

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PIROLOKİNOLİN KİNON'UN (PQQ) SH-SY5Y HÜCRE
HATTI ÜZERİNDE ANTI-ALZHEİMER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANAN BAĞCI TAN

DENİZLİ, ARALIK - 2021

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**PIROLOKİNOLİN KİNON'UN (PQQ) SH-SY5Y HÜCRE
HATTI ÜZERİNDE ANTI-ALZHEİMER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANAN BAĞCI TAN

DENİZLİ, ARALIK - 2021

Bu tez çalışması PAÜ-BAP tarafından 2020 FEBE 021 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Canan BAĞCI TAN

ÖZET

**PIROLOKİNOLİN KİNON'UN (PQQ) SH-SY5Y HÜCRE HATTI
ÜZERİNDE ANTI-ALZHEİMER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
CANAN BAĞCI TAN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ASLI SEMİZ)**

DENİZLİ, ARALIK - 2021

Alzheimer hastalığı (AH) nöropatolojik olarak β -amiloid plaklarının (APP) birikmesi, hücre içi nörofibriler düğümler ve beyindeki nöronların kaybı ile karakterizedir. AH'nin nedeni belirsiz olmasına rağmen birkaç araştırmada, bazı genlerin AH'nin artmasında ve patogeneğinde önemli ölçülerde etkili olduğu görülmektedir. Pirolokinolin kinon (PQQ), metoksatın olarak da bilinen bir redoks kofaktörüdür. Hücre kültürü deneylerinde ve insan hastalıklarının hayvan modellerinde temel bir besin maddesi, antioksidan ve redoks modülatörü olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Son yapılan çalışmalar PQQ'nun nöroprotektif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. PQQ'nun inme modelinde nöronal hücre ölümünü önlediği bildirilmiştir. Bu çalışmada, insan nöroblastom hücre hattında (SH-SY5Y) PQQ'nun anti-Alzheimer etkinlikleri araştırılmıştır. Bileşiğin SH-SY5Y hücreleri üzerinde EC05 ve EC10 dozları belirlendi. Her gene qRT-PCR analizi yapılması için hücrelere belirlenen dozlarda PQQ uygulanarak total RNA izole edildi. Bileşiğin APP, CD2AP, PSEN1, PSEN2, SORL1, APOE, BIN1, CLU, MMP9, PICALM, CR1, MS4A1 ve ABCA7 ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi analiz edildi. PQQ bileşiğinde bu bağlamda PSEN1 ve PSEN2 mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,102 μ M doz uygulamasında sırayla 4,18 kat ve 4,77 kat anlamlı artma görüldü. Ayrıca yine aynı genlerin ekspresyon düzeylerinde 5,0054 μ M doz uygulamasında sırayla 4,44 kat ve 22,9 kat artma meydana geldi. Benzer şekilde CLU, ABCA7 ve CR1 genlerinin mRNA düzeylerinde 3,102 μ M doz uygulamasında sırasıyla 3,97 kat, 9,84 kat ve 8,69 kat anlamlı artma görülürken, aynı genlerin ekspresyon düzeylerinde 5,0054 μ M doz uygulamasında sırayla 5,68 kat, 12,71 kat ve 5,65 kat artış görüldü. Bunun yanında BIN1 ve MMP9 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,102 μ M doz uygulamasında sırasıyla 10,06 kat ve 2,6 kat anlamlı azalma ile 5,0054 μ M doz uygulamasında sırayla 7,24 kat ve 4,27 kat anlamlı azalış görüldü. Alzheimer hastalığı ile ilişkili genlerin sonuçlarına göre PQQ'nun terapötik potansiyeli olduğunu söyleyebiliriz.

ANAHTAR KELİMELER: Pirolokinolin Kinon, Alzheimer, Metoksatın, SH-SY5Y

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTI-ALZHEIMER EFFECTS OF PYRROLOQUINOLINE QUINONE (PQQ) ON SH-SY5Y CELL LINE

MSC THESIS

CANAN BAĞCI TAN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOMEDICAL ENGINEERING DEPARTMENT

(SUPERVISOR:ASSOC. PROF. DR. ASLI SEMİZ)

DENİZLİ, DECEMBER 2021

Alzheimer's disease (AD) is neuropathologically characterized by accumulation of β -amyloid plaques (APP), intracellular neurofibrillary tangles, and loss of neurons in the brain. Although the cause of AD is unclear, few studies suggest that certain genes are significantly involved in the increase and pathogenesis of AD. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is a redox cofactor, also known as methoxatin. It is known to function as an essential nutrient, antioxidant, and redox modulator in cell culture experiments and animal models of human diseases. Recent studies have shown that PQQ has neuroprotective activity. It has been reported that PQQ prevents neuronal cell death in a stroke model. In this study, the anti-Alzheimer's activities of PQQ in the human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) were investigated. EC₀₅ and EC₁₀ doses of the compound were determined on SH-SY5Y cells. For qRT-PCR analysis of each gene, total RNA was isolated by applying PQQ to the cells at determined doses. The effect of the compound on the expression level of APP, CD2AP, PSEN1, PSEN2, SORL1, APOE, BIN1, CLU, MMP9, PICALM, CR1, MS4A1, and ABCA7 was analyzed. In this context, PSEN1 and PSEN2 mRNA expression levels in PQQ compound increased 4.18 fold and 4.77 fold, respectively, at a dose of 3.102 μ M. In addition, the expression levels of the same genes increased 4.44 fold and 22.9 fold, respectively, in the application of 5.0054 μ M dose. Similarly, while the mRNA levels of CLU, ABCA7 and CR1 genes were significantly increased by 3.102 μ M dose application, 3.97 fold, 9.84 fold and 8.69 fold, respectively, the expression levels of the same genes were increased 5.68 fold, 12.71 fold and 5.65 fold, respectively, at 5.0054 μ M dose. In addition, the mRNA expression levels of BIN1 and MMP9 genes decreased 10.06 fold and 2.6 fold, respectively, at the 3.102 μ M dose, and 7.24 fold and 4.27 fold, respectively, at the 5.0054 μ M dose. According to the results of the genes associated with Alzheimer's disease, we can say that PQQ has therapeutic potential.

KEYWORDS: Pyrroloquinoline Quinone, Alzheimer, Methoxatin, SH-SY5Y

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Amaç	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1 Kanser.....	3
2.1.1 Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	3
2.1.2 Apoptoz ve Apoptoz Genleri	5
2.2 Kanser Çeşitleri	6
2.3 Beyin Tümörleri	8
2.3.1 Nöroblastom.....	9
2.3.2 Alzheimer Hastalığı Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	10
2.3.3 Alzheimer Hastalığı Klinik Bulgular ve Evreleri	12
2.3.3.1 Preklinik Evre.....	13
2.3.3.2 Hafif Evre.....	13
2.3.3.3 İleri Evre.....	14
2.3.3.4 Ağır Evre.....	14
2.3.4 Alzheimer Hastalığı'nda Erken Başlangıçlı Genetiğin Rolü	14
2.3.4.1 Amiloid Prekürsör Protein (APP) Geni.....	15
2.3.4.2 Presenilin 1 (PSEN1) Geni	17
2.3.4.3 Presenilin 2 (PSEN2) Geni	17
2.3.5 Alzheimer Hastalığı'nda Geç Başlangıçlı Genetiğin Rolü	17
2.3.5.1 Apolipoprotein E (APOE) Geni	18
2.3.5.2 Sortilin Related Reseptör 1 (SORL1) Geni.....	18
2.3.5.3 ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7 (ABCA7) Geni ...	19
2.3.5.4 Clusterin (CLU) Geni.....	19
2.3.6 Alzheimer Hastalığı'nda Rol Alan Bazı Genler	20
2.3.6.1 Fosfatidilinositol Bağlayıcı Kltrin Birleşim Proteini (PICALM).....	20
2.3.6.2 Membran Kapsayan 4A (MS4A) Ailesi.....	20
2.3.6.3 Tamamlayıcı Bileşen Reseptörü 1 (CR1)	20
2.3.6.4 Köprü Oluşturan Entegratör 1 (BIN1)	20
2.3.6.5 Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP9).....	21
2.3.6.6 CD2 İle İlişkili Protein (CD2AP).....	21
2.3.7 Alzheimer Hastalığı Oluşumu İle İlgili Hipotezler.....	21
2.3.7.1 Kolinerjik Hipotez.....	22
2.3.7.2 Aβ Kaskad Hipotezi	22
2.3.7.3 Tau Hipotezi.....	22
2.3.7.4 Kolesterol Hipotezi	23
2.4 Pirolokinolin Kinon	23

2.4.1	Pirolokinolin Kinon'un Özellikleri.....	24
2.4.2	Kinolin ve Türevleri.....	27
2.4.3	Pirolokinolin Kinon ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	29
2.5	Çalışmanın Amacı	29
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	31
3.1	MATERYAL.....	31
3.1.1	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	31
3.1.2	Çalışmada Kullanılan Cihazlar	31
3.1.3	Çalışmada Kullanılan Kit, Vektör ve Hücreler.....	31
3.2	METOD.....	32
3.2.1	Hücre Kültürü	32
3.2.1.1	Hücrelerin Pasajlanması.....	33
3.2.1.2	Hücre Kültürü Modeli için PQQ Hazırlanışı	34
3.2.2	Sitotoksosite Deneyi	35
3.2.2.1	Doz Ayarlanması.....	37
3.2.3	Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA'ların Görüntülenmesi	37
3.2.4	cDNA Sentezi	39
3.3	Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	41
4.	BULGULAR	42
4.1	Sitotoksosite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
4.2	PQQ Bileşiminin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi	43
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	51
6.	KAYNAKLAR.....	59
7.	EKLER.....	83
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	84

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kansere diyebilmek için gereken oluşumlar	3
Şekil 2.2: Kansere neden olan hücresel değişimler.....	5
Şekil 2.3: Bazı kanser türleri ve mutasyon çeşitleri.....	7
Şekil 2.4: Beyindeki iyi ve kötü huylu tümör MRI görünümü	9
Şekil 2.5: Alois Alzheimer ve hastası Auguste Deter'in fotoğrafları.	11
Şekil 2.6: Alzheimer tarafından Auguste Deter'in erken ve geç evre nörofibriler yumak patolojisinin eskizleri.	11
Şekil 2.7: a-, b- ve c- sekretazlar tarafından APP bölünme yolları, toksik A β 42 peptidinin oluşturulduğu adımlar görülmektedir.....	16
Şekil 2.8: Pirolokinolin kinonun kristal yapısı ve kimliği	25
Şekil 2.9: Asetik asit bakterilerinin PQQ'ya bağlı dehidrogenazları	26
Şekil 3.1: Hücrelerin inkübe ortamı.	32
Şekil 3.2: SH-SY5Y hücrelerinin ilk ekildiğindeki ve sonra büyümüş hallerinin mikroskop görüntüleri.....	33
Şekil 3.3: Petride çoğaltılan SH-SY5Y hücreleri.....	33
Şekil 3.4: Santrifüj cihazı ve SH-SY5Y santrifüjünden elde edilen pelet.	34
Şekil 3.5: Pirolokinolin Kinon (PQQ).....	34
Şekil 3.6: Tripkan blue uygulanmış hücrelerin Thoma lamına koyularak mikroskop altında sayımı	35
Şekil 3.7: 96 kuyulu plakalara kristal viyole ve Na-sitrat uygulaması	36
Şekil 3.8: Çeşme suyunda 96 kuyulu plakadaki boyanın yıkanarak uzaklaştırılması ve Na-sitrat ile çalkalanması.....	36
Şekil 3.9: Değişik konsantrasyonlardaki PQQ'un hücre canlılığına olan etkisinin 630 nm'de plaka okuyucuda ölçülmesi	36
Şekil 3.10: Qiagen RNeasy Plus Universal Kiti ve alev çatısı.....	37
Şekil 3.11: Qiagen RNeasy Plus Universal Kiti içinden kullanılan solüsyonlar.	38
Şekil 3.12: RNA, DNA ve proteinlerin üç katman şeklinde ayrılmış hali.	38
Şekil 4.1: 1000 hücre ekilmiş hücrelerde PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.	42
Şekil 4.2: 5000 hücre ekilmiş hücrelerde PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.	43
Şekil 4.3: PQQ uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin RNA izolasyonu sonrası görüntüsü.	43
Şekil 4.4: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	44
Şekil 4.5: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	44
Şekil 4.6: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında APOE geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	45
Şekil 4.7: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CLU geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	45
Şekil 4.8: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	46

Şekil 4.9: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PCALM geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	46
Şekil 4.10: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında BIN1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	47
Şekil 4.11: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	47
Şekil 4.12: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MS4A1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	48
Şekil 4.13: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CD2AP geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	48
Şekil 4.14: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında SORL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	49
Şekil 4.15: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında APP geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	49
Şekil 4.16: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	50
Şekil 5.1: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında β amiloid üretimi ilişkili olan PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi.	53
Şekil 5.2: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında lipid metabolizması ilişkili olan ABCA7 ve APOE genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi..	54
Şekil 5.3: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında apoptoz ilişkili olan MMP9 ve CLU genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi.....	55
Şekil 5.4: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında nöroinflamasyon ve immün yanıt ilişkili olan CR1 ve MS4A1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi.....	56
Şekil 5.5: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında kolesterol metabolizması ilişkili olan SORL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi.....	56
Şekil 5.6: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında endositoz ve sinaptik fonksiyon ilişkili olan BIN1, PCALM, CD2AP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi.....	57

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Kinolin ve türevlerinin kaynakları ve kullanım yerleri	28
Tablo 3.1: cDNA sentez karışımı ve prosedürü	39
Tablo 3.2: qRT-PZR koşulları.	40
Tablo 3.3: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları	40
Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve sıcaklıkları	40
Tablo 5.1: PQQ bileşiği uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler	52

SEMBOL LİSTESİ

Aβ	: Amiloid β
AchE	: Asetilkolinesteraz
AD	: Alzheimer tipi demans
AH	: Alzheimer hastalığı
DMEM 12	: Dulbeco modifiye eagle besiyeri 12
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EBAH	: Erken başlangıçlı Alzheimer hastalığı
GBAH	: Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı
FBS	: Fetal bovine serum
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
PQQ	: Pirolokinolin Kinon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SH-SY5Y	: İnsan nöroblastoma hücre hattı
RT-PCR	: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
APP	: Amiloid Prekürsör Protein
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
APOE	: Apolipoprotein E
SORL1	: Sortilin Related Reseptör 1
ABCA7	: ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7
CLU	: Clusterin
PICALM	: Fosfatidilinositol Bağlayıcı Klatrin Birleşim Proteini
MS4A1	: Membran Kapsayan 4A Ailesi Üye 1
CR1	: Tamamlayıcı Bileşen Reseptörü 1
BIN1	: Köprü Oluşturan Entegratör 1
MMP9	: Matriks Metalloproteinaz 9
CD2AP	: CD2 İle İlişkili Protein

ÖNSÖZ

“Pirolokinolin Kinon’un (PQQ) SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde Anti-Alzheimer Etkilerinin Araştırılması” isimli çalışma Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği ABD’da yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (PAUBAP) Tez projesi olarak sunduğumuz bu çalışma PAUBAP tarafından 2020 FEBE 021 kodu ile desteklenmiştir. Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine destekleri için teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Yüksek lisans döneminin en başından en sonuna kadar yanımda olup tezimin şekillenmesinde büyük katkıları olan, bana her daim güç veren, akademik duruşu ve etiği ile örnek aldığım danışman hocam Doç. Dr. Aslı SEMİZ’e ve araştırma laboratuvarının imkânlarını bana sunan hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN’e, zorlu laboratuvar çalışmalarım esnasında benden manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve her daim yardımcı olan doktora öğrencisi Hajarat Abilo ALFA’ya ve hocamız Dr. Özden ÖZGÜN’e şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisansa başlamama vesile olup hep destek olan annem Hatice BAĞCI’ya, her daim beni destekleyen ve daima özverili davranan eşim Rıdvan Cüneyt TAN’a, zor anlarımda yanımda olup bana moral veren ablam Ayşe Burcu BAĞCI’ya, desteğini esirgemeyen babam İbrahim Zeki BAĞCI’ya sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), nöronlar ve sinapsların yıkıma uğramasından kaynaklı beyin hücrelerinin görevlerini yerine getirememesine neden olan bir hastalıktır. Bugün 50 milyondan fazla insan, AH ile yaşamaktadır ve dünya çapında sosyal ve sağlık bakımları için yılda yaklaşık 800 milyar dolar harcanmaktadır (Prince ve diğ. 2015). AH demansın en sık görülen sebebidir, şu anki tedaviler sadece minimal etki edebilmekte ve beyin dejenerasyonunu önleyememektedir. AH patolojik olarak tanımlanabilmektedir fakat AH'nın etiyojisi henüz kesin olarak bilinmemektedir. Bilimsel araştırmalar sonucunda beta amiloid, tau, nöroinflamasyonun değişmesi ve ortaya çıkmasının, AH'dan etkilenen nöronların AH'na karşı aldıkları önlemleri olabileceğini göstermektedir.

AH nörodejeneratif bir hastalıktır, kanserler ise aşırı proliferatiftir. Kanser ile AH arasındaki ilişkiyi hüresel yollar ve moleküler mekanizmalar açısından anlamak, AH'nın arkasındaki patogenezi ve faktörleri daha iyi anlamaya yardımcı olmaktadır.

Piridin ile kompleks iki karbon atomunun bir benzen halkasını içermekte olan Pirolokinolin Kinon (PQQ), çift halkalı C_9H_7N moleküler formüle sahip aromatik heterosiklik bir organik bileşiktir. PQQ; kinolin, metoksatin, benzopiridin ve benzazin olarak da adlandırılmaktadır. Antioksidan özelliklere sahip, anyonik, higroskopik, sarımsı yağlı bir sıvı olarak su, eter ve benzeri organik çözücülerde çözünmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kapsamında doğal kaynaklardan elde edilen PQQ, nispeten basit yapılar olmasına rağmen önemli biyolojik aktiviteler göstermiş olup bilimsel topluluğun büyük ilgisini çekmiştir. Kinolin ve analogları tirozin kinazların, proteazom, tübülün polimerizasyonu, topoizomeraz ve DNA onarımının inhibisyonundaki fonksiyon modları açısından incelenip, grubun biyoaktif bir molekölün uygun bir pozisyonunda ikame edilmesinin, derin bir farmakolojik etki sağladığı bulunmuştur (Gasparotto ve diğ. 2006).

1.1 Amaç

Doğal ve esansiyel bakteriyel bir kofaktör olan PQQ baklagillerde, meyvelerde ve yapraklı sebzelerde yaygındır ayrıca insan ve fare anne sütünde yüksek konsantrasyonlarda bulunan çok güçlü bir redoks antioksidanıdır. Bu çalışmada, PQQ'nun anti-Alzheimer etkilerinin SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı üzerinde araştırılması hedeflenmektedir. Yapılmak istenen bu çalışma ile çok güçlü anyonik bileşik olan PQQ'nun anti-Alzheimer etkileri literatüre yeni bilgi olarak kazandırılacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Kanser

Başlangıç evreleri, gelişimi süreci, ilerlemesi, yayılması ve en son hastada bıraktığı sonuçlar açısından kanser, hastalar arasında farklılık gösteren komplike bir hastalık olmakla birlikte bu durum moleküler ve hücresel düzeyde de görülebilmektedir. Kanser hücreleri yayılmak için otonom olarak kontrolsüz ve aşırı çoğalmalarıyla farklı doku ve organlara metastazlar oluşturarak istila edip çok basamaklı ve kompleks bir hastalık olarak davranışsal ve metabolik değişkenler yaratmaktadır (Şekil 2.1). Kimyasal, çevresel ve genetik koşullar kanserin oluşumuna yol açabilir.



Şekil 2.1: Kanser diyebilme için gereken oluşumlar

Hücre çeşitliliğine veya tedaviye verdiği cevap yönünden birçok farklı kanser türü bulunmaktadır. Kansere bağlı ölümler arasında özellikle çocuklarda başta gelen nedenlerden biri olan beyin tümörlerinin çoğu ya ölümcül sonuçlar vermektedir ya da beyin fonksiyonlarında hasara neden olmaktadır (Jemal ve diğ. 2005). Bu beyin tümörü çeşitlerinden birisi de nöroblastomdur.

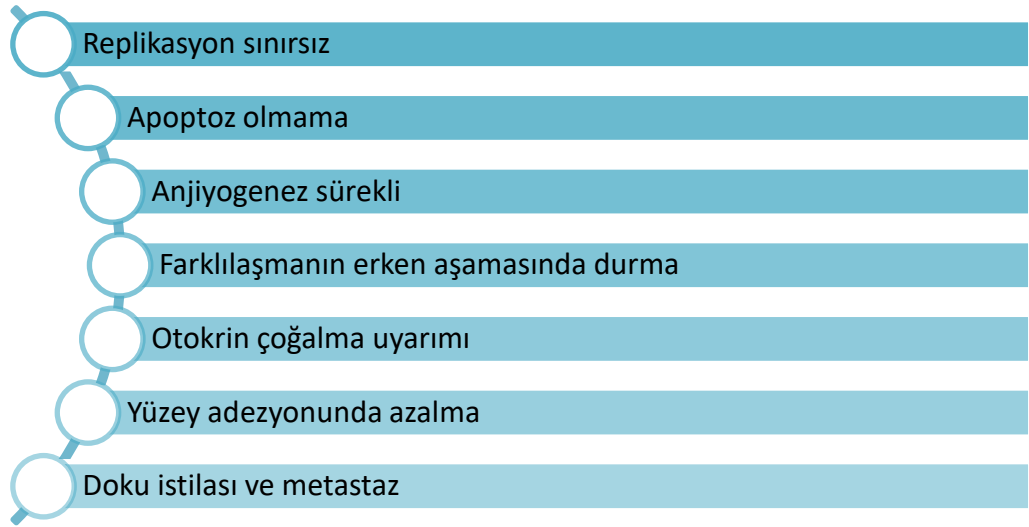
2.1.1 Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Günümüzde teknolojinin de yaygınlaşmasıyla DNA yapısını bozan birçok etkene daha çok maruz kalınmaktadır. Maruz kaldığımız kimyasalların her birinin kendine özgü tehlikeleri vardır. Toksikolojinin temel ilkesi, toksik etkilerin meydana getirdiği doza veya maruziyete bakmaktır ve bu günümüz risk değerlendirmesinin temelini oluşturmaktadır (WHO IPCS 2010; NRC 2009). 1272/2008 sayılı Avrupa Kimyasallar Ajansı Yönetmeliği kapsamında en yüksek düzeyde kabul edilen

tehlikeler için (örneğin karsinojenlik, mutajenite, üreme toksisitesi ve solunum hassaslaştırıcıları) ve diğer bazı maddeler için, kimyasalların tabi olduğundan emin olmak adına uyumlaştırılmış sınıflandırma ve etiketleme (CLH) yapılmaktadır (ECHA 2013). Çünkü tütün, aflotoksin (küf mantarı maddesi) gibi kimyasallar, mor ötesi ışınların yaptığı radyasyonlar ve virüsler, mutasyonları uyararak DNA hasarlarına neden olmaktadır. Karsinojen denilen bu maddeler kansere yol açmakta olup çok aşamalı kanser sürecinin ortaya çıkmasını tetiklemektedir. Bazen de bu karsinojenler, tümör teşvik edici madde gibi davranarak hücre çoğalmasını uyarıp kanser oluşumuna sebep olur.

Pek çok kanser türü, yıllar boyu vücutta biriken mutasyonlar sonucu görüldüğü için ileri yaşlarda daha çok rastlanmaktadır. Kanser hücrenin gelişimi, bir tek hücrenin değişimi ile başlayıp yeni bir klonal seçilim oluşturmak için hızla çoğalarak metastaz, invazyon yaparak ölüme yol açana kadar ilerlemektir. Gelişimi süresince tümör, klonal seçilimi ile daha hızlı çoğalır ve malign özellik kazanmaktadırlar.

Tümör türleri selim ve malign olmak üzere dokuya zarar vermeyen, yayılmayan ve çevredeki dokulara zarar verip lenfatik sistem ile diğer bölgelere yayılan olarak iki tip altında birçok farklı kanser türü bulunmaktadır. Kanser hücresi metabolizmasının genel özellikleri iyi şekilde araştırılıp belirlenmiştir (Şekil 2.2) fakat başladığı organa ve onkojenler ile onkompresörlerdeki bazı tekrarlayan mutasyonlara bağlı olarak kanser hücresi metabolizması önemli ölçüde değişebilmektedir (Flerin ve diğ. 2020).



Şekil 2.2: Kansere neden olan hücresel değişimler

Birçok özelliği olan kanserde, metastatik yayılmayla tümör büyümesine sebep olan bu yetenekler tamamlayıcı ve ayırt edici etkide en yaygın olanlardır (Hanahan and Weinberg 2000).

2.1.2 Apoptoz ve Apoptoz Genleri

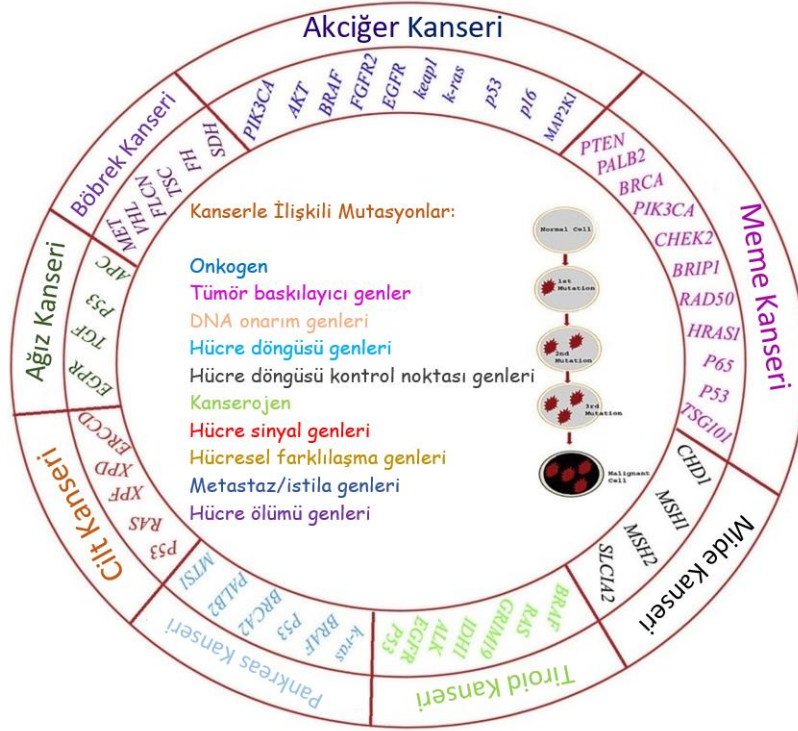
Programlanmış hücre ölümüne apoptoz denir. Apoptozis; fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı ve hücre kaybı olarak da düşünülebilmektedir. Hücre içi yapı bozularak DNA parçalanır ve apoptik cisimcikler olarak küçük küresel yapılara bölünür. Hücre dıştan intaktır. Küçük cisimcikler de makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir.

KontROLSÜZ hücre döngüsüne ek olarak, apoptozdan kaçınma durumu da kanserin ayırt edici özelliklerindedir (Luo ve diğ. 2009; Hanahan ve Weinberg 2000). Küçük moleküllü CDK inhibitörlerinin çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği bilinmektedir (Grant ve Roberts 2003; Senderowicz 2004). Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptozis; AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C infeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi ciddi hastalıklardır. Olması gerekirken gerçekleşmeyen apoptozun ise en önemli hastalık sebebi kanserdir. Örneğin, akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde flavonoid maddesiyle yapılan bir araştırmada A549 hücreleri üzerindeki antikanser etkisinin,

G2/M noktası ve apoptoz yoluyla çok sayıda hücrel yolu takip ettiği gösterilmiştir (Park ve diğ. 2012). Ayrıca kaspazların ekspresyonunun ve Bax/Bcl-xL oranının düzenlenmesi yoluyla apoptozu indükleyerek kaspaz-3'ün A549 hücreleri üzerindeki aktivitesi artırıldığı gözlemlenmiştir (Park ve diğ. 2012). Hücre döngüsü inhibisyonunun nedensel olarak apoptozu dahil olup olmadığı net olmasada, bu gözlemler, hücre döngüsünü ve apoptoz yollarını birlikte hedeflemenin antikanser terapötikleri geliştirmek için etkili bir strateji olabileceğini düşünölmektedir (Kim ve diğ. 2011). Siklinler ve CDK gibi hücre döngüsü düzenleyicilerinin ve Bcl-2 aile proteinleri gibi apoptoz düzenleyicilerinin deregölasyonu kanserde sıklıkla gözlenir ve terapötik olarak direncin gelişmesine katkıda bulunabilmektedir (Agus 1999; Catz ve Johnson 2003). CDK inhibitörleri, antikanser tedavileri için terapötik eşiği düşürme etkisindedir, bu da hücre döngüsü ve apoptoz yollarının kemosenitiviteyi arttırdığını göstermektedir (Grant ve Roberts 2003; Shah ve Schwartz 2000).

2.2 Kanser Çeşitleri

Kanser gelişimi, kontrolsüz hücre büyümesine yol açan çok sayıda düzensiz süreci içermektedir (Vogelstein ve diğ. 2013). Kanser Genom Atlası (TCGA) gibi yakın zamandaki yüksek verimli projeler, birçok yeni tümör baskılayıcı genlerin keşfedilmesine yol açmıştır (Davoli ve diğ. 2013)(şekil 2.3).



Şekil 2.3: Bazı kanser türleri ve mutasyon çeşitleri (Paul ve diğ. 2019).

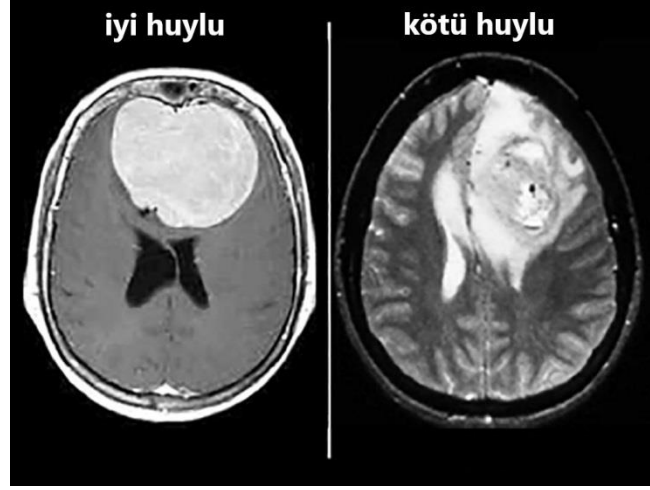
Kanser konumuna, başlangıç hücrelerine ve onkogenezi teşvik eden ve terapötik yanıtı etkileyen genomik değişikliklerin spektrumuna bağlı olarak sayısız farklı form alabilmektedir. Doğrudan fenotipik etkiye sahip birçok genomik olay tanımlanmış olmasına rağmen, karmaşık moleküler manzaranın çoğu, birçok kanser soyu için tam olarak anlaşılammıştır (Weinstein ve diğ. 2013).

Kanser araştırmaları, türlerin evrimsel dinamikleri, ekolojik ve demografik sistemlerle ilgili çalışmalardan elde edilen sonuçlardan büyük ölçüde faydalanabilir (Korolev ve diğ. 2014). Kanser, mutasyona uğramış, dolayısıyla, en kötü durumda, yerleşik sağlıklı (işlevsel) hücreler pahasına genişleyen, işlevsiz ve hatta işlevsel olmayan hücreler kümesidir. Bununla birlikte, bazı durumlarda kötü huylu hücrelerin, çok çeşitli rekabetçi yerleşik (sağlıklı) hücreler sistemi yoluyla bastırılabilmesine ve böylelikle tümör büyümesinin önlenebileceğine dair deneysel kanıtlar vardır (Newrzela ve diğ. 2012, Gerdes ve diğ. 2013, Diebner ve diğ. 2016). Karaciğer kanseri, en yaygın altıncı kanser çeşidi olarak 2018'de 800.000'den fazla yeni vaka ortaya çıkan ve 782.000 ölümle kansere bağlı ölümlerin dördüncüsü olmuştur (Bray ve diğ. 2018). Kadın popülasyonunda en yaygın kanser olan meme kanserinin görülme sıklığı yıllar içinde artmasına rağmen ölüm oranı 1989'dan

2016'ya kadar %40 düşmüştür (American Cancer Society 2019). Cilt Kanseri Vakfı'na göre, dünya çapında cilt kanseri oranı artmaya devam etmektedir (Foundation 2017). 2030 yılında pankreas kanserinin kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedeni olacağı tahmin edilmektedir (Rahib ve diğ. 2014). Pankreas kanserinde başvuru anında, hastaların sadece yaklaşık %15'i ameliyat için uygundur ve hastaların yaklaşık %35'ine lokal olarak ilerlemiş pankreas kanseri (LAPC) teşhisi konmuştur (Vincent ve diğ. 2011; Philip 2011; Reames ve diğ. 2019). Beyinde oluşan kanser, bazı hasarlar sonucu hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve kötü huylu seyretmesiyle dünyadaki en yıkıcı hastalıklardan biri olan beyin tümörüne neden olmaktadır. Birçok risk ve mekanizma yönünden değişiklik göstermektedir. Tümör mikro ortamı (TME), endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere kanser hücrelerine ek olarak birçok farklı kanserli olmayan hücre tipini de etkilemektedir (Quail ve Joyce 2013).

2.3 Beyin Tümörleri

Beyin tümörlerinin %90'ı merkezi sinir sistemindeki (CNS) tümörlerdendir (Johnson ve diğ. 2017). Beyindeki en büyük primer tümör gliomadır (%60,9), dörtte üçü ise glioblastoma ve astrositomdur (Neuro-Oncology Study Group 2019). 2012-2016 döneminde glioblastoma, Amerika Birleşik Devletleri popülasyonunda en kötü huylu tümör (tüm tümörlerin %14,6'sı ve kötü huylu tümörlerin %48,3'ü) ve en iyi huylu tümör (tüm tümörlerin %37,6'sı ve benign tümörlerin %53,3'ü) idi (Ostrom 2019). Yılda 20.000'den fazla hastaya yüksek dereceli glioma (kötü huylu beyin tümörü) teşhisi konulmaktadır ve her yıl tahminen 100.000 ila 200.000 yeni beyin metastazı vakası görülmektedir (Jemal 2008) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Beyindeki iyi ve kötü huylu tümör MRI görünümü (Saranya ve diğ. 2020).

Nöroblastoma (NB), çocuklarda en sık görülen ekstrakraniyal solid malignitedir. NB ayrıca 1 yaşından önce teşhis edilen en yaygın çocukluk çağı tümörüdür (Maris ve diğ. 2007). Bu malignitenin etiyojisi hala belirsizdir. Çevresel etkiler veya ebeveynlerden gelen kalıtsal hastalıklar kesin olarak tanımlanamamıştır (Ries ve diğ. 1999).

2.3.1 Nöroblastom

Nöroblastom, çocuklarda ilkel sempatik ganglion hücrelerinden kaynaklanan en yaygın ekstrakraniyal tümördür ve yüksek derecede maligniteye sahiptir (Gains ve diğ. 2018; Stenman ve diğ. 2017). Nöroblastoma sıklıkla 0-4 yaş arası çocuklarda görülür ve 15-19 yaş arası çocuklarda çok nadir görülür (Steliarova-Foucher ve diğ. 2017). Tanı anındaki hastalık evresine bakılmaksızın ergenlik ve yetişkinlikte sağkalım zayıftır (Suzuki ve diğ. 2018). Özelliklerinden biri, kanser metabolizması, proliferasyonu ve ilerlemesi için gerekli reaktif türlerin birikmesi nedeniyle oksidatif stresin üretilmesidir (Rita ve Strappazzon 2020).

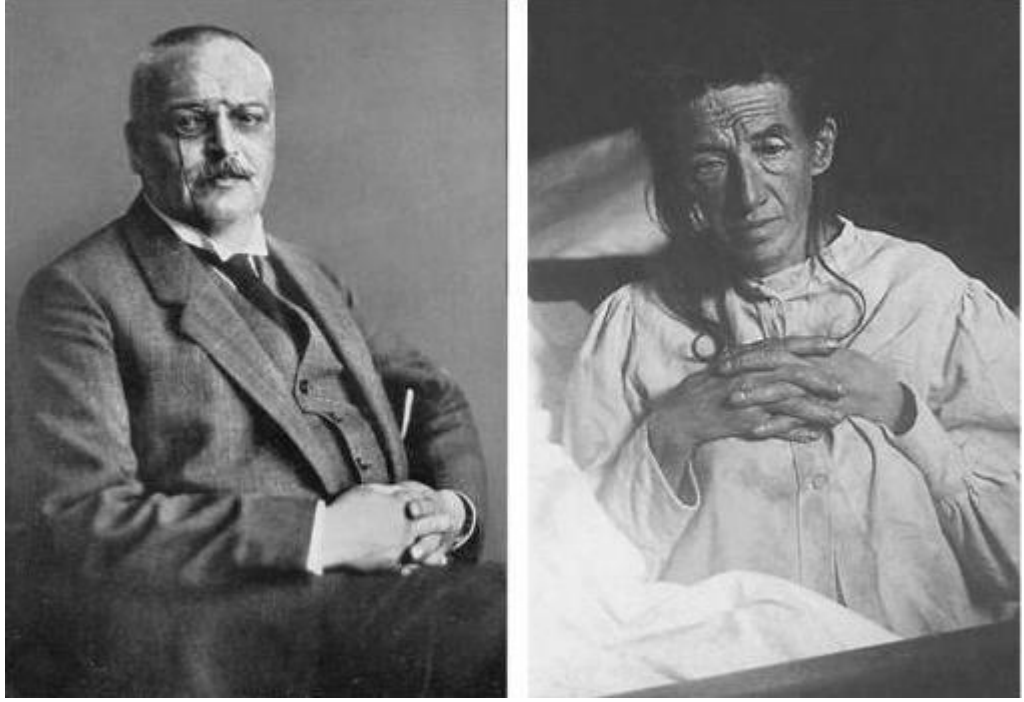
Nöroblastoma hücreleri yüksek bir proliferasyon oranı ile karakterize edildiğinden, genellikle Parkinson hastalığı veya Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif patolojileri incelemek için nöronları taklit ederek *in vitro* elektif bir model olarak kullanılmaktadır (Rita ve Strappazzon 2020). Nöroblastomunun tek bir

nedene bağlı olduğu veya beynin tek bir bölgesine lokalize olan patolojiyi yansıttığı kesin değildir.

2.3.2 Alzheimer Hastalığı Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

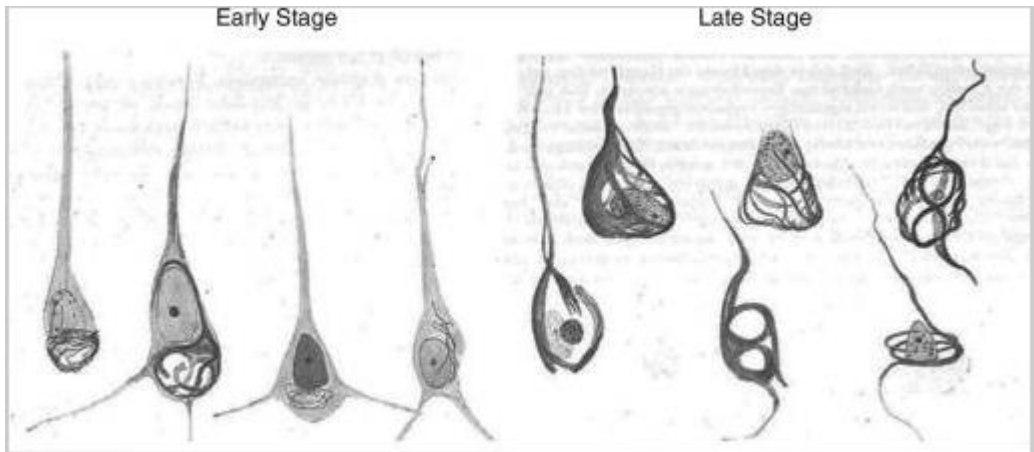
Demansın önde gelen nedeni olan AH, semptomların başlangıcı ve ilerlemesinin bireyler arasında önemli ölçüde değiştığı ilerleyici, çok faktörlü bir hastalıktır (Paolo ve Kim 2011; Vogel ve diğ. 2018). AH'de lipid metabolizması, immün fonksiyon, amiloid prekürsör protein metabolizması, oksidatif stres, nörotransmitter fonksiyonu ve mitokondriyal fonksiyonlar gibi çeşitli fizyolojik süreçler değişmiştir ve bu değişiklikler metabolizmayı etkileyebilmektedir (Kaddurah-Daouk ve diğ. 2013; IGAP 2015; Dehkordi ve diğ. 2019).

Aloysius Alzheimer ilk olarak nöropsikolojik semptomları ve talihsiz 51 yaşındaki Auguste Deter'in (Şekil 2.5) beyninin mikroskopik incelemesinden elde edilen bulguları tanımladığından, bu Alzheimer hastalığının hastalık mekanizması ve potansiyel tedavileri hakkında birçok araştırma yayınlanmıştır (Alzheimer 1907). Alzheimer'ın tanımladığı semptomlar, neredeyse hastalığın ilk nöropsikolojik karakterizasyonunu anlatmaktadır. Hafıza kaybı, davranış bozukluğu, kısa aralıklı bellek yitimi ve progressif (ilerici) bir hastalık anlamlarında tanımlamalar yapmıştır.



Şekil 2.5: Alois Alzheimer (1864-1915) (solda) ve hastası Auguste Deter'in (1849-1906) (sağda) fotoğrafları.

Alois Alzheimer, alzheimer hastası olan Auguste Deter öldüğünde o zamanlar yeni olan gümüş boyama histolojik tekniğini kullanarak beynini mikroskopik olarak incelemiş ve şimdi adını taşıyan hastalığın ayırt edici özellikleri olacak olan nöritik plakları, nörofibriler yumakları ve amiloid anjiyopatiji gözlemlemiştir (Alzheimer 1911) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Alzheimer tarafından Auguste Deter'in, "Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters" isimli 1911 tarihli makalesinden erken ve geç evre nörofibriler yumak patolojisinin eskizleri.

Alzheimer hastalarında kısa sözel hafıza kaybı, ruh hali değişimleri, süreli hafıza kaybı, motivasyon kaybı, performansta genel düşüş, muhakeme, karar verme

ve plan yapma sorunları, günlük aktiviteleri gerçekleştirmede eksiklik ve bilişsel yeteneklerin ve kazanılan becerilerin azalması durumları olmaktadır (Geldmacher ve Whitehouse 1997; Nussbaum ve Ellis 2003; Mistridis ve diğ. 2015; Mahmoudvand ve diğ. 2016; Li ve diğ. 2018). Ayrıca, bu hastalar sıklıkla depresyon, anksiyete ve psikoz dahil olmak üzere demansın davranışsal ve psikolojik semptomlarını göstermektedir (Cerejeira ve diğ. 2012; Rosenberg ve diğ. 2015). AH gelişimi ile ilişkili risk faktörleri arasında yaş, A β ve tau proteinlerinin birikimi, presenilin-1 ve Apolipoprotein E (ApoE) genleri gibi genetik çeşitlilik, aile öyküsü, kardiyovasküler risk faktörleri ve bulaşıcı hastalıklar (örn., mantar, bakteri ve parazit) yer almaktadır (Querfurth ve LaFerla 2010; Bekris ve diğ. 2010; Bruijn ve Ikram 2014; Souza ve diğ. 2018). Oksijenin beyne taşınması ve kan dolaşımındaki azalması AH etiolojisinde bir mekanizma olarak görev yapabilmektedir (Chang ve diğ. 2007).

Türkiye'de yaklaşık 600 bin Alzheimer hastası, yaklaşık 1 milyon demans hastası bulunmaktadır (Kulaksızoğlu 2017). 2021 yılı için Science Direct Alzheimer hastalığı (AH) için 252.770'den fazla içerik göstermektedir. İçeriklerden birçoğu anormal fosforile ve toplanmış tau proteininden oluşan hücre içi nörofibriler düğümlerin (NFT'ler) AH'de nöron kaybını ve uzamsal hafıza kaybını nasıl indüklediğini açıklamaktadırlar.

2.3.3 Alzheimer Hastalığı Klinik Bulgular ve Evreleri

Klinik evreler, AH'nın yıllar süren sürekliliğinden dolayı, hafif bilişsel bozulmadan demansa kadar değişkenlikler göstermektedir. İki tip AH tanımlaması yapılabilir; biri genetik mutasyonlarla ilişkili erken başlangıçlı ailesel tip, diğeri çok yaygın geç başlangıçlı form, kofaktörleri içerebilen çok faktörlü bir süreç olmaktadır (Shima ve diğ. 2010). AH, korteks ve hipokampusta geri dönüşümsüz nöron kaybı (Nussbaum ve Ellis 2003), granülovakuolar dejenerasyon (Simchowicz 1911), A β 1-42 peptidinin birikmesinin neden olduğu amiloid-beta (A β) plakları, nörofibriler yumaklar (NFT'ler) mikrotübül ilişkili bir protein (White ve diğ. 2014; Li ve diğ. 2018) ve nöropil iplikleri (yani kıvrıkcık lifler) (Gallyas 1971) tarafından oluşturulmuştur. Ayrıca NFT ve A β , AH'na özgü değildir ve merkezi sinir sisteminin (CNS) diğerk koşullarında üretilmektedir (Mawanda ve Wallace 2013). AH'nın

patogenezi tam olarak kesinleşmemiş olmakla birlikte ağırlıklı olarak, hastalığın başlatılmasında veya yayılmasında kilit rol oynadığı düşünülen amiloid beta ve fosforile tau protein agregatlarının birikimlerine dayanmaktadır (Donovan ve diğ. 2020). Bunların yanında nörotransmitter kaybı, sinaptik proteinlerdeki değişiklikler, serebrovasküler hastalık ve inflamasyon benzeri diğer süreçlerden de bahsedilmektedir (Donovan ve diğ. 2020).

2.3.3.1 Preklinik Evre

In vivo biyobelirteçlerin geliştirilmesi ile AH'nın tanısını demans evresinden prodromal evreye taşıdı yani semptom başlangıcından önce teşhis edilebilme imkânı sağlanarak preklinik tanı potansiyelini ortaya çıkarmıştır ve bu gelişmeler, AH'nın ikincil evresinin önlenmesi için potansiyel tedavilerin test edilmesine olanak sağlamaktadır (Dubois ve diğ. 2021). Genel AH süresi 24 yıl (60 yaş) ile 15 yıl (80 yaş) arasında değişmektedir. Yapılan bir çalışmada; 70 yaşında preklinik AH ile başvuran bireyler için, tahmini preklinik AH süresi 10 yıl, prodromal AH 4 yıl ve demans 6 yıl olarak bulunmuştur (Vermunt ve diğ. 2019). Erkek cinsiyet, klinik ortam, APOE ε4 allel taşıyıcılığı ve anormal beyin omurilik sıvısı tau daha kısa süre ile ilişkilendirildi ve bu etkiler hastalık evresine bağlı olmaktadır (Vermunt ve diğ. 2019). NIA-AA kriterleri 2011 yılında, amiloid kaskadı hipotezini kullanarak üç farklı preklinik aşama tanımlamıştır bunların birincisi amiloid lezyonları, ikincisi nörodejenerasyona neden olan tau patolojisi ve üçüncüsü ise belli belirsiz bilişsel değişikliklerin ortaya çıkması olarak tanımlanmıştır (Hardy and Higgins 1992; Sperling ve diğ. 2011).

2.3.3.2 Hafif Evre

Prodromal olarak da adlandırılan bu dönem, ilk başlarda AH'nın teşhisi birkaç alanı etkileyen önemli ilerleyici bilişsel bozulma veya günlük yaşam üzerinde belirgin işlevsel etkilere neden olacak kadar şiddetli nörodavranışsal semptomlarla karakterize klinik bir sendrom olan demansa doğru yol almaktadır (Scheltens ve diğ.

2021). Yavaş şekilde ilerleyerek kısa süreli hafıza kaybına neden olarak hasta bir önceki gün ne yiyip ne yaptığını hatırlamayabilir.

2.3.3.3 İleri Evre

İleri evrede hastanın günlük işlerinde aksama, yakınlarını tanımada güçlük, konuşma, yürümede zorluk ve psikolojik olarak bozulmalar olabilmektedir. Hastalığı ileri seviyeye taşımada ayrıca sebep olabilecek başka yan nedenlerde olabilir; metabolik bozukluklar, psikiyatrik bozukluklar veya uyku apnesi gibi gözlenen değişikliklerden nörodejenerasyon veya AH'dan başka birçok neden sorumlu olabilmektedir (Chipi ve diğ. 2019).

2.3.3.4 Ağır Evre

Son aşama olarak demans dönemi yani yatağa bağımlı ağır yaşam evresi meydana gelmektedir. Yaşa ve risk faktörlerine göre ayarlanmış bireyselleştirilmiş tahminlerin ortaya çıkması ve kardiyovasküler risk faktörlerinde olduğu gibi riski sıralama gibi modelleme yapılması daha erken zamanlı tanı aşaması sağlayacaktır (Perk ve diğ. 2012). Demansı olan bir kişi artık tamamen bağımsız değildir ve bu bağımsızlık kaybı, demansı hafif bilişsel bozukluktan ayıran temel özelliktir (Jack ve diğ. 2018).

2.3.4 Alzheimer Hastalığı'nda Erken Başlangıçlı Genetiğin Rolü

Bilişsel (düşüncesel) bozukluk, normal yaşlanmaya bağlı bilişsel değişiklikler ile AH'nın sebep olduğu daha ciddi problemler arasında bir geçiş basamağıdır ve henüz zihinsel fonksiyonlardaki bozulmalar günlük yaşamı etkileyecek kadar ciddi boyutta olmamaktadır (Mayo Clinic Staff 2012). AH'nin gelişiminde sinaps kaybının erken bir olay olduğu düşünülmektedir (DeKosky ve Scheff 1990; Masliah ve diğ. 2001; Scheff ve diğ. 2007) ve hastalığın erken aşamalarında, işlev bozukluğu ve sinaps kaybı bulunmakta olup bilişsel semptomlarla bağlantılı olarak nöronal kayıp ve nörodejenerasyondan önce meydana geldiği düşünülmektedir (DeKosky ve Scheff

1990; Henstridge ve diğ. 2016). Bu yüzden erken AH teşhisinde sinaptik proteinler, hastalık ilerlemesini ve hastalığı modifiye edici terapötiklerin etkilerini izlemek için biyobelirteç olma potansiyeline sahiptir (Höglund ve diğ. 2020).

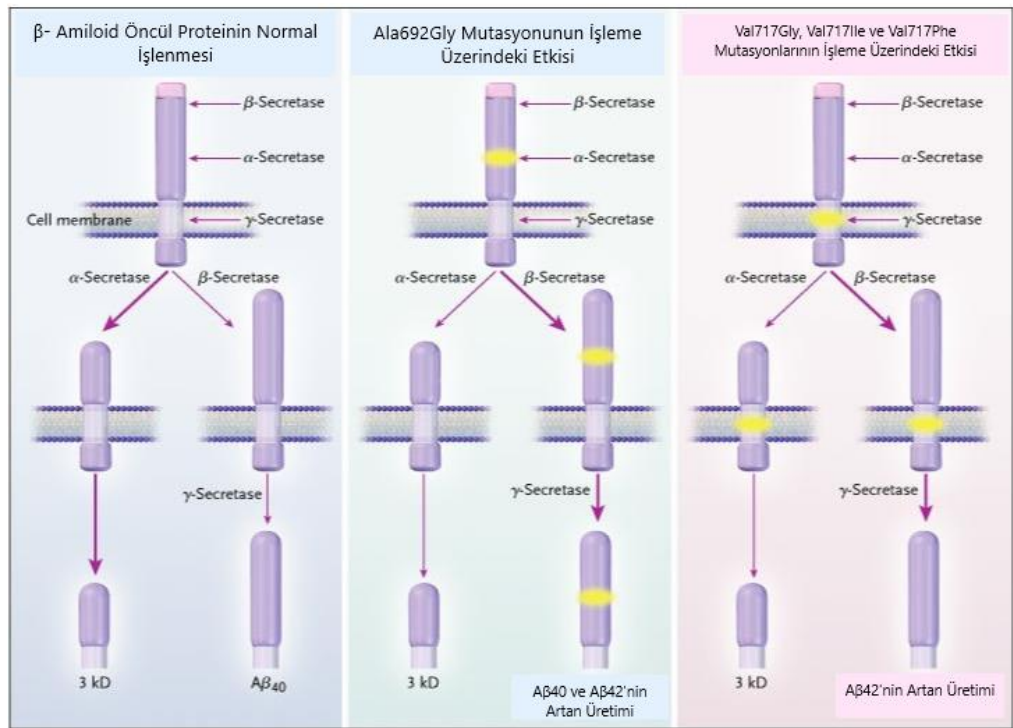
AH için yeni tedavilerin araştırılması devam etmektedir ve hastalığın gidişatını değiştirebilecek tedavinin uygulanmasına erken teşhis de eşlik etmelidir; klinik semptomların henüz ortaya çıkmadığı klinik öncesi aşamadır (Bringas ve diğ. 2020). Bu anlamda yapılan bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, ivmeölçerin klinik faydası tanısal amaçlar için değerlendirilmiş olup bunun sonucunda sağlıklı insan verilerini demanslı hastalardan (Gietzelt ve diğ. 2013) ve demanstan önce gelen ancak buna dönüşmeyen bir durum olan hafif kognitif bozuklukları (MCI) yaşayan hastalardan ayırt etmeyi de mümkün kılmıştır (Hausdorff ve diğ. 2018). Ayrıca Klunk ve meslektaşları beyinde amiloid birikimini ortaya çıkarmak için PET görüntüleme ile kullanım için A β 'ya bağlanan bir ajan geliştirmiştir (Mathis ve diğ. 2003). PET görüntüleme ile kullanılabilen tau bağlayıcı ajanlar da yakın zamanda geliştirilmiştir (Brosch ve diğ. 2017).

Otozomal dominant AH, bellek testi performansında düşüş, atipik semptomlar ve diğer nörolojik özellikler dahil olmak üzere değişken bir klinik fenotipe sahip olmaktadır (Ryan ve diğ. 2016). Erken başlangıçlı otozomal dominant Alzheimer hastalığında (AH), presenilin 1 (PSEN1), presenilin 2 (PSEN2) ve amiloid öncü protein (APP) genlerindeki mutasyonlar, hastalığın seyrinin erken presemptomatik evrelerden itibaren araştırılmasına olanak sağlamaktadır (Almkvist ve diğ. 2019). Beyinde A β birikimi, APP, presenilin 1 (PSEN1) presenilin 2 (PSEN2) ve apolipoprotein E (APOE) genleri hastalığa neden olan kalıtsal varyantlarla ilişkilidir (Goate ve diğ. 1991; Saunders ve diğ. 1993; Sherrington ve diğ. 1995; Rogaev ve diğ. 1995; Bales ve diğ. 1997).

2.3.4.1 Amiloid Prekürsör Protein (APP) Geni

Sinaps gelişimi, nöromusküler kavşakta bakım, sinaptik iletim ve kalsiyum homeostazı için sinir sistemindeki APP çok önemlidir (Arnhold 2020). APP'nin artan ifadesinin hipoksik ve iskemik koşullar altında nöroprotektif olarak etkilendiği düşünülmektedir (Arnhold 2020). Bu protein, hücre yüzeyinde bulunan tek geçişli bir

transmembran proteinidir ve iki yoldan da bölünebilmektedir: a-sekretaz veya b-sekretaz (Şekil 2.7) (Nussbaum ve Ellis 2003). Asıl birikim, A β 'nın 40 veya 42 amino asit kalıntısından oluşan, öncü protein üzerindeki β - ve γ -sekretazın ardışık bölünmesinden kaynaklanmakta olup A β 42 formu daha fibrilojeniktir ve bu nedenle AH ile ilişkilidir (Arnhold 2020). Çözünür A β , beyin omurilik sıvısında bulunur ve çözünür Ap oligomerleri, zarlarla etkileşime girerek zarlarda, nöronlara düzensiz bir Ca⁺² akışına izin veren iyon kanalları oluşturabilmektedir (Arnhold 2020). APP en çok nöronlarda ve oligodendrositlerde RNA düzeyinde ifade edilmektedir (Marian ve diğ. 2020).



Şekil 2.7: a-, b- ve c- sekretazlar tarafından APP bölünme yolları, toksik A β 42 peptidinin oluşturulduğu adımlar görülmektedir (Panel A). Panel B ve C, APP geninde artan A β 42 üretimine yol açan çeşitli yanlış anlamlı mutasyonların etkisini göstermektedir (Nussbau ve Ellis 2003).

APP taşıyıcılarındaki bilişsel düşüş, klinik başlangıcından 14 yıl önce başlayıp kademeli olarak ilerlemektedir (Almkvist ve diğ. 2019). Farklı mutasyonlara sahip taşıyıcıların verilerine göre bilişsel düşüşün başlangıcının ve hızının değiştiğine dair bulgular, fizyolojik işlevde değişikliklere yol açan APP metabolizmasındaki varyasyonlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Hunter ve Brayne 2018; O'Brien ve Wong 2011; Shepherd ve diğ. 2009, Thordardottir ve diğ. 2017). Bu bulgular,

hastanın beyindeki nörofibriler yumakların dağılımını tanımlayan nöropatolojik verilere dayanmaktadır (Braak ve Braak 1991).

Transmembran amiloid öncü proteini (APP), APP β 'yi oluşturmak için β -sekretaz tarafından sırayla bölünüp ardından APP β 'nin γ -sekretaz yoluyla bölünmesiyle AP üretilmektedir (Peng ve diğ. 2020).

2.3.4.2 Presenilin 1 (PSEN1) Geni

PSEN1 taşıyıcılarındaki bilişsel düşüş, klinik başlangıca yakın bir zamanda başlayıp hızla ilerlemektedir (Almkvist ve diğ. 2019). PSEN1 ve homologu PSEN2, yapısal olarak benzer integral membran proteinleri olarak hidrofilik bir hücre içi halka bölgesi ve dokuz transmembran alanı içermektedirler (Hooli and Tanzi 2016). Her iki protein de endoplazmik retikulum ve golgi cisimciğine yerleşip AP fragmanlarını salmak için amiloidojenik yol ile APP'nin işlenmesinde anahtar bir role sahip olmaktadır (Strooper 2003; Hansson ve diğ. 2004).

2.3.4.3 Presenilin 2 (PSEN2) Geni

PSEN2 mutasyon taşıyıcılarının biraz daha geç bir başlangıç yaşı olduğu düşünülmektedir (Jayadev ve diğ. 2010; Ryman ve diğ. 2014). Ayrıca PSEN2 mutasyonlarının diğer mutasyonlara göre daha değişken penetrasyonu bulunmaktadır (Rogaeva ve diğ. 2006). PSEN2'nin aşırı ekspresyonunun *in vivo* veya *in vitro* AH modellerinde varolduğu kanıtlandığı gibi, PSEN2 A β üretiminden sorumlu olmaktadır (Jia ve diğ. 2007). Presenilin güçlendirici protein 2, γ -sekretaz kompleksinin ayrılmaz bir bileşeni olarak γ -sekretazın kataliz aktivitesi için önemli bir rol oynamaktadır (Ruishan ve diğ. 2006; Zhi-Yong ve diğ. 2017). PSEN2 ile ilgili olarak patojenik yeni muhtemel varyantlar araştırılmaya devam edilmektedir (Guerreiro ve diğ. 2010).

2.3.5 Alzheimer Hastalığı'nda Geç Başlangıçlı Genetiğin Rolü

AH patolojisinin, açık demansa yol açan hafif bilişsel bozulma aşaması yoluyla herhangi bir semptom olmaksızın mevcut olabileceği, 15-25 yıllık bir süreye yayılan AH'nın sürekliliğine işaret etmektedir ve bunamanın son aşama olduğunu göstermektedir (Scheltens ve diğ. 2021).

2.3.5.1 Apolipoprotein E (APOE) Geni

ApoE ve ApoJ, esas olarak astrositler tarafından sentezlenir, nöronlarda ve oligodendrositlerde lipid metabolizmasını düzenler ve katabolizma için beyin fagositik hücrelerine, mikrogliaya lipidleri iletir. Bu yol, toksik A β 'nin temizlenmesi için de önemlidir (Marian ve diğ. 2020). APOE'nin amiloid- β serbestliği yoluyla amiloid ile ilişkili olduğuna dair içerikler bulunmakta olup; APOE'in AH'nı durağanlaştıran ve iyileştiren etkilerinin araştırmalar için yaygın olmasına rağmen, bir keşif olarak kalmakta olup son derece kısıtlı klinik kullanıma sahiptir (Bansal ve Singh 2019). 65 yaş üstü bireylerde yaygın olarak apolipoprotein A (APOE) genindeki polimorfizm majör bir genetik risk belirleyicisi olmaktadır (Onyango ve Stokin 2021). Sporadik tip, bir canlıda gelişigüzel ortaya çıkan, kalıtsal olmayan genetik olarak değişime uğrayan hastalık şeklidir. Amiloid öncü protein, presenilin-1 ve presenilin-2 mutasyonları ailesel AH ile ilişkilendirilirken, apolipoprotein E (ApoE) geni sporadik tip ile ilişkilendirilmiştir (Gale ve diğ. 2018).

2.3.5.2 Sortilin Related Reseptör 1 (SORL1) Geni

SORL1'in olmaması durumunda, APP holoproteinini retromer geri dönüşüm yolundan uzaklaştırılır ve APP'yi β -sekretaz bölünme yoluna yönlendirerek APPs β üretimini arttırmaktadır (Rogaeva ve diğ. 2007). Rogaeva ve diğerlerinin yapmış olduğu bir araştırmada, SORL1 nöronal sınıflandırma reseptöründeki kalıtsal varyantların geç başlangıçlı AH ile ilişkili olduğunu kanıtlayarak SORL1 geninde (LR11 veya SORLA olarak da bilinen) en az iki farklı intronik dizi kümesinde meydana gelen varyantların, SORL1'in dokuya özgü ekspresyonunu düzenleyebildiği bulunmuştur. Ayrıca SORL1'in APP'yi geri dönüşüm yollarına yönlendirdiğini ve SORL1 yeterince ifade edilmediğinde APP'nin Ap üreten bölmelere ayrıldığını da

göstermektedirler. Bu veriler ile SORL1 ekspresyonundaki veya işlevindeki kalıtsal veya edinilmiş değişikliklerin, AH'na neden olmada mekanik olarak rol oynadığını göstermektedir (Rogaeva ve diğ. 2007).

2.3.5.3 ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7 (ABCA7) Geni

ABCA7, geç başlangıçlı AH (GBAH) hastalarının büyük kohortlarının (belli bir ortak özelliği olan kişiler) genom çalışmalarında AH için bir risk geni olarak tanımlanmıştır (Hollingworth ve diğ. 2011). ABCA7'nin fagositoza aracılık ettiği ve membran alışverişini etkilediği gösterilmiştir (Satoh ve diğ. 2015). Ayrıca farklı hücre hatlarında ABCA7'nin baskılanması ile β -sekretaz bölünmesi artarak yüksek A β miktarına sebep olduğu bulunmuştur (Satoh ve diğ. 2015). ABCA7 geninde AH riskinin artmasıyla ilişkili birden fazla bölge olduğunu düşünülmektedir çünkü farklı gen kümelerinde lokuslar (gen konumları) belirlenmiştir (Reitz ve diğ. 2013). ABCA7, büyük ölçüde lipit taşınması ve homeostazda yer alan ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı ailesinin bir üyesidir (Pohl ve diğ. 2005). ABCA7'nin kolesterol ve fosfolipidlerin apolipoprotein aracılı salınımını desteklediğine dair araştırmalar bulunmaktadır (Dohmae ve diğ. 2004). Ancak bunun tersi araştırmalarda vardır (Wang ve diğ.2003).

2.3.5.4 Clusterin (CLU) Geni

Apolipoprotein J olarak da adlandırılan Clusterin geni içindeki AH riski, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) yani organizmalar arasındaki tek DNA bazlarındaki varyasyonlar arasındaki bir bölgeden kaynaklanmaktadır ve karmaşık bir modele sahiptir (Alfimova ve diğ. 2019). Bu bulgular, klinik fenotipler için faydalı genetik belirteçler sağlamaktadırlar. Clusterin (apo J)'de vitronektine (hücre yapışmasını ve yayılmasını destekleyen glikoprotein) benzer bir şekilde terminal yolu inhibe eden çok işlevli bir plazma proteindir (Kew 2014). Clusterin'in apoptozun inhibisyonu, kemoterapi ve radyoterapiye direncin artması yoluyla tümör hücrelerinde sitoprotektif (hücre koruyucu etki) bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Figuroa ve diğ. 2019).

2.3.6 Alzheimer Hastalığı'nda Rol Alan Bazı Genler

2.3.6.1 Fosfatidilinositol Bağlayıcı Klatrin Birleşim Proteini (PICALM)

PICALM, AH ile güçlü ilişki gösterdiği bulunmuştur (Hooli ve Tanzi 2016). AH'de koruyucu bir etki göstermekte olup, maya ve *caenorhabditis elegans* üzerinde yürütülen çalışmalarda A β 'nin toksik etkilerini frenlemek için PICALM homologları gösterilmiştir (Treusch ve diğ. 2011).

2.3.6.2 Membran Kapsayan 4A (MS4A) Ailesi

MS4A ailesinin üyelerinin klinik öncesi modellerden elde edilen kanıtları ve insanlardan elde edilen genetik kanıtlar ile kanser, bulaşıcı hastalıklar ve nörodejenerasyon gibi farklı patolojik ortamlarda önemli rollere sahip olduğu bulunmuştur (Mattiola ve diğ. 2021). Bu nedenle, çeşitli koşullar için aday biyobelirteçler ve terapötik hedefler haline gelmişlerdir.

2.3.6.3 Tamamlayıcı Bileşen Reseptörü 1 (CR1)

Genom çapında yapılan çalışmalarda CR1'in varyantları ile Alzheimer hastalığının sporadik formu arasında bir ilişki belirlemiştir (Killick ve diğ. 2013). CR1'in ve tamamlayıcı sistemin AH'daki rolü kesin olarak bulunamamıştır. Yapılan araştırmalarda CR1 geninin LOAD riski ile anlamlı olarak ilişkili olduğu gösterilmektedir (Luo ve diğ. 2014).

2.3.6.4 Köprü Oluşturan Entegratör 1 (BIN1)

BIN1, amfifizin protein ailesinin bir üyesidir, membran eğriliği ve endositoz oluşumunda rol oynadığı bulunmuştur. Genom araştırmalarında, geç başlangıçlı AH için ikinci en önemli duyarlılık lokusu olarak BIN1 geni tanımlanmıştır (Andrew ve diğ. 2019).

2.3.6.5 Matriks Metalloproteinaz 9 (MMP9)

Bir diğeri adı jelatinaz B olan MMP9, araştırmalarda en çok kullanılan MMP ailesinden biridir. Zimografi ve immünohistokimya kullanılarak yapılan doku çalışmalarında kontrol dokusuna kıyasla MMP9 miktarında artış görülmüştür (Baxter ve MacTaggart 2009). MMP9 embriyonik gelişim, hücre göçü, kemik gelişimi, endokondral ossifikasyon, anjiyogenez, nötrofil fonksiyonu ve yara onarımı ile ilgili fizyolojik süreçlerde etkili rol oynamaktadır (Malemud 2017).

2.3.6.6 CD2 İle İlişkili Protein (CD2AP)

CD2AP, T hücre yapışma proteini CD2 ile etkileşime giren, lenfoid ve epitel hücrelerinde eksprese edilen bir adaptör proteindir. CD2AP'deki çeşitli varyantlar, bazı çalışmalarda AH riskini %10 arttırıp AH'lı beyinlerde nöritik plak yüküne sebep olduğu bulunmuştur (Hooli ve Tanzi 2016).

2.3.7 Alzheimer Hastalığı Oluşumu İle İlgili Hipotezler

ABD Ulusal Yaşlanma Enstitüsü (NIA) ve Alzheimer Derneği (AA) 2018 yılında AH'nın tanımı ve teşhisi için amiloid β , tau, nörodejenerasyon (ATN) araştırma çerçevesini önerdi (Jack ve diğ. 2018). Bu, klinik ve biyolojik bir tanıdan AH'nın hem asemptomatik hem de semptomatik evrelerde uygulanabilen tamamen biyolojik bir tanıma geçişine olanak tanımaktadır.

AH patolojik olarak kümelenmiş amiloid beta (Ab)'dan yapılmış amiloid plakların, hiperfosforillenmiş tau proteininin intranüronal birikintileri olan nörofibriler yumaklardan ve nöron ve sinaps kaybı nedeniyle beyin atrofisinden oluşan birikimiyle tanımlanır. AH alanındaki baskın hipotez olan amiloid kaskad hipotezi, Ab'daki değişikliklerin tau'daki patolojik değişiklikler de dahil olmak üzere bir olaylar dizisi başlattığını öne sürmektedir (Hardy ve Higgins 1992; Hyman 2011). Genetik çalışmalar, doğuştan gelen bağışıklık sistemindeki değişikliklerin hastalık riski sağlamada da önemli olduğunu göstermektedir (Strooper ve Karran 2016; Henstridge ve diğ. 2019). Ab, glial, doğuştan gelen bağışıklık değişiklikleri ve

tau'nun nörodejenerasyona neden olmak için nasıl etkileşime girdiği, alanda önemli bir bilgi boşluğu olmaya devam etmektedir.

2.3.7.1 Kolinerjik Hipotez

AH'yi açıklamak için önerilen ilk teori kolinerjik hipotezdi ve o zamandan beri hafif ila orta dereceli AH'yi tedavi etmek için şu anda onaylanmış tek ilaçların geliştirilme sebebidir (Bartus ve diğ. 1982; Bartus 2000). Bu teori, AH hastalarının beyinlerinde kolinerjik aktivite kaybının yaygın olarak gözlemlendiği bulgusuna dayandırılmıştır ve diğer deneysel çalışmalar da öğrenme ve hafızada bir rolü olduğunu öne sürmektedir (Davies ve Maloney 1976; Perry ve diğ. 1981). Kolinerjik hipotez, başlangıçta AH hastalarında hafıza bozukluğunu tersine çevirmede umut vaat eden başka bir kolinerjik tür olan asetilkolinesteraz inhibitörlerini (AChEI'ler) kullanan erken klinik çalışmalara yol açtı (Craig ve diğ. 2011). Kısacası kanıtlar, AH'nin daha yaygın sporadik (belli bir kesim) formunun (AH vakalarının %85'i) başlangıç nöropatolojisinin, yaşa bağlı kolinerjik tükenme veya işlev bozukluğunun temel bir durumu üzerine ortaya çıktığını ve AH'nin hayvan modellerinin bu bilimsel gerçeği içerdiğini göstermektedir (Craig ve diğ. 2011).

2.3.7.2 Aβ Kaskad Hipotezi

Amiloid-β (Aβ) yaşam boyu beyinde üretilir ve yaşlılarda serebral kortekste, AH'nda aşırı derecede birikir. Beyindeki arterler yaşlandıkça sertleşirler ve Aβ'nin perivasküler eliminasyonu başarısız olur ve bunun sonucunda Aβ beyin parankiminde ve kan damarı duvarlarında serebral amiloid anjiyopati olarak birikir. AH'nda Aβ'yi beyinden uzaklaştırmak için immünoterapi geliştirilmektedir (Weller ve diğ. 2017).

2.3.7.3 Tau Hipotezi

Erken tau hipotezi, tau oligomerlerinin nörotoksik olduğu gözlemleri, tau patolojisi ile klinik korelasyonlar ve anormal tau hiperfosforilasyonlarının beyin

nöronlarını etkileyen farklı değiştirilmiş moleküler sinyaller için ortak bir son yol oluşturduğu gerçeği ışığında güçlenmektedir (Maccioni ve diğ. 2010). Yapılan araştırmalar, nörodejenerasyondaki sinyal kaskadlarının aydınlatılmasıyla birlikte, tau hiperfosforilasyonunun AH patogenezinde bir ortak yol oluşturduğu ve üzerinde bir dizi sinyal mekanizmasının birleştiği ve bu fenomenin önce geldiği kavramına dayanan bir hipotez varsayımına yol açmıştır (Rojo ve diğ. 2008; Fernandez ve diğ. 2008; Maccioni ve diğ. 2009).

2.3.7.4 Kolesterol Hipotezi

AH, esas olarak β -amiloid birikiminin neden olduğu karmaşık ve çok faktörlü nörodejeneratif bir hastalıktır ve çok sayıda çalışma, yüksek kolesterol düzeylerinin de AH patolojisinde bir işlev görebileceğini ve bu hastalıkla kolesterol ile ilgili birkaç gen polimorfizminin ilişkili olduğunu göstermiştir (Xue-shan ve diğ. 2016). Hayvan ve hücrel çalışmaları yanı sıra artan epidemiyolojik kanıtlar, hiperkolesteroleminin AH ile yakından ilişkili olduğunu desteklemektedir. ApoE4 gibi hiperkolesterolemi ile ilişkili birkaç gen, AH insidansını artırmaktadır ve kolesterol metabolizmasındaki değişiklikler, tau proteininin aşırı fosforilasyonunda önemli bir işlevi yerine getirmektedir (Paolo ve Kim 2011; Xiao ve diğ. 2012).

Yüzyıllar boyunca, doğal ürünler doğrudan veya dolaylı olarak önemli bir ilaç kaynağı olarak kullanılmıştır. Doğal ürünlerle ilgili geleneksel bilgiler, nörolojik bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilgili ilaçların geliştirilmesinde fayda sağlamıştır (Veer ve diğ. 2020). Doğal olarak bulunan pirolokinolin kinon bileşiğinin de antioksidan etkileri olduğu bilinmekte olup nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için potansiyel gösterebileceği düşünülmektedir.

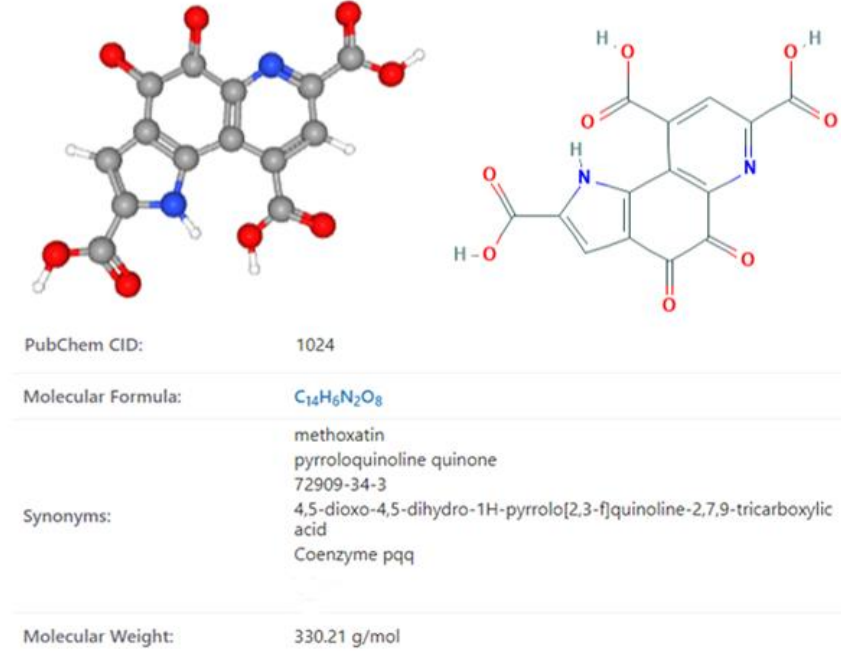
2.4 Pirolokinolin Kinon

PQQ, metoksatın olarak da bilinen bir redoks kofaktörüdür. Toprakta, besinlerde ve insan anne sütünde bulunmaktadır. Hücre kültürü deneylerinde ve insan hastalıklarının hayvan modellerinde temel bir besin maddesi, antioksidan ve redoks modülatörü olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Anyonik, suda çözünür bir

bileşik olan PQQ, başlangıçta kristalin bir aseton ilave maddesi olarak metilotropik bakteri kültürlerinden izole edilmiştir. PQQ bulunduran enzimlere kinoproteinler denilmektedir ve kinoproteinlerden biri olan glikoz dehidrojenaz, glikoz sensörü olarak kullanılmaktadır. Birçok bakteriyel birincil alkol dehidrojenazın bir kofaktörü olduğu öne sürülmüştür ve PQQ bakterilerdeki büyümeyi uyarmaktadır.

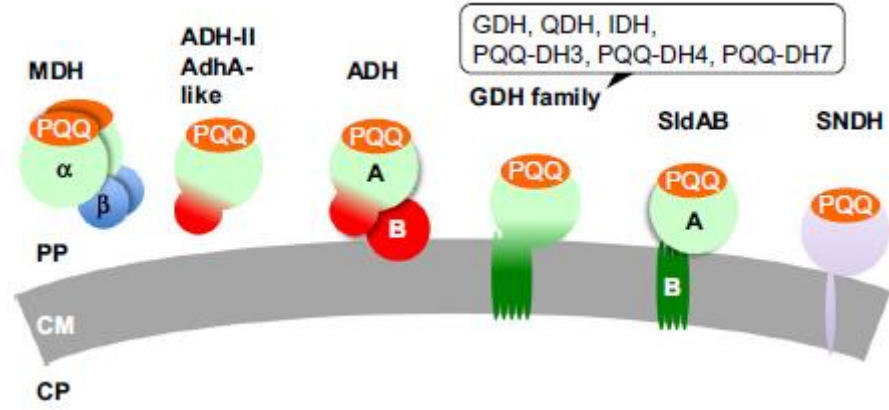
2.4.1 Pirolokinolin Kinon'un Özellikleri

PQQ, Hauge tarafından 1964 yılında keşfedilmiştir (Hauge 1964). Bu keşfin ardından Anthony (1998, 2003), Salisbury (1979) ve Duine vd. (2001) bunu metoksatin olarak bildirmiştir. Metoksatin, metanol oksitleyici bir bakteriden izole edilerek kristalleştirilmiştir (Forrest ve diğ. 1981). PQQ, 4- ve 5- pozisyonlarında okso gruplarına ve 2-, 7- ve 9-pozisyonlarında karboksi gruplarına sahip bir pirolokinolindir (Şekil 2.8). Suda çözünen bir vitamin ve bir kofaktör olarak rol oynamaktadır. Ortokinon, trikarboksilik asit ve bir pirolokinolin kofaktörünün üyesidir ayrıca PQQ bir konjugat asididir (PubCehm). PQQ veya metoksatin, çoklu prokaryotik dehidrojenazlar için bir redoks kofaktörüdür (Duine ve diğ. 1990). PQQ'nun zengin farmakolojik özellikleri ve besinlerdeki etkileri bilim insanlarının dikkatini çekmektedir. PQQ, antioksidan özelliklere sahip, anyonik ve suda çözünen bir bileşiktir (Wen ve diğ. 2018). PQQ başlangıçta bakterilerde bir redoks kofaktörü olarak bulunmuş ve daha sonra bitkiler, hayvanlar ve insanlar için temel bir besin olduğu öğrenilmiştir (Kasahara ve Kato 2003; Felton ve Anthony 2005; Rucker ve diğ. 2005).



Şekil 2.8: Pirolokinolin kinon'un kristal yapısı ve kimliği (PubChem).

PQQ'nun bilinen üretim yöntemlerinden birisi, zaman alıcı olan ve izomerleri ve yan ürünleri uzaklaştırmak için karmaşık adımlar gerektiren organik kimyasal sentez yöntemidir (Kempf ve diğ. 2006). İkincisi, daha ekonomik ve çevre dostu olan bir mikrobiyal fermantasyon yöntemidir. Çoklu gram negatif bakteriler PQQ'yu sentezlemektedir (Ameyama ve diğ. 1984; Urakami ve diğ. 1992; Wang ve diğ. 2007; Gak ve diğ. 2015). PQQ, metilotrofik bir bakteri olan *Methylovorus sp.* MP688 (Zou ve diğ. 2018), klonlanmış *K. pneumoniae* fragmanını içeren *E. coli* suşları (Meulenberg ve diğ. 1990), membrana bağlı alkol ve glikoz dehidrojenaz içeren asetik asit bakterileri (Matsutani ve Yakushi, 2018) PQQ içermektedir ve bu tür bazı bakterilerden PQQ sentezlenebilmektedir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Asetik asit bakterilerinin PQQ'ya bağlı dehidrojenazları (Matsutani ve Yakushi 2018'den alınmıştır). MDH, metanol dehidrojenaz; ADH, alkol dehidrojenaz; GDH, glikoz dehidrojenaz; QDH, kinat dehidrojenaz; IDH, inositol dehidrojenaz; PQQ-DH, karakterize edilmemiş PQQ içeren dehidrojenaz; SldAB, gliserol dehidrojenaz (veya poliol dehidrojenaz); SNDH, sorboson dehidrojenaz; a, MDH'nin büyük alt birimi; β , MDH'nin küçük alt birimi; ADH'de A, ADH'nin büyük alt birimi AdhA; ADH'de B, ADH'nin sitokrom alt birimi. Soluk yeşil, sekiz kanatlı β -pervane PQQ alanı; soluk mor, altı kanatlı P-pervane PQQ alanı. PP, periplazma; CM, sitoplazmik zar; CP, sitoplazma.

PQQ, bitki mantar patojenlerini kontrol etmek, ekin bitkilerini geliştirmek, hücre büyümesini ve stres toleransını iyileştirmek, antioksidatif etki ve nöroprotektif işlev dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları nedeniyle gıda, ilaç ve tarım endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bishop ve diğ. 1998; Rucker ve diğ. 2009; Misra ve diğ. 2012; Akagawa ve diğ. 2015). PQQ'nun, oksidatif stresi azaltıp mitokondriyal fonksiyonu teşvik etmesiyle beyni, kalbi ve karaciğeri oksidatif stres kaynaklı hasara karşı koruduğu bildirilmiştir (Misra ve diğ. 2012). PQQ'nun, yeni bir B vitamini benzeri bileşik olduğuna inanılmaktadır ve PQQ takviyesi damarsal demansı ve diyabet de dahil olmak üzere hastalıklar için olası bir tedavi yöntemi olarak dikkat çekmektedir. Fakat gıdalarda PQQ dağılımındaki belirsizliklerden dolayı bileşiğin analiz edilmesinde zorluklar yaşanmaktadır (Kato ve diğ. 2018).

PQQ eser miktarda da olsa, insan ve sıçan dokularında bulunmaktadır (Kumazawa ve diğ. 1992; Kumazawa ve diğ. 1993; Kumazawa ve diğ. 1995; Suzuki ve Kumazawa 1997). Yakın zamanda PQQ ve türevi imidazolpirrolokinolin anne sütünde de 140 ila 180 ng/ml arasındaki konsantrasyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Mitchell 1999). Bu PQQ seviyesi, memelilerde biyolojik aktiviteye sahip bir mikro besin olabileceğini düşündürmektedir, ancak henüz memeli PQQ gerektiren enzimler keşfedilmemiştir.

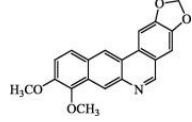
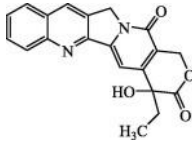
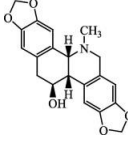
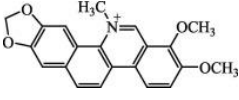
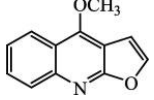
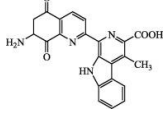
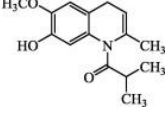
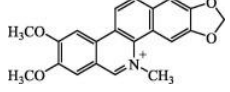
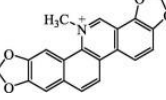
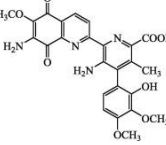
PQQ'nun potansiyel fizyolojik özellikleri tam bilinmemekle beraber, bir antioksidan gibi davranabilmektedir; PQQ'nun O_2^- ve OH^- radikallerini etkin bir şekilde temizlediği keşfedilmiştir (Urakami ve diğ. 1997). Başka farklı PQQ etkileri olarak, sıçangil B16-F10 melanomunda melanogenezi inhibe ettiği (Kosano ve diğ. 1995) ve hücre hatlarında sinir büyüme faktörü üretimini arttırdığı gözlenmiştir (Murase ve diğ. 1993; Urakami ve diğ. 1995). Yüksek dozda PQQ ise hayvan modellerinde dokularda hipoksik ve iskemik yaralanmaya (Jensen ve diğ. 1994), kimyasal maddeye bağlı nöbete (Sanchez ve diğ. 2000), karaciğer hasarına (Tsuchida ve diğ. 1993; Jonscher ve Rucker 2019) yol açtığı görülmüştür.

2.4.2 Kinolin ve Türevleri

Doğal kinolin ile türevi, antitümör ve antikanser aktivitesine sahiptir; kinolin veya türevlerinin bazı kaynakları ve kullanım yerleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir ayrıca kinolin ve türevleri birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve önemli antikanser aktivite gösterdiği bilinmektedir (Jain ve diğ. 2019). Kültürlenmiş hipokampal nöronlarda glutamat kaynaklı apoptozun, takip eden PQQ tedavisi ile önemli ölçüde zayıfladığı ve bunun da Ca^{2+} akışında kaspaz 3'te glutamat kaynaklı artışı engellediği; aktivitesinin ROS üretimi ve Bcl-2/Bax oranında glutamatın neden olduğu azalmayı tersine çevirdiği bulunmuştur (Zhang ve diğ. 2017). SW1353 hücrelerinde, PQQ'nun konsantrasyonuna ve geçen zamana bağlı olarak ROS birikiminin arttığı gözlenmiştir ve PQQ apoptozu indüklemiştir (Wen ve diğ. 2018). Başka bir yapılan çalışmanın sonucunda, mono (2-etilheksil) ftalatın tip 2 diyabet ile ilişkili olan beta adacık hücrelerinin (INS-1 hücreleri) otofajiye bağımlı apoptozu lizozomal ve mitokondriyal eksenle indüklediğini görülmüştür ve buna ilave olarak PQQ, ROS'u regüle ederek bu işlemi geliştirmiş ve bir derece koruma sağlamıştır (Shi ve diğ. 2019). Kaspaz 3'ün protein ekspresyonunun travmatik beyin hasarı sonrasında arttığını ve ekspresyonun, PQQ ile tedavi edilerek azaltıldığı bulunmuştur (Wen ve diğ. 2018). PQQ'nun hücre döngüsünde MeHg (organik cıva) ile indüklenen S-fazı tutuklama oranını azalttığı ve erken aşamalarda oluşan apoptozu bloke ettiği ortaya konulmuştur (Zhang ve diğ. 2008). Geniş kapsamlı kinolin bazlı antikanser ajanların güncel gelişmeleri hakkında kapsamlı incelemeler bulunmaktadır (Jain ve diğ. 2019). Şu anda insan malignitelerinin tedavisinde kullanılan kinolin bazlı

antikanser ilaçlarının çoğu ve geliştirilmekte olan birkaç yeni ilaç serisi, kalıcı DNA hasarına neden olan topoizomerez enzimlerini tedavi etmekte yardımcı olmaktadır (Schmidt ve diğ. 2008).

Tablo 2.1: Kinolin ve türevlerinin kaynakları ve kullanım yerleri (Jain ve diğ. 2019).

Referans	Bileşik Yapısı	Kinolin Türevi	Kaynak	Kullanım Amacı
Ortiz ve diğ. 2014		Berberin	<i>Berberidaceae</i>	Kolon kanseri
Wall ve diğ. 1966		Kamptotes	<i>Camptotheca acuminata</i> , <i>Notihapodytes foetida</i>	Topoizomerez inhibitörü (antikanser ajan)
Haseeb ve diğ. 2007		Chelidionine	<i>Kırlangıçotu</i>	Akciğer ve pankreas kanseri
Haseeb ve diğ. 2007		Keleritrin	<i>Kırlangıçotu</i>	Akciğer ve pankreas kanseri
Abdel ve diğ. 2014		Dictamine	<i>Dictaminus albus</i>	HepG2 hücrelerine sitotoksiste
Cai ve diğ. 2010		Lavendamycin	<i>Streptomyces levendulae</i>	Antitümör antibiyotik
Djerassi ve diğ. 1958		Lophocereine	<i>Lophocereus schotti</i>	Antitümör antibiyotik
Tan ve diğ. 1991		Nitidin	<i>Zanthoxylum nitidum</i>	Topoizomerez inhibitörü (antikanser ajan)
Zhihu ve diğ. 2014		Sanguinarin	<i>Sanguinaria</i>	Akciğer ve pankreas kanseri
Rao ve diğ. 1963		Streptonignn	<i>Streptomyces flokculus</i>	Antitümör antibiyotik

2.4.3 Pirolokinolin Kinon ve Sağlık Üzerine Etkileri

PQQ ile ilgili yapılan son çalışmalarda daha çok Parkinson hastalığı (PH) üzerinde yoğunlaşma görülmektedir. PH yaşlanan popülasyonda ikinci en sık görülen nörodejeneratif bozukluktur ve dopamin nöronlarının, *substantia nigra pars compacta*'daki kaybıyla alakalıdır (Johnson ve Bobrovskaya 2015). PQQ'nun *in vitro* ve *in vivo* olarak rotenon kaynaklı nöron hasarını iyileştirdiğini, PH modellerinde oksidatif stresi azalttığı ve mitokondriyal fonksiyonları iyileştirdiği, rotenon yaralı nöronlarda mikrotübül depolimerizasyonunu düzenlediği, Ndufs1 ve Ndufs4 siRNA dizilerinin modülasyonu nöroproteksiyonuna aracılık edebileceğine ulaşılmıştır (Zhang ve diğ. 2016). Ayrıca PQQ, rotenon kaynaklı PH modellerine karşı nöroprotektiftir, mitokondriyal biyogenezi teşvik eder, mitokondriyal fisyon ve füzyonu düzenler ve PH'nı tedavi etmek için yeni bir potansiyel adaydır (Lu ve diğ. 2018).

Dikkat çekici bir şekilde, son çalışmalar PQQ'nun nöroprotektif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. PQQ'nun inme modelinde nöronal hücre ölümünü önlediği bildirilmiştir (Jensen ve diğ. 1994; Zhang ve Rosenberg 2002; He ve diğ. 2003; Alexandrova ve Bochev 2005; Zhang ve diğ. 2006). PQQ, kültürlenmiş SH-SY5Y hücrelerinde apoptoz ile ilişkili proteinlerin (Bcl-2, Bax ve Smac) modülasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin restorasyonu, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) inhibisyonu ile birlikte rotenon kaynaklı apoptozdan önlenmesini sağlamıştır (Qin ve diğ. 2015).

2.5 Çalışmanın Amacı

AH, nöropatolojik olarak β -amiloid plaklarının (APP) birikmesi, hücre içi nörofibriler düğümler ve beyindeki nöronların kaybı ile karakterizedir. Günümüzde bu hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı bilinen net bir tedavi yöntemi yoktur. AH'nin nedeni belirsiz olmasına rağmen birkaç araştırma, bazı genlerin AH'nin patogenezinde veya ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Beyindeki amiloid öncü proteini (sAPP) ve amiloid β peptidinin aşırı birikimi nörodejenerasyonun olası bir nedenidir, ancak nöron ölümüne neden olan kesin mekanizma henüz anlaşılamamaktadır.

Doğal ve esansiyel bakteriyel bir kofaktör olan PQQ baklagillerde, meyvelerde ve yapraklı sebzelerde yaygındır ayrıca insan ve fare anne sütünde yüksek konsantrasyonlarda bulunan çok güçlü bir redoks antioksidanıdır. Bu çalışmada, PQQ'nun anti-Alzheimer etkilerinin insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) üzerinde araştırılması hedeflenmektedir. Son yapılan çalışmalar PQQ'nun nöroprotektif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. PQQ'nun inme modelinde nöronal hücre ölümünü önlediği bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma ile çok güçlü anyonik bileşik olan PQQ'nun anti-Alzheimer etkileri literatüre yeni bir bilgi olarak kazandırılmıştır. Literatür için PQQ bileşiği, AH tedavisi için ilaç etkinliği geliştirme çalışmalarına yeni bir soluk getirecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 MATERYAL

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Projemiz kapsamında kullandığımız bazı kimyasallar; Pirolokinolin Kinon (PQQ), Dimetilsülfoksit (DMSO), Fetal Sığır Serum (FBS), DMEM/F-12 (Hücre Kültürü Besiyeri Karışımı F-12), DPBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi), Penisilin-Streptomisin karışımı ve Tripsin-EDTA çözeltisidir. Diğer kimyasallar yüksek saflıktadır.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Projemizde çalışma boyunca, Nuve OT 4060 ve Hiclave HVE-50 marka Otoklav, Thermo EC320 marka Agaroz Jel Elektroforez Aparatı, DNR LB 0605 marka UV Jel Görüntüleme Kabini, DragonLab MX-F marka Vorteks, Bioneer PZR Cihazı, Biosan Dry Block Heating Thermostat TDB-100, Isı Bloğu, Thermo Scientific Multiskan GO Mikropilaka Okuyucu Spektrometre, UV-1700 Shimadzu model Spektrofotometre, Precisa XB 220A ve Mettler Toledo AB 265S model Terazi, Soğutmalı & Soğutmasız Sigma 1-14 ve Mettler Toledo PB 602-L marka Santrifüj, SHOV M7017-P model Mikrodalga Fırın, Nuair marka CO₂ İnkübatörü, Olympus CX31 model Olympus Ters Mikroskop ve Thermo EC-250-90 model Güç Kaynağı kullanılmıştır.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kit, Vektör ve Hücreler

İnsan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y), Qiagen RNeasy Plus Universal Kit, OneScript Plus cDNA Sentez Kit ve GM SYBR qPCR Kittir.

3.2 METOD

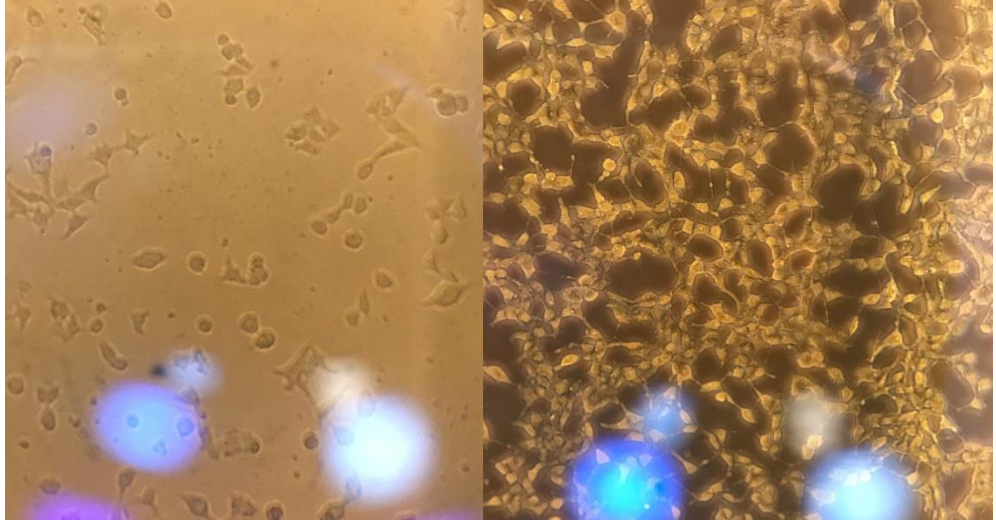
3.2.1 Hücre Kültürü

PQQ bileşiminin insan nöroblastom hücre hattı SH-SY5Y üzerindeki anti-Alzheimer etkileri ilişkili genlerin mRNA düzeyleri saptanarak araştırıldı. SH-SY5Y hücrelerini inkübe etmek için 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem ortamda, %1 penisilin ve %10 FBS içeren DMEM/F-12 kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Hücrelerin inkübe ortamı.

-80°C derin dondurucuda %10 DMSO'da saklanan hücreler su banyosunda 37°C'de eriyene kadar bekletildi. Hücreler erimesinin ardından hücreler petrilere ekilerek üzerlerine 5 ml DMEM/F-12 besiyeri ilave edilip 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 1 gün bekletilip yüzeye tutunması sağlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: SH-SY5Y hücrelerinin ilk ekildiğindeki ve sonra büyümüş hallerinin mikroskop görüntüleri.

Hücreler CO₂ inkübatöründe yeterli çoğalmayı elde edene kadar bekletildi. Besiyerleri gün aşırı yenilenerek canlılıklarına ve çoğalma hızlarına bakıldı (Şekil 3.3).

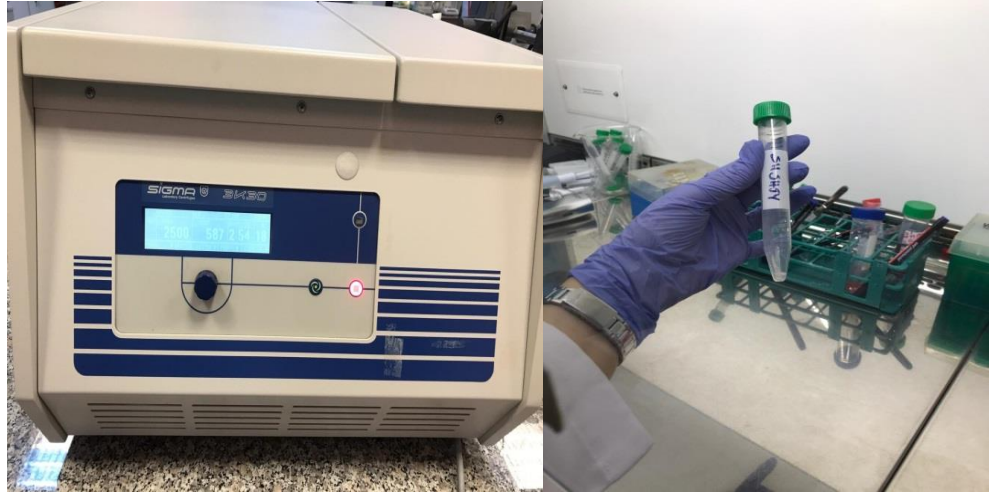


Şekil 3.3: Petride çoğaltılan SH-SY5Y hücreleri.

3.2.1.1 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler besiyeri uzaklaştırılarak kültür kaplarında tek tabaka olduklarında pasajlama işlemi yapıldı. Sonra hücreler 5 dk %0,25'lik tripsinle muamele edilerek hücreler yüzeyden kaldırıldı. Süspansiyon olan hücrelerin üzerine 1 ml DMEM/F-12 besi ortamı eklendi böylece tripsin inaktif hale gelmiş oldu. Hücreler 5 dk 2500 xg'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete 1 ml besiyeri eklendi,

ependorfta hazırlanan tripan blue (1:1000 seyreltilmiş) ve hücre karışımının (1:1) Thoma lamı ile sayımı yapıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Santrifüj cihazı ve SH-SY5Y santrifüjünden elde edilen pelet.

3.2.1.2 Hücre Kültürü Modeli için PQQ Hazırlanışı

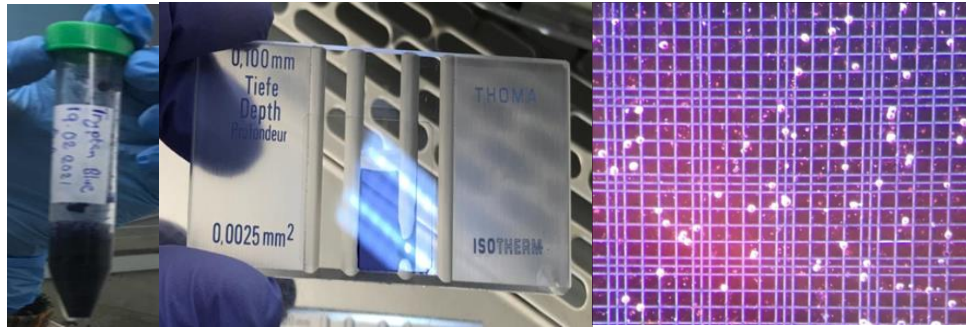
Tez çalışması sırasında kullanılacak olan PQQ bileşiği ticari olarak yurt dışından satın alınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Pirolokinolin Kinon (PQQ).

3.2.2 Sitotoksisite Deneyi

PQQ bileşiminin sitotoksisite deneyleri için çözülmesi steril su ile yapıp, 0,2 mikronluk filtreden geçirildi. 96'lık plakaya ekilecek hücre sayıları hesaplandı. Büyütülen hücreler tripsin ile kaldırıldı ve 2500 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Sup kısmı atıldı, dibinde kalan hücreler için 1 ml besiyeri ilave edilip çözdürüldü. Hazırlanan tripan blue ve hücre karışımının (1:1) Thoma lamı ile sayımı yapıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Tripan blue uygulanmış hücrelerin Thoma lamına koyularak mikroskop altında sayımı.

Sayımı yapılan hücreler, her kuyucukta 1×10^3 hücre olacak şekilde 96'lı plakalara koyulup 200 μ l olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı. Hücrelerin plakaya yapışması için 24 saat %5'lik CO₂ inkübatöründe, %95 nem içeren ortamda inkübe edildi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PQQ bileşiği hücrelere 1 gün sonunda uygulandı.

İnkübasyon süresi (24 saat) bitince plakadaki besiyeri uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 μ l kristal viyole boyası (%0,5) eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında plaka dik tutularak çeşme suyunda yıkandı. Her kuyucuğa 100 μ l 0,1 M %50 etanol içindeki Na-sitrat (pH 4,2) eklenerek, çalkalayıcıda 100 rpm hızda 15 dk çalkalandı (Şekil 3.7- 3.8).



Şekil 3.7: 96 kuyulu plakalara kristal viyole ve Na-sitrat uygulanışı.



Şekil 3.8: Çeşme suyunda 96 kuyulu plakadaki boyanın yıkanarak uzaklaştırılması ve Na-sitrat ile çalkalanması.

Plaka okuyucu kullanılarak rengin 630 nm’de yoğunluğuna bakıldı. 10 farklı doz konsantrasyonlarındaki PQQ uyguladığımız gruplar kontrol grubu ile kıyaslanarak farklı dozlardaki bileşiğin hücre canlılığını nasıl etkilediği hesaplandı (Şekil 3.8).



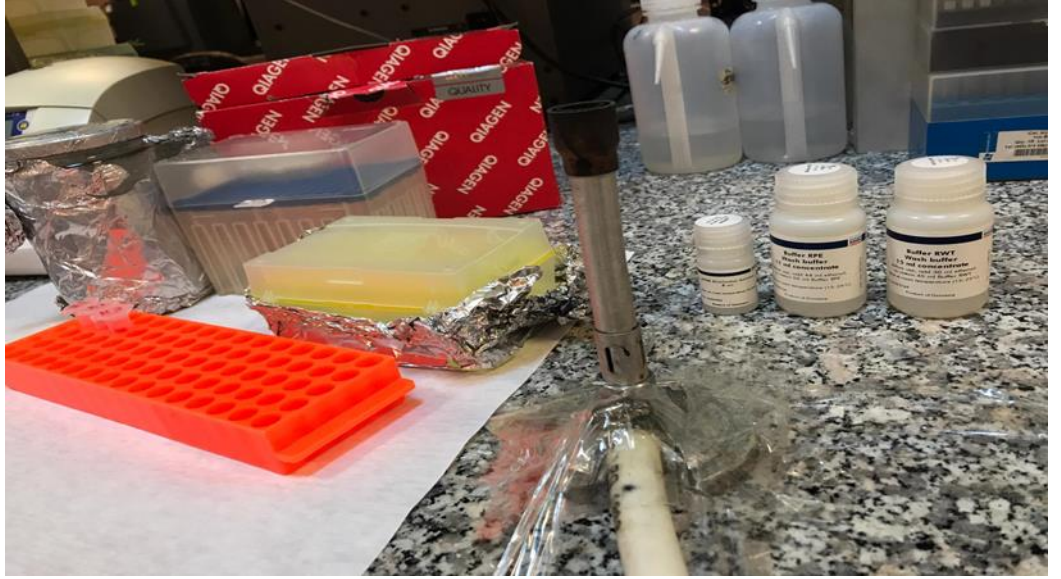
Şekil 3.9: Değişik konsantrasyonlardaki PQQ’un hücre canlılığına olan etkisinin 630 nm’de plaka okuyucuda ölçülmesi.

3.2.2.1 Doz Ayarlanması

Sitotoksosite deneyi ile belirlenen dozların Alzheimer için belirtilen genlerdeki etkisine bakmak üzere hücrelere uygulandı. Bu kapsamda 100 mm petriyeler kullanılarak 10^6 hücre ekilip bu hücrelerin 24 saatlik inkübasyonundan sonra belirlenen dozlar bu hücrelere uygulandı. PQQ uygulanan hücreler 24 saatlik inkübasyonun ardından RNA izolasyonu için toplandı.

3.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA'ların Görüntülenmesi

Hücrelerden RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Plus Universal Kit kullanıldı. Bunun için, total RNA izolasyonu, üretici talimatları ve laboratuvarımızda optimize ettiğimiz prosedür kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Qiagen RNeasy Plus Universal Kiti ve alev çatısı.

Hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı. 10^6 hücreye 600 μ l Qiazol Lysis solüsyonu eklendi ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere toplandı. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilip üstüne 100 μ l kit içinde bulunan gDNA Eliminator Solution eklenerek 15 sn karıştırıldı. 180 μ l kloroform eklenip 15 sn karıştırıldı. 3 dk inkübe edildi. 4°C ortamda 12000 xg 'de 30 dk boyunca santrifüj yapıldı. Üst fazdan yaklaşık 600 μ l alınarak 2 ml'lik başka ependorf tüpe koyuldu. Alınan kısmın üstüne %70 etanol eklenerek karıştırıldı. Oluşan karışım RNeasy Mini Spin kolonuna

yüklendi. 22 sn 9000 xg'de santrifüj yapıldı ve alttaki kısım boşaltıldı. Kalan kısmın üstüne 700 µl kit içindeki RWT koyuldu. 22 sn 9000 xg'de santrifüj yapılarak alta dolan sıvı döküldü. Kolonun üstüne kitteki 500 µl RPE tamponu eklendi. 22 sn 9000 xg'de tekrar santrifüj yapılarak alta akan kısmı boşaltıldı. Yeniden kolonun üzerine 500 µl RPE tamponu eklendi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Qiagen RNeasy Plus Universal Kiti içinden kullanılan solüsyonlar.

2 dk 15 sn 9000 xg'de santrifüj yapıldı. Altta kısım döküldü. 30 sn kolon boş olarak 9000 xg'de santrifüj edildi. Kolon yeni bir tüpe alınarak üstüne 50 µl RNAz içermeyen su eklendi. 9000 xg'de 1 dk 15 sn santrifüj yapılarak RNA'ların alt tarafa akması sağlandı. Elde edilen RNA'dan 3 µl alınıp 2 µl boya ve 5 µl su ile karıştırılarak elde edilen hacmin 5 µl'si jele yüklendi. Tüm bu işlemler alev çatısı altında gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların 260/280 nm ölçümleri yapılarak cDNA sentezi sırasında kullanılacak RNA miktarının belirlenmesi sağlandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: RNA, DNA ve proteinlerin üç katman şeklinde ayrılmış hali.

3.2.4 cDNA Sentezi

Nanodrop'ta konsantrasyonları belirlenen RNA'lardan ABM Onescript cDNA sentez kitiyle cDNA sentezi yapıldı. Ependorf tüpe total RNA kit içerisindeki 1µl oligo d(T) primerleri, nükleaz içermeyen su ve 1 µl dNTP çözeltisi karıştırılarak 5 dk 65°C'de inkübe edildi. Daha sonra karışıma 0,5 µl RNAz inhibitörü, 4 µl reaksiyon tamponu ve 1 µl 'Easy Script RTase' enzimi ilave edildi. Son hacim 20 µl'ye tamamlandı ve 50 dk 50°C'de inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleşmiş oldu. İnkübasyon süresinin bitiminde enzimi inhibe etmek üzere karışım 5 dk 85°C'de bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar daha sonraki çalışmalar için -20°C'de muhafaza edildi. Uygulanan cDNA sentez karışım ve prosedürü Tablo 3.1'de görülmektedir.

Tablo 3.1: cDNA sentez karışımı ve prosedürü.

Bileşenler	Alınan Hacim	Son Hacim
Total RNA	1 µl	2 µg/ml
Oligo(dT) primer	1 µl	0,5 µM
dNTP karışımı (10 nM)	1 µl	500 µM
RNAaz içermeyen su	Değişken	14,5 µl
Karışım hazırlandıktan sonra 5 dk 65°C ısıtıcıda inkübe edilir.		
5X RT tamponu	4 µl	1X
Ribonükleaz inhibitörü (40 U/µl)	0,5 µl	20 U/rxn
ReverseTranskriptase (200 U/µl)	1 µl	200 U/rxn
Toplam Hacim		20 µl
Karışım sentez için 50 dk 50°C ısıtıcıda inkübe edilir.		

GM SYBR qPZR Kit'i kullanılarak gerçek zamanlı PZR reaksiyonları üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. Sonuçlar ise 'Exicycler3' programı kullanılarak "housekeeping" geni olarak β-aktin seviyesinde hesaplandı. PZR uygulama koşulları Tablo 3.2'de, sıcaklık, döngü ve zamanları Tablo 3.3'te verilmiştir. Kullanılan primer dizileri, primer listesi ve sıcaklıkları Tablo 3.4'teki gibidir.

Tablo 3.2: qRT-PZR koşulları.

Bileşenler	Reaksiyon Karışımı
SYBR qPZR Mix	12,5 µl
İleri Primer (10 pm)	0,6 µl
Geri Primer (10 pm)	0,6 µl
cDNA (1:5 seyreltilmiş)	5 µl
dH ₂ O	6,3 µl

Tablo 3.3: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları.

Döngü	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	95°C	5 dk
Denatürasyon	95°C	20 sn
Yapışma	X°C	20 sn
Uzama	72°C	25 sn
Döngü Sayısı	40 Döngü	

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan primer dizileri ve sıcaklıkları.

Primer	İleri Primer (5'→3')	Geri Primer (5'→3')	Sıcaklık (°C)
APP	GCCCTGCGGAATTGACAAG	CCATCTGCATAGTCTGTGTCTG	62
PSEN1	GCAGTATCCTCGCTGGTGAAGA	CAGGCTATGGTTGTGTTCCAGTC	54.5
PSEN2	GCTGTTTGTGCCTGTCACTCTG	TGTGTCCTCAGTGAATGGCGTG	54.5
APOE	GGGTCGCTTTTGGGATTACCTG	CAACTCCTTCATGGTCTCGTCC	54.5
CLU	TGCGGATGAAGGACCAGTGTGA	TTTCCTGGTCAACCTCTCAGCG	54.5
CR1	TAGGTGTCAGCCTGGCTTTGTC	GACATCTGGAGGTGGCTGACAT	54.5
PICALM	GGCAGCATTAGAGGAAGAACAGG	CTGCTGAGGTGGATACAGGAGA	54.5
BIN1	CGTCAACACGTTCCAGAGCATC	CTTGACCGTGAAGGTGTTGCTC	54.5
ABCA7	CACTCTCCGAGAGCTAGACAC	CTCCATATCTGTGTCCGCAGCA	54.5
MS4A1	CTGGTCCAAAACCACTCTTCAGG	GGCAATGTGGAAGAGCCCATTC	54.5
CD2AP	CCAAAGCCTGAACTGATAGCTGC	GGACTTGTGGAGCTGCTGGTTT	54.5
SORL1	GAACACCTGTCTTCGCAACCAG	TGTCCAGGTCACAGATGGTGGT	54.5
MMP9	GGGACGCAGACATCGTCATC	TCGTCATCGTCGAAATGGGC	62

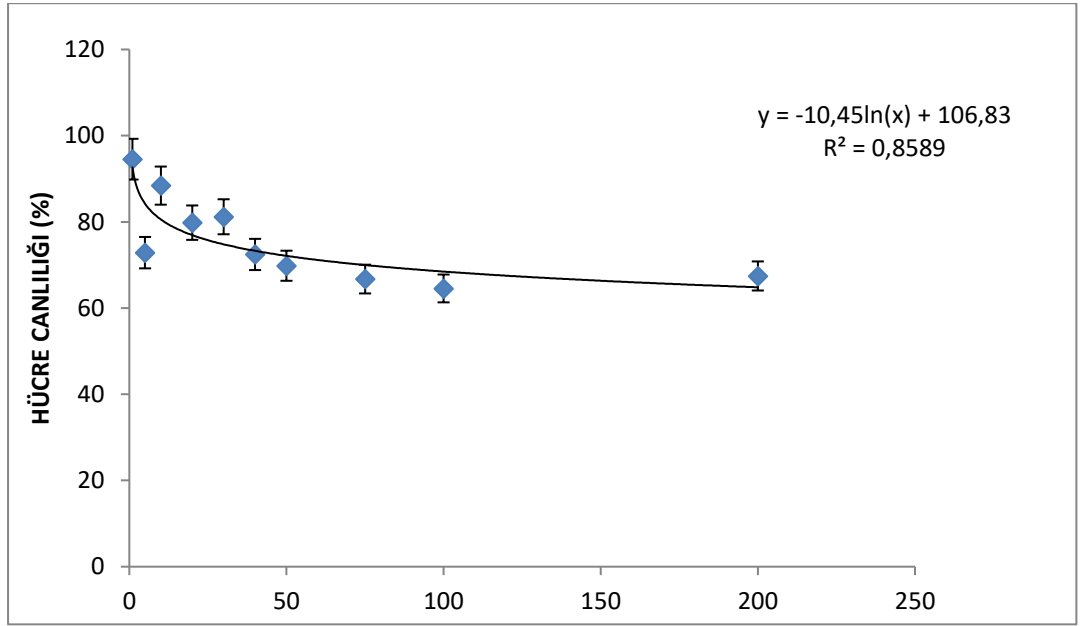
3.3 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Sonuçlar Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edilerek qRT-PCR veri analizleri RT2 Profiller PCR Array Data Analysis v3.5 ile web üzerinden çevrim içi gerçekleştirildi. $P < .05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

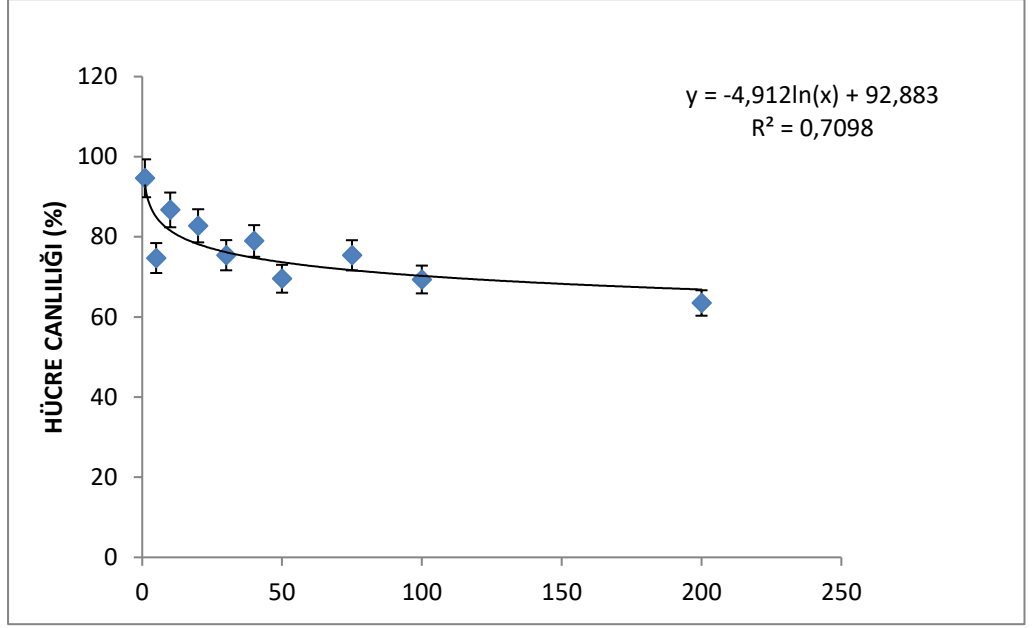
4. BULGULAR

4.1 Sitotoksosite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

96'lı plakalardaki hücrelerin PQQ'nun 1 µM ile 200 µM arasında 10 farklı doz konsantrasyonunda 24. saatteki etkinliği araştırılmıştır. Deney sonucunda oluşan renge göre kontrol ve doz gruplarının absorbands değerleri 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında ELISA cihazında belirlenmiştir. Yapılan sitotoksosite deneyi sonucunda devamındaki çalışmalar için EC05 dozu 3,102 µM, EC10 dozu ise 5,0054 µM olarak belirlendi ve ileri çalışmalarda bu iki doz kullanıldı (Şekil 4.1).



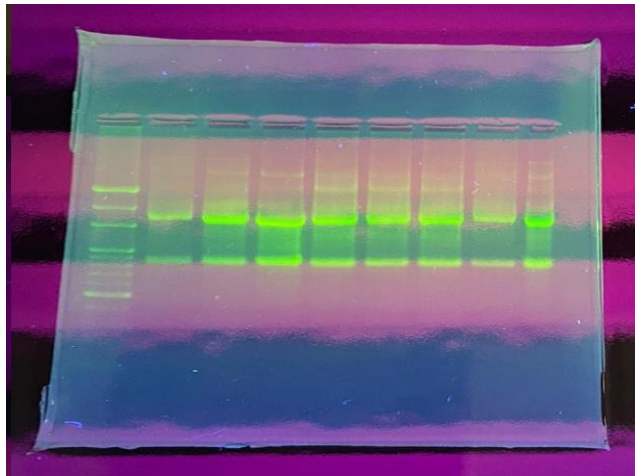
Şekil 4.1: 1000 hücre ekilmiş hücrelerde PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.



Şekil 4.2: 5000 hücre ekilmiş hücrelerde PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre canlılığına etkisi.

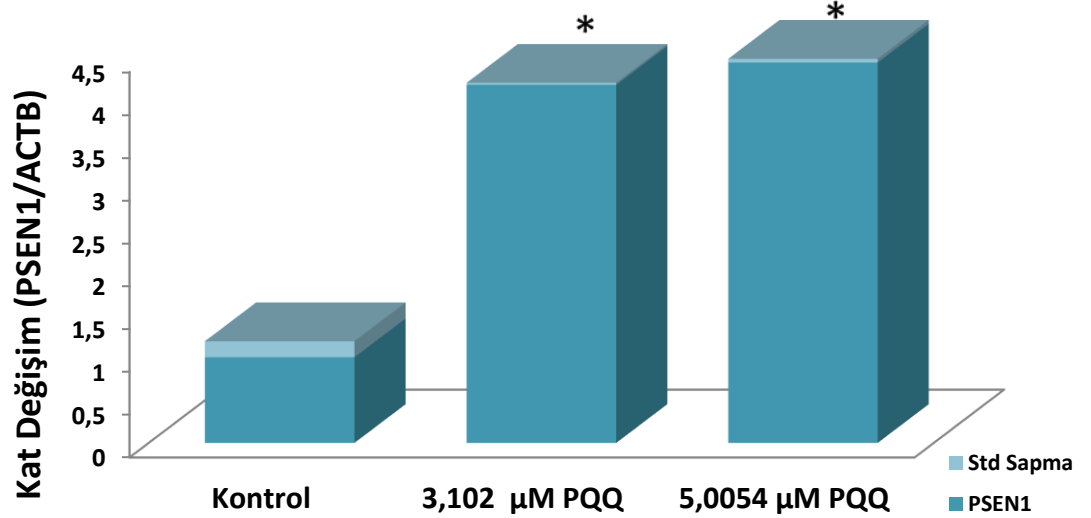
4.2 PQQ Bileşiğinin SH-SY5Y Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

Uygulanacak dozlar sitotoksisite deneyi ile belirlendi ve hücrelere belirlenen dozda PQQ bileşiği uygulandı. Toplam 24 saat inkübasyon süresinin ardından hücreler toplandı ve bu hücrelerden RNA izole edilerek hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerine bakıldı (Şekil 4.3). Çalışmalarda sonuçlar β -aktin ile normalize edilip kontrol değerleri 1 olarak alındı (Şekil 4.4-4.16).



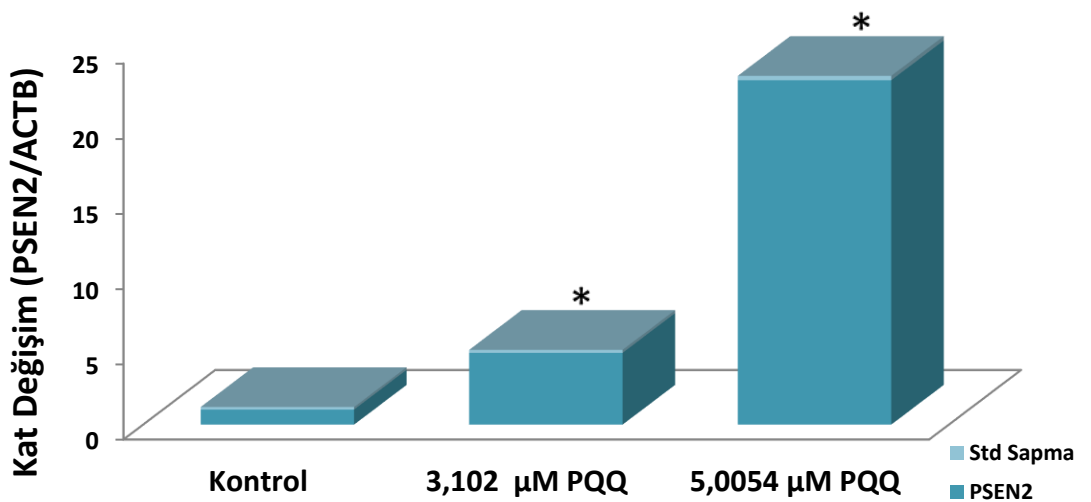
Şekil 4.3: PQQ uygulanmış SH-SY5Y hücrelerinin RNA izolasyonu sonrası görüntüsü.

PSEN1 mRNA ekspresyon düzeyinde 3,102 μ M doz uygulamasında 4,18 kat anlamlı artma görülürken diğer 5,0054 μ M doz uygulamasında 4,44 kat artma meydana geldi (Şekil 4.4).



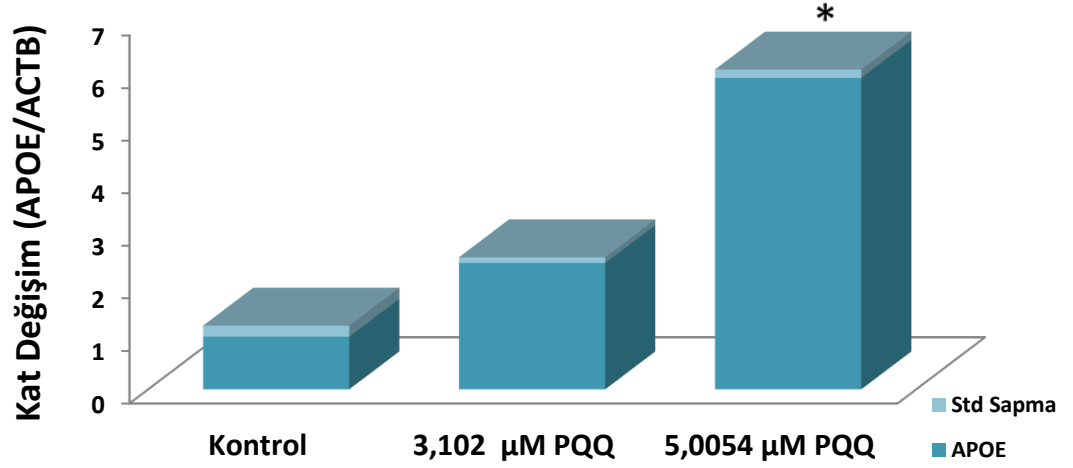
Şekil 4.4: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

PSEN2 mRNA ekspresyon düzeyinde 3,102 μ M doz uygulamasında 4,77 kat anlamlı artma görülürken diğer 5,0054 μ M doz uygulamasında ise 22,9 kat artma görüldü (Şekil 4.5).



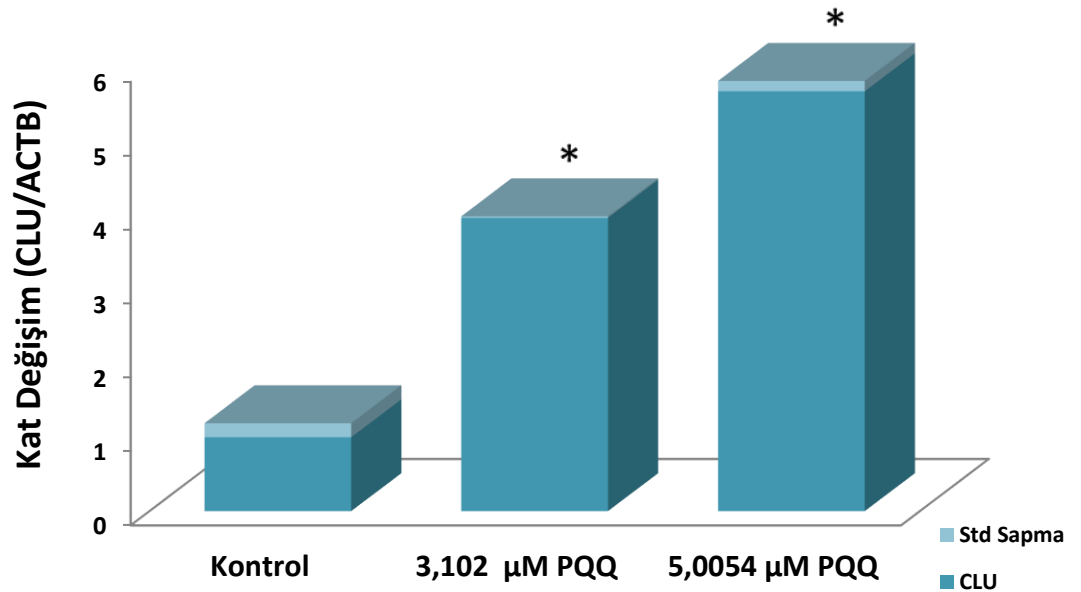
Şekil 4.5: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PSEN2 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

APOE mRNA ekspresyon düzeyinde 5,0054 μM doz uygulamasında 5,92 kat anlamlı artma meydana geldi (Şekil 4.6).



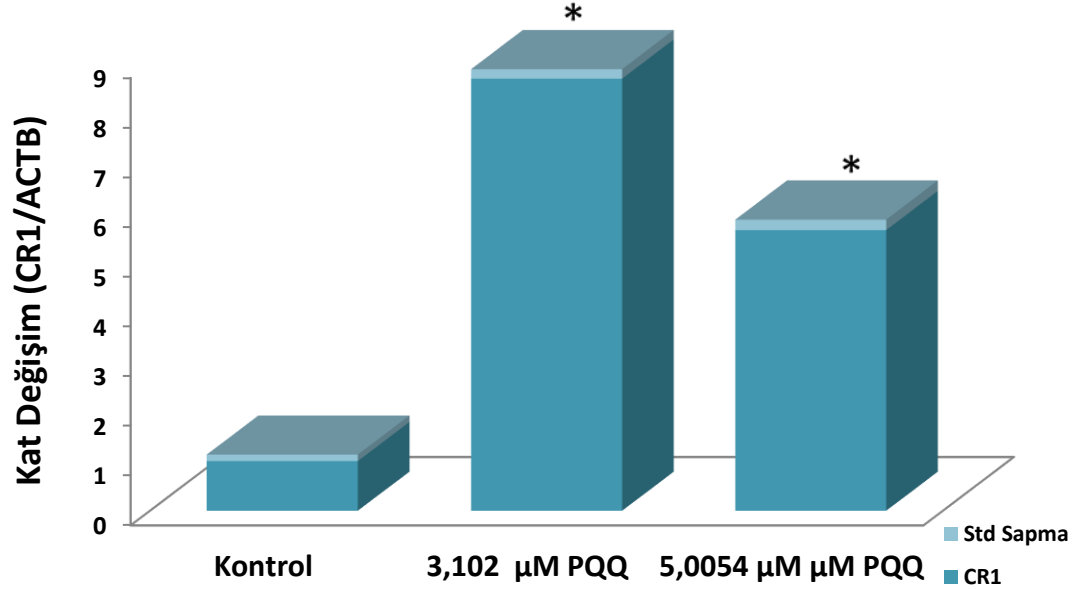
Şekil 4.6: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında APOE geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

CLU mRNA ekspresyon düzeyinde 3,102 μM doz uygulamasında 3,97 kat anlamlı artma, 5,0054 μM doz uygulamasında 5,68 kat anlamlı artma görüldü (Şekil 4.7).



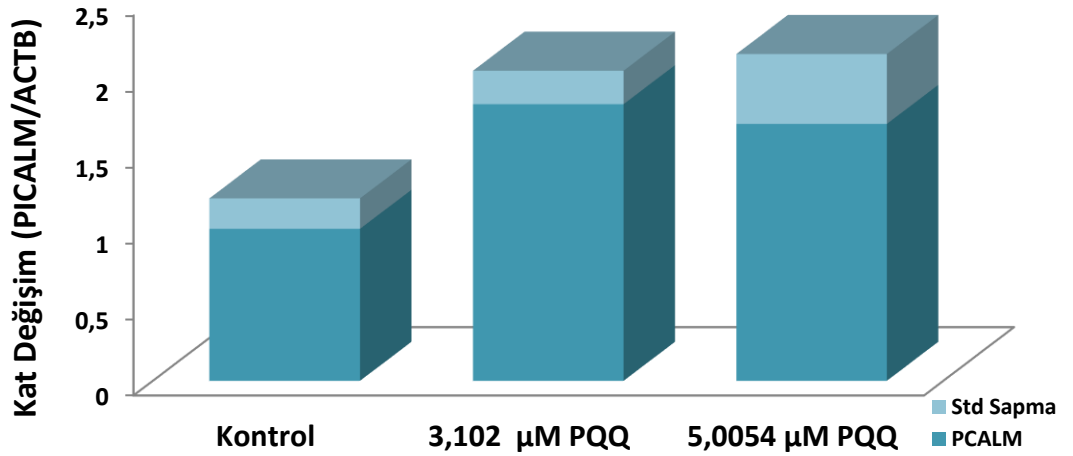
Şekil 4.7: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CLU geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

CR1 mRNA ekspresyon düzeyinde 3,102 μM doz uygulamasında 8,69 kat anlamlı artma görülürken diğer 5,0054 μM doz uygulamasında 5,65 kat anlamlı artma meydana geldi (Şekil 4.8).



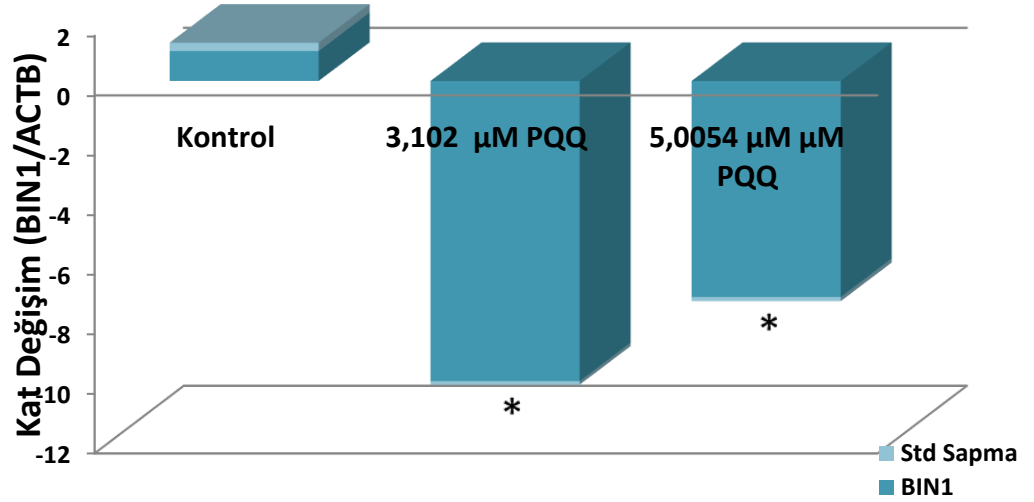
Şekil 4.8: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında CR1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

PICALM geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişimler olmamıştır (Şekil 4.9).



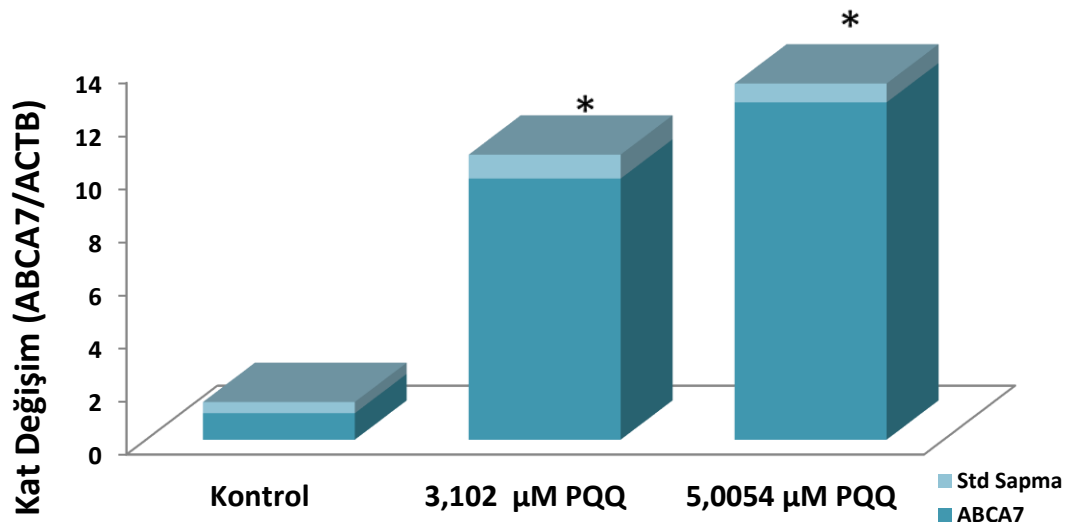
Şekil 4.9: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında PICALM geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı.

BIN1 mRNA ekspresyon düzeyinde 3,102 μM doz uygulamasında 10,06 kat azalma ve 5,0054 μM doz uygulamasında 7,24 kat azalma görüldü (Şekil 4.10).



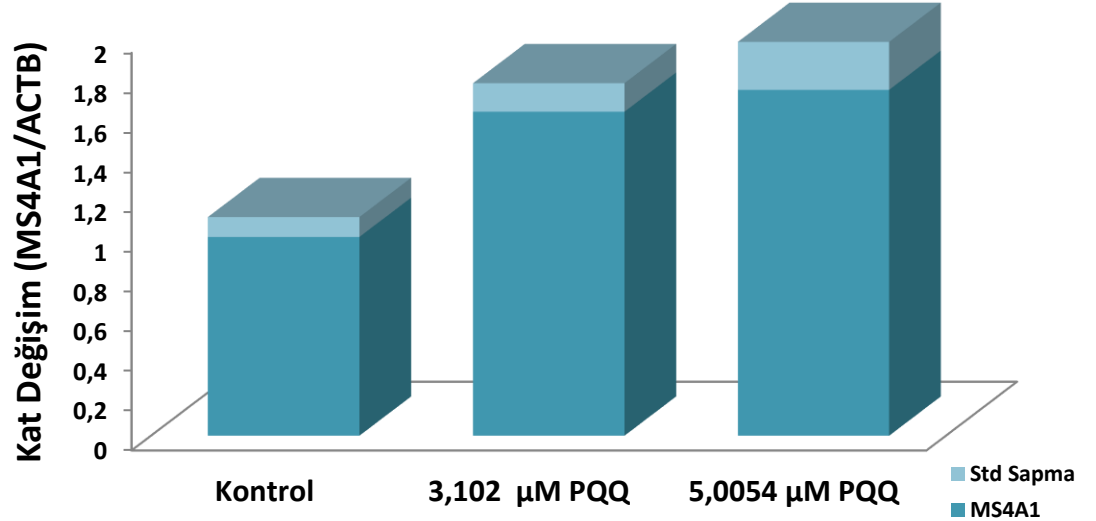
Şekil 4.10: PQQ bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında BIN1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

ABCA7 mRNA ekspresyon düzeyinde 3,102 μM doz uygulamasında 9,84 kat azalma ve 5,0054 μM doz uygulamasında 12,71 kat azalma meydana geldi (Şekil 4.11).



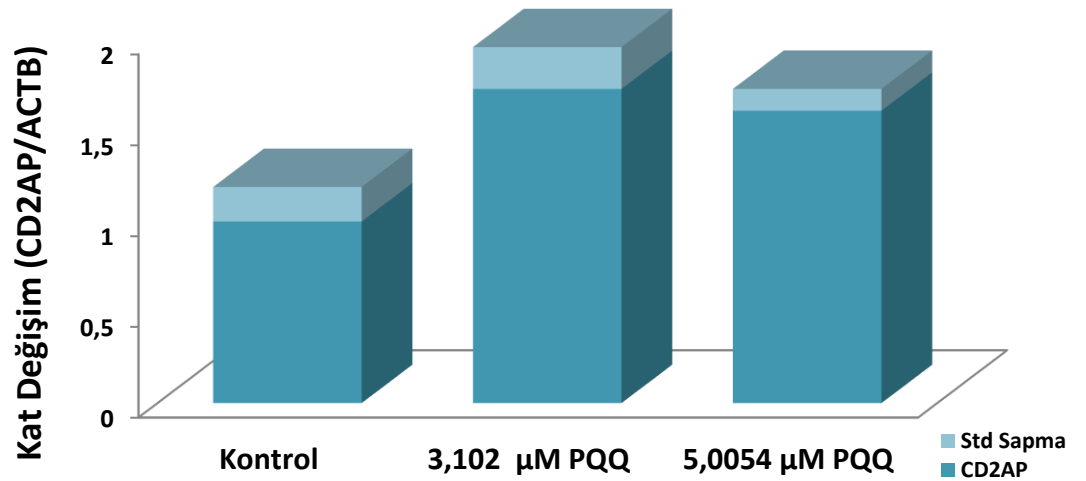
Şekil 4.11: PQQ bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında ABCA7 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

MS4A1 mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişimler görülmemiştir (Şekil 4.12).



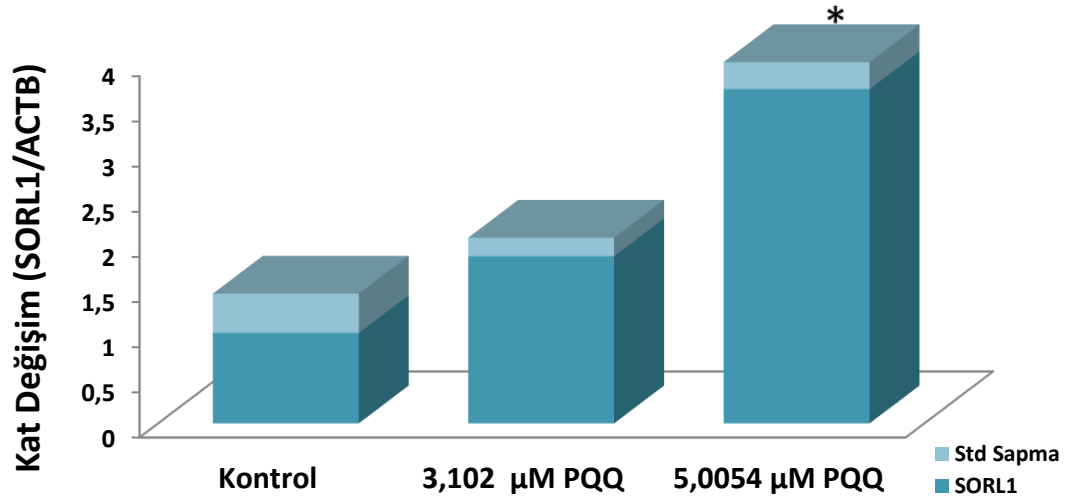
Şekil 4. 12: PQQ bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında MS4A1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı.

CD2AP geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişimler olmamıştır (Şekil 4.13).



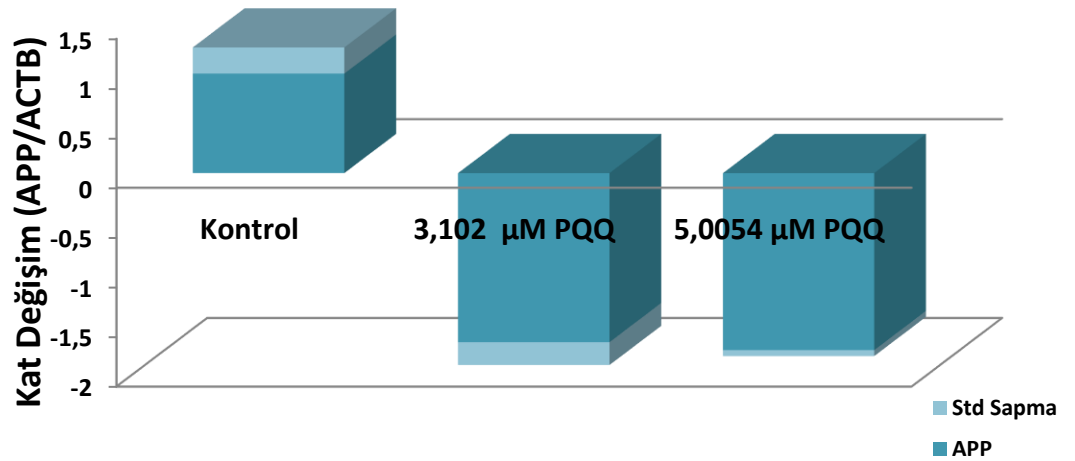
Şekil 4.13: PQQ bileşiminin SH-SY5Y hücre hattında CD2AP geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı.

SORL1 mRNA ekspresyon düzeyinde 5,0054 μM doz uygulamasında 3,7 kat anlamlı artma meydana geldi (Şekil 4.14).



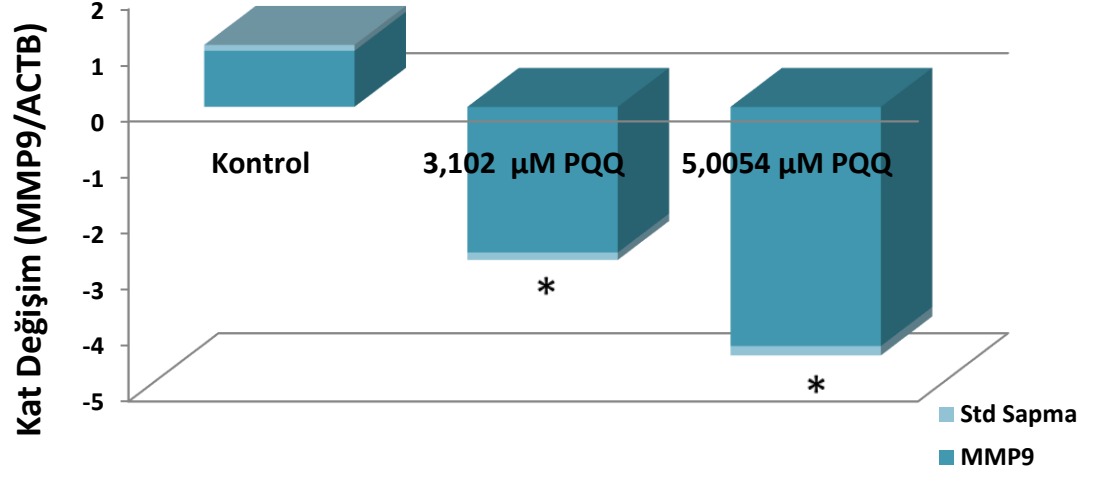
Şekil 4.14: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında SORL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

APP geninin mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı değişimler olmamıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında APP geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı.

MMP9 mRNA ekspresyon düzeyinde 3,102 μM doz uygulamasında 2,6 kat anlamlı azalma ve 5,0054 μM doz uygulamasında 4,27 kat anlamlı azalma görüldü (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında MMP9 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde farklılık gösteren gruplardır.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Semptomları çok faktörlü olan AH patogenezi tam olarak kesinleşmese de büyük oranda, hastalığın başlatılmasında veya yayılmasında kilit rol oynadığı düşünülen amiloid beta ve fosforile tau protein birikimlerine dayandırılmaktadır. Günümüzde nöropatolojik plaklarının birikmesi, hücre içi nörofibriler düğümler ve beyindeki nöronların kaybı ile karakterize olan AH'nin ilerlemesini azaltan kesin bir tedavi yöntemi yoktur. Buna rağmen birkaç araştırmada bazı genlerin AH'nin ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını gösterilmektedir.

İlk andan itibaren bilim insanlarının dikkatini çeken PQQ'nun araştırıldıkça zengin farmakolojik özellikleri ile besinlerdeki etkileri bulunmaya başlanmıştır. Antioksidan gibi davranabilen PQQ'nun potansiyel fizyolojik özellikleri hala araştırılmakta olup yeni bilgiler edinilmektedir. Bu çalışma kapsamında PQQ'nun anti-Alzheimer etkinliklerini öğrenmek için insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) üzerinde çalışma yapılmıştır.

Proje kapsamında Alzheimer ile ilişkili olduğu bilinen genler üzerinde PQQ'nun etkileri SH-SY5Y hücre hattında çalışıldı. Çalışma sonuçlarına göre PQQ'nun doza göre sitotoksik etkisi çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanarak 24 saatteki hücre canlılığına olan etkisi belirlenmiş ve sonuç olarak hücrelerin %5 ve %10 oranlarındaki ölüme yol açan miktarları EC05 ve EC10 dozları 24. saatte 3,102 μM ve 5,0054 μM olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki diğer araştırmalarda kontrol grubu, EC05 ve EC10 dozlarının olduğu değişimler araştırılmıştır. RNeasy Plus Universal Kit ile total RNA izolasyonun ve takibinde Onscript Plus cDNA Sentez Kiti ile cDNA sentezlenmesinin ardından hücre döngüsü ile ilişkili genlerin kontrol ve doz grupları arasındaki mRNA düzeyinde ifade değişimleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1: PQQ bileşigi uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler.

SH-SY5Y		
Genler	EC05 (3,102 μ M)	EC10 (5,0054 μ M)
PSEN1	4,18	4,44
PSEN2	4,77	22,9
APOE	2,4	5,92
CLU	3,97	5,68
PICALM	1,82	1,69
ABCA7	9,84	12,71
MS4A1	1,63	1,74
CR1	8,69	5,65
BIN1	-10,06	-7,24
MMP9	-2,6	-4,27
APP	-1,7	-1,78
CD2AP	1,73	1,61
SORL1	1,85	3,7

■; mRNA seviyesinde meydana gelen artma, ■; mRNA seviyesinde meydana gelen azalma.

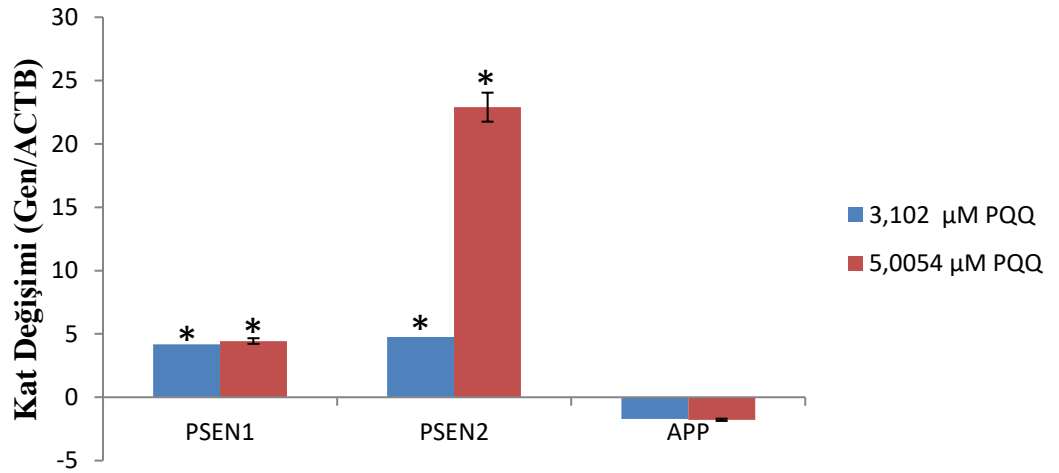
Çalışmamızda Alzheimer ile ilişkili genler olarak PSEN1, PSEN2, APOE, CLU, PICALM, ABCA7, MS4A1, CR1, BIN1, MMP9, APP, CD2AP ve SORL1 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimlerine bakıldı. PQQ bileşiginde bu bağlamda PSEN1 ve PSEN2 mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,102 μ M doz uygulamasında sırayla 4,18 kat ve 4,77 kat anlamlı artma görüldü. Ayrıca yine aynı genlerin ekspresyon düzeylerinde 5,0054 μ M doz uygulamasında sırayla 4,44 kat ve 22,9 kat artma meydana geldi. Benzer şekilde CLU, ABCA7 ve CR1 genlerinin mRNA düzeylerinde 3,102 μ M doz uygulamasında sırasıyla 3,97 kat, 9,84 kat ve 8,69 kat anlamlı artma görüldü. Ayrıca aynı genlerin ekspresyon düzeylerinde 5,0054 μ M doz uygulamasında sırayla 5,68 kat, 12,71 kat ve 5,65 kat artış görüldü. Bunun yanında BIN1 ve MMP9 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinde 3,102 μ M doz uygulamasında sırasıyla 10,06 kat ve 2,6 kat azalma ile 5,0054 μ M doz uygulamasında sırayla 7,24 kat ve 4,27 kat azalış görüldü. Elde edilen sonuçlar PQQ bileşiginin anti-Alzheimer etkisini destekler niteliktedir. AH üzerine bu genler üzerinde yapılmış PQQ ile ilgili herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışma ile ilk veriler elde edilmiştir.

PQQ'nun bu çalışma ile SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında hücresel düzeyde etkilerini *in vitro* olarak hücre kültürü ortamında potansiyel anti-alzheimer etkisi, bundan sonraki detaylı çalışmalarda kullanılıp kullanılmayacağını ve etki

mekanizmasının ortaya çıkarılması amaçlanmış olup bu kapsamda da hücre canlılığına etkisi için Alzheimer ile ilişkili genlerin ifadelerindeki değişimi belirlemek için Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. PQQ ticari olarak satın alınmış ve çalışmalarda direkt olarak PQQ'nun SH-SY5Y hücreleri üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Literatürde PQQ'nun Alzheimer üzerinde etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmadığından bulgularımızın kıyaslanabileceği literatür bilgisi bulunmamaktadır. Fakat diğer SH-SY5Y hücrelerindeki etki mekanizmaları ayrıca değerlendirilmiştir.

PSEN1 ve PSEN2 γ sekretaz bileşeni olup A β kesiminden sorumlu olmaktadır (Şekil 5.1). İnsan ve farede yapılan deneylerde, PSEN2 mutasyonlarının A β 40 ve A β 42 oranlarını arttırdığı rapor edilmiştir (Vilatela ve diğ. 2012; Ridge ve diğ. 2014). Bu anlamda bakıldığında PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki artış A β birikimindeki artışı ifade ediyor anlamındadır.

β Amioid Üretimi İlişkili Genler

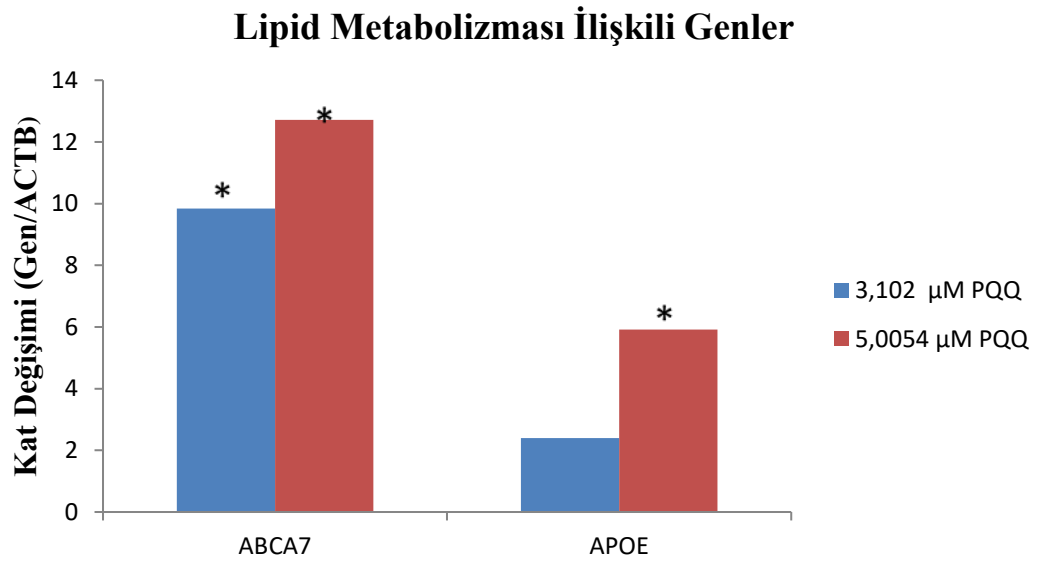


Şekil 5.1: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında β amiloid üretimi ilişkili olan PSEN1, PSEN2 ve APP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Üç çeşit APOE alleli tanımlanmış olup (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) bu alleller üç farklı proteine kodlanmıştır (E2, E3, E4) (Özpak ve diğ. 2017). APOE ϵ 4 allelinden bir kopya bile bulunması geç başlangıçlı Alzheimer (GBAH) riskini katlayarak arttırmaktadır (Alonso ve diğ. 2012; Özpak ve diğ. 2017). APOE ϵ 2 alleli taşıyan bireylerde ise APOE ϵ 4'e göre tam tersine GBAH gelişme riskini azaltmaktadır (Alonso ve diğ. 2012; Özpak ve diğ. 2017). Tek başına hastalığın ortaya çıkmasında

yeterli bir faktör olmayan APOE ϵ allelleri, çeşidi ve miktarı farklı gruplar arasında farklı sonuçlar göstermektedir (Bekris ve diğ. 2010; Özpak ve diğ. 2017). Bu çalışmalar kapsamında APOE genindeki 5,0054 uM PQQ doz değerindeki anlamlı artışın sonucunda APOE ϵ 2 alleli artışı ile anti-Alzheimer etkide görev almış olabileceğini göstermektedir.

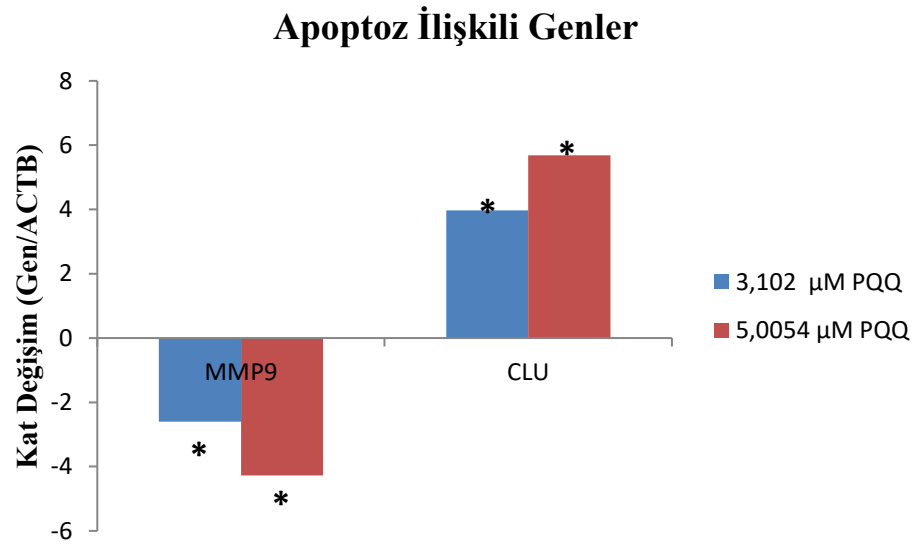
Başka araştırmalara bakıldığında, farklı hücre hatlarında ABCA7'nin baskılanması ile β -sekretaz bölünmesi artarak yüksek A β miktarına sebep olduğundan bahsetmiştik (Satoh ve diğ. 2015). Bunun doğrultusunda yaptığımız deneyde ABCA7 geninin mRNA düzeyinde 3,102 μ M doz uygulamasındaki 9,84 kat anlamlı artışının ve 5,0054 uM doz uygulamasındaki 12,71 kat artışının (Şekil 5.2) ABCA7 genini PQQ'nun baskılanmayı engelleyerek A β birikiminin azalmasını sağlamıştır. Sonuç olarak anti-Alzheimer etkisi yaparak hastalığı azaltmaya yönelik etki ettiğini söyleyebiliriz.



Şekil 5.2: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında lipid metabolizması ilişkili olan ABCA7 ve APOE genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) P<0,05 düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

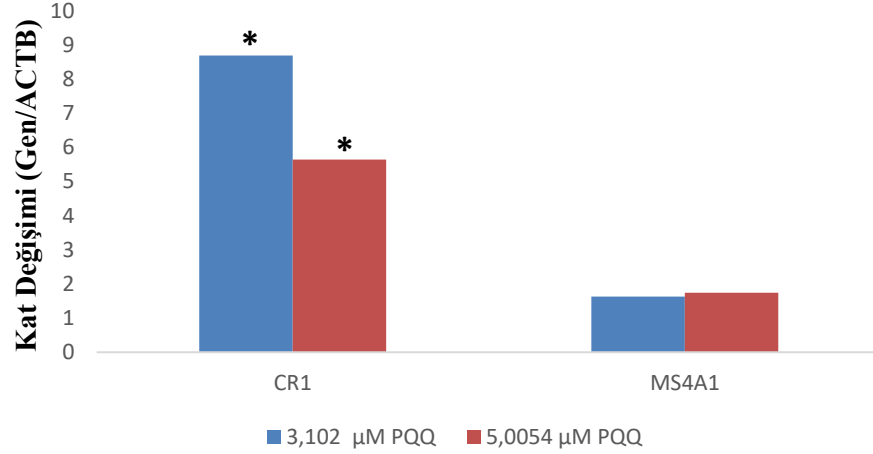
Amiloid plakların yapısında bulunduğu bilinen CLU'nun ekspresyonu AH'de fazladır ve bu proteinin A β temizlenmesinde, A β 42 peptidinin agregasyonunu önlemede ve endositozda etkili olduğu düşünülmektedir (Bettens ve diğ. 2010). Clusterin, hücre yapışmasını ve yayılmasını destekleyen glikoproteine benzer bir şekilde terminal yolu inhibe eden çok işlevli bir plazma proteini olduğu bilinmesine

rağmen çok işlevli birçok yönü olduğu için kesin olarak bir bilgi söylenememektedir (Kew 2014). Buradaki duruma göre CLU'nun iki doz uygulamasında da göstermiş olduğu 3,97 kat ve 5,65 kat anlamlı artışın (Şekil 5.3) sebebinin yayılmayı inhibe etme, endositozu sağlama ve A β birikimini engelleyerek temizlenmesinde etkin rol alarak Alzheimer'ı azaltmada katkı sağlamış olabileceği fikrini desteklemektedir. Bir başka araştırmada ise AH'de CLU'nun mRNA ve protein miktarının arttığı gösterilmiştir (Kyriazis ve diğ. 2008). Bu çalışmaya göre ise tam tersi bulduğumuz bu CLU genindeki artışın AH'nı arttırabileceği ihtimalini de barındırmaktadır. İlerdeki çalışmalar ışığında CLU ile ilgili kesin bilgiler bulunduğu daha net değerlendirilebilecektir. CR1'de CLU'ya benzer şekilde kompleman aracılığı ile A β temizlemesine yardımcı olmaktadır (Bettens ve diğ. 2010). CR1'deki 8,69 kat ve 5,65 kat artmanın (Şekil 5.4) sonucunda A β birikimini yok ederek hastalığın temizlenmesine yardımcı olmuştur.



Şekil 5.3: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında apoptoz ilişkili olan MMP9 ve CLU genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

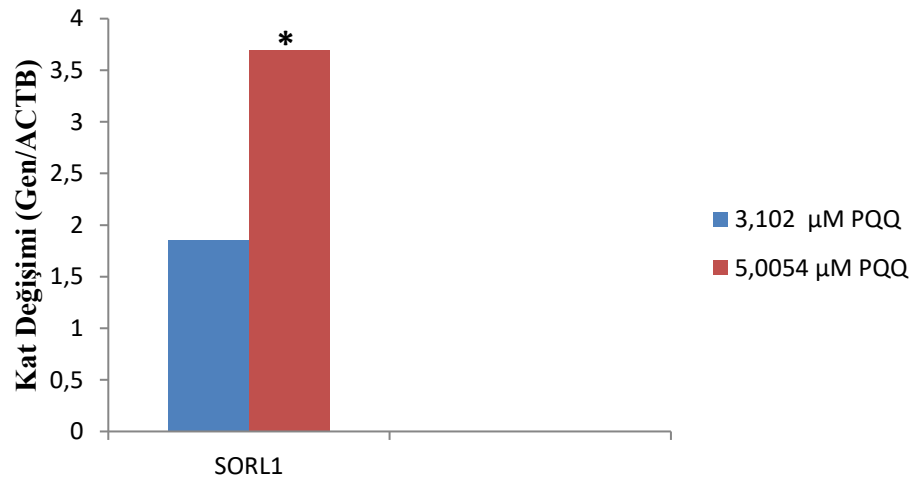
Nöroinflamasyon ve İmmün Yanıt İlişkili Genler



Şekil 5.4: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında nöroinflamasyon ve immün yanıt ilişkili olan CR1 ve MS4A1 genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

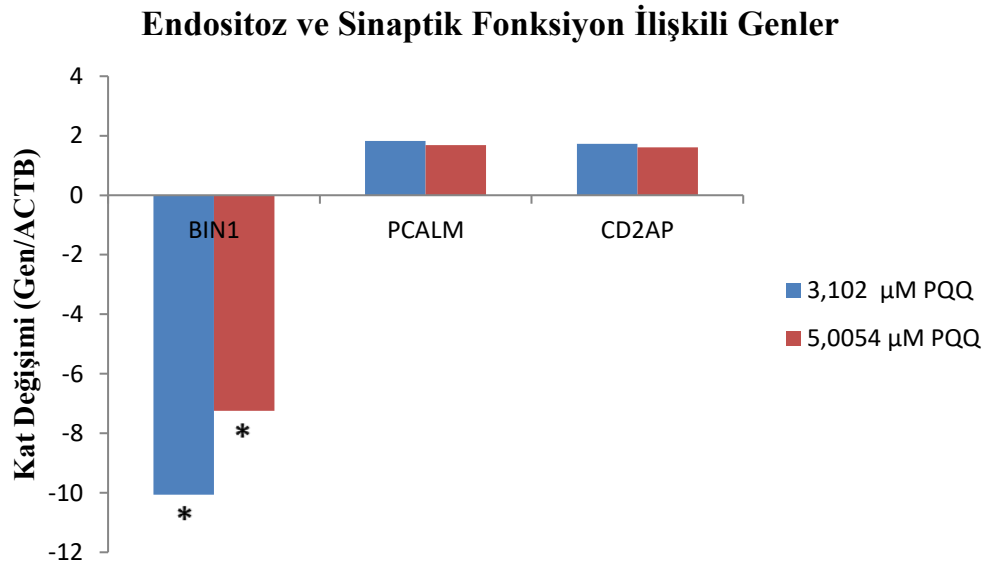
SORL1 geninin AH'de etkin bir rol aldığı bilinmektedir. SORL1'in olmadığı durumlarda, APP'yi β -sekretaz bölünme yoluna yönlendirerek APPs β üretimini arttırdığı bulunmuştur (Rogaeva ve diğ. 2007). Uyguladığımız 5,0054 uM PQQ dozunda SORL1'de meydana gelen mRNA'daki 3,7 kat anlamlı artıştaki değişimin (Şekil 5.5) sonucunda APPs β üretimini azaltarak AH üzerinde olumlu sonuç verdiğini söyleyebiliriz.

Kolesterol Metabolizması İlişkili Genler



Şekil 5.5: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında kolesterol metabolizması ilişkili olan SORL1 geninin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

Genom çapında yapılan çalışmalar, apolipoprotein E'den sonra geç başlangıçlı Alzheimer hastalığında en önemli genetik duyarlılık lokusu olarak köprüleyici entegratör 1 (BIN1) geni tanımlanmaktadır (Tan ve diğ. 2014). Potansiyel etkileşim olarak Tau patolojisinin yanı sıra BIN1 ayrıca endositoz, bağışıklık, iltihaplanma, kalsiyum geçişleri ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabilmektedir (Elliott ve diğerleri 2000; Carter 2011; Tjondrokoesoemo ve diğerleri 2011; Hong ve diğerleri 2012; Chapuis ve diğerleri 2013;). AH hastalarının periferik kanında BIN1 ekspresyonunun arttığını gözlemlemiştir ve plazma BIN1, AH teşhisi için potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilirliği bulunmuştur (Sun ve diğerleri 2013). Yapılan araştırmalar, 3,102 uM ve 5,0054 uM PQQ dozlarındaki mRNA'da sırasıyla meydana gelen 10,06 kat ve 7,24 kat BIN1'deki azalmanın (Şekil 5.6) AH'nı geriletliğini göstermektedir. Nöroinflamasyonda tanımlanan önemli bir MMP olan MMP9; nöronlar, astrositler ve mikroglia tarafından eksprese edilir ve diğer faktörlerin yanı sıra sitokinler tarafından düzenlenmektedir (Candelario-Jalil ve diğ. 2009; McGeer and McGeer 2010).



Şekil 5.6: PQQ bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattında endositoz ve sinaptik fonksiyon ilişkili olan BIN1, PCALM, CD2AP genlerinin mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar β -aktin ile normalize edildi. Kontrol değeri 1 olarak alındı. (*) $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren örneklerdir.

MMP9'un *in vitro* olarak β -amiloid peptit fibrillerini ve ayrıca kompakt plakları parçaladığı ve böylece amiloid yüklü beyinlerden plakların temizlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Yan ve diğ. 2006). Bu veriler doğrultusunda

MMP9'daki azalmanın sonucunda β -amiloidin artmasına sebep olarak AH'yi desteklemektedir. Bir başka çalışmada ise bunun antitezi olarak 5xFAD farelerinde MMP9 geninin silinmesi, özellikle erkek farelerde sosyallik ve sosyal tanıma belleğini iyileştirmenin yanı sıra, açık alan testi kullanılarak kaygılarını da azalttığı ve AH'deki belirli davranış değişikliklerine aracılık edebileceğini gösterdi (Ringland ve diğ. 2021). Yeni veriler doğrultusunda MMP9 genindeki 2,7 kat ve 4,27 kat azalmanın, AH'nin azalmasına yardımcı olacağı bulunmuş olmaktadır.

AH'nda, çeşitli araştırmaların karşılaştırmalı sonuçlarının değerlendirildiği verileri de dikkate aldığımızda diğer benzer bazı genlerin ifadelerindeki değişimlerin bizim bulgularımızla benzerlik içerdiği görülmektedir. Bu durum PQQ'nun benzer genlerin ifadeleri üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir. PQQ ve nöroblastom üzerinde yapılan bu detaylı araştırma ile genel olarak PQQ bileşiğinin anti-Alzheimer etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

6. KAYNAKLAR

Agus, D. B., Cordon-Cardo, C., Fox, W., Drobnyak, M., Koff, A., Golde, D. W., Scher, H. I., "Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence", *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 1869-1876, (1999).

Akagawa, M., Nakano, M., Ikemoto, K., "Recent progress in studies on the health benefits of pyrroloquinoline quinone", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80, 13-22, (2015).

Alexandrova, M. and Bochev, P., "Oxidative stress during the chronic phase after stroke", *Free Radic. Biol. Med.*, 39, 297-316, (2005).

Alfimova, M., Kondratyev, N., Golov, A., Golimbet, V., "Relationship between Alzheimer's disease-associated SNPs within the CLU gene, local DNA methylation and episodic verbal memory in healthy and schizophrenia subjects", *Psychiatry Res.*, 272, 380-386, (2019).

Almkvist, O., Rodriguez Vieitez, E., Thordardottir, S., Nordberg, A., Viitanen, M., Lannfelt, L., Graff, C., "Longitudinal cognitive decline in autosomal-dominant Alzheimer's disease varies with mutations in APP and PSEN1 genes", *Neurobiol. Aging*, 82, 40-47, (2019).

Alonso Vilatela M. E., López López M., Yescas Gómez P., "Genetics of Alzheimer's disease". *Arch. Med. Res.*, 43, 622-31, (2012).

Alzheimer, A., "über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde", *Allg. Z. Psychiat.*, 64, 146-148, (1907).

American Cancer Society, "Cancer facts & figures 2019 [online]", (22 Aralık 2020), <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>, (2019).

Ameyama, M., Hayashi, M., Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O., "Microbial production of pyrroloquinoline quinone", *Agric. Biol. Chem.*, 48, 561-565, (1984).

Andrew, R. J., Rossi, P. D., Nguyen, P., Kowalski, H. R., et al., "Reduction of the expression of the late-onset Alzheimer's disease (AD) risk-factor BIN1

does not affect amyloid pathology in an AD mouse model”, *JBC*, 294 (12), 4477-4487, (2019).

Anthony, C. and Williams, P., “The structure and mechanism of methanol dehydrogenase”, *BBA*, 1647, 18, (2003).

Arnhold J., *Cell and Tissue Destruction; Mechanisms, Protection, Disorders*, United States: Academic Press, 249-287, (2020).

Bachurin, S. O., “Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer’s disease”, *Med. Res. Rev.*, 23, 48–88, (2003).

Bales, K. R., Verina, T., Dodel, R. C., et al., “Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition”, *Nat. Genet.*, 17, 263–264, (1997).

Bansal, A. ve Singh, T. R., *Epigenome wide DNA methylation and histone modification of Alzheimer's disease*, United States: Academic Press, 9, 131-148, (2019).

Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Andrisano, V., “beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies”, *Biochem. Pharmacol.*, 65: 407–416, (2003).

Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., Lipka, A. S., “The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction”, *Science*, 217, 408-414, (1982).

Bartus, R. T., “On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis”, *Exp. Neurol.*, 163, 495-529, (2000).

Bastianetto, S., Ramassamy, C., Doré, S., Christen, Y., Poirier, J., Quirion, R., “The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid”, *Eur. J. Neurosci.*, 12, 1882-1890, (2000).

Baxter, B. T., MacTaggart, J., *Pathogenesis of Aortic Aneurysms*, Mosby: University of Adelaide Press, 465-472, (2009).

Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., Tsuang, D. W., “Genetics of Alzheimer disease”, *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.*, 23, 213-227, (2010).

- Bettens, K., Slegers, K., Van Broeckhoven, C., “Current status on Alzheimer’s disease molecular genetics: from past, to present, to future.” *Hum Mol Genet*, 19, R4- R11, (2010).
- Bishop, A., Gallop, P. M., Karnovsky, M. L., “Pyrroloquinoline quinone: a novel vitamin”, *Nutr. Rev.*, 56, 287- 293, (1998).
- Bonelli, M., Monica, S. L., Fumarola, C., Alfieri, R., “Multiple effects of CDK4/6 inhibition in cancer: From cell cycle arrest to immunomodulation”, *Biochem. Pharmacol.*, 170, 113676, (2019).
- Bowen, D. M., Benton, J. S., Spillane, J. A., Smith, C. C. T., Allen, S. J., “Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients”, *J. Neurol. Sci.*, 57, 191-202, (1982).
- Braak, H. and Braak, E., “Neuropathological staging of Alzheimer-related changes”, *Acta Neuropathol.*, 82, 239-259, (1991).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A., “Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA. Cancer J. Clin.*, 68, 394-424, (2018).
- Bringas, S., Salomón, S., Duque, R., Lage, C., Montaña, J. L., “Alzheimer’s disease stage identification using deep learning models”, *J. Biomed. Inform.*, 109 (103514), (2020).
- Brosch J. R., Farlow M. R., Risacher S. L., Apostolova L.G., “Tau imaging in Alzheimer’s disease diagnosis and clinical trials”, *Neurother.*, 14, 62–68, (2017).
- Bruijn, R. F., Ikram, M. A., “Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer’s disease”, *BMC Med.*, 12, 130, (2014).
- Candelario-Jalil, E., Yang, Y., Rosenberg, G. A., “Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia”, *Neuroscience*, 158, 983–994, (2009).
- Castro, A., and Martinez, A., “Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: Implications in treatment of Alzheimer’s disease”, *Mini Rev. Med. Chem.*, 1, 267–272, (2001).

Catz, S. D., Johnson, J. L., “BCL-2 in prostate cancer: a minireview”, *Apoptosis*, 8, 29-37, (2003).

Cerejeira, J., Lagarto, L., Mukaetova-Ladinska, E., “Behavioral and psychological symptoms of dementia”, *Front. Neurol.*, 3, 73, (2012).

Chang, C. Y., Liang, H. J., Chow, S. Y., Chen, S. M., Liu, D. Z., “Hemorheological mechanisms in Alzheimer's disease”, *Microcirculation*, 14 (6), 627-634, (2007).

Chipi, E., Salvadori, N., Farotti, L., Parnetti, L., “Biomarker-based signature of alzheimer's disease in pre-MCI individuals”, *Brain Sci*, 9, 1-22, (2019).

Colombres, M., Sagal, J. P., Inestrosa, N. C., “An overview of the current and novel drugs for Alzheimer's disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds”, *Curr. Pharm. Des.*, 10, 3121–3130, (2004).

Craig, L. A., Hong, N. S., McDonald, R. J., “Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease”, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35 (6), 1397-1409, (2011).

Davis, K. L., Mohs, R. C., Marin, D., Purohit, D.P., Perl, D. P., Lantz, M., Austin, G., Haroutunian, V., “Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer's disease”, *J. Am. Med. Assoc.*, 281, 1401-1406, (1999).

Davoli, T., Xu, A. W., Mengwasser, K. E., Sack, L. M., Yoon, J. C., Park, P. J., Elledge, S. J., “Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome”, *Cell*, 155, 948-962, (2013).

Dekosky, S. T. and Scheff S. W., “Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity”, *Ann. Neurol.*, 27 (5), 457-464, (1990).

Dekosky, S. T., Ikonovic, M. D., Styren, S. D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennett, D. A., Cochran, E. J., Kordower, J. H., Mufson, E. J., “Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment”, *Ann. Neurol.*, 51, 145-155, (2002).

Diebner, H. H., Kirberg, J., Roeder, I., “An evolutionary stability perspective on oncogenesis control in mature T-cell populations”, *J. Theor. Biol.*, 389, 88-100, (2021).

Dohmae, S. A., Ikeda, Y., Matsuo, M., Hayashi, M., Okuhira, K., Ueda, K., Yokoyama, S., “Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein”, *J. Biol. Chem.*, 279 (1), 604-611, (2004).

Donovan, N., Mecca, A., Smith, G., Gatchel, J., “Molecular imaging in alzheimer's disease: linking pathologic, neurotransmitter, synaptic and clinical findings relevant to geriatric psychiatry”, *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, 28 (4), S4, (2020).

Dore, S., Kar, S., Quirion, R., “Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 4772-4777, (1997).

Dubois, B., Villain, N., Frisoni, G. B., Rabinovici G. D., Sabbagh, M., Cappa, S., BEJANIN, A., Bombois, S., et al., “Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group”, *Lancet Neurol.*, 20 (6), 484-496, (2021).

Duine, J. A., “Cofactor diversity in biological oxidations: Implications and applications”, *Chem. Rec.*, 1: 74, (2001).

ECHA, Maddelerin ve Karışımların Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Ambalajlanması (CLP) hakkında 1272/2008 Sayılı Tüzük (EC) Rehberi Avrupa Kimyasallar Ajansı CLP Kriterlerinin Uygulanmasına İlişkin Kılavuz [online], (2021), <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/12/20131211M1-1.htm>, (2013).

Eftekhazadeh, B., Daigle, G., Kapinos, L. E., Coyne, A., Schiantarelli, J., Carlomagno, Y., Cook, C., Miller, S. J., Dujardin, S., Amaral, A. S., Grima, J. C., Bennett, R. E., Tepper, K., Ture, M. D., Vanderburg, C. R., Corjuc, B. T., Vos S. L. D., Gonzalez, J. A., Hyman, B. T., “Tau protein disrupts nucleocytoplasmic transport in Alzheimer’s disease”, *Neuron*, 99 (5), 925-940, (2018).

Felton, L. M. and Anthony, C., “Biochemistry: role of PQQ as a mammalian enzyme cofactor”, *Nature*, 433 (E10), E11–12, (2005).

Fernandez, J., Rojo, L. E., Kuljis, R. O., et al., “The damage signal hypothesis of AD”, *J. Alzheimers Dis.*, 14, 329-333, (2008).

Figuroa, D. M., et al., *Apolipoproteins as context-dependent regulators of lung inflammation in Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease*, United States: Academic Press, (2019).

Flerin, N. C., Cappelleso, F., Pretto, S., Mazzone, M., “Metabolic traits ruling the specificity of the immune response in different cancer types”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 68, 124-143, (2020).

Forrest, H. S., Salisbury, S. A., Sperl, G., “Crystallization of a derivative of a new coenzyme, methoxatin”, *Biochim. Biophys. Acta.*, 676 (2), 226-229, (1981).

Foundation, S. C., Skin Cancer Facts and Statistics [Online], (2021), <https://www.skincancer.org/skin-cancerinformation/skin-cancer-facts/general>, (2017).

Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., Stratton, M. R., “A census of human cancer genes”, *Nat. Rev. Cancer.*, 4, 177- 183, (2004).

Gains, J. E., et al., “Immunohistochemical evaluation of molecular radiotherapy target expression in neuroblastoma tissue”, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*, 45 (3), 402-411 (2018).

Gak, E. R., Gorshkova, N. V., Tokmakova, I. L. V., “Method for producing, pyrroloquinoline quinone using a bacterium of the genus methylobacterium or, hyphomicrobium”, *US Patents*, US9062334B2, (2015).

Gale, S. A., Acar, D., Daffner, K. R., “Dementia”, *Am. J. Med.*, 131(10):1161-1169, doi: 10.1016/j.amjmed.2018.01.022, (2018).

Gallyas, F., “Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development”, *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.*, 19 (1), 1-8, (1971).

Galvao, J. F., Grokoski, K. C., Silva, B. B., Lamers, M. L., Siqueira, I. R. “The amyloid precursor protein (APP) processing as a biological link between Alzheimer's disease and cancer”, *Ageing Res. Rev.*, 49, 83-91, (2019).

Geldmacher, D. S. and Whitehouse, P. J., “Differential diagnosis of Alzheimer's disease”, *Neurology*, 48, 2S-9S, (1997).

Gerdes, S., Newrzela, S., Glauche, I., Laer, D., Hansmann, M. L., Roeder I., “Mathematical modeling of oncogenesis control in mature T-cell populations”, *Front. Immunol.*, 4 (380), (2013).

Gietzelt, M., Wolf, K. H., Kohlmann, M., Marschollek, M., Haux, R., “Measurement of accelerometry-based gait parameters in people with and without dementia in the field”, *Methods Inf. Med.*, 52 (4), 319-325, (2013).

Gilmore, M. L., Erickson, J. D., Varoqui, H., Hersh, L. B., Bennett, D. A., Cochran, E.J., Mufson, E.J., Levey, A.I., “Preservation of nucleus basalis neurons containing choline acetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter in the elderly with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease”, *J. Comp. Neurol.*, 411 (4), 693-704, (1999).

Goate, A., Chartier Harlin M. C., Mullan, M., et al., “Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer disease”, *Nature*, 349, 704–706 (1991).

Goodwin, P. M., Anthony, C., “The Biochemistry, physiology and genetics of pqq and pqq-containing enzymes”, *Microb. Physiol.*, 40: 1, (1998).

Grant, S., Roberts, J. D., “The use of cyclin-dependent kinase inhibitors alone or in combination with established cytotoxic drugs in cancer chemotherapy”, *Drug Resist. Updat.*, 6, 15-26, (2003).

Guerreiro, R. J., Baquero, M., Blesa, R., Boada, M., et al., “Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP”, *Neurobiol. Aging*, 31, 725-731, (2010).

Hanahan, D. and Weinberg, R. A., “The hallmarks of cancer”, *Cell*, 100, 57-70. (2000).

Hansson, C. A., Frykman, S., et al., “Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria”, *J. Biol. Chem.*, 279 (49), 51654-60, doi: 10.1074/jbc.M404500200, (2004).

Hardy, J. A. and Higgins, G. A., “Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis”, *Science*, 256, 184-185, (1992).

Hauge, J. G., “Glucose dehydrogenase of bacterium anitratum: an enzyme with a novel prosthetic group”, *J. Biol. Chem.*, 239: 3630, (1964).

Hausdorff, J. M., Hillel, I., Shustak, S., Din, S. D., Bekkers, E. M. J., Pelosin, E., Nieuwhof, F., Rochester, L., Mirelman, A., “Everyday stepping quantity

and quality among older adult fallers with and without mild cognitive impairment: Initial evidence for new motor markers of cognitive deficits?”, *J. Gerontol. Ser. A, Biol. Sci. Med. Sci.*, 73 (8), 1078-1082, (2018).

He, K., Nukada, H., Urakami, T., Murphy, M., “Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems”, *Biochem. Pharmacol.*, 65, 67-74, (2003).

Henstridge, C. M., Hyman, B. T., Spires-Jones, T. L., “Beyond the neuron–cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis”, *Nat. Rev. Neurosci.*, 20, 94–108, (2019).

Henstridge, C. M., Pickett, E., Spires-Jones, T. L., “Synaptic pathology: a shared mechanism in neurological disease”, *Ageing Res. Rev.*, 28, 72-84, (2016).

Hochegger, H., Takeda, S., Hunt, T., “Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 910-916 (2008).

Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., et al., “Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease”, *Nat. Genet.*, 43, 429 – 435, (2011).

Hooli, B. and Tanzi, R. E., *The Genetic Basis of Alzheimer's Disease in Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry*, United States: Academic Press, (2016).

Höglund, K., Schussler, N., Kvartsberg, H., Smailovic, U., Brinkmalm, G., Liman, V., et al., “Cerebrospinal fluid neurogranin in an inducible mouse model of neurodegeneration: A translatable marker of synaptic degeneration”, *Neurobiology of Disease*, 134 (104645), (2020).

Hunter, S. and Brayne, C., “Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease”, *Mol. Psychiatry*, 23, 81-93, (2018).

Hyman, B. T., “Amyloid dependent and amyloid independent stages of alzheimer disease”, *Arch Neurol.*, 68 (8), 1062-1064, doi:10.1001/archneurol.2011.70, (2011).

IGAP (International Genomics Of Alzheimer's Disease Consortium), “Convergent genetic and expression data implicate immunity in Alzheimer's disease”, *Alzheimers Dement.*, 11, 658-671, (2015).

Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., et al., “NIA-AA research framework: toward a biological definition of alzheimer's disease”, *Alzheimers Dement*, 14, 535-562, (2018).

Jain, S., Chandr, V., Jain, P. K., Pathak, K., Pathak, D., Vaidy, A., “Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents”, *Arab. J. Chem.*, 12 (8), 4920-4946, (2019).

Jayadev, S., Leverenz, J. B., Steinbart, E., Stahl, J., Klunk, W., Yu, C. E., Bird, T. D., “Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2”, *Brain*, 133, 1143-1154, (2010).

Jensen, F. E., Gardner, G. J., Williams, A. P., Gallop, P. M., Aizenman, E., Rosenberg, P. A., “The putative essential nutrient pyrroloquinoline quinone is neuroprotective in a rodent model of hypoxic/ischemic brain injury”, *Neuroscience*, 62: 399- 406, (1994).

Jia, L., Ye, J., Haiyan, L. V., Wang, W., Zhou, C., Zhang, X., Xu, J., Wang, L., Jia, J., “Genetic association between polymorphisms of Pen2 gene and late onset Alzheimer's disease in the North Chinese population”, *Brain Res.*, 1141, 10-14, (2007).

Johnson, D. R., Guerin, J. B., Giannini, C., Morris, J. M., Eckel, L. J., Kaufmann, T. J., “2016 updates to the WHO brain tumor classification system: what the radiologist needs to know”, *Radiographics*, 37 (7), 2164-2180, (2017).

Johnson, M. E. and Bobrovskaya, L., “An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions”, *Neurotoxicology*, 46:101-116, (2015).

Jonscher, K. R. and Rucker, R. B., “Pyrroloquinoline quinone: its profile, effects on the liver and implications for health and disease prevention, dietary interventions in liver disease foods”, *Nutr. Diet. Suppl.*, 157- 173, (2019).

Kaddurah-Daouk, R., Zhu, H., Sharma, S., Bogdanov, M., Rozen, S. G., Matson, W., Oki, N. O., Motsinger Reif, A. A., Churchill, E., Lei, Z., et al., “Pharmacometabolomics research network alterations in metabolic pathways and networks in alzheimer's disease”, *Transl. Psychiatry*, 3, 244, (2013).

Kasahara, T. and Kato, T., “Nutritional biochemistry: a new redox-cofactor vitamin for mammals”, *Nature*, 422, 832, (2003).

Kato, C., Kawai, E., Shimizu, N., Mikekado, T., Kimura, F., Miyazawa, T., “Determination of pyrroloquinoline quinone by enzymatic and LCMS/ MS methods to clarify its levels in foods”, *Plos One*, 13 (12), e0209700, (2018).

Kew, R. R., *Pathobiology of human disease, a dynamic encyclopedia of disease mechanisms Referans in Biomedical Sciences*, Amsterdam: Academic Press, 231-243, (2014).

Killick, R., Hughes, T. R., Morgan, B. P., Lovestone, S., “Deletion of crry, the murine ortholog of the sporadic alzheimer's disease risk gene CR1, impacts tau phosphorylation and brain CFH”, *Neurosci. Lett.*, 533, 96-99, (2013).

Kim, S. H., Bae, H. C., Park, E. J., Lee, C. R., Kim, B. J., Lee, S., Park, H. H., Kim, S. J., So, I., Kim, T. W., Jeon, J. H., “Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 407 (1), 129-134, (2011).

Korolev, K. S., Xavier, J. B., Gore, J., “Turning ecology and evolution against cancer”, *Nat. Rev. Cancer*, 14, 371-380, (2014).

Kosano, H., Setogawa, T., Kobayashi, K., Nishigori, H., “Pyrroloquinoline quinone (pqq) inhibits the expression of tyrosinase mRNA by alpha-melanocyte stimulating hormone in murine B16 melanoma cells”, *Life Sci.*, 56, 1707- 1713, (1995).

Kulaksızoğlu, I. B., Türkiye'deki Alzheimer Hastaları [online], (2020), <https://www.haberler.com/turkiye-de-yaklasik-600-bin-alzheimer-hastasi-10048170-haberi/>, İhlas Haber Ajansı, (2017).

Kumazawa, T., Seno, H., Suzuki, O., “Failure to verify high levels of pyrroloquinoline quinone in eggs and skim milk”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193: 1- 5, (1993).

Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O., “Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods”, *Biochem. J.*, 307: 331- 333, (1995).

Kumazawa, T., Seno, H., Urakami, T., Matsumoto, T., Suzuki, O., “Trace levels of pyrroloquinoline quinone in human and rat samples detected by gas chromatography/mass spectrometry”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1156: 62- 66, (1992).

Ladner, C. J. and Lee, J. M., “Pharmacological drug treatment of alzheimer disease: the cholinergic hypothesis revisited”, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57, 719–731, (1998).

Li, Z., Zhu, H., Zhang, L., Qin, C., “The intestinal microbiome and Alzheimer's disease: a review”, *Animal Model. Exp. Med.*, 1 (3), 180-188, (2018).

Lu, J., Chen, S., Shen, M., He, Q., Zhang, Y., Shi, Y., Ding, F., Zhang, Q., “Mitochondrial regulation by pyrroloquinoline quinone prevents rotenone-induced neurotoxicity in parkinson’s disease models”, *Neurosci. Lett.*, 687, 104-110, (2018).

Luo, J., Li, S., Qin, X., Song, L., et al., “Meta-analysis of the association between CR1 polymorphisms and risk of late-onset alzheimer's disease”, *Neurosci. Lett.*, 578, 165-170, (2014).

Lukong, K. E., “Understanding breast cancer—the long and winding road”, *BBA Clinical*, 64-77, (2017).

Luo, J., Solimini, N. L., Elledge, S. J., “Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction”, *Cell*, 136, 823-837, (2009).

Maccioni R. B., Farías, G., Morales, I., Navarrete L., “The revitalized tau hypothesis on alzheimer's disease”, *Arch. Med. Res.*, 41 (3), 226-231, (2010).

Maccioni, R. B., Rojo, L. E., Fernandez, J. A., et al. “The role of neuroimmunomodulation in alzheimer's disease”, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1153, 240-246, (2009).

Dehkordi, M. S., Arnold, M., Nho, K., Ahmad, S., Jia, W., Xie, G., Louie, G., Kueider Paisley A., Moseley, M. A, Thompson, J. W., et al., “Alzheimer’s disease neuroimaging initiative and the alzheimer disease metabolomics consortium, altered bile acid profile associates with cognitive impairment in alzheimer’s disease-an emerging role for gut microbiome”, *Alzheimers Dement.*, 15, 76-92, (2019).

Mahmoudvand, H., Sheibani, V., Shojaee, S., Mirbadie, S. R., Keshavarz, H., Esmaeelpour, K., et al., “Toxoplasma gondii infection potentiates cognitive impairments of alzheimer's disease in the BALB/c mice”, *J. Parasitol.*, 102 (6), 629-635, (2016).

Malemud, C. J., *Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in health and disease: target tissues and therapy in Progress in Molecular Biology and Translational Science*, United States: Academic Press, 148, 305-325, (2017).

Malumbres, M. and Barbacid, M., “Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm”, *Nat. Rev. Cancer*, 9, 153-166, (2009).

Marian, O. C., Don, A. S., et al., *Altered lipid metabolic homeostasis in the pathogenesis of Alzheimer's disease in Lipid Signaling and Metabolism*, United States: Academic Press, (2020).

Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R., Cohn, S. L., “Neuroblastoma”, *Lancet*, 369, 2106-2120, (2007).

Masliah, E., et al. “Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of alzheimer's disease”, *Neurology*, 56 (1), 127-129, (2001).

Mathis, C. A., Wang, Y, Holt D. P., Huang G. F., Debnath M. L., Klunk W. E., “Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents”, *J. Med. Chem.*, 46, 2740-2754, (2003).

Matsutani, M. and Yakushi, T., “Pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases of acetic acid bacteria”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 9531- 9540, (2018).

Mattiola, I., Mantovani, A., Locati, M., “The tetraspan MS4A family in homeostasis, immunity, and disease”, *Trends Immunol.*, 42(9),764-781, (2021).

Mawanda, F., Wallace, R., “Can infections cause alzheimer's disease”, *Epidemiol. Rev.*, 35 (1), 161-180, (2013).

Mayo Clinic Staff, Hafif Bilişsel Bozukluk Nedir [online], (2020), <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/mild-cognitive-impairment/symptoms-causes/syc-20354578>, (2012).

Mcgeer E. G. and McGeer P. L., “Neuroinflammation in alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy”, *J. Alzheimer's Dis.*, 19 (1), 355-361, (2010).

Meulenber, J. J. M., Sellink, E., Loenen, W. A. M., Riegman, N. H., Van Kleef, M., Postma, P. W., “Cloning of klebsiella pneumoniae pqq genes and

pqq biosynthesis in *Escherichia coli*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 71 (3), 337-343, (1990).

Misra, H. S., Rajpurohit, Y. S., Khairnar, N. P., “Pyrroloquinoline quinone and its versatile roles in biological processes”, *J. Biosci.*, 37, 313- 325, (2012).

Mistridis, P., Krumm, S., Monsch, A. U., Berres, M., Taylor, K. I., “The 12 years preceding mild cognitive impairment due to alzheimer’s disease: the temporal emergence of cognitive decline”, *J. Alzheimer’s Dis.*, 48 (4), 1095-1107, (2015).

Mitchell, A. E., Jones, A. D., Mercer, R. S., Rucker, R. B., “Characterization of pyrroloquinoline quinone amino acid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk”, *Anal. Biochem.*, 269, 317-325, (1999).

Murase, K., Hattori, A., Kohno, M., Hayashi, K., “Stimulation of nerve growth factor synthesis/secretion in mouse astroglial cells by coenzymes”, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 30, 615- 621, (1993).

Neuro-Oncology Study Group, *Book of Teaching Neuro-Oncology*, Jakarta: Indonesian Society of Neurologist, (2019).

Newrzela, S., Al-Ghaili N., Heinrich, T., Petkova, M., Hartmann, S., Rengstl, B., Kumar, A., Jack, H. M., Gerdes, S., Roeder, I., Hansmann, M. L., Laer D., “T-cell receptor diversity prevents T-cell lymphoma development”, *Leukemia*, 26, 2499-2507, (2012).

NRC, *Science and Decisions Advancing Risk Assessment NRC National*, Washington DC: Academies Press, (2009).

Nussbaum, R. L., Ellis, C. E., “Alzheimer's disease and parkinson's disease”, *N. Engl. J. Med.*, 348 (14), 1356-1364, (2003).

O'brien, R. J. and Wong P. C., “Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease”, *Annu. Rev. Neurosci.*, 34, 185-204, (2011).

Onyango, I. G. and Stokin, G. B., *Chapter 15-Targeting Alzheimer's disease neuronal mitochondria as a therapeutic approach Clinical Bioenergetics*, Brno: Academic Press, 343-364, (2021).

Orhan, G., Orhan, I., Sener, B., “Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease”, *Lett. Drug. Des. Disc.*, 3 (4), 268-274, (2006).

Ostrom, Q. T., et al., “Cbtrus statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2012-2016”, *Neuro Oncol.*, 21, V1-V100, (2019).

Özpak, L., Pazarbaşı, A., Keser, N., “alzheimer hastalığının genetiği ve epigenetiği”, *Arch. Med. Res.*, 26 (1), 34-49, (2017).

Paolo, G. D., Kim, T. W., “Linking lipids to alzheimer’s disease: cholesterol and beyond”, *Nat. Rev. Neurosci.*, 12, 284-296, (2011).

Papavramidou, N., Papavramidis, T. and Demetriou, T., “Ancient greek and greco-roman methods in modern surgical treatment of cancer”, *Ann. Surg. Oncol.*, 17, 665-667, (2010).

Park, K., SooPark, H., Nagappan, A., EunHong, G., HoonLee, D., Kang, S. R., Kim, J. A., Zhang, J., Kim, E. H., Lee, W. S., Shin, S. C., Hah, Y. S., Kim, G. S., “Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean citrus aurantium l. in non-small-cell lung cancer cells”, *Food Chem.*, 135 (4), 15, 2728-2735, (2012).

Peng, Z., Luo, Y., Xiao, Z. Y., “Angiopoietin-1 accelerates alzheimer's disease via foxa2/pen2/app pathway in app/ps1 mice”, *Life Sci.*, 246 (117430), (2020).

Perk, J., Backer, G., Gohlke, H., et al., “European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). the fifth joint task force of the european society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts”, *Eur. Heart. J.*, 33, 1635-1701, (2012).

Perry, E. K., Tomlinson, B. E., Blessed, G., Perry, R. H., Cross, A. J., Crow T. T., “Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of alzheimer type”, *Lancet*, 2, 8238-8249, (1981).

Philip, P.A., “Locally advanced pancreatic cancer: where should we go from here”, *J. Clin. Oncol.*, 29 (31), 4066-4068, (2011).

Pohl, A., Devaux, P. F., Herrmann A., “Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1733, 29-52, (2005).

Qin J., Wu, M., Yu, S., Gao, X., Zhang, J., Dong, X., Ji, J., Zhang, Y., Zhou, L., Zhang, Q., Ding, F., “Pyrroloquinoline quinone-conferred neuroprotection in rotenone models of parkinson's disease”, *Toxicol. Lett.*, 238 (3), 70-82, (2015).

Quail, D. and Joyce J., “Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis”, *Nat. Med.*, 19, 1423-1437, (2013).

Querfurth, H. W. and LaFerla, F.M., “Mechanisms of disease”, *N. Engl. J. Med.*, 362, 329-344, (2010).

Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., Matrisian, L. M., “Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States”, *Canc. Res.*, 74 (11), 2913-2921, (2014).

Raza, A., *The First Cell: and the human costs of pursuing cancer to the last 1290 Avenue of the Americas*, New York: Hachette Book Group, (2019).

Reames, B. N., Blair, A. B., Krell, R. W., “Management of locally advanced pancreatic cancer: results of an international survey of current practice”, *Ann. Surg.*, (in press), (2019).

Rees, T., Hammond, P. I., Soreq, H., Younkin, S., Brimijoin, S., “Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex”, *Neurobiol. Aging*, 24, 777–787, (2003).

Reitz, C., Jun, G., Naj, A., Rajbhandary, R., et al., “ATP bağlayıcı kaset taşıyıcısındaki (ABCA7), apolipoprotein e ε4'teki varyantlar ve Afrikalı Amerikalılarda geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı riski”, *JAMA*, 309, 1483-1492, (2013).

Ridge P. G., Ebbert M. T., Kauwe, J. S., “Genetics of alzheimer's disease” *Biomed. Res. Int.*, 2014, 254954, (2014).

Ries, L. A. G., Smith, M. A., Gurney, J. G., Linet, M., Tamra, T., Young, J. L., et al., *Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program, Maryland: NCI, 1975-1995*, (1999).

Ringland, C., Schweig, J. E., Eisenbaum, M., et al., “MMP9 modulation improves specific neurobehavioral deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease”, *BMC Neurosci*, doi.org/10.1186/s12868-021-00643-2, (2021).

Rita, A. D. and Strappazzon, F., *Neuroblastoma and oxidative stress: from pathogenesis to in vitro models of neurodegeneration in Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases*, United States: Academic Press (2020).

Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., et al., “Familial Alzheimer’s disease in kindreds with missense mutations in a novel gene on chromosome 1 related to the Alzheimer’s disease type 3 gene”, *Nature*, 376, 775–778, (1995).

Rogaeva, E., Kawarai, T., George Hyslop, P., et al., “Genetic complexity of Alzheimer’s disease: successes and challenges”, *J. Alzheimer’s Dis.*, 9 (3), 381-7, (2006).

Rogaeva, E., Meng, Y., Lee J. H., Gu, Y., et al., “The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease”, *Nat. Genet.*, 39, 168–177, (2007).

Rojo, L., Fernandez, J., Maccioni, A. A., et al., “Neuro-inflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer’s disease”, *Arch. Med. Res.*, 39, 1-16, (2008).

Rosenberg, P. B., Nowrangi, M. A., Lyketsos, C. G., “Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer’s disease: what might be associated brain circuits”, *Mol. Aspects Med.*, 43, 25-37, (2015).

Rucker, R., Chohanadisai, W., Nakano, M., “Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone”, *Altern. Med. Rev.*, 14, 268- 277, (2009).

Rucker, R., Storms, D., Sheets, A., Tchapanian, E., Fascetti, A., “Biochemistry: is pyrroloquinoline quinone a vitamin”, *Nature*, 433 (E10-E11), E11–12, (2005).

Ruohan, W., Yun-Wu, Z., Ping, S., Runzhong, L., Xian, Z., Xue, Z., Kun, X., Jiahui, X., Huaxi, X., Zhuohua, Z., “Transcriptional regulation of PEN-2, a key component of the gamma-secretase complex by CREB”, *Mol. Cell. Biol.*, 26, 1347-1354, (2006).

Ryan, N. S., et al., “Clinical phenotype and genetic associations in autosomal dominant familial Alzheimer’s disease: a case series”, *Lancet Neurol.*, 15, 1326-1335, (2016).

Ryman, D. C., Acosta-Baena, N., Aisen, P. S., Bird, T., Danek, A., Fox, N. C., Goate, A., Frommelt, P., Ghetti, B., Langbaum, J. B., Lopera F., et al., “Symptom onset in autosomal dominant alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis”, *Neurology*, 83, 253-260, (2014).

Salisbury, S. A., Forrest, H. S., Cruse, W. B. T., Kennard, O., “A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases”, *Nature*, 280, 843, (1979).

Sanchez, R. M., Wang, C., Gardner, G., Orlando, L., Tauck, D. L., Rosenberg, P. A., Aizenman, E., Jensen, F. E., “Novel role for the NMDA receptor redox modulatory site in the pathophysiology of seizures”, *J. Neurosci.*, 20, 2409-2417, (2000).

Saranya, C., Geetha Priya, J., Jayalakshmi, P., Harini Pavithra, E., “Brain tumor identification using deep learning”, *Mater. Today: Proc.*, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.555>, (2021).

Satoh, K., Dohmae S. A., Yokoyama, S., George Hyslop, P., Fraser, P. E., “ATP-binding cassette transporter a7 (abca7) loss of function alters alzheimer amyloid processing”, *J. Biol. Chem.*, 290 (40), 24152-24165, (2015).

Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., et al., “Association of apolipoprotein E allele e4 with the late-onset familial and sporadic Alzheimer disease”, *Neurology*, 43, 1467–1472, (1993).

Scheff, S. W., et al., “Synaptic alterations in CA1 in mild alzheimer disease and mild cognitive impairment”, *Neurology*, 68 (18), 1501-1508, (2007).

Scheltens, P., Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C., Cummings, J., Flier, J. M., “Alzheimer's disease”, *Lancet*, 397 (10284), 1577-1590, (2021).

Schliebs, R., Arendt, T., “The cholinergic system in aging and neuronal degeneration”, *Behav. Brain. Res.*, 221 (2), 555-563, (2011).

Schmidt, F., Knobbe, C. B., Frank, B., Wolburg, H., Weller, M.,” The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines”, *Onco. Repo.*, 1061, (2008).

Segeren, H. A., Rijnberk, L. M., Moreno, E., Riemers, F. M., Liere, E. A., Yuan, R., Wubbolts, R., Bruin, A., Westendorp, B., 'Excessive e2f transcription in single cancer cells precludes transient cell-cycle exit after dna damage', *Cell Reports*, 33 (9), 1, 108449 (2020).

Selkoe, D. J., "Deciphering the genesis and fate of amyloid betaprotein yields novel therapies for alzheimer disease", *J. Clin. Investig.*, 110, 1375–1381, (2002).

Selkoe, D. J., "Toward a comprehensive theory for alzheimer's disease, hypothesis: alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 924, 17-25, (2000).

Senderowicz, A. M., "Targeting cell cycle an apoptosis for the treatment of human malignancies", *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 670-678, (2004).

Shah, M. A. and Schwartz, G. K., "The relevance of drug sequence in combination chemotherapy", *Drug Resist. Updat.*, 3, 335-356, (2000).

Shepherd, C., McCann, H., Halliday, G. M., "Variations in the neuropathology of familial alzheimer's disease", *Acta Neuropathol.*, 118, 37-52, (2009).

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., et al., "Cloning of a gene bearing missense mutations in early onset familial alzheimer's disease", *Nature*, 375, 754–760, (1995).

Shi, L., Jiang, L., Zhang, X., Yang, G., Zhang, C., Yao, X., Wu, X., Fu, M., Sun, X., Liu, X., "Pyrroloquinoline quinone protected autophagy-dependent apoptosis induced by mono(2-ethylhexyl) phthalate in ins-1 cells", *Hum. Exp. Toxicol.*, 39 (2), 194- 211, (2019).

Shima, K., Kuhlenbäumer, G., Rupp, J., "Chlamydia pneumoniae infection and Alzheimer's disease: a connection to remember", *Med. Microbiol. Immunol.*, 199 (4), 283-289, (2010).

Simchowicz, T., *Histologische studien uber die senile Demenz. Histologische und histopathologisch arbeiten uber die grosshirnrinde: mit besonderer berucksichtigung der pathologischen*, Jena: Anatomie der Geisteskrankheiten, 9 (7), 267-444, (1911).

Souza, L. C., Jesse, C. R., Fabbro, L. D., Gomes, M. G., Gomes, N. S., Borges Filho, C., et al., "Aging exacerbates cognitive and anxiety alterations

induced by an intracerebroventricular injection of amyloid- β 1–42 peptide in mice”, *Mol. Cell. Neurosci.*, 88, 93-106, (2018).

Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., et al., “Toward defining the preclinical stages of alzheimer's disease: recommendations from the national institute on aging–alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease”, *Alzheimers. Dement.*, 7, 280-292, (2011).

Steliarova-Foucher, E., et al., “International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study”, *Lancet. Oncol.*, 18 (6), 719-731, (2017).

Stenman, J., et al., “Improved local control by extensive surgery in high-risk neuroblastoma may be dependent on adjuvant radiotherapy”, *J. Clin. Oncol.*, 35 (17), 1965-1966, (2017).

Strooper, B. D. and Karran, E., “The cellular phase of alzheimer's disease”, *Cell*, 164 (4), 603-615, (2016).

Strooper, B. D., “Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex”, *Neuron*, 38 (1), 9-12, (2003).

Sun, L., Tan, M. S., Hu, N., Yu, J. T., Tan, L., “Exploring the value of plasma BIN1 as a potential biomarker for alzheimer's disease”, *J. Alzheimer's Dis.*, 37, 291-295, (2013).

Suzuki, M., et al., “Treatment and outcome of adult-onset neuroblastoma”, *Int. J. Cancer.*, 143 (5), 1249-1258, (2018).

Suzuki, O. and Kumazawa, T. “Gas chromatographic mass spectrometric analysis of pyrroloquinoline quinone”, *Meth. Enzymol.*, 280, 150- 158, (1997).

Tan, M. S., Yu, J. T., Jiang, T., Zhu, X. C., Guan, H.S., Tan, L., “Genetic variation in bin1 gene and alzheimer's disease risk in han Chinese individuals”, *Neurobiol. Aging*, 35 (7), 1781.e1-1781.e8, (2014).

Thordardottir, S., Kinhult Stahlbom, A., Almkvist, O., Thonberg, H., Eriksson, M., Zetterberg, H., Blennow, K., Graff, C., “The effects of different familial Alzheimer's disease mutations on APP processing in vivo”, *Alzheimers Res. Ther.*, 9, 9, (2017).

Treusch, S., Hamamichi, S., “Functional Links Between A β Toxicity, Endocytic Trafficking, and Alzheimer’s Disease Risk Factors in Yeast”, *Science*, 334 (6060): 1241-1245, (2011).

Tsuchida, T., Yasuyama, T., Higuchi, K., Watanabe, A., Urakami, T., Akaike, T., Sato, K., Maeda, H., “The protective effect of pyrroloquinoline quinone and its derivatives against carbon tetrachloride-induced liver injury of rats”, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8, 342- 347, (1993).

Urakami, T., Tanaka, A., Yamaguchi, K., Tsuji, T., Niki, E., “Synthesis of esters of coenzyme PQQ and IPQ, and stimulation of nerve growth factor production”, *Biofactors*, 5: 139- 146, (1995).

Urakami, T., Yoshida, C., Akaike, T., Maeda, H., Nishigori, H., Niki, E., “Synthesis of monoesters of pyrroloquinoline quinone and imidazopyrroloquinoline, and radical scavenging activities using electron spin resonance in vitro and pharmacological activity in vivo”, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 43: 19- 33, (1997).

Urakami, T., Yashima, K., Kobayashi, H., Yoshida, A., Ito-Yoshida, C., “Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3970-3976, (1992).

Veer, B., Geetanjali, Singh, R., *Chapter 6-Natural products as anti-Alzheimer's drugs*, Amsterdam: Elsevier, 66, 157-174, (2020).

Vermunt, L., Sikkesa, S. A. M., Hout, A., Handels, R., Bos, I., et al., “Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype”, *Alzheimers Dement.*, 15 (7), 888-898, (2019).

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., Goggins, M., “Pancreatic cancer”, *Lancet*, 378 (9791), 607-620, (2011).

Vogel, J. W., Vachon Presseau E., Pichet Binette, A., Tam, A., Orban, P., Joie R. L., Savard, M., Picard, C., Poirier, J., Bellec, P., et al., “Alzheimer’s disease neuroimaging initiative and the prevent-ad research group brain properties predict proximity to symptom onset in sporadic alzheimer’s disease”, *Brain*, 141, 1871-1883, (2018).

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz L. A., Kinzler, K. W., “Cancer genome landscapes”, *Science*, 339, 1546-1558, (2013).

Wang, N., Lan, D., Giannone, G. M., et al., “ATP-binding cassette transporter a7 (abca7) binds apolipoprotein a-1 and mediates cellular phospholipid but not cholesterol efflux”, *J. Biol. Chem.*, 278 (44), 42906-42912, (2003).

Wang, X., Wang, J., Liu, D., Zhang, W., “Establishment of the screening method and isolation of PQQ producing strains”, *Acta Microbiol. Sin.*, 47, 982-986, (2007).

Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., ve diğ. “Cancer genome atlas research network the cancer genome atlas pan-cancer analysis project”, *Nat. Genet.*, 45 (10), 1113-1120, (2013).

Weller, R. O., Boche, D., et al., “Amyloid: Vascular and Parenchymal”, in Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, United States: Elsevier (2017).

Wen, L., Lu, X., Wang, R., Jin, X., Hu, L., You, C., “Pyrroloquinoline quinone induces chondrosarcoma cell apoptosis by increasing intracellular reactive oxygen species”, *Mol. Med. Rep.*, 17, 7184-7190, (2018).

White, M. R., Kandel, R., Tripathi, S., Condon, D., Qi, L., Taubenberger, J., et al., “Alzheimer's associated β -amyloid protein inhibits influenza A virus and modulates viral interactions with phagocytes”, *PloS One*, 9 (7), (2014).

WHO IPCS, “WHO Human Health Risk Assessment Toolkit: Chemical Hazards”, *IPCS Harmonisation Project Document*, Switzerland: WHO Press, vol. 8, (2010).

Xiao, Z., Wang, J., Chen, W., Wang, P., Zeng, H., Chen, W., “Association studies of several cholesterol-related genes (abca1, cetp and lipc) with serum lipids and risk of alzheimer's disease”, *Lipids Health Dis.*, 11, 163, (2012).

Xue-Shan, Z., Juan, P., Qi, W., Zhong, R., Li-hong, P., Zhi-han, T., Zhi-sheng J., Gui-xue, W., Lu-shan, L., “Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease”, *Clinica. Chimica. Acta*”, 456, 107-114, (2016).

Yamaguchi, M. and Murata, T., “Extracellular regucalcin suppresses colony formation and growth independent of tumor suppressor p53 in human mammary epithelial cells”, *Tissue Cell*, 67, 101447, (2020).

Yan, P., Hu, X., Song, H., Yin, K., Bateman, R. J., Cirrito, J. R., Xiao, Q., Hsu, F. F., TURK, J. W., Xu, J., Hsu, C. Y., Holtzman, D. M., Lee, J. M.,

“Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ”, *J Biol Chem*, 281, 24566–24574, (2006).

Zhang, J. J., Zhang, R. F., Meng, X. K., “Protective Effect Of pyrroloquinoline quinone against A β -induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells”, *Neuroscience Letters*, 464 (3), 165-169, (2009).

Zhang, P., Xu, Y. P., Wang, L. H., Li, X. Y., Jin, L. J., “Neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone on methylmercury-induced cytotoxicity in pc12 cells”, *J. Biotechnol.*, 136: S81, (2008).

Zhang, Q., Chen, S., Yu, S., Qin, J., Zhang, J., Cheng, Q., Ke, K., Ding, F. “Neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone against rotenone injury in primary cultured midbrain neurons and in a rat model of parkinson's disease”, *Neuropharmacology*, 108, 238-251, (2016).

Zhang, Q., Shen, M., Ding, M., Shen, D., Ding, F. “The neuroprotective action of pyrroloquinoline quinone against glutamate-induced apoptosis in hippocampal neurons is mediated through the activation of PI3K/Akt pathway”, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 252 (1), 1, 62-72, (2011).

Zhang, S., Li, Q., Zhang, F., Xu, H., Gao, H., “Computed Tomography Image Analysis and Clinical Diagnosis Value of Nasal Olfactory Neuroblastoma”, *World Neurosurg.*, (In Press), (2020).

Zhang, Y. and Rosenberg, P., “The essential nutrient pyrroloquinoline quinone may act as a neuroprotectant by suppressing peroxynitrite formation”, *Eur. J. Neurosci.*, 16: 1015-1024, (2002).

Zhang, Y., Feustel, P., Kimelberg, H., “Neuroprotection by pyrroloquinoline quinone (PQQ) in reversible middle cerebral artery occlusion in the adult rat”, *Brain Res.*, 1094: 200-206, (2006).

Zhaoa, H., Yi, B., Liang, Z., Phillips, C. N., Lin, H. Y., Riker, A. I., Xi, Y., ‘Cyclin G2, a novel target of sulindac to inhibit cell cycle progression in colorectal cancer’, *Genes Diseases*, (In Press), Corrected Proof., (2020).

Zhi-Yong W., Jian-Gang, L., Yun, W., Mei-Xia, L., Qi, W., Lin, L., Hui-Min, Y., Hao, L. I., “X. Hospital; Huannaoyicong formula (还脑益聪方) regulates γ -secretase activity through APH-1 and PEN-2 gene regulation pathways in hippocampus of APP/PS1 double transgenic mice”, *Chin. J. Integr. Med.*, 23, 270-278, (2017).

Zou, W., Xiong, X., Zhang, J., Zhang, K., Zhao, X., Zhao, C.,
“Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of
methylovorus sp. MP688, a high level pyrroloquinolone quinone producer”,
Biosystems, 172, 37- 42, (2018).

EKLER

7. EKLER