Batman Üniversitesi

Doç. Dr. İsmet MEYDAN
Sağlık Teknikerliği Bölümü, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

ONAY

Savunma Tarihi: 03 / 08 / 2023

(*) Sınav Jürisi kısmının birinci satırına Jüri Başkanının bilgilerini yazınız.
(**) Sınav Jürisi kısmının ikinci satırına Tez Danışmanının bilgilerini yazınız.

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılayıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Ad, Soyad: Feryal Zeliha AKAY

İmza: …….……

TEŞEKKÜR

Çalışmanın fikir aşamasından tamamlanmasına kadar gösterdikleri emek, destek ve kıymetli zamanlarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Göksel Kızıl'a ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Beran Yokuş'a ve değerli hocam Prof. Dr. Murat Kızıl'a teşekkürü bir borç bilirim. Değerli Hocam Prof. Dr. Veysel Tolan'a tez çalışması kapsamında hücre kültürü çalışmalarını araştırma laboratuarlarında gerçekleştirmeme yardımcı olduğu için teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesi için alınan etik kurul raporunun hazırlanmasındaki destekleri için sevgili Prof. Dr. Hatice Öztürkmen Akay ve Prof. Dr. Ali Ferruh Akay'a teşekkürü bir borç bilirim.

Jüri üyelerine tezin nitelikli bir hale gelmesi için yaptıkları eleştiri ve önerileri için teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşım, meslektaşım Dr. Nesrin İnceören'e bilgi paylaşımı, yardımları için teşekkürlerimi sunarım. Çalışmada manevi desteklerini ve değerli bilgilerini esirgemeyen meslektaşlarım, dostlarım Dr. Sevil Emen, Dr. Mehmet Hayrullah Akyıldız, Dr. Hayrettin Dinç, Dr. Feysel Çakmak'a teşekkür ederim. Dr. Cemal Nas hocama sunduğu destek için, değerli hocam Dr. Bircan Çeken Toptancı'ya bilgi paylaşımları için, sevgili annem ve kardeşlerime manevi destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (DÜBAP), bu tez çalışması kapsamında sağladıkları finansal destek (Proje No: DÜBAP 22.004) için teşekkürü bir borç bilirim.

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezine (DÜSAM), laboratuvarlarının kullanılmasına izin vererek destek sundukları için teşekkür ederim.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna verdikleri sertifika için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

ŞEKİLLER LİSTESİ x

EKLER LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ xiii

ÖZET xv

ABSTRACT xvi

1. GİRİŞ 1

1.1 Diyabet Epidemiyolojisi ve Diyabetle İlişkili Komplikasyonlar 1

1.2 Diyabetin Patofizyolojisi 2

1.3 Diyabetik Komplikasyonlarda Biyobelirteçler 3

1.4 Glikasyon 4

1.5 Amadori Ürünleri 7

1.6 Dikarbonil Ürünleri 8

1.7 İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGES) 9

1.7.1 Kısa ömürlü AGE moleküllerinin etkileri 9

1.7.2 Uzun ömürlü AGE moleküllerinin etkileri 9

1.8 AGE'lerin Başlıca Eksojen Kaynakları 11

1.8.1 Diyet 11

1.8.2 Sigara 12

1.9 AGEs Hücresel Etkileşimler 12

1.9.1 Spesifik ve spesifik olmayan AGE reseptör sistemleri 12

1.9.2 AGE reseptör regülasyonu 12

1.9.3 AGE ile modifiye edilmiş moleküllerin uzaklaştırılması için bozunma mekanizmaları 13

1.9.4 AGEs karşıtı stratejiler 14

1.9.5 Polifenoller tarafından AGE'lerin inhibisyonu 15
1.9.6 AGE inhibitörleri 15
1.10 ROS(Reaktif Oksijen Türleri) 18
1.11 Bağışıklık Sistemi 19
1.12 Lenfositler 20
1.13 İmmunoglobulinler 25
1.13.1 İmmunoglobulin G (IgG) 26
1.14 Fruktoz Kaynaklı İmmunoglobulin G (IgG) Glikasyonu 26
1.15 Fruktoz 28
1.16 Oleuropein 29
1.17 Glutatyon 30
1.17.1 Glutatyon transferaz süpergen ailesi 31
1.18 Selenyum 32
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 34
3. MALZEME VE YÖNTEM 38
3.1 Malzeme 38
3.1.2 Kullanılan Aletler 38
3.1.3 Etik Beyan 38
3.2 Yöntem 38
3.2.1 Selenyum, Oleuropein ve Glutatyon karışımını hazırlama 38
3.2.2 DPPH radikali söndürme aktivitesi 39
3.2.3 OH radikali söndürme aktivitesi(deoksiriboz yöntemi) 39
3.2.4 Protein glikasyonu(*in vitro*) 40
3.2.5 Bağlanmamış şekerlerin diyaliz yöntemiyle uzaklaştırılması 40
3.2.6 α-Dikarbonil bileşik tayini 40
3.2.7 Fruktozamine testi 40

3.2.8 Kongo kırmızısı spektral kayma 41
3.2.9 UV-visible spektroskopi 41
3.2.10 Floresan spektroskopi 41
3.2.11 İçsel floresans 42
3.2.12 Agaroz jel elektroforezi(IgG-Fru-DNA Sistemi) 42
3.2.13 İnsan kanından lenfosit hücre izolasyonu (PBL izolasyonu) 42
3.2.14 Fruktoz kaynaklı lenfosit hücre hasarı 43
3.2.15 SDS PAGE 43
3.2.16 Western Blotting yöntemi 43
3.2.17 İstatistiksel analiz 44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 45
4.1 Biyokimyasal Aanliz 45
4.1.1 DPPH radikali söndürme aktivitesi 45
4.1.2 OH radikali söndürme aktivitesi(Deoxyribose Assay) 46
4.1.3 α-Dikarbonil bileşik tayini 47
4.1.4 Fruktozamine 48
4.2 Biyofiziksel Analizler 49
4.2.1 Kongo kırmızısı spektral kayma 49
4.2.2 UV-visible absorbans spektroskopisi(200-400 nm) 52
4.2.3 Floresans spektroskopisi 53
4.2.4 İçsel floresans 54
4.2.5 SDSPAGE 57
4.2.6 Agaroz jel elektroforezi 59
4.2.7 Fruktoz kaynaklı lenfosit hücre hasarı 60
4.2.8 Western Blotting yöntemi 61
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 63
KAYNAKLAR 69

EKLER 86
ÖZGEÇMİŞ 87

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Hemoglobin Proteininin Glikoz İle Glikasyon Reaksiyonu 4
Şekil 1.2 Maillard Reaksiyonu Aracılığıyla AGEs Oluşum Mekanizması..... 6
Şekil 1.3 Strecker Bozulması /Enolizasyon Reaksiyonu 7
Şekil 1.4 Bazı Dikarbonil Ürünlerinin Organik Yapısı..... 8
Şekil 1.5 Bazı İleri Glikasyon Son Ürünlerinin (AGEs) Organik Yapısı 11
Şekil 1.6 İnhibitör Tipleri..... 16
Şekil 1.7 Sentetik AGEs İnhibitörleri 18
Şekil 1.8 Glikasyonun Erken Basamağında Kullanılan AGEs İnhibitörleri 18
Şekil 1.9 Serbest Oksijen Söndürücü Sistem 19
Şekil 1.10 Kök Hücrelerin Kemik İliğinde Olgunlaşarak Farklılaşmaları..... 20
Şekil 1.11 Lenfosit Hücre Alt Grupları..... 21
Şekil 1.12 Kök Hücresinin Farklılaşması 22
Şekil 1.13 T Hücre Fonksiyonu 23
Şekil 1.14 B Hücre Fonksiyonu 24
Şekil 1.15 İmmünoglobulinlerin Yapısı..... 25
Şekil 1.16 İmmünoglobülin G'nin yapısı..... 26
Şekil 1.17 Fruktoz Kaynaklı İmmünoglobulin G Glikasyonu 27
Şekil 1.18 Fruktozun Kimyasal Yapısı 29
Şekil 1.19 Oleuropein'in Kimyasal Yapısı 29
Şekil 1.20 Glutatyonun Kimyasal Yapısı..... 30
Şekil1.21 Glutatyonun Oksidasyonu/Redüksiyonu ve NADPH Sentezine Bağlı Biyolojik Olaylar..... 32
Şekil 3.1 İnsan Kanından Lenfosit hücre izolasyonu..... 43
Şekil 4.1 Karışımın DPPH radikali üzerindeki söndürme etkisi..... 45
Şekil 4.2 Karışımın OH radikali üzerindeki söndürme etkisi. 47
Şekil 4.3 Karışımın farklı konsantrasyonlarının (100–500 µg/ml) 0-28 gün aralığında α-dikarbonil bileşiği üzerindeki etkisi..... 48
Şekil 4.4 Karışımın IgG/fruktoz sistemindeki fruktozamin düzeyi üzerindeki etkileri.. 49
Şekil 4.5 1. hafta, 2. hafta, 3. hafta ve 4. haftadaki doğal IgG, IgG+AG ve IgG+Fru sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları 50

Şekil 4.6 1. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. 50
Şekil 4.7 2. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. 51
Şekil 4.8 3. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları.. 51
Şekil 4.9 4. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. 52
Şekil 4.10 Doğal IgG ve IgG+ Fru 1., 2., 3. ve 4. haftaların UV absorpsiyon spektrumları. 28 gün boyunca fruktoz ile modifiye edilmiş IgG'nin absorpsiyon profilleri, 240–400 nm dalga boyu aralığında tarandı..... 52
Şekil 4.11 Karışım, aminoguanidin'in (9 mM) ve fruktoz ile inkübe edilmiş IgG'de toplam AGE oluşumunun floresan yoğunluğu üzerindeki etkileri. 54
Şekil 4.12 28 günlük inkübasyon süresinde doğal IgG ve IgG+ Fru numunelerinin hafta hafta içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı..... 55
Şekil 4.13 1. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. 55
Şekil 4.14 2. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı……....56
Şekil 4.15 3. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı……....56
Şekil 4.16 4. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı……....57
Şekil 4.17 IgG proteininin fruktoz ile hasarı ve mixin koruyucu etkisinin SDS-PAGE yöntemi ile karakterizasyonu. 59
Şekil 4.18 IgG+Fru, IgG+Fru+mix sisteminin DNA üzerindeki etkisi. 60
Şekil 4.19 Glikasyon sırasında toplam lenfosit hücresinin gelişimi. 61
Şekil 4.20 Western Blotting Yöntemi ile Lenfosit Hücre Karakterizasyonu..... 62

EKLER LİSTESİ

Ek 1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Raporu 87

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	**Açıklama**
μL	Mikrolitre
Mm	Mikrometre
dL	Desilitre
μM	Mikromolar
M	Molar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Nm	Nanometre
nmol	Nanomol

Kısaltma	**Açıklama**
AG	Aminoguanidin
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Sığır Serum Albümin
BSA	Butylated hydroxytoluene
CEL	N-Karboksietil Lisin
CML	N-Karboksimetil Lisin
DG	Deoksiglukozon
3-DG	3-Deoksiglukozon
DNA	Deoxyribonucleic acid
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
Fru	Fruktoz
GO	Glioksal
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione disulfide oxidized
GST	Glutathione S-transferase

GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
HbA1c	Hemoglobin A1c
HPLC	Yüksek Peranslı Sıvı Kromatografisi
IgG	İmmunoglobulin G
MDA	Malondialdehyde
MG	Metilglioksal
Mix	Karışım(gluthatione, oleuropein, selenium)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
PBL	Peripheral blood lymphocytes
RAGE	İleri Glikasyon Son Ürünleri için Reseptör
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TCA	Trichloroacetic acid
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-α

ÖZET

İNSAN İMMÜNOGLOBULİN G'NİN GLİKASYONU VE ANTİJEN BAĞLANMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Akay, Feryal Zeliha
Doktora, Kimya Bölümü
Danışman: Prof. Dr. Göksel Kızıl
İkinci Danışman: Prof. Dr. Beran Yokuş
Ağustos 2023, 105 sayfa

Beslenme yönteminin yaşam kalitesini etkilediği bilinen bir gerçektir. Beslenmenin yaşlanmada veya yaşlanmaya bağlı hastalıkların tedavisinde olduğu gibi bağışıklık sistemi elemanları için de gözardı edilemeyecek bir unsurdur. Diyabette hiperglisemik durum, çeşitli plazma proteinlerinin glikasyonunu arttırmaktadır. Çalışmada, antioksidan özellikleri olduğu bilinen glutatyon oleuropein ve selenyumdan vücudun günlük ihtiyacı olan doza göre bir karışım (mix) hazırlandı. Bu hazırlanan karışımın serbest radikal söndürme sistemi üzerindeki etkisini incelemek için DPPH ve OH radikali söndürme aktiviteleri tespit edildi. Bağışıklık sistemi elemanlarından biri olan ticari insan İmmunuglobulin G proteni fruktoz ile hasara uğratıldı. Hasara uğratılan protein, karışım ile 28 günlük inkübasyona bırakıldı. Protein glikasyon çalışmasında; IgG/fruktoz/mix sisteminde, 0, 7, 14, 21. ve 28. günlerde alınan örneklere bağlanmamış şekerleri uzaklaştırmak için diyaliz yöntemiyle kullanıldı. Protein örneklerindeki fruktoz kaynaklı hasarı ve karışımın etkisini karakterize edebilmek için; α-Dikarbonil Bileşik Tayini, Fruktozamine Testi, Kongo kırmızısı spektral kayma, UV-Visible Spektroskopi, Floresan Spektroskopi, İçsel Floresans ve SDS PAGE yöntemleri kullanıldı. Yapılan biyokimyasal ve biyofiziksel çalışmaların ışığında; fruktozun IgG proteininin yapısını bozduğu ve karışımın ise IgG glikasyonu üzerindeki koruyucu etkisi tespit edildi. Sonraki aşamada ise (18-35 yaş, sağlıklı) gönüllülerden alınan kann örneklerinden izole edilen lenfosit hücrelerinde kültür ortamında fruktozun ve karışımın etkisi incelendi. Fruktozun lenfosit hücre ölümüne neden olduğu gözlendi. Bu dikkat çekici artışın nedeni selenyum oleuropein ve glutatyonun serbest radikalleri parçalaması, antioksidan etkiye sahip olması, bazı enzimleri aktive ederek toksinleri inhibe etmesi ve hücre içinde çeşitli yolları aktive ederek vitamin metabolizmasını desteklemesi olabilir.Bu çalışma, diyet AGE'lerinin lenfosit hücre döngüsü üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Diyet AGE'lerini temel otoimmün/enflamatuvarda incelemek, onun hastalıklardaki rolünü araştırmak ve daha geniş ölçekli çalışmalar yapmak için öncü bir çalışma olmuştur.
Sonuç olarak fruktozun bağışıklık sisteminde önemli bir role sahip olduğu ve hazırlanan karışımın bağışıklık sistemi proteinlerinden IgG'yi koruyucu bir ajan olduğu önerilebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bağışıklık, Tip II Diyabet, Fruktoz, İnsan İmmunoglobulin G, Glikasyon, AGEs

ABSTRACT

HUMAN IMMUNOGLOBULIN G GLICATION AND ITS EFFECT ON ANTIGEN BINDING

Akay, Feryal Zeliha
Doctor of Philosophy in Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Göksel Kızıl
Co-Supervisor: Prof. Dr. Beran Yokuş
August 2023, 105 pages

It is a known fact that nutrition method affects quality of life. Nutrition is an element that cannot be ignored for immune system elements, as in the treatment of aging/aging-related diseases. One of the main causes of obesity common in the world is fructose/glucose (corn) syrup. The study was structured in two stages. A mixture was prepared from glutathione oleuropein and selenium, which are known to have antioxidant properties, according to the daily requirement of the body. In order to determine the effect of this prepared mix on the free radical quenching system, DPPH and OH radical quenching activities were determined. The commercial human IgG protein, one of the immune system elements, was damaged by fructose. The damaged protein was incubated with the mix for 28 days. In the protein glycation study; It was used by dialysis method to remove unbound sugars from the samples taken on days 0, 7, 14, 21 and 28 in IgG/fructose/mix system. To characterize fructose-induced damage and mixin effect in protein samples; Determination of α-Dicarbonyl Compound, Fructosamine Test, Congo red spectral shift, UV-Visible Spectroscopy, Fluorescent Spectroscopy, Intrinsic Fluorescence and SDS PAGE methods were used. In the light of biochemical and biophysical studies; It was determined that fructose disrupted the structure of IgG protein and the protective effect of the mixture on IgG glycation. In the second stage, the effects of fructose and mixin in culture medium were investigated in lymphocyte cells isolated from blood from volunteers (18-35 years old, healthy). It was observed that fructose caused lymphocyte cell death. Chemical modifications resulting from its glycation, reactive carbonyl formation and amino acid oxidation were detected by cell death. It was observed with the increase in the number of cells that glutathione, selenium and oleuropein, which are soldiers of the free radical defense system, maintain the current healthy state of the cell. The reason for this remarkable increase may be that selenium oleuropein and glutathione break down free radicals, have antioxidant effects, inhibit toxins by activating some enzymes, and support vitamin metabolism by activating various pathways in the cell. This study suggests that dietary AGEs may have a significant effect on the lymphocyte cell cycle. It has been a pioneering study to examine dietary AGEs in the main autoimmune/inflammatory, to investigate its role in diseases and to conduct larger-scale studies. As a result, it was determined that fructose has an important role in the immune system and the prepared mixture is a protective agent for IgG, one of the immune system protein.

Keywords: Immunity, Type II Diabetes, Fructose, Immunoglobulin G, Glycation, AGEs

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), tarihte MÖ 3000'den beri gözlemlenen en önemli metabolik sorunlardan biri olmakla birlikte sağlık ve ekonomi üzerinde yıkıcı bir etkiye sahiptir (Dall ve diğerleri, 2014).

Enfeksiyona karşı zayıflamış direnç, diyabet ile ilişkilendirilmiştir. Bağışıklık sistemi üzerinde direkt etkisi olan viral ajanların(COVID-19 gibi) ve diabetes mellitusun patogenezinin paralel analizi, inflamasyonun ana sinyal yollarının kritik noktalarına müdahale yoluyla kontrol edilmesi için yeni terapötik yaklaşımlar sağlayabileceği önerilmiştir.

Diyabetiklerin enfeksiyonlara karşı artan duyarlılığı mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, fakat humoral bağışıklığa katkıda bulunan potansiyel adaylar arasında immünoglobülinler bulunduğu bilinmektedir. Diyabet hastalarının kanında IgG, IgM, IgA'nın glike olduğu kanıt olarak gösterilmektedir. İmmünoglobulinler *in vitro* koşullar altında kolaylıkla diyabetik sirkülasyonu taklit edebilir. IgG'nin diyabetik sirkülasyonda uzun kalması ve immün korumada baskın olması nedeniyle diğer İmmünoglobülinlere kıyasla IgG'nin glikasyonu daha fazla ilgi görmüştür. Ek olarak, IgG'ler lizin açısından zengindir ve bu durum onları yüksek potansiyelli protein glikasyon hedefleri haline getirir. Aslında her bir immünglobulin spesifik bir antijenik bölgeye bağlanır. Antikorlar tarafından antijen bağlama, antikorların primer fonksiyonudur ve konak savunmasına yarar. Genellikle bir antikorun antijenle bağlanması direkt bir biyolojik etkiye sebep olmaz. Aksine, biyolojik etkiler antikorun sekonder efektör fonksiyonlarının bir sonucudur. İmmünglobulinler çeşitli efektör fonksiyonlara aracılık eder. Genellikle belirli bir efektör fonksiyonu gerçekleştirmesi için antikorun antijenine bağlanması gerekir.

1.1 Diyabet Epidemiyolojisi ve Diyabetle İlişkili Komplikasyonlar

Diyabet vücuttaki birçok farklı organ sistemlerini etkileyebilir ve zamanla ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Diyabet komplikasyonları mikrovasküler veya makrovasküler olarak sınıflandırılabilir. Mikrovasküler komplikasyonlar arasında sinir sistemi hasarı (nöropati), böbrek sistemi hasarı (nefropati) ve göz hasarı (retinopati) yer alır. Makrovasküler komplikasyonlar arasında kardiyovasküler hastalık, inme ve periferik vasküler hastalıklar yer alır. Periferik damar hastalığı

morluklara veya yaralanmalara neden olabilir. İyileşmez ise kangren ve nihayetinde amputasyona neden olur (Amerikan Diyabet Derneği, 2014).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2005 yılında, 20 milyondan fazla insanın diyabet olduğu, yaklaşık %30'unun teşhis edilmemiş vakalar olduğu tahmin ediliyor. Öncelikle yaş, etnik köken, ailede diyabet öyküsü, sigara, obezite ve fiziksel hareketsizlik diyabet için artan risk faktörleridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2050 yılında diyabet teşhisi konulacak insane sayısının 48,3 milyona çıkacağı tahmin ediliyor.

Diyabetik riskli bireylerde yapılan randomize kontrollü çalışmalardan elde edilen sonuçlar, yoğun yaşam tarzının düzenlenmesi, kan şekeri düzeylerine, kan basıncına ve kan lipit seviyelerine müdahaleler diyabetin başlamasını önleyebileceğini veya geciktirebileceğini göstermiştir. Diyabet komplikasyonlarının bireyler ve sağlık sistemi üzerindeki ekonomik etkisini azaltmak, hem bireyde hem de popülasyonda etkili müdahaleler diyabet salgınını yavaşlatmak için gereklidir.

1.2 Diyabetin Patofizyolojisi

Diabetes mellitus, vücudun insülin üretememesi veya insülin etkisine direnç göstermesi veya her ikisinden de kaynaklanan kan şekeri seviyesi ile ilgili kronik metabolik bir durumdur. Klinik olarak farklı 4 türe ayrılır:

- Tip 1 insülin eksikliği ile pankreas beta hücre yıkımından kaynaklanan otoimmün rahatsızlık.
- Tip 2 insülinin etkisine karşı anormal artmış bir direnç var ve vücut bunun üstesinden gelmek için yeterli insulin üretemez
- Gestasyonel diyabet, hamilelik sırasında glukoz intoleransı oluşur
- Pankreas hastalıkları, insülin yetersizliği ve laçlar veya kimyasalların neden olduğu belirli genetik kusurlar sonucunda oluşan beta hücre fonksiyonu bozuklığu

Tip 1 diyabet tüm diyabet vakalarının %5 ile %10'unu kapsar. Otoimmün hastalıklar, genetik ve çevresel faktörler sonucu oluşur.

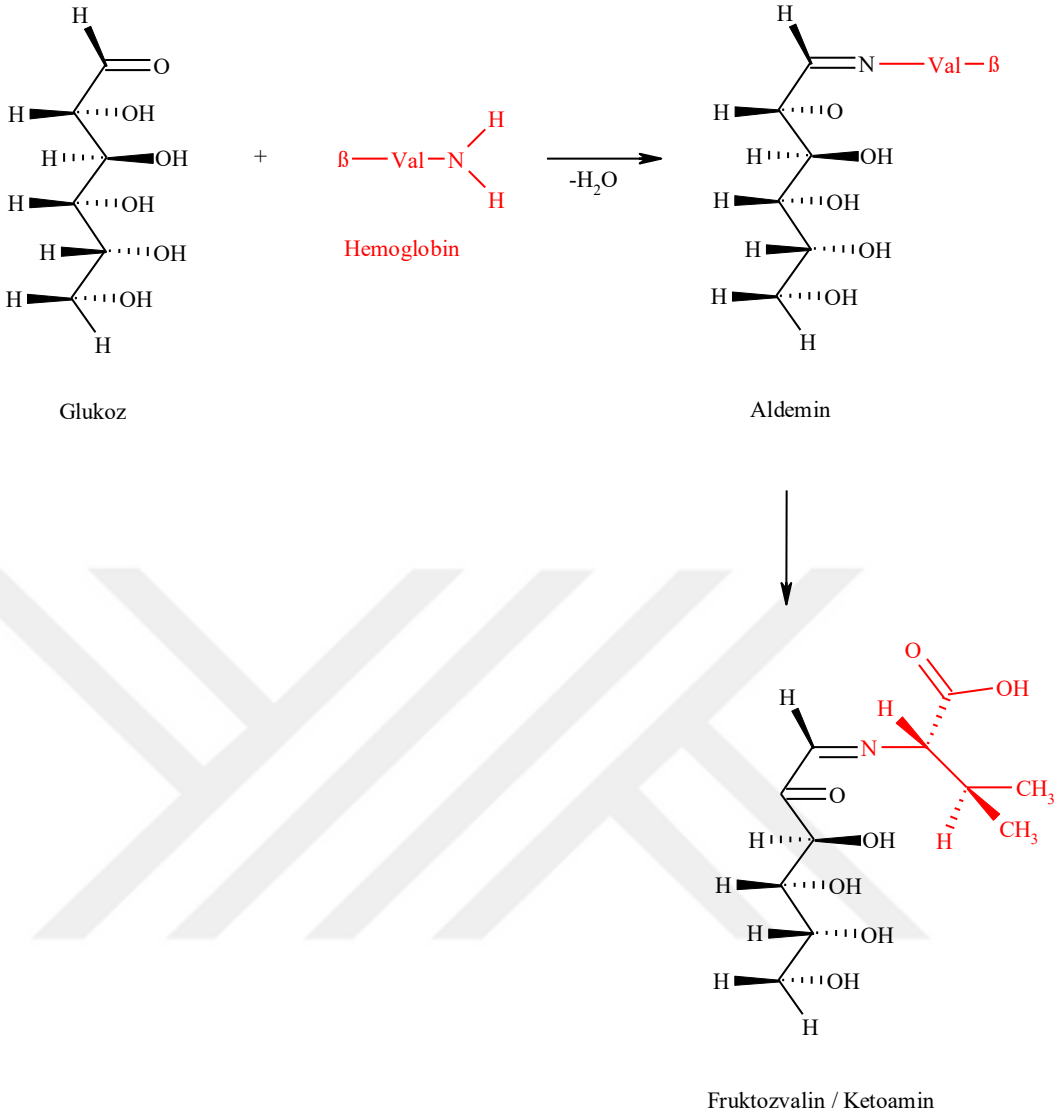
Tip 2 diyabet tüm diyabetin %90 ila %95'ini oluşturur. Diyabet genellikle insülin direnci olarak başlar ve vücut yeterli insülin üretemiyorsa pankreas direnci azaltmak için insülin üretimini azaltabilir veya sonunda üretmeyi durdurabilir.

İleri yaşta gebe olan, daha önceki bir gebelikte gestasyonel diyabet geçirmiş olanlar, obez, diyabetik aile öyküsü olan kadınlar daha yüksek risk altındadır. Bu kadınların sağlıklı bireylere oranla hayatlarının devamında diyabet olma riski %20-%50 arasında artabilir (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri Raporu, 2005).

Prediyabet tanı kriterlerini karşılamaz fakat diyabetik kişilerde öncü bir durumdur, Yüksek kan şekeri seviyesinde ortaya çıkabilir. Prediyabetli insanlar bozulmuş açlık glukozuna, bozulmuş glikoz toleransına veya her ikisine de sahip olabilir. ABD'de 1988'den 1994'e kadar yapılan araştırmada 40 ila 74 yaş arası yetişkinlerin yaklaşık olarak %25'ı prediyabet olarak sınıflandırılmıştır. 2000 yılı için bu sayı 12 milyon olarak güncellenmiştir (Benjamin S.M. ve vd., 2003).

1.3 Diyabetik Komplikasyonlarda Biyobelirteçler

Son yıllarda diyabetik komplikasyonların tedavisi, yeni biyobelirteçlerin keşfi için büyük çaba sarf edilmektedir. DM'nin kökeni, teşhisi ve tedavisi için reaktif değil önleyici tedavilerin kullanılması DM ile mücadelede önemli bir basamaktır. Glikoz 1962'den itibaren hiperglisemi için biyobelirteç olarak kabul edilir. Ayrıca, şeker hastalarının kesinliğinin belirlenmesi için glikoz ölçümü farklı kategorilere ayrılmıştır. Kan, idrar ve tükürük gibi matrislerde glikoz ölçümü için Açlık Plazma Glikozu (FPG), 2-h Plazma gibi testler, Glikoz (2hPG), Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT), Rastgele Plazma Glikoz testi (RPG), Glycated Hemoglobin (HbA1C) çeşitli yöntemler geliştirmeye odaklanılmıştır (Liu ve vd.,2018) (Şekil 1.1).



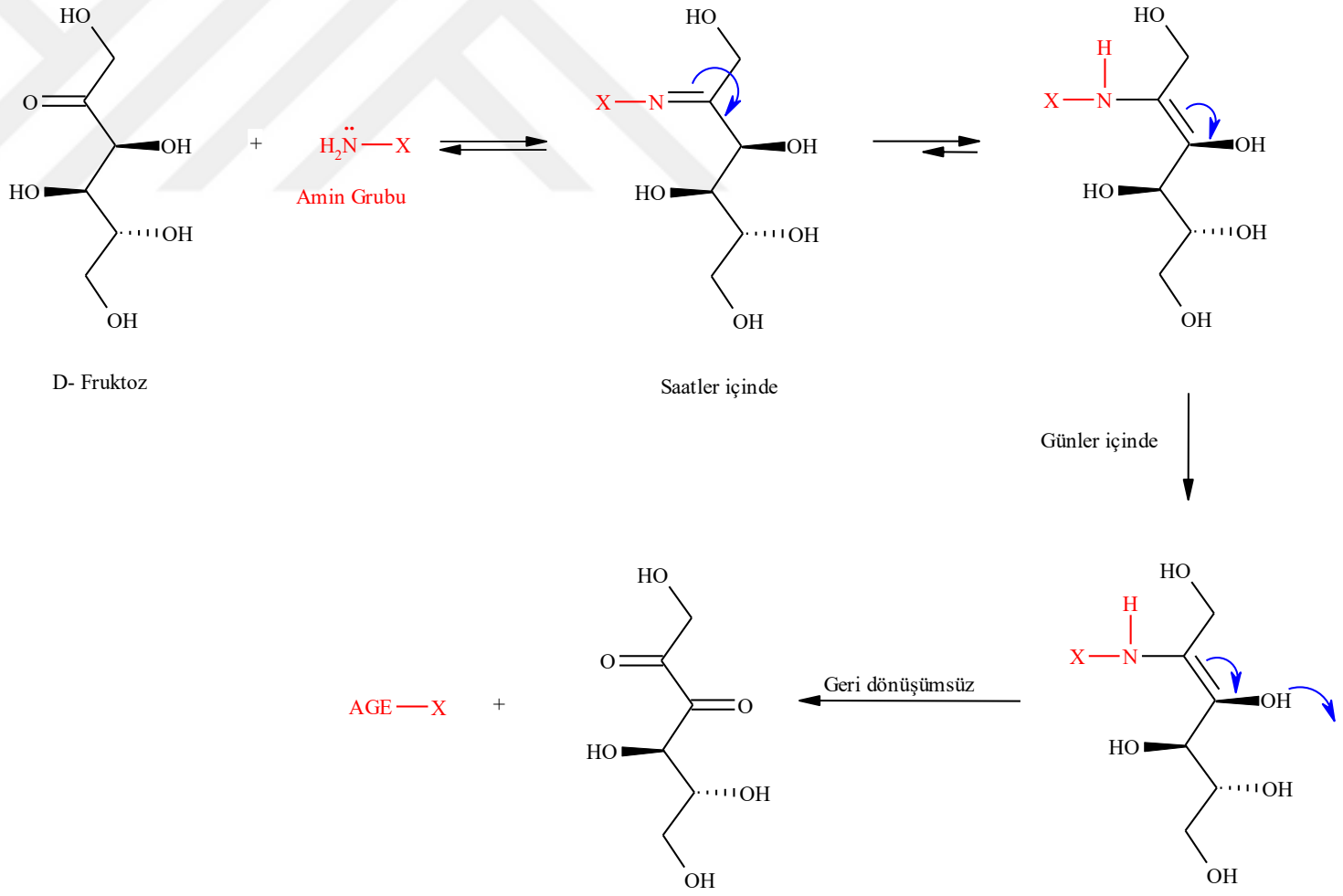
Şekil 1.1 Hemoglobin Proteininin Glikoz ile Glikasyon Reaksiyonu

Ayrıca, araştırmacılar, glutamik asit dekarboksilaz otoantikorları (GADA), insülin otoantikorları (IAA), insülinoma ile ilişkili 2-otoantikorlar (IA-2A), adacık hücresi sitoplazmik otoantikorlar (ICA), C-peptid, Metilglioksal (MG), (Beisswenger, 2014), lipid metabolomikleri, palmitoleat (Roberts ve vd., 2014) (Bingley, 2010; Bonifacio,2015; Regnell ve Lernmark, 2017; Wasserfall ve Atkinson, 2006), gibi alternatif biyobelirteçler üzerinde çalışmıştırlar.

1.4 Glikasyon

Hiperglisemiye uzun süre maruz kalma, diyabetik komplikasyonların çoğunda birincil nedensel faktör olarak kabul edilmektedir (Pirart, 1977; Nathan ve vd., 1993). Aslında, glikozun hücre işlevi üzerinde çok çeşitli geçici ve geri döndürülebilir etkileri (Ruderman ve vd., 1992; King ve vd.; 1996) olduğu kadar geri

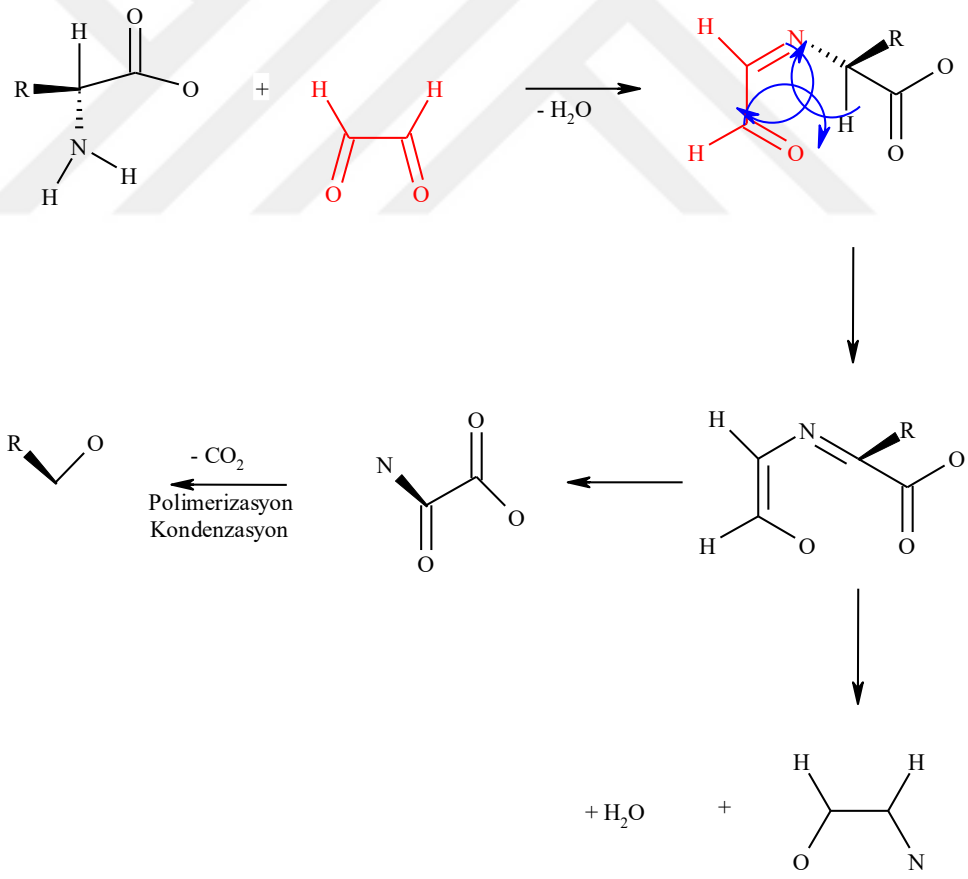
döndürülemez ve ilerleyici, kümülatif işlev bozukluğuna neden olabilen etkileri de vardır (Engerman ve vd., 1987). Bu, diyabetik komplikasyonların gelişmesinde ve ilerlemesinde akut değil kalıcı metabolik değişikliklerin çok önemli olduğunu düşündürür. Hipergliseminin doğrudan bir sonucu olarak ortaya çıkan geri dönüşü olmayan değişiklikler arasında, Maillard reaksiyonu yoluyla ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) oluşumu yer alır. AGE'lerin bir dizi kimyasal, hücresel ve dokusal etkisi vardır ve sadece diyabetik komplikasyonların değil, aynı zamanda yaşlanmayla ilişkili yaygın değişikliklerin aracıları olarak işlev görürler (Vlassara ve vd., 2002). Glikasyon, DNA, lipid ve proteinlerin N-terminal amino asitlerinin α amino grubu ile karbonil grubu şekerler ve türevleri arasında gerçekleşen enzimatik olmayan reaksiyonlardır (Munch ve vd., 1999). Saatler içinde geri dönüşümlü olarak Schiff bazlarını oluşturur. Günler içinde geri dönüşüm miktarı az olan amadori ürünleri ve dikarbonil ürünleri oluşur. Haftalar/aylar sonunda geri dönüşümsüz olan ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) oluşur (Şekil1.2).



Şekil 1.2 Maillard Reaksiyonu Aracılığıyla AGEs Oluşum Mekanizması

1.5 Amadori Ürünleri

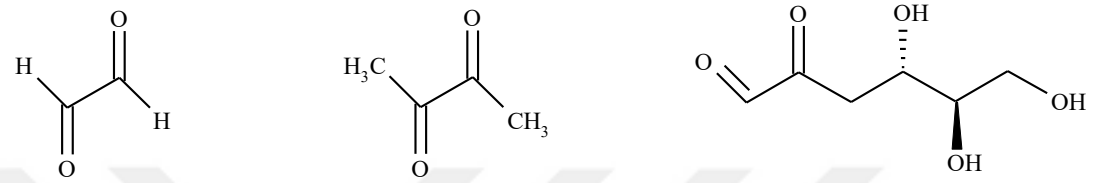
Proteinlerin şeker varlığında ısıtılması veya daha uzun süre saklanması, Maillard reaksiyonunun ilk aşamalarında amino asit şeker komplekslerinin (Amadori veya Heyns bileşikleri) oluşmasına neden olur. Proteinlerde, amino grupları bağlı peptit tarafından korunur ancak serbest amino grupları ve özellikle lizinin ε-amino grubu oldukça reaktiftir. Bu nedenle, glikoz, fruktoz, galaktoz, maltoz veya laktoz varlığında, ε-fruktoselisin, ε-maltuloselizin ve laktuloselizin formu oluşur. Galaktoz ve fruktoz ile sırasıyla ε-tagatoselysine ve ε-glucoselysine oluşur. Serbest amino asitler ve aldozlar veya ketozlar içeren ısıtılmış gıda maddelerinde veya parenteral veya enteral beslenme solüsyonlarında, diğer fruktoz- veya glukoz-amino asitler bulunabilir. Amino asit takviyesi, metionin veya bazı gıdalardaki sindirim öncesi tedaviler, diğer şeker-amino asitlerin oluşumunu artırabilir(Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Strecker Bozulması /Enolizasyon Reaksiyonu

1.6 Dikarbonil Ürünleri

Metilglioksal (MG), biyolojik olarak önemli bir diyabet belirtecidir ayrıca hipertansiyon, nöropati, nefropati, oksidatif stres gibi çeşitli metabolik düzensizliklere neden olur. Ayrıca MG, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) baskın bir öncüsüdür ve protein disfonksiyonu, vasküler dokuların glikasyonu ve yaşlanmaya neden olur (Bhat ve vd. 2019). Glioksal ile metilglioksal lipidlerin peroksidasyonu ile de oluşabilir (Şekil 1.4).



Glioksal Metilglioksal 3-Deoksiglukazon

Şekil 1.4 Bazı Dikarbonil Ürünlerinin Organik Yapısı

MG'nin sentezi, karakterizasyonu ve kimyasal etkileşimleri 19. yüzyılın son yirmi yılından itibaren bilim insanları arasında ilgi görmüştür (Baumann, 1885; Witt ve vd., 1987).

MG, canlı organizmalarda (Vander Jagt ve Hunsaker, 2003) glikoliz sürecinde bir ara ürün olarak üretilen (Kalapos,2008; Thornalley, 1996) elektrofilik bir α, β-dikarbonil bileşiğidir (Desai ve vd., 2010).

MG'ın aktif işlevsellikle güçlü etkileşimi proteinlerdeki arginin gruplarının yüksek derecede reaktif doğasını etkiler ve glikoliz işlemi sırasında lizin grupları ile glikozdan daha hızlı reaksiyona girer (Thornalley ve Rabbani, 2011).

Diyabet teşhisi için AGE'lerin oluşum yolağında, MG'nin oluşum mekanizmalarını tespit etmek AGEs tespitinden daha önemlidir. Eşzamanlı olarak, beslenme yöntemi, yaşam tarzı MG'nin aşırı üretimini tetikler. Bu fiziksel ve kimyasal şartlar hiperglisemi sırasında hücrelerin içindeki ve dışındaki MG konsantrasyonunu önemli ölçüde artırır.

Spesifik olarak, MG ve AGE üretimi hiperglisemik koşullarda 2-4 kat artar (Rabbani ve Thornalley, 2014). Normal koşullarda MG glioksalaz(GLO I ve GLO II enzimler) sistemiyle detoksifiye edilebilir.

1.7 İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGES)

1.7.1 Kısa ömürlü AGE moleküllerinin etkileri

İleri glikasyon son ürün oluşumunun, makromoleküler yapı ve işlev üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Yakın zamana kadar, AGE oluşumunun öncelikle uzun ömürlü hücre dışı proteinleri içerdiği ve zamanın bir fonksiyonu olarak meydana geldiği, dolayısıyla bir moleküler yaşlanma biçimini temsil ettiği düşünülüyordu. AGE'lerin dolaşımdaki plazma proteinleri ve lipidler dahil olmak üzere kısa ömürlü moleküllerde de ortaya çıktığı ve seviyelerinin diyabetik hastalarda önemli ölçüde yükseldiği artık açıktır (Makita ve vd., 1991; Mallipattu ve vd., 2012). Ayrıca sitoplazmik proteinler ve nükleik asitler üzerinde hızla oluşabildikleri de bilinmektedir. Gerçekten de hücre içi AGE'lerin yüksek (30 mMM) glukoz koşullarında 14 kata kadar daha hızlı oluşabileceği gösterilmiştir (Giardino ve vd., 1994). Kısa ömürlü moleküllerin bu tür AGE modifikasyonunun, proteinlerin ve lipitlerin oksidasyonunu içerdiği, moleküler yapıyı bozduğu, enzimatik aktiviteyi değiştirdiği, parçalama kapasitesini azalttığı ve reseptörler tarafından anormal tanıma neden olduğu bilinmektedir (Watkins ve vd., 1985; Tsilibary ve vd., 1988; Vitck ve vd., 1994). Fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin gibi belirli fosfolipitlerde amino gruplarının varlığı, glikozun AGE'leri oluşturmak için lipid aminlerle reaksiyona girebileceği uygun alanlar sağlar. Önemli ölçüde, LDL oksidasyonu AGE±LDL'nin oluşumunu takip ederken, her ikisi de glikoz konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak meydana gelir ve AGE inhibitörü aminoguanidin varlığında inhibe edilir. Bu nedenle, lipidlerle serbest amin-glikoz etkileşimlerinin, yağ asidi glikasyonuna ve oksidasyon ürünlerine yol açan *in vivo* doğal olduğu açıktır. Glikasyon sırasında, yağ asidi kalıntıları geçiş metallerinden veya eksojen serbest radikal üreten sistemlerden bağımsız olarak oksitlenebilir (Bucala ve vd., 1993).

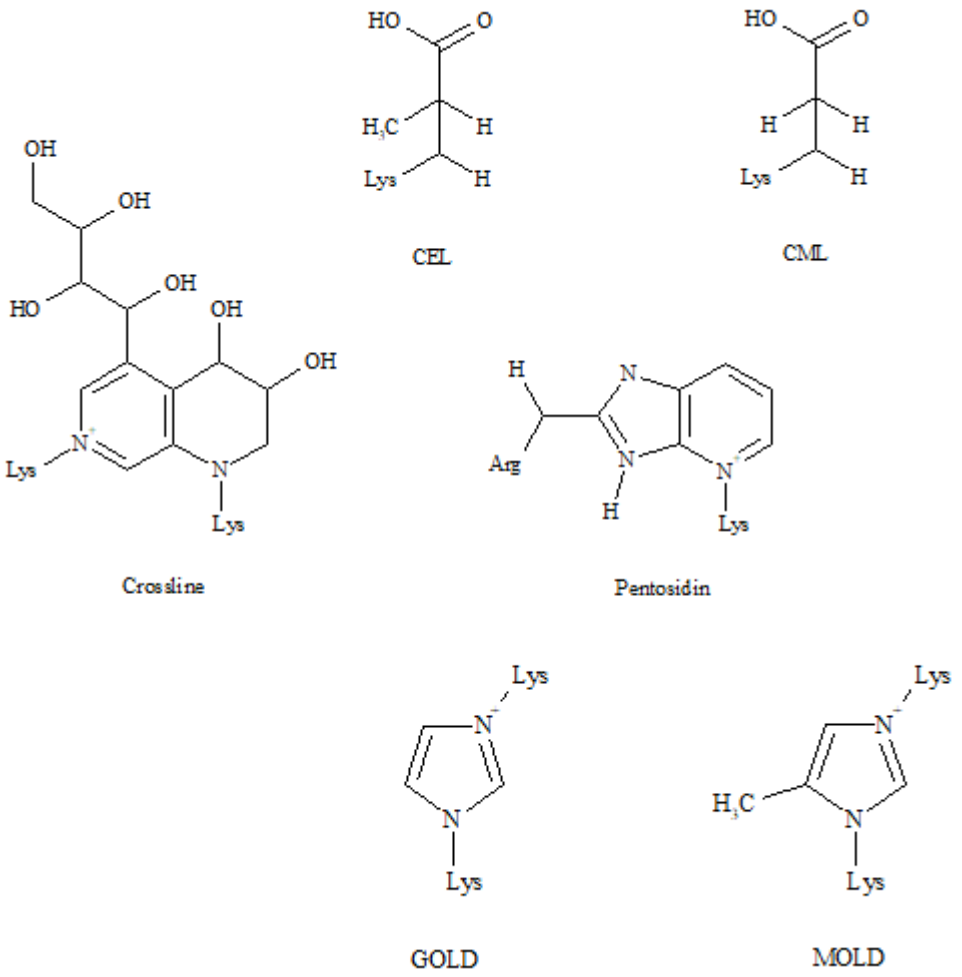
İleri glikasyon son ürünleri sağlıklı bireylerde de mevcuttur, bunların saptanması ve miktarının belirlenmesi, potansiyel biyobelirteçler olarak kullanım için büyük önem taşımaktadır.

1.7.2 Uzun ömürlü AGE moleküllerinin etkileri

AGE'lerin oluşum hızı, birinci dereceden kinetik tarafından tahmin edilenin üzerindedir. Bu, zaman içinde en hafif hipergliseminin bile uzun ömürlü makromoleküller üzerinde önemli ölçüde AGE birikimine yol açabileceği anlamına

gelir (Stitt ve vd., 1997; Sell ve vd., 1990; Monnier ve vd., 1987). Bu durum göz merceğindeki gibi bazı uzun ömürlü proteinlerde iyi bir şekilde gösterilmiştir. Örneğin, lens kristallerinin glikozdan türetilen AGE'ler tarafından progresif post-translasyonel modifikasyonu, diyabetin seyri sırasında ortaya çıkan erken lentiküler esmerleşmeyi ve kümülatif çapraz bağlanmayı açıklar (Kohn ve vd., 1984; Harding ve vd., 1984; Stevens ve vd., 1978). Bu durum diyabette olduğu kadar yaşlanma sırasında da lentiküler opaklaşmanın ve katarakt oluşumunun önemli bir oranından sorumludur. Bu değişiklikler, yüksek glukoz konsantrasyonlarının varlığında ex vivo olarak yeniden üretilebilir ve AGE inhibitörü aminoguanidin varlığında etkili bir şekilde önlenebilir (Mtusumato ve vd., 1997; Stit ve vd., 1998). Vücutta en uzun ömürlü olan hücre dışı matrisi (ECM) ve vasküler bazal membranları (BM) oluşturan proteinler, AGE modifikasyonuna karşı oldukça hassastır. İşlevsel olarak BM'deki AGE aracılı çapraz bağların çözünürlüğün azalmasına ve enzimatik sindirimin azalmasına neden olduğu bilinmektedir. AGE'nin vasküler BM üzerindeki mevcudiyeti, özellikle AGE'lerin hızlı bir şekilde birikmesine sahip olan diyabetiklerde korkunç patolojik sonuçlara sahip olabilir (Charonis ve vd., 1992; Knecth ve vd., 1987; Paul ve ark 1996).

İleri glikasyon son ürün tespiti için mevcut yöntemler sınırlıdır ve yalnızca toplam glikasyonu ölçer (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Bazı İleri Glikasyon Son Ürünlerinin (AGEs) Organik Yapısı

1.8 AGE'lerin Başlıca Eksojen Kaynakları

1.8.1 Diyet

Son araştırmalar, biyolojik sistemlere diyet ve sigara içme gibi dış kaynaklardan getirilen AGE'lerin hastalık mekanizmaları üzerinde önemli etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Diyet, karbonhidratlar ve yağlar açısından zengin olanlar gibi karmaşık gıdalarda en yüksek içeriğe sahip eksojen AGE'nin ana kaynağıdır. AGE oluşumu, ısıya maruz kalma ile artar; bu nedenle, pişirirken yiyeceklerin esmerleşmesinden sorumlu olan AGE içeriği, pişirme sıcaklığı ve süresiyle birlikte artar. Metilglioksal (MG) ve karboksimetillizin (CML) dahil olmak üzere diyetteki AGE'lerin uzun süredir bilinmesine rağmen, potansiyel toksinler olarak önemleri, emilimleri kadar takdir edilmemiştir (Sgarbieri ve vd., 1973; Koschinsky ve vd., 1997).

1.8.2 Sigara

Tütün yaprakları kurutulurken, yapılan işleme kür adı verilir, Maillard reaksiyon kaskadı glikasyonlu ve oksitlenmiş türevlerin oluşumuna yol açar. Yanma üzerine, reaktif AGE türleri buharlaşır. "Glikotoksinler" olarak da adlandırılan bu türler solunur, akciğerlerde hasara neden olur. Bu durum sigara içenlerde toplam serum AGE ve AGE-apoprotein B düzeylerinin sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede yüksek bulunması gerçeğine yansımıştır. Ayrıca, sigara içenlerin ve özellikle diyabetik sigara içenlerin arterlerinde ve oküler lenslerinde yüksek AGE seviyeleri olduğu tespit edilmiştir (Cerami ve vd., 1997; Nichole ve vd., 1998).

1.9 AGEs Hücresel Etkileşimler

1.9.1 Spesifik ve spesifik olmayan AGE reseptör sistemleri

AGE araştırmalarının başlarında, in vivo olarak AGE ürünlerinin dokulardan çıkarılabileceği ve böylece zararlı etkilerini sınırlayabileceği doğal bir reseptör tabanlı sistemin var olduğu tahmin ediliyordu. Son 15 yılda yürütülen çalışmalar, AGE ile ilişkili biyolojide olduğu kadar diyabet ve yaşlanma komplikasyonları ile ilişkili patolojide de önemli bir rol oynadığı görülen karmaşık bir AGE reseptör sisteminin tanınmasına yol açmıştır (Vlassara ve vd., 1994). Başlangıçta, AGE ile modifiye edilmiş proteinlerin, daha önce tarif edilen çöpçü reseptör sistemleriyle ilişkisi olmayan spesifik reseptörler tarafından tanındığı gösterilmiştir (Vlassara ve vd.,1986). Son yıllarda birkaç AGE bağlayıcı molekül tanımlanmıştır. Bunlar AGE bağlayıcı reseptör (RAGE) olarak adlandırılır. İmmünoglobulin üst ailesinin bir multiligand üyesi olan RAGE, AGE endositozu ve döngüsünde hücre içi sinyal ileten veya proinflamatuvar bir peptit olarak giderek daha fazla görülmektedir. Bu bağlamda RAGE, oksidan-stres indükleyen sinyal molekülleri veya kofaktörler ailesinde daha doğru bir şekilde sınıflandırılabilir (Mackic ve vd. 1998).

1.9.2 AGE reseptör regülasyonu

AGE-reseptör sisteminin farklı aktivitelerinin diyabetik faktörler tarafından modüle edildiği rapor edilmiştir. AGE-reseptör modülasyonunu değerlendirmek için sıklıkla hücre aktivasyonunun parametrelerine odaklanmıştır (Stitt ve vd., 1997; Vlassara ve vd., 1988; Vlassara ve vd., 1989). Makrofajlar tarafından sitokin üretiminde uyarılmış ileri glikasyon son ürünü, bunun reseptör ekspresyonu ve endositik aktivite üzerindeki oto-düzenleyici etkisi, çoğunlukla bilinen bir sistem kavramını genişleten

orijinal gözlemler arasındadır. İlk bulgulardan bu yana, hücre içi oksidan stres sensörlerini ve yapısal/mekanik doku fonksiyonlarına verilen inflamatuvar tepkileri birbirine bağlayan çok daha karmaşık biyoaktif mekanizmalar ortaya çıkmıştır. Bunların tümü, vücuttaki çeşitli kronik durumların yanı sıra erken gelişim ve büyümede etkileri vardır. AGE-reseptör up-regülasyonu ve hücresel aktivasyon arasındaki bağlantı, şu anda tanımlanan bir dizi reseptör bileşeni için doğrulanmıştır. Bununla birlikte, hücre aktivasyonu, reseptör olmayan yollarla veya ROS oluşumuna ve oksidan strese yol açan hücre içi üretilen glikoksidan türevleri tarafından meydana gelebilir (Radoff ve vd., 1988). Hücre aktivasyonu, diğer metabolitlerin yanı sıra tümü yüksek AGE ile ilişkili olan hiperlipidemi, üremi, amiloidoz ve Alzheimer hastalığı gibi sistemik hastalıklarda da indüklenir. Bu durum alıcının rolünü tanımlamayı zorlaştırır. Reseptöre bağımlı AGE endositozu ve katabolizmin düzenlenmesi hakkında çok daha az şey bilinmektedir. Büyük ölçüde AGE-ligandlarının pleio-morfik ve genellikle kararsız doğasına atfedilebilir. Diyabetik veya yaşlanan hayvanlardan ve insanlardan alınan hücrelerde reseptöre bağımlı AGE bozunmasının arttığını veya baskılandığını öne sürmüştür (Stitt ve vd., 2000; Pugliese ve vd., 2001).

1.9.3 AGE ile modifiye edilmiş moleküllerin uzaklaştırılması için bozunma mekanizmaları

Endojen AGE oluşumu kan glukoz seviyelerinin düşürülmesi ve çeşitli doğal antioksidan sistemlerin yardımıyla hafifletilebilse de, AGE'ler sonunda uzun ömürlü makro moleküller üzerinde birikir. Mevcut AGE çapraz bağlarının doku bileşenlerinden uzaklaştırılması, büyük ölçüde hücre dışı proteoliz yoluyla ve AGE'ye özgü olan veya olmayan, çöpçü, reseptörler yardımı ile olur (Gardiner ve vd., 1995; Stitt ve vd., 1995; Vlassara ve vd., 1997). Vasküler endotelyum veya mesangium gibi mezenkimal hücrelerin de AGE inhibisyonunda önemli bir rol oynayabileceği açık hale gelmektedir. Genel olarak, AGE ile modifiye edilmiş moleküller, hücre yüzeyi reseptörü aracılı dendositoz tarafından tanınır ve içselleştirilir, hücre içinde parçalanır ve ardından "ikinci nesil AGE'ler" olarak bilinen düşük moleküler ağırlıklı AGE'ler olarak salınır. Bu ikinci nesil AGE'ler, yüksek çapraz bağlama veya oksidatif reaktiviteye sahip reaktif ara maddeler

içerirken, etkileri renal atılımla sınırlanabilir (Miyata ve vd., 1993; Miyata ve vd., 1994; Dolhofer ve vd., 1997).

Reaktif AGE ara maddelerinin birikimini sınırlamak için hücre içi koruyucu sistemlerin var olduğu da açık hale gelmektedir. Böyle bir sistem, bir kofaktör olarak indirgenmiş glutatyon kullanarak reaktif dikarbonil MG'yi laktoilglutatyona metabolize edebilen parçalayıcı glioksalaz enzimlerini içerir (Shinohara ve vd., 1998).

1.9.4 AGEs karşıtı stratejiler

AGE toksisitesinin mekanizmalarının belirlenmesi, diyabetik komplikasyonları önleme girişiminde anahtar bir strateji olmuştur. Bugüne kadar, AGE oluşumunu önlemeyi, hücreler üzerindeki AGE etkilerini azaltmayı ve önceden var olan AGE çapraz bağlarını kırmayı amaçlayan çeşitli yaklaşımlar olmuştur. Bu işlemin inhibisyonu için önemli bir farmakolojik strateji, güçlü bir AGE aracılı çapraz bağlanma inhibitörü olan küçük nükleofilik hidrazin bileşiği aminoguanidin kullanmıştır. Aminoguanidinin terminal amino grubu, düşük pKa'sı sayesinde, çapraz bağlanmayı önlemek için özellikle glikozdan türetilen reaktif ara maddelerle reaksiyona girer. Aminoguanidinin deney hayvanlarında diyabete bağlı vasküler komplikasyonları önlediği çok sayıda çalışan tarafından gösterilmiştir. Bu kapsamlı çalışmalardan, amino-guanidin'in diyabet ve yaşlanmanın neden olduğu AGE aracılı doku hasarını önlemek için kullanılabileceği açıktır (Brownlee ve vd., 1986). İnsanlarda, aminoguanidin ile ilgili bir faz I klinik deneyi, tedavi edilen ve edilmeyen diyabetik deneklerde ileri glikasyonu modifiye edilmiş hemoglobini (AGE-Hb) ölçtü ve tedavi edilen grupta AGE-Hb'nin yanı sıra LDL'nin de önemli ölçüde azaldığını buldu. HbA1c değerleri, aminoguanidin tedavisinden etkilenmemiştir, bu da aminoguanidin'in Amadori sonrası ileri glikasyon reaksiyonlarının inhibisyonu için özgüllüğüne işaret etmektedir. Son zamanlarda, biyolojik sistemlerde oluşan tersinmez moleküller arası AGE çapraz bağlarına saldırmak umut verici bir terapötik strateji olmuştur (Obayashi ve vd., 1996). Böyle bir AGE çapraz bağ "kırıcı" prototipi olan N-fenil-tiyazolyum bromürün (PTB), in vitro dikarbonil türevli çapraz bağların kovalent karbon-karbon bağlarına saldırdığı tarif edilmiştir (Vasan ve vd., 1996). Daha yakın zamanlarda, ALT-711 adlı böyle bir AGE kırıcının, diyabetik sıçanlarda AGE aracılı vasküler sertliği ve gerilebilirliği tersine çevirebildiği

bulunmuştur (Wolffenbuttel ve vd., 1998). İnsanlarda eşit derecede etkiliyse, bu tür ajanlar, diyabetten bağımsız olarak yaşlı erişkin popülasyonları etkileyen geç kardiyovasküler komplikasyonların tersine çevrilmesinde oldukça faydalı olabileceği sonucuna ulaşılmaktadır.

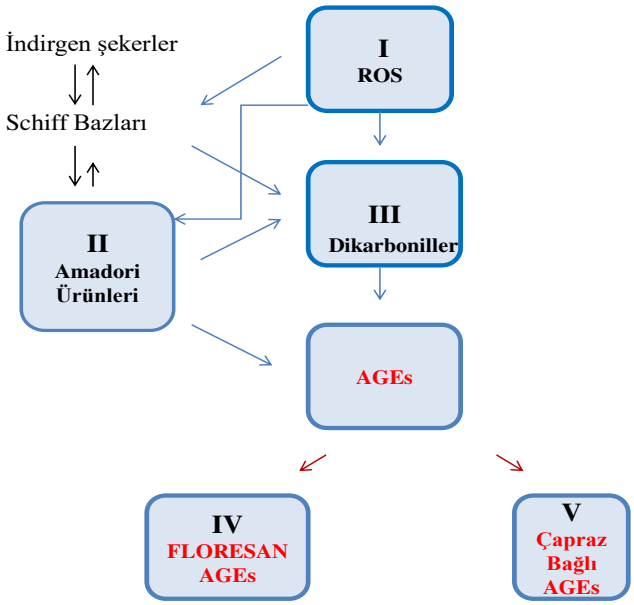
1.9.5 Polifenoller tarafından AGE'lerin inhibisyonu

Polifenoller bitkilerde doğal olarak bulunur ve yararlı olarak kabul edilir (Xie, Xiao, Kai ve Chen, 2012). Bu antioksidanlar, zararlı serbest radikalleri temizler. Polifenoller, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kronik hastalıkların ve nörodejeneratif bozukluklar gibi patolojik koşullar altında hücresel sinyal yolakları ile riski azaltma kapasitesine sahiptir (Polifenoller antialerjik, antiviral / antibakteriyel ajanlar, antifungal / antikanser ajanlar olarak çeşitli hastalıkların önlenmesinde çeşitli şekillerde biyolojik aktivitelere sahiptir (Gothai ve diğerleri, 2016). GO (glioksal) ve MGO (metilglioksal) gibi AGE'lerin öncüleri polifenoller tarafından inhibe edilmiştir (Yu Wang & Ho, 2012). İnsanlarda bulunan AGE'lerin iki ana öncüsü olan MGO ve GO çok reaktiftir ve serbest lizin ve arginin kalıntılarını değiştirir (Nagaraj ve diğerleri, 2002). Polifenoller lizin ve arginin ile rekabet etme yeteneği vardır ve bu nedenle AGE'lerin gelişimini engeller. Bazı polifenoller tipik bir AGE inhibisyon ajanı olan aminoguanidinden daha fazla MGO yakalar (Thornalley,2003).

Yapılan bir çalışmada glikoz-BSA sisteminde, p-kumarik asit dışında tüm denenmiş fenolik asitler belirli bir derecede AGE inhibitör yeteneklerine sahip olduğu gözlenmiştir. Oleik asit-BSA sisteminde tüm test edilen fenolik asitler AGE'lerin gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Virk ve Chen, 2016).

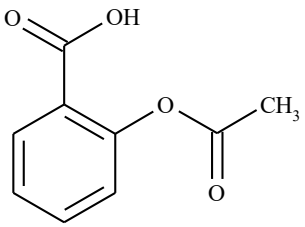
1.9.6 AGE inhibitörleri

Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini inhibe edebilirler ve glikasyonu erken aşamada engellemiş olurlar (Şekil 1.12).

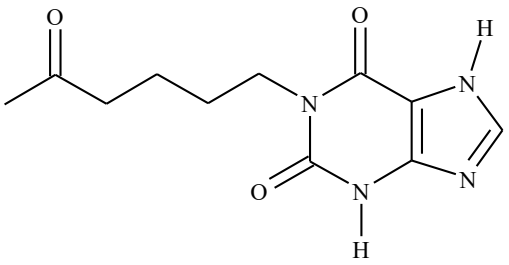


Şekil 1.6 İnhibitör Tipleri

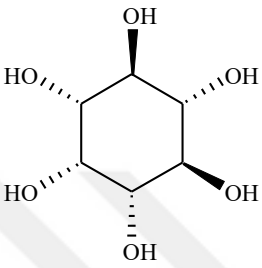
AGES oluşumunu önleyebilmek için kullanılan inhibitör tipleri (Şekil 1.6) (Şekil 1.7) (Şekil 1.8)



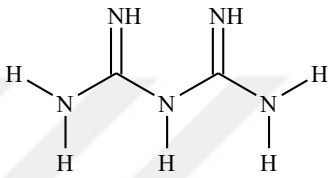
Asprin



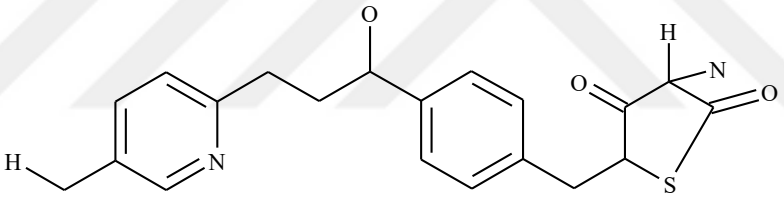
Pentoksifilin



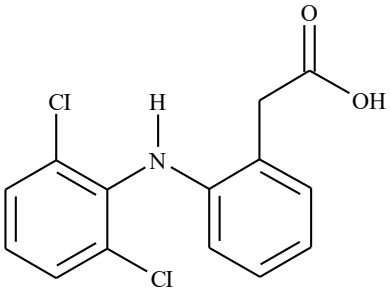
İnisitol



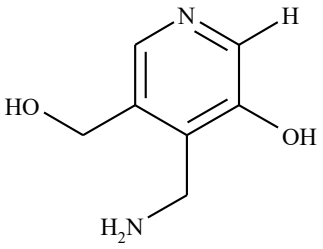
Metformin



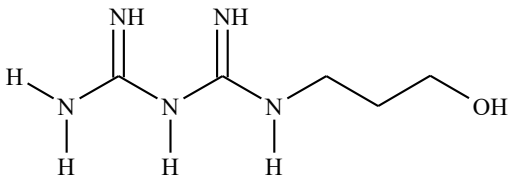
Pioglitazon



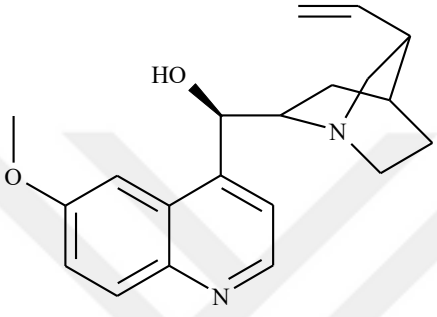
Diklorofenak



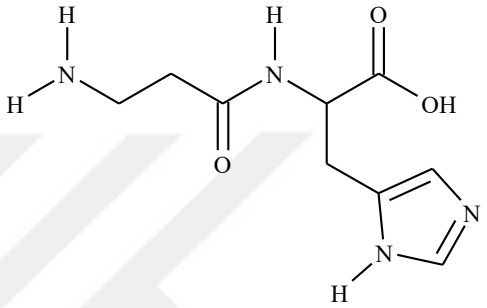
Pridoksamin



Bufromin

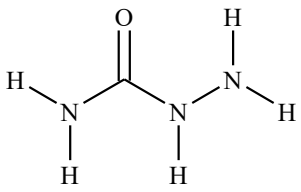


Kunin

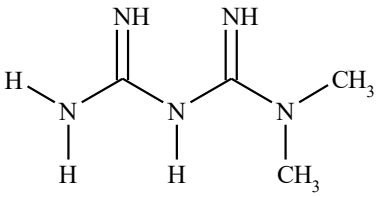


Karnosin

Şekil 1.7 Sentetik AGEs İnhibitörleri



Aminoguanidin



Metformin

Şekil 1.8 Glikasyonun Erken Basamağında Kullanılan AGEs İnhibitörleri

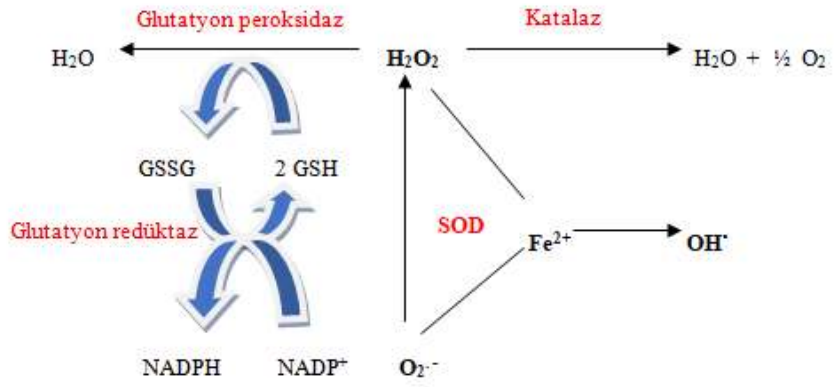
1.10 ROS (Reaktif Oksijen Türleri)

Reaktif oksijen türleri (ROS) oksijen (O_2) içeren (O_2^-, H_2O_2, OH^-) DNA'ya, lipitlere, proteinlere karşı reaktif olan hücre içi kimyasallardır. ROS kimyasal olarak O_2'den daha reaktiftir ve çeşitli biyolojik olayları tetikleyebilir. Her ROS'un farklı içsel özelliklerini belirleyen kimyasal özellikleri çeşitli biyolojik olayları tetikler.

O_2 oksidatif metabolizma sırasında bir elektron tarafından indirgenme ile üretilir.

O_2 hızla süperoksit dismutazlar (SOD'ler) tarafından dönüştürülür. H_2O_2 ile etkileşime girerek hücresel sinyalleşmeyi etkilerler. O_2' den farklı olarak H_2O_2 membranda kolayca dağılabilir ve hücre içi sinyal molekülü olmak için ideal hale

gelir. Demir veya bakır iyonlarının varlığında H_2O_2 bir OH^- radikali olabilir, çok reaktif olan bu molekül lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonu sonucunda hücrede hasara neden olur. Kontrolsüz kimyasal maruziyeti, ilaç kullanımı oksidatif stres sonucu ortaya çıkar. Normal oksijen molekülüne kıyasla reaktiftir. Vücudun kendi antioksidan savunma sistemi sayesinde etkisiz hale gelebilir (Şekil 1.9).



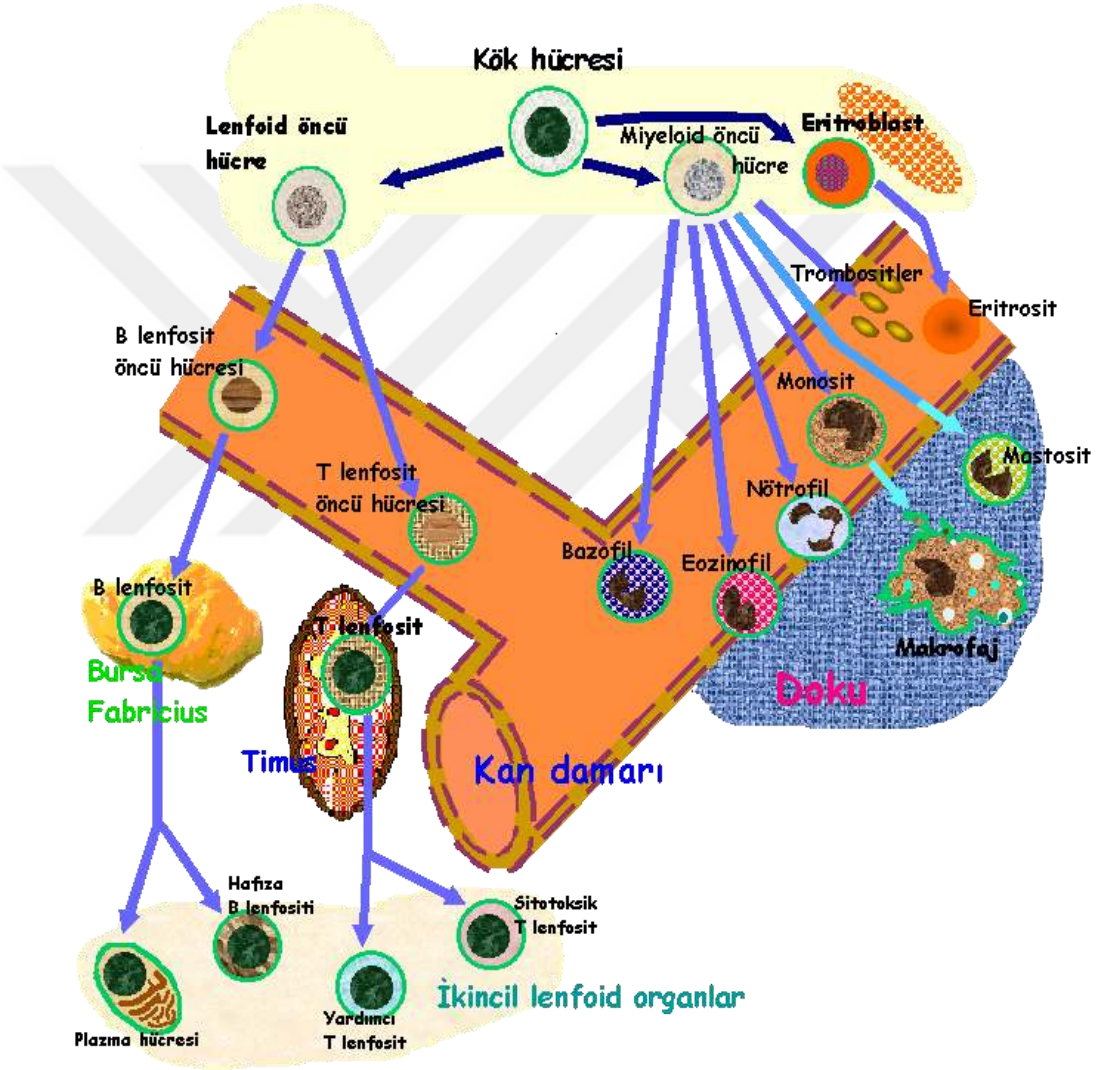
Şekil 1.9 Serbest Oksijen Söndürücü Sistem

1.11 Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemini oluşturan hücreler, bireyin yaşamı süresince "Hematopoez" olarak adlandırılan bir süreç aracılığıyla vücutta devamlı olarak sentezlenir. Kemik iliğinde başlayan ve daha sonra kan dolaşımı ile doku ve organlarda devam eden bu süreçte, bağışıklık sistemini oluşturan hücrelerin gelişimi ve özel hücre türlerine farklılaşmaları tamamlanır (Şekil 1. 10). Organizmaya verildiklerinde kendilerine karşı humoral ya da hücresel bağışıklığın oluşumunu tetikleyen moleküller immunojen olarak adlandırılır. Tek başına verildiklerinde organizmada kendilerine karşı bağışık yanıt oluşumunu tetikleyemeyen ancak bir immunojen ile birlikte verildiklerinde bağışık yanıt oluşturabilen moleküller antijen olarak adlandırılır. İmmun sistem hücrelerinin üretildiği, olgunlaşma ve aktifleşme süreçlerini tamamladıkları organlar merkezi ve çevresel organlar olarak ikiye ayrılır. Merkezi organlar; kemik iliği ve timus, çevresel organlar; kanatlılarda dalak, lenf yumruları ve solunum, sindirim sistemi ile mukozalara bağlı lenfoid odaklardır.

Vücudumuz dışardan giren ve özellikle patojenik karekterde olan etkenlere karşı kendisini savunabilecek şekilde yani immunolojik yanıt verecek tarzda örgütlenmiştir.

- İmmunolojik yanıt sıvısal (humoral) ve hücresel (cellular) olmak üzere iki çeşittir.
- Her iki tür yanıtın temelini merkezi görev yapan, lenfoid ve miyeloid seriye ait olan hücreler yapar
- Lenfoid seriye ait olanlar B (sıvısal yanıt, kan ve doku sıvısındaki antikorlar) ve T (hücresel yanıt) hücreleri
- Miyeloid seriye ait olanlar ise monosit ve makrofajlardır.

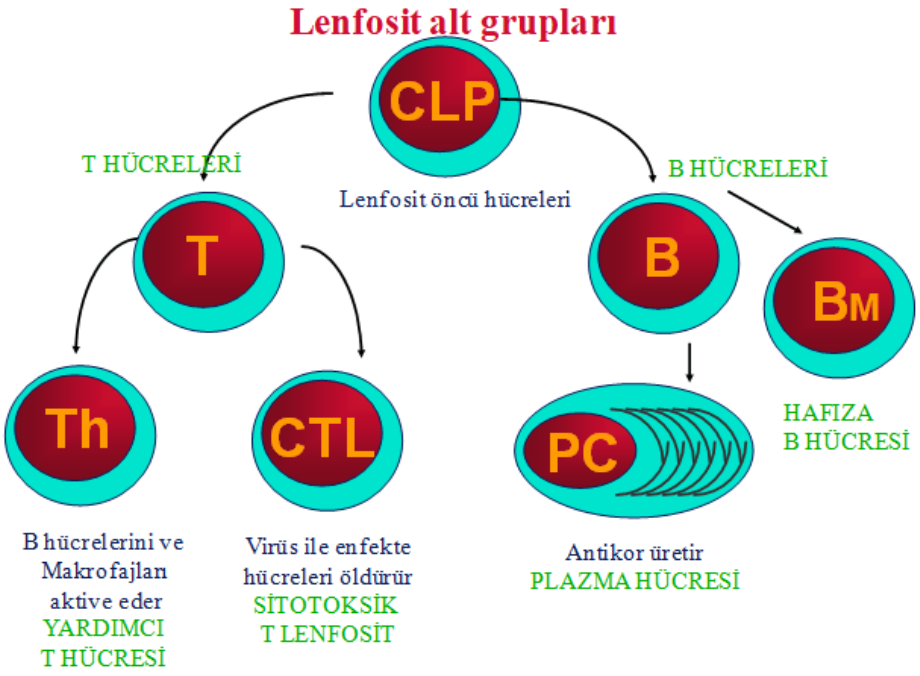


Şekil 1.10 Kök Hücrelerin Kemik İliğinde Olgunlaşarak Farklılaşmaları

1.12 Lenfositler

Bağışıklık sistemi, yabancı patojenler veya enflamatuar uyaranlar gibi "tehlike" sinyallerine hızla tepki vermeye koşullanmış bir dizi özelleşmiş hücreden oluşur. Günümüzde iki farklı lenfosit sınıfının bulunduğu genel olarak kabul edilmektedir.

Lenfositler; insan timüs kaynaklı (T) hücreler ve kemik iliği kaynaklı (B) hücreler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Görünüşte benzer olmasına rağmen, bu iki hücre tipi farklı işlevlere sahiptir (Şekil 1.11).

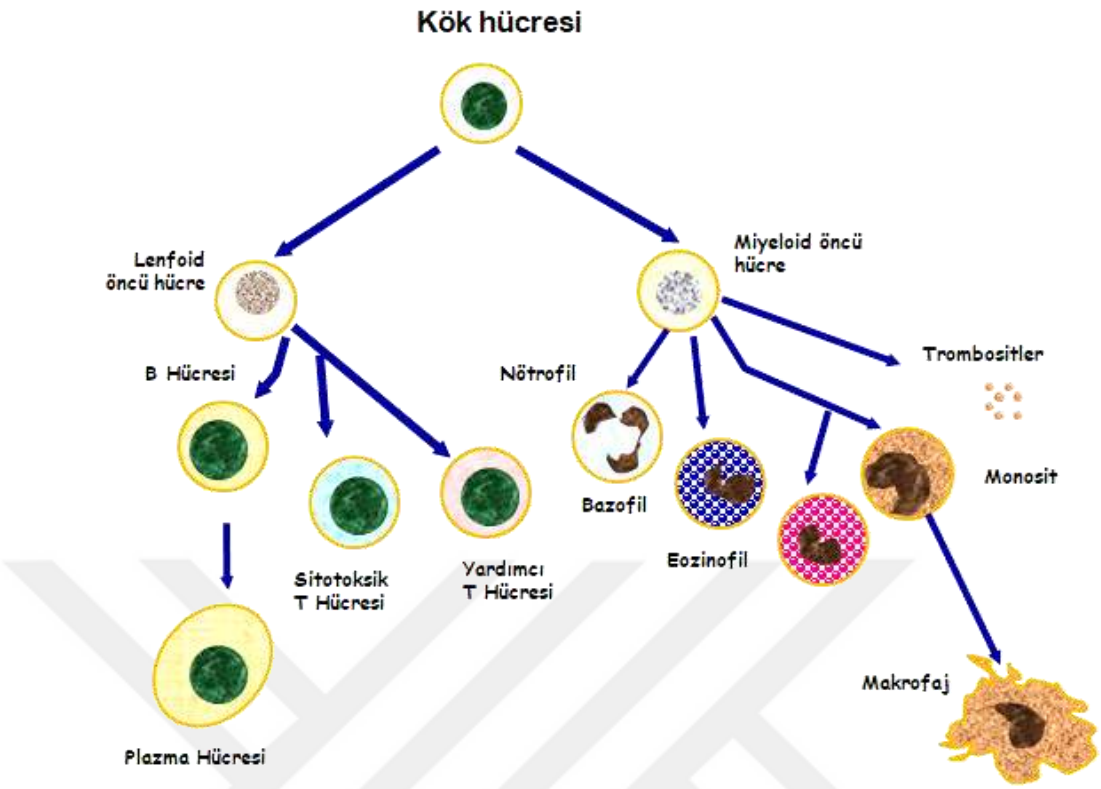


Şekil 1.11 Lenfosit Hücre Alt Grupları

Kök hücrelerin kemik iliğinde olgunlaşarak farklılaşmaları sonucu, yine kemik iliğinde üç farklı tipte öncü hücre oluşur:

- B ve T lenfositlerinin oluşumunda ön aşamayı oluşturan lenfoid öncü hücreler.
- Kanın pıhtılaşmasından sorumlu trombositlerin ve mikroorganizmalara karşı yürütülen savaşta ilk aşamayı oluşturan, belirgin bir mikroorganizmaya yönelik olmayan "nonspesifik" bağışıklık sisteminin yapıtaşları niteliğindeki lökositlerin oluşumunda ön aşamayı oluşturan miyeloid öncü hücreler.
- Kandan dokulara oksijen taşıyan eritrositlerin oluşumunda ön aşamayı oluşturan eritroblastlar (Şekil 1.12).

Çevresel organlarda antijen ile karşılaşan B ve T lenfositleri aktif hale gelip hücresel ve humoral yanıtı oluştururlar.



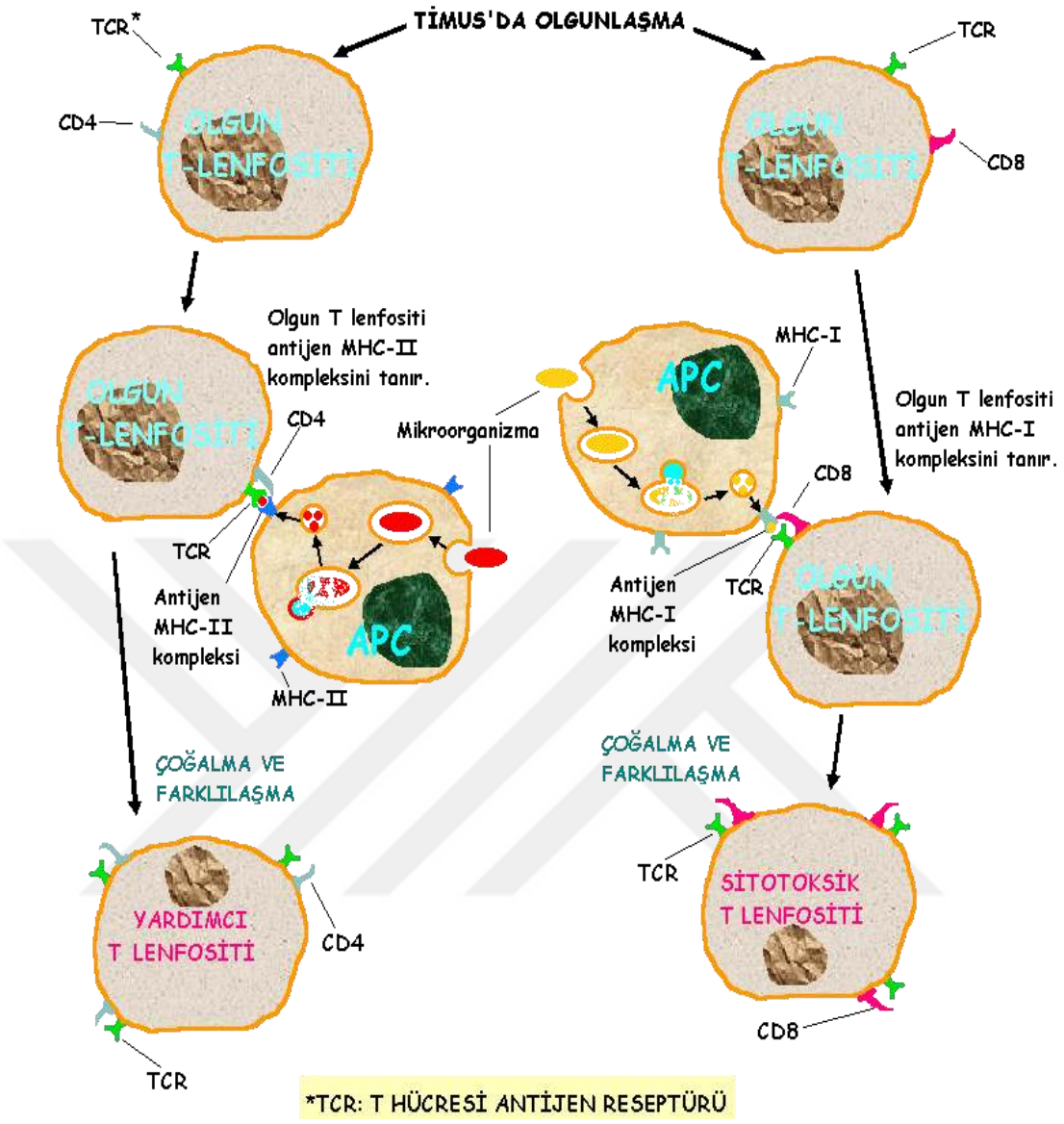
Şekil 1.12 Kök Hücresinin Farklılaşması

T-hücrelerinin hücresel bağışıklık yanıttan sorumludur. Üç çeşit T-hücresi vardır (Şekil 1.13).

- Yardımcı (helper T-cells), B- hücreleri ile beraber çalışır. B-hücrelerini uyararak yabancı etkene karşı antikor sentezlemesini sağlar.
- Sitotoksik, Bu hücreler doğrudan doğruya yabancı maddeye yapışaraketki gösterirler
- Süpresor, B ve diğer T-hücrelerini kontrol altında tutarlar.

Yardımcı T-hücre reseptörlerinin yüzeylerinde CD4, Sitotoksik ve Supresör T-hücrelerinde CD8 molekülleri vardır. Dolaşımda çok az sayıda bulunan bazı T-hücrelerinin yüzeylerinde CD4 ve CD8 molekülleri yoktur. T-hücreleri veya T-hücre reseptörleri yabancı maddeyi antigeni ancak MHC molekülleri ile birleşince komplex oluşturunca tanırlar ve immunolojik yanıt oluştururlar. MHC molekülleri Class I ve ClassII olmak üzere iki çeşittir.

- MHC class I tüm hücrelerde hemen hemen vardır.
- MHC Class II APC hücrelerinde bulunur.

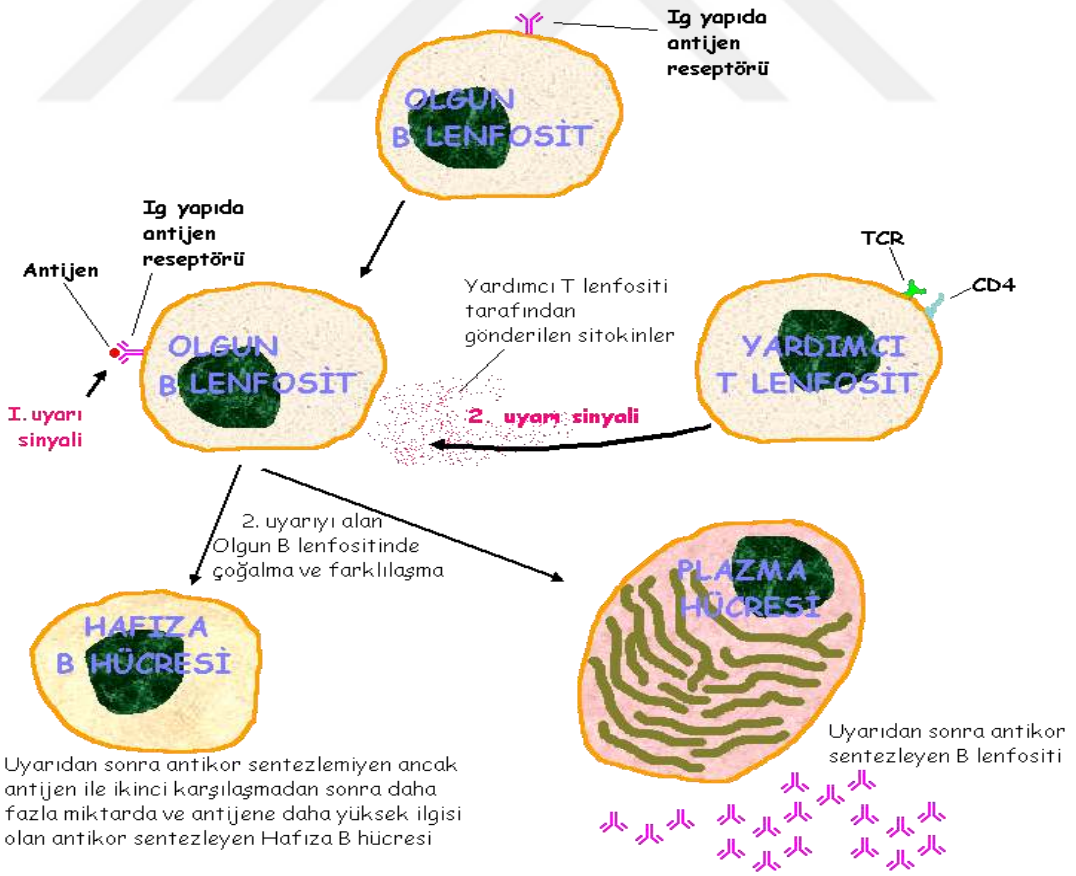


Şekil 1.13 T Hücre Fonksiyonu

Spesifik yüzey antijen markörlerinin varlığı veya yokluğu ile serolojik olarak farklı hareketlilikleri ve çeşitli lektinlere karşı farklı in vitro reaktiviteleri ile elektroforetik olarak ayırt edilebilirler. B hücreleri, yüzey immünoglobülinin Fc reseptörlerinin boyanması ile kompleman reseptörü tarafından tarafından kolaylıkla tanınır (Şekil 1.14). Bağışıklık tepkisi, tek tek lenfosit klonlarının kesin olarak düzenlenmiş proliferasyonu ve farklılaşmasından kaynaklanır. B lenfositlerinin ana işlevi, immünoglobülinleri (Ig) üretmektir. Dokuz farklı Ig izotipi bulunmaktadır (IgM, IgD, IgG, IgGe, IgG3, IgG, IgA1, IgA2 ve IgE) (Pascual ve Capra, 1991; Walter ve vd., 1991). Bu izotiplerin her biri, etkileşimleri çok çeşitli biyolojik aktivitelerle sonuçlanan tamamlayıcı reseptörler bileşenlerine bağlanma veya çok sayıda Fc'ye bağlanma gibi belirli efektör işlevleri gösterir (Ravetch ve Kinet, 1991).

İmmünoglobulinler çeşitli enfeksiyöz mikroorganizmalara karşı savunmada çok önemli bir rol oynar. B hücresi yokluğu, değiştirilmiş B hücresi farklılaşmasının bir sonucu olarak yaygın immün yetmezlik veya şiddetli kombine immün yetmezlik, (agammaglobulinemi) ile sonuçlanır. Bu da ömür boyu tekrarlanan enjeksiyonları ile ölümcül sonuçlara yol açar. Bir B lenfositinin doğal öyküsü iki ana bölüme ayrılabilir. B lenfopoezi adı verilen ilk aşama, fetal karaciğer ve yetişkin kemik iliği kaynaklıdır. Hematopoietik multipotent bir kök hücrenin IgM ve IgD'yi birlikte eksprese eden olgun B lenfositlere bağlanmasına ve olgunlaşmasına izin verir. T hücrelerinden ve antijenlerden büyük ölçüde bağımsızdır. İlk B soyu bağlı hücre, germ hattı konfigürasyonunda immünoglobulin genlerine sahip olan pro-B hücresidir. B- hücresi uyarımı ve antikor salınımı iki sinyale gereksinim duyar.

- Antijen ve B - lenfositi üzerinde bulunan antijen reseptörü arası etkileşimle oluşan sinyal
- Yardımcı T-hücreleri (TH veya T-helper) tarafından üretilen ve Sitokinlerdir.



Şekil 1.14 B Hücre Fonksiyonu

1.13 İmmunoglobulinler

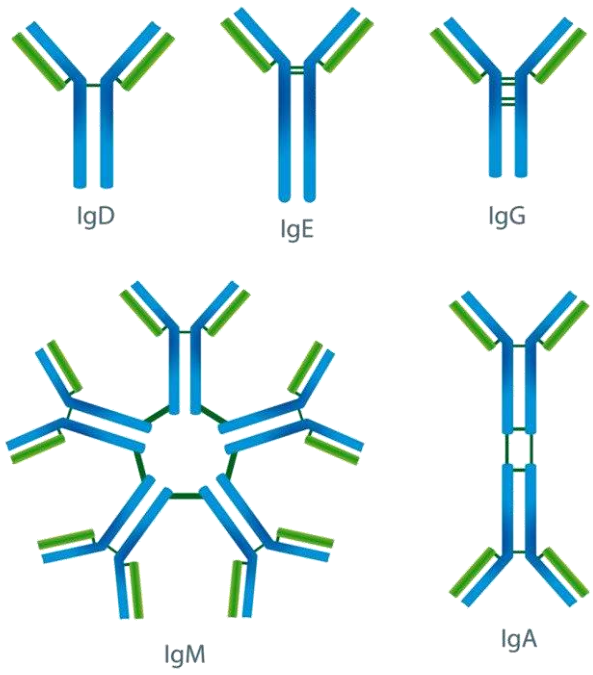
İmmünoglobulin molekülü monomer adı verilen en az bir üniten oluşur. Monomer de 450 aminoasitten oluşan bir çift ağır H polipeptid zinciri ve 212 aminoasitten oluşan bir çift hafif L polipeptid zincirinden oluşur. H ve L zincirlerinde bir aminoterminal bir de karboksiterminal kısım bulunur. Aminoterminal kısıma değişken bölge V denir. Bu değişkenin görülmediği karboksiterminal kısıma sabit bölge C denir. İmmünoglobulinleri oluşturan polipeptid zincirleri birbirlerine disülfit bağı ile bağlıdır. Bir immünoglobulin molekülünün ağır zincirinde moleküle esneklik veren ve Ag'le birleşme durumuna göre gerektiğinde Y çatalının açılmasına, böylece molekülün Y şeklinden T şekline esnemesini sağlayan menteşe bölgesi bulunur.

IgA: Salgılarda bulunur, mukozal yüzeylerden giren antijenlere kaşı koruma sağlar. Anne sütünde buunur.

IgM: En büyük antikordur. Enfeksiyon esnasında oluşur ve kısa sürede (3-6 ay) kaybolur.

IgE: Alerjik reaksiyonların primer antikorudur.

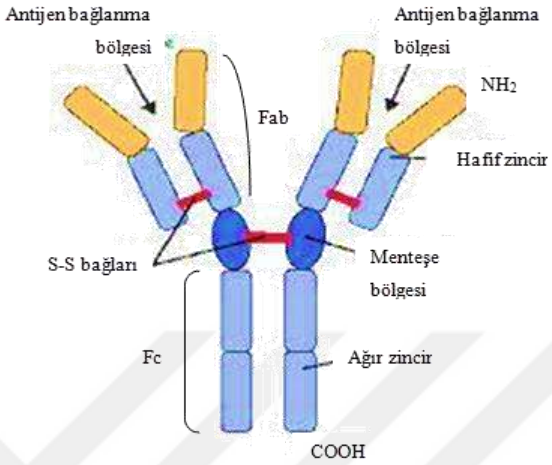
IgD: Serumda çok az miktarda bulunur. B hücrelerinin olgunlaşmasında ve farklılaşmasında rol oynar (Şekil 1.15).



Şekil 1.15 İmmünoglobulinlerin Yapısı

1.13.1 İmmunoglobulin G (IgG)

İnsan serum antikorunun yaklaşık %75'ini oluşturur. Kan dolaşımında bulunan en yaygın inhibitör türüdür. IgG proteini serum plazmasındaki b hücreleri tarafından oluşturulur (Şekil 1.16).



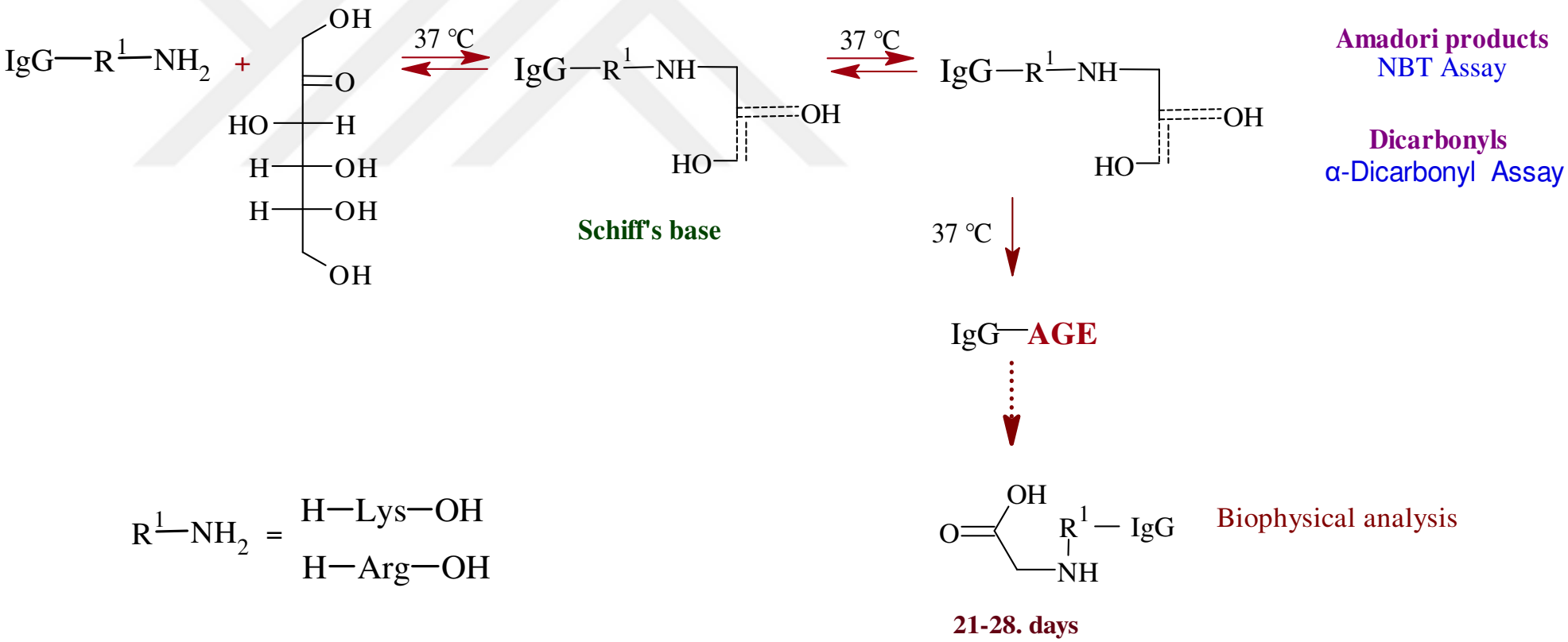
Şekil 1.16 İmmünoglobülin G'nin Yapısı

1.14 Fruktoz Kaynaklı İmmunoglobulin G (IgG) Glikasyonu

Fruktoz, genellikle glikasyon olarak adlandırılan enzimatik olmayan süreçle proteinlere kovalent olarak bağlanabilir. IgG'nin glikasyonu, immünoglobulinlerin işlevselliği ve genel immünokompetans üzerindeki olası etkisi nedeniyle özel ilgi konusudur.

Glikasyon, biyoaktiviteyi ve moleküler stabiliteyi potansiyel olarak etkileyebilecek önemli bir protein modifikasyonudur ve monoklonal antikorlar gibi terapötik proteinlerin glikasyonu iyi karakterize edilmelidir. Glikatlanmış protein, ileri glikasyon son (AGE) ürünlerine daha fazla bozulmaya uğrayabilir.

İmmünoglobulinler (Ig), genellikle memeli serumlarında ve biyolojik sıvılarda bulunan glikoproteinlerdir. Diyabet varlığında, Ig ve diğer dolaşımdaki ve doku proteinleri yüksek glikoz konsantrasyonuna maruz kalır. Ig'nin immünolojik önemi nedeniyle, glikasyonlarının özel bir önemi vardır ve bu konuda birçok makale yayınlanmıştır. Örneğin, diyabetik deneklerde glikolize IgG'de önemli bir artış, afnite kromatografisiyle bulunmuştur (Danze ve diğerleri, 1987). IgG'nin *in vitro* glikasyonu incelenmiştir (Şekil 1.17) (DolhoferBliesener & Gerbiz, 1990) ve bir glisemik kontrol indeksi olarak izole edilmiş IgM üzerindeki glikasyon seviyelerinin ölçülmesi önerilmiştir.



Şekil 1.17 Fruktoz Kaynaklı İmmünoglobulin G Glikasyonu

ACE2'nin enzimatik olmayan glikasyonunun meydana geldiği düşünüldüğünde, bunun glikolize edilebilecek amino asit (çoğunlukla lizin) açısından protein üçüncül yapısını değiştirmedeki olası patojenetik rolü dikkate alınmalıdır. Diyabet hastalığında ayrıca immünoglobulinler (IgG) yüksek glikoz konsantrasyonları; MALDI/MASS Spektrometresi yaklaşımını kullanarak, IgG üzerinde yoğunlaştırılan glikoz moleküllerinin sayısının glikoz seviyeleriyle ilişkili olduğunu ve zayıf kontrol edilen diyabet durumunda 20 glikoz molekülünün IgG'nin lizin kalıntılarıyla enzimatik olmayan bir şekilde reaksiyona girdiği gösterilmiştir. IgG üzerinde kütle spektrometrisi ve bilgisayar-moleküler modelleme ile yapılan diğer deneyler, Fab fragmanlarının, özellikle hafif ve ağır değişken bölgelerde glukoz tarafından saldırıya daha yatkın olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle, diyabetli kişilerde gözlenen bağışıklık yetersizlikleri, Fab fragmanının aşırı glikasyonuna bağlı olabilir, antikor ve antijen arasındaki moleküler tanıma sürecini inhibe edebilir.

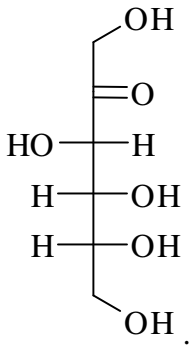
Diyabetik deneklerin serumundan izole edilen özellikle Fab parçalarının tercihli glikasyonu IgG'nin Fd bölgesinde tespit edilmiştir. Ancak glikolize IgG1'den boronat desteklere hafif zincirin bağlanmasını tespit edemediler. Ayrıca (Menini ve vd., 1990) esas olarak IgM'nin Fab bölgesinde glikasyonun meydana geldiğini önesürdü. IgG'de Fab'da, Fc bölgesinde olduğundan daha fazla glikasyon sahası mevcuttur.

(Sasaki, Kaneshige ve Kennedy ve vd., 1994) çalışmalarında monoklonal antikorların glikasyonu sonucunda antijenlere bağlanma yeteneklerini bozduğuna dair ikna edici kanıtlar sağlamıştır. Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışmada, antijen glikasyona bağlı inaktivasyona karşı, anti Cu'nun, Zn-süperoksit dismutaz enzimi antikorları koruyabilir.

1.15 Fruktoz

İmmünoglobulin glikasyonu ile ilgili çalışmaların çoğunda reaktif şeker olarak glikoz kullanılır.

Fruktoz sahip olduğu reaktif açık zincir yapısı glikasyona yatkınlığı glukozdan 300 kat daha fazladır. Fruktoz, glikozdan daha kapsamlı protein çapraz bağlanmasına neden olur. Diyabet ve bazı diyet durumları fruktozun *in vivo* AGE oluşumundaki rolünü giderek artıyor. Glikasyon üzerine yapılan çalışmalarda şeker modeli olarak fruktoz bu nedenle yaygın kullanılmaktadır (Şekil 1.18)

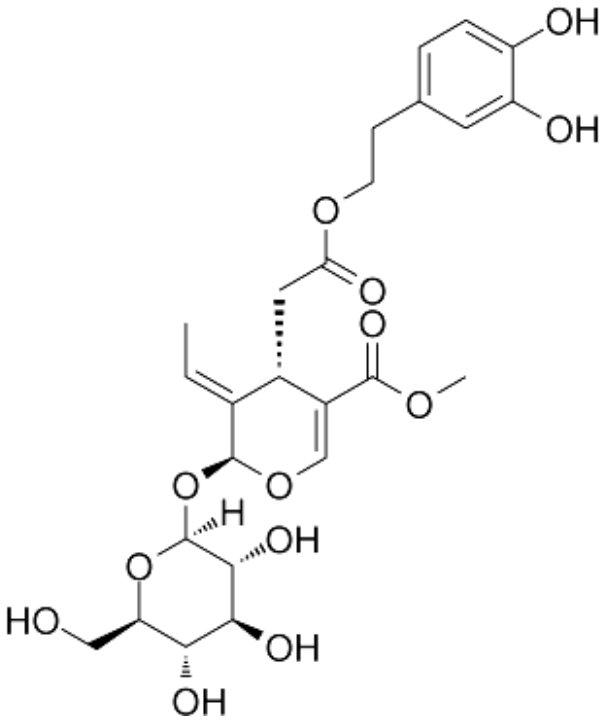


Şekil 1.18 Fruktozun Kimyasal Yapısı

1.16 Oleuropein

Zeytin yaprağı ve zeytinyağından elde edilir. Oleuropein (Oleu), zeytin yaprağı gibi bazı zeytin yan ürünlerinin fenolik fraksiyonunun en bilinenlerindendir. Çeşitli çalışmalar oleuropeinin yüksek bir antioksidan aktivite içerdiğini göstermiştir. Zeytin yaprağı ekstraktı yapılan birkaç çalışma sonucunda oleuropeinin antioksidan ve hipoglisemik aktiviteleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır (Bılotta ve vd., 2014; Cicerale ve vd., 2010; Jemai ve vd.,2009).

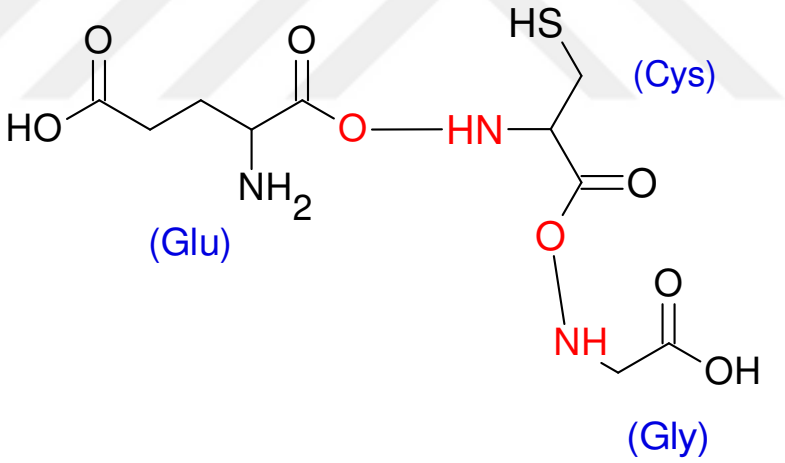
Oleuropein, düşük yoğunluklu lipoproteinleri inhibe eder. İn vitro oksidasyon ve *in vivo* lipid peroksidasyonunda oluşan serbest radikalleri temizler. Oleuropeinin omurilik yaralanması ve ksidatif omurilikte koruyucu nöroprotektif etkiye sahiptir (Kyriazis ve vd., 2016)(Şekil 1.19).



Şekil 1.19 Oleuropein'in Kimyasal Yapısı

1.17 Glutatyon

Glutatyon, öncü amino asitler sistein, glutamat ve glisinden sentezlenen bir tripeptittir (Şekil 1.20). GSH, kan ve safraya salınmadan önce söndürücü yollar mevcut olmasına rağmen, esas olarak karaciğerde de novo sentezlenir (Mates ve vd.,2000). İkinci olarak da üst jejunumun doğrudan barsak lümeninden GSH elde etmesini sağlar. Biyolojik düzenleyici olarak glutaminin etkilerinin birçoğunun GSH yoluyla gerçekleşmesi muhtemeldir. Glutatyon (GSH) gibi düşük moleküler ağırlıklı kükürt içeren bileşikler (tioller) kolayca oksitlenir ve çok hızlı bir şekilde yeniden üretilebilir (Mates ve vd., 2002). Bu özellikler, birçok biyokimyasal ve farmakolojik reaksiyonda önemli bir rol oynamalarına izin verir.1–3 GSH'nin bu çeşitli işlevleri üç gruba ayrılabilir: (i) süperoksit dis-mutaz ile birlikte, ana hücre içi antioksidandır; (ii) hücre çoğalmasını ve bağışıklık yanıtlarını modüle eder; ve (iii) nükleer faktör-kappaß ve protein tirozin fosfatazlar gibi moleküller aracılığıyla hücrelerdeki sinyal iletimini düzenlemeye yardımcı olur (Khurana ve ark; 2002; Berlett ve vd., 1997;Beckman ve vd., 1997).



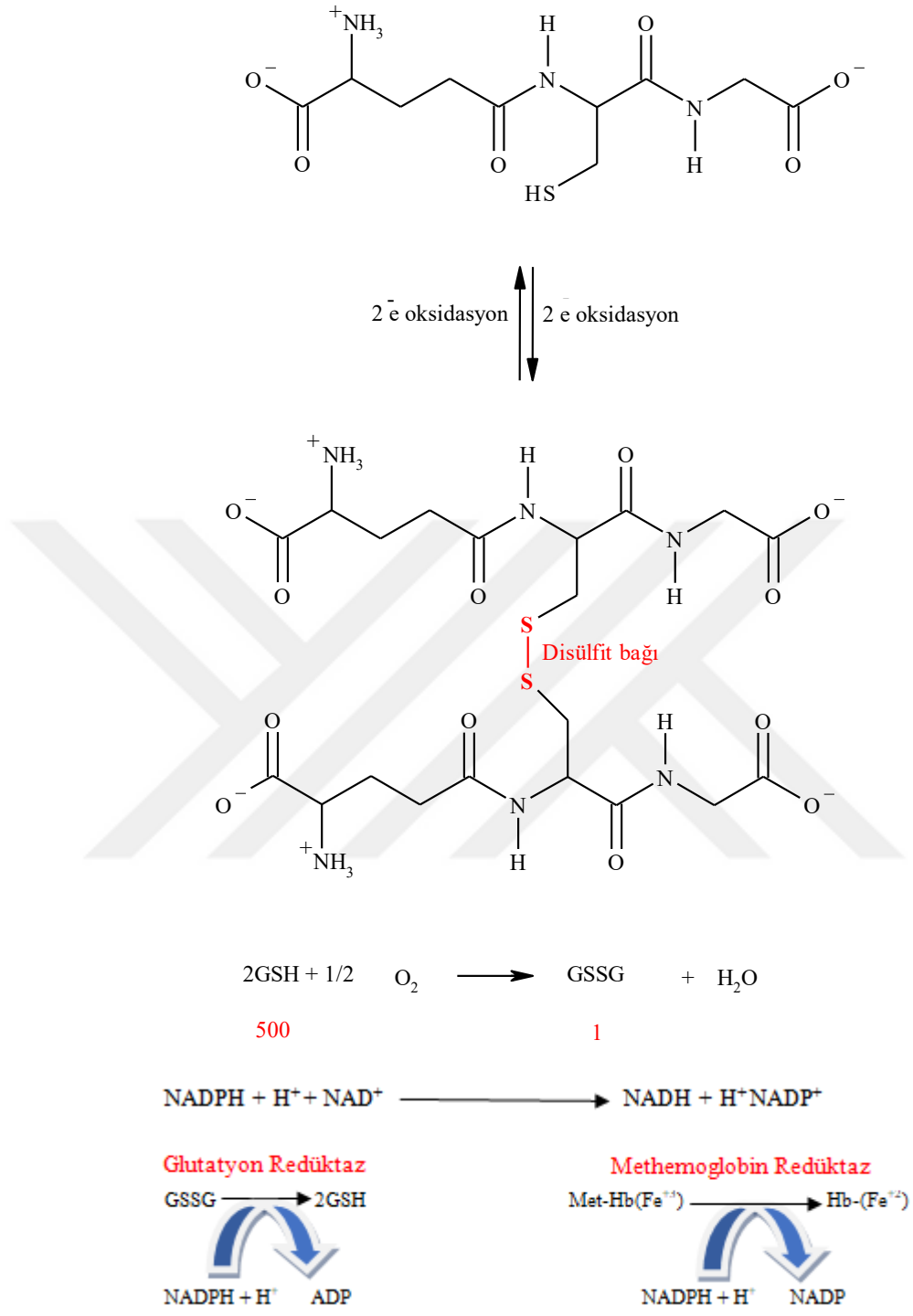
Şekil 1.20 Glutatyonun Kimyasal Yapısı

Hücrelerin redoks durumunda oksidasyon ve redüksiyon seviyeleri arasındaki dengeyi regüle eder. GSH tampon sistemi, redoks değişikliklerinde hücre yanıtını modüle eder. (Şekil 1.21). Hücreler, aerobik metabolizma sırasında sürekli olarak reaktif oksijen türleri ürettiğinden dolayı GSH redoks durumu, hücresel canlılığın sürdürülmesinde çok önemlidir (Rennie ve vd., 2001; Khurana ve vd., 2002). Reaktif oksijen türleri arasında hidroksil radikalleri, süper oksit anyonu, hidrojen peroksit ve nitrik oksit bulunur. Lipitperoksidasyonu ve DNA ile proteinlerin oksidasyonu ile sonuçlanan yüksek reaktiviteye sahiptirler. Oksidatif stresin hücre sinyal iletimi ve

gen düzenleme sistemlerinin kontrolünde yer aldığı artık açıktır. Fonksiyonel açıdan önemli selenoproteinlerin ana ailesi olan glutatyon peroksidazlar (GP), reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin inaktivasyonunu katalize eder. Bu enzimler, okside glutatyon (GSSG) oluşturmak için iki GSH molekülü arasında sülfür bağı oluşturur. GSH redüktaz daha sonra bir GSSG molekülünden iki GSH molekülünün oluşumunu katalize eder. Dört farklı GP enzimi bulunmaktadır; (i) klasik GPX-1; (ii) gastrointestinal GPX-GI;(iii) plazma GPX-P ve (iv) fosfolipid hidroperoksit PHGPX. Bu izoenzimler immünolojik olarak farklıdır ve farklı genler tarafından kodlanır (Jefferies ve vd., 2003).

1.17.1 Glutatyon transferaz süpergen ailesi

Glutatyon-S-transferaz (GST) süper familyasının üyeleri, GSH konjugatları oluşturmak için GSH'nin hedef bileşiklerle konjugasyonunu katalize eder. Bu GSH konjugatları atılım için merkaptürik asitlere dönüştürülür. GSH konjugatları atılım için merkaptürik asitlere dönüştürülür. GST enzimleri kodlayan lokuslar, en az yedi kromozom üzerinde bulunur. Bu moleküller, ısı şoku tepkisi, elektrofillerin detoksifikasyonu, ilaç direnci, karsinojenez ve immünomodülatör fonksiyonlarla ilgili çeşitli olaylarda yer alır (Mc Williams ve vd.,1995). GST polimorfizmi hastalık fenotiplerini ve kansere yatkınlığı belirlemede önemli bir biyobelirteçtir. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri mitokondriye zarar verir. Bu, mitokondriyal DNA mutasyonlarına yol açar ve 'mitokondriyal başarısızlık' nedeniyle enerji çıkışında ilerleyici bir azalmaya neden olur. Elektron taşıma zincirinin bir parçası olan sitokrom oksidaz, reaktif oksijen türlerine karşı özellikle hassas görünmektedir. Sitokrom oksidazın inhibisyonu, mitokondriyal süperoksit oluşumunda bir artışa ve mitokondriye ek hasar vererek oksidatif stresin daha da şiddetlenmesine yol açar. Elektron taşıma zincirinin bozulması, zar potansiyelinin kaybına, geçirgenlik geçiş gözeneklerinin yetersizliğine ve ATP eksikliğine yol açar. GSH, reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirdiği için mitokondriyal hasarın kapsamını sınırlayabilir. Oksidatif stres, apoptozun başlaması ve ilerlemesi üzerinde derin bir etkiye sahiptir. Normalde, yüksek sitoplazmik GSH seviyeleri, sitokrom C'yi indirgenmiş veya inaktif bir durumda tutar. Oksidatif stres dönemlerinde, sitokrom C mitokondriden salınır ve sitoplazmik GSH'deki azalma nedeniyle oksitlenir. Oksitlenmiş sitokrom C'nin sitoplazmada birikmesi apoptoza yol açabilir (Al Temimi ve vd., 2023).



Şekil1.21 Glutatyonun Oksidasyonu/Redüksiyonu ve NADPH Sentezine Bağlı Biyolojik Olaylar

1.18 Selenyum

Selenyum (Se) diyetimizde gerekli bir mikro besindir ve diyabetik semptomları azaltabilir (Pillai ve diğerleri, 2012). Hwang ve vd. (2007), Se; streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik farelerde insülin gibi davranır, burada glukoneogenez ve glikolizde yer alan birkaç enzimin etkisini düzenleyebilir ve glikozun hücrelere

taşınmasını kolaylaştırabilir. ROS inhibe edebilir. İyi bir antioksidandır. Bununla birlikte, yüksek Se kan seviyeleri toksisiteye neden olabilir.

Selenyum oksidatif stresi, iltihaplanma, apoptoz, kontrolsüz hücre çoğalması, hormon üretimi, anjiyogenez ve bağışıklık fonksiyonu ve DNA metilasyonunu etkiler. Selenyumun hem *in vitro* hem de *in vivo* insülin benzeri etkileri vardır. Ayaz ve vd. selenyum kalp, böbrek ve trombosit kusurlarını içeren modellerin tedavisini ve diyabet hayvanında hastalık semptomlarını hafifletir. Son 10 yılda, seleno protein genlerinde hastalıkla ilişkili polimorfizmlerin keşfi, selenoproteinlerin sağlıkla ilişkisine dikkat çekmiştir. Düşük selenyum durumu, artan ölüm riski, zayıf bağışıklık fonksiyonu ve bilişsel gerileme ile ilişkilendirilmiştir. Daha yüksek selenyum durumu veya selenyum takviyesi üreme, otoimmün ve tiroid hastalığı riskini azaltır ve selenyum antiviral etkilere sahiptir. İnsanlarda, selenyumun beslenme işlevi, aktif merkezlerinde selenosistein bulunan 25 selenoprotein tarafından sağlanır. Düşük selenyum durumunda bazı selenoproteinlerin (örneğin, glutatyon peroksidaz, GPx4) sentezi diğerlerine göre önceliklidir. Selenyum takviyesi, selenyum eksikliği olmayan bireylerde bile, aktive edilmiş T hücrelerinin proliferasyonunda bir artış ile artan sitotoksik lenfosit aracılı tümör sitotoksisitesi ve doğal öldürücü hücre aktivitesive belirgin immüno-uyarıcı etkileri göstermiştir (Hoffmann ve vd., 2010). Selenoproteinler, aktifleştirilmiş T-hücre fonksiyonu için gereklidir. T hücreleri özellikle oksidatif strese duyarlıdır ve selenoprotein eksikliği olan T hücreleri çoğalamaz. Bu nedenle reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılayamayarak T-hücresi-reseptör stimülasyonuna yanıt veremez (Carlson ve vd., 2010). Selenyum, İnterlökin 2 ve reseptörü arasındaki etkileşimlerle T-hücre proliferasyonunu yönlendirir. İnsan çalışmaları yüksek afiniteli interlökin-2 reseptörünün artan ekspresyonundan önce selenyum takviyesi ile lenfosit proliferasyonu arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. İnsan denekler üzerinde yapılan 9 yıllık bir çalışma sonucunda kan serumundaki selenyum miktarının azalması ile diyabet riskinin artması arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir (Akbaraly ve vd., 2010).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Son yıllarda diyabetik komplikasyonların tedavisi, yeni biyobelirteçlerin keşfi için büyük çaba sarf edilmektedir. DM'nin kökeni, teşhisi ve tedavisi için reaktif değil önleyici tedavilerin kullanılması DM ile mücadelede önemli bir basamaktır. Glikoz 1962'den itibaren hiperglisemi için biyobelirteç olarak kabul edilir (Dall ve diğerleri, 2014). Ayrıca, şeker hastalarının kesinliğinin belirlenmesi için glikoz ölçümü farklı kategorilere ayrılmıştır. Kan, idrar ve tükürük gibi matrislerde glikoz ölçümü için Açlık Plazma Glikozu (FPG), 2-h Plazma gibi testler, Glikoz (2hPG), Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT), Rastgele Plazma Glikoz testi (RPG), Glycated Hemoglobin (HbA1C) çeşitli yöntemler geliştirmeye odaklanılmıştır (Liu ve vd.,2018)

Araştırmacılar, glutamik asit dekarboksilaz otoantikorları (GADA), insülin otoantikorları (IAA), insülinoma ile ilişkili 2-otoantikorlar (IA-2A), adacık hücresi sitoplazmik otoantikorlar (ICA), C-peptid, Metilglioksal (MG), (Beisswenger, 2014), lipid metabolomikleri, alternatif biyobelirteçler üzerinde çalışmıştırlar.

Metilglioksal (MG), biyolojik olarak önemli bir diyabet belirtecidir ayrıca hipertansiyon, nöropati, nefropati, oksidatif stres gibi çeşitli metabolik düzensizliklere neden olur. Ayrıca MG, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) baskın bir öncüsüdür ve protein disfonksiyonu, vasküler dokuların glikasyonu ve yaşlanmaya neden olur (Bhat ve vd. 2019).

MG'nin sentezi, karakterizasyonu ve kimyasal etkileşimleri 19. yüzyılın son yirmi yılından beri bilim insanları arasında ilgi görmüştür (Baumann, 1885; Witt ve diğerleri, 1987).

MG, canlı organizmalarda (Vander Jagt ve Hunsaker, 2003) glikoliz sürecinde bir ara ürün olarak üretilen (Kalapos, 2008; Thornalley, 1996) elektrofilik bir α, β-dikarbonil bileşiğidir (Desai ve vd., 2010).

MG'ın aktif işlevsellikle güçlü etkileşimi proteinlerdeki arginin gruplarının yüksek derecede reaktif doğasını etkiler ve glikoliz işlemi sırasında lizin grupları ile glikozdan daha hızlı reaksiyona girer(Thornalley ve Rabbani, 2011).

Diyabet teşhisi için AGE'lerin oluşum yolağında, MG'nin oluşum mekanizmalarını tespit etmek AGEs tespitinden daha önemlidir. Eşzamanlı olarak, beslenme yöntemi, yaşam tarzı MG'nin aşırı üretimini tetikler. Bu fiziksel ve kimyasal şartlar hiperglisemi sırasında hücrelerin içindeki ve dışındaki MG konsantrasyonunu önemli ölçüde artırır.

Spesifik olarak, MG ve AGE üretimi hiperglisemik koşullarda 2-4 kat artar (Rabbani ve Thornalley, 2014). Normal koşullarda MG glioksalaz(GLO I ve GLO II enzimler) sistemiyle detoksifiye edilebilir.

Diyabet varlığında, Ig ve diğer dolaşımdaki ve doku proteinleri yüksek glikoz konsantrasyonuna maruz kalır. Ig'nin immünolojik önemi nedeniyle, glikasyonlarının özel bir önemi vardır ve bu konuda birçok makale yayınlanmıştır. Örneğin, diyabetik deneklerde glikolize IgG'de önemli bir artış, afnite kromatografisiyle bulunmuştur (Danze ve diğerleri, 1987);

ACE2'nin enzimatik olmayan glikasyonunun meydana geldiği düşünüldüğünde, bunun glikolize edilebilecek amino asit (çoğunlukla lizin) açısından protein üçüncül yapısını değiştirmedeki olası patojenetik rolü dikkate alınmalıdır. Diyabet hastalığında ayrıca immünoglobulinler (IgG) yüksek glikoz konsantrasyonları; MALDI/MASS Spektrometresi yaklaşımını kullanarak, IgG üzerinde yoğunlaştırılan glikoz moleküllerinin sayısının glikoz seviyeleriyle ilişkili olduğunu ve zayıf kontrol edilen diyabet durumunda 20 glikoz molekülünün IgG'nin lizin kalıntılarıyla enzimatik olmayan bir şekilde reaksiyona girdiği gösterilmiştir. IgG üzerinde kütle spektrometrisi ve bilgisayar-moleküler modelleme ile yapılan diğer deneyler, Fab fragmanlarının, özellikle hafif ve ağır değişken bölgelerde glukoz tarafından saldırıya daha yatkın olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle, diyabetli kişilerde gözlenen bağışıklık yetersizlikleri, Fab fragmanının aşırı glikasyonuna bağlı olabilir, antikor ve antijen arasındaki moleküler tanıma sürecini inhibe edebilir.

Diyabetik deneklerin serumundan izole edilen özellikle Fab parçalarının tercihli glikasyonu IgG'nin Fd bölgesinde tespit edilmiştir ancak glikolize IgG1'den boronat desteklere hafif zincirin bağlanmasını tespit edemediler. Ayrıca Menini ve vd. esas olarak IgM'nin Fab bölgesinde glikasyonun meydana geldiğini öne sürdü. IgG'de Fab'da, Fc bölgesinde olduğundan daha fazla glikasyon sahası mevcuttur.

Monoklonal antikorların glikasyonu sonucunda antijenlere bağlanma yeteneklerini bozduğuna dair ikna edici kanıtlar sağlamıştır. Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışmada, antijen glikasyona bağlı inaktivasyona karşı, anti Cu'nun, Zn-süperoksit dismutaz enzimi antikorları koruyabilir. Polifenoller bitkilerde doğal olarak bulunur ve yararlı olarak kabul edilir (Xie, Xiao, Kai ve Chen, 2012). Bu antioksidanlar, zararlı serbest radikalleri temizler. Polifenoller, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kronik hastalıkların ve nörodejeneratif bozukluklar gibi patolojik koşullar

altında hücresel sinyal yolakları ile riski azaltma kapasitesine sahiptir. Polifenoller antialerjik, antiviral/antibakteriyel ajanlar, antifungal/antikanser ajanlar olarak çeşitli hastalıkların önlenmesinde çeşitli şekillerde biyolojik aktivitelere sahiptir (Gothai ve diğerleri, 2016). GO ve MGO gibi AGE'lerin öncüleri polifenoller tarafından inhibe edilmiştir (Yu Wang & Ho, 2012). İnsanlarda bulunan AGE'lerin iki ana öncüsü olan MGO ve GO çok reaktiftir ve serbest lizin ve arginin kalıntılarını değiştirir (Nagaraj ve diğerleri, 2002). Polifenoller lizin ve arginin ile rekabet etme yeteneği vardır ve bu nedenle AGE'lerin gelişimini engeller. Bazı polifenoller tipik bir AGE inhibisyon ajanı olan aminoguanidinden daha fazla MGO yakalar (Thornalley,2003).

Glikoz-BSA sisteminde, p-kumarik asit dışında tüm denenmiş fenolik asitler belirli bir derecede AGE inhibitör yeteneklerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Oleik asit-BSA sisteminde tüm test edilen fenolik asitler AGE'lerin gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Virk ve Chen, 2016).

Selenyum oksidatif stresi, iltihaplanma, apoptoz, kontrolsüz hücre çoğalması, hormon üretimi, anjiyogenez ve bağışıklık fonksiyonu ve DNA metilasyonunu etkiler. Selenyumun hem *in vitro* hem de *in vivo* insülin benzeri etkileri vardır. Ayaz ve vd. selenyum kalp, böbrek ve trombosit kusurlarını içeren modellerin tedavisini ve diyabet hayvanında hastalık semptomlarını hafifletir.

Mitojenik lektinlere yanıt olarak lenfosit proliferasyonu, doğrudan glutatyon (GSH) mevcudiyetine bağlıdır. Böylece proliferasyon, lenfositlere aşırı glutatyon sağlanarak artırılabilir ve mitojenik stimülasyon sırasında mevcut olan hücre içi GSH miktarını sınırlayarak güçlü bir şekilde inhibe edilebilir. Eksojen GSH, sistein ve 2-merkaptoetanol (2-ME), lenfosit proliferasyonunu önemli ölçüde artırabilir ve hücre içi GSH seviyelerini artırabilir. Butiyonin sülfoksimin (BSO) tarafından GSH'den yoksun bırakılan lenfositler, mitojenik lektinlere karşı tam bir blast transasyon tepkisinden geçemez. BSO varlığında mitojenle uyarılan lenfositlerde, hücre içi GSH seviyelerinin zaman profili ilk 24-48 saatte hızlı bir düşüş ve ardından 72-96 saatte <0.5 nmol/107 lenfosit seviyelerine kademeli bir düşüş gösterir. Eksojen GSH, hücre içi GSH seviyelerini kısmen korur ve 2000 μM BSO varlığında bile lenfosit proliferasyonunu tamamen geri yükler. Sistein ve 2-ME gibi diğer tiyoller, 2000 uM BSO varlığında mitojenle uyarılan lenfositlerde hücre içi GSH'nin zaman profilini önemli ölçüde değiştirmez ve bunların proliferasyonu arttırma kapasiteleri, bu koşullar altında tamamen ortadan kalkmasa da büyük ölçüde azalır. Devam eden

GSH sentezi, normal bir proliferatif yanıtı sürdürmek için açıkça gereklidir. Hücre içi GSH seviyeleri başlangıçta tükenirse ve ardından lenfositler BSO varlığında mitojen ile uyarılırsa, eksojen GSH'ye göre proliferasyonu eski haline getirmek için sistein ve 2-ME'nin azalmış bir kapasitesi vardır (Jefferies ve vd., 2003). Eksojen GSH'nin daha yüksek BSO konsantrasyonu ile proliferasyonu eski haline getirme kapasitesi de azalttığı gözlenmiştir. Bu, eksojen GSH tarafından lenfosit proliferasyonunun restorasyonunun, hücre dışı GSH'den çok hücre içi etkilerle daha yakından bağlantılı olduğunu düşündürür. Bu çalışmalar hücre içi GSH'nin lenfosit proliferasyonundaki önemini doğrulamaktadır. Hücre içi GSH'nin temel rolü, sistein ve 2-ME gibi diğer ekzojen tiyollerin varlığında bile gösterilebilir. Lenfosit proliferasyonunun eksojen sistein tarafından arttırılması, doğrudan hücre içi GSH üzerindeki etkilerle bağlantılı gibi görünmektedir, oysa 2-ME ile yapılan artış muhtemelen daha karmaşıktır, ancak açıkça hücre içi GSH üzerindeki etkilerle bağlantılıdır (Daniel ve vd., 1989). Perfüze çalışan sıçan kalbinde, iskemiden sonra kas içi glutamin ve alfa-ketoglutaratta kayda değer bir düşüş oldu. Glutamat veya alfa-ketoglutarat yerine glutamin, iskemi sonrası kalbin performansını kurtarmayı başardı. Araştırmacılar bunun intrakardiyak adenozin trifosfat fosfokreatin (ATP) ve GSH'yi sürdürme yeteneğinden kaynaklanabileceğini düşündüler (Rennie ve vd., 2001).

Selenyum takviyesi, selenyum eksikliği olmayan bireylerde bile, aktive edilmiş T hücrelerinin proliferasyonunda bir artış ile artan sitotoksik lenfosit aracılı tümör sitotoksisitesi ve doğal öldürücü hücre aktivitesive belirgin immüno-uyarıcı etkileri göstermiştir (Hoffmann ve vd., 2010). Selenoproteinler, aktifleştirilmiş T-hücre fonksiyonu için gereklidir. T hücreleri özellikle oksidatif strese duyarlıdır ve selenoprotein eksikliği olan T hücreleri çoğalamaz. Bu nedenle reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılayamayarak T-hücresi-reseptör stimülasyonuna yanıt veremez (Carlson ve vd., 2010). Selenyum, İnterlökin 2 ve reseptörü arasındaki etkileşimlerle T-hücre proliferasyonunu yönlendirir. İnsan çalışmaları yüksek afiniteli interlökin-2 reseptörünün artan ekspresyonundan önce selenyum takviyesi ile lenfosit proliferasyonu arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. İnsan denekler üzerinde yapılan 9 yıllık bir çalışma sonucunda kan serumundaki selenyum miktarının azalması ile diyabet riskinin artması arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir (Akbaraly ve vd., 2010).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Malzeme

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

ECL (Enhanced Chemiluminescence), Tween 20, yağsız süt tozu, selenium, L-gluthatione, oleuropein Sigma-Aldrich, Secondary antibody anti rabbit IgG, HRP-linked Antibody (7074S Cell Signaling Technology), Primary antibody human IgG polyclonal antibody (PTG10284-1-AP proteintech) IgG, gallic acid, D-fructose, aminoguanidine (AG), agarose, ethanol, folin-Ciocalteu's phenol reagent (FCR), quercetin, nitro blue tetrazolium chloride (NBT), CR(congo red), guanidine hydrochloride, Iron(III) chloride tetrahydrate, sodium azide, 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), Girard′s reagent T, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), trichloroacetic acid (TCA), sodium dodecyl sulfate (SDS), bromophenol blue, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA),

3.1.2 Kullanılan Aletler

UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu, UV/Visible Recording spektrofotometre), Jel Görüntüleme Sistemi (Bio Rad Gel Doc XR), Elektroforez (Bio Rad mini protean), Santrifüj (Hettich marka, Universal 320 R), Otoklav (Hiramaya), Terazi (Metler Toledo), Vortex (Heidolph), pH metre (Metler Toledo), Soxhlet (Heidolph marka), Evaporatör, Derin dondurucu (Vestel), Buzdolabı (Vestel), Mikrodalga(Arçelik), Çalkalayıcı(Memmert), Mikropipet (Ependorf), Filtre (Schleicher-Schvell), Blender, Floresans Spektrofotometresi, Laminar air flow (Kendro-Hera KS12), vakumlu evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin.)

3.1.3 Etik Beyan

Çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 20/05/2022 tarihinde onaylandı (sertifika onay no: 95).

3.2 Yöntem

3.2.1 Selenyum, Oleuropein ve Glutatyon karışımını hazırlama

Selenyum, oleuropein ve glutatyon vücudun günlük ihtiyacı olan doza göre hesaplandı (Selenyum, 10 µg/kg, L-Glutatyon 15 µg/kg, Oleuropein 7mg/kg). Bu maddelerin bir karışımı hazırlandı. Tüm deneysel çalışmalarda bu karışım

kullanılmıştır. Hazırlanan karışımın antioksidan aktiviteleri aşağıdaki yöntemlere göre tespit edildikten sonra diğer çalışmalara devam edilmiştir.

3.2.2 DPPH radikali söndürme aktivitesi

Antioksidant maddelerin DPPH radikalini söndürme etkileri, kendi hidrojenlerini radikale verebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. DPPH serbest ve kararlı bir radikaldir, 1 elektron veya hidrojen alarak kararlı diamagnetik bir moleküle dönüşür. DPPH radikalini söndürme aktivitesi diğer metotlara kıyasla antioksidant aktiviteyi kısa zamanda kıyaslayabilme imkânı sağladığından daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Gülçin ve vd., 2004). Bu yöntem absorbansın azalması temeline dayanır. DPPH üzerindeki ortaklanmamış elektron görünür bölgede 517 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Antioksidant molekül ile DPPH arasındaki reaksiyon DPPH'in ortamdaki derişiminin azalmasına yani absorbansın düşmesine neden olur. Sonuçta oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H 'dır Reaksiyon sırasında karışımın rengi mordan sarıya döner. Çalışmada kullanılan oleuropein, glutation ve selenyum karışımının 1 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Seyreltmeler, 5-250 µg/ml konsantrasyonlarda stok çözeltilerden yapıldı. %96 etanol içinde 0.1 mM DPPH çözeltisi hazırlandı. 3 ml seyreltilmiş mix ve bunlara 1 ml 0.1 mM DPPH solüsyonu eklenmiştir. Tüpler vortekslenerek iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi Ardından 517 nm'de absorbans okundu ve % İnhibisyon hesaplandı (3.1).

$$\%I = \frac{A_{\text{Control}} - \text{Sample}}{A_{\text{Control}}} \text{ x } 100 \qquad (3.1)$$

3.2.3 OH radikali söndürme aktivitesi (Deoksiriboz yöntemi)

Çalışmada kullanılan karışımın hidroksi radikalini söndürme aktivitesi deoksiriboz yöntemi ile $Fe^{2+/}$askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde incelenmiştir. Malondialdehit (MDA), hidroksi radikalinin deoksiriboz saldırısından sonra oluşur. Ortaya çıkan MDA, pembe renkli bir MDA-TBA kompleksi oluşturmak için TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girer (Wang ve ark, 2003). Reaksiyon karışımı sırasıyla 100 µl 1 mM EDTA, 10 µl 0,1 mM FeCl3, 100 µl 50 mM H_2O_2 , 360 µl 2,8 mM deoksiriboz, 1 ml ekstrakt (50-500 µg/ml), 330 µl 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu ve 100 µl 0,3 mM askorbik asit içermektedir. Karışım 37 ºC'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdan 1 ml alınıp üzerine 1 ml % 10'luk TCA ve 1 ml % 0.5'lik TBA (0.025 M NaOH içinde % 0.025 BHA içerecek şekilde hazırlanacak)

ilave edildi. Daha sonra 100ºC'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı (pembe renk oluşana kadar). İnkübasyon örnekleri buzda soğutulduktan sonra 532 nm'de UV spektroskopide absorbans değerleri ölçüldü (Mazumder ve vd., 2005). Pozitif kontrol BHA kullanıldı. Negatif kontrol, mix ve pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi (3.2).

$$\%I = \frac{A_{\text{Control}} - \text{Sample}}{A_{\text{Control}}} \text{ x } 100 \qquad (3.2)$$

3.2.4 Protein glikasyonu(*in vitro*)

0.8 µM 6 mg IgG, 0.02 mol/l fosfat tampon pH 7.2 içinde 5 mM fruktoz ile inkübe edildi. Tampona %0.02 sodyum azid eklendi. Pozitif kontrol olarak 9 mM aminoguanidin kullanıldı. 100, 250, 500 µg/ml oleuropein, glutatyon ve selenyum karışımı kullanıldı. 28 gün 37°C'de steril aerobik koşullarda inkübe edildi. Aynı koşullar altında fruktoz olmadan inkübe edilen IgG, kontrol olarak görev yaptı. 0, 7, 14, 21, 28. günlerde alınan örnekler +4°C 'de 24 saat diyaliz edilerek bağlanmamış şekerler uzaklaştırıldı ve aşağıdaki parametreler ile analizleri yapıldı (Miyazana ve vd. 1998).

3.2.5 Bağlanmamış şekerlerin diyaliz yöntemiyle uzaklaştırılması

Çalışma prensibi, maddenin çok yoğun bir ortamdan daha az yoğun bir ortama geçişini yarı geçirgen bir zar yardımıyla sağlamak esasına dayanır. Bu yöntem kullanılarak, bağlanmamış şekerler uzaklaştırılır. Örnekler bir pipet ile diyaliz tüplerine aktarılır. Fosfat tamponuna konur ve tamponlar 8 saatte bir değiştirilir. 24 saat sonra işlem durdurulur.

3.2.6 α-Dikarbonil bileşik tayini

İmmünoglobulin G-fruktoz sisteminde inkübe edilen örneklerdeki α-dikarbonil bileşiği miktarı Griard-T yöntemi ile belirlendi. Glikolizlenmiş materyalden yaklaşık 20 µl alınıp 80 µl saf su ve 50 µl Griard-T reaktifi ve 850 µl sodyum format (pH:2.9) ile test tüpünde karıştırılıp 25 ºC 'de 1 saatlik inkübasyon sonunda 290 nm'de absorbans değerleri okundu. AG pozitif kontrol olarak kullanılacak (Wang ve vd., 2011).

3.2.7 Fruktozamine testi

Kalorimetrik bir testtir. Alkali çözeltide serum proteinlerinin glikasyon derecesi ölçülerek belirlenir. Amadori bileşikleri nitroblue tetrazolyumu (NBT) indirgeyerek

mor renkli tetrazinol radikal (NBT^{+}.) ürününü meydana getirirler. Amadori bileşikleri, mor bir tetrazinol radikali (NBT^{+}) oluşturmak için nitromavi tetrazolyumu (NBT) azaltır. IgG-Fruktoz sisteminde inkübe edilen örneklerdeki fruktozamin miktarı Baker, Zyzak ve Baynes'in (1994) yöntemine göre belirlendi (Song ve vd., 2021). Glikolizlenmiş materyal (0.2 ml), sodyum karbonat tamponu (100 mM, pH 10.35) içinde hazırlanmış nitro blue tetrazolyum (0.8 ml) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılıp ve 530 nm absorbans değerleri ölçüldü. AG pozitif kontrol olarak kullanıldı (Baker ve vd., 1994).

3.2.8 Kongo kırmızısı spektral kayma

0. 7, 14, 21, 28. günlerde alınan 1 mg/mL'ye seyreltilen kontrol IgG- fruktoz ve IgG-fruktoz-mix numuneleri, 50µM kongo kırmızısı 20 dakika boyunca 20 mM fosfat tamponu (pH 7.8) ve içinde inkübe edildi. Tüm numunelerin absorbans değerleri 300 nm'de okundu. Kongo kırmızısı içermeyen çözeltilerin spektrumları negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Khanam ve vd., 2021).

3.2.9 UV-visible spektroskopi yöntemi

0. 7, 14, 21, 28. günlerde alınan 1 mg/mL'ye seyreltilen kontrol IgG- fruktoz ve IgG-fruktoz-mix numunelerinin UV absorpsiyon ölçümleri, 1.0 cm yol uzunluğunda bir küvet kullanılarak Shimadzu spektrofotometrede 200-400 nm arasındaki absorpsiyon ölçülerek elde edildi. Analiz için toplam 1.0 ml hacimde 300 µg numune alındı. UV-1700 Spektrofotometre üzerinde kuvars küvet kullanılarak, doğal IgG-fruktoz sisteminde IgG'nin emildiği dalga boyu aralığı 200-400 nm'de tarandı (Shaklai ve ark,1984).

3.2.10 Floresan spektroskopi yöntemi

0. 7, 14, 21, 28. günlerde alınan 1 mg/mL'ye seyreltilen kontrol IgG- fruktoz ve IgG fruktoz - mix numunelerinin (25 ± 0.2 °C'de) 285 nm'de uyarılma ve emisyon aralığı 310–460 nm'de ölçüldü. Numunelerin uyarıldıkları dalga boyunda floresans yoğunlukları hesaplandı, grafiği çizildi (Wani ve vd. 2012).

3.2.11 İçsel floresans ölçümü

Floresans spektroskopisi, daha önce tarif edildiği gibi glikasyonlu proteinlerdeki aromatik amino asitlerin (Phe, Tyr & Trp) içsel floresan özelliklerindeki değişiklikleri tespit etmek için gerçekleştirilmiştir (Ahmadve ark,, 2012) 0, 7, 14, 21,

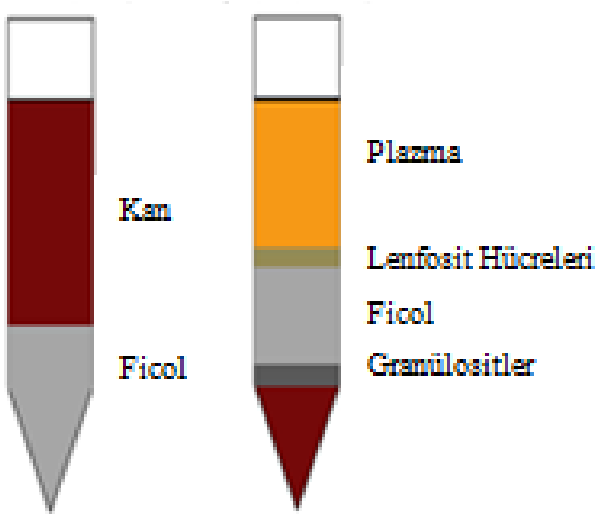
28. günlerde alınan 1 mg/mL'ye seyreltilen kontrol IgG- fruktoz ve IgG-fruktoz-mix numunelerinin (25 ± 0.2 °C'de) ölçümü yapıldı. Kısaca, doğal ve glikasyonlu numunelerin emisyonu 340 nm'de kaydedildi. 280 nm'lik dalga boyu, triptofan kalıntısının uyarılmasına özgüdür (Afreen ve vd., 2020).

3.2.12 Agaroz jel elektroforezi(IgG-Fru-DNA Sistemi)

50 mM ve 7, 14, 21, 28. gün fruktozile IgG örnekleri pBR 322 plazmid DNA ile 8 gün inkübe edilerek karışımın etkisi incelendi. Numunelerin alkali ve non-alkali koşullarda elektroforetik göç modeli gözlemlendi. Alkalin jel elektroforez tamponu (50 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH 8.0) eklenerek hazırlandı. Numuneler etanol ile çökeltilerek ve alkalin yükleme tamponu hazırlandı (50 mM NaOH, 1 mM EDTA, %5-10 gliserol, % 0.025 bromofenol mavi). Farklı derişimlerde hazırlanan numuneler jel kuyularına yüklendi ve 120 V/cm'de 3 saat boyunca elektroforezlendi. Jel, etidyum bromid (0.5 mg / ml) ile lekelendi, UV ışık altında aydınlatılarak incelendi ve fotoğraflandı. Alkali koşullarda numunelerin elektroforetik migrasyon paterni gözlendi (Zaman ve vd.,2017; Green ve vd.,2019).

3.2.13 İnsan kanından lenfosit hücre izolasyonu (PBL izolasyonu)

Sağlıklı, yetişkin, gönüllü (18-35 yaş; 10 kişi) donörlerden alınan 10 mL kan, fikollü gradiyent santrifüj yöntemi ile EDTA'lı antikoagülan tüplerde lenfositlere ayrıldı. Ortada kalan beyaz nebula hücre tabakası pipet yardımı ile dikkatlice çıkarıldı (Şekil 3.1). Dikkatlice alınan hücreler 3 kez RPMI-1640 medyumu ile yıkandı. İnkübasyona bırakılan hücreler, Tyrpan blue yöntemi (Fuss ve vd., 2009)ile sayıldı.



Şekil 3.1 İnsan Kanından Lenfosit hücre izolasyonu

3.2.14 Fruktoz kaynaklı lenfosit hücre hasarı

Her kuyucuğa 100 µL lenfosit hücresi ve 1M 20 µL fruktoz eklendi (mL başına 100 hücre olduğu varsayıldı) (Miyazawa ve vd., 1998). Mix koyulacak kuyucuklara 20 µL mix eklendi. Kuyucukların toplam hacmi 200 µL olacak şekilde DPBS ile tamamlandı. Çalışmada fruktoz kaynaklı lenfosit hücre hasarı üzerine oleuropein, glutatyon ve selenyum karışımının artan konsantrasyonda etkisi incelenmiştir (toplam hacim 200 µL). Kontrol olarak AG kullanıldı(48 saat inkübasyon). Tyripan blue ile boyanan hücrelerde sayım yapıldı (3.4).

$$Viable\ cells\ count(live\ cell\ per\ mL) = \frac{\text{number live cells counted}}{\text{number of large corner squares counted}} \text{ x Dilution factor x } 10.000 \quad (3.4)$$

3.2.15 SDS PAGE

0, 7, 14, 21, 28. günlerde alınan 1 mg/mL'ye seyreltilen kontrol IgG- fruktoz ve IgG-fruktoz-mix numunelerinde SDS-PAGE protein jel elektroforez yöntemi uygulanarak glikasyon ve mixin etkisi tespit edildi. 20 µL glikasyona uğramış örneklerin üzerine 10 uL numune tamponu eklenerek 5 dk boyunca kaynatıldı ardından alınan numuneler ve moleküler weight kuyucuklara yüklendi. BioRad tankındaki her bir jel için 90 mAmp ve 300 volt uygulanarak 180 dakika süreyle tamponda yürütüldü.

3.2.16 Western Blotting yöntemi

Glikasyonla uğramış (lenfosit/fruktoz sistemi ve karışım sistemi) SDS-PAGE protein jel elektroforez yöntemi uygulandı. 20 µL glikasyona uğramış örneklerin üzerine 10 uL SDS-PAGE numune tamponu eklendi. BioRad tankındaki her bir jel için 90 mAmp ve 300 volt uygulanarak 180 dakika süreyle tamponda yürütüldü.

SDS PAGE çalışması bittikten sonra, jeller bir transbloting sistemi (80mA 7dk, BIO-RAD) ile PVDF membranına aktarıldı. Yağsız süt tozu ve TBST karışımı, spesifik olmayan bağlanmayı en aza indirmek için bir çalkalayıcıda 1 saat süreyle uygulandı. Yağsız süt tozu ve TBST çözeltisindeki proteinler, hedef proteinin bulunmadığı zar üzerindeki tüm bölgeyi kaplar. Bu nedenle, kullanılan birincil antikor yalnızca hedef proteine bağlanır. Sonuç olarak kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlardan kaçınılır. Membran birincil antikoru insan IgG poliklonal antikoru (PTG10284-1-AP proteintech), bir gece çalkalayıcıda +4°C'de inkübe edildi. Membran, antikoru temizlemek için TBST ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Sekonder

antikor anti tavşan IgG, HRP-bağlı Antikor (7074S Hücre Sinyal Teknolojisi) +4°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra TBST ile 3 kez 10 dakika, distile su ile 2 kez 2 dakika yıkandı. Daha sonra ECL substratı ile 5 dakikalık bir film oluşturuldu ve membran cihazın içine yerleştirildi ve görüntüleme yapıldı (BIO-RAD ChemiDoc MP, Image lab).

3.2.17 İstatistiksel analiz

İstatistikte kullanılan varyans analizi kavramı birçok istatistiksel yöntemi içinde barındıran bir yöntemler topluluğunun genel adıdır. Varyans analizinin en basit formu tek yönlü varyans analizi bir başka ifade ile One-Way ANOVA'dır (analysis of variance).

ANOVA bir sayısal değişken en az 3 grupta karşılaştırılmak istendiğinde kullanılır. Bu test öncelikli olarak gruplardan en az birinin diğerlerinden farklı olup olmadığını test eder. ANOVA testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir P değeri bulunursa yani $P<0,05$ ise hangi gruplar arasında fark olduğunun ortaya konması için çoklu karşılaştırma testleri (Post-hoc testler) kullanılır. Çalışmada One-Way ANOVA'dır (analysis of variance) yöntemi kullanıldı. Veriler ortalama±SD olarak sunuldu. Verilerin istatistiksel önemi olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Biyokimyasal Aanliz

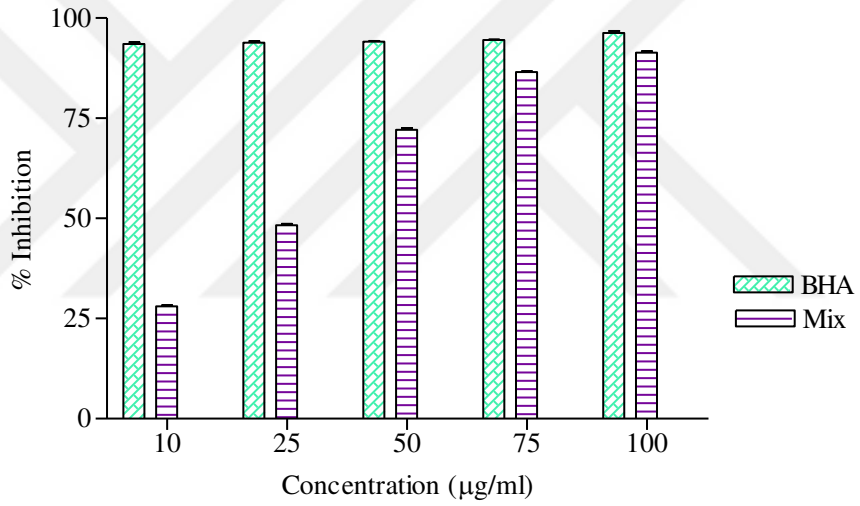
4.1.1 DPPH radikali söndürme aktivitesi

Karışımın DPPH radikali söndürme aktivitesi 10-100 µg/ml aralığında 5 konsantrasyonda çalışıldı.

$\%I = \frac{A_{Control} - Sample}{A_{Control}} \times 100$ ül ile % İnhibisyon değeri hesaplanmıştır. (4.1)

Karışım, %28.08 ile %91.41 arasında DPPH radikalini söndürme aktivitesi gösterdi. Konsantrasyon arttıkça karışımın inhibisyon değerinin pozitif kontrole yaklaştığı grafikte görülmektedir.

BHA, %93,50 ile %96,30 arasında söndürme aktivitesi gösterdi (Şekil4.1).



Şekil 4.1 Karışımın farklı konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 75,100 µg/ml) DPPH radikali üzerindeki söndürme etkisi.

Antioksidanlar, reaktif serbest radikaller tarafından oluşan oksitleyici zincir reaksiyonları hayati moleküllere zarar vermeden önce inhibe edebilen moleküllerdir. Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler bozukluklar, nörolojik hastalıklar, kanserden parkinson hastalığına kadar pek çok hastalığa neden olurlar. Antioksidanlar doğal olarak veya sentetik kimyasal süreçlerle oluşur. Doğal antioksidan örnekleri E vitamini, C ve β-karoten gibi moleküllerdir. Sentetik antioksidanlar ise tertbütilhidrokinon (E-319), bütillenmiş hidroksil anisol (BHA; E320) bütillenmiş hidroksitoluen (BHT; E321) ve propil galat (E-311) gibi moleküllerdir (Wollinger ve vd., 2016). Antioksidan aktiviteyi belirlemeye yönelik güncel yöntemler şunlardır:

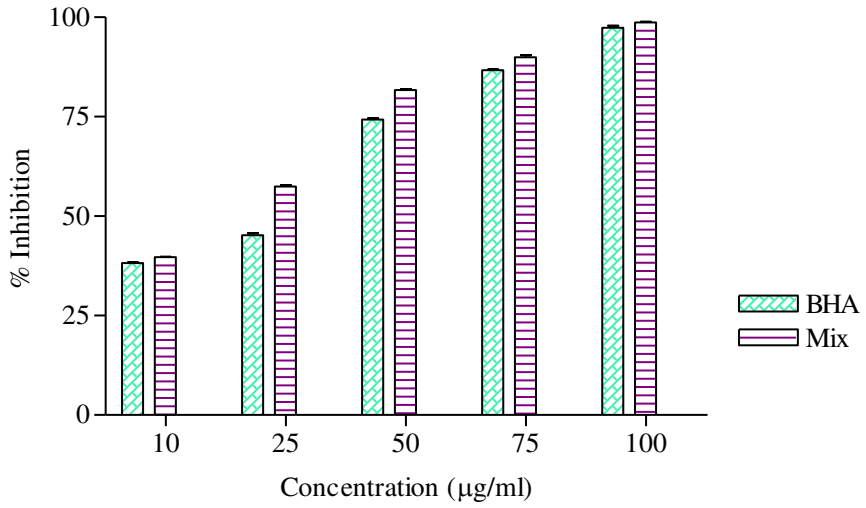
Hidrojen yoluyla spektrofotometrik belirlemeye dayalı atom transferi (HAT) ve tek elektron transferi (SET). Bu testler 2,2e-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) testi, 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazil (DPPH) radikali söndürme aktivitesi, oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC) testleridir. Bu yöntemler arasında en yaygın ve en basit olarak kullanılan yöntemlerden başlıcası DPPH metodudur. Mor renkli DPPH radikalinin bir hidrojen atomu aracılığıyla antioksidan tarafından indirgenmesi ile rengin kararlı soluk sarı DPPH moleküllerine dönüşmesine neden olur. Kalan mor renkli DPPH radikali antioksidan aktiviteyi belirlemek için UV-Vis spektrofotometre ile 515-520 nm ölçülür. Bu test kullaılan antioksidan maddenin hidrojen atomlarını verme kapasitesi ve serbest radikaller arasındaki indirgeme kapasitesi hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan BHA konsantrasyondan bağımsız olarak DPPH radikali söndürme aktivitesi gösterirken kullanılan mix konsantrasyon arttıkça DPPH radikalini söndürme aktivitesi de artmıştır. Mix'in içerdiği selenyum, glutatyon ve oleuropeinin ayrı ayrı serbest radikal söndürme aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. Fakat karışım halinde kullanıldığında da sinerjik etkiye uğramadan DPPH radikalini artan konsantrasyonlarda söndürdüğü tespit edilmiştir.

4.1.2 OH radikali söndürme aktivitesi (Deoxyribose assay)

Karışımın OH radikali söndürme aktivitesi 10-100 µg/ml aralığında 5 konsantrasyonda çalışıldı.

$\%I = \frac{A_{\text{Control}} - \text{Sample}}{A_{\text{Control}}} \times 100$ ül ile % İnhibisyon değeri hesaplanmıştır. (4.2)

BHA, pozitif kontrol olarak kullanıldı. Karışım, %39.68 ve %99.67 aralığında hidroksi radikali söndürme aktivitesi gösterdi. Karışımın konsantrasyonu arttıkça Pozitif kontrol olarak kullanılan BHA'dan daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği grafikte görülmektedir. BHA, %38.21 ve %97.39 aralığında hidroksi radikal söndürme aktivitesi gösterdi (Şekil 4.2).



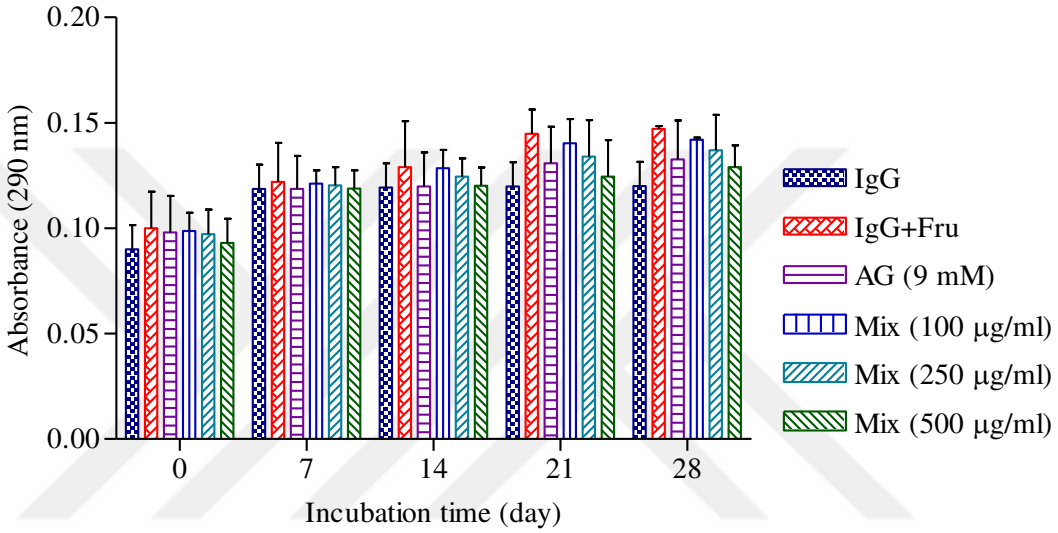
Şekil 4.2 Karışımın farklı konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 75, 100 µg/ml) OH radikali üzerindeki söndürme etkisi.

Canlı sistemde, geçiş metali ile H_2O_2 iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakarak ve indirgenmiş formlara sahip son derece reaktif ·OH radikali oluşur. H_2O_2'nin demir tuzuna bağlı ayrışmasına Fenton reaksiyonu denir. Fenton reaksiyonları, indirgeyici ajanların eklenmesiyle hızlandırılabilir, böylece biyolojik moleküle daha fazla zarar verir. Süperoksit radikali, demir kompleksinin indirgenmiş formunu üreterek demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonunu hızlandırabilir. Askorbik asit varlığında demir(III)-EDTA ile H_2O_2 arasındaki reaksiyonda oluşan hidroksil radikali, düşük pH'ta tiyobarbitürik asit (TBA) ile ısıtıldığında deoksiriboz ile pembe bir kromojen veren ürünler oluşturur. EDTA tarafından söndürülmekten kurtulan hidroksil radikali, deoksiriboz molekülüne ve mevcut herhangi bir bileşiğe saldırmak için yarışacaktır. Hidroksil radikalinin hedefle reaksiyona girme hızı, bu reaksiyon için hız sabitlerine ve konsantrasyonlara bağlıdır. Bundan dolayı hem pozitif kontrol olarak kullanılan BHA hem de mix konsantrasyon arttıkça OH radikali ile yarışarak radikali söndürme eğilimi göstermiştir.

4.1.3 α-Dikarbonil bileşik tayini

α-karboniller, dehidrasyonla oluşan oldukça aktif Maillard reaksiyon ara maddeleridir. Fruktoz biyolojik makromolekülleri değiştirerek metabolize olurken, dikarbonil bileşenleri ve ROS (Yang ve vd.,2023) oluşumuna neden olabilir. Fruktoz serbest radikalleri savunma sistemine zarar verir. Fruktoz ile 28 gün inkübasyona bırakılan IgG proteininin artan konsantrasyonlarda Mix (100–500 µg/ml) ile

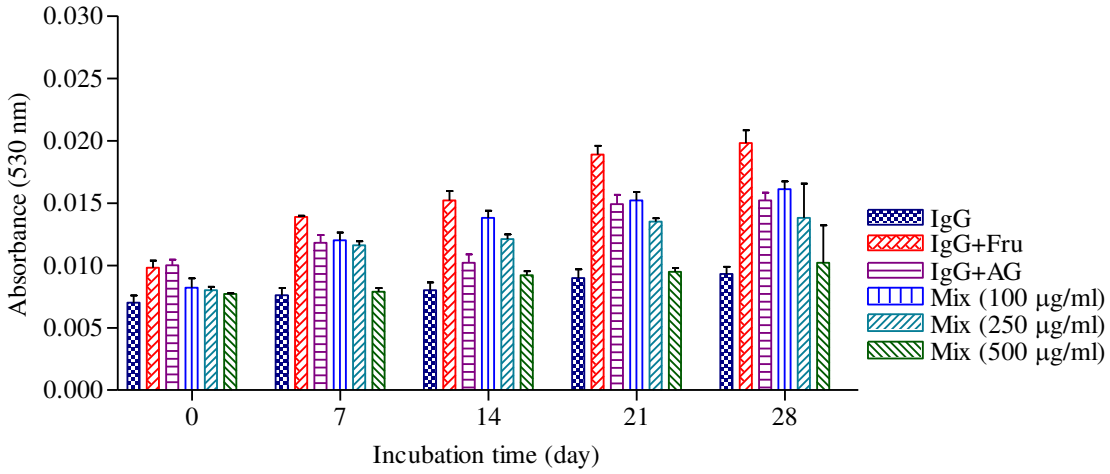
antiglikasyon aktivitesi 290 nm'de absorbans ölçümü ile belirlendi. IgG+Fru sisteminde günler ilerledikçe α-karbonil bileşiklerinin oluşumunun arttığı gözlemlendi. Karışımın (100–500 µg/ml) artan konsantrasyonlarının erken ve ileri aşamalarda α-karbonil bileşenlerini inhibe ettiği gözlendi Çalışmada antiglikasyon ajanı olarak kullanılan karışım, IgG'ye dikarbonil bağlanmasını engelleyerek erken dönemde glikasyonu inhibe ettiği grafikte görülmektedir. AG (9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 4.3)



Şekil 4.3 Karışımın farklı konsantrasyonlarının (100–500 µg/ml) 0-28 gün aralığında α-dikarbonil bileşiği üzerindeki etkisi. AG pozitif kontrol olarak kullanıldı.

4.1.4 Fruktozamine testi

28 gün boyunca fruktoz ile hasara uğrayan IgG, NBT boyası kullanılarak Fruktozamin testi yapıldı. Bu çalışmada fruktozamin sarı renkli NBT boyasını mor monoazan'a indirgemekte ve 530 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. Amadori ürünlerinin oluşumu 28. güne kadar devam etti. 28 gün içinde fruktozamin içeriği zirveyi gösterdi. Daha sonra artan konsantrasyonlarda kullanılan karışım ile fruktozamin içeriği azalmaya başladı. Son iki hafta içinde amadori ürünleri AGE'lere dönüştürüldüğünden, düşük konsantrasyonda mixin inhibisyonu az miktarda gözlemlendi (Şekil 4.4). AG (9mM), pozitif kontrol olarak kullanıldı.

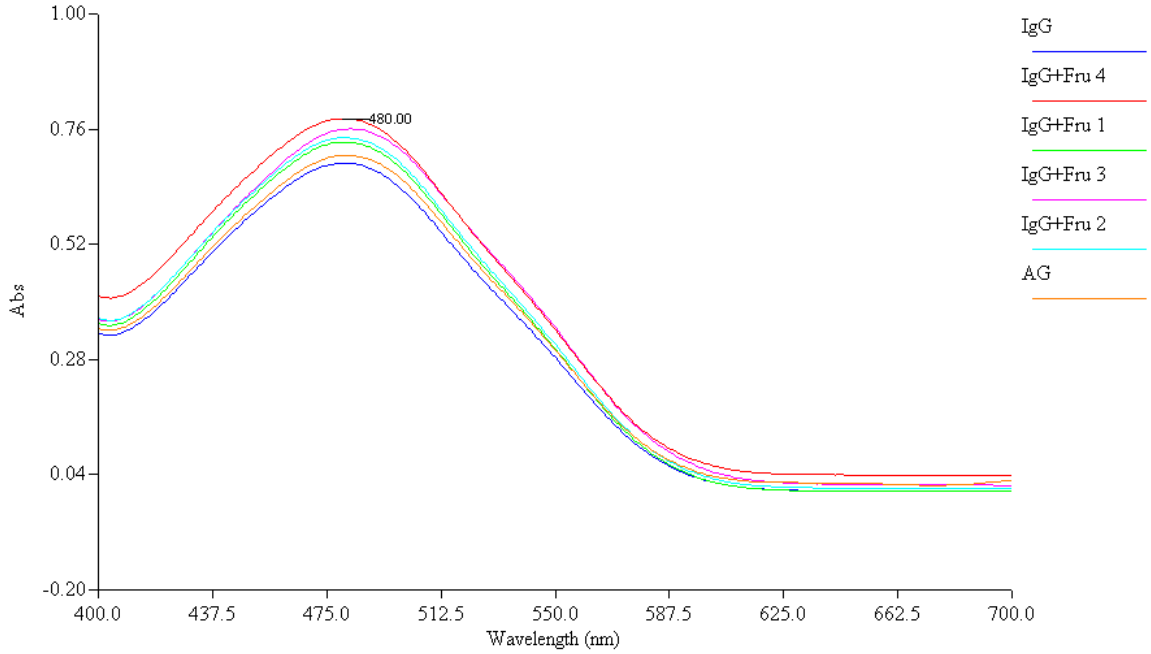


Şekil 4.4 Karışımın (100-500 µg/ml) IgG/fruktoz sistemindeki fruktozamin düzeyi üzerindeki etkileri. Pozitif kontrol olarak ve AG(9 mM) kullanıldı.

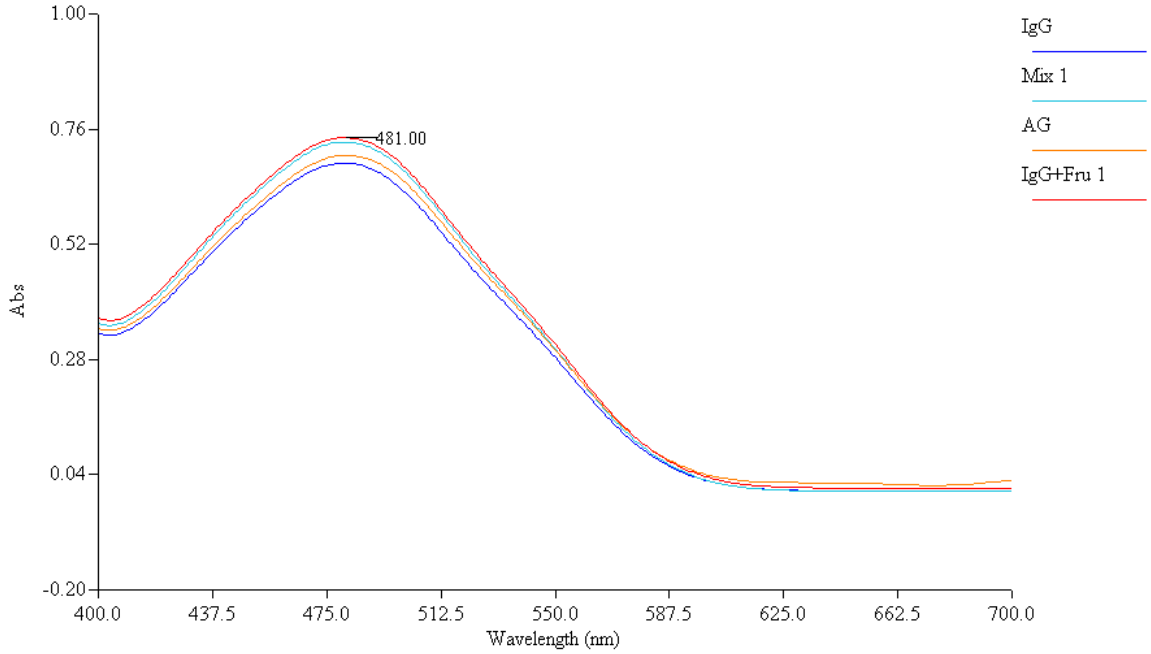
4.2 Biyofiziksel Analizler

4.2.1 Kongo kırmızısı spektral kayma

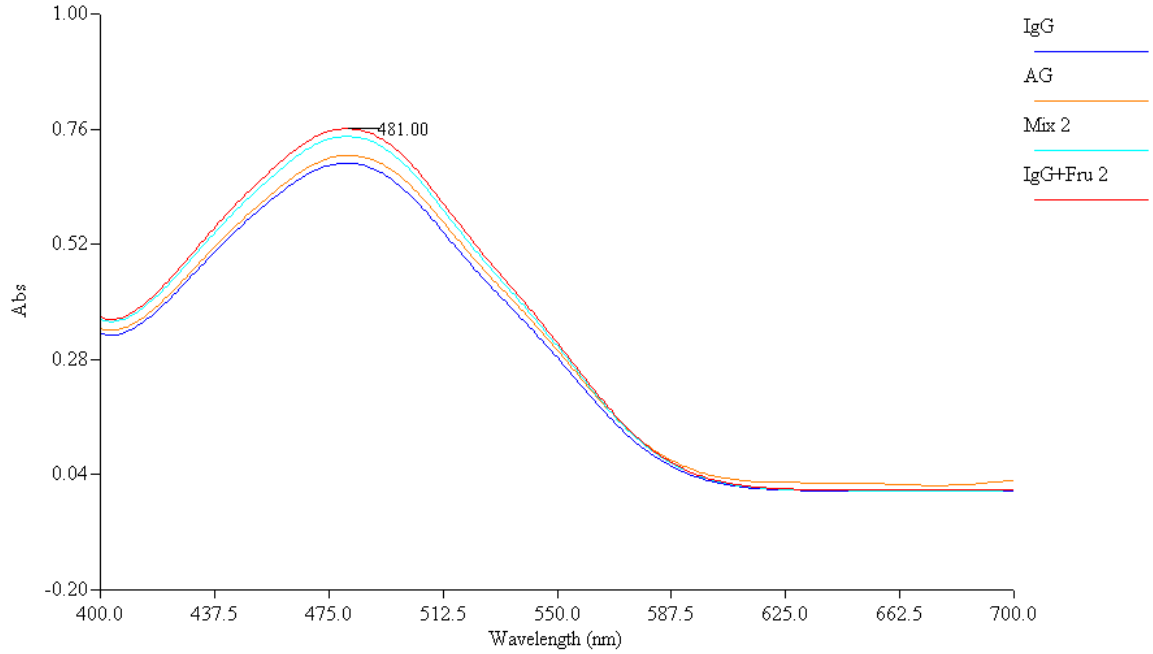
Kongo kırmızısı ile boyanmış numuneler 400-700 nm dalga boyu aralığında tarandı. Kongo kırmızısı ile boyanmış doğal IgG, 480 nm'de bir absorbans zirvesi gösterdi. Absorbans artışı ile fruktoz kaynaklı protein hasarları tespit edildi. 28 günlük inkübasyonun ardından, Şekil 4.5'te gösterilen doğal (hasara uğramamış ticari IgG) IgG, IgG+AG, IgG+Fru absorbansındaki artış. Ardından, doğal IgG, IgG+AG, hasarlı IgG+Mix(500 µg/ml) ve IgG+Fru 1. hafta grafik Şekil 6'da gösterilmektedir. Doğal IgG, IgG+AG, hasarlı IgG+Mix(500 µg/ml) ve IgG+Fru 2. hafta grafiği Şekil 7'de gösterilmektedir. Doğal IgG, IgG+AG, hasarlı IgG+Mix (500 µg/ml) ve IgG+Fru 3. hafta grafiği Şekil 8'de, doğal IgG, IgG+AG, hasarlı IgG+Mix(500 µg/ml) ve IgG+Fru 4. hafta grafiği Şekil 9'da gösterilmektedir. Fruktozun neden olduğu IgG hasarının üzerine karışımın erken aşamada büyük ölçüde engellenebildiği ve absorbanslarda büyük düşüş olsa bile antiglisasyon etkisi olduğu bilinen AG ile hemen hemen aynı etkiye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Glikasyonun zaman içinde geri dönüşümsüz hasar etkisi ve AGE'lerin biyolojik materyallere ne ölçüde zarar verdiği absorbans artışı ile belirlendi (Şekil 4.9). Mix en iyi aktiviteyi 3. haftada gösterdi (Şekil 4.8). Glutatyon, selenyum ve oleuropein karışımının glikasyonun erken evresinde oluşan ROS'u inhibe etmiştir. Bu inhibisyonunu absorbansı azalmasından tespit edilmiştir (Sidra ve vd., 2018).



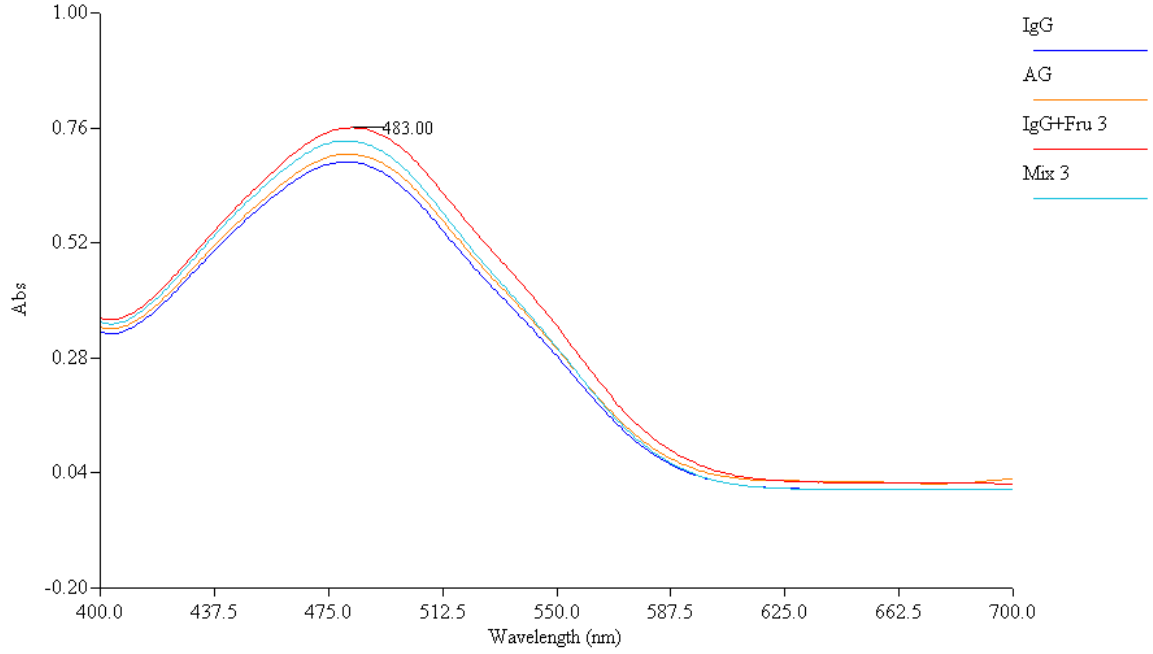
Şekil 4.5 1. hafta, 2. hafta, 3. hafta ve 4. haftadaki doğal IgG, IgG+AG ve IgG+Fru sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. (n=3).



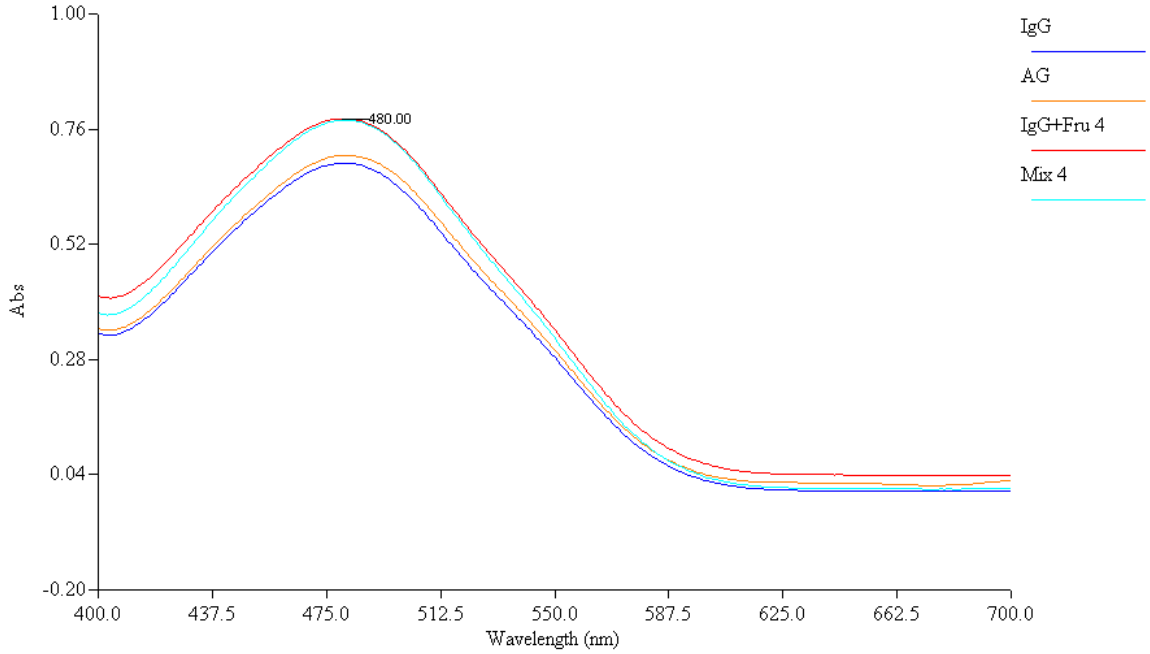
Şekil 4.6 1. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. (n=3).



Şekil 4.7 2. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. (n=3).



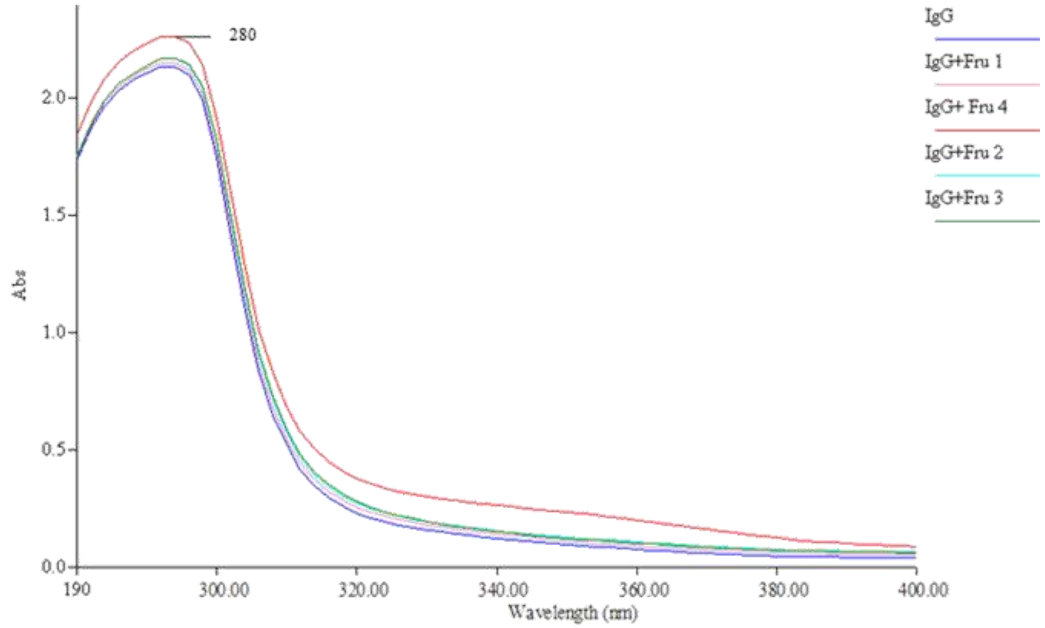
Şekil 4.8 3. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. (n=3).



Şekil 4.9 4. hafta doğal IgG, IgG+AG, IgG+Fru, IgG+Fru+Mix sistemine kongo kırmızısı bağlanmasının UV absorbans spektrumları. (n=3).

4.2.2 UV-visible spektroskopi (200-400 nm)

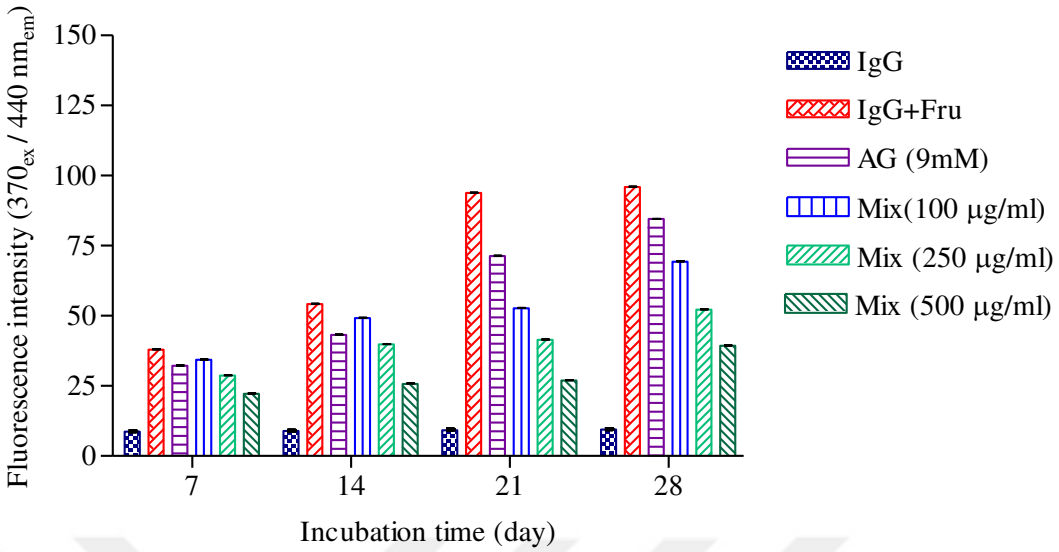
28 gün boyunca fruktoz ile modifiye edilmiş IgG'nin absorpsiyon profilleri, 240–400 nm dalga boyu aralığında gözlendi. Doğal IgG, 280 nm'de λmax gösterdi. 3.haftadan sonra hiperkromisitenin arttığı gözlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Doğal IgG ve IgG+ Fru 1., 2., 3. ve 4. haftaların UV absorpsiyon spektrumları. 28 gün boyunca fruktoz ile modifiye edilmiş IgG'nin absorpsiyon profilleri, 240–400 nm dalga boyu aralığında tarandı.

4.2.3 Floresans spektroskopi yöntemi

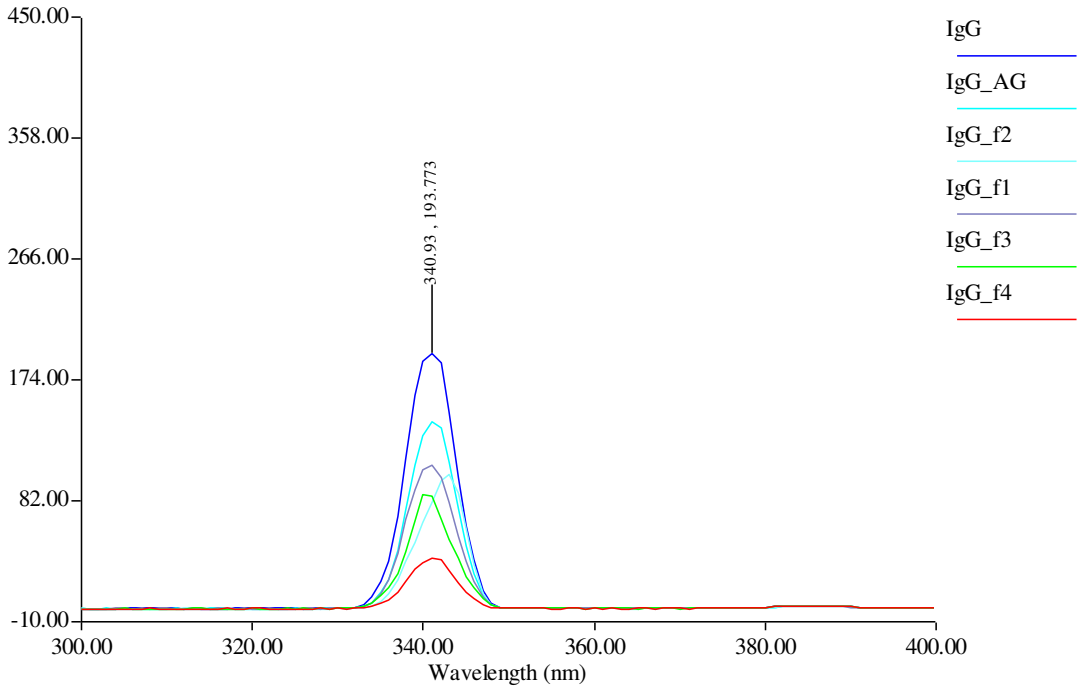
IgG'nin fruktoz modifikasyon etkisini analiz etmek için floresan spektroskopi yöntemi kullanıldı. IgG'nin floresansı, mikro ortamındaki değişikliklerden etkilenir. AGE'lerin çoğu heterojen bileşiklerdir. 370 nm'de uyarıldığında doğal IgG floresan emisyon spektrumları gösterdiğinde 440 nm'de güçlü floresan sergiler. Fruktoz ile inkübe edilen IgG numunelerinde (28 gün/süreye bağlı) hasar floresansta çok önemli artış olarak gözlendi. Karışımın artan konsantrasyonlarındaki antiglikasyon etkisi inhibisyondaki azalma ile belirlendi. AG (9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı. IgG+Fru sırasıyla 1. Haftada %37.910, 2. Haftada %54.210, 3. Haftada %93.750 ve 4. Haftada %95.980 floresans aktivitesi gösterdi. AG'nin fruktoz ile IgG hasarı üzerindeki inhibisyon etkisi, hafta sırasına göre; %32,21, %43,15, %71,33, %84,52 olarak hesaplanmıştır. Karışım 100 µg/ml'nin fruktozlu IgG hasarı üzerindeki inhibisyon etkisi, hafta sırasına göre; %34,27 %49,16 %52,68 %69,33 olarak hesaplanmıştır. Karışım 250 µg/ml'nin fruktozlu IgG hasarı üzerindeki inhibisyon etkisi, hafta sırasına göre; %28,74, %39,86, %41,43 ve %52,17 olarak hesaplanmıştır. Karışım 500 µg/ml'nin fruktozlu IgG hasarı üzerindeki inhibisyon etkisi, hafta sırasına göre; %22,15, %25,72, %26,92, %39,31 olarak hesaplanmıştır. Karışımın artan konsantrasyonlarda glikasyonu önleme etkisi, engelleme değerleri ile belirlendi. Mixin 1. hafta inkübasyon değerlerinden AG'den daha iyi bir antiglikasyon ajanı olarak kullanılabileceği tespit edildi (Şekil 4.11).



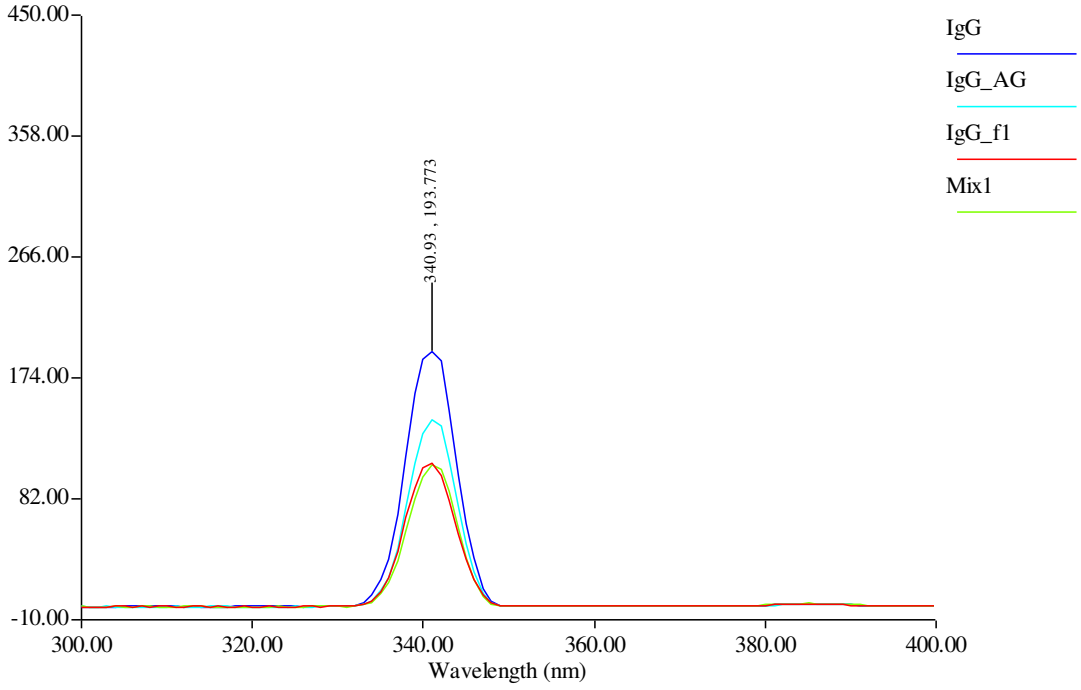
Şekil 4.11 Karışım (100–500 µg/ml), aminoguanidin'in (9 mM) ve fruktoz ile inkübe edilmiş IgG'de toplam AGE oluşumunun floresan yoğunluğu üzerindeki etkileri(n=3).

4.2.4 İçsel floresans ölçümü

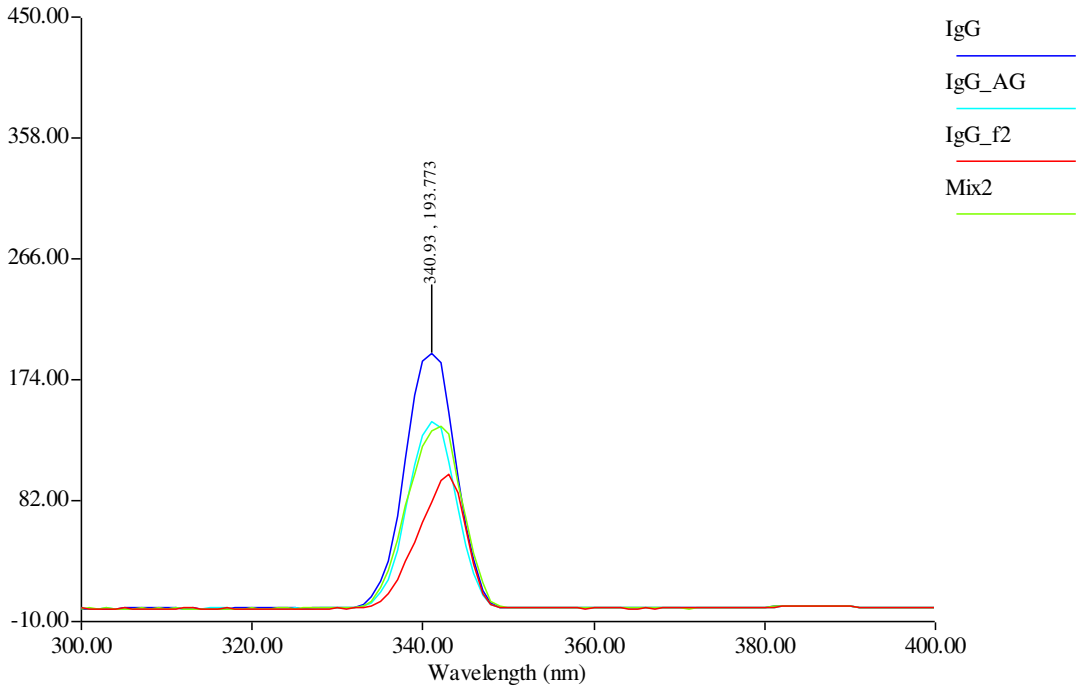
Protein moleküllerindeki aromatik amino asitler, özellikle triptofan, belirli bir dalga boyunda içsel flüoresans yayabilir. IgG'nin içsel floresan yoğunluğu, ısıl işlem, glikasyon, kimyasal modifikasyonu veya hidroliz gibi çeşitli faktörlerle değiştirilebilir. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. IgG numuneleri, 340 nm'de maksimum floresans emisyonu (λmax) değerini sundu. Doğal IgG ve 28 gün inkübe edilen IgG+Fruktoz örneklerinin 340 nm'deki λmax yoğunluğunun hafta sırasına göre 193'ten 37'ye düştüğü gözlendi. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Glikasyonun şiddeti azalarak IgG'nin yapısını değiştirdiği saptandı (Şekil 4.12). Antiglikasyon ajanı olarak kullanılan 500 µg/ml Mix'in yoğunluğu her hafta ayrı ayrı ölçüldü. Sonuç olarak; Yoğunluklar Mix 1 121, Mix 2 148 Mix 3 153 Mix 4 169 AG 128 olarak ölçülmüştür. Mix'in IgG'yi fruktoz kaynaklı glikasyondan korumadaki etkisi günler geçtikçe (Şekil 4.13) (Şekil 4.14) (Şekil 4.15) ve (Şekil 16) yoğunluk artışı ile belirlenmiştir. Hidrofobik ortamda bulunan Trp ve Tyr gibi spesifik amino asitler, glikasyon sırasında üçüncül yapısal değişiklikler nedeniyle kademeli olarak polar ortamlara hareket edebilir. Glikasyonun etkisiyle 340 nm floresans yoğunluğunda maksimum emisyonda önemli bir azalma olmuştur (Inlong ve vd., 2022; Yipeng ve vd., 2020).



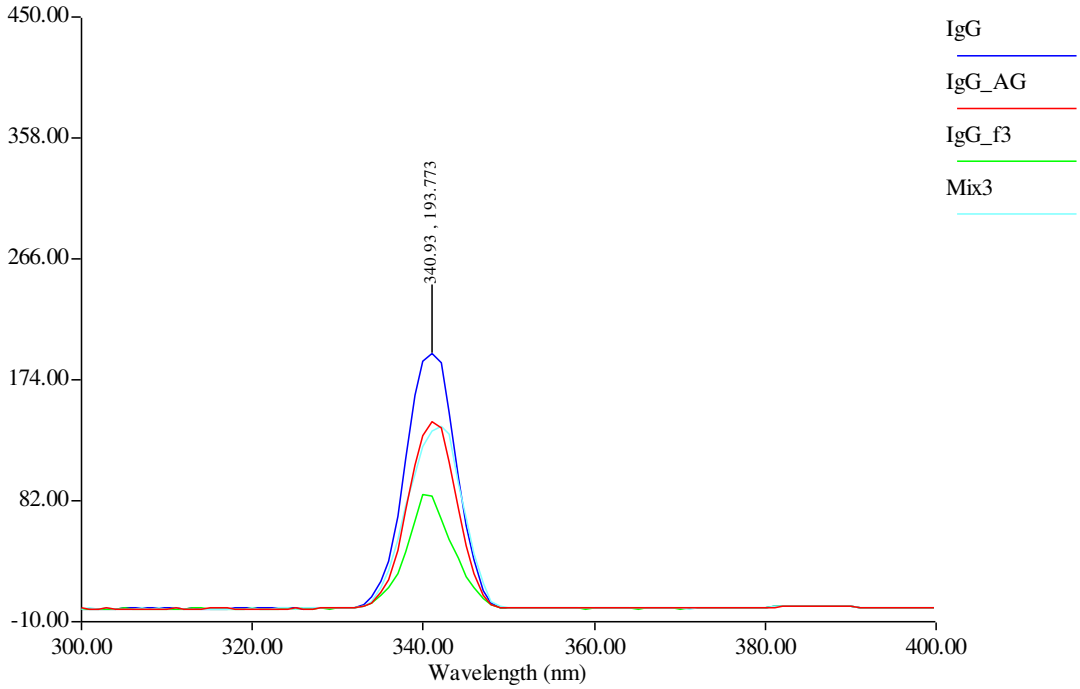
Şekil 4.12 28 günlük inkübasyon süresinde doğal IgG ve IgG+ Fru numunelerinin hafta hafta içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı.



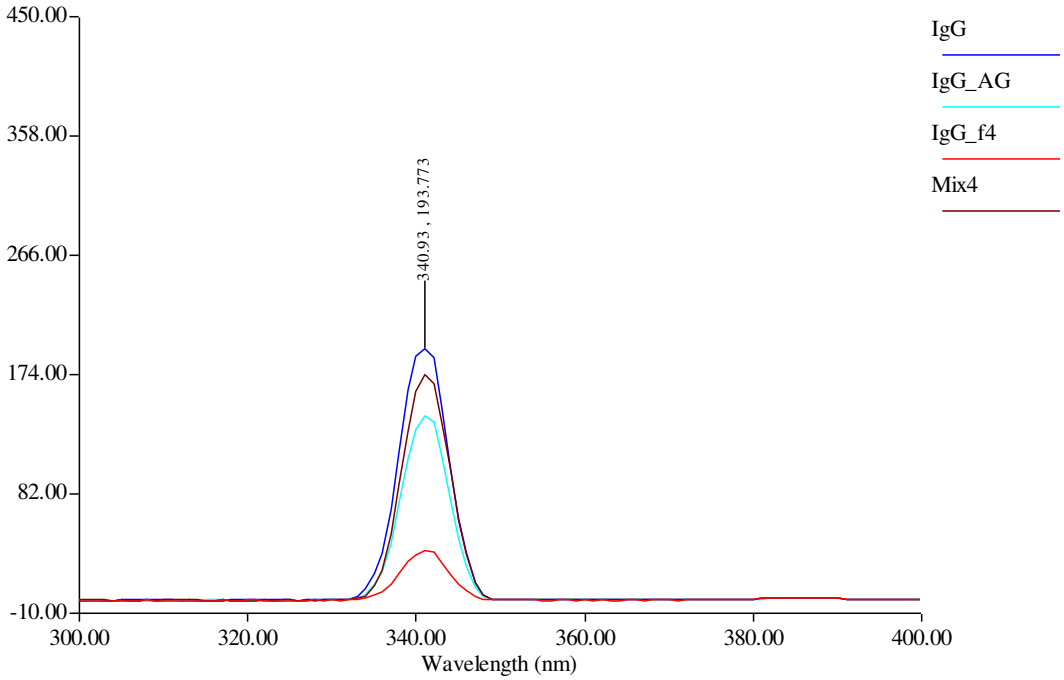
Şekil 4.13 1. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 4.14 2. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 4.15 3. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı.



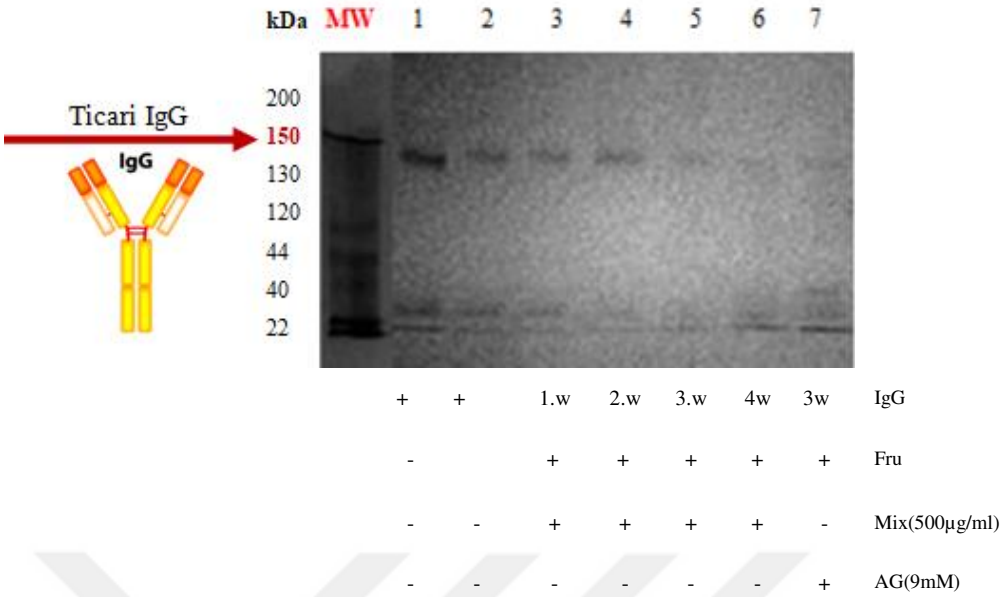
Şekil 4.16 4. Haftada doğal IgG, IgG+ Fru ve IgG+Fru+Mix numunelerinin içsel floresans emisyon spektrumları. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

4.2.5 SDS PAGE

Elektroforez, proteinlerin karmaşık karışımlarını (örn. hücrelerden, hücre altı fraksiyonlardan, kolon fraksiyonlarından veya immünopresipitatlardan) ayırmak, alt birim kompozisyonlarını araştırmak, protein numunelerinin homojenliğini doğrulamak ve daha sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere proteinleri saflaştırmak için kullanılır. Poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler, bir elektrik alanına yanıt olarak bir poliakrilamid jel matrisindeki gözenekler boyunca hareket eder; akrilamid konsantrasyonu arttıkça gözenek boyutu küçülür. Gözenek boyutu ile protein yükü, boyutu ve şeklinin kombinasyonu, proteinin göç oranını belirler. Bu ünitede, denatüre edici koşullar altında, yani sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında süreksiz jel elektroforezi için standart Laemmli yöntemi kullanılmıştır Destek protokolleri, jellerin dökümünü, bir proteinin elektroforetik hareketliliğini kullanarak moleküler kütlenin hesaplanmasını ve yeniden kristalleştirme yoluyla SDS yardımıyla saflaştırılmasını kapsar. Çalışmada moleküler weight, ticari IgG proteini, fruktoz ile hasara uğramış IgG ve 7, 14, 21 ve 28. günlerde mixin en yüksek konsantrasyonu (500 µg/ml) ile inkübasyona bırakılan IgG+fruktoz örnekleri kuyucuklara yüklenerek 90 mAmp 300V'ta 180 dk yürütüldü. Ardından jel % 15'lik

Coomassie blue R250 ile 45 dakika boyandıktan sonra yıkama çözeltisi(su:metanol:glasiyel asetik asit: 6:3:21, v:v:v) içinde kontrollü 12 saat inkübasyona bırakılarak boya uzaklaştırıldı. Fruktoz ile hasara uğramış IgG proteinini ve korunmuş IgG proteinlerini belirlemek için jel görüntüleme sistemi kullanıldı. İlk kuyucukta IgG'yi tespit edebilmek için kullanılan moleküler weight bulunmaktadır. 1. kuyucukta hasara uğramamış 0. günndeki ticari IgG bulunmaktadır. 2. kuyucukta IgG+Frutoz, 3. kuyucukta 1. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 4. Kuyucukta 2. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 5. kuyucukta 3. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 6. Kuyucukta 4. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 7. kuyucukta ise 3. Hafta IgG+Fru+AG bulunmaktadır. Bant yoğunluklarından da anlaşılabileceği üzere IgG proteini 3. ve 4. hafta sonunda neredeyse tamamen bozunmuş gibi görünmektedir (5. ve 6. kuyucuk). Fruktozun IgG de hasar oluşturduğu bant yoğunluğunun azalmasından tespit edilmektedir (2. kuyucuk). Mixin erken aşamadaki maillard reaksiyonunu yavaşlattığı ya da durdurduğu 3. ve 4. kuyucuktaki bant yoğunuğunun korunmasından tespit edilmektedir. 3. Haftadaki AG'nin (7. kuyu) koruma etkisi ile 3. ve 4. Haftadaki (5 ve 6. kuyucuk) mixin koruma etkisinin hemen hemen aynı olduğu bant yoğunlukları ile gözlemlenmektedir.

Bu yöntem sonucunda fruktozun IgG' ye büyük miktada hasar verdiği, yapısını bozduğu, glutatyon selenyum ve oleuropein içeren mixin erken aşamada glikasyonu yavaşlattığı veya engellediği kontrol olarak kullanılan AG den daha iyi inhibisyon aktivitesi gösterdiği ispat edilmiştir (Şekil 4.17).



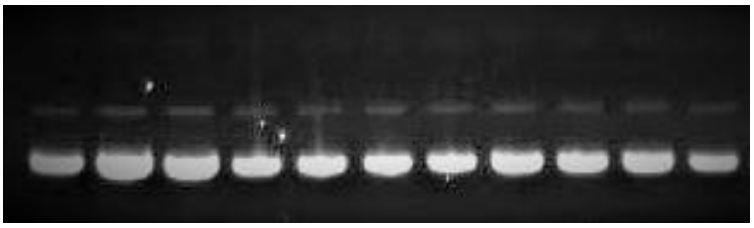
Şekil 4.17 IgG proteininin fruktoz ile hasarı ve mixin koruyucu etkisinin SDS-PAGE yöntemi ile karakterizasyonu. Pozitif kontrol olarak AG kullanılmıştır.

4.2.6 Agaroz Jel Elektroforezi

Hasar görmemiş DNA miktarı, agaroz jeldeki bant yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bandın yoğunluğu hasara uğramış IgG varlığında değişir (3, 4, 5 ve 6. kuyucuktaki bant yoğunluğu) Form I'in (DNA'nın süper sarmal yapısı zarar görmüş) II ve III'ün (lineer) bant yoğunluğunun azaldığı gözlendi. 'in bant yoğunluğunun azaldığı (DNA'nın süper sarmal yapısının bozulduğu), Form I ve II'nin (doğrusal) oluştuğu gözlendi. Glikasyon DNA'da depurinasyona, zincir kırılmasına, insersiyon ve delesyon gibi mutasyonlara neden olur. Karışım varlığında bant yoğunluğunun arttığı (DNA mevcut süper-kıvrımlı yapısını korumuştur), I'nin azaldığı ve II'ün bant yoğunluğunun kaybolduğu gözlendi (7, 8, 9 ve 10. kuyucuktaki bant). Pozitif kontrol olarak AG (9mM) kullanıldı (11.Kuyucuktaki bant) (Şekil 4.18). DNA glikasyonu üzerine yapılan bazı çalışmalarda nükleobazlar ve nükleobaz eklentileri/amino asitlerin reaktif karbonil bileşikleri tarafından zarar görebileceği tespit edilmiştir (Bucala ve vd., 1984; Bucala ve vd., 1985; Udayan ve vd., 2005).

IgG+Fru sisteminde gerçekleşen 4 haftalık Maillard reaksiyonunun sonucunda oluşan ROS, amadori ürünleri, dikarbonil ürünleri ve AGE'lerin DNA'yı kalıcı olarak tahrip ettiği ve DNA'nın süpersarmal yapısını bozduğu gözlendi. 4 haftalık IgG+Fru+mix sisteminde karışımın serbest radikal koruyucu aktivitesi sayesinde

proteinin yapısı korunduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmişti. Korunan proteinin DNA hasarı üzerinde çok az etkisinin olduğu gözlemlendi.



+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DNA
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	IgG
-		1.w	2.w	3.w	4w	1.w	2.w	3w	4.w	3.w	IgG+Fru
-	-	-	-	-	-	1.w	2.w	3.w	4.w	-	Mix(µg/ml)
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	AG(9mM)

Şekil 4.18 IgG+Fru, IgG+Fru+mix sisteminin DNA üzerindeki etkisi. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Etidyum bromür (10 mg/mL) içeren %1 Agaroz jel üzerine 90 V 500 mA akım uygulanarak 1 saat süreyle yürütme yapıldı. Elektroforez tamponu: TAE (40 mM Tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2). Jellerin fotoğrafı Bio Rad Gel Doc XR (BioRad, Hercules, CA, ABD) görüntüleme sistemi ile çekilmiştir.

4.2.7 Fruktoz kaynaklı lenfosit hücre hasarı

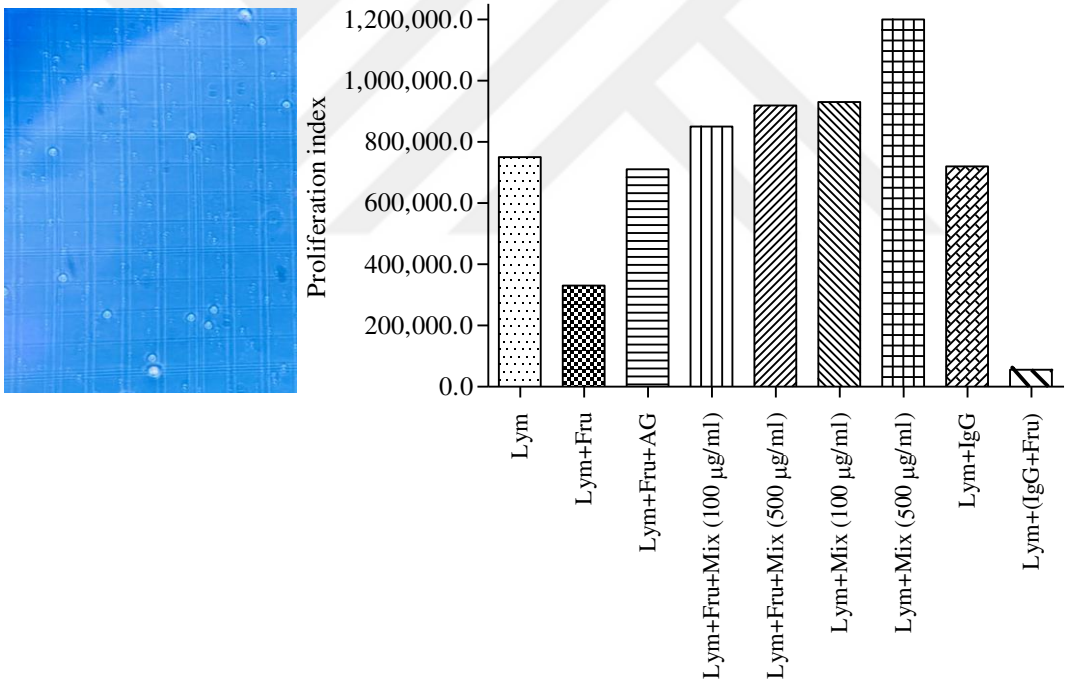
Gönüllülerden alınan kandan izole edilen lenfosit hücreleri kültür ortamına alındı. Lenfosit hücreleri fruktoz ile inkübe edildi. 100 ve 500µg/ml'lik karışımın fruktoz tarafından glikozillenmiş lenfosit hücreleri üzerindeki etkisi araştırıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından tripan mavisi ile boyanmış hücreler sayıldı. İnkübasyon öncesi lenfosit hücreleri $7x10^5$ olarak sayıldı. (Beyaz, parlak, hücreler). Fruktoz ile inkübe edilen hücreler $3.3x10^5$ olarak sayıldı. Fruktozun lenfosit hücre ölümüne neden olduğu gözlendi. Hücre sayısındaki bu radikal azalma, glikasyonun ve Maillard reaksiyonunun tehlikeli sonuçlarından sadece biridir (Poggioli ve vd., 2002) (Şekil 4.19).

Glikasyonundan kaynaklanan kimyasal modifikasyonlar, reaktif karbonil oluşumu amino asit oksidasyonu hücre ölümü ile gözlemlendi. Bu da yaşlanma, bağışıklık sistemi hastalıkları gibi pek çok hasarın altında yatan olası sebeplerden biridir. Mix'in her iki konsantrasyonunda da glikasyonlu lenfosit hücreleri yaklaşık $9x10^5$ oranında sayıldı. Serbest radikal savunma sisteminin askerlerinden olan glutatyon, selenyum ve oleuropein, hücrenin mevcut sağlıklı durumunu korumak yerine hücre sayısını artırdı. Çalışmanın ilk aşamasında yapılan biyokimyasal ve biyofiziksel

testler doğrultusunda karışımın IgG glikasyonu üzerindeki koruyucu etkisi tespit edilmişti buna paralel olarak lenfosit hücre sisteminde de benzer sonuçlar gözlemlendi. Yüksek karışım konsantrasyonunun sağlıklı lenfosit hücresini ($12x10^5$) neredeyse ikiye katladığı gözlendi. Bu dikkat çekici artışın nedeni selenyum oleuropein ve glutatyonun serbest radikalleri söndürmesi antioksidan etkiye sahip olması, bazı enzimleri aktive ederek toksinleri inhibe etmesi ve hücre içinde çeşitli yolları aktive ederek vitamin metabolizmasını desteklemesi olabilir.

Bu çalışma, diyet AGE'lerinin lenfosit hücre döngüsü üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Diyet AGE'lerini temel otoimmün/enflamatuvarda incelemek, onun hastalıklardaki rolünü araştırmak ve daha geniş ölçekli çalışmalar yapmak için öncü bir çalışma olmuştur (Hamilos, ve vd., 1989; Chhabra ve vd., 2018).

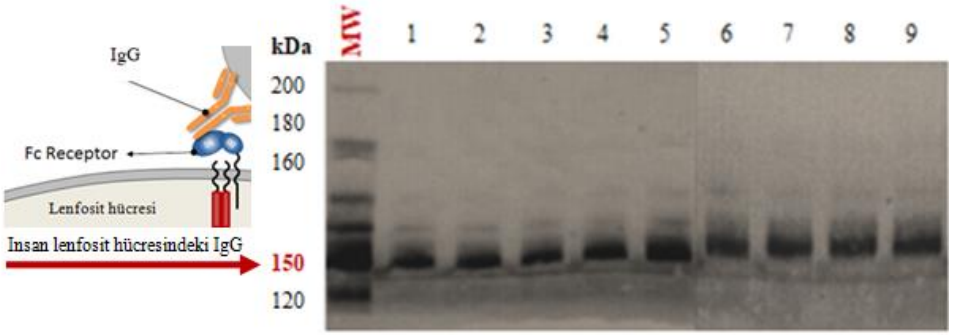


Şekil 4.19 Glikasyon sırasında toplam lenfosit hücresinin gelişimi. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sağlıklı, yetişkin, gönüllü (18-35 yaş; 10 kişi) donörlerden alınan kanlar, ficoll ile gradyan santrifüj yöntemi (600 x g 15 dk Ficoll Hypaque Plus) ile EDTA'lı antikoagülan tüplerde lenfositlere ayrıldı. İnkübasyona bırakılan hücreler, Tyrpan blue yöntemi ile sayıldı.

4.2.8 Western Blotting yöntemi

Her bir kuyucuğa eklenecek protein miktarını hesaplamak için öncelikle hücre örneklerinin spektrofotometre ile protein konsantrasyonu tayini yapılmıştır. Bunun

için Brodford yöntemi kullanıldı. Daha sonra standardın eğim grafiği çizilerek protein miktarı hesaplandı. IgG bantları 150 kDa'da gözlendi. Glikasyonlu lenfosit hücrelerinin ve glikolize IgG'ye maruz kalan lenfosit hücrelerinin azalan bant yoğunlukları saptandı (3. Bant ve 4. Bant). Karışımın uygulandığı kuyuda bant yoğunluğunda artış gözlendi (6., 7., 8., 9. Bant) (Şekil 4.20). Karışımın artan konsantrasyonla glikasyonu baskıladığı ve bağışıklık sistemini koruyucu ajan olduğu belirlendi (Ernst ve vd., 2010; Huang ve vd., 2023; Ting ve vd., 2023; Poggioli ve vd., 2002).



+	+	+	+	+	+	+	+	+	Lenfosit
-	+	-	+	-	-	-	-	-	IgG
-	-	+	+	+	+	+	-	-	Fru
-	-	-	-	-	100	500	100	500	Mix(µg/ml)
-	-	-	-	+	-	-	-	-	AG(9mM)

Şekil 4.20 1 Numaralı kuyucukta yalnızca lenfosit, 2 Numaralı kuyucukta IgG+Lym, 3 Numaralı kuyucukta Lym +Fru, 4 Numaralı kuyucukta Lym +Fru+IgG, 5 Numaralı kuyucukta Lym+Fru+AG, 6 Numaralı kuyucukta Lym +Fru+ Karışımı 100µg/ml,7 Numaralı kuyucukta Lym +Fru+ Karışımı 500ug/ml, 8 Numaralı kuyucukta Lym+100ug/ml, 9 Numaralı kuyucukta Lym + Karışımı 500ug/ml. AG(9mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Karışım, %28.08 ile %91.41 arasında DPPH radikalini söndürme aktivitesi gösterdi. Konsantrasyon arttıkça karışımın inhibisyon değerinin pozitif kontrole yaklaştığı grafikte görülmektedir (Şekil 4.1). BHA, %93,50 ile %96,30 arasında süpürme aktivitesi gösterdi. Karışım, %39.68 ve %99.67 aralığında hidroksi radikali söndürme aktivitesi gösterdi. Karışımın konsantrasyonu arttıkça Pozitif kontrol olarak kullanılan BHA'dan daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği grafikte görülmektedir. BHA, %38.21 ve %97.39 aralığında hidroksi radikal söndürme aktivitesi gösterdi. Bitki ekstraktları ve etken maddelerinin serbest radikalleri söndürmesi bu maddelerin içindeki fenolik bileşenlerin serbest radikaleri daha kararlı ürünlere dönüştürmesinden kaynaklanmaktadır. DPPH ve fenoller arasında (HAT) ve (SET) reaksiyonları olduğu kabul edilir (Musialik ve Litwinienko 2005).

Oleuropein, düşük yoğunluklu lipoproteinleri inhibe eder. İn vitro oksidasyon ve *in vivo* lipid peroksidasyonunda oluşan serbest radikalleri temizler.

Se; streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik farelerde insülin gibi davranır. Glukoneogenez ve glikolizde yer alan birkaç enzimin etkisini düzenleyebilir ve glikozun hücrelere taşınmasını kolaylaştırabilir ve ROS inhibe edebilir. Selenyum oksidatif stresi, iltihaplanma, apoptoz, kontrolsüz hücre çoğalması, hormon üretimi, anjiyogenez ve bağışıklık fonksiyonu ve DNA metilasyonunu etkiler.

α-karboniller, dehidrasyonla oluşan oldukça aktif Maillard reaksiyon ara maddeleridir. Fruktoz biyolojik makromolekülleri değiştirerek (Song ve vd., 2021) metabolize olurken, dikarbonil bileşenleri ve ROS (Yang ve vd., 2023) oluşumuna neden olabilir. Fruktoz serbest radikalleri savunma sistemine zarar verir. Fruktoz ile 28 gün inkübasyona bırakılan IgG proteininin artan konsantrasyonlarda Mix (100–500 µg/ml) ile antiglikasyon aktivitesi 290 nm'de absorbans ölçümü ile belirlendi. IgG+Fru sisteminde günler ilerledikçe α-karbonil bileşiklerinin oluşumunun arttığı gözlemlendi. Karışımın (100–500 µg/ml) artan konsantrasyonlarının erken ve ileri aşamalarda α-karbonil bileşenlerini inhibe ettiği gözlendi. Fruktozun neden olduğu IgG hasarının üzerine karışımın erken aşamada büyük ölçüde engellenebildiği ve absorbanslarda büyük düşüş olsa bile antiglikasyon etkisi olduğu bilinen AG ile hemen hemen aynı etkiye sahip olduğu belirlendi.

Glikasyonun zaman içinde geri dönüşümsüz hasar etkisi ve AGE'lerin biyolojik materyallere ne ölçüde zarar verdiği absorbans artışı ile belirlendi.

Glutatyon, selenyum ve oleuropein karışımının glikasyonun erken evresinde oluşan ROS'u inhibe etmiştir. Bu inhibisyonunu absorbansı azalmasından tespit edilmiştir.

IgG'nin fruktoz modifikasyon etkisini analiz etmek için floresan spektroskopi yöntemi kullanıldı. IgG'nin floresansı, mikro ortamındaki değişikliklerden etkilenir. AGE'lerin çoğu heterojen bileşiklerdir. 370 nm'de uyarıldığında doğal IgG floresan emisyon spektrumları gösterdiğinde 440 nm'de güçlü floresan sergiler. Fruktoz ile inkübe edilen IgG numunelerinde (28 gün/süreye bağlı) hasar floresansta çok önemli artış olarak gözlendi. Karışımın artan konsantrasyonlarındaki antiglikasyon etkisi inhibisyondaki azalma ile belirlendi.

Protein moleküllerindeki aromatik amino asitler, özellikle triptofan, belirli bir dalga boyunda içsel flüoresans yayabilir. IgG'nin içsel floresan yoğunluğu, ısıl işlem, glikasyon, kimyasal modifikasyonu veya hidroliz gibi çeşitli faktörlerle değiştirilebilir. Numuneler 300-400 nm aralığında tarandı. IgG numuneleri, 340 nm'de maksimum floresans emisyonu (λmax) değerini sundu. Doğal IgG ve 28 gün inkübe edilen IgG+Fruktoz örneklerinin 340 nm'deki λmax yoğunluğunun hafta sırasına göre 193'ten 37'ye düştüğü gözlendi. Hidrofobik ortamda bulunan Trp ve Tyr gibi spesifik amino asitler, glikasyon sırasında üçüncül yapısal değişiklikler nedeniyle kademeli olarak polar ortamlara hareket edebilir. Glikasyonun etkisiyle 340 nm floresans yoğunluğunda maksimum emisyonda önemli bir azalma olmuştur (Inlong ve vd., 2022; Yipeng ve vd., 2020). İmmünoglobulinler in vitro koşullar altında kolaylıkla diyabetik sirkülasyonu taklit edebilir. Ig G'nin diyabetik sirkülasyonda uzun kalması ve immün korumada baskın olması nedeniyle diğer İmmünoglobülinlere kıyasla IgG'nin glikasyonu daha fazla ilgi görmüştür. Ek olarak, IgG'ler lizin açısından zengin olası onları yüksek potansiyelli protein glikasyon hedefleri haline getiriyor.

Diyabetik deneklerin serumundan izole edilen özellikle Fab parçalarının tercihli glikasyonu IgG'nin Fd bölgesinde tespit edilmiştir ancak glikolize IgG1'den boronat desteklere hafif zincirin bağlanmasını tespit edemediler. Ayrıca Menini ve vd. esas olarak IgM'nin Fab bölgesinde glikasyonun meydana geldiğini öne sürdü. IgG'de Fab'da, Fc bölgesinde olduğundan daha fazla glikasyon sahası mevcuttur.

Sasaki, Kaneshige ve Kennedy ve vd. çalışmalarında monoklonal antikorların glikasyonu sonucunda antijenlere bağlanma yeteneklerini bozduğuna dair ikna edici kanıtlar sağlamıştır. Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışmada, antijen glikasyona

bağlı inaktivasyona karşı, anti Cu'nun, Zn-süperoksit dismutaz enzimi antikorları koruyabilir.

Fruktoz ile hasara uğramış IgG proteinini ve korunmuş IgG proteinlerini belirlemek için jel görüntüleme sistemi kullanıldı. İlk kuyucukta IgG'yi tespit edebilmek için kullanılan moleküler weight bulunmaktadır. 1. kuyucukta hasara uğramamış 0. günndeki ticari IgG bulunmaktadır. 2. kuyucukta IgG+Frutoz, 3. kuyucukta 1. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 4. Kuyucukta 2. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 5. kuyucukta 3. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 6. Kuyucukta 4. Hafta IgG+Fru+mix500 µg/ml, 7. kuyucukta ise 3. Hafta IgG+Fru+AG bulunmaktadır. Bant yoğunluklarından da anlaşılabileceği üzere IgG proteini 3. ve 4. hafta sonunda neredeyse tamamen bozunmuş gibi görünmektedir(5. ve 6. kuyucuk). Fruktozun IgG de hasar oluşturduğu bant yoğunluğunun azalmasından tespit edilmektedir(2. kuyucuk). Mixin erken aşamadaki maillard reaksiyonunu yavaşlattığı ya da durdurduğu 3. ve 4. kuyucuktaki bant yoğunuğunun korunmasından tespit edilmektedir. 3. Haftadaki AG'nin (7. kuyu) koruma etkisi ile 3. ve 4. Haftadaki (5 ve 6. kuyucuk) mixin koruma etkisinin hemen hemen aynı olduğu bant yoğunlukları ile gözlemlenmektedir.

Bu yöntem sonucunda fruktozun IgG' ye büyük miktada hasar verdiği, yapısını bozduğu, glutatyon selenyum ve oleuropein içeren mixin erken aşamada glikasyonu yavaşlattığı veya engellediği kontrol olarak kullanılan AG den daha iyi inhibisyon aktivitesi gösterdiği ispat edilmiştir (Şekil 4.17).

Hasar görmemiş DNA miktarı, agaroz jeldeki bant yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bandın yoğunluğu glikolize IgG varlığında değişir (3., 4., 5. ve 6. kuyucuktaki bant yoğunluğu) 1'in (DNA'nın süper sarmal yapısı zarar görmüş) 2 ve 3'ün (lineer) bant yoğunluğunun azaldığı gözlendi. 'in bant yoğunluğunun azaldığı (DNA'nın süper sarmal yapısının bozulduğu), I ve II'ün (doğrusal) oluştuğu gözlendi. Glikasyon DNA'da depurinasyona, zincir kırılmasına, insersiyon ve delesyon gibi mutasyonlara neden olur (Wani ve vd., 2012).

Karışım varlığında bant yoğunluğunun arttığı (DNA mevcut süper-kıvrımlı yapısını korumuştur), I'nin azaldığı ve II'ün bant yoğunluğunun kaybolduğu gözlendi (7., 8., 9. ve 10. Kuyucuktaki bant). Pozitif kontrol olarak AG(9mM) kullanıldı (11. Kuyucuktaki bant) (Şekil 4.18). DNA glikasyonu üzerine yapılan bazı çalışmalarda nükleobazlar ve nükleobaz eklentileri/ amino asitlerin reaktif karbonil bileşikleri

tarafından zarar görebileceği tespit edilmiştir(Bucala ve vd., 1984; Bucala ve vd., 1985).

IgG+Fru sisteminde gerçekleşen 4 haftalık Maillard reaksiyonunun sonucunda oluşan ROS, amadori ürünleri, dikarbonil ürünleri ve AGE'lerin DNA'yı kalıcı olarak tahrip ettiği ve DNA'nın süpersarmal yapısını bozduğu gözlendi.

100 ve 500µg/ml'lik karışımın fruktoz tarafından glikozillenmiş lenfosit hücreleri üzerindeki etkisi araştırıldı. 24 saatlik inkübasyonun ardından tripan mavisi ile boyanmış hücreler sayıldı. İnkübasyon öncesi lenfosit hücreleri $7x10^5$ olarak sayıldı. (Beyaz, parlak, hücreler). Fruktoz ile inkübe edilen hücreler $3.3x10^5$ olarak sayıldı. Fruktozun lenfosit hücre ölümüne neden olduğu gözlendi. Hücre sayısındaki bu radikal azalma, glikasyonun ve Maillard reaksiyonunun tehlikeli sonuçlarından sadece biridir (Poggioli ve vd., 2005) (Şekil 4.19).

Glikasyonundan kaynaklanan kimyasal modifikasyonlar, reaktif karbonil oluşumu amino asit oksidasyonu hücre ölümü ile gözlemlendi. Bu da yaşlanma, bağışıklık sistemi hastalıkları gibi pek çok hasarın altında yatan olası sebeplerden biridir. Mix'in her iki konsantrasyonunda da glikasyonlu lenfosit hücreleri yaklaşık $9x10^5$ oranında sayıldı. Serbest radikal savunma sisteminin askerlerinden olan glutatyon, selenyum ve oleuropein, hücrenin mevcut sağlıklı durumunu korumak yerine hücre sayısını artırdı. Çalışmanın ilk aşamasında yapılan biyokimyasal ve biyofiziksel testler doğrultusunda karışımın IgG glikasyonu üzerindeki koruyucu etkisitespit edilmişti buna paralel olarak lenfosit hücre sisteminde de benzer sonuçlar gözlemlendi. Yüksek karışım konsantrasyonunun sağlıklı lenfosit hücresini ($12x10^5$) neredeyse ikiye katladığı gözlendi. Bu dikkat çekici artışın nedeni selenyum oleuropein ve glutatyonun serbest radikalleri parçalaması, antioksidan etkiye sahip olması, bazı enzimleri aktive ederek toksinleri inhibe etmesi ve hücre içinde çeşitli yolları aktive ederek vitamin metabolizmasını desteklemesi olabilir.

Bu çalışma, diyet AGE'lerinin lenfosit hücre döngüsü üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Diyet AGE'lerini temel otoimmün/enflamatuvarda incelemek, onun hastalıklardaki rolünü araştırmak ve daha geniş ölçekli çalışmalar yapmak için öncü bir çalışma olmuştur.

Glikasyonlu lenfosit hücrelerinin ve glikolize IgG'ye maruz kalan lenfosit hücrelerinin azalan bant yoğunlukları saptandı (3. Bant ve 4. Bant). Karışımın

uygulandığı kuyuda bant yoğunluğunda artış gözlendi (6., 7., 8., 9. Bant) (Şekil 4.20) Karışımın artan konsantrasyonla glikasyonu baskıladığı ve bağışıklık sistemini koruyucu ajan olduğu belirlendi.

Diyete bağlı Maillard reaksiyonu ve AGE'lerin sağlık ve hastalıktaki rolü konusundaki bilinci artırmak ve beslenmenin vücudun kendi oksidasyon savunma sistemini güçlendirdiğini göstermek çalışmanın amaçlarından biriydi. Çoğunlukla sağlıksız beslenme yöntemleri (fruktoz bazlı gıdaların kontrolsüz alımı) ve stres Maillard reaksiyonu ile AGE'lerin sistemik yükünü artırarak metabolizmayı oksidatif strese (OS), ROS üretimine ve inflamasyona yatkın hale getirir ve yaşlanmayı hızlandırır. Kronik hastalıkların oluşumu AGE ve ROS inflamasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu oksitleyici ajanlar klinik bilimde ve biyokimyada önemli bir yere sahiptir. Söz konusu ajanlar nihayetinde bağışıklık sistemi zayıflığı, kardiyovasküler hastalık, diyabet dahil çoğu kronik hastalık, kronik böbrek hastalığı (KBH) ve nörodejeneratif hastalıklara neden olan faktörlerdir (Uribarr ve vd., 2010; Vitro ve vd., 2018; Kahleova ve vd., 2020).

Bağışıklık sistemi proteini olan Immunoglobulin G proteininin glikasyonu konusunda ise sınırlı sayıda çalışmalar mevcuttur. Fruktoz kaynaklı Immunoglobulin G hasarı konusunda yapılan çalışmalar yetersizdir. Bu hasarın üzerine oleuropein, selenyum, glutatyon maddelerinin etkisi daha önce araştırılmamıştır ve karışım halinde kullanılmamıştır.

Selenyumun gıda takviyesinin B ve T hücre sayısını arttırdığıönceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Margaret ve vd., 2012). Glutatyonun (Jefferiess ve vd., 2003) yaptıkları çalışmada AGEs yi erken aşamada inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Oleuropeinin oksidatif stresi engellediği ve MDA oluşumunun inhibisyonunu sağladığı (Al Azzawie ve vd.,2006) yaptıkları çalışmada tespit edilmiştir. Bahsedilen çalışmaların referansı ve tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda görülmektedir ki; fruktoz biyolojik makromoleküllere geri dönüşümsüz olarak zarar vermektedir. Çalışma kapsamında hasara uğrayan ticari IgG ve insan lenfosit hücreleri; glutatyon, selenyum ve oleuropein karışımı ile glikasyondan korunmuştur. Bahsi geçen mix biyolojik makromoleküllerdeki erken aşamada oluşan AGEs inhibe etmiştir.

Özet olarak biyokimyasal analizler sonucunda bağışıklık sisteminden önemli bir protein olan IgG'nin fruktoz kaynaklı Maillard reaksiyonu ile zarar gördüğü tespit

edildi. Söz konusu biyolojik malzeme hasarının ciddiyeti, α-dikarbonil, NBT testi, floresans ve UV tarama çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Daha sonra hem DNA'da hem de hücre sisteminde hasar görmüş protein ve fruktozun çeşitli sinyal yollarını aktive ederek hasarı daha ciddi bir boyuta taşıdığı gözlemlendi. Vücudun kendi savunma sistemi elementlerinden biri olan glutatyon, destek metali olan selenyum ve iyi bir fenolik olduğu bilinen oleuropein ile karışımı hazırlandı. Diyet kaynaklı Maillard reaksiyonu, bu karışım tarafından erken bir aşamada inhibe edildi. IgG, DNA ve lenfosit hücrelerini fruktozun neden olduğu hasardan koruyarak bağışıklık sistemini destekleyici bir unsur olarak kullanılabileceği belirlendi.

Yapılan çalışmalar glikasyonun ve biyolojik materyallerde oluşabilecek hasarların; birçok hastalık ile birlikte yaşam kalitesini azalttığı, yaşlanmayı hızlandırdığı ve oluşan hasarların genetik problemleri de meydana getirebileceği sonucunu göstermiştir. Son yıllarda doğal ürünler ile ilgili çalışmalara yoğun bir ilgi olmuştur. Bu ilginin nedenleri ya yeni farmakolojik aktif bileşik ortaya çıkarmak ya da ileriki sentetik çalışmalar için öncü bileşik elde etmek için yapılmaktadır. Araştırma hedefi piyasada varolan sentetik bağışıklık güçlendirici ilaçlara alternatif olarak öncü bileşik araştırma ve bu bileşiğin İleri glikasyon son ürünü metabolizmasını erken aşamada inhibisyon etkisini araştırmak hem literatüre hem ilaç tasarım çalışmalarına hem de tedaviye katkı sağlamaktır. Bu çalışmanın etkisi literatüre katkı sağlamakla beraber oldukça pahalı tedavi yöntemleri olan hastalıkların tedavi yükünü azaltabilecek ve yeni ilaç/aşı gelişimine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Afreen K. , Sultan A., Shahnawaz R., Irfan A. A. Uzma S. & Saheem A.(2020): An in vitro approach to unveil the structural alterations in d-ribose induced glycated fibrinogen, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, DOI:10.1080/07391102.2020.1802339

Ağca, C. A. (2013). Diyabetik nöropati oluşturulan ratlarda taurinin Nrf2/HO-1 sinyal yolağı üzerine etkisi/The effect of taurine on Nrf2/HO-1 signaling pathway on diabetic neuropathy in rats.

Ahmad, S., & Ali, A. (2012). Immunological studies on glycated human IgG. Life Sciences, 90(25–26), 980–987. https://doi.org/10.1016/j.lfs. 2012.05.002

Akbaraly, T.N., Arnaud, J., Rayman, M.P. et al. (2010). Plasma selenium and risk of dysglycemia in an elderly French population: results from the prospective Epidemiology of Vascular Ageing Study. Nutr Metab (Lond) 7, 21 https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-21.

Al-Azzawie, H. F., & Alhamdani, M. S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. Life sciences, 78(12), 1371–1377. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.029

Al-Temimi, A. A., Al-Mossawi, A. E., Al-Hilifi, S. A., Korma, S. A., Esatbeyoglu, T., Rocha, J. M., & Agarwal, V. (2023). Glutathione for Food and Health Applications with Emphasis on Extraction, Identification, and Quantification Methods: A Review. Metabolites, 13(4), 465. https://doi.org/10.3390/metabo13040465.

American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care, 37 Suppl 1, S81–S90. https://doi.org/10.2337/dc14-S081

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(17), 7915–7922. https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915

Aspinall, R., Andrew, D., 2000. Immunosenescence: potential causes and strategies for reversal. Biochem. Soc. Trans. 28, 250–254.

Aulak, K.S., Miyagi, M., Yan, L., West, K.A., Massillon, D., Crabb, J.W., Stuehr, D.J., 2001. Proteomic method identifies proteins nitrated *in vivo* during inflammatory challenge. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 12056–12061.

Bakala, H., & Friguet, B. (2002). Age-related increase of protein glycation in peripheral blood lymphocytes is restricted to preferential target proteins. Experimental gerontology, 37(10-11), 1207–1215. https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00145-6

Baker, J., Zyzak, D.V., Thorpe, S.R., & Baynes, J.W. (1994). Chemistry of the

fructosamine assay: D-glucosone is the product of oxidation of Amadori compounds. Clinical chemistry, 40 10, 1950-5 .

Bank, R.A., Bayliss, M.T., Lafeber, F.P., Maroudas, A., Tekoppele, J.M., 1998. Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage. Biochem. J. 330, 345–351.

Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. The Journal of biological chemistry, 272(32), 19633–19636. https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19633

Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. Physiol. Rev. 78, 547–581

Beisswenger, P. J. (2014). Methylglyoxal in diabetes: link to treatment, glycaemic control and biomarkers of complications. Biochemical Society Transactions, 42(2), 450-456.

Benjamin, S. M., Valdez, R., Geiss, L. S., Rolka, D. B., & Narayan, K. M. (2003). Estimated number of adults with prediabetes in the US in 2000: opportunities for prevention. Diabetes care, 26(3), 645–649. https://doi.org/10.2337/diacare.26.3.645

Beregi, E., Regius, O., Rajczy, K., 1991. Comparative study of the morphological changes in lymphocytes of elderly individuals and centenarians. Age Ageing 20, 55–59.

Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. The Journal of biological chemistry, 272(33), 20313–20316. https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313

Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem. 272, 20313–20316.

Bhat, A., Chakraborty, R., Adlakha, K., Agam, G., Chakraborty, K., & Sengupta, S. (2019). Ncl1-mediated metabolic rewiring critical during metabolic stress. Life science alliance, 2(4).

Bonifacio, E., Yu, L., Williams, A. K., Eisenbarth, G. S., Bingley, P. J., Marcovina, S. M., ... & Akolkar, B. (2010). Harmonization of glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2 autoantibody assays for national institute of diabetes and digestive and kidney diseases consortia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 95(7), 3360-3367.

Bonnefont-Rousselot, D., Beaudeux, J. L., Thérond, P., Peynet, J., Legrand, A., & Delattre, J. (2004, May). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. In Annales pharmaceutiques françaises (Vol. 62, No. 3, pp. 147-157). Elsevier Masson.

Bouma, B., Kroon-Batenburg, L.M., Wu, Y.P., Brunjes, B., Posthuma, G., Kranenburg, O., de Groot, P.G., Voest, E.E., and Gebbink, M.F. 2003.

Glycation induces ation of amyloid cross- structure in albumin. J. Biol. Chem. 278: 41810–41819 [Epub 42003 Aug 41818].

Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., & Cerami, A. (1986). Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. Science (New York, N.Y.), 232(4758), 1629–1632. https://doi.org/10.1126/science.3487117

Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A., & Vlassara, H. (1993). Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(14), 6434–6438. https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6434

Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S. M., Montalcini, T., Pujia, A., & Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. Journal of translational medicine, 12, 219. https://doi.org/10.1186/s12967-014-0219-9

Bulteau, A., Petropoulos, I., Friguet, B., 2000. Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. Exp. Gerontol. 35, 767–777.

Bulteau, A.L., Lundberg, K.C., Humphries, K.M., Sadek, H.A., Szweda, P.A., Friguet, B., Szweda, L.I., 2001a. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. J. Biol. Chem. 276, 30057–30063.

Bulteau, A.L., Verbeke, P., Petropoulos, I., Chaffotte, A.F., Friguet, B., 2001b. Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. J. Biol. Chem. 276, 45662–45668.

C.-Y. Huang, M.Y. Ng, T. Lin et al., Quercetin ameliorates advanced glycation end product-induced wound healing impairment and inflammaging in human gingival fibroblasts, Journal of Dental Sciences, https://doi.org/10.1016/j.jds.2023.04.014

Carlson, B. A., Yoo, M. H., Shrimali, R. K., Irons, R., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L., & Park, J. M. (2010). Role of selenium-containing proteins in T-cell and macrophage function. The Proceedings of the Nutrition Society, 69(3), 300–310. https://doi.org/10.1017/S002966511000176X

Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Fact Sheet: General Information and National Estimates on Diabetes in the United States, 2005. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention;2005.Availableat:http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2005.pdf. Accessed May 29, 2008.

Cerami, C., Founds, H., Nicholl, I., Mitsuhashi, T., Giordano, D., Vanpatten, S., Lee, A., Al-Abed, Y., Vlassara, H., Bucala, R., & Cerami, A. (1997). Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(25), 13915–13920.

https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13915

Charonis, A. S., & Tsilbary, E. C. (1992). Structural and functional changes of laminin and type IV collagen after nonenzymatic glycation. Diabetes, 41 Suppl 2, 49–51. https://doi.org/10.2337/diab.41.2.s49.

Chen, H., Virk, M. S., & Chen, F. (2016). Phenolic acids inhibit the ation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on their reducing powers and structures. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 67(4), 400-411.

Chhabra A, Ram AK, Bhatia A, Goel S (2018) Effect of Dietary Advanced Glycation end Products on Cell Cycle of Peripheral Blood Lymphocytes. J Blood Lymph 8: 211. doi:10.4172/2165-7831.1000211

Chiti, F., Bucciantini, M., Capanni, C., Taddei, N., Dobson, C.M., and Stefani, M. 2001. Solution conditions can promote ation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain. Protein Sci. 10: 2541–2547

Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. International journal of molecular sciences, 11(2), 458–479. https://doi.org/10.3390/ijms11020458

Conconi, M., Szweda, L.I., Levine, R.L., Stadtman, E.R., Friguet, B., 1996. Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. Arch. Biochem. Biophys. 331, 232–240.

Dall, T. M., Yang, W., Halder, P., Pang, B., Massoudi, M., Wintfeld, N., ... & Hogan, P. F. (2014). The economic burden of elevated blood glucose levels in 2012: diagnosed and undiagnosed diabetes, gestational diabetes mellitus, and prediabetes. Diabetes care, 37(12), 3172-3179.

Danze, P. M., Tarjoman, A., Rousseaux, J., Fossati, P., & Dautrevaux, M. (1987). Evidence for an increased glycation of IgG in diabetic patients. Clinica chimica acta, 166(2-3), 143-153.

Desai, P. S. (2018). Calotropis gigantea leaves ark used as corrosion inhibitor for aluminum in hydrochloric acid. Der Pharma Chemica, 10, 7-12.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan, D. M., Genuth, S., Lachin, J., Cleary, P., Crofford, O., Davis, M., Rand, L., & Siebert, C. (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The New England journal of medicine, 329(14), 977–986. https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291401

Dincer, Y., Akcay, T., Alademir, Z., & Ilkova, H. (2002). Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Metabolism-Clinical and Experimental, 51(10), 1360-1362.

Dolhofer-Bliesener, R., Lechner, B., & Gerbitz, K. D. (1996). Possible significance of advanced glycation end products in serum in end-stage renal disease and in

late complications of diabetes. European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies, 34(4), 355–361. https://doi.org/10.1515/cclm.1996.34.4.355

Dunn, J.A., Patrick, J.S., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., 1989. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. Biochemistry 28, 9464–9468.

Eiland, M. M., Lyamin, O. I., & Siegel, J. M. (2001). State-related discharge of neurons in the brainstem of freely moving box turtles, Terrapene carolina major. Archives Italiennes de Biologie, 139(1-2), 23.

Engerman, R. L., & Kern, T. S. (1987). Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. Diabetes, 36(7), 808–812. https://doi.org/10.2337/diab.36.7.808

Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the bradford protein assay. Journal of visualized experiments : JoVE, (38), 1918. https://doi.org/10.3791/1918.

Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., Ghezzi, P., 2002. Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 3505–3510.

Friedmann, E., & Giršavičius, J. (1936). Reactions of pyruvic acid with thiolacetic acid and cysteine. Biochemical Journal, 30(10), 1886.

Friguet, B., 2002. Aging of proteins and the proteasome. Prog. Mol. Subcell. Biol. 29, 17–33.

Friguet, B., Bulteau, A.L., Chondrogianni, N., Conconi, M., Petropoulos, I., 2000. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. Ann. NY Acad. Sci. 908, 143–154.

Fuss, I. J., Kanof, M. E., Smith, P. D., & Zola, H. (2009). Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. Current protocols in immunology, Chapter 7, 7.1.1–7.1.8. https://doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85

Gardiner, T. A., Stitt, A. W., & Archer, D. B. (1995). Retinal vascular endothelial cell endocytosis increases in early diabetes. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 72(4), 439–444.

Giardino, I., Edelstein, D., & Brownlee, M. (1994). Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. The Journal of clinical investigation, 94(1), 110–117. https://doi.org/10.1172/JCI117296

Giardino, I., Edelstein, D., & Brownlee, M. (1996). BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced ation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. The Journal of clinical investigation, 97(6), 1422-1428.

Globerson, A., Effros, R.B., 2000. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. Immunol. Today 21, 515–521.

Gothai, E., Thamilselvan, R., Natesan, P., Keerthivasan, M., Kabinesh, K., & Ruban, D. K. (2022, January). Plastic Waste Classification Using CNN for Supporting 3R's Principle. In 2022 International Conference on Computer Communication and Inatics (ICCCI) (pp. 01-07). IEEE.

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. Cold Spring Harbor Protocols, 2019(1), pdb-top100388.

Gülçin I, Küfrevioglu OI, Oktay M, Büyükokuroglu ME, Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (Urtica dioica L.). Journal of ethnopharmacology, 90(2004) 205–215. https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.028

Hamilos, D. L., Zelarney, P., & Mascali, J. J. (1989). Lymphocyte proliferation in glutathione-depleted lymphocytes: direct relationship between glutathione availability and the proliferative response. Immunopharmacology, 18(3), 223–235. https://doi.org/10.1016/0162-3109(89)90020-9

Harding J. J, Crabbe M. J. C.(1984). The lens: development proteins,metabolism and cataract. In: Davson H ed.The Eye,Vol 1b.New York, NY: Academic, 207-492 .

Hipkiss, A. R. (2006). Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. Experimental gerontology, 41(5), 464-473.

Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. C., Shafer, L. A., Dow, S., Berry, M. J., & Hoffmann, P. R. (2010). Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols. The Journal of nutrition, 140(6), 1155–1161. https://doi.org/10.3945/jn.109.120725

Horie, K., Miyata, T., Yasuda, T., Takeda, A., Yasuda, Y., Maeda, K., Sobue, G., Kurokawa, K., 1997. Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. Biochem. Biophys. Res. Commun. 236, 327–332.

Husmann, M. A. T. F. H. I. A. S., Roth, J. U. R. G. E. N., Kabat, E. A., Weisgerber, C., Frosch, M. A. T. T. H. I. A. S., & Bitter-Suermann, D. I. E. T. E. R. (1990). Immunohistochemical localization of polysialic acid in tissue sections: differential binding to polynucleotides and DNA of a murine IgG and a human IgM monoclonal antibody. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 38(2), 209-215.

Inlong Z., Yonghong L., Lili Xu., Jianhua Z., Yuhai L., Vaileth T., Ziye Z., Hong L., Zhenxing L., Thermal induced the structural alterations, increased IgG/IgE binding capacity and reduced immunodetection recovery of tropomyosin from shrimp (Litopenaeus vannamei),Food Chemistry,Volume 391,2022, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133215

Jana, C.K., Das, N., Sohal, R.S., 2002. Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. Arch. Biochem. Biophys. 397, 433–439. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2020 68 (22), 6065-6075 https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01233

Jefferies, H., Coster, J., Khalil, A., Bot, J., McCauley, R. D., & Hall, J. C. (2003). Glutathione. ANZ journal of surgery, 73(7), 517–522. https://doi.org/10.1046/j.1445-1433.2003.02682.x

Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. Journal of agricultural and food chemistry, 57(19), 8798–8804. https://doi.org/10.1021/jf901280r

Kahleova H, Znayenko-Miller T, Uribarri J, Holubkov R, Barnard ND.Dietary advanced glycation products and their associations with insulin sensitivity and body weight: A 16-week randomized clinical trial. Obes Sci Pract. 2022 Oct 21;9(3):235-242. doi: 10.1002/osp4.646. eCollection 2023 Jun.PMID: 37287522

Kalapos, M. P. (2008). Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. Drug metabolism and drug interactions, 23(1-2), 69-92.

Kaufmann, H., Bailey, J.E., Fussenegger, M., 2001. Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by twodimensional gel electrophoresis. Proteomics 1, 194–199.

Keller, T.N., Huang, F.F., Zhu, T., Yu, T., Ho, Y.S., Kindy, T.S., 2000. Oxidative stress-associated impairment of proteasome activity during ischemia-reperfusion injury. J. Cereb. Blood Flow Metab. 20, 1467–1473.

Kennedy, D. M., Skillbn, A. W., & Self, C. H. (1994). Glycation of monoclonal antibodies impairs their ability to bind antigen. Clinical & Experimental Immunology, 98(2), 245-251.

Khanam, A., Alouffi, S., Rehman, S., Ansari, I. A., Shahab, U., & Ahmad, S. (2021). An in vitro approach to unveil the structural alterations in d-ribose induced glycated fibrinogen. Journal of biomolecular structure & dynamics, 39(14), 5209–5223. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1802339

Khurana, S., Corbally, M. T., Manning, F., Armenise, T., Kierce, B., & Kilty, C. (2002). Glutathione S-transferase: a potential new marker of intestinal ischemia. Journal of pediatric surgery, 37(11), 1543–1548. https://doi.org/10.1053/jpsu.2002.36181

Kimura, T., Takamatsu, J., Miyata, T., Miyakawa, T., Horiuchi, S., 1998. Localization of identified advanced glycation end-product structures. Nepsilon(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. Pathol. Int. 48, 575–579.

King, G. L., Kunisaki, M., Nishio, Y., Inoguchi, T., Shiba, T., & Xia, P. (1996).

Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. Diabetes, 45 Suppl 3, S105–S108. https://doi.org/10.2337/diab.45.3.s105

Knecht, R., Leber, R., & Hasslacher, C. (1987). Degradation of glomerular basement membrane in diabetes. I. Susceptibility of diabetic and nondiabetic basement membrane to proteolytic degradation of isolated glomeruli. Research in experimental medicine. Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie, 187(5), 323–328. https://doi.org/10.1007/BF01855657.

Kohn, R. R., Cerami, A., & Monnier, V. M. (1984). Collagen aging in vitro by nonenzymatic glycosylation and browning. Diabetes, 33(1), 57–59. https://doi.org/10.2337/diab.33.1.57

Koschinsky, T., He, C. J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Heitmann, K., & Vlassara, H. (1997). Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(12), 6474–6479. https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6474

Krischer, J. P., Lynch, K. F., Schatz, D. A., Ilonen, J., Lernmark, Å., Hagopian, W. A., ... & TEDDY Study Group. (2015). The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. Diabetologia, 58, 980-987.

Kwon, H. S., Cho, J. H., Kim, H. S., Song, B. R., Ko, S. H., Lee, J. M., ... & Yoon, K. H. (2004). Establishment of blood glucose monitoring system using the internet. Diabetes care, 27(2), 478-483.

Kyriazis, I. D., Koutsoni, O. S., Aligiannis, N., Karampetsou, K., Skaltsounis, A. L., & Dotsika, E. (2016). The leishmanicidal activity of oleuropein is selectively regulated through inflammation- and oxidative stress-related genes. Parasites & vectors, 9(1), 441. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1701-4

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

Lapolla, A., Fedele, D., & Traldi, P. (2000). The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation in diabetes. Mass spectrometry reviews, 19(5), 279-304.

Li, D., Beisswenger, C., Herr, C., Hellberg, J., Han, G., Zakharkina, T., ... & Bals, R. (2014). Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/β-catenin signaling in murine and human tumor cells. Oncogene, 33(10), 1239-1248.

Li, Y., Teng, D. I., Shi, X., Qin, G., Qin, Y., Quan, H., ... & Shan, Z. (2020). Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study. bmj, 369.

Ling, X., Sakashita, N., Takeya, M., Nagai, R., Horiuchi, S., Takahashi, K., 1998. Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end products in human tissues. Lab. Invest. 78, 1591–1606.

Linton, P., Thoman, M.L., 2001. T cell senescence. Front Biosci. 6, D248–D261.

Mackic, J. B., Stins, M., McComb, J. G., Calero, M., Ghiso, J., Kim, K. S., Yan, S. D., Stern, D., Schmidt, A. M., Frangione, B., & Zlokovic, B. V. (1998). Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1- 40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. The Journal of clinical investigation, 102(4), 734–743. https://doi.org/10.1172/JCI2029

Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E. J., Yang, Z., Skolnik, E., Delaney, V., Friedman, E. A., Cerami, A., & Vlassara, H. (1991). Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. The New England journal of medicine, 325(12), 836–842. https://doi.org/10.1056/NEJM199109193251202

Malik, P., Chaudhry, N., Mittal, R., & Mukherjee, T. K. (2015). Role of receptor for advanced glycation end products in the complication and progression of various types of cancers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1850(9), 1898-1904.

Mallipattu, S. K., He, J. C., & Uribarri, J. (2012). Role of advanced glycation endproducts and potential therapeutic interventions in dialysis patients. Seminars in dialysis, 25(5), 529–538. https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2012.01081.x

Matés J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology, 153(1-3), 83–104. https://doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00306-1

Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., Asenjo, M., & Márquez, J. (2002). Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. The international journal of biochemistry & cell biology, 34(5), 439–458. https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00143-1

Matsumoto, K., Ikeda, K., Horiuchi, S., Zhao, H., & Abraham, E. C. (1997). Immunochemical evidence for increased formation of advanced glycation end products and inhibition by aminoguanidine in diabetic rat lenses. Biochemical and biophysical research communications, 241(2), 352–354. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7744

Mazumder A, Gerlt JA, Absalon MJ., Stubbe J, Cunningham RP, Withka J, Bolton PH, Stereochemical studies of the. Beta.-elimination reactions at aldehydic abasic sites in DNA: endonuclease III from Escherichia Coli, sodium hydroxide, and Lys-Trp-Lys. Biochemistry, 30(1991) 1119-1126.

McWilliams, J. E., Sanderson, B. J., Harris, E. L., Richert-Boe, K. E., & Henner, W. D. (1995). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the

American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 4(6), 589–594.

Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S., Ebert, H., 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211, 1437–1438.

Miyata, T., Inagi, R., Iida, Y., Sato, M., Yamada, N., Oda, O., Maeda, K., & Seo, H. (1994). Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. The Journal of clinical investigation, 93(2), 521–528. https://doi.org/10.1172/JCI117002

Miyata, T., Oda, O., Inagi, R., Iida, Y., Araki, N., Yamada, N., Horiuchi, S., Taniguchi, N., Maeda, K., & Kinoshita, T. (1993). beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. The Journal of clinical investigation, 92(3), 1243–1252. https://doi.org/10.1172/JCI116696

Miyata, T., van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K., Baynes, J.W., 1999. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of carbonyl stress in long-term uremic complications. Kidney Int. 55, 389–399.

Miyazawa N, Kawasaki Y, Fuji J, et al. Immunological detection of fructated proteins in vitro and *in vivo*. Biochem J 1998;336:101–7.

Monnier, V. M., & Cerami, A. (1981). Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. Science (New York, N.Y.), 211(4481), 491–493. https://doi.org/10.1126/science.6779377

Nagaraj, R. H., Sarkar, P., Mally, A., Biemel, K. M., Lederer, M. O., & Padayatti, P. S. (2002). Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. Archives of biochemistry and biophysics, 402(1), 110-119.

Nicholl, I. D., Stitt, A. W., Moore, J. E., Ritchie, A. J., Archer, D. B., & Bucala, R. (1998). Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 4(9), 594–601.

Obayashi, H., Nakano, K., Shigeta, H., Yamaguchi, M., Yoshimori, K., Fukui, M., Fujii, M., Kitagawa, Y., Nakamura, N., Nakamura, K., Nakazawa, Y., Ienaga, K., Ohta, M., Nishimura, M., Fukui, I., & Kondo, M. (1996). Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product in vitro and in vivo. Biochemical and biophysical research communications, 226(1), 37–41. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1308

Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Osawa, T., Toyokuni, S., Tanaka, K., Uchida, K., 1999. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. J.

Biol. Chem. 274, 23787–23793.

Paul, R. G., & Bailey, A. J. (1996). Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. The international journal of biochemistry & cell biology, 28(12), 1297–1310. https://doi.org/10.1016/s1357-2725(96)00079-9

Pawelec, G., Barnett, Y., Forsey, R., Frasca, D., Globerson, A., McLeod, J., Caruso, C., Franceschi, C., Fulop, T., Gupta, S., Mariani, E., Mocchegiani, E., Solana, R., 2002. T cells and aging, January 2002 update. Front Biosci. 7, D1056–D1183.

Petropoulos, I., Conconi, M., Wang, X., Hoenel, B., Bregegere, F., Milner, Y., Friguet, B., 2000. Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 55, B220–B227

Pillai, S. S., Sugathan, J. K., & Indira, M. (2012). Selenium downregulates RAGE and NFκB expression in diabetic rats. Biological trace element research, 149, 71-77.

Pirart J. (1977). Diabète et complications dégénératives. Présentation d'une étude prospective portant sur 4400 cas observés entre 1947 et 1973 (troisième et dernière partie) [Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973 (3rd and last part) (author's transl)]. Diabete & metabolisme, 3(4), 245–256.

Poggioli, S., Bakala, H., & Friguet, B. (2002). Age-related increase of protein glycation in peripheral blood lymphocytes is restricted to preferential target proteins. Experimental gerontology, 37(10-11), 1207–1215. https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00145-6

Poggioli, S., Bakala, H., & Friguet, B. (2002). Age-related increase of protein glycation in peripheral blood lymphocytes is restricted to preferential target proteins. Experimental gerontology, 37(10-11), 1207–1215. https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00145-6.

Ponnappan, U., 2002. Ubiquitin-proteasome pathway is compromised in CD45RO þ and CD45RA þ T lymphocyte subsets during aging. Exp. Gerontol. 37, 359–367.

Ponnappan, U., Zhong, M., Trebilcock, G.U., 1999. Decreased proteasome-mediated degradation in T cells from the elderly: a role in immune senescence. Cell Immunol. 192, 167–174.

Pugliese, G., Pricci, F., Iacobini, C., Leto, G., Amadio, L., Barsotti, P., Frigeri, L., Hsu, D. K., Vlassara, H., Liu, F. T., & Di Mario, U. (2001). Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 15(13), 2471–2479. https://doi.org/10.1096/fj.01-0006com

R. Bucala, P. Model, A. Cerami, Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age related dysfunction in gene expression, Proc. Natl. Acad. Sci. 81105–109.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2011, May). Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. In Seminars in cell & developmental biology (Vol. 22, No. 3, pp. 309-317). Academic Press.

Radoff, S., Vlassara, H., & Cerami, A. (1988). Characterization of a solubilized cell surface binding protein on macrophages specific for proteins modified nonenzymatically by advanced glycosylated end products. Archives of biochemistry and biophysics, 263(2), 418–423. https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90654-6

Rahbar, S., Natarajan, R., Yerneni, K., Scott, S., Gonzales, N., & Nadler, J. L. (2000). Evidence that pioglitazone, metin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. Clinica chimica acta, 301(1-2), 65-77.

Ramakrishnan, P., Clark, P. M., Mason, D. E., Peters, E. C., Hsieh-Wilson, L. C., & Baltimore, D. (2013). Activation of the transcriptional function of the NF-κB protein c-Rel by O-GlcNAc glycosylation. Science signaling, 6(290), ra75-ra75.

Regnell, S. E., & Lernmark, Å. (2017). Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. Diabetologia, 60(8), 1370-1381.

Rennie, M. J., Bowtell, J. L., Bruce, M., & Khogali, S. E. (2001). Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. *The Journal of nutrition*, *131*(9 Suppl), 2488S–7S. https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2488S

Rennie, M. J., Bowtell, J. L., Bruce, M., & Khogali, S. E. (2001). Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. The Journal of nutrition, 131(9 Suppl), 2488S–7S. https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2488S

Roberts, L. D., Koulman, A., & Griffin, J. L. (2014). Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from the metabolome. The lancet Diabetes & endocrinology, 2(1), 65-75.

Ruderman, N. B., Williamson, J. R., & Brownlee, M. (1992). Glucose and diabetic vascular disease. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 6(11), 2905–2914. https://doi.org/10.1096/fasebj.6.11.1644256

Sell, D. R., & Monnier, V. M. (1990). End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. The Journal of clinical investigation, 85(2), 380–384. https://doi.org/10.1172/JCI114449

Sell, D.R., Monnier, V.M., 1989. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. J. Biol. Chem. 264, 21597–21602.

Sell, D.R., Primc, M., Schafer, I.A., Kovach, M., Weiss, M.A., Monnier, V.M., 1998. Cell-associated pentosidine as a marker of aging in human diploid cells in vitro and *in vivo*. Mech. Ageing Dev. 105, 221–240.

Sgarbieri, V. C., Amaya, J., Tanaka, M., & Chichester, C. O. (1973). Nutritional consequences of the Maillard reaction. Amino acid availability from fructose-leucine and fructose-tryptophan in the rat. The Journal of nutrition, 103(5), 657–663. https://doi.org/10.1093/jn/103.5.657

Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conation and function. J. Biol. Chem. 1984; 259: 3812–3817. PMID: 6706980

Shinohara, M., Thornalley, P. J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S. R., Onorato, J., & Brownlee, M. (1998). Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. The Journal of clinical investigation, 101(5), 1142–1147. https://doi.org/10.1172/JCI119885

Sidra I., Moinuddin, A.R. M., Alok R., Safia H., Khursheed A. & Asif A. (2018) Glycation, oxidation and glycoxidation of IgG: a biophysical, biochemical, immunological and hematological study, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 36:10, 2637-2653, https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1365770

Song, M., Wang, K., Lu, H., Yan, S., Wu, L., & Xue, X. (2021). Composition and distribution of α-dicarbonyl compounds in propolis from different plant origins and extraction processing. Journal of Food Composition and Analysis, 104, 104141.

Srisailam, S., Wang, H.M., Kumar, T.K., Rajalingam, D., Sivaraja, V., Sheu, H.S., Chang, Y.C., and Yu, C. 2002. Amyloid-like fibril ation in an all -barrel protein involves the ation of partially structured intermediate(s). J. Biol. Chem. 277: 19027–19036 [Epub 12002 Mar 19024].

Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. Ann. NY Acad. Sci. 899, 191–208.

Stevens, V. J., Rouzer, C. A., Monnier, V. M., & Cerami, A. (1978). Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75(6), 2918–2922. https://doi.org/10.1073/pnas.75.6.2918

Stitt AW, He C, Friedman S, et al. Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. Molecular Medicine (Cambridge, Mass.). 1997 Sep;3(9):617-627. DOI: 10.1007/bf03401819. PMID: 9323713; PMCID: PMC2230092.

Stitt, A. W., Burke, G. A., Chen, F., McMullen, C. B., & Vlassara, H. (2000). Advanced glycation end-product receptor interactions on microvascular cells occur within caveolin-rich membrane domains. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology,

14(15), 2390–2392. https://doi.org/10.1096/fj.00-0289fje

Stitt, A. W., Chakravarthy, U., Archer, D. B., & Gardiner, T. A. (1995). Increased endocytosis in retinal vascular endothelial cells grown in high glucose medium is modulated by inhibitors of nonenzymatic glycosylation. Diabetologia, 38(11), 1271–1275. https://doi.org/10.1007/BF00401758

Stitt, A. W., Li, Y. M., Gardiner, T. A., Bucala, R., Archer, D. B., & Vlassara, H. (1997). Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. The American journal of pathology, 150(2), 523–531.

Stitt, A. W., Moore, J. E., Sharkey, J. A., Murphy, G., Simpson, D. A., Bucala, R., Vlassara, H., & Archer, D. B. (1998). Advanced glycation end products in vitreous: Structural and functional implications for diabetic vitreopathy. Investigative ophthalmology & visual science, 39(13), 2517–2523.

Talent, J.M., Kong, Y., Gracy, R.W., 1998. A double stain for total and oxidized proteins from two-dimensional fingerprints. Anal. Biochem. 263, 31–38.

Teillet, L., Verbeke, P., Gouraud, S., Bakala, H., Borot-Laloi, C., Heudes, D., Bruneval, P., Corman, B., 2000. Food restriction prevents advanced glycation end product accumulation and retards kidney aging in lean rats. J. Am. Soc. Nephrol. 11, 1488–1497

Thornalley, P. J., & Rabbani, N. (2011, May). Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. In Seminars in cell & developmental biology (Vol. 22, No. 3, pp. 318-325). Academic Press.

Thornalley, P. J., Battah, S., Ahmed, N., Karachalias, N., Agalou, S., Babaei-Jadidi, R., & Dawnay, A. (2003). Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. Biochemical Journal, 375(3), 581-592.

Ting F., Qiang Z., Fangzhi L., Shuyu C., Shuanglin P., Jingang X., Advanced glycation end products inhibit the osteogenic differentiation potential of adipose-derived stem cells in mice through autophagy, Cellular Signalling, Volume 108,2023,https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110694.

Tsilibary, E. C., Charonis, A. S., Reger, L. A., Wohlhueter, R. M., & Furcht, L. T. (1988). The effect of nonenzymatic glucosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. The Journal of biological chemistry, 263(9), 4302–4308.

Udayan D., Menashi A. C., Joel A. D.,Nonenzymatic glycation of DNA nucleosides with reducing sugars,Analytical Biochemistry,Volume 345, Issue 2,2005,Pages 171-180, ISSN 0003-2697,https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.07.034

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet.

Van Boekel, M. A., van den Bergh, P. J., & Hoenders, H. J. (1992). Glycation of

human serum albumin: inhibition by Diclofenac. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1120(2), 201-204.

Vander Jagt, D. L., & Hunsaker, L. A. (2003). Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. Chemico-biological interactions, 143, 341-351.

Vasan, S., Zhang, X., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S., Basgen, J., Wagle, D., Shih, D., Terlecky, I., Bucala, R., Cerami, A., Egan, J., & Ulrich, P. (1996). An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. Nature, 382(6588), 275–278. https://doi.org/10.1038/382275a0

Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. Nutrients, 2(11), 1106-1131.

Verbeke, P., Clark, B.F., Rattan, S.I., 2000. Modulating cellular aging in vitro: hormetic effects of repeated mild heat stress on protein oxidation and glycation. Exp. Gerontol. 35, 787–794.

Verbeke, P., Perichon, M., Borot-Laloi, C., Schaeverbeke, J., Bakala, H., 1997. Accumulation of advanced glycation end products in the rat nephron: link with circulating AGEs during aging. J. Histochem. Cytochem. 45, 1059–1068.

Verzijl, N., DeGroot, J., Oldehinkel, E., Bank, R.A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Bayliss, M.T., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., Tekoppele, J.M., 2000. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. Biochem. J. 350 Pt 2, 381–387.

Vitek, M. P., Bhattacharya, K., Glendening, J. M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., Manogue, K., & Cerami, A. (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(11), 4766–4770. https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4766

Vitro.van der Lugt T, Weseler AR, Gebbink WA, Vrolijk MF, Opperhuizen A, Bast A. Dietary Advanced Glycation Endproducts Induce an Inflammatory Response in Human Macrophages in Nutrients. 2018 Dec 2;10(12):1868. doi: 10.3390/nu10121868.PMID: 30513810

Vlassara H. (1997). Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. Diabetes, 46 Suppl 2, S19–S25. https://doi.org/10.2337/diab.46.2.s19

Vlassara, H., & Palace, M. R. (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. Journal of internal medicine, 251(2), 87–101. https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.00932.x

Vlassara, H., Brownlee, M., & Cerami, A. (1986). Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. The Journal of experimental medicine, 164(4), 1301–1309.

https://doi.org/10.1084/jem.164.4.1301

Vlassara, H., Brownlee, M., & Cerami, A. (1988). Specific macrophage receptor activity for advanced glycosylation end products inversely correlates with insulin levels in vivo. Diabetes, 37(4), 456–461. https://doi.org/10.2337/diab.37.4.456

Vlassara, H., Bucala, R., & Striker, L. (1994). Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 70(2), 138–151.

Vlassara, H., Moldawer, L., & Chan, B. (1989). Macrophage/monocyte receptor for nonenzymatically glycosylated protein is upregulated by cachectin/tumor necrosis factor. The Journal of clinical investigation, 84(6), 1813–1820. https://doi.org/10.1172/JCI114366

Wang L, Yen JH, Liang HL and Wu MJ. "Antioxidant effect of methanol extracts from lotus plumule and blossom (Nelumbo nucifera Gertn.)," Journal of Food and Drug Analysis 11 (2003) https://doi.org/10.38212/2224-6614.2726

Wang, Y., & Ho, C. T. (2012). Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal. Chemical Society Reviews, 41(11), 4140-4149.

Wasserfall, C. H., & Atkinson, M. A. (2006). Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. Autoimmunity reviews, 5(6), 424-428.

Watkins, N. G., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (1985). Glycation of amino groups in protein. Studies on the specificity of modification of RNase by glucose. The Journal of biological chemistry, 260(19), 10629–10636.

Watson, M. E., Diepeveen, L. A., Stubbs, K. A., & Yeoh, G. C. (2015). Glycosylation-related diagnostic and therapeutic drug target markers in hepatocellular carcinoma. J Gastrointestin Liver Dis, 24(3), 349-57.

Wolffenbuttel, B. H., Boulanger, C. M., Crijns, F. R., Huijberts, M. S., Poitevin, P., Swennen, G. N., Vasan, S., Egan, J. J., Ulrich, P., Cerami, A., & Lévy, B. I. (1998). Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(8), 4630–4634. https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4630

Wollinger, A., Perrin, É., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from Rosmarinus officinalis L. leaves determined by DPPH assays. Comptes Rendus Chimie, 19, 754-765.

Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., ... & Zhang, Y. (2011). Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. Genes & development, 25(7), 679.

Xie, Y., Xiao, J., Kai, G., & Chen, X. (2012). Glycation of plasma proteins in type II diabetes lowers the non-covalent interaction affinities for dietary polyphenols. Integrative Biology, 4(5), 502-507.

Yan, L.J., Levine, R.L., Sohal, R.S., 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11168–11172.

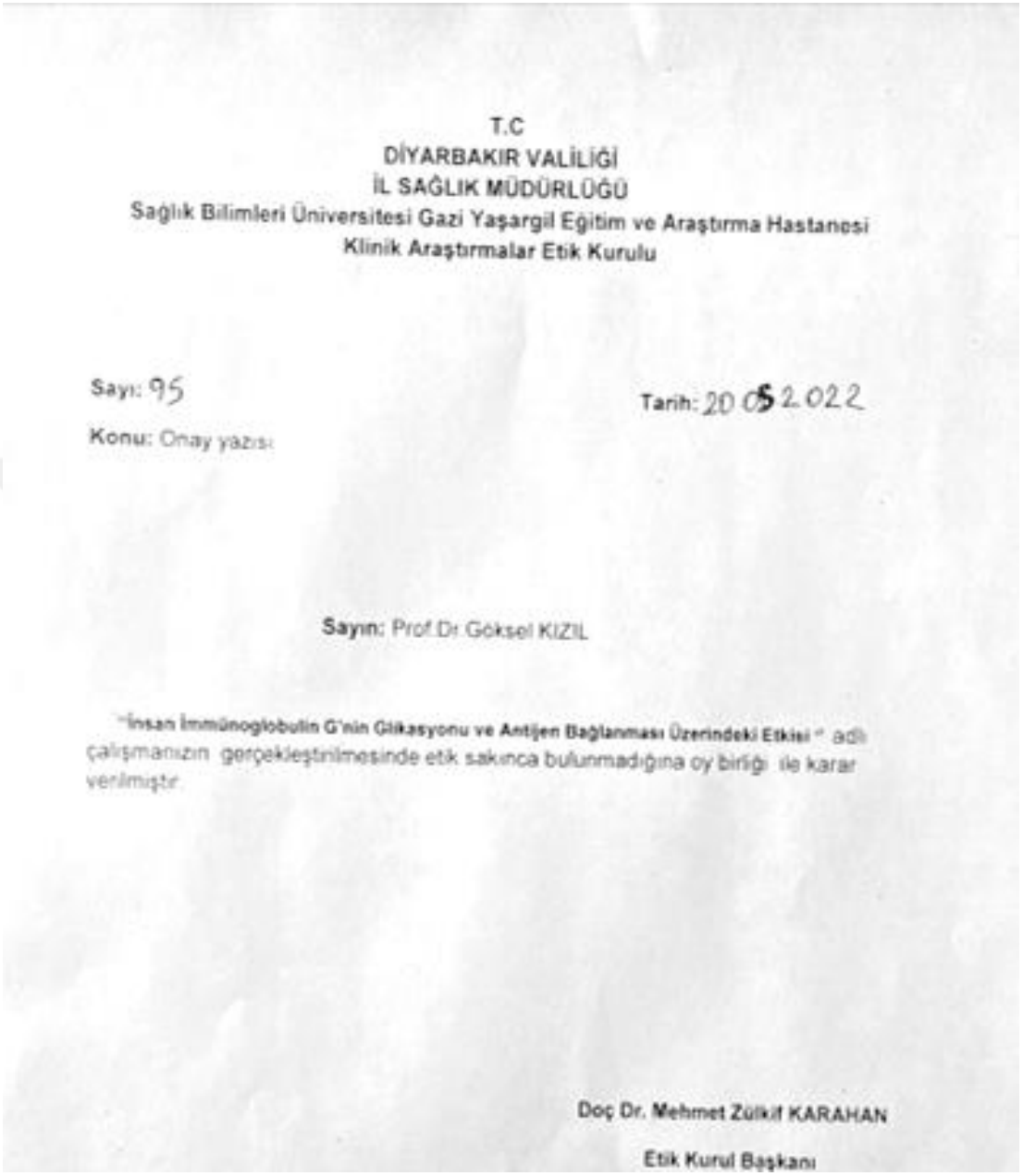
Yan, L.J., Sohal, R.S., 1998. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12896–12901.

Yang L., Lu L., Shaofeng Y., Yahui G., Weirong Y., Weibiao Z., Hang Y., ation of advanced glycation end-products and α-dicarbonyl compounds through Maillard reaction: Solutions from natural polyphenols,Journal of Food Composition and Analysis,Volume 120,2023, https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105350

Zaman A, Arif Z., Alam, K. Fructosylation induced structural changes in mammalian DNA examined by biophysical techniques. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 174(2017) 171-176.

EKLER

Ek 1: Klinik Araştırmalar Etik Kurul Raporu



T.C
DİYARBAKIR VALİLİĞİ
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı: 95

Tarih: 20 05 2022

Konu: Onay yazısı

Sayın: Prof.Dr Göksel KIZIL

"İnsan İmmünoglobulin G'nin Glikasyonu ve Antijen Bağlanması Üzerindeki Etkisi" adlı çalışmanızın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç Dr. Mehmet Zülkif KARAHAN

Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler / **Personal Ination**

Soyad, Ad **/ Surname, Name**	Akay, Feryal Zeliha
Web sayfası / **Web Page** (Research Gate, Academia, etc.)	

Eğitim Bilgileri / **Education**

Derece **/ Degree**	Kurum **/ Institution**	Mezuniyet Yılı / **Year of Graduation**
Yüksek Lisans **/ MS**	Dicle Üniversitesi	2018
Lisans **/ BS**	Dicle Üniversitesi	2015
Lise **/ High School**	MelikAhmet Lisesi	2005

İş Deneyimi / **Work Experience**

Dönem (Yıl) / **Period (Year)**	Şirket, Kurum/ **Company, Institution**	Görev **/ Enrollment**
2012-2013	Havalimanı Çelebi Hava Servisi	Yer Hizmetleri Memuru
2015	Diyarbakır Ali Emiri Anadolu Lisesi	Kimya Öğretmenliği
2018	Lila Kozmetik	AR-GE uzmanı
2020-2021	Labixir İlaç	Ar&Ge Analist

Yabancı Dil / **Foreign Languages**

İngilizce

Yayınlar / **Publications**

1.İ nceören, N., Akay, F., Nas, C. et al. Antiglycative Effect of Combination of Extracts of Capsicum annuum (chilli) and Pyridoxamine Against Glycation in Streptozotocin-induced Experimental Diabetes in Rats. Rev. Bras. Farmacogn. (2023). https://doi.org/10.1007/s43450-023-00414-6

2. Akay, F. & Kızıl, G. (2023). Determination of Antioxidant Activity of Dietary Selenium, Oleuropein, Glutathione Mixture . European Journal of Technique (EJT) , 13 (1) , 49-53 . DOI: 10.36222/ejt.1303042

Özel İlgiler / **Hobbies**

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK BİLDİRİMİ FORMU

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışmamın toplam 105 sayfalık kısmına ilişkin, 02/10/2023 tarihinde şahsım tarafından iThenticate isimli intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 14 olarak tespit edilmiştir.

Öğrencinin Adı, Soyadı	Feryal Zeliha Akay		
Öğrenci No	18803504		
Ana Bilim Dalı	Kimya		
Program Türü	Proje ☐	Yüksek Lisans ☐	Doktora X
Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	Prof. Dr. Göksel Kızıl		
(Varsa) II. Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	Prof. Dr. Beran Yokuş		
Tez Başlığı	İnsan İmmünoglobulin G'nin Glikasyonu Ve Antijen Bağlanması Üzerindeki Etkisi		
RAPOR BİLGİLERİ			
Raporlama Aşaması	Tez Savunma Sınavı Sonrası		
Sayfa Sayısı	105		
Raporlama Tarihi	02.10.2023		
Benzerlik Oranı (%)	%14		

Uygulanan filtrelemeler:

☐Başlangıç Bölümleri (Kabul ve Onay sayfası, Teşekkür sayfası, Özet/Abstract) hariç

XKaynaklar hariç

☐Alıntılar hariç/dâhil

☐Diğer (Açıklayınız)

Tezimin benzerlik oranı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İntihal Raporu Uygulama Esaslarında belirtilen üst sınır benzerlik oranını aşmamaktadır. Benzerlik oranım üst sınır benzerlik oranının altında olsa dahi aksinin tespit edilmesi durumunda her türlü yasal sorumluğu kabul ettiğimi ve hukuki sonuçlarına razı olduğumu bildirir,
gereğini arz ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı: Feryal Zeliha Akay

Tarih:02.10.2023

İmza:

Danışman Adı, Soyadı: İmza:

Prof. Dr. Göksel Kızıl

Tarih:02.10.2023

Ana Bilim Dalı Başkanı Adı, Soyadı: İmza:

Prof. Dr. Berrin Ziyadanoğlu

Tarih:02.10.2023