



**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLEUROPEİNİN SH-SY5Y NÖROBLASTOM HÜCRE
HATTINDA ÇEŞİTLİ HÜCRESEL YOLAKLARDAKİ
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Araştırma Görevlisi
Mücahit SEÇME**

**Aralık 2014
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OLEUROPEİNİN SH-SY5Y NÖROBLASTOM HÜCRE HATTINDA
ÇEŞİTLİ HÜCRESEL YOLAKLARDAKİ ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Araştırma Görevlisi
Mücahit SEÇME**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
İkinci Danışman: Doç. Dr. Yavuz DODURGA**

Denizli, 2014

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Mücahit SEÇME tarafından Prof. Dr. Gülseren BAĞCI yönetiminde hazırlanan "**Oleuropeinin SH-SY5Y Nöroblastom Hücre Hattında Çeşitli Hücreyel Yolaklardaki Etkisinin Belirlenmesi**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ercan KURAR
(Necmettin Erbakan Üniversitesi)



Danışman: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. Hakan AKÇA
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
(Pamukkale Üniversitesi)



Üye: Doç. Dr. Yavuz DODURGA
(Pamukkale Üniversitesi)



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
19.11.15 tarih ve 2-4 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Melek BOR-KÜÇÜKATAY
Müdür



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

Öğrenci Adı Soyadı: Mücahit SEÇME

İmza:

ÖZET

OLEUROPEİNİN SH-SY5Y NÖROBLASTOM HÜCRE HATTINDA ÇEŞİTLİ HÜCRESEL YOLAKLARDAKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

SEÇME, Mücahit

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

İkinci Danışman: Doç. Dr. Yavuz DODORGA

Aralık 2014, 109 sayfa

Nöroblastom beyin dokusu içerisinde hızlı bir şekilde yayılabilen ve çocukluk çağının en sık rastlanılan tümör çeşitlerinden birisidir. Kanser hastalığı her geçen gün gelişen teşhis ve tedavi yöntemlerine rağmen hala ölüm nedeni olarak dünyada ilk sıralardadır. Günümüzde kanser tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, immünoterapi, gen terapisi, radyoterapi ve bunlara destek amaçlı çeşitli alternatif tedaviler kullanılmaktadır. Son yıllarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılacak doğal ve biyolojik etkili bileşiklerin keşfedilmesi en popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu bileşiklerden biri olan polifenoller grubuna ait, zeytin yaprağının etken maddesi oleuropeinin antioksidan, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, anti-hipertansif, anti-kanserojen etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı oleuropeinin SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında hücre proliferasyonuna, invazyonuna ve koloni oluşumu, hücre döngüsü ve apoptoz mekanizmaları üzerine etkisi ve terapötik etkinliğinin *in vitro* olarak belirlenmesidir. Oleuropeinin hücre canlılığı üzerine etkisi XTT yöntemi ile belirlenmiş ve IC₅₀ dozu 48. saate 350 µM olarak bulunmuştur. Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre oleuropein hücre döngüsü ile ilişkili genlerden SiklinD1, SiklinD2, SiklinD3, CDK4 ve CDK6 down regülasyonuna ve p53 ve p21'in up regülasyonuna sebep olarak hücre döngüsünü durdurduğu ve ayrıca Bcl-2'nin inhibisyonu, Bax, kaspaz-9 ve kaspaz 3'ün aktive edilmesiyle apoptotik yolağı indüklediği tespit edilmiştir. Western blot yöntemi ile Bcl-2 ve SiklinD1'in protein düzeyinde değişimleri gösterilmiştir. TUNEL testi ile doz grubu hücrelerde apoptotik hücre oranının %36.4±3.27'ye çıktığı bulunmuştur. Ayrıca Matrigel-İnvazyon testi ile oleuropeinin SH-SY5Y hücrelerinde invazyonu azalttığı belirlenmiştir. Koloni formasyon testi ile de koloni oluşumunu %53.6±4.71 oranında baskıladığı tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları ile oleuropeinin, nöroblastom tedavisinde potansiyel bir anti-kanserojen ajan olabileceği gösterilmiş ve daha detaylı çalışmalar için ilk veriler ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, Oleuropein, Hücre Döngüsü, Apoptoz

Bu çalışma, ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT**DETERMINATION OF THE EFFECTS OF OLEUROPEIN ON VARIOUS CELLULAR PATHWAYS IN THE SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELL LINE**

SEÇME, Mücahit

M.Sc., Thesis in Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yavuz DODORGA

December 2014, 109 pages

Neuroblastoma is one of the most common type of pediatric tumors that can spread quickly in brain tissues. Despite developed diagnosis and treatment methods, cancer is still one of the leading causes of death in the world. Many types of treatments such as surgery, chemotherapy, immunotherapy, gene therapy, radiotherapy are used for cancer therapy and various alternative treatments are also used for supporting these treatments. On the other hand, discovering the naturally and biologically effective compounds in treatments of various cancer types becomes one of the most popular research topics. Oleuropein which is active compound of olive leaves, belongs to polyphenols group and it is one of these compounds that has antioxidant, anti-microbial, anti-inflammatory, anti-hypertensive and anti-carcinogenic effects. The aim of the study is to determine the therapeutic effects of oleuropein on cell proliferation, invasion, colony formation, cell cycle and apoptotic mechanisms in SH-SY5Y neuroblastoma cell line under *in vitro* conditions. The effect of oleuropein on cell viability was determined by XTT method and dose of IC₅₀ were detected as 350 µM in 48th hours. According to the Real-time PCR results, it is determined that oleuropein causes cell cycle arrest by downregulating of CylinD1, CylinD2, CyclinD3, CDK4, CDK6 and upregulating of p53 and p21 gene expressions. Oleuropein also induces apoptosis by inhibiting of Bcl-2 and activating of Bax, caspase-9 and caspase-3 gene expressions. Protein expression of CylinD1 and Bcl-2 were determined by western blot analysis. According to TUNEL results, apoptotic cell ratio was found %36,4±3,27 in oleuropein dose group. Matrigel-invasion chamber tests showed that oleuropein decreases invasion in SH-SY5Y cells. Colony formation test results demonstrate that colony numbers in dose group were suppressed in a ratio of %53,6±4,71. All these results demonstrated that oleuropein can be a therapeutic agent in the treatment of neuroblastoma and hereby the first data have been put forward for more detailed studies.

Key words: Neuroblastoma, Oleuropein, Cell cycle, Apoptosis

This study was supported by Instructor Training Program (ÖYP)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya,

Tez süreci boyunca bilgilerini benden esirgemeyen ve çalışmanın yapılmasında her türlü alt yapıyı sağlayan değerli yardımcı danışman hocam Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya,

Labaratuar çalışmaları sırasında deneylerin her aşamasında yardımcı olan arkadaşım Araş. Gör. Canan EROĞLU' na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini benden esirgemeyen başta ana bilimdalı başkanımız Prof. Dr. Hakan AKÇA olmak üzere tüm hocalarıma,

Ve hayatımın her evresinde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir şekilde benden esirgemeyen aileme sonsuz minnetlerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	4
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	5
2.1. Kanser	5
2.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	7
2.1.2. Kanserin Genetik Temeli	9
2.1.3. Hücre Döngüsü	10
2.1.4. Apoptoz	15
2.1.5. Beyin Tümörleri	18
2.1.6. Nöroblastom	20
2.1.7. Kanser Tedavisi	27
2.2. Oleuropein	30
2.2.1. Oleuropeinin Biyolojik, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	30
2.2.2. Oleuropein ve Sağlık Üzerine Etkileri	34
2.3. Hipotez	39
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	40
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Kitler	40
3.2. Hücre Kültürü	41
3.3. XTT Testi (Hücre Canlılığı Testi)	44
3.4. TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini	46
3.5. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu	47
3.6. cDNA Sentezi	48
3.7. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR)	48
3.8. Western Blotlama	58

3.8.1. Total Protein İzolasyonu ve Lowry Yöntemi ile Protein Tayini.....	58
3.8.3. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi	60
3.9. İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi	62
3.10. Koloni Oluşum Testi	63
3.11. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	63
4. BULGULAR	64
4.1. XTT Sonuçları	64
4.2. RNA izolasyonu	65
4.3. Gerçek-Zamanlı PZR (Real-Time PCR)	66
4.4. TUNEL Testi ile Apoptoz Sonuçları	70
4.5. Western Blot Sonuçları	72
4.6. Matrigel- İnvazyon Testi Sonuçları	73
4.7. Koloni Oluşum Sonuçları.....	75
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇ	90
7. KAYNAKLAR.....	92
8. ÖZGEÇMİŞ	107
9. EKLER	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Hücrelerde kansere neden olan değişiklikler	7
Şekil 2.2 Hücre döngüsünün şematik görünümü	11
Şekil 2.3 p53 geni etki mekanizması	13
Şekil 2.4 Apoptotik süreçteki mekanizmalar	18
Şekil 2.5 Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması	21
Şekil 2.6 Siklin D1, CDK4 ve CDK6'nın nöroblastom ve diğer kanser türlerinde ekspresyon düzeyleri	25
Şekil 2.7 Oleuropein'in kimyasal yapısı	31
Şekil 2.8 a) Oleuropeinin β -glikozidaz enzimi ile hidrolizi b) vücuda alındıktan sonraki metabolizması	33
Şekil 3.1 Çalışmamızda kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüsü	42
Şekil 3.2 a) Çalışmada kullanılan oleuropein; b) Toz görünümü	44
Şekil 3.3 XTT'nin formazona dönüşümü	44
Şekil 3.4 DNA kırıklarının Tunel ile İşaretlenmesi	46
Şekil 3.5 Lowry protein standart eğrisi	59
Şekil 4.1 Kit içeriğindeki reaktif madde olan tetrazolium tozunun canlı hücrelerde turuncu renkli formazaon bileşenlerine indirgenmesi	64
Şekil 4.2 Oleuropein'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisi a) 24. saat b) 48.saat c) 72.saat sütun grafiği gösterimi d) Çizgi grafiği ile gösterimi ...	65
Şekil 4.3 Hücre döngüsü ile ilişkili genlerin Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre ekspresyon değişimi	68
Şekil 4.4 Hücre döngüsü ile ilişkili genlerin Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre ekspresyon değişimi	68
Şekil 4.5 Apoptoz ile ilişkili Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre ekspresyon değişimi	69
Şekil 4.6 Apoptoz ile ilişkili Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre ekspresyon değişimi	69
Şekil 4.7 Kontrol ve doz gruplarında sayılan alanlardaki ortalama apoptotik hücre yüzdeleri	71
Şekil 4.8 Kontrol grubuna ait hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst boyaması sonrası 40x (a) ve 20x (b) floresan mikroskop görüntüleri	71
Şekil 4.9 Doz grubuna ait hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst boyaması sonrası floresan mikroskop görüntüleri	72
Şekil 4.10 Kontrol ve doz grubu hücrelerde Bcl-2 ve SiklinD1 proteinlerinin değişimi	74
Şekil 4.11 Kontrol ve doz grubu hücrelerde %invazyon kapasiteleri	74
Şekil 4.12 Kontrol ve doz grubu invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü	74
Şekil 4.13 SH-SY5Y hücreleri kontrol ve doz grubu koloni görüntüsü	75
Şekil 4.14 Kontrol ve doz gruplarındaki ortalama koloni sayıları	75
Şekil 5.1 Oleuropeinin SH-SY5Y hücrelerindeki etki mekanizması	85

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Embriyonel tümörlerin histolojik sınıflandırılması	20
Tablo 2.2 Uluslararası nöroblastoma evreleme sistemi	27
Tablo 2.3 Oleuropeine ait bazı fiziksel ve kimyasal özellikler	31
Tablo 2.4 Oleuropeinin farmakolojik özellikleri ve etki mekanizmaları	34
Tablo 2.5 Oleuropein'in ile ilgili <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> anti-kanserojen çalışmalar	38
Tablo 3.1 Hücre hattının büyümesi için kullanılan besiyeri detayları:	42
Tablo 3.2 cDNA sentez karışımı	48
Tablo 3.3 Gerçek-Zamanlı PZR koşulları	51
Tablo 3.4 Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımı	51
Tablo 3.5 Çalışmada kullanılan hücre döngüsü genlerinin plate düzeni	52
Tablo 3.6 Çalışmada kullanılan apoptoz genlerinin plate düzeni	52
Tablo 3.7 Hücre döngüsü gen tablosu: RT ² Profiler PCR Array (Qiagen)	53
Tablo 3.8 Apoptoz gen tablosu: RT ² Profiler PCR Array (Qiagen)	55
Tablo 3.9 Ayırıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonlarının hazırlanması	60
Tablo 4.1 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri	65
Tablo 4.2 Gerçek Zamanlı PCR sonuçlarına göre kontrol ve doz gruplarında anlamlı düzeyde değişim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler	67
Tablo 4.3 Gerçek Zamanlı PCR sonuçlarına göre kontrol ve doz gruplarında anlamlı düzeyde değişim tespit edilen apoptoz ile ilişkili genler	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CASP1.....	Kaspaz1, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
CASP3.....	Kaspaz3, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
CASP9.....	Kaspaz9, Apoptoz-İlişkili Sistein Peptidaz
CDK4.....	Siklin Bağımlı Kinaz 4
CDK6.....	Siklin Bağımlı Kinaz 6
CDKN1A.....	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A
CDKN1B.....	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B
CDKN2A.....	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
CDKN2B.....	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2B
Cp.....	Geçiş Noktası (crossing point)
DMSO.....	Dimetil sülfoksit
E2F4.....	E2F Transkripsiyon Faktör 4, p107/p130- Bağlayıcı
ERK1/2.....	Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz
FBS.....	Fetal Bovin Serum
GNR.....	Ganglionörom
IC ₅₀	Letal Doz 50
INSS.....	Uluslararası Nöroblastoma Evreleme Sistemi
MKI.....	Mitoz Kayrokinaz İndeksi
MMP.....	Matriks metallo proteinaz
µl.....	Mikrolitre
ml.....	Mililitre
µg.....	Mikrogram
µM.....	Mikromolar
NB.....	Nöroblastom
NFκB.....	Nükleer Faktör Kappa B
OLE.....	Oleuropein
PBS.....	Fosfat Tampon solusyonu
PZR.....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RB.....	Retinoblastom
SDS-PAGE.....	Sodyum Dedosil Sülfat Pliakrilamid Jel Elektroforez
TAT.....	Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi
TNFR.....	Tümör Nekroz Faktör Reseptör
TPOG.....	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu
XTT.....	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
°C.....	Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde artan teşhis ve tedavi yöntemlerine rağmen özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Sık görülmesi ve yüksek oranda ölümlere yol açmasından dolayı önemli bir halk sağlığı sorunu olarak değerlendirilen kanser, hastalıklara bağlı ölümler arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın yayınlamış olduğu 2014 Dünya Kanser Raporu verilerine göre, 2012'de tüm dünya genelinde tahmini olarak 14 milyon olan kanser vakasının, gelecek 20 yıl içinde oldukça yüksek bir artış göstererek 22 milyona ulaşması beklendiği belirtilmektedir. Kansere bağlı ölümlerde de benzer bir şekilde artış gerçekleşeceği, 2012'de 8.2 milyon olan ölüm oranının da 20 yıl içinde yılda 13 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Bernard vd 2014). Dünyada kanserden ölen dört kişiden birinin Amerika Birleşik Devletleri'nde olması nedeniyle Amerika istatistik verileri anlamlı sonuçları ortaya koymaktadır. ABD'de 2013 yılında 1.660.290 yeni kanser teşhisi konulmuş ve bunlardan 580.350'si ölümlerle sonuçlanmıştır (Siegel 2013). Ülkemizde de kanser ile ilişkili istatistik verileri dünya ile paralellik göstermekle birlikte, Türkiye kanser haritası incelendiğinde her yıl yaklaşık 150.000 yeni kanser olgusu teşhis edilmektedir (Web_1).

Kanser kendini göstermesi, gelişimi, ilerlemesi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine göre değişkenlik gösteren karmaşık bir hastalık olmakla birlikte bu heterojenlik hücresel ve moleküler düzeyde de görülmektedir. Kanser, hücrelerin bağımsız (otonom), aşırı ve kontrolsüz çoğalmaları, uzaktaki doku ve organları istila ederek metastazlar oluşturmaları ile karakterize olan metabolik ve davranışsal değişikliklerin olduğu çok basamaklı ve kompleks bir hastalıktır. Genetik, kimyasal ve çevresel koşullar kanserin oluşmasına sebep olabilir (Merlo vd 2006). Çok farklı kanser türleri bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi olan beyin kanseri, özellikle çocuklarda kansere bağlı ölümler arasında başta gelen nedenlerden biri olmakla birlikte beyin tümörlerinin çoğu ölümcül olup, ölümcül olmayanları da beyin fonksiyonlarına zarar vermekte ve günlük yaşamı oldukça olumsuz etkilemektedir (Jemal vd 2005). Bu beyin tümörü çeşitlerinden birisi de nöroblastomdur.

Nöroblastom, çocukluk döneminin sık görülen ekstrakraniyel tümörü olmakla birlikte adrenal medulla veya sempatik ganglionlarda bulunan primordial nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. Tüm çocukluk çağı malignitelerinin %8-10 kadarını oluşturan bir tümördür. Pediatrik kanser tedavisindeki kemoterapi, radyoterapi, kemik iliği transplantasyonu gibi ilerlemelere rağmen yaşama oranı %40'ların altında kalmaktadır (Demirkaya ve Sevinir 2006). Biyolojik ve genetik değişiklikler, tedaviye yanıt ve prognozun önemli göstergesi olup, tanı sırasında tümörün karakterinin belirlenmesinde yardımcıdır. Dolayısıyla nöroblastom, tümör hücresinde yapılan genetik ve biyolojik incelemelerin, hastanın en iyi şekilde yönetilmesi için gerekli bilgileri bize sağlayan bir solid tümör modelidir. Yakın gelecekte hedef, bu bilgiyi hastalara uygulanacak daha etkin ve daha az toksik tedavilere çevirmektir. Ayrıca bu genetik değişiklikler; olguların risk gruplarına ayrılması ve hedeflenmiş tedavilerin planlanması yönünden çok önemlidir. Bu genetik değişiklikler arasında allelik fazlalık/kayıp olması, onkogen aktivasyonu ve tümör supresör genlerin kaybı yanında bazı genlerin ekspresyonlarındaki değişiklik şeklinde olabilir. Nöroblastoma gibi sinir sistemi kökenli tümörlerde gerek cerrahi, gerekse diğer tedavi yaklaşımlarıyla tatmin edici sonuçların alınamaması, bu tümörlerin onkogenezi üzerinde ayrıntılı çalışma ihtiyacı doğurmuştur (Olshan vd 1999, Matthey vd 2012).

Ölüm vakalarının yanı sıra, kanser tedavilerinin gittikçe yükselen maliyeti nedeniyle ülke ekonomileri üzerine de büyük yük oluşturmaktadır. Bu nedenle günümüzde teknolojik gelişmelerle birlikte kanser mekanizmasının aydınlatılması ve daha etkili ve pratik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Hastanın fizyolojisine, tümörün karakterine ve organizmadaki bulunduğu dokuya bağlı olarak, çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan bu yöntemler arasında kemoterapi, radyoterapi, gen tedavisi, immünoterapi ve monoklonal antikor tedavisi gibi yöntemler bulunmaktadır. Teşhis ve tedavideki gelişmelere rağmen hala kanser hastalığında aydınlatılamayan noktalar bulunmaktadır ve kanser ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini korumaktadır. Bütün bu tedavi yöntemlerine ek olarak alternatif ve tamamlayıcı tedavi kapsamında bitkisel ve besinsel destekler; kanser hastalarında immün fonksiyonları güçlendirmede ve tedavi ile ilişkili yan etkileri azaltmada kullanılmaktadır. Besinsel destekler, biyolojik olarak aktif bileşenlerden oluşur ve bu bileşenlerin vücutta istenmeyen durumlara yol açabileceği unutulmamalıdır (Vogelzang vd 2003). Bu nedenle, tedavi amacıyla kullanılan besinsel ürünlerin, konvansiyonel ilaçlarda olduğu gibi kalite, güvenlik ve etkinlik yönünden test edilmeleri ve standardizasyonlarının yapılması gerekmektedir (Simaan 2009). İlaç geliştirme çalışmalarının prelinik aşamasında hücre kültürü yöntemi ile

sitotoksiste çalışmaları ve hayvan deneyleri ile biyolojik sistemlere yönelik özel etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması günümüzde zorunlu hale gelmiştir (Wang vd 2002).

Kemoterapi ve radyasyon ile kanser tedavisinde en önemli noktalardan biri de uygulanan tedavinin kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelere de zarar veriyor olmasıdır. Bununla birlikte tedavi yöntemlerinde hastalar çok ciddi yan etkilere maruz kalabilmektedirler. Bu kapsamda, kemoterapötik ajanların etkisinin ve dozunun azaltılması, insan ve hayvanlarda doz aşımına bağlı yan etki göstermeyecek uygulama ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Son yıllarda bitkisel veya mantar içerikli doğal besinlerin ilaç olarak kullanımının artması fitoterapi, alternatif ve tamamlayıcı terapiye olan ilgiyi arttırmıştır. Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ticari önem kazanmasından dolayı geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı yaygınlaşmaktadır. Dünya marketlerinde bu tip ilaç pazarının 60 milyon dolara, yıllık büyüme hızının %5-15 düzeyine ulaştığı bilinmektedir. ABD'de son 50 yılda halkın doğal içerikli ilaçlara olan ilgisi %34-42 oranında arttığı bildirilmektedir (Roybyrne vd 2005). Bitki ve mantar gibi insanlar tarafından doğal ilaç olarak kullanılan besinler önemli ilaç kaynağıdır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kapsamında Akdeniz diyeti beslenme tarzı, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer çeşitli metabolik hastalıkların önlenmesinde başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Akdeniz diyetinin koruyucu etkisi meyve ve sebze açısından çeşitli ve zengin bir içeriğe sahip olmasından ileri gelmektedir. Akdeniz diyetinin önemli besinlerinden birisi de zeytindir. Günümüzde pek çok araştırmada zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağı gibi ürünler başta olmak üzere bilim insanlarını bu besinlerin potansiyel sağlık etkileri konusunda çalışmalar yürütmektedir (Büyükbacı ve El 2008). Bu kapsamda zeytin yaprağının da Akdeniz ülkelerinde bazı hastalıkların daha az görülme sebeplerine katkı yapan bir faktör olabileceği üzerinde durulmaktadır. Araştırmalar, zeytinyağı kadar, zeytin yaprağı özütlerinden elde edilen bileşenlerin anti-hipertansif, anti-aterojenik, kardiyoprotektif, hipokolesterolemik, hipoglisemik, anti-viral, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, antioksidan ve anti-kanserojen etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Visioli vd 2002, El ve Karakaya 2009, Bouallagui vd 2011). Zeytin ürünlerinin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri yapılarında bulunan çok yönlü biyoaktif bileşenlere dayandırılır. Bu bileşenler polifenoller, tokoferoller, fosfolipitler, karetonoidler, steroller olarak gruplandırılır (Visioli vd 2002). Özellikle zeytinin kansere olan etkisinin

araştırılmaya başladığı son yıllarda, polifenoller içerisinde yer alan oleuropein büyük ilgi görmektedir.

Akdeniz bölgesinde oldukça sık kullanılan bir besin olan zeytin yaprağının etken maddesi olan oleuropeinin, sağlık üzerine etkileri insanlarda umut verici olmasına rağmen, çeşitli hastalıklarda ve özellikle kanser türlerinde tedavide kullanılabilecek en uygun dozun tayin edilmesi gerekmektedir. Çeşitli dozlarda güvenlik profili önce hücre düzeyinde *in vitro* olarak daha sonrada hayvan deneyleriyle organizma düzeyinde incelenerek kliniğe uygun bir şekilde kullanılabilecek farmosötik ajan olarak katkı yapabilecektir. Çeşitli kanser türleri ve hücre hatlarında etkisi ortaya çıkarılmış, biyolojik olarak oldukça etkili, antioksidan içeriği yüksek ve vücuda toksik etkisi olmadığı gösterilmiş olan oleuropeinin, nöroblastom üzerine etkisi tam olarak bilinmemektedir.

1.1. Amaç

Bu kapsamda bu tezin amacı, doz ve etki mekanizması çeşitli kanser hücrelerinde araştırılmış olan zeytin yaprağının majör etken maddesi oleuropeinin, SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında, hücre proliferasyonuna, invazyonuna ve koloni oluşumuna etkisi, hücre siklusu, sağkalımı veya ölümü ile ilişkili hangi mekanizmalarla etki gösterdiği ve bu yolaklardaki gen ve protein düzeyindeki ekspresyon değişimlerini araştırmaktır. Ayrıca bu çalışma sonucunda, oleuropeinin nöroblastoma hücre hattında terapötik etkinliği ve bu etkinliğin altında yatan moleküler mekanizmaları belirlenmeye çalışılmış, daha ileri ve detaylı araştırmalara kaynak ve ön bilgi oluşturulması da amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kanser

Kanser klinik olarak, köken aldığı hücre tipine göre değişik davranışlar sergileyen çok sayıdaki kompleks hastalıkları kapsayan bir olgu olarak tanımlanmakla birlikte, başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımlarına, evrelerine ve tedaviye karşı vermiş oldukları cevaba göre çeşitlilik göstermektedir. Buna rağmen tüm kanser türleri, moleküler seviyede, ortak ve karakteristik özellikler sergilerler. Tüm kanserlerin bu ortak özelliklerinden birincisi, anormal hücre büyümesi ve bölünmesinin gerçekleşmesi ve diğeri de hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılmasını ve istilasını (metastaz) engelleyen normal sınırlamalardaki anormalliklerdir. Bu işlevler, normal hücrelerde zamanında ve yerinde ifade edilen genler tarafından uygun bir şekilde gerçekleştirilirken, kanserli hücrelerde ise farklı bir mekanizma işlemekte, denetlemeyi sağlayan bu genlerde ya mutasyon olmaktadır ya da farklı bir şekilde ifade edilmektedirler (Klug ve Cummings 2002). Dokulardaki normal hücreler, belirli bir süre sonra yıpranmış, tahrip olmuş ve yaşamsal faaliyetlerini yitirmiş olan hücrelerin yerini alarak bölünür, gelişir ve böylece doku bütünlüğü korunurken, kanserli hücreler de ise böyle kontrollü bir şekilde hücre bölünmesinden ve doku bütünlüğünden bahsetmek mümkün değildir (Levin ve Boyle 2008).

Kanser, çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle apoptoz ve hücre bölünmesinde rol oynayan genlerde mutasyon olması sonucu, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde anormal bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Vücutta herhangi bir anormal çoğalma sonucu ortaya çıkabilecek olan kanserin, gerek davranış, gerekse de tedaviye yanıt yönünden farklılık gösteren oldukça çeşitli türleri bulunmaktadır. Kontrolsüz bir şekilde sürekli bölünen ve çoğalan hücreler kümelenerek dokularda tümör oluşumuna sebep olurlar. Oluşan tümörlerin yayılıp yayılmamasına bağlı olarak benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) kanser olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Benign tümörler, çevredeki dokuya veya vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerlerde kalırlarken, malign tümörler ise çevre dokulara veya kan ve lenf sistemi ile vücuttaki diğer bölgelere taşınarak çoğalmasıyla (metastaz) karakterizedirler. Kanseri tehlikeli yapan, yayılma ve metastaz oluşturma durumudur. Benign tümörler genellikle ameliyat ile çıkartılabildikleri halde, malign tümörler ise vücuttaki uzak bölgelere

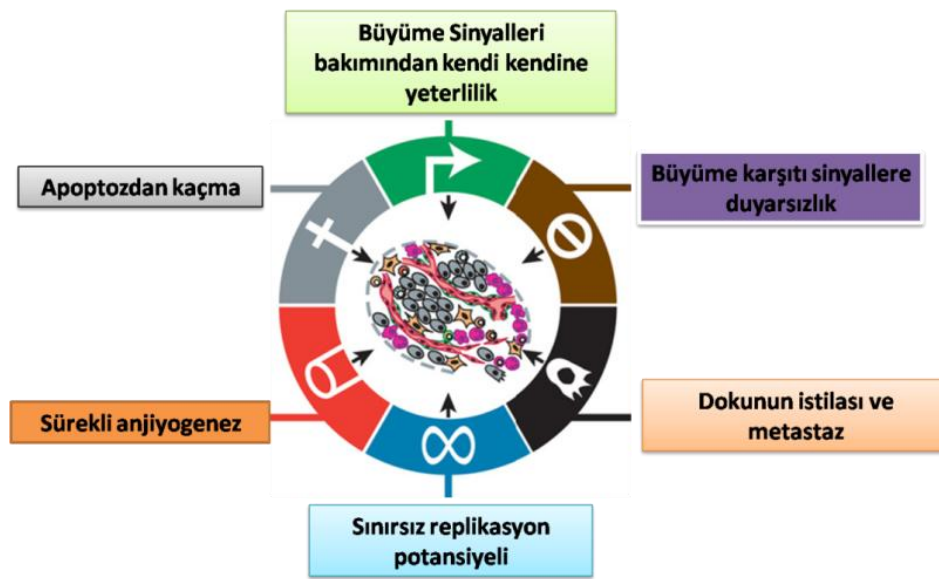
invaze olmalarından dolayı, hastalığın tedavisini sınırlamakta ve ortadan kaldırılmasını güçleştirmektedir (Bertram 2001, Cooper ve Hausman 2004).

Tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılmaktadırlar. Kanselerin çoğu üç ana grupta toplanmaktadır. Bunlar karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalardır. Karsinomlar, epitel hücrelerden kaynaklanan tümörler olmakla birlikte insan kanserlerinin yaklaşık olarak %90'ını oluşturmaktadır. Sarkomlar, insanlarda daha az görülmekte ve kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. Kan veya immün sistem hücrelerinden gelişen lösemi ve lenfomalar ise insan kanserleri arasında yaklaşık %7 gibi bir orana sahiptir (Cooper ve Hausman 2004).

Kanser olgularına sebep olan hücresel mekanizmalardaki düzensizlikler genellikle tümör oluşturan kimyasallar, hormonlar ve bazen virüslerin etkisiyle birlikte yürüyen genetik bozulmaların sonucudur. Kanselerin, %10-15'inin, kalıtsal olduğu, genler yoluyla ebeveynlerden yeni jenerasyonlara aktarıldığı düşünülmektedir. Geriye kalan %85-90'luk kısmına ise mutajenlere maruziyet, hücre DNA'sındaki progresif değişiklikler ve DNA'nın eşlenmesi sırasında meydana gelen hataların oluşması vb. ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan mutasyonlardan biri etki gösterdiği hücrede, bölünme ve büyüme ile hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlamaktadır (Williams 2001, Yokuş ve Çakır 2012). Kansere neden olan mutasyonların çoğu eşey hücrelerinde değil somatik hücrelerde meydana geldiğinden dolayı gelecek nesillere aktarılmaz. Fakat, eşey hücrelerinde taşınan bazı kalıtsal mutasyonlar ileri bir dönemde kansere yakalanma potansiyelini ve olasılığını artırır. Böylece onkogeneze ya da tümör oluşumu (tümörögenез) olarak adlandırılan tümör oluşum süreci genetik ve çevre arasındaki etkileşim sonucu oluşmaktadır (Lodish vd 2008). Multifaktöriyel bir hastalık olan kanserin oluşumunda kalıtsal faktörlerin yanı sıra bakterilerden virüslere, maruz kaldığımız radyasyondan kimyasal ajanlara, diyet ve gıdalardan beslenme alışkanlığımıza, sigara, alkol benzeri gibi çok sayıda toksik maddeler de etki göstermektedir (Williams 2001, Yokuş ve Çakır 2012). Ayrıca, kanserin yaş gruplarına göre dağılımı göz önüne alındığında, görülme sıklığı açısından, ilerleyen yaş gruplarında daha fazla görülmesi, yaşam boyunca oluşan mutasyonların birikimi ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Lüleyap 2008).

2.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Normal hücreden kanser hücresine dönüşüm için geçen süreç karsinogenez olarak adlandırılır ve çok basamaklı bir süreçtir. Karsinogenez süresince altı temel hücresel değişiklik gözlemlenmektedir. Bunlar, büyüme sinyalleri bakımından kendi kendine yeterlilik, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçma, sınırsız replikasyon potansiyeli, dokunun istilası ve metastaz ile sürekli anjiyogenezdir (Şekil 2.1). Bu değişiklikler ile tümörün normal doku içerisinde büyüyüp zararlı kanser fenotipine dönüşmesi gerçekleşir. Bu değişimlerin sadece birkaçı meydana geldiğinde ise daha az zararlı tümörler gelişir (Lodish vd 2008, Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 2.1 Hücrelerde kansere neden olan değişiklikler (Hanahan ve Weinberg 2011)

Biriktirmiş oldukları çok sayıdaki mutasyonlardan da anlaşılacağı üzere, çoğu kanser hücresi bir ya da daha fazla DNA tamir sistemi mekanizmalarından yoksundur. Tamir sistemindeki eksiklik veya bozukluklar sebebiyle direkt hücre çoğalmasını engellenmese de DNA'daki hataların, boşlukların veya kırıkların onarımı tam olarak yapılamadığından, bu tamir yeteneğini kaybetmiş hücreler, hücre bölünmesi ve çoğalmasında kritik roller oynayan genler de dahil olmak üzere pek çok gende mutasyonlar biriktirirler (Lodish vd 2008). Kanser mutasyona uğrayan bir tek hücrenin anormal bir şekilde çoğalmasıyla başlar ve yeni mutasyonlar da biriktirerek giderek daha hızlı çoğalan hücrelerin ortaya çıkmasıyla da büyür, gelişir ve özellikler kazanır (Cooper ve Hausman 2004). Kanser hücreleri kromozomal anormallikler, genomik kararsızlık (instabilite) göstermelerinden dolayı, hücre çoğalması, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücre-hücre bağlantılarını kontrol eden özel genlerde

mutasyonlara yol açar. Böylece kanserde, translokasyon, anöploidi, kromozom kaybı, DNA çoğalması (amplifikasyonu) ve delesyonlar gibi oldukça önemli ve büyük genetik kusurların oluşumu gözlemlenir (Klug ve Cummings 2002).

Normal (sağlıklı) hücrelerimizde çoğalma, yenilenme ve apoptoz olayları dengeli bir şekilde kontrol altındadır. Kanser hücrelerinde normal hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen moleküler mekanizmalarda düzensizlikler görülmektedir. Sağlıklı hücrelerde telomerler her bölünmeden sonra kısılırken kanser hücrelerinde telomerler, telomeraz enzimiyle yenilenmektedir. Bu durum sonucunda kanser hücrelerinde telomer uzunluğu sürekli olarak sabit kalmakta ve böylece hücrelerin sınırsız bölünmesi indüklenmektedir (Karp 1999).

Kanser hücreleri, solunum enzimleri, sitokromlar ve sitokrom oksidaz gibi vital proteinlerinin azlığıyla dikkat çekerler. Glikozu laktik aside dönüştürerek oksijenden bağımsız beslenme yeteneğine sahip olmakla birlikte, kalsiyum düzeyleri sağlıklı hücrelere oranla %40 daha azdır. Böylece hücrelerin birbirinden daha çabuk kopması ve dolaşım yoluyla diğer dokulara taşınması sağlanır (Karp 1999, Toğar 2013).

Benign tümörler sınırlı büyüme potansiyeline sahip, yayılma ve metastaz oluşumu gözlemlenmeyen iyi huylu olarak adlandırılan tümörlerdir. Hücre membranının kenarları düzenlidir, herhangi bir dokuda oluşabilirler ve bulunduğu bölgede basınç oluştururlar (Franks ve Teich 1996, Toğar 2013). Benign tümörler genel olarak yavaş büyümektedirler ve köken aldıkları hücelere yapısal ve fonksiyonel olarak oldukça benzemekle birlikte malign tümörlerdeki gibi diğer doku ve organlara yayılma, yani invazyon ve metastaz yapmazlar. Tümörün orijin aldığı hücrenin tipine, mikroskobik ve makroskobik özelliklerine ya da köken aldığı hücrelerin sonuna -om ya da -oma eki getirilerek adlandırılmaktadır (Livolsi vd 1992, Toğar 2013).

Normal hücre ile kanser hücreleri arasındaki en önemli farklardan biri, sağlıklı normal hücrelerin ortamdaki büyüme faktörlerinin belirlediği miktara ulaşana kadar bölünüp daha sonra G0 evresine girerek geçici olarak bölünme döngüsünden ayrılmalarıdır. Kanserli hücrelerde ise otokrin uyarımla kendi bölünmeleri için gerekli olan büyüme faktörlerini sentezleyebilme yeteneği kazanmış olmalarından dolayı böyle bir sınırlama söz konusu değildir ve sürekli olarak bölünürler. Hücre-hücre etkileşimi açısından normal hücrelerle kanserli hücreler arasındaki en önemli farklardan birisi de kontakt inhibisyon mekanizmasındaki farklılıktır. Kanser hücrelerinde, hücre yüzey adezyon genlerinin normal hücelere kıyasla daha az ifade

edilmesinden dolayı daha az düzeyde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi olmaktadır. Bu durum hücre iskeleti ve hücre morfolojisinde bazı bozulmalara sebebiyet vererek hücrelerde kontakt (temas) kaybına yol açar. Bundan dolayı çoğu kanser hücresi komşu hücrelerle daha az temas halinde olmakla birlikte morfolojileri de normal hücreye nazaran daha yuvarlaktır. Normal hücreler kültürde belirli bir yoğunluğa erişinceye kadar çoğalmaktadır. Normal hücreler kültür plağı üzerinde komşu hücrelere temas edinceye kadar yayılırken, tersine kanserli hücreler ise yoğunluktan etkilenmeden çoğalmaya devam etmekte, komşu hücrelerle temas etse bile üzerine doğru yayılımını sürdürmektedir. Bu durum invazyon ve metastazda önemli rol oynamaktadır (Cooper ve Hausman 2004, Lüleyap 2008).

2.1.2. Kanserın Genetik Temeli

Bir kanserin sporadik olarak (yeni mutasyon tarafından oluşturulan hastalık) bireylerde izlenmesine veya kalıtsal bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar etmesine bakılmaksızın, kanser bir genetik hastalık olarak tanımlanır (Nussbaum 2005). Kanser, hücresel düzeyde genlerin üç genel sınıfında onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarımında görevli genlerde meydana gelen mutasyonlar ve genetik değişimler kanser indüksiyonunda önemli roller üstlenmektedir. Bu genler hücre büyümesinin ve çoğalmasının kontrolünde görevli pek çok protein kodlar (Futreal vd 2004). Kanserlerde genellikle tümör baskılayıcı genlerde inaktivasyon, onkogenlerde aktivasyon veya DNA onarımı ile ilişki genlerin çalışmasında moleküler ve genetiksel bozulmalar söz konusudur. Kanser gelişimi; genetik ve epigenetik değişimlerin nedeniyle oluşmaktadır. Bu gelişim sürecinde tümör oluşum mekanizmaları ve hücre döngüsü sırasındaki mutasyonlar da rol oynamaktadır. Bu değişimler; nokta mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlenmeleri, mikrosatellit kararsızlığını, tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinin hipermetilasyonunu ve/veya inaktivasyonunu, onkogenlerin aktivasyonunu ve programlı hücre ölümünün (apoptoz) baskılanmasını vb. içermektedir (Hanahan ve Weinberg 2011). Kanserın başlangıcında farklı görevleri olan genlerin yer aldığı bilinmektedir. Bu grupta yer alan genler: Hücre çoğalmasında (proliferasyonunda), sinyal iletiminde görevli proteinler,

- kontakt inhibisyonun oluşumunda yer alan hücre komponentleri,
- programlanmış hücre ölümünde rol oynayan genler,
- mitotik döngü regülatörleri, mutasyonların tanımlanmasında ve onarımında görevli proteinleri kodlayan genlerdir (Nussbaum vd 2005).

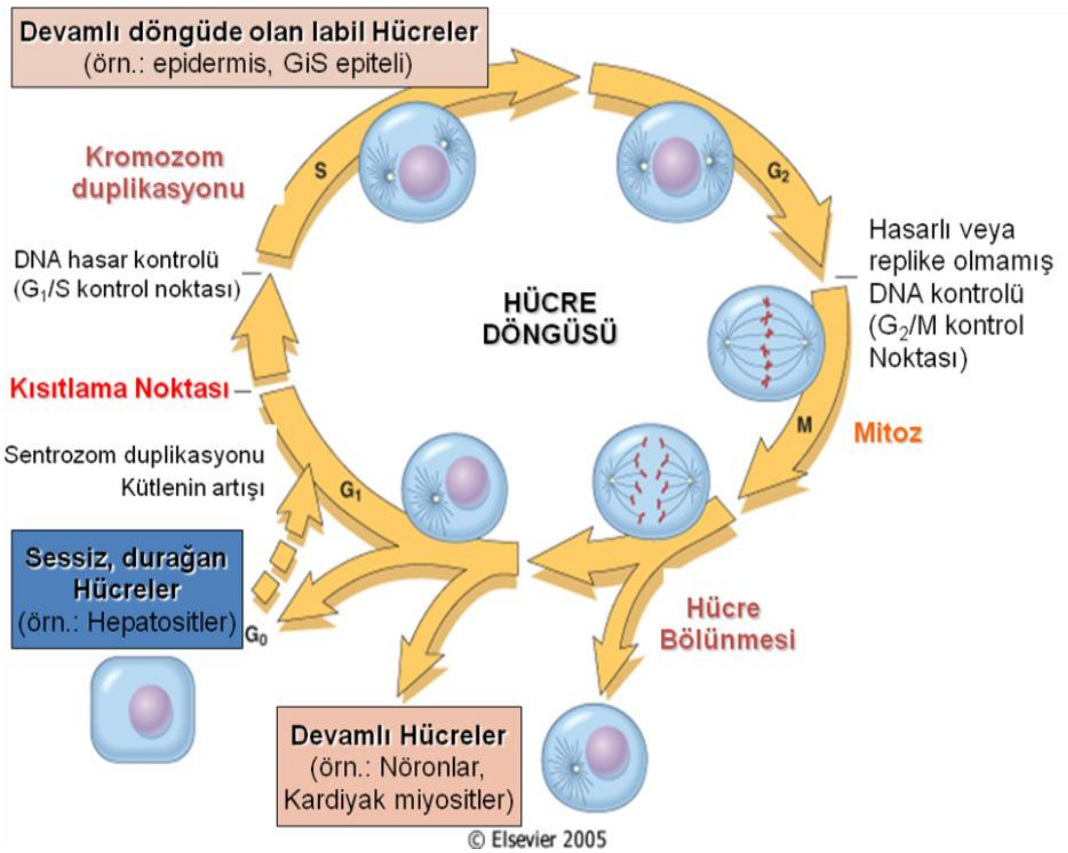
Kanserde yer alan genler, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak iki temel alt gruba ayrılmaktadır. Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogenler adını verdiğimiz normal hücrel genlerin mutant (aktif olan) allelleri olmakla birlikte telomerazları kodlayan veya programlanmış hücre ölümünü bloke eden genler de olabilir. Proto-onkogenler, önemli hücre regülatör genleri olmakla birlikte bir çok durumda hücre bölünmesini kontrol ederler ve sinyal iletiminde rol oynayan proteinleri şifrelerler. Üretilen bu proteinler genellikle büyüme faktörleri, hücrede uyarıları alan reseptörler ve uyarı ileten moleküllerdir. Bazı proto-onkogenler ise transkripsiyonda etkili rol oynamaktadır. Bu genlerin herhangi birinde meydana gelen mutasyonlar, translokasyonlar ve aşırı gen ifadesi mekanizmaları proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümüne sebebiyet verir. Onkogenler genellikle fonksiyon kazandıran mutasyon özelliğine sahip olup, hücre proliferasyonunu indüklemeye, tümörün damarlanmasını teşvik etme ve apoptozu engelleme gibi mekanizmalarla malign transformasyonunu gerçekleştirmektedir (Kopnin 2000, Nussbaum 2005, Lüleyap 2008).

Büyüme uyarıcı proteinleri etkileyen mutasyonlara ek olarak, normal ürünleri hücre bölünmesini inhibe eden genlerde meydana gelen değişiklikler de kanser oluşumuna yol açmaktadır. Bu genler tümör baskılayıcı genler olarak bilinirler. Bu genler hücre bölünmesini durdurarak kontrolsüz hücre büyümesini önlemeye yardım eder. Tümör baskılayıcı proteinlerin normal aktivitesini azaltan herhangi bir mutasyon, kanserde başlatıcı etki yapabilir ve böylece baskılanmanın ortadan kalkması ile büyüme teşvik edilir. Tümör baskılayıcı genlerin protein ürünleri, çeşitli hücrel işlevlere sahiptirler ve tümör baskılayıcı genlere örnek olarak hücre döngüsü kontrol proteinleri, DNA tamir proteinleri, hücreler arası iletişimde görevli proteinler ve anti-apoptotik proteinler verilebilir. En iyi bilinen tümör baskılayıcı gen p53 genidir ve p53 hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişi kontrol etmektedir (DeVita vd 1997, Kopnin 2000, Campbell ve Reece 2008). Tüm kanser hücrelerindeki temel sapmalardan birisi, hücre çoğalması üzerindeki kontrolün kalkmasıdır ve bu nedenle kontrolsüz çoğalmanın mekanizmasını açıklamak için kanserli/normal hücre döngüsünü incelemek gerekir.

2.1.3. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, genetik materyalin mitoz bölünme süreci yoluyla kopyalandığı ve yeni oluşturulan hücrelere paylaştırıldığı, düzenli moleküler ve hücrel süreçler dizisi olarak tanımlanır. Normal hücre döngüsünde G0, G1 (interfaz), S (sentez), G2 ve M (Mitoz) fazı bulunmaktadır. G0 fazı dinlenme safhasıdır ve hücre büyüme faktörü ile

uyarılmadığı sürece farklılaşmış hücreler bu safhada beklemektedir. G1 fazı, çeşitli büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir ve hücre bu aşamada DNA sentezi için hazırlanır. S fazında DNA replikasyonu gerçekleşmekte ve DNA kopya sayısı iki katına çıkmaktadır. DNA duplikasyonunun ardından G2 safhası başlar ve hücre bu aşamada mitoz için hazırlanır. Daha sonraki faz ise hücre bölünmesinin gerçekleştiği M fazıdır ve bu safha profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz adını alan farklı evrelerden oluşmaktadır (Lodish H 2001, Park ve Lee 2002). Sürekli bölünmek için uyarı alan hücrelerde mitozdan sonra döngü tekrardan G1, S, G2 safhaları şeklinde tekrarlanmaktadır (Vermeulen vd 2003, Kumar vd 2005) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Hücre döngüsünün şematik görünümü (Kumar vd 2005)

Hücre çoğalması, çok hücreli organizmalarda tüm gelişim ve doku onarımı için gerekli olan hücre büyüme ve bölünme süreçlerini kapsamaktadır. Hücre çoğalması üzerindeki normal düzenleme, hücre döngüsü aşamalarını, hücre ölümlerinin programlanmasını ve aşırı büyüme sinyallerine karşı hücrelerin yanıtlarını kontrol eden çok sayıda gen ve ürünlerinin varlığını gerektirmektedir. Kanseri hücrelerde, bu fonksiyonları kontrol eden çok sayıda gende mutasyon söz konusudur. Bu durum kontrol edilemeyen hücre çoğalmasına yol açmaktadır (Klug ve Cummings 2002).

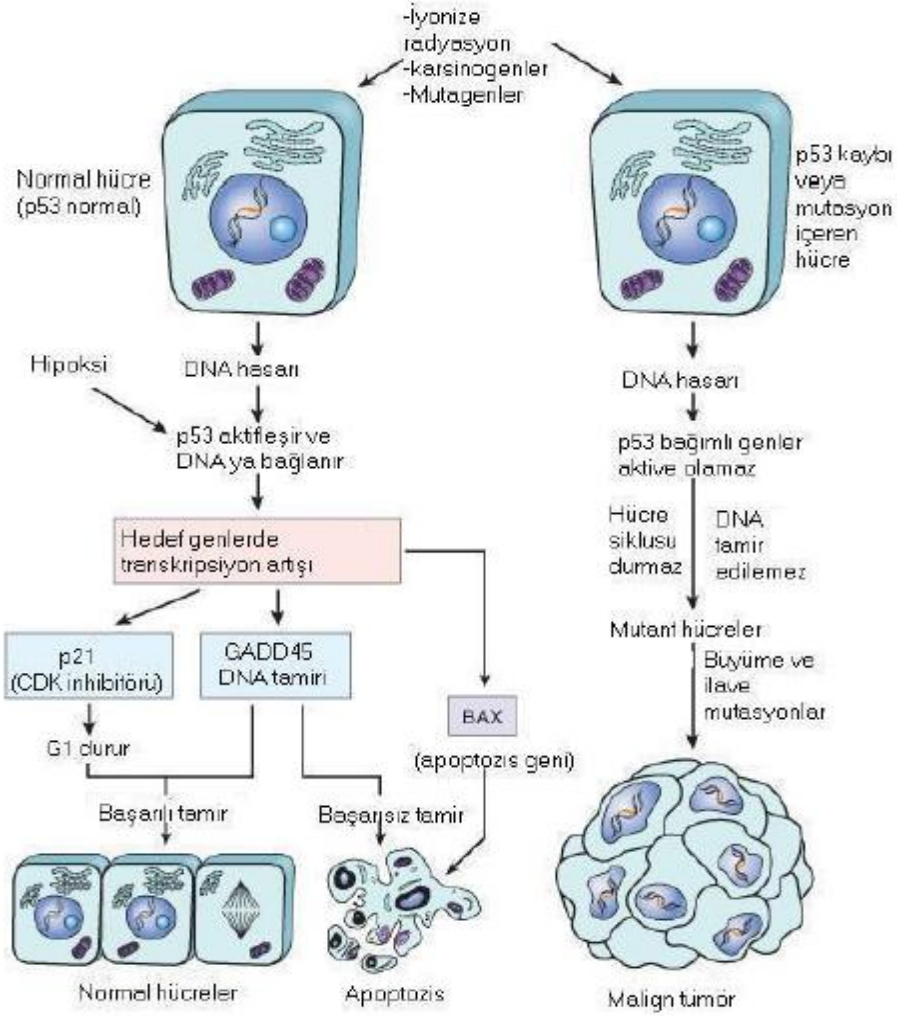
2.1.3.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü

Normal hücrelerde, hücre döngüsü süreci sıkı bir şekilde düzenlenmiştir. Her aşamasının tamamlanması ve bir sonraki aşamaya geçişi kontrol altına alınmıştır. Hücre döngüsünde, bir sonraki aşamaya ilerlemeden önce, hücrenin kendi iç dengesini izlediği ve kontrol ettiği en az üç farklı nokta vardır. Bu kontrol noktaları; G1-S, G2-M ve M kontrol noktalarıdır (Klug ve Cummings 2002, Lukas vd 2004).

2.1.3.1.1. G1-S Kontrol Noktası

G1-S noktasında hücre kendi boyutunu izler ve DNA'nın hasar görüp görmediğine karar verir. Eğer hücre uygun boyuta ulaşmayı başaramamış ya da hasar görmüş ise hücre döngüsündeki ileri aşamalar bu koşullar doğrulana kadar durdurulur. Hücre G1'den S fazına doğru ilerlediğinde hücre DNA'sı hatasız olmalı, hücre bölünmesinin gerekliliğine dair sinyal alınmalı, uygun çevre bulunuyor olmalı ve DNA sentez işlemi başlatılabilir. Eğer hücre boyutu ve DNA bütünlüğü normal ise G1-S kontrol noktası geçilmiş olur böylece hücre S fazına doğru ilerler. Sonuç olarak buradaki kontrol sistemi ile S fazında hasarlı DNA kopyalanması önlenmiş olur (Klug ve Cummings 2002, Lüleyap 2008).

p53: Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasındaki söz konusu duraklama, p53 olarak adlandırılan ve DNA hasarı olduğunda hızla çoğalan bir proteinin etkisi ile gerçekleştirilmektedir. p53, G1/S kontrol noktasının kritik bir düzenleyicisi olmakla birlikte DNA hasarına veya ekstraselüler büyüme düzenleyici sinyalleri hücre cevabında kritik işlev görür. İnsanlarda görülen değişik kanser türlerinde, genellikle p53'ü şifreleyen genin her iki kopyası da mutasyona uğramıştır. Tüm tümörlerin yaklaşık %50'sinde p53 geni mutasyonuna uğradığı rapor edilmektedir. Bu mutasyonlara bağlı olarak p53 fonksiyonu kaybolursa DNA hasarı olduğunda G1 fazındaki duraklama gerçekleşmez ve böylece hasarlı DNA yavru hücrelere tamir edilmeden geçer. Bu durumda hasarlı DNA kalıtılır, mutasyon sayısı artar ve genomun karasızlığına neden olunarak kanser gelişimine katkıda bulunulur. p53 DNA hasarına karşı etki mekanizması hücre döngüsünü durdurup, p21'i uyararak transkripsiyonel olarak DNA onarım enzimlerini aktive etmesi şeklindedir. Eğer istenildiği gibi DNA onarımı gerçekleştirilemez ve hücre büyümesi durdurulmazsa p53 hücreyi apoptoza götürür (Şekil 2.3) (Hollstein vd 1991, Harry vd 1997, Kumar 2005, Lüleyap 2008).



Şekil 2.3 p53 geni etki mekanizması (Kumar vd 2005)

G1-S kontrol noktasının regülasyonunda görev alan bazı proteinler de mevcuttur. Bunlardan en sık görülen siklin/CDK kompleksleri, siklin A/CDK2, siklin E/CDK2, siklinD/CDK4 ve siklin D/CDK6'dır. Bu kompleksler de hücrelerin G1 fazından S fazına geçişinde rol oynarlar. Eğer Siklin/CDK kompleksleri overeksprese (aşırı ekspresyon) olursa G1-S arrestisi kısalır, az eksprese olursa da hücreleri G1 arreste uğratar (Resnitzky vd 1994, Lee vd 1995, Ito vd 1999). Siklinlerin ve CDK'ların G1-S kontrol noktalarındaki bu kritik durumları onları önemli onkogen haline getirmektedir (Strauss vd 1995).

2.1.3.1.2. CDK İnhibitörleri:

Fonksiyonları, G1-S kontrol noktasının siklin/CDK komplekslerinin aktivitesini büyük oranda CDK inhibitörlerinin CIP/KIP ve INK4 ailelerinin üyeleri tarafından

kontrol edilir (Hall vd 1995). CDK inhibitörleri DNA hasarı, hücre-hücre teması, sitokin salınımı, hipoksi gibi çeşitli sinyallere cevap olarak gelişir. INK4 ailesi üyeleri, CDK4 ve CDK6'yı bağlarken, CIP/KIP ailesi üyeleri siklin/CDK kompleksini bağlar. CDK inhibitörleri siklin/CDK kompleksine bağlanarak Rb (Retinoblastom) fosforilasyonunu inhibe ederek replikasyon mekanizmasının durdurulmasında rol alır (Bertin vd 2003).

INK4/ARF Ailesi: CDK inhibitörlerinin INK4/ARF ailesi, siklin D'nin CDK4 ve CDK6 ile birlikteliğini, siklin D-CDK4/6 kompleksinin fosforilasyonunu bloke eder. Bu ailenin 4 üyesi vardır. Bunlar CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C ve CDKN2D'dir. İnaktive edici mutasyonlar ile CDKN2A ve CDKN2B'nin anormal metilasyonunun kanserlerde önemli olduğu düşünülmektedir (Takeuchi vd 1995, Kawamura vd 1999).

CIP/KIP Ailesi: CDK inhibitörlerinin CIP/KIP ailesinin üyeleri (CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C) siklin-CDK komplekslerinin negatif düzenleyicileridir. Siklin A/CDK2 ve siklin E/CDK2 komplekslerine bağlanarak Rb geninin fosforilasyonunu engeller ve hücre döngüsünün durmasını kontrol ederler. CDKN1A ve CDKN1B ayrıca siklin D/CDK4 kompleksine bağlanırlar. Ancak, siklin E/CDK2'yi indirekt aktive etmek şeklinde fonksiyon görmektedir (Cabadak 2008).

Retinoblastoma Geni: G1-S kontrol noktasında görevli anahtar düzenleyici elemanlardan biridir. Siklin-CDK kompleksleri Rb veya diğer aile üyelerini fosforile eder. Aktif durumdaki Rb, hücrenin döngüde G1'den S fazına ilerlemesinde fren görevi yapar. Hücre büyüme faktörü uyarıldığı zaman, Rb proteini fosforilasyonla inaktif hale gelir, fren serbest bırakılır ve hücre G1-S noktasına geçer. Rb ve aile üyelerinin fosforilasyonu siklin/CDK kompleksince oluşturulur. Hücre S fazına girince büyüme faktörü uyarısı olmadan, bölünme başlatılır. M fazı sırasında selüler fosfatlarla Rb'den fosfat grupları alınır ve defosforile Rb şeklinde rejenere olur (Hashimoto vd 1999).

G0 veya erken G1 fazında olan hücreler aktif, fosforile olmamış Rb içerir. Bu evrede Rb, E2F4 transkripsiyon faktörü ailesini bağlayarak hücre çoğalmasını önler. Sessiz hücre, büyüme faktörleri ile uyarıldığında, siklin D ve siklin E konsantrasyonu artar ve sonuçta siklin D/CDK4, siklin D/CDK6 ve siklin E/CDK2 aktivasyonu Rb fosforilasyonuna yol açar. Aşırı fosforile olmuş Rb formu E2F4 transkripsiyon faktörünü serbest bırakır ve değişik hedef genleri aktive eder. Rb proteini yoksa veya transkripsiyon faktörleri yetersiz ise, mutasyonlar ortaya çıkar ve hücre S fazına geçer (Chellappan vd 1991).

2.1.3.1.3. G2-M Kontrol Noktası

İkinci önemli kontrol noktası, mitoz giriş için hücredeki fizyolojik koşulların izlenmesinin yapıldığı G2-M kontrol noktası olmakla birlikte, burada DNA replikasyonu tamamlanmadıkça mitozun başlamasını önlemektedir. Replikasyonu tamamlanmış DNA'yı tanıyıp hücre siklusunu durduran bir sinyal oluşturan G2 kontrol noktası böylece S evresi tamamlanmadıkça M evresinin başlamasını önler. Hücre genomu replikasyonu her bir kromozomun iki kopyasını ayırması gerekir ki, bu ayrılmayı Siklin/CDK kompleksleri G1-S kontrol noktasındakine benzer şekilde regüle eder. G2-M evresinde hücre döngüsü arrestinin en azından bir kısmında p53 ve BRCA1 aracılı olduğu bildirilmekle birlikte p53 tarafından hücre döngüsünün inhibitörlerinin (CDKN1A, GADD45 gibi) transkripsiyonel olarak aşırı düzenlemesi hücreyi G2-M arrestinde tutar. p53'ün hem G1-S hem de G2-M fazında hücre döngüsü arrestine aracılık etmesi genomik stabilitede (bütünlükte) ne kadar da kritik bir rol üstlendiğini göstermektedir (Vauzour vd 2007, Lüleyap 2008, Shiotani ve Zou 2009).

2.1.3.1.4. M Kontrol Noktası

Üçüncü ve en büyük kontrol noktası mitoz sırasında ortaya çıkar ve M kontrol noktası olarak isimlendirilmektedir. Bu kontrol noktasında hem iğ iplikçikleri sisteminin oluşması hem de iğ iplikçiklerinin sentromere tutunan kinetokorlar yardımıyla bağlanması kontrol edilmektedir. Böylece yavru hücrelere kromozom setlerinin doğru şekilde dağıtılması sağlanır. Eğer bu iğ iplikçiklerinin uygun bir şekilde biçimlendirilmesinde problem çıkarsa ya da bağlanma uygun olmaz ise bu kontrol noktasında mitoz durdurulur (Klug ve Cummings 2002, Lüleyap 2008). Eğer DNA replikasyonunda, DNA onarımında, kromozom düzenlenmesinde hata ya da sapma olursa, hücre döngüsü koşullar düzelinceye kadar durdurulur ve bu şekilde mutasyon sayısında artış ve çoğalan hücrelerdeki biriken kromozomal temelli anormalliklerin önüne geçilmiş olur. Buna rağmen, eğer hasarlı olan DNA tamir edilememiş ya da kromozomal hasar düzeltilmesi imkânsız hale gelmişse bu durumda hücre belki ikinci bir savunma hattı kurabilir ki, bu duruma programlanmış hücre ölümü ya da apoptoz denilmektedir (Klug ve Cummings 2002).

2.1.4. Apoptoz

Organizmadaki hücre sayısı homeostazinin korunmasında oldukça önem arz etmekle birlikte yeni hücreler sentezlenirken var olan hücrelerin bir kısmı ölmekte ve

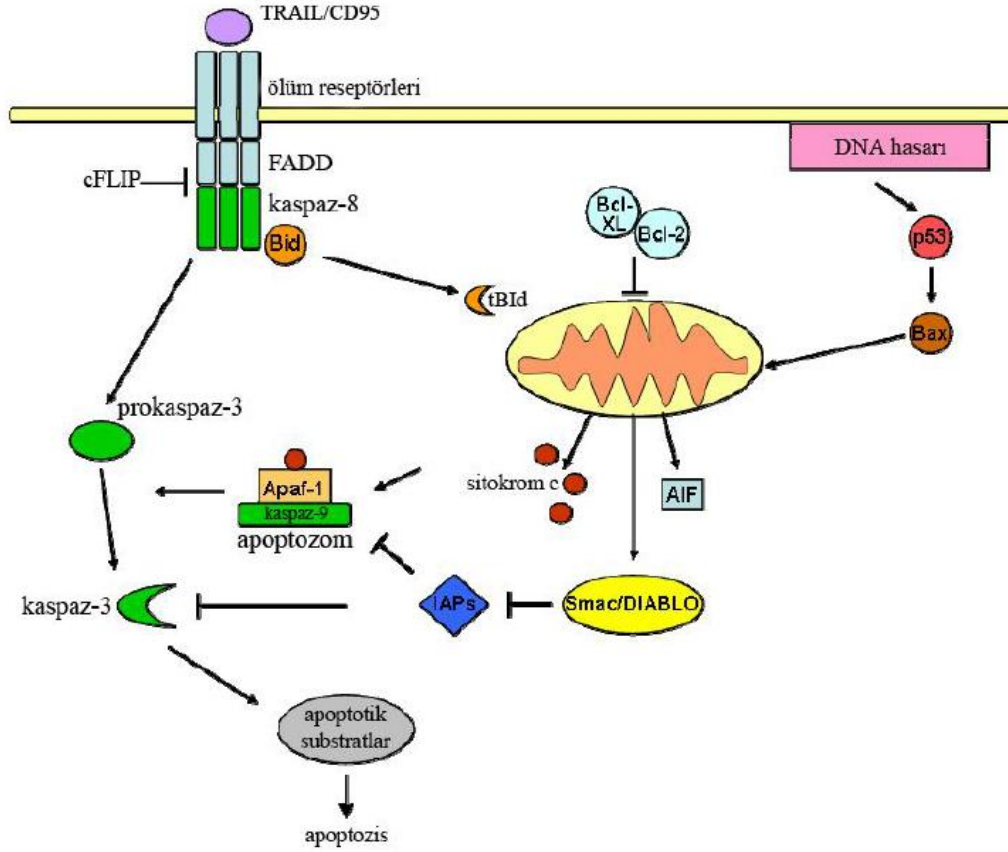
bu sayede homeostazi sağlanmaktadır. Apoptoz, organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam eden bir süreçtir. Bu şekilde ölüm ve yapım ile dokudaki dinamik denge korunmuş olur. İşte bu denge apoptoz aleyhine veya lehine değişecek olursa birçok hastalığın ortaya çıkmasına katkıda bulunur. Olmaması gerekirken gerçekleşmesi, hızlanması veya yavaşlaması organizma için oldukça tehlikeli sonuçlara sebebiyet verebilir. AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, arteriosklerozis gibi hastalıklarda apoptoz hızlanmış iken, kanser ve bazı otoimmün hastalıklarda apoptozun yavaşladığı ve mekanizmasının bozulduğu görülür (Lüleyap 2008).

Apoptoz; hücrenin genetik olarak kontrol edildiği ve sonunda intihar ettiği bir süreç olarak tanımlanır ve normal çok hücreli ve yüksek yapıları organizmaların gelişimi sırasında da katkı sağlamaktadır. Apoptoz, nekroz gibi diğer hücre ölüm tiplerinden farklılık sergilemektedir ve ayrıca konağın bağışıklık sistemi apoptotik bir hücre ölümü ile aktive edilmez. Nekroz ile hücre ölümünde konağın immün sistemi uyarılmaktadır. Apoptoz genler tarafından kontrol edilen, dokuların dengesi ve gelişimi için gerekli olan ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz sırasında çekirdek büzülür, kromatin yapı yoğunlaşır ve DNA nükleazlarca parçalanır. Hücrenin diğer hücrelerle bağlantısının kopmasının ardından hücre apoptotik cisimcikler olarak bilinen küçük küresel yapılara bölünür. Bu cisimcikler komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Bu süreçte meydana gelen bir bozukluk ölmesi gereken bir hücrenin yaşaması genetik bozukluğa ve mutasyonlu hücrelerin oluşumuna neden olmaktadır. Diğer ölüm mekanizması nekroz ise hücre şişmesi ve hızlı dejenerasyon olarak tanımlanmaktadır. Apoptozun tersine hücre bütünlüğü bozulmakta ve hücre içeriği dış ortama yayılmaktadır (Klug ve Cummings 2002, Guimaras ve Linden 2004, Toğar 2013).

Şimdiye kadar apoptoz mekanizmasında çeşitli hücreyel yolaklar ortaya çıkarılmıştır. Bunlar ölüm reseptörü aracılı dış yolak, mitokondri aracılı iç yolak ve endoplazmik retikulum aracılı oksidatif stres yolağı gibi programlı hücre ölümünü aktive eden yolaklardır. Apoptotik hücre ölümü intraselüler ve ekstraselüler sinyallerin, mitokondriyel değişimlerin, pro-apoptotik proteazların, spesifik endonükleazların aktivasyonu ile DNA fragmentasyonunun da dahil olduğu kompleks mekanizmayla başlatılmakla birlikte dış yolak, ligandların hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması üzerine bu reseptörlerde meydana gelen konformasyon değişikliğine bağlı olup, iç yolakta ise mitokondriyal bir işlev söz konusudur ve büyüme faktörlerinin eksikliği, kortikosteroidler ya da radyasyon veya sitolojik ilaçlar nedenli DNA hasarı tarafından başlatılır (Rich vd 2000, Susin vd 2000, Uguz vd 2009).

Kaspazlar olarak adlandırılan bir grup proteaz apoptozu başlatan ve hücre içi bileşenlerinin sindiriminden sorumlu enzimlerdir. Pro-apoptotik sinyal, başlatıcı ilk kaspazı aktive eder ve böylece diğer efektör kaspazlar aktive edilerek hücre sel bozulma açığa çıkmaktadır. Apoptoz sinyallerinin verilmesinde apoptozin göstergeleri olan morfolojik değişimi gerçekleştirecek efektör kaspazları (kaspaz-3 ve kaspaz-7 dahil) etkinleştirmek için başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10 dahil) önemli fonksiyonlara sahiptir. Kaspaz-8 ölüm reseptörlerini içeren apoptoz mekanizması ile ilişkili iken kaspaz-9 sitolojik ajanların uyarısı sonucu hücre ölümünü tetiklemektedir. Çeşitli kimyasallar, UV, DNA denatüre edici ajanlar ve bazı kemoterapötikler apoptozun başlamasını indükleyen sitotoksik ajanlardır. Bunlar mitokondriyal hasara bağlı olarak sitokrom c'nin salımı ile kaspaz-9'u aktive ederek prokaspaz-3 gibi kaspaz zimojenlerinin aktivasyonunu başlatırlar ve böylece apoptozu indüklerler (Salvesen vd 1999, Rich vd 2000). Sitokrom c'nin sitozole çıkması Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs gibi Bcl-2 ailesi üyelerinden bir kısmı pro-apoptotik etki gösterirken, Bcl-2, Bcl-XL gibi üyeler ise anti-apoptotik etki göstererek apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Pro-apoptotik olan Bcl-2 ailesi üyeleri, sitokrom c'nin salınımını indükleyerek anti-apoptotikler ise sitokrom c'nin salınımını baskılayarak etki gösterirler. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak intrinsik (iç yolakla) sitokrom c'nin salınımını baskılama özelliğine sahipken, pro-apoptotik üyeler ise anti apoptotik üyelere bağlanması halinde bu baskılayıcı etkiyi ortadan kaldırıp sitokrom c'nin mitokondriden salınımını sağlarlar. Buradaki pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerin biribiri ile dengede olması durumu yaşam ile ölüm arasındaki dengenin korunmasında önemlidir (Thompson 1995, Petros vd 2004).

Bcl-2 ailesi üyelerinden; Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik üyeler normal şartlarda hücrede sessiz halde bulunurlar ve bu üyelerin aktive edilmeleri ile sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesi sağlanır. Kaspaz 8 aktivasyonu, Bid'in kırılmasına, dolayısıyla da aktifleşmesine yol açmaktadır. Bid karboksi terminal parçası Bak aracılı sitokrom c salınımını aktifleştirirler (Petros 2004). Dış yolak aracılığıyla apoptozun aktivasyonunda örneğin, TNFR (Tümör Nekroz Faktör Reseptör) ailesinden olan Fas reseptör ligandına (FasL), Fas bağlandıktan sonra reseptör membranında dimerize olur ve aktifleşir. Daha sonra reseptörün sitoplazmik kısmında yer alan kısımlarına pro-kaspaz 8 bağlanarak kendi kendini kesmesi sonucu aktifleşen kaspaz 8, pro-kaspaz 3'ü keserek aktive eder. Böylece kaspaz kaskadı oluşur (Song vd 2006) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Apoptotik süreçteki mekanizmalar (Kuş 2010)

Programlanmış hücre ölümü ile hasarlı hücreler ortadan kaldırılarak bir sonraki nesle kalıtsal olarak aktarım ve kansere neden olabilecek olası genetik mutasyonların da sayısı azaltılmış olur (Klug ve Cummings 2002). Apoptotik mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar hücrede anormal proliferasyona ve sitotoksik tedaviye direnç oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle özellikle son on yılda apoptozu indükleyen yeni ajanlar üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Fesik 2005).

Şimdiye kadar çeşitli kanser türlerinde hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, etkisini araştıracağımız oleuropeinin nöroblastom ile ilgili çalışmaya rastlanmamış olması nedeniyle öncelikle beyin tümörleri hakkında bilgi verecek olursak;

2.1.5. Beyin Tümörleri

Beyin kanseri, özellikle çocuklarda kansere bağlı ölümler arasında başta gelen nedenlerden biri olmakla birlikte beyin tümörlerinin çoğu ölümcül olup, ölümcül olmayanları da beyin fonksiyonlarına zarar vermekte ve günlük yaşamı oldukça

olumsuz olarak etkilemektedir (Jemal vd 2005). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın 2008 yılı kanser raporu verilerine göre beyin kanseri vakaları her 100 bin kişinin 238'inde görüldüğü ve sadece 64'ünün hayatta kalabildiği belirtilmiştir. Beyin tümörleri insidansı erkeklerde kadınlardan bir miktar daha yüksektir.

Beyin kanserinin diğer kanser türlerine nazaran görülme sıklığı az olmakla birlikte ölüm oranı oldukça yüksek bir kanser türüdür (Levin ve Boyle 2008, Ferlay vd 2010). Dünyada kanserden ölen dört kişiden birinin Amerika Birleşik Devletleri'nde olması nedeniyle Amerika istatistik verileri anlamlı sonuçları ortaya koymaktadır. 2014 yılı için yayınlanan raporlara göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014 yılında beyin ve diğer sinir sistemi kanserlerinde tahmini 23,380 (12,820 erkek, 10,560 dişi) yeni vaka beklenirken bu hastalığa bağlı ölümlerde ise 14,320 (8,090 erkek, 6230 dişi) ölüm vakası tahmin edilmektedir. Beyin tümörleri, bütün kanserlerin yaklaşık %1,4'üne tekabül ederken, kansere bağlı ölümlerde ise %2,44'ünden sorumludur (Siegel vd 2014, Web_2).

Beyin tümörleri primer ve sekonder olarak iki ana grupta incelenmekle birlikte primer olanlarda çeşitli alt gruplarda incelenir. Bunlar, nöroepitelyal orijinliler, meningeal tümörler, kranyal ve spinal sinir tümörleri, lenfoma ve hematopoietik neoplaziler, germ hücreli tümörler ve sellar bölge tümörleridir. Beyin tümörleri bir kaç çeşit olmakla birlikte Dünya Sağlık Örgütü glioblastoma ve nöroblastoma kanserli hücreleri sırasıyla astrosit ve embriyonel beyin tümörü sınıfına dâhil etmektedirler (Vescovi vd 2006).

Embriyonel totipotent ve pluripotent hücreler doku diferansiyonu gösteren hücrelerdir ve doğumdan sonraki ilk yıllarda kaybolmaktadırlar. Bundan dolayı bu tip hücrelerden oluşmuş tümörler de genellikle çocukluk dönemi tümörleridir. Genel olarak malign nitelik taşırlar ve aynı tümörde birden fazla dokuya farklılaşabilirler (Yachnis ve Perry 2009, Toğar 2013). Embriyonel tümörleri histolojik sınıflandırılması Tablo 2.1'de verilmiştir (Tuğcu 2004; Toğar 2013).

Tablo 2.1 Embriyonel tümörlerin histolojik sınıflandırılması

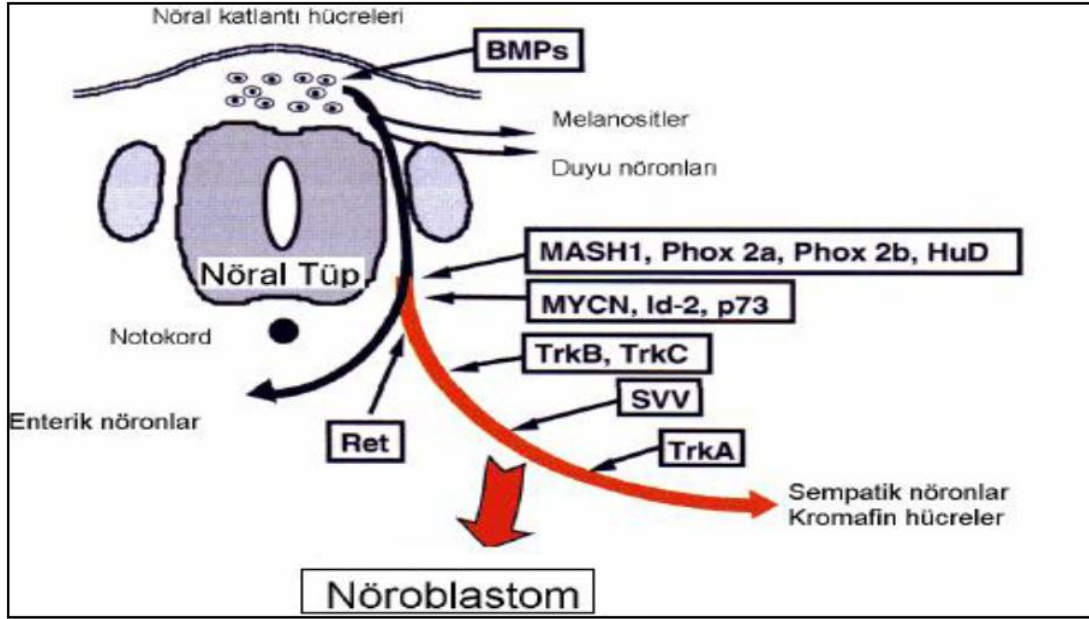
Nöroepitelyal doku tümörleri
Embriyonel tümörler
1. Medullaepitelyom
2. Ependimoblastom
3. Atipik teratoid / rabdoid tümör
4. Supratentoryel primitif nöroektodermal tümörler
a. Nöroblastom
b. Ganglionöroblastom
5. Medullablastom
a. Desmoplastik medullablastom
b. Large cell medullablastom
c. Medullomyoblastom
d. Melanositik medulloblastom

Kanser tedavisindeki gelişmelere rağmen beyin kanserinin tedavisi oldukça zordur ve halen tam anlamıyla etkili bir ilacı olmayan tümörler grubuna girmektedir. Beyin kanseri primer (kök hücre) beyin hücrelerinin anormal gelişim göstermesiyle oluşabileceği gibi, metastaz yeteneğine sahip kanserli hücrelerin diğer organlardan kan dolaşımı yoluyla beyne göç etmesi sonucunda da oluşabilir (Singh vd 2003, Vescovi vd 2006, Arslan 2011). Bu çalışma SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gerçekleştirildiği için nöroblastom hakkında dataylı bilgi verilmek gerekirse;

2.1.6. Nöroblastom

2.1.6.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Nöroblastom, embriyonik gelişimin dördüncü haftasında ortaya çıkan, adrenal medulla veya sempatik gangliyonlarda normalde bulunan primordial nöral krest hücrelerinden köken alan bir tümördür (Demirkaya ve Sevinir 2006). Nöral tümörlerin oluşumu nöral kreste giren embriyonik ektodermin normal sinyallere cevap vermemesi ve normal gelişimini tamamlayamaması sonucu gerçekleşir. Nöral tüplerdeki nöroektodermal hücrelerden nöroektodermal tümörler, nöral kreste giren hücrelerden ganglia ve nöroblastom, kemik ve yumuşak dokuyu oluşturan nöroektodermal hücrelerden ise periferik nöroektodermal tümörler oluşmaktadır (Olgun 1997, Toğar 2013). Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması (Aydın 2006, Toğar 2013)

Bebeklik çağının en sık görülen ekstrakranial (kafatası dışında) solid tümörü olmakla birlikte olguların çoğu ise iki yaşından küçük çocuklarda görülmektedir (Web_3). Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society)'nin 2014 verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 0-14 yaş arası çocukluk çağı tümörlerinin %7'sinden sorumlu olup her yıl yaklaşık 700 yeni çocuk bu hastalığa yakalanmaktadır. Ulusal Kanser Araştırmaları Enstitüsü'nün raporuna göre nöroblastom, her bir milyon çocuktan %9,5'inde görülecek bir insidans sergilemektedir (Web_2, Web_4). Avrupa'da bu oranın yaklaşık iki katı kadar olduğu yılda yaklaşık 1500 vaka tespit edildiği bildirilmiştir (Saydere 2009, Spix vd 2006).

Türkiye Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)'na ait NBL 2003 protokolünde ve aynı grubun Ekim 2006 verilerine göre, Türkiye'de ortalama tanı konma yaşı 22 aydır ve kız/erkek oranı ise 1.01'dir (Olgun 2007). İzmir ilinde 1997-2002 yılları arasında çocukluk çağı kanser insidansına yönelik yapılmış olan bir çalışmada nöroblastomu da içeren periferik sinir hücrelerinden köken alan kanserlerin rölatif sıklığı %7,1 olarak bulunmuştur (Eser 2007). 2002 yılında solid tümörler ve lenfoma saptanan 1073 çocuk üzerinde TPOG tarafından yapılan bir çalışmada, sempatik sinir tümörlerinin %9.40 oranında görüldüğü saptanmıştır (Kutluk 2004). Türkiye'deki 2002-2005 pediatrik kanser verilerine göre, 1435 çocukluk çağı tümörlerinin %10.6'sı sempatik sinir sistemi kökenlidir (Kutluk ve Yesilipek 2007, Bağcı 2009).

Nöroblastom bir yaş altındaki çocuklarda kendiliğinden gerileyerek iyi huylu tümör (gangliyonörom) haline dönüşebileceği gibi bir yaş üstü bireylerde agresif seyrederek diğer organlara yayılım yapma potansiyeline sahip bir tümör çeşididir (Brodeur 2003, Saydere 2009, Toğar 2013).

SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program) 2014 yılındaki raporuna göre nöroblastom için 5 yıllık sağkalım oranı, 1975-1979 yılları arasında %54 iken 1985-2000 yılları arasında %65 ve 2003-2009 yılları arasında da %79'a çıkmıştır. İrk ve cinsiyet arasında genel farklılık çok az olmakla birlikte lokal veya bölgesel hastalığı olan infantlarda yaşam süresi daha yüksek iken, büyük çocuklar ve uzak metastazlı hastalar için yaşam süresi azalmaktadır. Bu nedenle bazı gebelik ve doğumsal faktörlerin, ebeveynlerin aldığı ilaçların daha dikkatli incelenip kullanımının daha hassas olması gerekmektedir (Web_4).

Periferik nöroblastik tümörler sempatik sinir sisteminin embriyogenik neoplazmalarıdır ve sıklıkla adrenal bezlerde görülmekle birlikte boyun, göğüs, karın veya pelvis bölgelerindeki sinirlerde görülebilmektedir. Primer tümörlerin %60'ından fazlası adrenal medulladan veya abdomendeki paraspinal ganglia'lardan kaynaklanabilir. (Kushner ve Cheung 1988, Cingöz 2013). En sık metastaz bölgesel lenf nodları, karaciğer, kemik iliği ve kemiklerdir. (Sugiura vd 1998).

2.1.6.2.Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte çevresel etkenlerin nöroblastomda majör rolü gösterilememiştir. Daha çok nöral krest gelişim bozukluğuna bağlı geliştiği düşünülmektedir (Demirkaya ve Sevinir 2006). Ancak risk faktörleri arasında elektronik, tarım, kimyasal ajan maruziyeti yüksek işlerde çalışanlar, radyasyona maruz kalanlar, annenin yaşı, kullandığı ilaç ve hormonlar, alkol alımı, sigara kullanımı, tekrarlayan sezeryan, bebeğin düşük doğum ağırlığı, preterm doğum yer almaktadır (Haase vd 1999, Maris 2005, Toğar 2013).

Nöroblastom tanısı konmuş çocuklarda vücut ağırlığında kayıp, terleme, kızarma, iştahsızlık, baş ağrısı, çarpıntı ve hipertansiyon gibi belirtiler görülmektedir. Adrenal medullanın kromofin hücrelerinde, beyin ve sempatik nöronlarda sentezlenen adrenalin, norepinefrin ve dopamin (katekolaminler) yapımındaki artışa bağlı olarak terleme, hızlı ve çabuk öfkelenme ve hipertansiyon gelişmektedir. Ayrıca tümörün kemik iliğine metastaz yapması ile anemi gözlenebilmektedir. Sindirim sistemi

anormallikleri, f3tal alkol sendromu, n3rolojik ve gelişimsel anormallikler, otozomal resesif geçişli 3rogenital ve kardiyak anomaliler, Beckwith-Wiedemann sendromu ve Turner Sendromu n3roblastom ile birlikte bildirilen semptomların başında gelmektedir (Haase vd 1999, Maris 2005 ve Toğar 2013) Klinik bulgu ve semptomlar primer t3m3r3n bulunduğu b3lgeye, metastatik duruma veya paraneoplastik sendrom gelişimine bağlı olarak çeşitlilik g3stermektedir (Maris 2005).

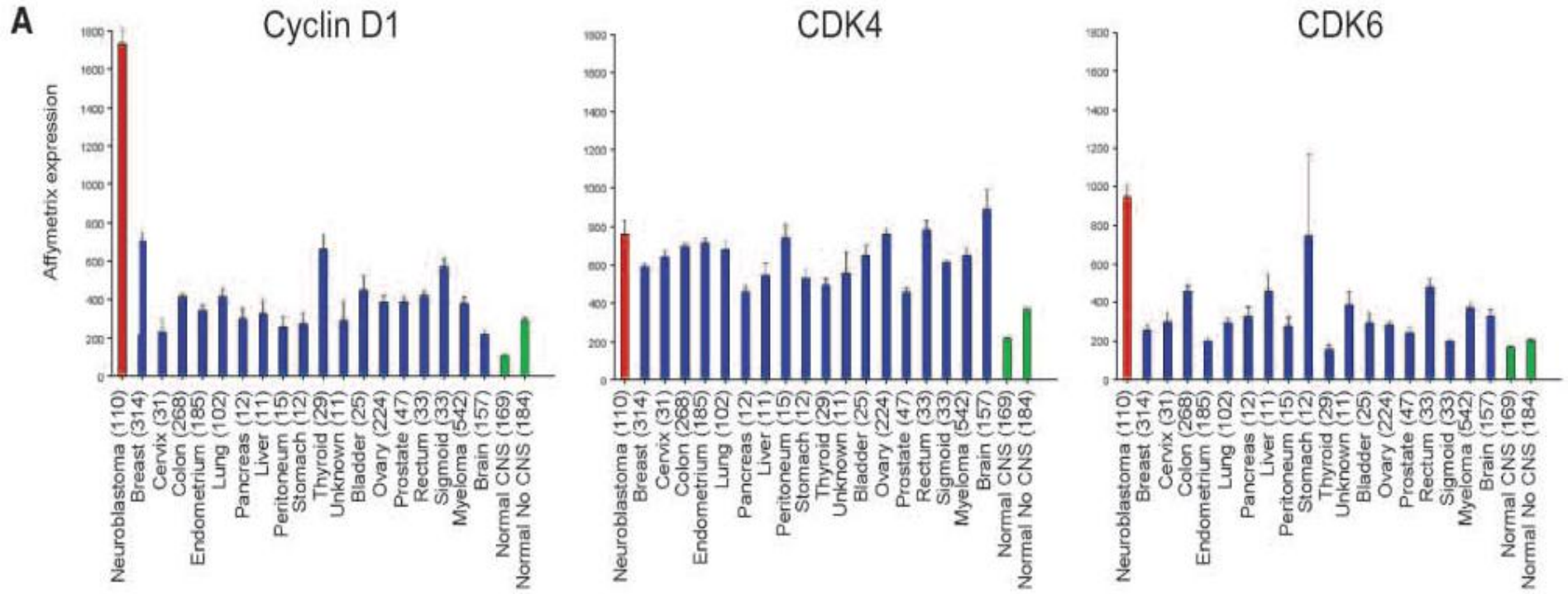
2.1.6.3. H3cresel ve Molek3ler Patogenezi

Genel olarak t3m3r oluşumu iki nokta hipotezi ile açıklanmaktadır ve doğuştan bir kromozomdaki alel kaybının n3roblastom oluşumuna zemin hazırladığı bununla birlikte aynı genin alelinde meydana gelen nokta mutasyonunun kanser oluşumuna neden olduğu d3ř3n3lmektedir (Cheung and Cohn 2005, Aydın 2006). N3roblastom'da t3m3r h3crelerinde g3sterilmiş genetik değişiklikler hastalığın patogenezi ve prognozunda rol oynayabilmekte ve t3m3r3n biyolojisi ve biyokimyası ile ilgili bilgileri sunmaktadır. Bu durum ayrıca risk gruplarına ayrılmış ve hedeflenmiş tedavilerin planlanması y3n3nden oldukça 3nem arz etmektedir. Bu genetik değişiklikler;

- Alelik fazlalık veya kayıp olması,
- Onkogen aktivasyonu,
- T3m3r baskılayıcı genlerde genetik hasar,
- Bazı hastalıkla ilişkili genlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler olabilir.

N3roblastom h3cresindeki DNA miktarı normal (diploid) veya artmış (near-triploid) olabilmekte ve bu DNA miktarı artmış kanser h3crelerinde normal h3crelere kıyasla daha iyi prognoz g3zlemlenmektedir. N3roblastomun en 3nemli onkogeni 2. kromozomun kısa kolunda lokalize 2p24 b3lgesinde yerleşmiş MYCN onkogenidir. MYCN amplifikasyon sıklığının artması k3t3 prognozla anlamlı olarak ilişkilidir ve n3roblastomda MYCN amplifikasyonu dışında gen d3zeyinde diğer kanserlerde rol3 olduğu bilinen genlerin aberasyonları da g3zlemlenmektedir. Ayrıca n3roblastomların yaklaşık olarak yarısında 17. kromozomun uzun kolundaki alelik fazlalık k3t3 prognozla ilişkilidir. Ayrıca bununla birlikte 1p delesyonu t3m3r dokusunun %25-35'inde g3r3l3rken 11q delesyonu t3m3r dokusunun %35'inde saptanmıştır (Aksoylar 2007, Toğar 2013).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, nöroblastom hücre hatlarında ve nöroblastoma hastalarında CDK4/CDK6 kinaz aktivitesinde önemli düzeyde artış olduğu gösterilmiştir. SiklinD1 ve CDK 4 gen amplifikasyonunun yanı sıra homozigot CDKN2A delesyonu da rapor edilmiştir (Easton vd 1998, Krasnoselsky vd 2005, Mosse vd 2007, Molenaar vd 2012, Rader vd 2013). Ayrıca Molenaar ve arkadaşları (2008) SiklinD1, CDK4, CDK6 gen ifadelerinin nöroblastoma vakalarında overeksprese olduğunu göstermekle birlikte diğer tümörlerle karşılaştırıldığında da nöroblastomada bu genlerin ekspresyon düzeylerinin daha yüksek olduğu belirtmişlerdir. Nöroblastomda SiklinD1, CDK4 ve CDK6'daki genomik aberasyonların saptanması bu pediatrik tümörde hücre döngüsünün G1 aşamasına giriş kontrol noktasında bir bozukluk olduğunu gösterir (Molenaar vd 2008). Şekil 2.6'da nöroblastoma ve diğer kanser türlerinde bu genlerin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması gösterilmiştir. Sempatik sisteme ait nöroblastların nasıl nöroblastomlara dönüştüğü tam olarak bilinmemekle birlikte bu malign dönüşümde nöroblastların normal farklılaşmasını uyarayan nörotropin reseptör yolaklarının rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, nöroblastom hücrelerinde hücre farklılaşması ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu arttığında telomeraz aktivitesi düşük bulunurken, hücre döngüsü ile genler ve transkripsiyon faktörlerinin overekspresyonu, yüksek telomeraz aktivitesi ve kötü prognozla ilişkilidir (Aksoylar 2007).



Şekil 2.6 SiklinD1, CDK4 ve CDK6'nın nöroblastom ve diğer kanser türlerinde ekspresyon düzeyleri (Molenaar vd 2008)

2.1.6.4 Nöroblastom Histopatolojisi ve Evreleme

Klasik olarak, periferal nöroblastik tümörlerin alt tipleri, nöroblastom (NB), ganglionöroblastom ve ganglionöromlardan (GNR) oluşmaktadır ve bunlarla ilgili Shimada 1984 yılında, tümörün histopatolojik özelliklerinden yararlanarak bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu kapsamda tümörler nöroblast farklılaşması, 'Schwannian stroma' içeriği, mitoz karyoreksis İndeksi (MKI) ve tanı yaşı dikkate alınarak iyi ve kötü histoloji olarak gruplanmıştır (Shimada vd 1984, Tümer 2013). Sonraki çalışmalarda tümör sınıflandırılması Shimada sınıflandırılmasının modifikasyonunun 'International Neuroblastoma Pathology Classification System' (INPC) olarak kullanılmıştır (Shimada vd 1999).

Nöroblastomlar, hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı küçük hücrelerden oluşur. Bunlar sıklıkla ince fibrovasküler septalar ile birlikte gruplar oluşturan tümör hücreleri şeklinde görülür. *In vitro* çalışmalarda N tip nöroblastik hücreler, S tip Schwannian/melanoblastik öncül hücreler ve I tip kök hücre olmak üzere moleküler özellikler ve davranış olarak da farklı olan 3 farklı tip nöroblastoma hücresi bulunmuştur. Nöroblastomlar, andiferansiye, az diferansiye ve diferansiye olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Ross vd 2003).

Klinik Evrelemede Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)'nun Ulusal Nöroblastom Tedavi Protoklü'nde kabul ettiği sistem Evans sınıflandırmasının geliştirilmiş ve özgülleştirilmiş ve modifiye edilmiş şekli olan İnternasyonal Evreleme sistemi kullanılmaktadır. Tablo 2.2'de bu evreleme sistemi verilmiştir (Olgun vd 2009).

Tablo 2.2 Uluslararası nöroblastoma evreleme sistemi (Olgun vd 2009, Aksoylar 2007)

INSS Evre	Tanım
Evre 1	Tümör köken aldığı organa sınırlı, makroskopik tam rezeksiyon. Mikroskopik tümör artığı olabilir ya da olmayabilir. İpsi ve kontrateral lenf nodu tutulumu yok.
Evre 2a	Unilateral tümör, tam olmayan makroskopik rezeksiyon. İpsi ve kontrateral lenf nodu tutulumu yok.
Evre 2b	Unilateral tümör, makroskopik tam veya tam olmayan rezeksiyon. İpsilateral bölgesel lenf nodu tutulumu var, kontrateral tutulum yok.
Evre 3	Orta hattı aşan tümör +/-, bölgesel lenf nodu tutulumu var. - Unilateral tümör ve kontrateral lenf nodu tutulumu var - Orta hat tümör ve bilateral lenf nodu tutulumu var.
Evre 4	Yaygın hastalık, uzak metastazlar (kemik iliği, kemik, uzak lenf nodu, karaciğer ve/veya diğer organlar).
Evre 4-S	Hastanın yaşı < 365 gün olmalıdır. Evre 1 ve 2 gibi lokalize primer tümör var. Sadece karaciğer, cilt ve/veya kemik iliği yayılımı var (kemik iliğinde tümör hücrelerinin oranı < %10 olmalı).

Bütün bu evreleme çalışmaları sonucunda kanser tedavisine göz atacak olursak;

2.1.7. Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde; tümörün organizmada bulunduğu dokuya, tümörün karakterine ve evresine, hastanın fizyolojik durumuna göre çok çeşitli tedavi yöntemleri uygulanmakla birlikte bu tedaviler arasında, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, monoklonal antikör terapileri, gen terapisi ve cerrahi müdahale gibi yöntemler kullanılmaktadır (Türker ve Kayaalp 2000, Tozkoparan ve Aytaç 2007). Kanser tedavisinde cerrahi müdahale ile erken tanı konmuş ve henüz vücuda yayılmamış tümörlü dokunun hayati organlara zarar vermeden vücuttan alınması amaçlanmaktadır. Radyoterapide ise kanserli hücelere gönderilen X ışınları yardımıyla hücre ölümünü indükleyip kanser tedavisini sağlamak amaçlanmaktadır. Böylece kanser hastalarında tümörün yayılması, kitlenin küçültülmesi veya yok edilmesi sağlanmaya çalışılmaktadır (Dilsiz 2004). Özellikle orta veya yüksek risk gruplarındaki hastaların ya da düşük risk grubu olup da hayati organların tutulumu nedeniyle cerrahi müdahalenin uygulanamadığı olgularda kullanılan temel tedavi şekli ise kemoterapidir. Kemoterapi hastanın ya da konakçının normal hücrelerine zarar vermeksizin direkt mikrop ya da tümörlü doku hücrelerini öldürmeyi amaçlamakta kullanılan kimyasal tedavi şekli olup, kemoterapi protokolleri hastanın risk grubuna göre belirlenmektedir (Kayaalp 2000).

Gen tedavisi yöntemi son yıllarda daha da güçlü bir şekilde bilim insanları tarafından dillendirilmekle birlikte bu yöntem ile kalıtsal ve/veya kazanılmış insan hastalıklarını tedavi etmek amacıyla gen düzeyinde moleküler hücre biyolojisi, DNA ve RNA temelli bir tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde gen transfeksiyonu, DNA onarımı gibi genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılmaktadır (Kars 2004). İnsan vücudunun bağışıklık sistemi, kanser hücrelerini yabancı hücre olarak algılamakta bundan dolayı da diğer bir tedavi yöntemi olan immunoterapi ile doğal olarak bağışıklık sisteminin daha iyi hale getirilip güçlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu tedavi yönteminde ise antikorların ürettiği lenfokinler kullanılmaktadır (Kirkwood vd 2012). Günümüzde hedefe yönelik tedavi kapsamında, terapötik ajanların direkt olarak kanserli hücrelerde proteinlere bağlanarak sağlıklı hücreleri etkilemeden, spesifik olarak sadece kanser hücrelerini hedefleyen çalışmaların sayısı artmıştır. Şu an için hedefe yönelik tedavi çalışmalarının çoğu deneyseldir ve diğer tedavi yöntemlerine yardımcı olarak veya kombine şekilde kullanılır. Bilimsel çalışmalarla test edilmekte olan hedefe yönelik tedaviler, tümöre özel ilaç sağlamanın yanında kanser tedavisinde en büyük sıkıntılardan birisi olan yan etki durumunu minimize etmeye de yardımcı olabilir. Tedavi için her zaman kür mümkün olmayabilmekte bazen özellikle çocuklarda olmak üzere palyatif (alternatif ve tamamlayıcı tedavi türleri) tedaviden de yararlanılabilmektedir. Bu tedavi ile hastanın hangi evrede olursa olsun kendini mümkün olduğunca iyi hissetmesi amaçlanmakta ve tedavi fiziksel, psikolojik, ruhsal ve ya sosyal ihtiyaca yönelik olabilmektedir (Demirelli 2005).

Kemoterapi ve radyasyon ile kanser tedavisinde en önemli noktalardan biri de uygulanan tedavinin kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelere de zarar veriyor olmasıdır. Bununla birlikte tedavi yöntemlerinde hastalar çok ciddi yan etkilere maruz kalabilmektedirler. Bu kapsamda hem kemoterapik ajanların etkisinin ve dozunun azaltılması bakımından hem de insan ve hayvanlarda doz aşımına bağlı yan etki göstermeyecek uygulama ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Tıp ve teknolojideki gelişmelere rağmen kanser günümüzde ölüm nedeni olarak ilk sıralarda yerini korumaktadır. Son yıllarda bitkisel veya mantar içerikli doğal besinler veya hayvansal kaynaklı zehirlerin (arı, akrep, yılan zehri gibi) ilaç olarak kullanımının artması fitoterapi, alternatif ve tamamlayıcı terapiye olan ilgiyi arttırmıştır. Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde ticari önem kazanmasından dolayı geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı yaygınlaşmaktadır. Dünya marketlerinde bu tip ilaç pazarının 60 milyon dolara, yıllık büyüme hızının %5-15 düzeyine ulaştığı bilinmektedir. ABD'de

son 50 yılda halkın doğal içerikli ilaçlara olan ilgisi %34-42 oranında arttığı bildirilmektedir (Roy-bvyrne vd 2005).

Özellikle kanser hastalarında tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanımının giderek arttığı da bildirilmiştir. 13 ülkede 26 çeşitli çalışmadan elde edilen istatistiki verilere göre yapılan araştırmalarda bu tarz kullanımın sıklığının %7 ile %64 (ortalama %31,4) arasında seyrettiğini rapor edilmiştir (Ernst ve Cassileth 1998, Kav vd 2008). İçerisinde Türkiye'nin de bulunduğu 14 ülkede yürütülen bir başka çalışmada, alternatif ve tamamlayıcı tedavi kullanım ortalamasının %36'larda olduğu ve bu oranın ülkelere göre %15 ile 73 arasında değiştiği de bildirilmiştir (Molassiotis vd 2005, Kav vd 2008). Gelişmiş bazı ülkelerde yapılmış olan tamamlayıcı ve alternatif tedavi sonuçları şu şekilde rapor edilmiştir: Amerika'da %42.1, Avustralya'da %48.2, Fransa'da %49.3, Kanada'da %70.4 iken gelişmekte olan bazı ülkeler için bu oranlar benzer şekilde bulunmuştur. Örneğin, Çin'de %70, Kolombiya'da %40 ve Afrika ülkelerinde ortalama %80 oranındadır (Bodeker ve Kronenberg 2002, Özçelik ve Fadiloğlu 2009). Türkiye'de kanser hastaları için TAT (tamamlayıcı ve alternatif tedavi) kullanım oranları yapılan çeşitli araştırmalarla belirlenmeye çalışılmış ve elde edilen verilere göre, Ceylan ve ark. %60,1, Samur ve ark %50, Oğuz ve Pınar %80.2, Tas ve ark. %47.3, Gözüm ve ark %41.1, Işıkhhan ve ark.%39.2, Algier ver ark. %36 bulunmuştur. Kav ve ark. tarafından yapılan literatür taramasında Türkiye için bu verilerin %22.1 ile %84.1 (ortalama %46,2) düzeylerinde olduğu rapor edilmiştir (Oğuz ve Pınar 2000, Samur vd 2001, Ceylan vd 2002, Gözüm vd 2003, Algier vd 2005, Tas vd 2005, Kav vd 2008).

Tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemleri günümüzde tıbbi tedavilere destek olmak amacıyla kullanılmakla birlikte aynı zamanda hastanın yaşam kalitesini arttırmak, fiziksel ve psikolojik destek sağlamak, semptomları ve ilaçlara bağlı yan etkileri azaltmak gibi amaçları da içerir. Tamamlayıcı tıp, bilimsel olarak test edilmiş ve etkili ve güvenli olduğu bulunmuş konvansiyonel tedavi yöntemlerine ilave olarak yapılır. Alternatif tedavi ise, bilimsel uygulamaların yerine kullanılan fakat etkisi kanıtlanmamış tedavi yöntemleridir. Bakım ve tedavisi güç kronik, dejeneratif ve malign hastalıklarda daha fazla karşılaşılmaya başlanması, yeni teknolojilerin maliyetinin nispeten yüksek olması, olanaklara ulaşma kısıtlılığı, sağlık çalışanlarının hastalara yeterince zaman ayıramaması, geleneksel tedavi yöntemlerinin halk nezdinde hala oldukça geçerli sayılması, güncel tedavi yöntemlerine karşı kuşku, klasik tıbbi tedavilerdeki olası yan etkilerden korkulması gibi sebeplerden dolayı tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanımının her geçen gün dünyada kanser hastaları

dâhil bir çok hastalıkla mücadelede tedavi amaçlı kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Turan vd 2010). Kanser hastaları; tıbbi tedaviye destek olma, tekrarlamasının önüne geçme amaçlı da kullandıkları tamamlayıcı tedavi ayrıca son bir çare olarak da tercih edilmektedir (Özçelik ve Fadiloğlu 2009).

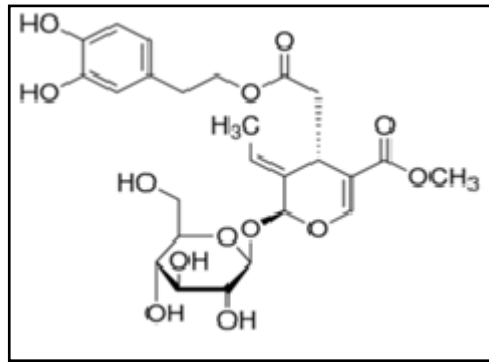
Son zamanlarda yapılan çalışmalar kapsamında meyve ve sebze içeriği zengin olan Akdeniz diyeti beslenme tarzı kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer çeşitli metabolik hastalıkların önlenmesinde başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Akdeniz diyetinin önemli besinlerinden birisi de zeytindir. Günümüzde pek çok araştırmada zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağı gibi ürünler başta olmak üzere bilim insanlarını bu besinlerin potansiyel sağlık etkileri konusunda çalışmalar yürütmektedir (Büyükbacı ve El 2008). Bu kapsamda zeytin yaprağının da Akdeniz ülkelerinde bazı hastalıkların daha az görülme sebeplerine katkı yapan bir faktör olabileceği üzerinde durulmaktadır. Araştırmalar, zeytinyağı kadar, zeytin yaprağı özütlerinden elde edilen bileşenlerin antihipertansif, anti-aterojenik, kardiyoprotektif, hipokolesterolemik, hipoglisemik, anti-viral, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, antioksidan ve anti-kanserojen etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Visioli vd 2002, Büyükbacı ve El 2008, El ve Karakaya 2009, Bouallagui vd 2011). Zeytin ürünlerinin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri yapılarında bulunan çok yönlü biyoaktif bileşenlere dayandırılır. Bu bileşenler polifenoller, tokoferoller, fosfolipitler, karetonoidler, steroller olarak gruplandırılır (Visioli vd 2002). Özellikle kansere olan etkisinin araştırılmaya başladığı son yıllarda zeytinin polifenoller içersinde yer alan oleuropein büyük ilgi görmektedir.

2.2. Oleuropein

2.2.1. Oleuropeinin Biyolojik, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Oleuropein *Oleaceae*, *Gentianaceae*, *Cornaleae* familyalarında ve bunun yanı sıra pek çok diğer bitkilerde bol miktarda bulunan sekoiridoit grubu bir bileşiktir. Oleuropein zeytin yaprağında bulunan en önemli fenolik bileşik olmakla birlikte, ayrıca zeytinyağı ve meyvesinde de bulunmaktadır. Fenolik bileşikler, gıdalarda bulunan ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri kanıtlanmış bileşiklerdir. Bitkisel kökenli hemen hemen tüm gıdalar farklı tiplerde, değişen oranlarda fenolik bileşikler içerirler. Fenolik bileşikler aromatik bir halkaya (benzen) bir veya daha fazla hidroksil gruplarının bağlanmasıyla oluşan moleküllerdir ve oluşan yapı polifenoller olarak da adlandırılırlar. Bitkiler için karakteristik olan bu bileşikler genellikle serbest halde

olmayıp ester veya glikozit formda bulunurlar. Bu bileşikler yağ elde etme işlemi sırasında yağa geçerek yağı oksidasyona karşı korur ve zeytinyağının lezzet özelliğini sağlarlar. Bu bileşikler insan sağlığı için zararlı olan oksidasyon ürünlerinin oluşmasını önlerler. Zeytin yaprağı, meyvesi ve elde edilen yağı, içereği analiz edildiğinde tespit edilen fenolik bileşiklerin başlıca sekoiridoidleri flavonoidler, fenolik asitler ve lignanlardır. Oleuropein, sekoiridoid grubunda yer alan bir fenolik bileşiktir ve moleküler olarak üç alt birimden oluşmuştur. Bu alt birimlerden birincisi, polifenol yapısında olan 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol (hidroksitirizol); ikinci alt birim, molekül elenolik asit ve üçüncü alt birim de glikoz molekülüdür. Hidroliz yoluyla aktif metaboliti olan hidroksitirizole dönüşür. Oleuropein reaktif oksijeni ve nitrojen türlerini uzaklaştırmaktadır (Ersus ve Esen 2008, Armutcu vd 2011, Yıldız ve Uylaşer 2011). Oleuropein ($C_{25}H_{32}O_{13}$), moleküler ağırlığı 540.51 g/mol olan açık sarı görünümülü bir fenolik bileşiktir (Şekil 2.7, Web_5). Oleuropeine ait fiziksel ve kimyasal bazı özellikler Tablo 2.3'de belirtilmiştir.



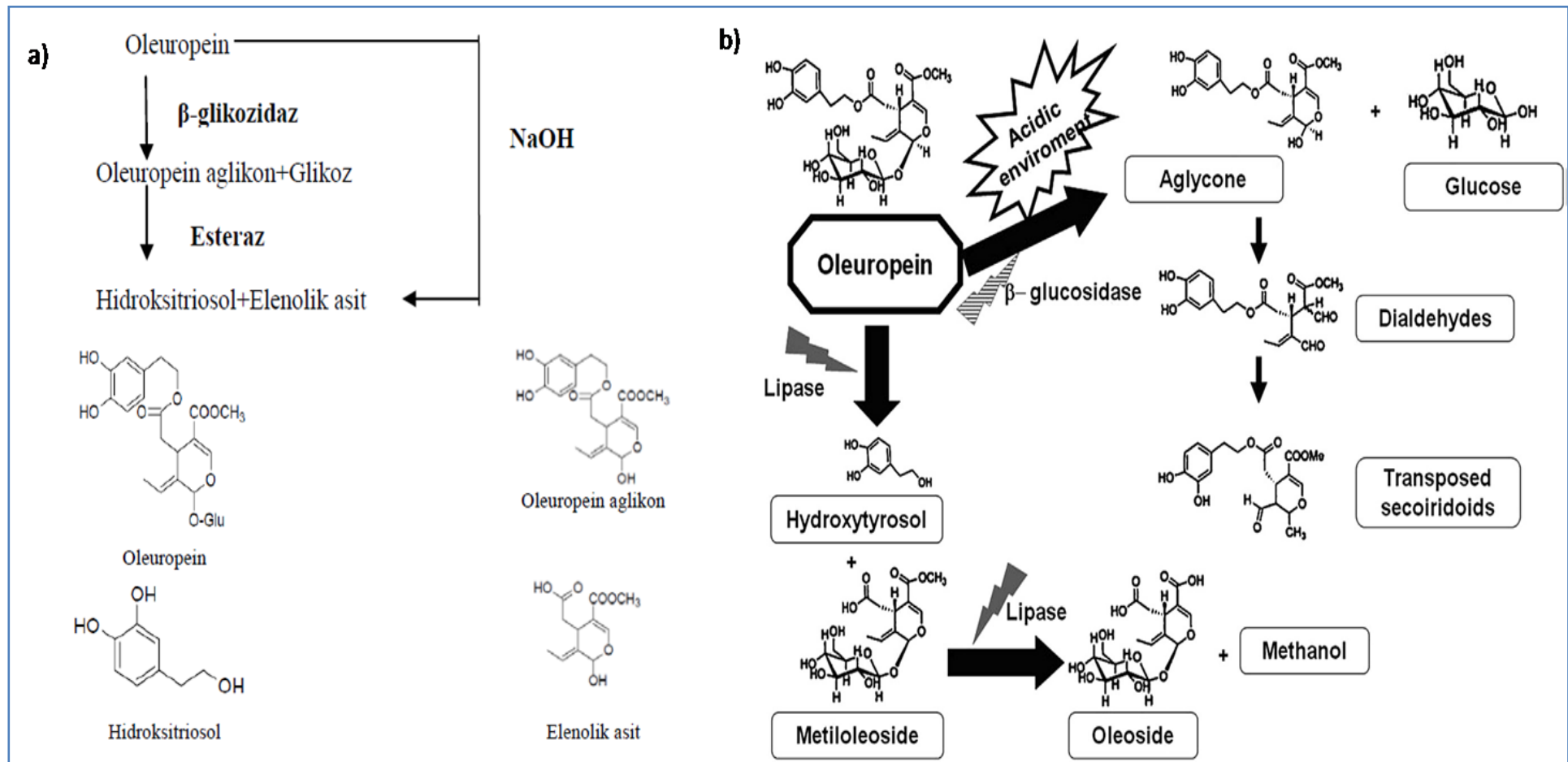
Şekil 2.7 Oleuropein'in kimyasal Yapısı (Web_5)

Tablo 2.3 Oleuropeine ait bazı fiziksel ve kimyasal özellikler (Sigma)

Özellik	
Kimyasal Formül	$C_{25}H_{32}O_{13}$
Kimyasal İsimlendirme	(2S,3E,4S)-3-Ethylidene-2-(β-D-glucopyranosyloxy)-3,4-dihydro-5-(methoxycarbonyl)-2H-pyran-4-acetic acid 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl ester
Alternatif isim-kısaltma	OLE
Moleküler Ağırlık	540.5
Çözünürlük	DMSO, etanol, metanol, DMF, Su
Muhafaza	+4°C
Görünüm-Renk	Açık Sarı

Zeytinin hasattan hemen sonra tüketilebilir nitelikte olmamasından sorumlu olan bu glikozit suda çözünebilme özelliğine sahiptir. Alkali uygulaması, enzimatik yöntem ya da mikroorganizmalarla hidrolize edilerek zeytinden uzaklaştırılabilmektedir (Brenes ve DeCastro 1998). Oleuropein, polifenol yapısında olan 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol (hidroksitrizol); Elenolik asit ve glikoz olmak üzere üç alt yapısal birimden oluşmuştur (Yıldız ve Uylaşer 2011). Oleuropeinin vücuda alındıktan sonraki metabolizması şu şekilde gerçekleşir. Enzimatik hidroliz yöntemiyle oleuropein β -glikozidaz enzim aktivitesiyle glikoz ve oleuropein aglikona parçalanmakta, daha sonra esterez enziminin etkisiyle hidroksitriosol ve elenolik asit oluşmaktadır (Şekil 2.8a, Marsillo ve Lanza 1998).

Oleuropeinin mideye alınması ile birlikte asidik ortam etkisiyle çeşitli metabolitlere ayrılır. β -glukozidaz enzimi ile β -glikozidik bağlar parçalanır ve oleuropein, aglikan ve glukozu ayrıştırır. Daha sonra aglikanlar dialdehitlere parçalanır ve stabil olmayan bu bileşikler, β -glukozidaz enzimi ile lipofilik özellikli transpoz sekoiridoitlere ayrıştırır. Uzun süreli asit etkisi veya güçlü asit etkisi ile bu bileşiklerde iki esteral gruba ayrılarak hidroksitrizol veya metanol fragmenti kaybedilir. Eğer oleuropein gastro-dirençli, midede sindirime uğramayacak şekilde kapsül içinde vücuda verilirse midede herhangi bir hidrolize uğramadan direkt bağırsağa ulaşır ve burada farklı bir kadere sahip olur. Yüksek moleküler ağırlığı ve hidrofilik bileşenleri nedeniyle lipid çift tabakadan veya parasellum kavşaklardan (paracellum junctions) difüze olamaz. Bir glikozit olarak muhtemelen bir glukoz transporter (taşıyıcı) ile giriş yapabilir fakat bu konu ile ilgili olarak yapılmış deney veya bu hipotezi destekleyen çalışma ya da bilimsel veri bulunmamaktadır. Literatürde oleuropeinin farmakokinetikleri açıklayıcı rapor bulunmamakta ve oleuropeinin çok az miktarının değişmeden sistematik sirkülasyona katıldığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, bağırsakta lipaz enzimi yardımıyla hidroksitrizol ve metiloleoside parçalanır. Metiloleosid ise daha sonra lipaz enzimi yardımıyla metanol ve oleosid formuna dönüştürülür. (Furneri vd 2009) Oleuropeinin hidrolizi ile elde edilen bileşikler arasından hidroksitrizol öne çıkmaktadır (Şekil 2.8b) (Carrera-Gonzales vd 2013).



Şekil 2.8 a) Oleuropeinin β -glikozidaz enzimi ile hidrolizi (Marsillo ve Lanza 1998) b) Vücuda alındıktan sonraki metabolizması (Furneri vd 2009)

2.2.2. Oleuropein ve Sağlık Üzerine Etkileri

Oleuropein çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Bunlar; antioksidan; anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-viral, hipoglisemik, anti-kanserojen, anti-hipertansif, hepatoprotektif ve nöroprotektiflik gibi sağlık ile ilgili aktivitelerdir. Tablo 2.4'de oleuropeinin rapor edilmiş farmakolojik özellikleri ve etki mekanizmaları verilmiştir.

Tablo 2. 4 Oleuropeinin farmakolojik özellikleri ve etki mekanizmaları

Aktivite	Etki	Referans
Antioksidan	*Radikal stabilitenin düzenlenmesi *Reaktif oksijen süpürücü etki *LDL oksidasyonunun inhibiasyonu	Omar 2010 Visioli vd 1998 De la Puerta vd 2001
Anti-inflamatuar	*Pro-inflamatuar sitokinlerin sentezinin inhibisyonu ile *Lipoksijenaz inhibisyonu	Giamerellos-Bourboulis vd 1999; Omar 2010 De la Puerta vd 1999
Anti-tümör	*ROS süpürücü etki ile *Antiproliferatif etki *Apoptoz indüklenmesi *Anti-migrasyon etkisi *Anjiyogenez inhibisyonu ile	Owen, vd 2004 Goulas vd 2009; Acquaviva vd 2012; Cardeno vd 2013; Hamdi ve Castellon 2005; Mao vd 2012; Hamdi vd 2003
Hepatoprotektif aktivite	*Steatozis azaltılması *Oksidatif stresi azaltarak	Park S vd, 2011 Domitrovic R vd.2012
Anti-mikrobiyal Etki	*Bakteri hücre membranı üzerinden	Omar vd 2010
Anti-viral	*Viral integraz inhibisyonu ile *Viral zarf etkileşimi ile	Lee-Huang vd 2007 ; Lee-Huang S vd 2007; Micol vd 2005
Nöroprotektif aktivite	*Oksidatif stresi azaltarak *Tau fibrilizasyon inhibisyonu ile	Omar 2010 Daccache vd 2011
Hipoglisemik Etki	*İnsülin düzeyini yükseltip kan glukoz seviyesini azaltarak	Al-Azzawie vd 2006
Anti-hipertansif	*Kan basıncını düşürerek	Khayyal vd 2002; Somava vd 2003

Antioksidanlar, serbest radikaller denilen vücudumuzdaki zararlı maddeleri etkisiz hale getirmeleri ve hücrelerin tahrip edilmesini engellemeleri bakımından son derece önemli maddelerdir. Oleuropeinin süpeoksit ve hidroksil radikallerine karşı temizleyici rolündedir. Glutasyon sistemini kullanarak antioksidan savunma mekanizmalarını pozitif olarak etkiler. Oleuropeinin ve zeytin yaprağı ekstratı içerisinde bulunan polifenollerin hücrelerin oksidasyonuna direnç gösterdiği ve yaşlanmayı geciktirdiğine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Vlahov 1998, Galli ve Visoli 1999). Yapılan bir çalışmada oleuropeinin karaciğer mikrozomlarındaki askorbat- fe^{+2} sistemini etkileyerek non-enzimatik lipid peroksidasyonu üzerinden antioksidan etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Gutierrez 2001). Tutour ve Guedon (1992) tarafından yapılan bir çalışmada da oleuropein ve onun metaboliti olan hidroksitirozolün güçlü bir antioksidan olan vitamin E ile etkileri karşılaştırılmış ve oleuropein ve hidroksitirozolün antioksidan etkilerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tutour ve Guedon 1992).

Oleuropeinin birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar üzerine olan inhibitör etkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Tassou vd 1991, Markin ve Duel 2003, Lee-Huang vd 2003, Micol ve Caturle 2005, Sousa vd 2006). Yapılan bir çalışmada Oleuropeinin hipoglisemik bir ajan olduğu belirtilmiştir. (Lee-Huang vd 2003). Ayrıca kalp hastalıklarına karşı koruyucu ve bağışıklık sistemini güçlendirici olduğu gösterilmiştir (Visioll vd 1998). Yapılan bazı çalışmalarda toksikolojik olarak birçok hayvan türünde oleuropeinin ve metabolitlerinin tam olarak toksik etkisinin olmadığı ortaya koyulmuştur (Gonzales vd 2003).

Oleuropeinin ve türevlerinden hidroksitirozolün kan beyin bariyerini geçebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Dangelo vd 2001, Wu vd 2009, Mohagheghi vd 2011, Luccarini 2014). Bu durum oleuropein ve zeytin içeriğindeki diğer polifenollerin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de potansiyel ajan olabileceği ve bu kapsamda araştırmalar yapılmasını cazip hale getirmektedir. Oleuropeinin beyin ve merkezi sinir sisteminin inme, Alzheimer ve Parkinson gibi yaşa bağlı dejeneratif hastalıkların korunmasında etkisinin olduğu ve etkiyi yangının bastırılması ve oksidatif stresin sebep olacağı tahribatın azaltılması yoluyla gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Beyin dokusunun mikroskopik incelemesinde de benzer şekilde, hasarlı beyin dokusunda ve ölen beyin hücrelerinde %55'lik bir azalmanın olduğu belirtilmiştir (Mohagheghi vd 2011). Araştırmacılar, inme modeli oluşturulmuş hayvanlarda zeytin yaprağı ekstratı ile denenen ön çalışma sonuçlarında olumlu etkiler bulmuşlardır. Ön tedavi görmemiş hayvanlar ile karşılaştırıldığında tedavi görmüş hayvanların

oksidasyon seviyelerinde azalma ve normal hücresel antioksidan aktivitede bariz artış tespit etmişlerdir (Dekanski vd 2011, Khalatbary ve Ahmadvand 2012). Oleuropein ile ön tedavi görmüş deneysel omurilik hasarlı hayvanlardada benzer bulgulara rastlanmıştır (Khalatbary ve Ahmadvand 2012). Zeytin yaprağı ekstraktı ve oleuropeinin nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer, Parkinson) da oksidatif stres üzerinden etki gösterdiği gösterilmiştir. Hayat boyunca süren oksidatif etki zaman içinde katlanmakta ve ortaya çıkan yangı ve diğer değişimler sinir hücrelerinde bir takım anormal proteinlerin birikmesine ve bu birikmeye bağlı olarak nöronların normal çalışmasını bozarak ölümlere neden olabilmektedir. Zeytin yaprağı ekstraktının Alzheimer ve benzeri hastalıklarda nörofibriller karmaşayı proteinler üzerinden etkileyerek azalttığı gösterilmiştir (Bazoti vd 2006, Daccache vd 2011, Rigacci vd 2011). Her ne kadar yapılan sınırlı çalışmalara bulunsa da oleuropeinin beyindeki farmakokinetik detayı ve etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bu kapsamda çok çeşitli ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır (Dangelo vd 2001). Nöroblastom üzerine yapılmış oleuropeinle ilişki çalışma literatürde bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışma ile ilk veriler elde edilmiştir.

Çok sayıda yararlı etkiye sahip olan ve toksik etkisi bulunmayan oleuropeinin kanser hücreleri üzerine herhangi bir etkiye sahip olup olmadığı son yıllarda araştırma konusu olmuştur. 2005 yılında yapılan bir araştırmada oleuropeinin insan ve hayvan deneylerinde anti-tümöral ve anti-anjiyojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (Hamdi ve Costallen 2005). Yapılan bu çalışma ile oleuropeinin hücre büyümesi, migrasyonu ve yayılımını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Hayvan deneyi ile tümör büyümesini çok kısa sürede geriletmiş tespit edilmiştir (Gonzales vd 2002). Monositik lösemi hücre hattı THP-1 ile yapılan bir çalışmada zeytinyağı fenollerinin *Metalloproteinaz 9* ekspresyonunu modüle ettiği ve *NF kappa B* yolağı ile bağlantısını olduğunu rapor edilmiştir (Agli vd 2010). Bir diğer çalışmada, oleuropeinin meme kanseri modeli olan MCF-7 hücre hattında hücre canlılığını azalttığı, hücre proliferasyonunu *ERK1/2* aktivasyonu ile inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Sirianni vd 2010). Ayrıca Kimura ve arkadaşları 2009 yılında, UV ışığı ile irite olmuş deri kanseri modelinde, oleuropein uygulamasının MMP-2, MMP-9, MMP-13, VEGF ve COX-2 genlerinin ifadesini azalttığını bulmuşlardır (Kimura vd 2009). Yapılan başka bir çalışmada MCF-7, T-24 (insan üriner bladder karsinoma) ve BBCE (Bovine Brain kapiller endotel) hücrelerinde zeytin yaprak ekstresinin, güçlü antioksidan özelliği gösterdiği ve hem kanser hem de endotel hücrelerinde hücre proliferasyonunu önlediği bulunmuştur (Goulas vd 2009). Hassan Zeinab ve arkadaşları MCF-7 hücre hattında oleuropeinin apoptozu *Bax* ve *Bcl-2* ekspresyon değişimi ve *p53* yolağı

aracılığıyla indüklediğini rapor etmişlerdir (Havan vd 2013). Köçkar ve arkadaşları Prostat (PC-3), Meme (MCF-7) ve Hepatoma (HEP3B) kanser hücrelerinde oleuropeinin anti-tümör etkisini belirlemeye yönelik yaptıkları *in vitro* çalışmada çeşitli hücre hatlarında farklı dozajlarda oleuropein uygulaması ile anti-proliferatif etkisini belirlemişlerdir (Köçkar vd 2010). A549 akciğer kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada oleuropeinin hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Oleuropeinin A549 hücre hattında, IC₅₀ değeri 59.96 µM olarak tespit edilmiştir (Mao vd 2012). Prostat kanser hücre hatlarında (BPH-1, LNCaP ve DU145) oleuropeinin 100 µl ve 500 µl dozajında zamana bağımlı hücre proliferasyonları araştırılmıştır (Acquaviva 2012). Yakın zaman da yapılan bir çalışmada zeytin ekstratı içerisinde yer alan fenolik bileşenlerin SKBR3 meme kanseri hücre hattında hücre canlılığını engellediği rapor edilmiştir (Quirantes 2013). Drira ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada oleuropein ve hidroksitirosolün 3 T3-L1 hücrelerinde adipozit farklılaşmayı inhibe ettiği gösterilmiştir (Drira vd 2011). Kolon kanser hücre hattı Caco-2 ile yapılan bir çalışmada oleuropeinin Caco-2 hücrelerinde G2/M hücre siklus blokajını indüklediği ve bunu p38 ve CREB aktivitesinin ve COX-2 ekspresyonunun inhibisyonu ile yapıldığı gösterilmiştir (Corano vd 2007). Kolon kanseri ile yapılmış başka bir çalışmada oleuropeinin analjezik, anti-inflamatuar ve anti-kanserojen aktivitesi hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir. Çalışmada HTC116 kolon kanseri hücre hattı ve Atimik nu/nu ratlar kullanılmış ve dozaj çalışmaları yapılmıştır (Fezai vd 2013). Yine wistar sıçanlarında yapılmış bir çalışmada kimyasal kullanılarak hepatosellüler karsinom indüklenmiş sıçan modelinde, oleuropeini hepatoprotektif ve anti-kanser özellikleri incelenmiş ve etkili sonuçlar bulunmuştur (Abdel-Hamid 2011). Kolon kanser ile 2013 HT-29 hücre hattında oleuropeinin etkisi ile ilgili bir çalışma sonucunda hücre proliferasyonuna etkisinin HIF-1α downregülasyonu aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (Cardeno 2013). Oleuropein ile ilgili tüm kanser çalışmaları Tablo 2.5'de toplu olarak özetlenmiştir.

Tablo 2.5 Oleuropein'in ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* anti-kanserojen çalışmaları

Hücre Hattı	Kanser Tipi	Aktivite-Etki Mekanizması	Referans
MCF-7	Meme Kanseri	<i>ERK1/2</i> üzerinden ¹ ; <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> , <i>p-53</i> üzerinden ² ; <i>kaspaz-3</i> , <i>Siklin D1</i> , <i>NFkB</i> ³	Srianni vd 2010 ¹ ; Hassan vd. 2013 ² ; Elamin vd 2013 ³
MDA-MB-231	Meme Kanseri	<i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> , <i>TIMP1,3,4</i>	Hassan vd 2012
SKBR3	Meme Kanseri	<i>GPB/GR30</i>	Chiment vd 2014
HT-29, SW620	Kolon Kanseri		Notarnikola 2011
HTC 116	Kolon Kanseri		Fezai vd 2013
CaCO2	Kolon Kanseri	<i>p38</i> , <i>CREB</i> , <i>COX2</i>	Corono vd 2007
HT-29	Kolon Kanseri	<i>HIF1-α</i> , <i>p53</i> , <i>PPARγ</i> , <i>IκBα</i> , <i>pJNK</i>	Cardeno 2013
LNCaP, DU145	Prostat Kanseri		Acquiaviva 2012
A549	Akciğer Kanseri		Moa vd 2012
TPC-1, BCPAP	Tiroid Kanseri	<i>Erk/Akt</i>	Bulotta vd 2013
HeLa	Serviks Kanseri	<i>JNK</i> aktivasyonu	Yao vd 2014
THP-1	Monositik Lösemi	<i>MMP-9</i> , <i>NFkB</i>	Agli vd 2010
K562	Kronik Myeloid Lösemi		Samet vd 2014
RPMI 7951	LN18		Hamdi ve Costallen 2005
LN 18	Glioblastoma		Hamdi ve Costallen 2005
Hayvan Deneyi			
Atimik nu/nu sıçan	Kolon Kanseri Modeli		Fezai vd 2013
Wistar sıçan	Hepatosellüler Karsinoma Modeli		Abdel-Hamid 2013
Fare	Deri Kanseri	<i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> , <i>MMP-13</i> , <i>COX-2</i> , <i>VEGF</i>	Kimura vd 2009

Akdeniz bölgesinde oldukça sık kullanılan bir besin olan zeytinin yaprağındaki etken madde olan oleuropeinin sağlık üzerine etkileri insanlarda umut verici olmasına rağmen, çeşitli hastalıklarda ve özellikle kanser türlerinde tedavide kullanılabilecek en uygun dozun tayin edilmesi gerekmektedir. Çeşitli dozlarda güvenlik profili önce hücre düzeyinde *in vitro* olarak daha sonrada hayvan deneyleriyle organizma düzeyinde incelenerek kliniğe uygun bir şekilde kullanılabilecek farmositik ajan olarak katkı yapabilecektir. Çeşitli kanser türleri ve hücre hatlarında etkisi ortaya çıkarılmış olan biyolojik olarak oldukça etkili, antioksidan içeriği yüksek ve vücuda toksik etkisi olmadığı gösterilmiş olan oleuropeinin, beyin tümörleri üzerine etkisi bilinmemektedir. Diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma hipertansiyon ve çeşitli metabolik hastalıklar üzerine etki gösterdiği bilinen oleuropeinin nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisine yönelik yapılan araştırma sayısı oldukça azdır.

2.3. Hipotez

Günümüzde biyolojik bileşenlerin kullanımı ve çeşitli hastalıklarda tedavi ajanı olabileceğine yönelik ilginin artması ile birlikte çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler ve türevleri ile yapılan çalışmalar artmıştır. Çalışmamızda zeytin bitksinin major fenolik bileşeni olan oleuropein kullanılmıştır. Antioksidan içeriği oldukça yüksek olan oleuropeinin literatür taramalarında anti-mikrobiyal, antioksidan, anti-hipertansif, anti-kanserojen bir ajan olduğuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Çeşitli kanser türlerinde *in vitro* ve *in vivo* yapılan araştırmalar oleuropeinin anti-kanserojen etkinliğini ve tedavide rol alabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmadaki hipotezimiz, oleuropeinin bir beyin tümörleri olan nöroblastom hücrelerinde hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücresel mekanizmalar üzerinden etki gösterdiği ve ayrıca hücre invazyonunu ve koloni oluşumunu etkileyeceğidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Kitler

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Tween 20 (BioShop), Skim Milk (BioShop), Magnesium Chloride (BioShop), 2-Mercaptoetanol (Merck), Bromfenol Mavisi (BioShop), Dietanolamin (BioShop), BCIP (BioShop), Fenazin metosülfat (BioShop), Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (BioShop), Etanol (Riedel), Tris (BioShop), Hidroklorik asit (HCl) (Sigma), Akrilamid (Sigma), Sodyum bikarbonat (Riedel), Amonyum persulfat (Sigma), Coomassie Pırlanta Mavisi (BioShop), Asetik Asit (Merck), N,N-Metilenbisakrilamid (Sigma), Glisin (BioShop), Oleuropein (Sigma), Akrilamid (Sigma), Kloroform (Sigma), 2-propanol (Sigma), Amonyum persulfat (Sigma), Trizol (Ambion), Matrigel Invasion Chamber (BD Biosciences.), Fötal Sığır Serumu (Sıcaklık ile inaktive edilmiş) (Biological Industries), Kristal Viyole (BioShop), Hoechst (Sigma), Penisilin/Streptomisin (Biological Industries), DMEM F-12 Medium (Biological Industries), PBS (Biological Industries), Tripan Mavisi Boyası (%0,5 (w/v) fizyolojik tuz içinde), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Roche) (Santa Cruz), DNAaz/RNAse free su (Invitrogen), Steril kültür kapları (Petri), (Greiner) 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Greiner) 96-Kuyucuklu PCR Array Plate (Qiagen)

Bu çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik derecede ve yüksek saflıkta olacak şekilde ticari kaynaklardan elde edilmiştir.

Çalışmalarda Kullanılan Kitler:

XTT proliferation Kit (Biological Industries), Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Tunel In Situ Cell Detection Kit (Roche), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (RocheDiagnostics),

Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar:

CO₂'li inkübatör (Nuaire), Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow (Nuaire), İverted Mikroskop (Olympus), Floresan Mikroskop (Olympus), Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik) (Biohit), Hassas Terazi (Denver Instrument), Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo), Jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging System), Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Mikro Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Yatay Elektroforez Seti (BioRad), Dikey Elektroforez Seti (Wealtec), RT- PCR (Applied Biosystems StepOnePlus), -20 Derin Dondurucu (BEKO), No Frost Buzdolabı (BEKO), Ph metre (Metler Toledo MP 220), Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (IKA RH basic 2), Otoklav (Nuve), Vorteks(IKA Yellow Line), Güç Kaynağı(Bio-Rad), Mikrodalga Fırın (BEKO MD1500), Hücre sayıcı (Cellometer)(Nexcellum), -80°C Dondurucu (Nuaire)

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda hücre kültürü kullanılarak *in vitro* koşullarda SH-SY5Y (ATCC® : CRL-2266[™]; Şekil 3.1) nöroblastom hücre hattı kendi stoklarımızdan kullanılmış olup, deneyler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan SH-SY5Y hücre hattına ait bazı özellikler şu şekildedir (Web_6);

Organizma: İnsan, (*Homo sapiens*)

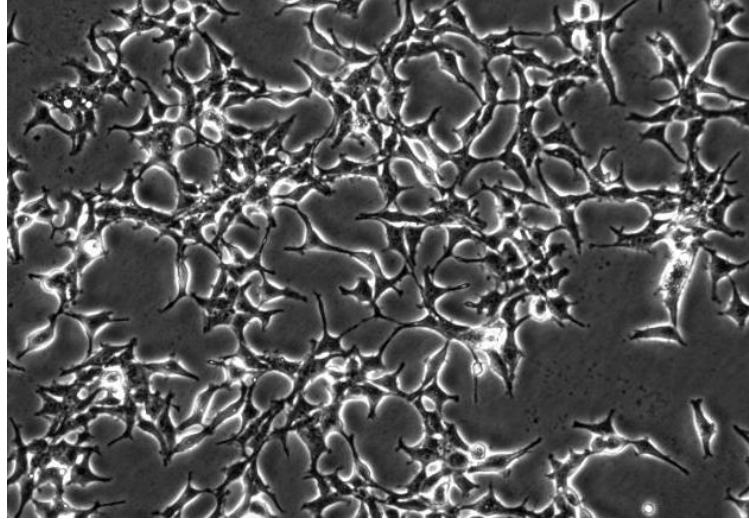
Tipi: Nöroblastom

Elde edildiği doku: Kemik iliği

Cinsiyet-Yaş: Dişi- 4

Büyüme Özelliği: Yapışarak

Hücreye ait diğer özellikler: Epitelyal Morfoloji, MYCN⁻ (negatif)



Şekil 3.1 Çalışmamızda kullanılan SH-SY5Y hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (X10)

Oleuropeinin, SH-SY5Y nöroblastom hücre hattındaki biyolojik etkilerini anlayabilmek amacıyla çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinin rutin kültür basamakları;

- hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması ve pasajlanması,
- ekim için sayılması ve kullanılacak kültür plakalarına ekilmesi,
- dondurulması ve çözülmesini kapsamaktadır.

In vitro koşullarda yapılan hücre kültürü çalışmaları için kullanılan hücre besi ortamı, hücreleri *in vitro* koşullarda yaşatabilecek, büyüme ve bölünmelerine uygun zemini sağlayacak ve hücrelerin bunlar için gereksinim duyduğu maddeleri içerecek düzeyde olmalıdır. Bu kapsamda çalışmamızda kullanılan besi ortamı %10 fetal siğir serum (FBS), %1 L-glutamin, 100IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren DMEM F12 besi yeridir. Hücre hattının büyümesi için kullanılan besi yeri detayları Tablo 3.1'de belirtilmiştir. Hücrelerin proliferasyonu, pasajlanmaları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlenmiş ve hücreler kendileri için uygun kültür ortamı olan 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmişlerdir.

Tablo 3.1 Hücre hattının büyümesi için kullanılan besiyeri detayları:

Hücre Dizinlerinin Büyümesi için Kullanılan Besiyeri Detayları:
• DMEM F12 L-Glutamine (01-025-1A, Biological Industries)
• %10 FBS (Yeni Doğan Siğir Serum) (04-121-1B, Biological Industries)
• 0.1mM Aminoasit solusyonu (01-340-1B, Biological Industries)
• 2mM Glutamin (03-020-1B, Biological Industries)
• 1mM Sodyum Piruvat (03-042-1B, Biological Industries)
• 100U/0.1mg Penisilin/Streptomisin (03-031-1C, Biological Industries)

SH-SY5Y hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması işleminde; hücreler DMEM-F12 besi yeri ile petri kaplarına ekilmiş ve 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde iki günde bir besi ortamları tazelenerek inkübe edilmiştir. Hücreler monolayer olup tutunarak üremektedir. Bu hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden ayrılması gerekir. Önce petrilere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilip ölü hücrelerden ve hücre atıklarından iyice arındırılıp aspire edildikten sonra tripsin ilave edilerek hücrelerin petri yüzeyinden kalkması sağlanmıştır. Petri içerisindeki hücre-ortam karışımı 15 ml'lik falkonlara alınıp 1500g'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak çöken hücreler besi yerinde homojenize edilerek uygun oranda petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yeniden petriye yapışarak çoğalmalarının sağlanması için inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin sayılması işleminde tripan mavisinden yararlanılmıştır. Tripan Mavisi sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Ölü hücreler mavi (boya almış) ve canlı hücreler (boya almamış) olarak görülür. Deneylerin standardizasyonunu sağlayabilmek amacıyla tüm deney basamaklarında hücre sayımları yapılarak ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda hücreler Hücre sayar (Cellometer) (Nexellum) cihazı yardımıyla sayılmıştır. Hücreler petri kabından tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra üzerine besi yeri eklenmiştir. Ependorfta, 400 µl PBS, 100 µl hücre süspansiyonunun içine 1 µl tripan mavisini eklenerek hücreler 5 kat dilüe edilmiştir. Bu karışımdan 20 µl alınarak cellometer lamına eklenmiştir. Böylece canlı ve ölü hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu aşama hücre ekimi yapılacak her bir deney testi için ayrı ayrı yapılmış ve çalışmaya göre çeşitli sayılarda ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

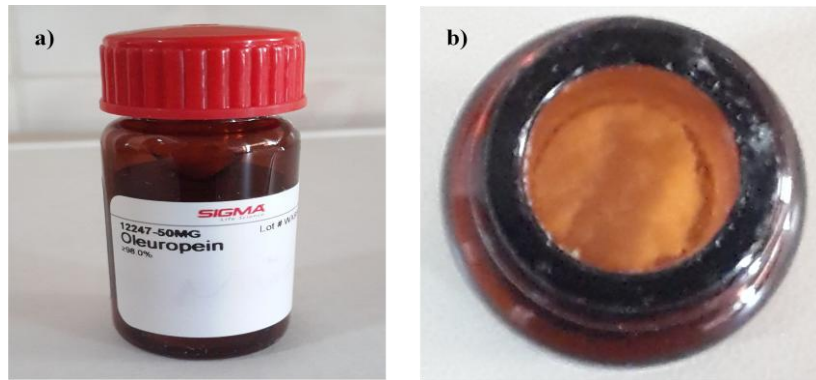
Hücrelerin dondurularak saklanması işlemi kriyotüpler içerisinde DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin dondurulması, tripsinizasyon ve santrifüj basamaklarından sonra 1,5 ml hacimli kriyotüplere, 9:1 oranında besi yeri ve DMSO (%10 DMSO) olacak oranda hücre süspanse edilerek koyulmuştur. Resüspanse edilerek kriyotüplere konulan hücreler daha sonraki çalışmalar için -80 derecede muhafaza edilmiştir.

Dondurulmuş hücrelerin yeniden çözülüp ekilmesi işlemleri; dondurulan kriyotüpteki hücrelerin hızlı bir şekilde 37°C de su banyosunda çözülüp biraz da taze besi yeri eklenerek önce falkona alınıp santrifüj işlemi ile DMSO içeren besi yeri

uzaklaştırılıp yeni besi yeri eklenmesinden sonra kültür kaplarına ekilmesi ve uygun kültür şartlarında inkübe edilmesi şeklinde yapılmıştır.

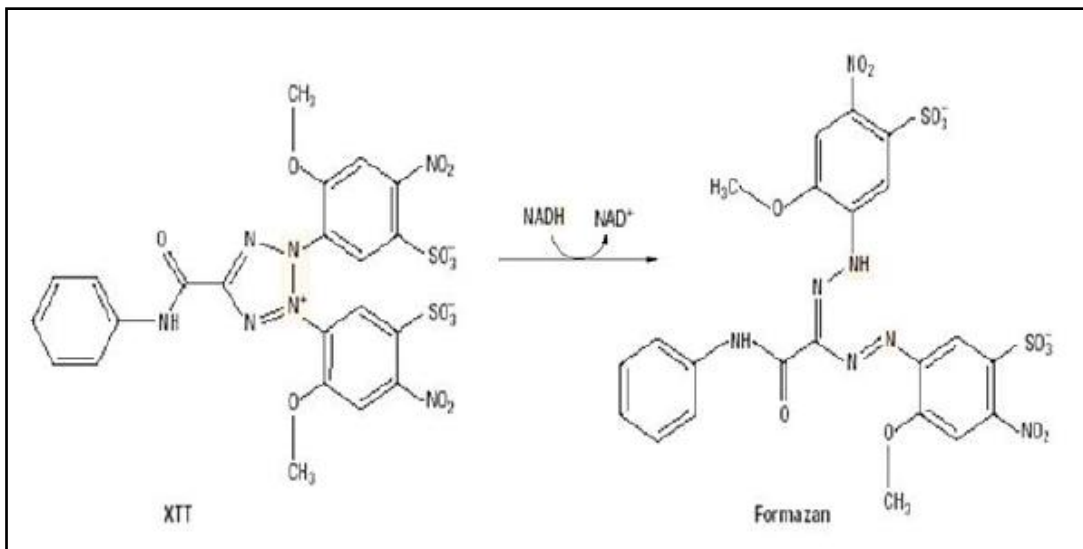
3.3. XTT Testi (Hücre Canlılığı Testi)

Oleuropeinin değişen dozlarda SH-SY5Y hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin yüzde ellisinin (%50) yaşadığı dozu bulmak için XTT ile, hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan oleuropein %98 saflıkta olacak şekilde ticari olarak Sigma firmasından satın alınmıştır (Şekil 3.2 a,b).



Şekil 3.2 a) Çalışmada kullanılan oleuropein; b) Toz görünümü

Bu test suda eriyebilen bir bileşik olan XTT (2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'yi canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibine göre işlemektedir (Şekil 3.3, Web_7).



Şekil 3.3 XTT'nin formazana dönüşümü (Web_7)

Suda eriyebilir özellikte olan boyanın yoğunluğu bir spektrometre ile verilen dalga boylarında okutulmakta ve metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan formazon oluşumu sayesinde hızlı bir şekilde hücre canlılığı testi sonuçlarının değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Oleuropeinin sitotoksitesisi ve doz ve zamana bağlı etkisi “Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)” ile yapılmıştır. Toz halinde bulunan oleuropein (Sigma) çeşitli dozlarda %10 serumlu tam besi ortamında binde bir oranında DMSO içinde çözülmüş ve konsantrasyonları ayarlanarak (25 µM ve 800 µM arası) etkisi araştırılmıştır. Seçilen konsantrasyon aralığı literatür bilgileri dikkate alınarak belirlenmiştir. Test kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

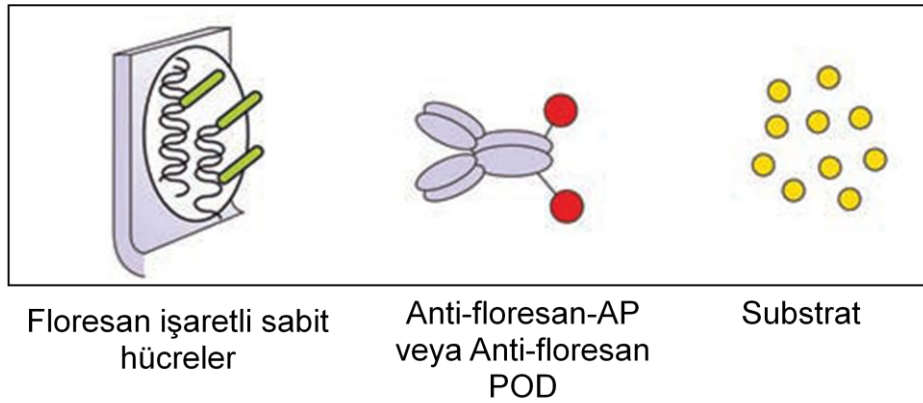
SH-SY5Y nöroblastom hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında 1×10^4 /kuyucuk miktarında ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenmiştir. 25 µM, 40 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM, 175 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM, 350 µM, 400 µM, 500 µM, 700 µM ve 800 µM'lık çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı ile hazırlanmıştır. Kontrol kuyucukları dışında oleuropein gruplarına 100 µl içindeki son konsantrasyonları yukarıdaki dozlarda oleuropein ilave edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonda oleuropein uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu “Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)” ile saptanmıştır. Aynı zamanda zamana bağımlı etkinin araştırılması amacıyla test işlemi 24, 48 ve 72. saatlerde çalışılmıştır. Bu saatler sonunda her bir kuyucuğa 100 µL ortam koyulduktan sonra 50 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu (49 µL XTT Reagent Solüsyonu ve 1 µL Aktivatör Solüsyonu) eklenmiştir. Madde eklenmesinden 4 saat sonra çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak IC_{50} oranı belirlenmiştir.

Ölçülen optik dansite değeri:

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

3.4. TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanımlanması sağlayan TUNEL testi hücrelerde apoptozun saptanmasında kullanılan bir metottur. DNA fragmentasyonu apoptozun terminal evresini gösteren bir olaydır ve hücre içi endonükleazların aktivitesi ile gerçekleşir. İlerlemiş DNA fragmentasyonu sonucunda DNA'da tek ve çift zincir kırıkları meydana gelmekte ve bu zincir kırıklarının *in situ* floresans veya kolorimetrik olarak belirlenmesi, TUNEL ismi verilen histokimyasal analiz ile yapılabilmektedir. TUNEL kısaltması, İngilizce orijinal ismi olan "Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling" geçen kelimelerden elde edilmektedir. DNA kırıklarının 3'-OH terminaline floresan işaretli nükleotidler "terminal deoxynucleotidyl transferase" enzim kabiliyetinin eklenmesiyle floresan mikroskop altında, bu DNA kırıkları görülebileceği gibi aynı zamanda bu floresan işaretlere HRP bağlı antikorlar bağlanarak da kolorimetrik olarak belirlenebilir (Şekil 3.4, Web_8).



Şekil 3.4 DNA kırıklarının TUNEL ile işaretlenmesi (Web_8)

Çalışmamızda Roche In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Cat. No. 11 684 817 910) kullanılmıştır. TUNEL testi için hücreler, 8 odacık içeren lamlara (BD Falcon Culture Slides; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue culture treated Glass Slide) ekilmiştir. Her bir odacığa içine 4×10^3 hücre olacak şekilde 4 kontrol ve 4 adet oleuropein doz grubu hücreler eklenmiş ve etkili bulunana doz ve zaman aralığında ($350 \mu\text{M}$ ve 48 saat) hücreler inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besi yeri aspire edilmiş ve PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kit protokolüne göre;

- Odacık başına $500 \mu\text{l}$ olacak şekilde fiksasyon solüsyonu (%4 Paraformaldehit içeren PBS, 7,4 pH) ile bir saat inkübasyon
- PBS ile yıkama
- $350 \mu\text{l}$ bloklama solüsyonu (metanol içerisinde %3 H_2O_2) ile inkübasyon, 10 dakika
- PBS ile yıkama işlemi

- buz üstünde iki dakika süre ile permeabilizasyon solüsyonu (%0,1 Triton-X-100 olacak şekilde sodyum sitrat çözeltisi) ile muamele
- Tekrar PBS ile yıkama
- Her bir odacığa 1,7 µl enzim (vial 1) ve 15,3µl label solüsyonu (vial 2) olacak şekilde 17 µl kit solüsyonu karışımı ile muamele, 1 saat inkübasyon
- Tekrar PBS ile yıkama işlemleri sırasıyla gerçekleştirilmiştir.
- Boyama inkübasyonun bitimini takiben yıkama işleminden sonra üzerlerine 10µl PBS içinde Hoechst 33332 (100 µg/ml) içeren %50 gliserol eklenmiş ve camlar lam üzerine olacak şekilde lamel kapatıldı.
- Görüntüleme, floresan mikroskopta yapılmıştır. Lameldeki çeşitli alanlarda apoptotik ve canlı hücrelerin sayımı yapılarak oranlama gerçekleştirilmiştir.

3.5. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu Trizol Reagent ile gerçekleştirilmiştir.

- 3×10^6 hücre olacak şekilde 6'lık well plakalara hücre ekimi,
- Kontrol grubu ve oleuropeinin XTT ile tespit edilen IC_{50} dozu ve zamanı (350 µM, 48 saat) kadar madde uygulaması ve inkübasyon,
- Hücreler 6'lık kültür kaplarından bir plaka başına 500 µl olacak şekilde Trizol ve scraper kazıyıcı ile hücreler tamamen kaldırılıp, ependorf tüplere (1 ml'lik) transferi (dondurulmuş ise yaklaşık 10 dk çözülmesi için inkübasyon),
- Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübasyon,
- Soğutmalı santrifüj ile $+4^{\circ}C$ ' de 15.000 g'de 20 dk santrifüj ve renksiz olan üst fazın toplanıp, ayrı ependorf tüplere alınması,
- Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenip, pipetlenmesi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon,
- $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 g'de 30 dk santrifüj
- Peletin üzerine %70'lik etanol konulması ve $+4^{\circ}C$ 'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj,
- Süpernatant atılıp, pelet kısa bir süre hava ile kurutulması,
- Pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözünmesi basamaklarını içerir.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Termo) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000

ng/ μ l'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1 μ l RNase free su ile Nanodrop cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde pipetlenip ve bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1 μ l olacak şekilde pipetlenip 230, 260,280 nm'de okunmuştur.

3.6. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (CatNo: 05 081 955 001) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım prosedürü Tablo 3.2'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 50°C' de 1 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.2 cDNA sentez karışımı

	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2 μ g
Oligo(dT) Primer	1 μ l	2,5 μ M
dNTP karışımı (10 mM)	1 μ l	500 μ M
5X RT tamponu	4 μ l	1X
DTT	1 μ l	5mM
Protector RNase Inhibitör	0,5 μ l	20 U
Easyscript plus RTase (200U/μL)	1 μ l	200 ünite
RNAaz içermeyen su	Değişken	-
Son hacim	20 μ l	-

3.7. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR)

Gerçek zamanlı PZR, gen ekspresyon ürününün kantitasyonu amacıyla kullanılan hassas moleküler bir metottur. Bu yöntem sayesinde, RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı PZR/RT-PZR'da

ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, PZR ürününün mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Bu çalışmada da 96 kuyucuklu mikroplaka okuyabilen Gerçek Zamanlı PZR sistemi kullanılmıştır.

Oleuropein muamelesi sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, hücre döngüsünde rol alan genlerin RNA düzeyindeki ekspresyonları “Real Time Custom Panel” kullanılarak belirlenmiştir. İlgili hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış ve takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi tespit edilmiştir. Sonrasında, total RNA'lardan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili panel hücre döngüsünde ve apoptozda rol alan genleri içerecek şekilde custom olarak belirlenmiştir. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak Gerçek-Zamanlı PZR ile analiz yapılabilmektedir. Ayrıca, her panelde referans–housekeeping genler PZR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değişikliği analiz etme imkânı sağlamaktadır. PZR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan LightCycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmiştir. Bunun için önce konsantrasyonları bilinen GAPDH ve diğer housekeeping genlerin bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmuştur. Çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA'nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlenmiştir. İlk olarak, hedef miktarı; hedef (T) gen kopyalarının housekeeping (H) gen kopyalarına oranı şeklinde ölçülmüştür. İkinci basamakta, örnekteki hedefin housekeeping gen kopyalarına oranı (T/H), her reaksiyonda koşulan kontrol RNA'nın T/H oranına bölünmesi ile elde edilmiştir. Sonuçlar, örnekteki T/H oranını ifade etmektedir. Uygulanan PZR protokolü; aşağıda detaylandırılmış olan Denatürasyon, Amplifikasyon ve Soğutma aşamalarını içermektedir. Gerçek-Zamanlı PZR koşulları Tablo 3.3'de verilmiştir.

Step One Plus Real-time PCR System, gerçek zamanlı bir PCR cihaz olup, amplifikasyon ürünlerinin artışı eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Oldukça hızlı ısıtma ve soğutma kapasitesi sayesinde, tek bir grup için aynı anda 96 gen ekspresyonuna 30–45 PCR döngüsü, yaklaşık olarak bir buçuk saat içinde yapılabilmektedir. Sistemde, SYBR Green metodu kullanılmıştır. SYBR Green boyası çift sarmal DNA'nın küçük girintisine bağlanan ve oldukça uzun süre dayanıklılığını kaybetmeyen bir boyadır (30 amplifikasyon döngüsü sonrası aktivitesinin yalnızca %6'sını kaybeder). Ancak bu çalışmada kullandığımız modifiye edilmiş SYBR Green boyası DNA'nın hem büyük hem de küçük girintisine bağlanmaktadır. Uyarılma ve ışık saçma dalga boyları light cycler'ın optik filtre setine uymaktadır. Amplifikasyon öncesi

reaksiyon karışımı denatüre edilmiş DNA'yı, primerleri ve boyayı içerir. Bağlanmamış olan boya az miktarda florasan yayarak, daha sonraki bilgisayar analizlerinden çıkartılan, minimum arka fon florasan sinyalinin oluşturur. Primerlerin bağlanması ile az sayıdaki boya moleküllü çift sarmal DNA'ya bağlanır. DNA'ya bağlanması, SYBR Green moleküllerinin uyarılma sonucu ışık saçmalarını etkili şekilde artmasına neden olur. Uzama aşaması esnasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanır. Reaksiyon devamlı denetlenerek, florasadaki artış eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından izlenir. Diğer döngünün ısıtma basamağında DNA denatüre edildiğinde boya molekülleri serbest kalır ve florasan sinyali düşmektedir.

Gerçek zamanlı RT-PZR ile kontrol grubu ve 350 µM oleuropein uygulanmış doz grubu arasındaki hücre döngüsünde rol alan genlerin ekspresyonlarının nasıl değiştiği custom olarak dizayn edilen plaka ile belirlenmiştir (Qiagen Sciences, RT² Profiler™ PCR Array Human Cell Cycle, PAHS-020ZC;Tablo 10). Primerlerin gömülü olduğu plakalar için Real-Time PZR'da reaksiyon karışımı oranı, her 96 kuyucuklu plaka için 750µl Sybr Green Master Mix, 60 µl cDNA ve 680 µl de RNase free su şeklinde hazırlanıp her bir kuyucuğa 15 µl olacak şekilde çoklu mikropipet yardımıyla plakalara yüklenmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.3 Gerçek Zamanlı PZR koşulları

Denatürasyon		
Döngü Programı Verileri		Değer
Döngü		1
Analiz Modu		-
Hedef Dereceleri		Segment 1
Hedef Derece (°C)		95
İnkübasyon zamanı (sn)		600
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/sn)		20.0
İkinci hedef derece (°C)		0
Basamak derecesi (°C)		0.0
Döngüler		0
Kazanç modu		-
Amplifikasyon		
Döngü Programı Verileri		Değer
Döngü		40
Analiz Modu		Kantitasyon
Hedef Dereceleri	Segment 1	Segment 2
Hedef Derece (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (sn)	15	60
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)	20.0	20.0
İkinci Hedef Derecesi (°C)	0	0
Basamak derecesi (°C)	0.0	0.0
Döngüler	0	0
Kazanç modu	-	Tek
Soğuma		
Program Verileri		Değer
Döngü sayısı		1
Analiz Modu		-
Hedef Dereceleri		Segment 1
Hedef Derece (°C)		40
İnkübasyon Zamanı		30
Sıcaklık Transisyon Oranı (°C/san)		20.0
İkinci Hedef Derece (°C)		0
Basamak derecesi (°C)		0.0
Döngüler		0
Kazanç modu		-

Tablo 3.4 Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımı

Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Karışımı (96 kuyucuklu plaka için; bir reaksiyon)	
Sybr Green Master Mix	750 µl
CDNA	60 µl
RNase Free Su	680 µl
Son Hacim	1490 µl

Çalışma ekspresyonları analiz edilen genlerden hücre döngüsü ile ilgili olanlar plaka Tablo 3.7 de ve apoptozla ilişkili genlerin olduğu panel (Qiagen Sciences, RT² Profiler™ PCR Array Human apoptosis, PAHS-012ZC; Tablo 3.6 ve Tablo 3.8)' te belirtilmiştir.

Tablo 3.5 Çalışmada kullanılan hücre döngüsü genlerinin plate düzeni

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1	ANAPC2	ATM	ATR	AURKA	AURKB	BCCIP	BCL2	BIRC5	BRCA1	BRCA2	CASP3
B	CCNA2	CCNB1	CCNB2	CCNC	CCND1	CCND2	CCND3	CCNE1	CCNF	CCNG1	CCNG2	CCNH
C	CCNT1	CDC16	CDC20	CDC25A	CDC25C	CDC34	CDC6	CDK1	CDK2	CDK4	CDK5R1	CDK5RAP1
D	CDK6	CDK7	CDK8	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2A	CDKN2B	CDKN3	CHEK1	CHEK2	CKS1B	CKS2
E	CUL1	CUL2	CUL3	E2F1	E2F4	GADD45A	GTSE1	HUS1	KNTC1	KPNA2	MAD2L1	MAD2L2
F	MCM2	MCM3	MCM4	MCM5	MDM2	MKI67	MNAT1	MRE11A	NBN	RAD1	RAD17	RAD51
G	RAD9A	RB1	RBBP8	RBL1	RBL2	SERTAD1	SKP2	STMN1	TFDP1	TFD2	TP53	WEE1
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tablo 3.6 Çalışmada kullanılan apoptoz genlerinin plate düzeni

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1	AIFM1	AKT1	APAF1	BAD	BAG1	BAG3	BAK1	BAX	BCL10	BCL2	BCL2A1
B	BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11	BCL2L2	BRAF	BID	BIK	BIRC2	BIRC3	BIRC5	BIRC6	BNIP2
C	BNIP3	BNIP3L	BRAF	CASP1	CASP10	CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7
D	CASP8	CASP9	CD27	CD40	CD40LG	CD70	CFLAR	CIDEA	CIDEB	CRADD	CYC5	DAPK1
E	DFFA	DIABLO	FADD	FAS	FASLG	GADD45A	HRK	IGF1R	IL10	LTA	LTBR	MCL1
F	NAIP	NFKB1	NOD1	NOL3	PYCARD	RIPK2	TNF	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF11B	TNFRSF1A	TNFRSF1B
G	TNFRSF21	TNFRSF25	TNFRSF9	TNFRSF10	TNFSF8	TP53	TP53BP2	TP73	TRADD	TRAF2	TRAF3	XIAP
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tablo 3.7 Hücre Döngüsü Gen Listesi: RT² Profiler PCR Array

Pozisyon	Sembol	Tanım
A1	ABL1	C-abl Onkogen 1, Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz
A2	ANAPC2	Anafaz Teşvik Edici Kompleks Altünite 2
A3	ATM	AtaxiaTelangiectasia Mutasyonu
A4	ATR	AtaxiaTelangiectasia ve Rad 3 İlişkili
A5	AURKA	Aurora Kinase A
A6	AURKB	Aurora Kinase B
A7	BCCIP	BRCA2 ve CDKN1A Etkileşimli Protein
A8	BCL2	B-hücre KLL/lenfoma 2
A9	BIRC5	Boculoviral IAP Tekrarlı 5
A10	BRCA1	Meme Kanseri 1,Erken Başlangıçlı
A11	BRCA2	Meme Kanseri 1,Erken Başlangıçlı
A12	CASP3	Kaspaz 3, Apoptoz İlişkili Sistein Peptidaz
B1	CCNA2	Siklin A2
B2	CCNBI	Siklin B1
B3	CCNB2	Siklin B2
B4	CCNC	Siklin C
B5	CCND1	Siklin D1
B6	CCND2	Siklin D2
B7	CCND3	Siklin D3
B8	CCNE1	Siklin E1
B9	CCNF	Siklin F
B10	CCNG1	Siklin G1
B11	CCNG2	Siklin G2
B12	CCNH	Siklin H
C1	CCNT1	Siklin T1
C2	CDC16	Hücre Bölünme Döngüsü 16 Homolog (S. <i>cerevisiae</i>)
C3	CDC20	Hücre Bölünme Döngüsü 20 Homoloğu (S. <i>cerevisiae</i>)
C4	CDC25A	Hücre Bölünme Döngüsü 25 Homoloğu A (S. <i>pombe</i>)
C5	CDC25C	Hücre Bölünme Döngüsü 25 Homoloğu C (S. <i>pombe</i>)
C6	CDC34	Hücre Bölünme Döngüsü 34 Homoloğu (S. <i>cerevisiae</i>)
C7	CDC6	Hücre Bölünme Döngüsü 6 Homoloğu (S. <i>cerevisiae</i>)
C8	CDK1	Siklin Bağımlı Kinaz1
C9	CDK2	Siklin Bağımlı Kinaz2
C10	CDK4	Siklin Bağımlı Kinaz4
C11	CDK5R1	Siklin Bağımlı Kinaz 5, Düzenleyici Altünite 1 (p35)
C12	CDK5RA P1	CDK5 Düzenleyici Altünite ile İlişkili Protein 1
D1	CDK6	Siklin Bağımlı Kinaz 6
D2	CDK7	Siklin Bağımlı Kinaz 7

"Devamı arkada"

Tablo 3.7 Hücre Döngüsü Gen Listesi: RT² Profiler PCR Array

Pozisyon	Sembol	Tanım
D3	CDK8	Siklin Bağımlı Kinaz 8
D4	CDKN1A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A (p21, CIP1)
D5	CDKN1B	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (p27, KIP1)
D6	CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A (p16, CDK4 inhibitörü)
D7	CDKN2B	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2B (p15, CDK4 inhibitörü)
D8	CDKN3	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 3
D9	CHEK1	CHK1 Kontrol Noktası Homoloğu (S. pombe)
D10	CHEK2	CHK2 Kontrol Noktası Homoloğu (S. pombe)
D11	CKS1 B	CDC28 Protein Kinaz Düzenleyici Altünite 18
D12	CKS2	CDC28 Protein Kinaz Düzenleyici Altünite 2
E1	CUL1	Cullin 1
E2	CUL2	Cullin 2
E3	CUL3	Cullin 3
E4	E2F1	E2F Transkripsiyon Faktör 1
E5	E2F4	E2F Transkripsiyon Faktör 4, p107/p1 30-Bağlayıcı
E6	GADD45 A	Büyüme durdurma ve DNA-hasarı-indükleyici, alfa
E7	GTSE1	G-2 ve S Fazı İfade 1
E8	HUS1	HUS1 Kontrol Noktası Homoloğu (S. pombe)
E9	KNTC1	Kinetokor İlişkili 1
E10	KPNA2	Karyopherin Alfa 2 (RAG kohort 1, impartin alfa 1)
E11	MAD2L1	MAD2 Mitotik Tutuklama Eksikliği-1 (maya)
E12	MAD2L2	MAD2 Mitotik Tutuklama Eksikliği-2 (maya)
F1	MCM2	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 2
F2	MCM3	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 3
F3	MCM4	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 4
F4	MCM5	Minikromozom Koruma kompleksi bileşeni 5
F5	MDM2	Mdm2 p53 Bağlayıcı Protein Homoloğu (fare)
F6	MKI67	Monoklonal Antikor Ki-67 Tarafından Tanımlanan Antijen
F7	MNAT1	Trois Homoloğu Menage 1, Siklin H Birleştirme Faktörü (Xenopuslaevis)
F8	MRE11A	MRE11MayotikRekombinasyon 11 Homolog A (S. cerevisiae)
F9	NBN	Nibrin
F10	RAD1	RAD1 Homoloğu (S. pombe)
F11	RAD17	RAD17 Homoloğu (S. pombe)
F12	RAD51	RAD51 Homoloğu (S. cerevisiae)
G1	RAD9A	RAD9 Homolog A (S. pombe)
G2	RB 1	Retinoblastoma 1
G3	RBBP8	Retinoblastoma Bağlayıcı Protein 8

Tablo 3.7 Hücre Döngüsü Gen Listesi: RT² Profiler PCR Array

Pozisyon	Sembol	Tanım
G4	RBL1	Retinoblastoma-Benzeri 1 (p107)
G5	RBL2	Retinoblastoma-Benzeri 2 (p130)
G6	SERTAD 1	SERTA Domain İçeren 1
G7	SKP2	S-Faz Kinaz-İlişkili Protein 2 (p45)
G8	STMN1	Stathmin 1
G9	TFDP1	Transkripsiyon Faktör Dp-1
G10	TFDP2	Transkripsiyon Faktör Dp-2 (E2F Dimerleştirme Ortağı 2)
G11	TP53	Tümör Protein p53
G12	WEE1	WEE1 Homoloğu (S. pombe)
H1	ACTB	Aktin, Beta
H2	B2M	Beta-2-Mikroglobulin
H3	GAPDH	Gliseraldehit-3-FosfatDehidrogenaz
H4	HPRT1	Hipoksantin Fosforiboziltransferaz1
H5	RPLPO	Ribosomal Protein, Büyük, PO
H6	HGDC	İnsan Genomik DNA Kontaminasyonu
H7	RTC	Ters Transkripsiyon Kontrol
H8	RTC	Ters Transkripsiyon Kontrol
H9	RTC	Ters Transkripsiyon Kontrol
H10	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H11	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H12	PPC	Pozitif PCR Kontrol

Tablo 3.8 Apoptoz Gen Listesi: RT² Profiler PCR Array

Pozisyon	Sembol	Tanımlama
A1	ABL1	C-abl Onkogen 1, Reseptör Tirozin Kinaz
A2	AIFM1	Apoptoz-indükleyici faktör, mitokondriyal ilişkili, 1
A3	AKT1	V-akt mürin timus viral onkogene homolog 1
A4	APAF1	Apoptotik preptidaz aktive edici faktör 1
A5	BAD	-hücre ölümü BCL2 agonist ilişkili
A6	BAG1	BCL2-ilişkili athanogen
A7	BAG3	BCL2- ilişkili- athanogene 3
A8	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
A9	BAX	BCL2-ilişkili X protein
A10	BCL10	B-cell CLL/lemfoma 10
A11	BCL2	B-cell CLL/lemfoma 2
A12	BCL2A1	BCL2-bağılantılı protein A1
B1	BCL2L1	BCL2-benzeri 1

"Devamı arkada"

Tablo 3.8 Apoptoz Gen Listesi: RT² Profiler PCR Array

Pozisyon	Sembol	Tanımlama
B2	BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptoz kolaylaştırıcı)
B3	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptoz kolaylaştırıcı)
B4	BCL2L2	BCL2-like 2
B5	BFAR	Bifonksiyonel apoptoz düzenleyici
B6	BID	BH3 etkileşim domain ölüm agonist
B7	B1K	BCL2-ilişki killer (apoptoz-indükleyici)
B8	BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2
B9	BIRC3	Baculoviral 1AP repeat containing 3
B10	BIRC5	Baculoviral 1AP repeat containing 5
B11	BIRC6	Baculoviral IAP repeat containing 6
B12	BNIP2	BCL2/adenovirus E1 B 19kDa etkileşim protein 2
C1	BNIP3	BCL2/adenovirus E1 B 19kDa etkileşim protein 3
C2	BNIP3L	BCL2/adenovirus E18 19kDa etkileşim protein 3-like
C3	BRAF	V-raf mürin sarkoma viral onkogen homolog B1
C4	CASP1	Kaspaz 1, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz (interleukin 1, beta, convertaz)
C5	CASP10	Kaspaz 10, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C6	CASP14	Kaspaz 14, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C7	CASP2	Kaspaz 2, - apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C8	CASP3	Kaspaz 3, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C9	CASP4	Kaspaz 4, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C10	CASP5	Kaspaz 5, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C11	CASP6	Kaspaz 6, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C12	CASP7	Kaspaz 7, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
D1	CASP8	Kaspaz 8, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
C2	CASP9	Kaspaz 9, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
D3	CD27	CD27 molekül
D4	CD40	CD40 molekül, TNF reseptör superailisi üyesi 5
D5	CD40LG	CD40 ligand
D6	CD70	CD70 molekül
D7	CFLAR	CASP8 and MOD-like apoptoz düzenleyici
D8	CIDEA	Hücre ölümü indükleyici DFFA-like efektör a
D9	CIDEB	Hücre ölümü indükleyici DFFA-like

"Devamı arkada"

Tablo 3.8 Apoptoz Gen Listesi: RT² Profiler PCR Array

Pozisyon	Sembol	Tanımlama
		effector b
D10	CRADD	CASP2 ve RIPK1 domain içeren ölüm domainli adaptör
D11	CYCS	Sitokrom c, somatic
D12	DAPK1	Ölüm ilişkili protein kinaz 1
E1	DFFA	DNA fragmantasyon faktör, 45kDa, alfa polipeptid
E2	DIABLO	Diablo, IAP-bağlayıcı mitokondriyal protein
E3	FADD	Fas (INFRSF6)-ilişkili ölüm domaini
E4	FAS	Fas (INF reseptör superailisi, üye 6)
E5	FASLG	Fas ligand (TNF superailisi, üye 6)
E6	GADD45A	Büyümeyi durdurucu and DNA-hasarı-indükleyebilir, alfa
E7	HRK	Harakiri, BCL2 ilişkili protein (sadece 8H3 domain içerir)
E8	IGF1R	İnsülin-benzeri büyüme faktör 1 reseptörü
E9	IL10	Interlökin 10
E10	LTA	Lemfotoksin alfa (TNF süperailisi, üye 1)
E11	LTBR	Lemfotoksin beta reseptör (TNFR superailisi, üyesi 3)
E12	MCL1	Myeloid lösemi hücresi sekans 1 (BCL2-ilişkili)
F11	NAIP	NLR ailesi, apoptoz inhibitör protein
F2	NFKB1	Nükleer faktör kappa B 1, polipeptit gen enhansır B-hücre 1
F3	NOD1	Nükleotit-bağlayıcı oligomerizasyon domain 1 içeren
F4	NOL3	Nukleolar protein 3 (apoptoz represor ile CARD domain)
F5	PYCARD	PYD and CARD domain içeren
F6	RIPK2	Reseptor-etkileşi serine-thronin kinaz 2
F7	TNF	Tümör nekroz faktör
F8	TNFRSF10A	Tümör nekroz faktör reseptör superailisi üyesi 10a
F9	TNFRSF10B	Tümör nekroz faktör reseptör superailisi üyesi 10b
F10	TNFRSF11B	Tümör nekroz faktör reseptör superailisi üyesi 11b
F11	INFRSF1A	Tümör nekroz factor reseptör superailisi üyesi 1A
F12	TNFRSF1B	Tümör nekroz faktör reseptör superailisi üyesi 1B
G1	TNFRSF21	Tümör nekroz faktör reseptör superailisi üyesi 21
G2	TNFRSF25	Tümör nekroz faktör reseptör superailisi üyesi 25
G3	INFRSF9	Tümör nekroz Faktör Reseptör super ailesi üyesi 9

"Devamı arkada"

Tablo 3.8 Apoptoz Gen Listesi: RT² Profiler PCR Array

Pozisyon	Sembol	Tanımlama
G4	INFSF10	Tümör nekroz faktör (ligand) superaillesi , Üye,10
G5	TNFSF8	Tümör nekroz faktör (ligand) superaillesi , üyesi 8
G6	TP53	Tümör protein p53
G7	TP53BP2	Tümör protein p53 bağlayıcı protein, 2
G8	TP73	Tümör protein p73
G9	TRADD	INFRSF1A-ilişkili ölüm domain
G10	TRAF2	TNF reseptor-ilişkisi faktör 2
G11	TRAF3	TNF reseptor-ilişkisi faktör 3
G12	XIAP	X-bağlantılı apoptoz inhibitör
H1	ACTB	Aktin, beta
H2	B2M	Beta-2-mikroglobülin
H3	GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat - dehidrogenaz
H4	HPRT1	Hipoksantin fosfo ribozil transferaz 1
H5	RPLPO	Ribozomal protein, büyük, PO
H6	HGDC	İnsan Genomik DNA Kontaminasyonu
H7	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H8	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H9	RTC	Revers Transkripsiyon Kontrol
H10	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H11	PPC	Pozitif PCR Kontrol
H12	PPC	Pozitif PCR Kontrol

3.8. Western Blotlama

Kontrol ve oleuropein doz grubu (350 µM) hücrelerden protein izolasyonunu takiben β-aktin, Siklin D1 ve Bcl-2 ekspresyonunun protein düzeyinde değişimleri araştırılmıştır.

3.8.1. Total Protein İzolasyonu ve Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

Kontrol ve doz grubu hücreler total protein izolasyonu için ripa solüsyonu ile toplanmıştır. Ripa solüsyonu 150 mM sodyum klorid, %1 Triton-X-100, %0,5 sodyum deoksilat, %0,1 SDS, 50 mM Tris ve proteinaz inhibitörü eklenerak pH:8 olacak şekilde hazırlanmıştır. Ripa ile toplanan hücrelerden protein tayini için Lowry yöntemi kullanılmıştır. Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteau reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir. Birinci reaksiyonda peptit bağları ile Cu⁺² arasında biüre reaksiyonu sonucu

indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli heteropolimolibden kompleksi meydana getirir. Oluşan kompleks 600-800 nm aralığında absorpsiyon piki verir. Lowry yöntemi kullanılarak örneklerin protein düzeyleri aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

1) Ayıraç A [%2'lik Na₂CO₃ (%1 N NaOH'de çözülmüş)], AyıraçB (%1 Na veya K-tartarat), Ayıraç C (%0.5 CuSO₄.5H₂O), Ayıraç D (1 N folin ayırıcı) olmak üzere 4 solüsyon hazırlanmış ve sırası ile ayıraç A-B-C'den 48-1-1 oranında karıştırılarak yeni bir ayıraç hazırlanmıştır.

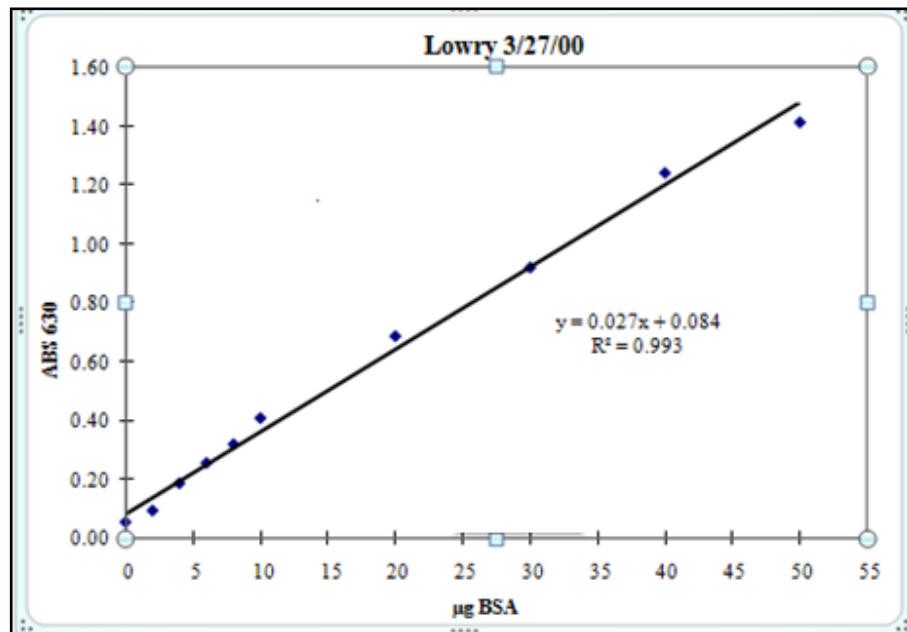
2) Ayrıca standart için BSA kullanılmış ve konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3) Yeni hazırlanan ayıraçtan 96 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 200 µL olacak şekilde konulmuştur.

4) Üzerine ilk kısma her standart için 2 kuyucuk olacak şekilde hazırlanan standartlardan, diğer kuyucuklara 1/5 oranında sulandırılmış numunelerden her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 50 µL koyulmuş ve karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

5) İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğun üzerine 20 µL folin ayırıcı koyularak 30 dk beklenmiş ve ELİSA okuyucu ile 630 dalga boyunda okunmuştur.

6) Örneklerin protein düzeyi, aşağıdaki şekilde verilen Standart grafik eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Lowry Protein Standart Eğrisi

3.8.3. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi

Oleuropeinin protein profilleri dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrıştırılıp protein profilleri elde edildi. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında kesintili bir tampon sisteminde %8.5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapıldı. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 3.9'da belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Tablo 3.9 Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonlarının hazırlanması

Solüsyon (1 jel için)	Ayrıştırıcı jel (%8.5)	Sıkıştırıcı jel (%4)
Jel çözeltisi	2,85ml	0,75ml
Distile su	4,5ml	2,5ml
Ayrıştırma Tamponu	2,5ml	-
Stacking buffer	-	1,25ml
%10 SDS	0,15ml	0,1ml
APS	0,05ml	0,025ml
TEMED	0,0065ml	0,005ml
Toplam	10ml	5ml

Sandviç sistemi hazırlandıktan sonra ilk önce ayrıştırıcı jel solüsyonu hazırlanarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde camların arasından dökülür. Havayla teması kesip kurummasını hızlandırmak için şırınga yardımıyla 2-propanol ile yüzey kaplanır. 10-15 dakika süreyle jel oda sıcaklığında polimerleşmeye bırakılır. Daha sonra 2-propanol dökülerek hazırlanan sıkıştırıcı jel solüsyonu dökülür. Hava kabarcığı oluşturmadan tarak sisteme yerleştirilir. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakikada gerçekleşir.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilecek proteinlerden alınan bir örnek 4X numune seyreltme tamponu ile 3:1 oranında (3 kısım örnek ve 1 kısım tampon) seyreltildi ve sıcak su banyosunda 2 dakika süre ile kaynar suda kaynatıldı. Tarak dişleri yırtmadan dikkatlice sıkıştırıcı jelden çıkarıldı. Kuyucuklar eğer varsa herhangi bir hava kabarcığını uzaklaştırmak için ince iğneye sahip bir şırınga kullanılarak elektrot tamponu ile dolduruldu. Daha sonra blok alt ve üst rezervuarları 1X elektrot tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Uygun iğneli bir

Hamilton şırıngası kullanılarak 25 µl (100 µg hücre lizatları) protein örneklerinden kuyucukların tabanında ince bir katman olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

Elektroforetik ayrıştırmanın yapılacağı jel için sıkıştırıcı jel üzerinde 10 mA'lık sabit akım yürütme işlemi yapıldı. Yol gösterici boya ayrıştırıcı jele ulaştığında akım 15 mA'e sıkıştırıcı jelden çıktığında ise 20 mA' e çıkarıldı. Yol gösterici boya tabana ulaştığı zaman (ayrıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatıldı. İyi bir ayrıştırma sağlamak için toplam 5-5,5 saat yürütme yapıldı.

Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve iliştilmiş jel sandviç çıkarılarak kısa cam tabaka dikkatlice açıldı. Jel yol gösterici boyanın olduğu yerden, kenarlardan, sıkıştırıcı jel bitiminden kesildi ve üstten sol köşesi (1 numaralı kuyucuk) kuyucukların sıralarını belirlemek için işaretlendi. Yürütülen jel Western blot analizi için elektroforezi takiben transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içerisinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Elektroforetik transfer Hooper MiniVE-blot sistemiyle ıslak transfer yapıldı.

MiniVE blotter'ın katot (siyah) kısmı alta gelecek şekilde açıldı. 2 adet sünger ıslatılarak yerleştirildi. Üzerine uygun büyüklükte kesilmiş filtre kağıdı ıslatılarak konuldu. Üzerine jel büyüklüğünde Membran kesilerek yerleştirilir. Membran üzerine jel baloncuk olmayacak şekilde konuldu. Üzerine tekrar filtre kağıdı ıslatılarak konuldu. Eğer iki jel varsa araya tek sünger konularak aynı düzen tekrar devam edildi. Eğer tek jelse kalan süngerler ıslatılarak yerleştirildi. Sistem güç kaynağına bağlandı, 45 volt 350 mA 90dakika ayarlandı. İşlem sonunda membranın başlangıç noktasına çentik atıldı. Jele göre fazla olan kısımlar kesildi. Membranın proteine (jele) temas eden kısmı üstte olacak şekilde bloklama solüsyonuna (%5'lik kuru süt tozu içeren TBST çözeltisi) alındı. 40-50 dk çalkalandı. Jelin transfer olup olmadığına bakmak için jel boyama solüsyonuna alındı. Beklemeden sonra boya uzaklaştırıldı. Aynı membran %5 kuru süt içinde 1:5000 (β -aktin, Bcl-2, SiklinD1; Santa Cruz; Anti-mouse) oranında bulunan primer antikora oda sıcaklığında overnight (14-16 saat) ya da 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda 3x5' TBST ile yıkama yapıldı. Membran 1:5000 oranında sulandırılan sekonder antikora (Santa Cruz, Anti-mouse) alındı. (1 saat) Süre bitiminde tekrar 3x5' TBST ile yıkama yapıldı. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için substrat çözeltisi alkalen fosfataz (ALP)(Tris-HCl, pH 8,80, NaCl, MgCl₂, ZnCl₂, Dietanolamin, Nitroblue tetrazolyum, fenazin metasülfat ve bromokloroindoilfosfat) ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra membran havada kurutuldu, alüminyum folyo ile kaplandı ve karanlıkta saklandı.

3.9. İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi

İlgili hücrelerin invazyon kapasitesi “trans-well matrigel invasion chamber”- invazyon kapları (BD Biosciences, USA) kullanılarak 24-kuyucuklu kültür plakları içerisinde araştırılmıştır. Bu invazyon odacıklarının hücrelere sağladıkları özel şartlar sayesinde *in vitro* koşullar altında hücrelerin invaziv özellikleri saptanabilmektedir. Bu invazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür ve bu porlu membran ayrıca bir matrigel matrix ile kaplıdır. Bu matrigel matrix bazal membranı *n vitro* koşullarda oluşturma imkanı sağlamaktadır. Bu membran sayesinde invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellenmektedir. Bu membrandan diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısı ile matrijel membran, invaziv olan ve olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkanı sunmaktadır.

Kısaca, invazyon kuyucuğunun alt-odacığına serum içeren kültür ortamı koyulmuştur. Matrigel membranın (8 µm por açıklıklı) üst kısmına ise, gece boyunca serumsuz kültür ortamında, oleuropein (350 µM) uygulanan SH-SY5Y hücreleri eklenmiştir. SH-SY5Y hücreleri, her invazyon odasında $2,5 \times 10^5$ olacak şekilde serum içermeyen 0.5 ml DMEM F12 içerisine konulmuştur. İnvazyon odacığının dışına ise, 0.75 ml %10 FBS içeren DMEM F12 konularak, invazyon odacığının dışının kemoatraktan olması sağlanmıştır. Hücreler 48 saat 37°C’de CO₂’li inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının membranının dış yüzeyine geçeceklerinden, invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırılmıştır. Ayrıca, iç yüzeyindeki hücreler “cell scaper” ile kazınarak uzaklaştırılmıştır. Gece boyunca inkübasyonu takiben, membranın üst kısmında kalan invaze olmamış hücreler kulak pamuğu çubuğu ile silinerek temizlenmiştir. İnvaziv olan dış yüzeydeki hücreler, önce 2 ml metanol ile fikse edilmiş, ardından da 1 ml kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskopunda sayılarak değerlendirilmiştir. % invazyon hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnvazyon} = \frac{\text{matrijel matris bazal membrandaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membrandaki hücre sayısı}} \times 100$$

3.10. Koloni Oluşum Testi

Oleuropein maruziyeti sonrasında SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde koloni oluşumunun nasıl etkilendiğini belirlemek için, 6 kuyucuklu kaplara kontrol ve doz grupları için 10^3 hücre ekimi yapılmış ve 14 gün boyunca hücrelerin 2 günde bir ortamları değiştirmek suretiyle 37°C 'de, %5 CO_2 'li ortamda bekletilmiştir. On dört günün sonunda hücreler soğuk metanolla -20°C 'de 10 dakika fikse olmaları sağlanmıştır. Fikse olmuş koloniler kristal viole boyası ile 15 dakika boyanmıştır. Boyanmış olan koloniler kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılmış ve değerlendirilmiştir.

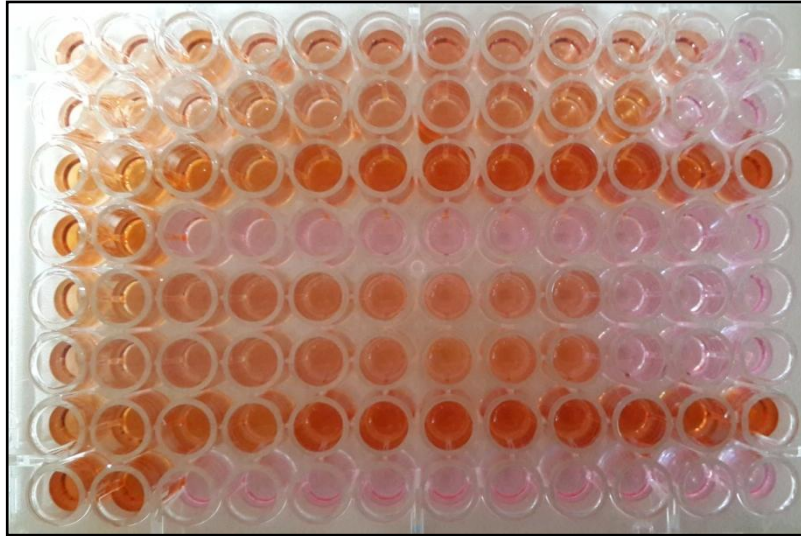
3.11. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Verilerin analizi $\Delta\Delta\text{CT}$ metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantitasyonu yapıldı. Web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanıldı. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun $\pm 3\text{SD}$ karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle, gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlendi. Grupların karşılaştırılması "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.BULGULAR

4.1. XTT Sonuçları

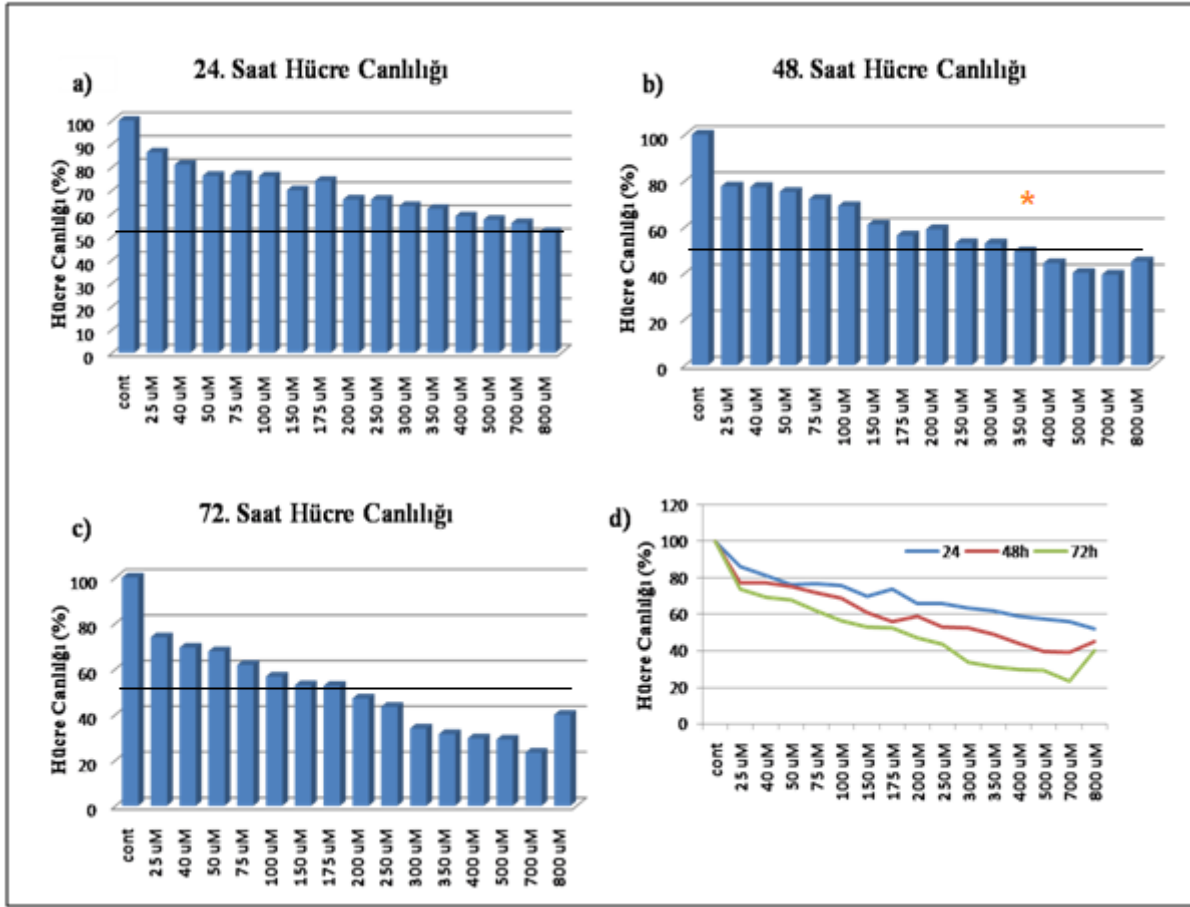
Oleuropeinin SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde, hücre canlılığı ve sitotoksik etkisi XT (2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)) metodu ile Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit kullanılarak (Biological Industries) belirlenmiştir. Kit içeriğindeki reaktif madde olan tetrazolium tozunun canlı hücrelerde turuncu renkli formazan bileşenlerine indirgenmesi prensibine göre çalışan XTT metodunda, zamana ve doza bağımlı olarak oleuropeinin hücre canlılığına etkisi saptanmıştır. Şekilde renk değişimi belirgin biçimde fark edilmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Kit içeriğindeki reaktif madde olan tetrazolium tozunun canlı hücrelerde turuncu renkli formazan bileşenlerine indirgenmesi

96 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki hücrelerin oleuropeinin 25 μ M ile 800 μ M arasında 15 farklı doz konsantrasyonunda 24, 48 ve 72. saatlerdeki etkinliği araştırılmıştır. Deney sonucunda oluşan renk reaksiyonuna göre kontrol ve doz gruplarının absorpsiyon değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Çalışma sonucuna göre oleuropeinin IC_{50} dozu 48. saate 350 μ M dozu olarak saptanmıştır. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun %50'lerin altına düşmemesi sebebiyle,

48.saatteki doz oranı IC₅₀ olarak kabul edilmiştir. Oleuropeinin değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2 Oleuropein'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisi a)24. saat b) 48.saat (* IC₅₀ dozu) c) 72.saat sütun grafiği gösterimi d) Çizgi grafiği ile gösterimi

4.2. RNA izolasyonu

Trizol Reagent yardımı ile kontrol grubu ve doz grubu SH-SY5Y hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA'lara konsantrasyon ve saflık ile ilgili olarak Nanodrop sonuçları Tablo 4.1'deki gibidir.

Tablo 4.1 İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Grup	Konsantrasyon (ng/µL)	260/ 280 OD	260/230 OD
Kontrol SH-SY5Y	2083	1,94	1,96
350µM OLE Doz Grubu SH-SY5Y	1564	1,93	1,95

Örneklerin, konsantrasyonları cDNA sentezinde gerekli hesaplamaları yapmakta kullanılır. Nanodrop cihazı RNA konsantrasyonları otomatik olarak hesaplayıp vermektedir. Hesaplama işemini $260\text{nm Abs} \times 40$ formülasyonuna göre hesaplamaktadır. İzole edilen RNA'ların saflıkları spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karşılaştırılmasından hesaplanır. 260/280 oranı, örneklerin saflığı ile ilgili tahmini bir karşılaştırma olanağı sunar. Doğru örnek kalitesini değerlendirmek için, 260/280 oranları genel spektral kalite ile birlikte analiz edilir. Saf nükleik asitler genellikle DNA için 260/280 oranı ~ 1.8 , RNA için ise ~ 2 'dir. Bu oran her iki durumda da kayda değer oranda düşükse ya da önemli ölçüde farklı ise saflık oranı, proteini, fenol ya da diğer kirleticilerin varlığını veya 280 nm yakınındaki kuvvetle absorbe varlığını ve kontaminasyonu gösterir. 260/230 saflık oranı 1.8-2.2 aralığında bir 'saf' nükleik asit değerleri ile saflığın ikinci bir ölçüsüdür. 260/230 değerleri de kayda değer ölçüde düşükse bu ikinci kez arıtılmış kirletici maddelerin varlığını gösterebilir ve anlamlı derecede düşük oranlar kullanılan izolasyon tekniğinin daha fazla optimize edilmesini gerektirmektedir (Web_9). Elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 15'te de görüldüğü gibi yeterli miktarda RNA izole ettiğimizi ve saflık derecesinin 1,94 sınırlarında olması nedeniyle herhangi bir kontaminasyon olmadığını ve RNA'nın kalitesini gösterir.

4.3. Gerçek-Zamanlı PZR (Real-Time PCR)

Konsantrasyonları 260/280 nm ölçümü ile belirlenen RNA'lardan $2\mu\text{g}$ olacak şekilde hesaplanarak seçilen genlerin cDNA sentezinden sonra, mRNA seviyelerindeki ekspresyon düzeyleri farklılıkları Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Oleuropeinin ($350\ \mu\text{M}$) uygulanması ile SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde kontrol grubuna göre hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili genlerin ifadelerinin nasıl değiştiği ve istatistiksel olarak anlamlılık değerleri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak panalde yer alan hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili genlere uygun gömülü primerler için cihazda yapışma sıcaklıkları ve döngü sayısı optimizasyonları yapılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen ct değerleri dikkate alınarak kontrol ve doz gruplarındaki gen ifadelerindeki değişim hesaplanmıştır.

Prosedürü materyal metotta (3.7.) belirtildiği şekilde gerçekleştirdiğimiz deneyler sonucunda elde ettiğimiz bulgular aşağıda belirtilen prensibe göre gerçekleşmiştir. Çalışmamız sonucunda hücre döngüsü ile ilişkili genlerden istatistiksel olarak anlamlı değişim görülen genler ve değişim durumları Tablo 4.2'de, apoptoz ile ilişkili olanlar Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Çalışma sonucuna göre, custom dizayn edilmiş 84 hücre

döngüsü, 84 apoptoz geninden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunan 10 hücre döngüsü geni Tablo 4.2'de, 10 apoptoz genide Tablo 4.3'de verilmiştir.

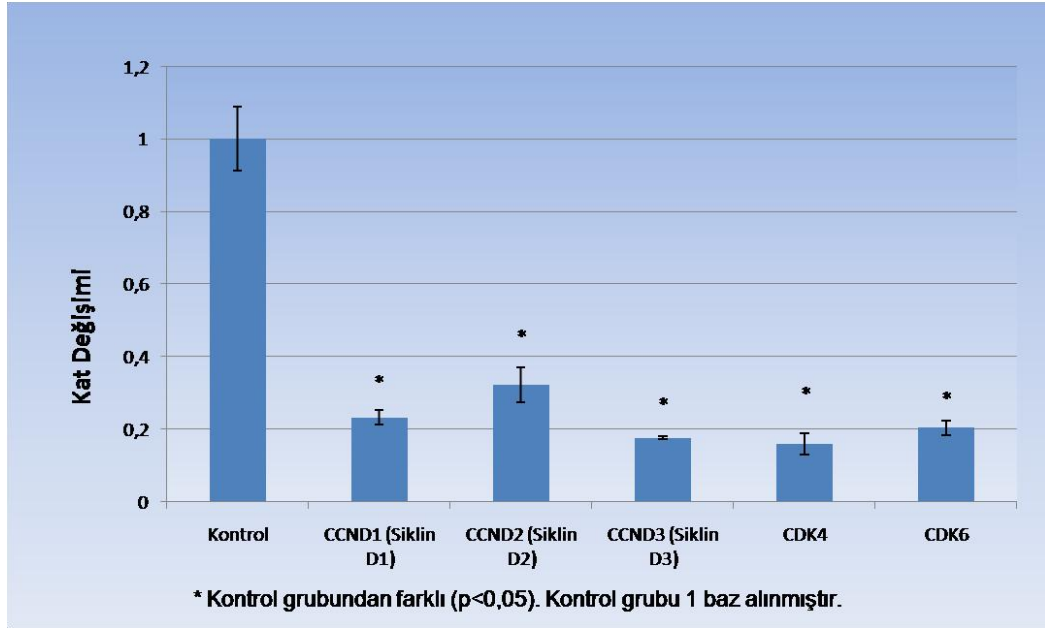
Tablo 4.2 Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre kontrol ve doz gruplarında anlamlı düzeyde değişim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler

Gen adı	Değişim	p-değeri ($<0,05$)
CCND1	-4,3241	0,02554
CCND2	-3,199	0,00855
CCND3	-5,7825	0,049663
CDK4	-6,3196	0,01147
CDK6	-4,9987	0,0229
CDKN2A	10,8638	0,00632
CDKN2B	9,577	0,01259
CDKN1A	13,3956	0,00632
GADD45A	20,7336	0,001259
WEE1	-13,3701	0,0086

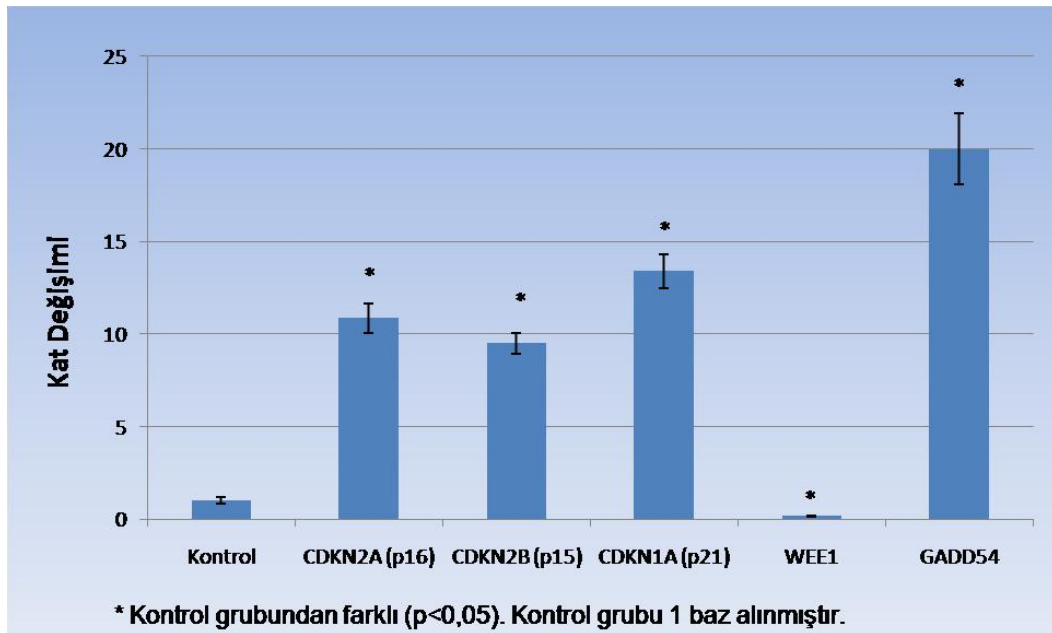
Tablo 4.3 Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre kontrol ve doz gruplarında anlamlı düzeyde değişim tespit edilen apoptoz ile ilişkili genler

Gen adı	Değişim	p-değeri ($<0,05$)
BCL-2	-3,4696	0,000558
DFFA	2,002	0,04336
BAD	6,6082	0,003666
BAX	20,7336	0,000667
BID	2,0473	0,03338
CASP1	4,2814	0,0114
CASP3	2,0153	0,00884
CASP8	2,0398	0,0199
CASP9	2,0332	0,022
TP53	2,0096	0,006

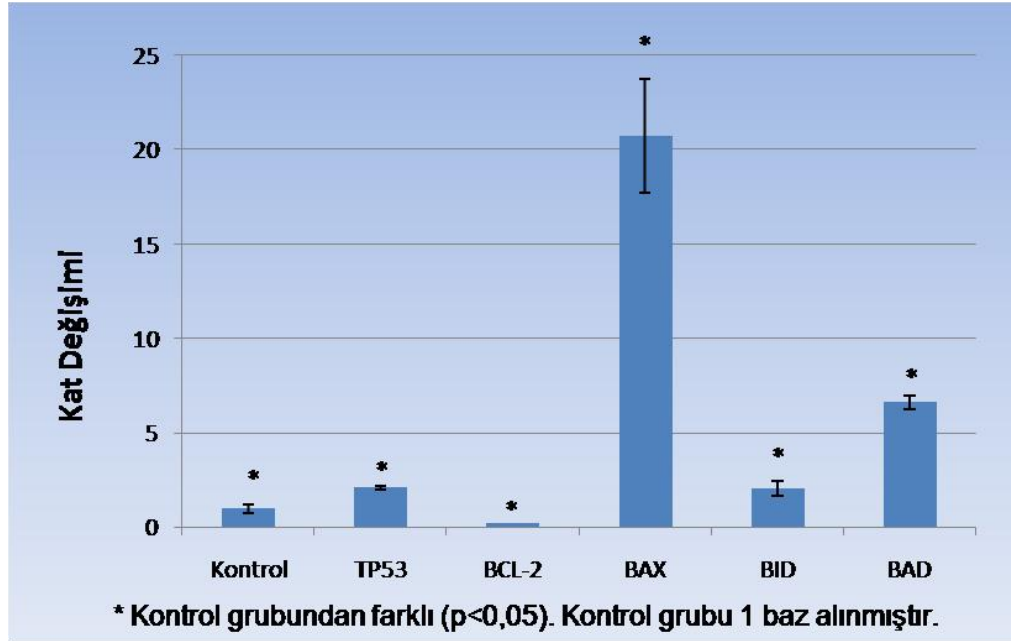
İstatistiksel olarak anlamlı bulunan hücre döngüsü ve apoptoz ilişkili genlerin kontrol ve doz gruplarındaki ekspresyon düzeylerindeki kat değişimleri Şekil, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6 verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ($p>0,05$) hücre döngüsü ve apoptoz ilişkili genlerin, kontrol ve doz grupları arasındaki ekspresyon değişimleri EK-1'de sunulmuştur.



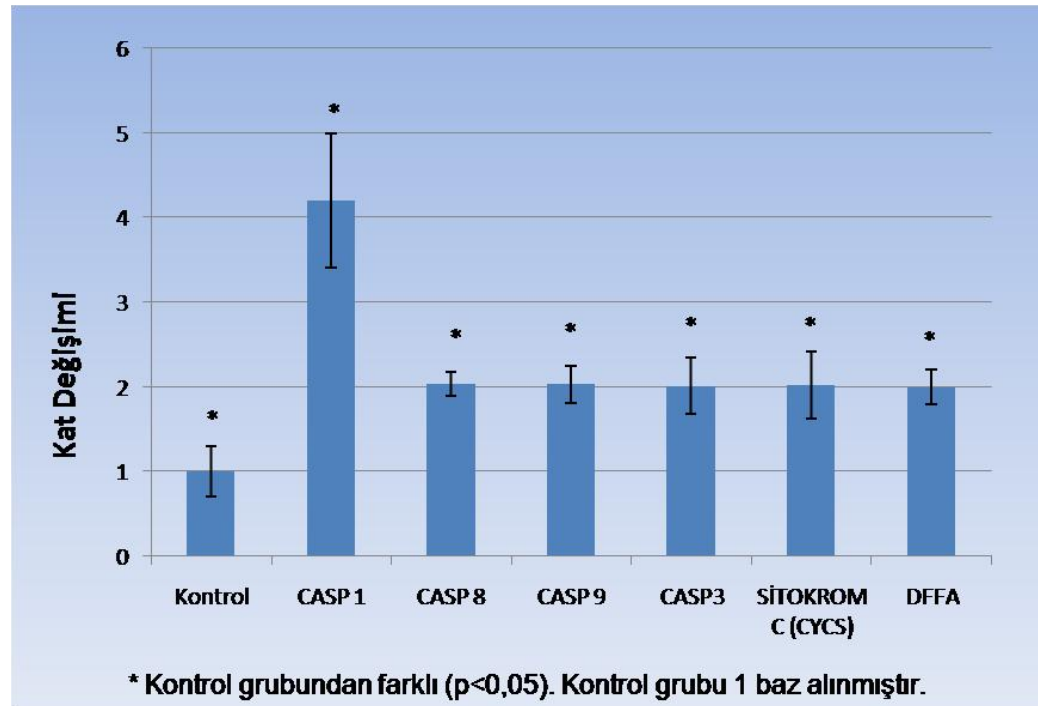
Şekil 4.3 Hücre döngüsü ile ilişkili genlerin Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarına göre ekspresyon değişimi, sırasıyla; CCND1, $p=0,02$; CCND2, $p=0,008$; CCND3, $p=0,04$; CDK4, $p=0,01$; CDK6, $p=0,02$ ($p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir)



Şekil 4.4 Hücre döngüsü ile ilişkili genlerin Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarına göre ekspresyon değişimi, sırasıyla; CDKN2A, $p=0,06$; CDKN2B, $p=0,01$; CDKN1A, $p=0,06$; WEE1, $p=0,008$; GADD45, $p=0,01$ ($p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir)



Şekil 4.5 Apoptoz ile ilişkili Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarına göre ekspresyon değişimi, sırasıyla; p53, $p=0,006$; Bcl-2, $p=0,0005$; Bax, $p=0,006$; Bid, $p=0,03$; Bad, $p=0,003$; ($p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir)



Şekil 4.6 Apoptoz ile ilişkili Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarına göre ekspresyon değişimi, sırasıyla; Kaspaz-1, Kaspaz-8, $p=0,01$; $p=0,01$; Kaspaz-9, $p=0,02$; Kaspaz-3, $p=0,008$; Sitokrom c, $p > 0,05$; DFFA, $p=0,04$; ($p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir)

4.4. TUNEL Testi ile Apoptoz Sonuçları

Çalışmamızda Roche In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Cat. No. 11 684 817 910) kullanılmıştır. TUNEL testi için hücreler 8 odacık içeren lamlara (BD Falcon Culture Slides; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue culture treated Glass Slide) ekilmiştir. Her bir chamber içine 4×10^3 hücre olacak şekilde 4 adet kontrol odacığı ve 4 adet de oleuropein doz grubu hücreler eklenmiş ve etkili bulunan doz ve zaman aralığında (350 μ M ve 48 saat) hücreler inkübe edilmiştir. Boyama işlemi Hoechst boyası ile yapılmış ve floresans mikroskobu ile görüntüleme işlemi, apoptotik hücrelerin sayımı 40X büyütmede gerçekleştirilmiştir.

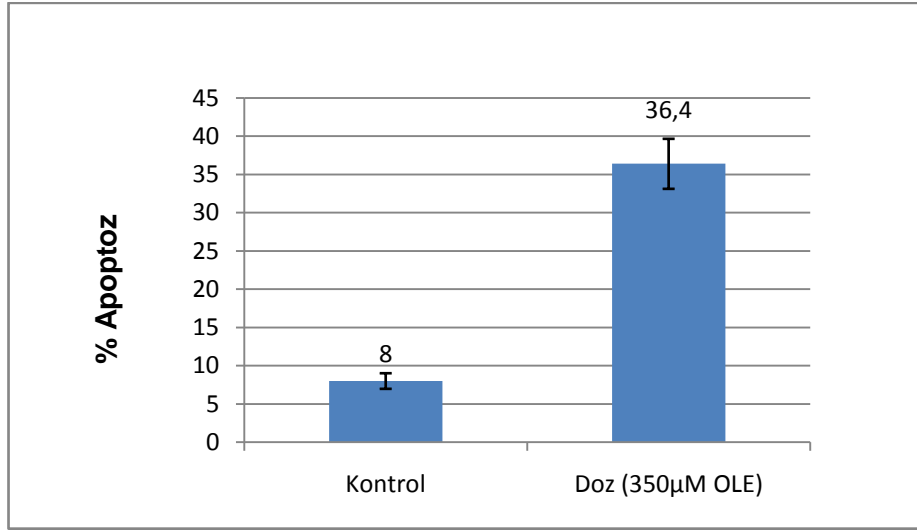
Floresan mikroskopi, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, propidium iyodid gibi) kullanılmasıyla yapılan bir yöntemdir. Floresan boylar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale getirebilir böylelikle hücre kültürü çalışmalarında kullanılması ile ölü ve canlı hücrelerin boyanması sağlanır. Hoechst boyası, ölü ve canlı hücrelerin tümünü boyar ama ölü hücrelerin apoptoz veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayrımı nükleus morfolojisine ve membran bütünlüğüne bakılarak yapılır. Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlenir. Bu değişiklikler;

- Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlaması
- Hücre iskeleti dağılması
- Çekirdek zarı yer yer eriyip ve DNA'sı parçalara ayrılmasıdır.

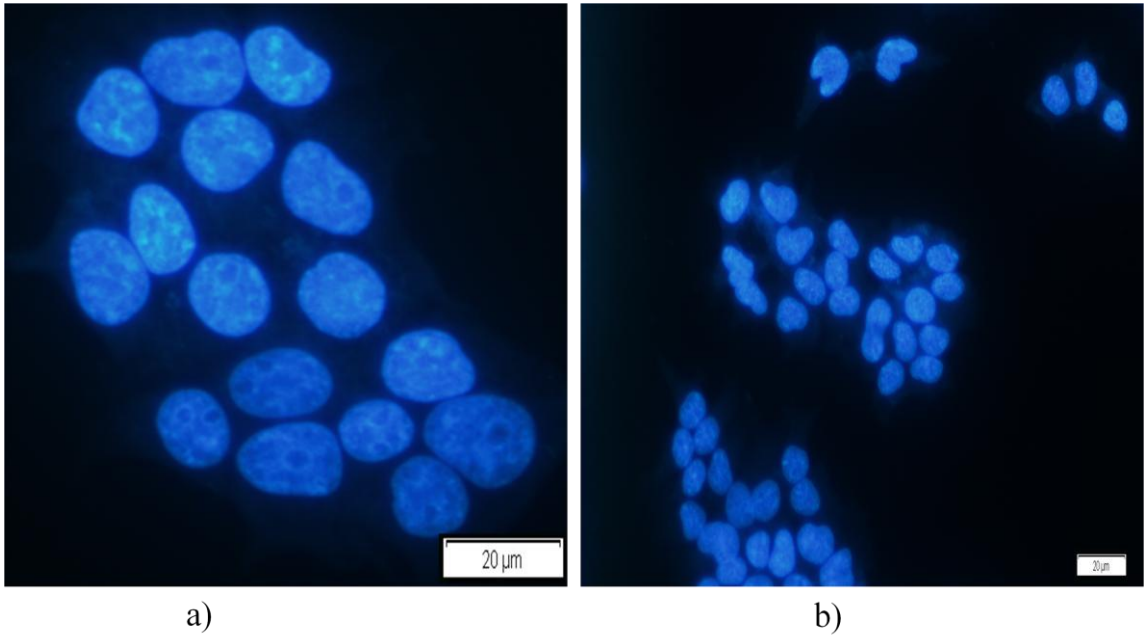
Apoptotik hücreler, normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılırlar. Hücre sitoplazması, sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimcikler meydana gelir (Güleş Ö ve Eren Ü 2008). Bu özellikler dikkate alınarak mikroskop altında kontrol ve doz gruplarında preperatta herbiri için 5 farklı alan sayılmış, canlı hücreler apoptotik hücrelere oranlanarak yüzde apoptoz bulunmuştur.

Kontrol grubu SH-SY5Y hücreleri ve 48 saat 350 μ M oleuropein doz grubu hücreler floresan mikroskopta 40X büyütme ile farklı alanlar sayılmıştır. Kontrol grubu hücrelerde ortalama apoptotik hücre oranı % $8 \pm 1,02$ iken, doz grubu hücrelerde her bir odacık için ortalama yüzdelerik apoptotik hücre oranları %32,5 ile %40 arasında değişmekle birlikte bütün doz grubuna ait ortalama apoptotik hücre yüzdesi

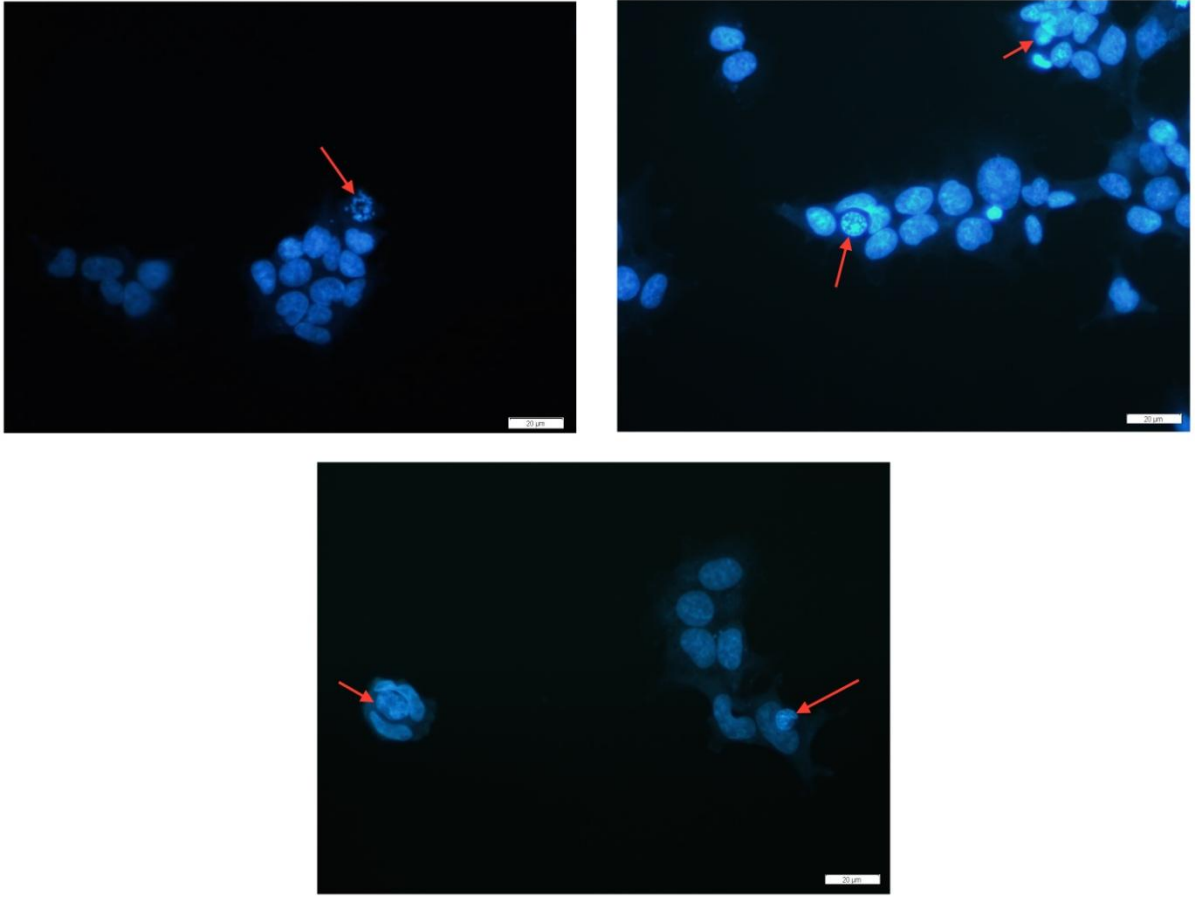
%36,4±3,27 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Kontrol ve doz gruplarına ait örnek preparat görüntüleri Şekil 4.8 ve 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Kontrol ve doz gruplarında sayılan alanlardaki ortalama apoptotik hücre yüzdeleri



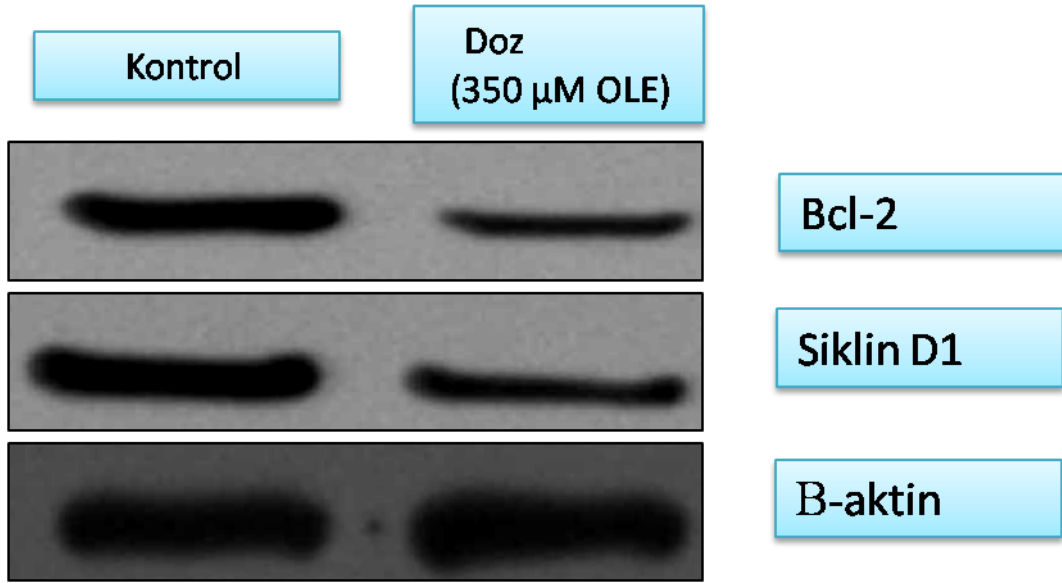
Şekil 4.8 Kontrol grubuna ait hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst boyaması sonrası 40x (a) ve 20x (b) floresan mikroskop görüntüleri



Şekil 4.9 Doz (350 μ M OLE) grubuna ait hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst boyaması sonrası floresan mikroskop görüntüleri (Apoptotik hücreler ok ile gösterilmiştir)

4.5. Western Blot Sonuçları

Western blot yöntemi ile kontrol ve doz grupları arasında, bütçe kısıtlamasından dolayı apoptoz ve hücre döngüsü ile ilgili olarak Bcl-2 ve SiklinD1 ekspresyonlarının protein düzeyinde değişimleri araştırılmıştır. House-keeping protein olarak β -aktin kullanılmıştır. Sonuçlara göre, oleuropein muamele edilen doz grubunda hem siklinD1 hem de Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarının kontrol grubuna göre azaldığı gösterilmiş ve Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre elde edilen mRNA düzeyindeki azalma Western Blot tekniği ile protein düzeyinde de teyit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Kontrol ve doz grubu hücrelerde Bcl-2 ve SiklinD1 proteinlerinin değişimi

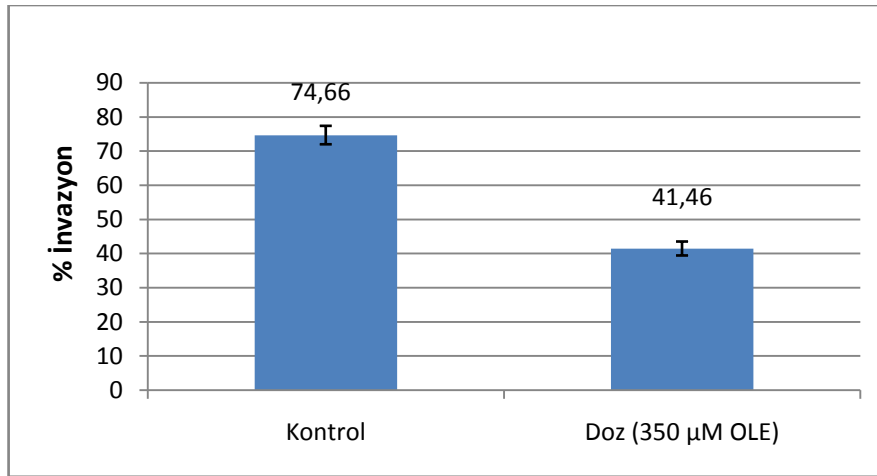
4.6. Matrigel- İnvazyon Testi Sonuçları

Oleuropein'in SH-SY5Y hücrelerinde invazyon üzerine etkisinin araştırılması için matrigel-invazyon testi gerçekleştirilmiştir. İlgili hücreler invazyon kapasitesi "trans-well matrigel invasion chamber"- invazyon kapları (BD Biosciences, USA) kullanılarak 24-kuyucuklu kültür plakları içerisinde araştırılmıştır. Kontrol grubu hücreler ve 350 µM oleuropein uygulanan doz grubu hücreler, matrigel invazyon odacıklarına serum içermeyen besiyeri içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde yerleştirilmiş ve invazyon odacığının dışına ise %10 serum (FBS) içeren besiyeri konulmuştur. Bu deney düzeneğinde hücreler 37°C'de CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübe edilmişlerdir. Bu durumda invaziv karakterli hücreler seruma kemoatrak yaparak 8 µm çaplı porlar ile örtülü matrigel matriks ortamından geçmişlerdir. Yüzde invazyonu saptayabilmek için hücre migrasyonunuda saptamak gerekmektedir. Bu amaçla BD Bioscience firmasından temin edilen kontrol odacıkları kullanılmıştır. Aynı ortam koşullarında $2,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde kontrol odacıklarına ekilmişlerdir. Matrigel matrikste bulunan dolayısıyla invaziv hücreler metanol ile fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanarak mikroskop altında 40X büyütmede sayılmışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen sayım sonuçları ile % invazyon değişimini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

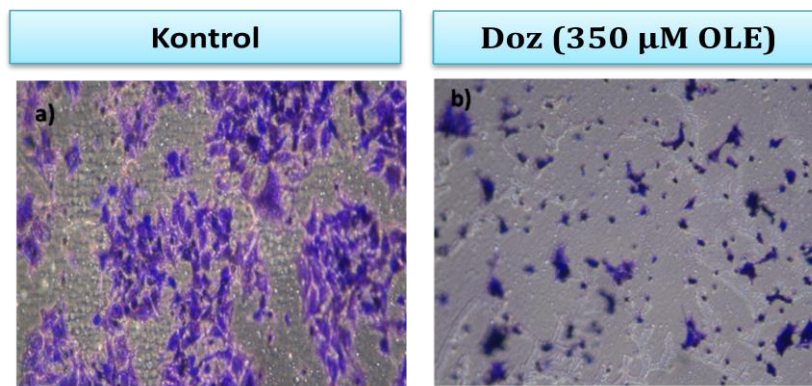
$$\% \text{ İnvazyon} = \frac{\text{matrijel matriks bazal membrandaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membrandaki hücre sayısı}} \times 100$$

Kontrol membranındaki düzenekte, sayım işlemleri sonucunda kontrol hücrelerinden ortalama $2645 \pm 12,72$ hücrenin, 350 µM oleuropein uygulanan doz

grubu hücrelerden de ortalama olarak $410 \pm 4,24$ hücrenin invaze olup kontrol odacığının diğer tarafına geçtiği tespit edilmiştir. Matrigel matriks bazal membrandaki düzenekte ise kontrol grubu hücrelerden ortalama $1975 \pm 8,48$ hücrenin, $350 \mu\text{M}$ oleuropein uygulanan doz grubu hücrelerden de ortalama olarak $170 \pm 2,82$ hücrenin invaze olup kontrol odacığının diğer tarafına geçtiği tespit edilmiştir. İnvazyon ve migrasyon sonuçlarında elde edilen verilerle yukarıdaki formül uygulanarak % invazyon hesaplaması kontrol ve doz grupları için hesaplanmıştır. Formül sonuçlarına göre kontrol hücrelerinin invazyon kapasiteleri $\%74,66 \pm 2,7$ iken oleuropein uygulanan doz grubunda invazyon yüzdesi $\%41,46 \pm 2,04$ olarak bulunmuştur. Matrigel-invazyon deneyi sonucunda, oleuropein uygulanmış doz grubu SH-SY5Y hücrelerinin invazyon durumlarının kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 4.11 ve 4.12).



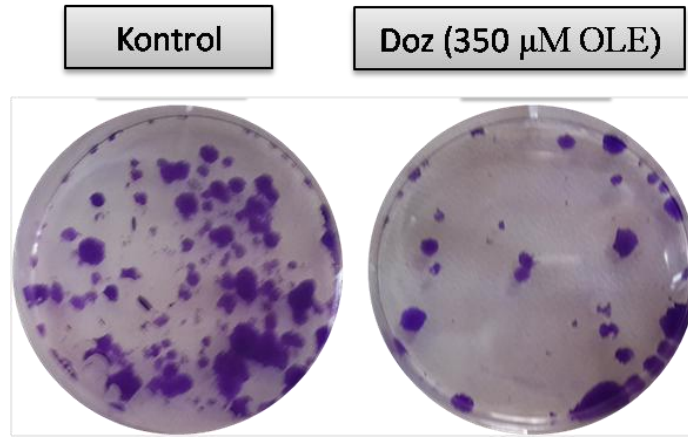
Şekil 4.11 Kontrol ve doz grubu hücrelerde % invazyon kapasiteleri



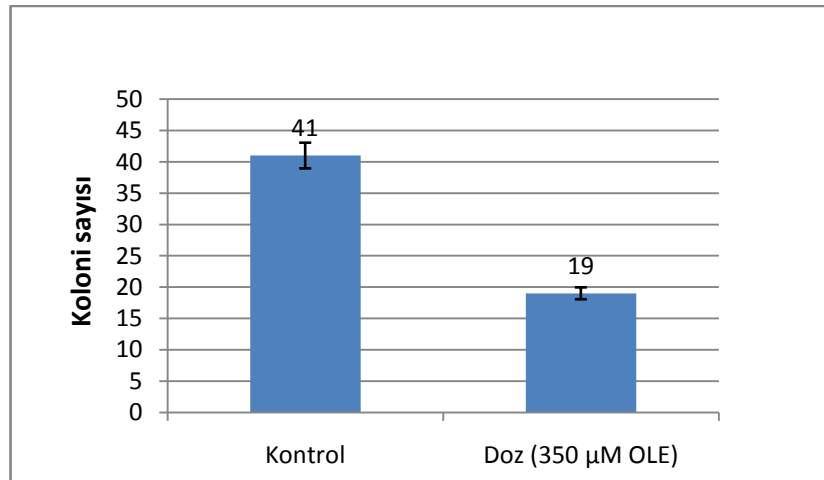
Şekil 4.12 Kontrol ve doz grubu invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)

4.7. Koloni Oluşum Sonuçları

Oleuropeinin SH-SY5Y hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, kontrol ve doz grupları (350 μ M) için 10^3 hücre ekimi yapılmış ve 14 gün boyunca hücrelerin 2 günde bir ortamlarını değiştirmek suretiyle 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda soğuk metanolla fikse edilen hücreler kristal viole ile boyanmışlardır (Şekil 4.13). Oleuropeinin koloni formasyonuna etkisini anlamak amacıyla 0,1 cm'den büyük koloniler sayılmıştır. Kontrol grubu hücrelerde koloni ortalaması 41 ± 2 iken, oleuropein (350 μ M) uygulanmış doz grubu hücrelerde koloni sayısı 19 ± 1 bulunmuştur. Şekil 4.13'de gözlemlendiği gibi koloni formasyonunun doz grubunda kontrole göre azaldığı belirgin biçimde dikkati çekmektedir. Sonuç olarak, oleuropein maruziyeti ile SH-SY5Y hücrelerinde koloni sayısı %53,6 \pm 4,71 oranında baskılandığı şekil 4.14'de grafik olarak görülmektedir.



Şekil 4.13 SH-SY5Y hücreleri kontrol ve doz grubu koloni görüntüsü



Şekil 4.14 Kontrol ve doz gruplarındaki ortalama koloni sayıları

5.TARTIŞMA

Kanser, organizmada hücrelerin çeşitli sebeplerden dolayı kontrolü kaybedip anormal şekilde çoğalmaları ile karakterize olan kompleks bir hastalıktır. Bu kontrolsüz çoğalmaya bağlı olarak tümör oluşumu gerçekleşmektedir. Tümörler normal vücut işleyişini, bulunduğu dokuya bağlı olarak durdurmakta ve bazen ölüme sonuçlanabilecek durumlara yol açmaktadır. Nöral krest hücrelerinden köken alan, biyolojik ve klinik olarak da farklı özellikler gösteren nöroblastoma çocukluk çağının en sık rastlanılan tümörleri arasında yer almakta ve çoğu zamanda ölümcül sonuçlara yol açmaktadır. Bu bağlamda kanser tedavilerini daha etkin ve sonuç alıcı hale getirmek için yapılan çok sayıda çalışma olmasına ve her geçen gün yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine rağmen, kansere bağlı ölümler hala ilk sıralarda gelmektedir. Ayrıca mevcut tedavi yöntemlerinde, yan etkiler, belirli bir süre sonra tedavinin etkisiz hale gelmesi ya da tedaviye direnç gibi sebeplerden dolayı alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi veya yeni biyolojik, kimyasal, farmakolojik, genetik, hedefe yönelik veya daha farklı ajanların geliştirilmesi çalışmalarının daha hızlı şekilde sürdürülmesini gerektirmektedir.

Günümüzde kanser tedavi yöntemlerinin yanı sıra dünyada ve ülkemizde pek çok kanser hastası konvansiyonel tedavilerle birlikte alternatif tedavileri de sıklıkla kullanmaktadır. Alternatif ve tamamlayıcı tedavilerinde kullanılan doğal ürünler ile kanser hücrelerinin büyümesi, metastaz yapmasının engellenmesi, hücre ölümünün indüklenmesi gibi mekanizmalarla bu hastalığın tedavisinin sağlanması amaçlanmaktadır (Baskın ve Olgun 2007). Son zamanlarda yapılan çalışmalar kapsamında Akdeniz diyeti beslenme tarzı kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer çeşitli metabolik hastalıkların önlenmesinde başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Akdeniz diyetinin koruyucu etkisi meyve ve sebze açısından çeşitli ve zengin bir içeriğe sahip olmasından ileri gelmektedir. Akdeniz diyetinin önemli besinlerinden birisi de zeytindir. Günümüzde pek çok araştırmada zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağı gibi ürünler başta olmak üzere bilim insanlarını bu besinlerin potansiyel sağlık etkileri konusunda çalışmalar yürütmektedir (Büyükbacı ve El 2008). Zeytin ürünlerinin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri yapılarında bulunan çok yönlü biyoaktif bileşenlere dayandırılır. Bu bileşenler polifenoller, tokoferoller,

fosfolipitler, karetonoidler, steroller olarak gruplandırılır (Visioli vd 2002). Özellikle zeytinin kansere olan etkisinin araştırılmaya başladığı son yıllarda, polifenoller içerisinde yer alan oleuropein büyük ilgi görmektedir. Araştırmalar bu bileşenin anti-hipertansif, anti-aterojenik, kardiyoprotektif, hipokolesterolemik, hipoglisemik, antiviral, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuar, antioksidan ve anti-kanserojen etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Tablo 4'te bu aktiviteleri ve etki mekanizmaları toplu olarak belirtilmiştir. Oleuropeinin ve diğer bileşenlerden hidrositrizolün kan beyin bariyerini geçebilme özelliği bulunmaktadır (Dangelo vd 2001; Wu vd 2009, Mohagheghi vd 2011, Luccarini 2014). Mohagheghi ve arkadaşları bununla ilgili olarak oleuropein ve zeytin içeriğindeki diğer bileşenlerin nörodejeneratif hastalıklarda da etkili olabileceğini düşündürmüş ve yapılan çeşitli çalışmalarda da oleuropeinin beyin ve merkezi sinir sistemi ile ilişkili Alzheimer, Parkinson veya inme gibi sağlık sorunlarında etkili olduğu nöronlarda oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir. Beyin dokusunun mikroskopik incelemelerinde hasarlı beyin dokusunda ve ölen beyin hücreleri oranında oleuropeinin %55'lere varan azalmalara sebep olduğu belirtilmiştir (Mohagheghi vd 2011). Zeytin yaprağı ekstraktı ve oleuropeinin nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer, Parkinson) da oksidatif stres üzerinden etki gösterdiği gösterilmiştir. Hayat boyunca süren oksidatif etki zaman içinde katlanmakta ve ortaya çıkan yangı ve diğer değişimler sinir hücrelerinde bir takım anormal proteinlerin birikmesine ve bu birikmeye bağlı olarak nöronların normal çalışmasını bozarak ölümlere neden olabilmektedir. Zeytin yaprağı ekstraktının Alzheimer ve benzeri hastalıklarda nörofibriller karmaşayı proteinler üzerinden etkileyerek azalttığı gösterilmiştir (Bazoti vd 2006, Daccache vd 2011, Rigacci vd 2011). Her ne kadar yapılan sınırlı çalışmalar bulunsa da oleuropeinin beyindeki farmakokinetik detayı ve etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bu kapsamda çok çeşitli ve detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır (Dangelo vd 2001). Nöroblastom üzerine yapılmış oleuropeinle ilişkili herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışma ile ilk veriler elde edilmiştir.

Bu çalışma ile oleuropeinin SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında hücresel düzeyde etkilerini *in vitro* olarak hücre kültürü ortamında potansiyel terapötik etkinliği, anti-kanserojen etkisi ve bundan sonraki detaylı çalışmalarda kullanılıp kullanılmayacağını ve etki mekanizmasının ortaya çıkarılması amaçlanmış bu kapsamda da hücre canlılığına etkisi için XTT testi, mRNA düzeyinde hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genlerin ifadelerindeki değişimi belirlemek için Real-Time PCR yöntemi, protein düzeyinde değişimi anlamak için Western Blot, ayrıca apoptozu desteklemek için TUNEL Testi, hücre invazyonuna etkisini araştırmak için matrigel

invazyon testi ve koloni oluşuma etkisinde koloni formasyon testi ile gösterilmiştir. Oleuropein %98 saflıkta olacak şekilde ticari olarak satın alınmış ve çalışmalarda direkt olarak oleuropeinin SH-SY5Y hücreleri üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Oleuropeinin ile nöroblastom üzerinde etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmadığından bulgularımızın kıyaslanabileceği literatür bilgisi bulunmamaktadır. Fakat diğer kanser hücre hatları üzerine oleuropeinin etki mekanizmaları ayrıca değerlendirilmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre oleuropeinin doza ve zamana göre sitotoksik etkisi çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanarak 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılığına olan etkisi belirlenmiş ve sonuç olarak hücrelerin %50 sinin ölümüne yol açan miktarı IC_{50} (LD_{50}) dozu 48. saate 350 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). 24. saatteki etkisine bakıldığında hücre canlılığının yüzde ellilerin altına düşmemesi dolayısıyla 48. saatteki IC_{50} doz konsantrasyonu alınmıştır. Bundan sonraki diğer araştırmalarda kontrol grubu ve IC_{50} dozunun olduğu grup arasındaki değişimler araştırılmıştır. Trizol ile RNA izolasyonun ve takibinde cDNA sentezlenmesinin ardından hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili genlerin kontrol ve doz grupları arasındaki mRNA düzeyinde ifade değişimleri araştırılmıştır. PCR sonuçlarına göre hücre döngüsü ile ilgili panelden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ifadeleri değişen genler CCND1 (SiklinD1), CCND2 (SiklinD2), CCND3 (SiklinD3), CDK4 (Siklin bağımlı kinaz 4), CDK6 (Siklin bağımlı kinaz 6), CDKN2a, CDKN2B, CDKN1A, GADD45 dır. Apoptozla ilişkili olup anlamlı değişim gösteren genler ise Bcl-2, DFFA, Bad, Bax, Bid, Kaspaz-1, Kaspaz-8, Kaspaz 9, Kaspaz-3, TP53'tür. Tablo 2.5 te çeşitli araştırmaların karşılaştırmalı sonuçlarının değerlendirildiği verileri de dikkate aldığımızda diğer kanser türlerinde de benzer bazı genlerin ifadelerinde ki değişimlerin bizim bulgularımızla benzerlik içermektedir. Bu durum oleuropeinin benzer genlerin ifadeleri üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir.

Hücre çoğalması ve hücre döngüsünün ilerlemesinin kontrolünde rolü olan genlerin ekspresyonları ile bağlantılıdır. Ökaryotik hücre döngüsü M (mitoz), G1, S, ve G2 fazlarından oluşmakta ve bu süreçlerde hücre uyarımı ile büyüme meydana gelmekte ya da hücre G0 fazında durmaktadır. Hücre döngüsü G1-S geçişinde, G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları bulundurmaktadır. Hücre döngüsü siklin bağımlı kinazlar (cdk, katalitik alt birim) ve siklin (cyc, düzenleyici alt birim) tarafından kontrol edilmektedir. Hücre homeostazis, hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptoz ile sürdürülmektedir. Hücre döngüsündeki düzenleme ve kontrol basamaklarındaki etkileşimler çok sayıda ve komplekstir. Bu

durumlarda meydana gelebilecek hatalar hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasına ve kanser gelişime sebep olabilir.

Hücre döngüsünde görev alan ve CDK'ların alt birimini oluşturan siklinler, hücre döngüsünün belirli evrelerinde sentez edilirler ve daha sonra yıkıma uğrarlar. CDK'lar hücre döngüsünün bir sonraki evresine geçebilmesi için gerekli olan kritik hedef proteinleri fosforile ederek bu döngünün devamını sağlarlar. Siklinler CDK'lardan farklı olarak, hücre döngüsünün belirli evrelerinde sentez edilirler. Fonksiyonları CDK'ları aktive etmektir. SiklinD; hücre döngüsünde düzeyi ilk artan siklidir. G1'in ortasında ortaya çıkar ve S evresinde yok olur. D1, D2, D3 ubiquitin-proteozom yolağı üzerinden yıkılır. D tipi siklinler CDK4 ve CDK6'yı regüle ederler. SiklinD, hücre döngüsünün G1 evresinde CDK4'e bağlanır ve onu aktive ederek SiklinD-CDK4 kompleksini şekillendirir. Bu kompleksin hücre döngüsünde kritik bir rolü bulunur, retinoblastoma proteini (RB) fosforiller. RB'nin fosforilasyonu, hücre döngüsü için moleküler bir anahtar gibi işlev görür. Siklin ve CDK'ların normal görevleri; hücre döngüsünün kontrolüdür ve bu moleküllerin aktivitelerinin yanlış düzenlenmeleri hücre proliferasyonu artışı ve kanserle ilişkilidir. SiklinD birçok kanserde meme, özafagus, baş ve boyun, karaciğer, lenfoma gibi yüksek oranda ifade edilir. Ekspresyon düzeyi hastalığın seyri ve sağkalım ile korelasyon gösterir.

SiklinD1(CCND1), kromozom 11q13 bölgesinde, siklinD2 (CCND2), kromozom 12p13 bölgesinde lokalize olup siklin bağımlı kinazların düzenlenmesinde görev alırlar. Çoğunlukla CDK4 ve CDK6 ile ilişkili olup hücre döngüsünün G1 fazında ve G1-S geçişinde rol almaktadırlar. CDK4, serin / theronin kinaz ailesi üyesi bir proteindir ve hücre döngüsünde G1 fazı ilerlemesinde kritik rol almaktadır. D tipi siklinler ve p16 (INK4) ile kontrol edilmekte ve bu genlerde meydana gelen değişiklikler karsinogenezde etkili olabilmektedir. CDK6, kromozom 13q12 bölgesinde lokalize bulunan bir siklin bağımlı kinaz ailesi üyesidir. Hücre döngüsünde G1 fazı ilerlemesinde ve G1-S geçişinde kritik roller üstlenmektedir. İlk olarak G1 fazı ortasında ortaya çıkmakta ve D tipi siklinler ile INK4 ailesi tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Sıklıkla bir tümör baskılayıcı gen olan Rb proteininin regülasyonunda rol alır (Web_10).

Yapılan çeşitli çalışmalarda nöroblastoma hücre hatlarında ve nöroblastoma hastalarında CDK4/CDK6 kinaz aktivitesinde önemli düzeyde artış olduğu gösterilmiştir. SiklinD1 ve CDK 4 gen amplifikasyonunun yanı sıra homozigot CDKN2A delesyonu da rapor edilmiştir (Easton vd 1998, Krasnoselsky vd 2005,

Mosse vd 2007, Molenaar vd 2012, Rader vd 2013). Ayrıca Molenaar ve arkadaşları (2008) SiklinD1, CDK4, CDK6 gen ifadelerinin nöroblastom vakalarında overekspresyonu göstermekle birlikte diğer tümörlerle karşılaştırıldığında da nöroblastomda bu genlerin ekspresyon düzeylerinin daha yüksek olduğu belirtmişlerdir. Nöroblastomda siklinD1, CDK4 ve CDK6'daki genomik aberasyonların saptanması bu pediatrik tümörde hücre döngüsünün G1 aşamasına giriş kontrol noktasında bir bozukluk olduğunu gösterir (Molenaar vd 2008). Rader ve arkadaşları (2013) CDK4, CDK6 ve SiklinD1 protein ekspresyonlarının yüksek olduğunu BE2C, IMR5, 1643, SY5Y, NGP, KELLY, LAN5, NLF, N869, NBSD, NBLS, SKNF1, EBC1, SKNAS, NB16, RFE1 nöroblastom hücre hatlarında Western Blot yöntemi ile göstermişler ve SiklinD/CDK4/CDK6/RB yolağının nöroblastomada hiperaktif olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bazı diğer pediatrik tümör hatlarından, DAOY (medulloblastom), H441 (akciğer adenokarsinom), T98G (glioblastom), PANC1 (pankreatik karsinom) ile de karşılaştırılmaları yapılmış ve nöroblastoma hücre hatlarında ekspresyonlarının daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (Rader vd 2013). SiklinD1 nöroblastomlarda ekspresyon gösterirken ganglionöromlarda bu ekspresyon düşük bulunmuştur. G1 düzenleyici genlerde artmış ekspresyon olması andiferansiye fenotiple ilişkili saptanmıştır (Lu ve Lane 1993, Zhang vd 2004). Aynı çalışmada düşük ve yüksek risk nöroblastom hasta gruplarında da SiklinD1, CDK4, CDK6 ve RB ekspresyonları protein düzeyinde Western blot yöntemi ile karşılaştırılmış ve yüksek risk gruplarında düşük risk gruplarına göre bu yolaktaki genlerin tamamının daha yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir. Araştırmalarda, yüksek risk nöroblastom olgularında düşük risk nöroblastom olgularına göre, SiklinD1 ekspresyonunun % 19.5, CDK6 ekspresyonunun %15.7 ve CDK4 ekspresyonunun %5.1 oranında daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak bu veriler ışığında kullanılacak kemoterapötiklerin veya yeni ajanların bu yolağa da etki göstermesi gerektiğini belirtmişlerdir (Rader vd 2013).

Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre, doz grubu hücrelerinde (350µM OLE) kontrol grubuna göre, SiklinD1 (CCND1) gen ekspresyonu 4,32 kat azalmış ($p=0,025$), CDK4 ekspresyonu 6,3 kat azalmış ($p=0,011$) ve CDK6 ekspresyonu da 4,99 ($p=0,022$) kat istatistiksel olarak da anlamlı düzeyde azalmıştır. Çalışma sonuçlarımıza göre doz grubunda kontrol grubuna göre, SiklinD2 (CCND2) gen ekspresyonunun 3,19 kat ($p=0,008$), SiklinD3 (CCND3) gen ekspresyonunda 5,7 kat ($p=0,04$) azaldığı bulunmuştur. Ayrıca western blot yöntemi ile kontrol ve doz grupları arasındaki SiklinD1'in protein düzeyindeki değişimi de gösterilmiştir. Doz grubunda SiklinD1'in protein düzeyindeki ekspresyonun azaldığı da gösterilmiştir. Oleuropein maruziyeti

sonrasında SH-SY5Y hücrelerinin Siklinler, CDK4 ve CDK6'nın baskılanması ile hücre döngüsün G1 arreste indüklenmiş olabileceğini ve böylece hücre proliferasyonunun azalmasına neden olduğunu düşünmekteyiz.

Kromozom 6p21.2 bölgesinde lokalize olan p21, siklin bağımlı kinaz olup hücre siklusunun ilerlemesini önleyen tümör süpresörlerdendir (Web_10). Normalde p53 ve p21 proteinleri hücre döngüsünün G1 kontrol noktasında görev almaktadır. p21 hücre döngüsünü CDK'lar ile etkileşime girerek kontrol edilmesinden sorumludur (Lin vd 1996). Çalışmamız sonucuna göre, p21 gen ekspresyonu doz grubu hücrelerde yaklaşık olarak 13 kat artış ($p=0,006$) göstermiştir. Bu durum p21'in CDK4/CDK6 inhibisyonunda modülator görev almış olabileceğini göstermektedir.

CDKN2A (p16)'nın nöroblastomun da içinde bulunduğu çeşitli tümörlerde mutasyona ve delesyona uğradığı bilinmektedir. CDKN2B geni de CDKN2A genine komşu ve kromozom 9p'de lokalizedir (Kamb vd 1994, Rader vd 2013, Web_10). CDKN2A (INK4A/p16) geni, yetişkin kanserlerinin çoğunda mutasyona ya da delesyona uğrar. P16 hücre kontrolünde kritik bir rol oynar. Primer NB'lardaki bazı çalışmalar, P16 inaktivasyonuna ait veya CDKN2B (KIP1/p15) ve CDKN2C (INK4C/p18) genleri ile ilgili kanıt bulunamamıştır (Maris ve Matthay 1999). Çalışmamızda CDKN2A (p16) geninde kontrol grubuna göre oleuropein uygulanan doz grubunda 10.8 katlık ($p=0,006$) bir artış, CDKN2B (p15)'te, 9.5 katlık bir artış ($p=0,001$) tespit edilmiştir. Oleuropein maruziyeti sonrası CDK inhibitörlerindeki bu artış CDK'ların baskılanmasını sağlamış ve hücre döngüsünün durdurulmasına katkı sağlamış olabileceği fikrini desteklemektedir.

Hücre döngüsü ile apoptoz entegrasyonunu sağlayan anahtar faktör olan tümör baskılayıcı gen ürünü bir protein olan p53'dür. p53, kromozom 17p13.1'e lokalizedir (Web_10). Normalde esas fonksiyonu, DNA bir şekilde (radyasyon veya ilaç etkisi gibi) hasar aldığı zaman, hücre döngüsünün dolayısıyla hücre proliferasyonunun durdurulup hücrelerin hasarı tamir etmesi için ona zaman kazandırmaktadır. p53 bilindiği gibi kanser hastalarının mutasyonunda en sık görülen proteindir ve kanserlerin %50-55'inde mutanttır. p53 normal olarak bir CKI'ü olan p21'in sentezini arttırarak proliferasyonu bloke eder. p53 tarafından hücre döngüsü inhibitörlerinin (CDKN1A, GADD45 gibi) transkripsiyonel aşırı düzenlenmeleri hücreyi G2-M arrestine götürür (Web_11). Oleuropein maruziyeti sonucunda p53 ekspresyonu doz grubunda kontrol grubuna göre 2 katlık ($p=0,006$) bir artış görülmesine karşılık (Şekil 16,17) CDKN1A ekspresyonunun 13 kat arttığı görülmüştür. Bu durumda CDKN1A

ekspresyonu p53 artışından daha fazla düzeyde olması başka mekanizmalarla da CDK inhibitörü olan p21 (CDKN1A)'in aktive olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Böylece bu kompleks pRB'yi fosforile edemeyeceğinden E2F ailesi de pRB'den ayrılamayacağı için siklus ilerletici işlevini yerine getiremez ve hücre döngüsü durur. NB' da, p53 proteininin sitoplazmik lokalizasyon aberasyonu gözlenmiş ve G1-S kontrol noktasını bozduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, NB hücrelerinin DNA hasarı nükleusta wild-type p53'ün normal translokasyonuna ve p21 uyarılmasına neden olmaktadır (Maris ve Matthay 1999).

Oleuropein maruziyeti ile p53 ve p21 ekspresyonlarındaki değişim, hücre döngüsünün durmasına bu şekilde katkı yapmış olabilir. Sonuç olarak, p53 hem G1-S hem de G2-M arrestine aracılık yapmış ve bu durum da genomik bütünlüğün korunmasındaki kritik rolü ile de uyumlu görünmektedir. Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırır ve hücre hasarlanmış DNA'sını tamir eder. Ama hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu kez p53 hücreyi apoptoza götürür. Oleuropein maruziyeti sonrası ayrıca doz grubunda, DNA tamirinde görevli GADD45 geninin ekspresyon düzeyi de yaklaşık 20 katlık bir artış ($P=0,012$) tespit edilmiştir. GADD45 hücre siklusunun G2-M kontrol noktasında önemli rolü olan nükleer proteindir. p15, p21 ve p27 nin baskılanarak hücre büyümesinin düzenlenmesinde görevlidir (Vermeulen vd 2003). GADD45 ifadesindeki bu önemi artış ile muhtemel başarısız veya yetersiz tamirden dolayı yine de hücre ölüm yolağı aktive olmuştur. p53'ün apoptozu indüklemesi Bax ekspresyonunu arttırması ve böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleştirir.

Apoptoz temel olarak hücre dışından tetiklenen, pozitif TNF ($TNF\alpha$ varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) dışsal yol veya hücre içinde DNA hasarı, ER stresi ya da mitokondriden tetiklenen içsel yol olmak üzere çeşitli yollarla başlatılır. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur. Hücre içi ya da hücre dışında başlayan apoptotik süreç kaspazlar adını verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Apoptoz dış yoldan, ölüm reseptörleri adı verilen birbiriyle yapısal akraba olan birçok reseptör tarafından aktif olarak uyarılır. En iyi örnekleri $TNF\alpha$ ve Fas reseptörleridir. Bu reseptörler hücre zarında bulunan bir çeşit integral membran protein yapısındadırlar. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar prokaspaz-8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Kaspaz-8, kromozom 2q33-q34 bölgesinde lokalizedir. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz-8, inaktif durumda proenzim olan kaspaz-3, kaspaz-6, ve kaspaz-7'nin bir zincir

biçiminde aktifleşmesine yol açar. Aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi üyelerinden proapoptotik bir protein olan bid'i kırar ve aktifleşmesini sağlar. Bid kromozom 22q11.1 de lokalize olup aktifleşmesi mitokondriden sitokrom c salınımı ile kaspazların aktifleşmesi sağlanır.

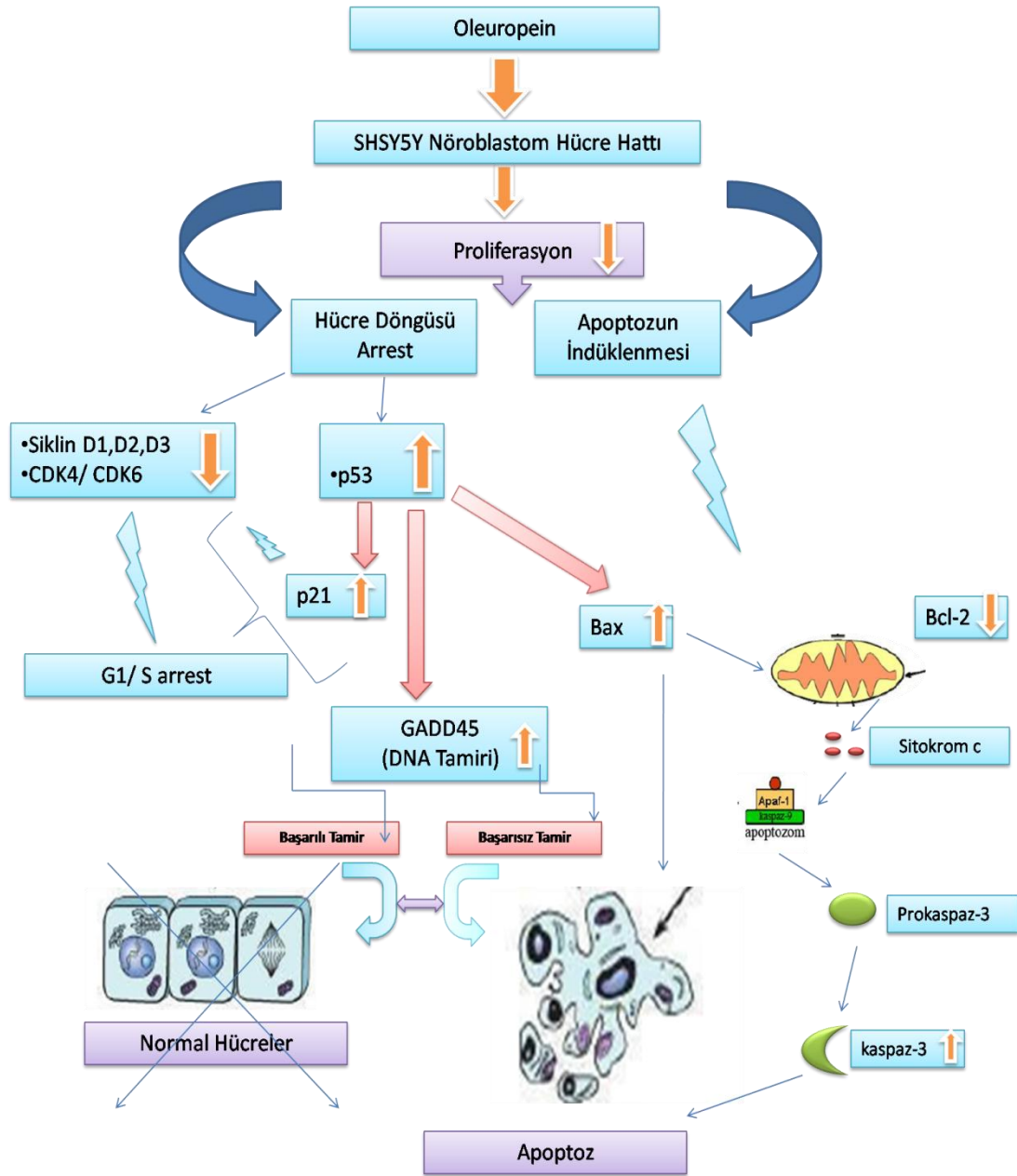
Bad, bir çok normal hücrede bulunmaktadır ve kompleks oluşturma mekanizması fosforilasyon defosforilasyon mekanizması ile düzenlenmektedir. Fosforile iken diğer anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştirir. Defosforile olduğu zaman sitokrom c salınımını ve kaspazların aktifleşmesini sağlamaktadır (Web_11). Nöroblastomlarda apoptoz mekanizmasında oluşan hasarla ilgili bilgiler mevcuttur. Kaspaz-8' in nöroblastomlarda tümör süpresör geni olduğu bulunmuştur. Nöroblastomlarda gerçekleşen apoptozun mitokondride oluşan içsel yol ile oluştuğuna dair bulgular vardır (Kenicli vd 2002, Johnsen vd 2009).

Çalışmamız sonucuna göre oleuropein uygulanan doz grubu SH-SY5Y hücrelerinde kaspaz-8 aktivitesinde 2 kat ($p=0,019$), BID ekspresyonunda 2 kat ($p=0,03$) ve BAD ekspresyonunda 6.6 kat ($p=0,003$) artış tespit edilmiştir. Fakat bu artışlara rağmen TNF ve TRAIL gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyonlarının değişiminde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum bize apoptozun dış yoldan daha ziyade iç yolak aracılığıyla indüklendiğini düşündürmektedir. Çünkü oleuropein uygulanan doz grubunda, Bax geninin ekspresyon düzeyinin yaklaşık 20 kat arttığı ($p=0,006$), Bcl-2 geninde de 3,4 kat azalış ($p=0,0005$) olduğu böylece Bax/Bcl-2 oranının önemli düzeyde değiştiği bulunmuştur. Doz grubunda Bcl-2'nin protein düzeyindeki ekspresyonunun azaldığı da western blot yöntemi ile gösterilmiştir.

Bcl-2 ve BCLX gibi anti-apoptotik genler, erken nöral ontojenide yüksek düzeyde eksprese edilir. Bcl-2 geni kromozom 18q21.3'de lokalizedir. Bcl-2, çoğu nöroblastom hücre hatlarında ve primer tümörde aşırı ifade edilir. Bcl-2 proteini, ganglionöromlarda nadiren rastlanır. Tümör regresyonu apoptoz inhibitör yokluğuna bağlı olabilir. Ayrıca Bcl-2 proteinin yüksek düzeyleri tümörün ilaca direncinde önemli rol oynar (Maris ve Matthey 1999). Farelerde yapılan Bcl-2 gen çalışmalarında dalak, lenf düğümü, kemik iliği, timus ve beyin normal dokularında bcl-2 gen ekspresyonu olduğu ortaya konmuştur (Negrini vd 1987). Reed ve arkadaşları nöroblastom ve nöronal özellikler gösteren PNB ilişkili tümör hücrelerinde değişik derecelerde bcl-2 protoonkogen ekspresyonu izlemişler ve Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun apoptozu engelleyerek hücrel yaşam sürecini arttırdığı ve bu şekilde hücre ölümü ile ilişkili olduğunu

göstermişlerdir (Reed vd 1991). Ayrıca çok sayıda hücre ölümü mekanizmalı kemoterapötikler ile etkileştiği bulunmuştur. Sonuç olarak yüksek Bcl-2 seviyesi, nöroblastom hücrelerinde tedaviye kötü yanıt ile ilişkilidir. Dolayısıyla hasta yaşam süresini kısaltmaya yol açması beklenmektedir. Castle ve ark (1993) nöroblastom tanılı hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada bcl-2 geni ile kötü histoloji ve evre arasında güçlü ilişki bulmuşlardır (Castle vd 1993). Bax kromozom 19q13.3'de lokalize olan ve ilgili bağlanma bölgeleri vasıtasıyla p53'ün doğrudan transkripsiyon kontrolü altındadır. Apoptotik uyarılar Bax'ın sitozolden mitokondriye yer değiştirmesini tetikler ve bu da sitokrom c salınımını gerçekleştirir. Sitokrom c'nin mitokondriden salınımı apaf-1 ve kaspaz-9 içeren, kaspaz 9'un aktive olduğu komplekslerin (apoptozom) oluşumuna neden olur. Daha sonra kaspaz-9 proteolitik kesim ile aşağı yöndeki kaspaz-3 gibi diğer kaspazları keser ve aktive eder ve nihayetinde hücre ölümü gerçekleşir. Kaspaz-9 kromozom 1p36.21, kaspaz-3 de kromozom 4q34'te lokalizedir. Oleuropein maruziyeti ile doz grubu hücrelerde sırasıyla hem kaspaz-9 ve hem de kaspaz-3 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,022$ kaspaz-9 ve $p=0,008$ kaspaz-3) 2 kat artış gerçekleşmiştir. Bu durumda oleuropein iç mitokondriyal yolakta bax/bcl-2 oranının değişmesi, sitokrom c salınımı ile kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ile apoptozu indüklediğini düşündürmektedir. Şekil 5.1'de oleuropeinin SH-SY5Y hücrelerindeki etki mekanizması özetlenmiştir.

Apoptozun başlamasından sorumlu olan enzim grubu kaspazlardır ve substratları hücrede bulunan çok sayıdaki proteinlerdir. Kaspazların aktivasyonu sonucunda hücrede; hücrenin küçülmesi, kromatin kondansasyonu, DNA fragmentasyonu ve sonunda hücrelerin küçük parçalara ayrılması bu hücrelerin komşu hücreler tarafından sindirilmesi olayları meydana gelir. Apoptozun terminal basamağı olan DNA fragmentasyonu iki temel olayla karşımıza çıkar. DNA ilk olarak parçalara ayrılır ve ardından oligonükleozomal parçaya çevrilir. İki büyük apoptotik nükleaz bulunmaktadır. İlki DNA fragmentasyonu faktörü (DFF)/kaspaz-aktive DNaz (KAD), diğeri ise endonükleaz G (Endo G)'dir. DNA'nın nükleazlarca kesilmesi, kromatin kondansasyonunu tetikler ve beraberinde DNA fragmentasyonu görülür. Apoptozun terminal evresinde karşımıza çıkan bu olayda, çalışmamız sonuçlarına göre DFFA geninin ekspresyonu doz grubunda 2 katlık ($p=0,04$) bir artış tespit edilmiştir. Kaspaz-3 için substrat görevi gören DFFA, kromozom 1p36.3-p36.2 bölgesinde lokalizedir. Oleuropein uygulanan doz grubunda ekspresyonundaki bu artışla, oleuropeinin DFFA ekspresyonunu arttırarak apoptozun erken safhasında meydana gelen DNA fragmentasyonuna neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.1 Oleuropeinin SH-SY5Y hücrelerindeki etki mekanizması (Aşağı ok: down regülasyon; Yukarı ok: upregülasyon)

Ayrıca bu çalışma kapsamında apoptoz ile ilişkili verilerin teyit edilmesi TUNEL testi ile yapılmıştır. Elde edilen verilere göre kontrol ve doz grupları arasında apoptotik hücre yüzdesi karşılaştırılmıştır. Boyama işlemi Hoechst boyası ile yapılmış ve apoptotik hücrelerin sayımı floresans mikroskobu 40X büyütmede gerçekleştirilmiştir. Sayılan alanlarda kontrol grubu hücrelerde apoptotik hücre oranı $8 \pm 1,02$ bulunmuştur. Oleuropein muamele edilen grupta yüzde apoptotik hücre oranı $36,4 \pm 3,27$ olarak tespit edilmiştir. Bu durum bize oleuropeinin gen düzeyinde gösterilen apoptotik etkisinin başka bir metot yardımıyla morfolojik olarak da

gösterilmesini sağlamıştır. Sonuçlar bize oleuropeinin SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde apoptoz mekanizmasını indüklediğini göstermektedir. Nöroblastom üzerine yapılmış oleuropein çalışmaları olmadığı için karşılaştırma yapılamamış olup verilerimiz güncel bilgidir.

Çalışma sonuçlarına göre, ayrıca oleuropein muamelesi sonrasında SH-SY5Y hücre hattında doz grubunda kontrole göre kaspaz-1 ekspresyonunun 4,2 kat arttığı ($p=0,01$) tespit edilmiştir. 11q23 bölgesinde lokalize olan Kaspaz-1'in proinflamatuvar sitokinleri aktifleştirerek savunma sisteminde görev aldığı bilinmektedir (Sperandio vd 2000). Literatürde oleuropein ve kaspaz-1 üzerine etkisi ile ilişkili bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte, kaspaz-1'in diğer anti-inflamatuvar ilişkili genlerin değişimleri de araştırılarak, oleuropein ve inflamasyon ilişkisi hakkında daha detaylı yorum yapılabilir.

Yapılan invazyon testi sonuçlarına göre kontrol grubu ve oleuropeinin uygulandığı doz grubu hücrelerinde invazyon kapasitesine etki durumu karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu hücrelerinde ortalama invazyon yüzdesi $74,66 \pm 2,7$ olarak tespit edilmişken, oleuropein uygulanan doz grubu hücrelerde bu oranın $41,46 \pm 2,04$ ya düştüğü ve invazyonun $33,2 \pm 2,33$ oranında baskılandığı gösterilmiş ama etki mekanizması ile ilgili bir çalışma bu tez kapsamında yapılmamıştır. Oleuropein ile yapılan bazı çalışmalarda, matriks metallo proteinazların aktivitelerinin modülasyonu ile invazyona olan etkisi arasında ilişkiler bulunmuştur. Hassan ve arkadaşları (2012) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde oleuropeinin MMP2 ve MMP9 üzerinden metaztazi ve invazyonu baskıladığını göstermişlerdir (Hassan vd 2012). Ayrıca monositik lösemi hücre hattı THP-1 ile yapılan başka bir çalışmada oleuropeinin MMP-9 modülasyonu ile invazyona etki gösterdiği rapor edilmiştir (Agli vd 2010). Bu çalışmalar sonucunda da gösterildiği gibi, oleuropeinin SH-SY5Y hücrelerinde, hücre invazyonu üzerinde etkisi, matriks metalloproteinazların ekspresyonlarındaki değişikliklerin hedeflenmesi ile gerçekleştirilmiş olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır.

Bu çalışma kapsamında oleuropeinin koloni formasyonu üzerine etkisi de araştırılmış ve sonuçlara göre kontrol grubunda koloni oluşumu ortalama 41 ± 2 , doz gruplarında ortalama 19 ± 1 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre oleuropein koloni oluşumunu $53,6 \pm 4,71$ oranında azaltmıştır. Dolayısıyla kanser hücrelerinin üremelerinin inhibe edilmesi böylece oleuropeinin SH-SY5Y hücrelerinde invazyona ve koloni oluşumuna etkisi ortaya koyulmuş ve etkili bir ajan olduğu gösterilmiştir.

Literatür verilerine göre oleuropeinin anti-kanserojen etkisi ile yapılan çalışmaların en yoğun olduğu kanser türleri arasında meme kanseri yer almaktadır. Meme kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarda oleuropeinin anti-poliferatif, anti-metastatik ve apoptotik etkinliği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla ortaya koyulmuştur. 2005 yılında yapılan bir araştırmada oleuropeinin insan ve hayvan deneylerinde anti-tümöral ve anti-anjiyojenik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattı, T-47D meme duktal karsinom hücre hattı, LN 18 glioblastom hücre hattı, RPMI 7951 Melanoma hücre hatları üzerinde *in vitro* düzeyde oleuropeinin hücre proliferasyonunu azalttığı, hücre invazyonunu baskıladığı gösterilerek potansiyel anti-tümör ajanlardan biri olabileceği belirtilmiştir. (Hamdi ve Costallen 2005). Menendez ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada, HER2 overeksprese meme kanseri hücrelerinde oleuropein aglikan muamelesi ile apoptozun indüklediği göstermişlerdir (Menendez vd 2007). MCF-7 hücreleri üzerine oleuropein ve hidroksitrizolün anti-proliferatif etkinlikleri araştırılmış ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azaltıldığı gösterilmiştir. Ayrıca hidroksitrizol ve oleuropeinin apoptozu indüklediği ve hücre döngüsünü, G1-S geçişi sırasında durdurduğunu göstermişlerdir (Han vd 2009). Benzer bir çalışma aynı hücre hattında tekrar, Sirianni ve arkadaşları (2010) tarafından yayınlanmış ve bu çalışmada oleuropein ve hidroksitrizolün MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu ERK1/2 aktivasyonunu üzerinden yaptığını belirtmişlerdir (Sirianni vd 2010). Diğer bir çalışmada MCF-7 meme adenokarsinom ve T-47D meme duktal karsinom hücrelerinde oleuropeinin hücre çoğalmasını engellediğini göstermişlerdir (Bulotta vd 2011). Hassan ve arkadaşları (2012) yayınladıkları bir çalışmayla, oleuropeinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde anti-metastatik etkisini gösterişlerdir. Çalışmada 200 µg/ml oleuropeinin 24, 48 ve 72. saatteki TIMP-1, TIMP-3, TIMP-4, MMP-2 ve MMP-9 genlerinin ekspresyonlarını değiştirerek zamana bağlı olarak metastazı inhibe ettiğini belirtmişlerdir. TIMP 1, 3, 4'ün oleuropein uygulamasından sonra ifadelerinin arttığı MMP-2 ve MMP9 ekspresyonlarının azaldığını göstermişlerdir (Hassan vd 2012). Hassan ve arkadaşları (2013) MCF-7 hücre hattında oleuropein apoptozu Bax ve Bcl-2 ekspresyon değişimi ve p53 yolağı aracılığıyla indüklediğini de rapor etmişlerdir (Hassan vd 2013). Elamin ve arkadaşları (2013) tarafından yayınlanan bir başka çalışmada oleuropeinin meme kanseri hücrelerinden MCF-7 hücrelerinde IC₅₀ dozu 110 µM, MDA-MB-231 hücrelerinde IC₅₀ dozunu 160 µM olarak tespit etmişlerdir. Oleuropeinin mitokondrial yolak aracılığıyla apoptozu indüklediği kaspaz-3 ve Bax ekspresyonunu arttırdığı, Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı, doz grubunda Bax/Bcl-2 oranının kontrol grubuna göre 7 kat daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Hücre proliferasyonunun inhibisyonunun, oleuropein tarafından DNA replikasyonun gerçekleştiği S fazını geciktirerek

gerçekleştirdiği, ayrıca oleuropein NFkB ve siklinD1 aktivasyonunu down regüle ederken p21'i aktive ettiğini göstermişlerdir (Elamin vd 2013). Oleuropein ve hidroksitrizolün ER-negatif SKBR3 meme kanseri hücrelerinde GPER/GPR30 bağımlı yolağı aktive edip apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (Chiment vd 2014).

Oleuropeinin de içinde bulunduğu zeytinyağı içerisinde bulunan polifenoller kolon kanseri üzerine etkilerini anlamak için yapılan bir çalışmada Fas aktivitesi üzerinden hücre ölümünün tetiklendiği HT-29 kolon kanseri ve lenf nodu metastatik hücre hattı SW620 hücrelerinde yapılan çalışmayla gösterilmiştir (Notarnikola 2011). Kolon kanser hücre hattı Caco-2 ile yapılan bir çalışmada oleuropeinin Caco-2 hücrelerinde G2-M hücre siklus blokajını indüklediği ve bunu p38 ve CREB aktivitesinin ve COX-2 ekspresyonunun inhibisyonu ile yapıldığı gösterilmiştir (Corono vd 2007). Kolon kanseri ile yapılmış başka bir çalışmada oleuropeinin analjezik, anti-inflamatuar ve anti-kanserojen aktivitesi hem in vitro hem de in vivo olarak gösterilmiştir. Çalışmada, HTC116 kolon kanseri hücre hattı ve Atimik nu/nu ratlar kullanılmış ve dozaj çalışmaları yapılmıştır (Fezai vd 2013). Yine wistar sıçanlarında yapılmış bir çalışmada kimyasal kullanılarak hepatoselüler karsinom indüklenmiş sıçan modelinde, oleuropeini hepatoprotektif ve anti-kanser özellikleri incelenmiş ve etkili sonuçlar bulunmuştur (Abdel-Hamid 2011). Kolon kanser ile 2013 yılındaki yapılmış başka bir araştırmada HT-29 hücre hattındaki oleuropeinin etkisi ile ilgili bir çalışma sonucunda hücre proliferasyonuna etkisinin HIF-1 α downregülasyonu aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Bu kapsamda HIF-1 α , p53, PPAR γ , I κ B α , pJNK, ve p38 MAPK proteinlerinin western blot ile ekspresyon değişimleri gösterilmiştir. Grade 2 kolon adenokarsinom HT-29 hücrelerinde oleuropeinin etkili dozu (IC₅₀ dozu) 400 μ M olarak tespit edilmiştir. (Cardeno 2013).

Prostat kanser hücre hatlarında (BPH-1, LNCaP ve DU145) oleuropeinin 100 μ M ve 500 μ M dozajında zamana bağımlı hücre proliferasyonları araştırılmıştır (Acquaviva 2012). A549 akciğer kanser hücre hattında yapılan bir çalışmada oleuropeinin hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Oleuropeinin A549 hücre hattında, IC₅₀ değeri 59.96 μ M olarak tespit edilmiştir (Mao vd 2012).

Oleuropeinin TPC-1 ve BCPAP tiroid kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı, doz gruplarında hücredeki reaktif oksijen seviyesini azalttığı bu şekilde antiokside aktivite gösterdiği, Erk ve Akt aktivasyonunu üzerine etki gösterdiği belirtilmiştir (Bulotta vd 2013). Ayrıca Kimura ve arkadaşları 2009 yılında, UV ile irite

olmuş deri kanseri modelinde, oleuropein uygulamasının MMP-2, MMP-9, MMP-13, VEGF ve COX2 genlerinin ifadesini azalttığını bulmuşlardır (Kimura vd 2009). Oleuropeinin servikal karsinom hücre hattı olan HeLa hücrelerinde JNK (c-Jun N-terminal protein kinaz) aktivasyonu ile ilişkili mitokondriyal apoptotik kaskadın tetiklenmesi aracılığı ile apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Yao vd 2014). Fabiana ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada zeytinyağı etken maddelerinin PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) ve HL-60 (Promyelotic lösemi) hücrelerinde DNA hasarına karşı hücreleri koruduğu önerilmiştir (Fabiana vd 2008). Monositik lösemi hücre hattı THP-1 ile yapılan bir çalışmada zeytinyağı fenollerinin Metalloproteinaz 9 ekspresyonunu modüle ettiği ve NFkB yolağı ile bağlantısını olduğunu rapor edilmiştir (Agli vd 2010). Zeytin yaprağı ekstraktı ile yapılan bir başka çalışmada oleuropeinin Kronik Myeloid Lösemi hücre hattı K562 hücrelerinde apoptozu ve monosit/makrofaj farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (Samet vd 2014). Tablo 2.5'de oleuropein ile yapılan *in vitro* hücre kültürü kanser hücre hatları ve *in vivo* hayvan modeli çalışmaları toplu olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak, hücre döngüsünde olaylar kaskadını düzenleyen ve kontrol eden etkileşimler çok sayıda ve komplekstir. Kemoterapi ve biyoterapi için kullanılan mevcut ajanlar ve oleuropein gibi yeni potansiyel ajanlar açısından hücre döngüsü kontrol noktaları ve apoptoz ilişkili mekanizmalar büyük potansiyele sahip hedeflerdir. Bu çalışma sonucunda; oleuropeinin, hücre canlılığı testi, Gerçek Zamanlı PZR, Western blot, Tunel Testi, İnvazyon ve Koloni Testleri ile nöroblastomada, ilk defa hücre proliferasyonunu azalttığı, hücre döngüsünü durdurup apoptozu indüklediği, invazyonu ve koloni oluşumunu azalttığı mekanizmalarıyla birlikte *in vitro* olarak gösterilmiş ve diğer detaylı çalışmalara ön bilgi oluşturması sağlanmış ve oleuropeinin potansiyel anti-kanserojen ajan olabileceği yönündeki tespitlere katkı sağlamıştır.

6.SONUÇ

Gün geçtikçe artan kanser insidansı, alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması ve kullanılması açısından oldukça ilgi çekmektedir. Hali hazırda kullanılan tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması ve yan etkiler göstermesi birçok bilim insanını da yeni araştırmalar konusunda teşvik etmektedir. Son yıllarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilecek doğal ve biyolojik etkili bileşiklerin keşfedilmesi en popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu araştırmamızda nöroblastomda çalışılmamış olan oleuropeinin etkileri araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmalar göstermiştir ki, oleuropein SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde;

- Hücre proliferasyonunu azaltmaktadır.
- IC₅₀ dozu 48. saate 350 µM olarak tespit edilmiştir.
- Hücre proliferasyonunu, hücre döngüsünde SiklinD1/CDK4/CDK6 yolağındaki genlerin ekspresyonlarını downregüle edip p53 ve p21'in genlerinin ekspresyonunu upregüle ederek durdurduğu bulunmuştur.
- Tunel testi yöntemi ile de apoptotik etkinliği teyit ettiğimizde, oleuropein muamele edilen grupta yüzde apoptotik hücre oranı %36,4±3,27 olarak tespit edilmiştir. Apoptotik etkinliğini Bax/Bcl-2 oranını değiştirerek kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün upregülasyonu indükleyerek gösterdiği tespit edilmiştir.
- Oleuropeinin hücre invazyonun azaltılmasında da etkili olduğu gösterilmiştir. Kontrol grubu hücrelerinde ortalama invazyon yüzdesi %74,66±2,7 olarak tespit edilmişken, oleuropein uygulanan doz grubu hücrelerde bu oranın %41,46±2,04 ya düştüğü ve invazyonunun %33,2±2,33 oranında baskılandığı gösterilmiştir.
- Oleuropeinin koloni oluşumunun azaltılmasında da etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçlara göre kontrol grubunda koloni oluşumu ortalama 41±2, doz gruplarında ortalama 19±1 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre oleuropeinin koloni

oluşumunu $53,6 \pm 4,71$ oranında azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç, oleuropeinin hücre proliferasyonunu düşürdüğünü destekleyen önemli bir bulgudur.

Tüm bu sonuçlar oleuropeinin nöroblastom tedavisinde alternatif bir potansiyel ajan olabileceği fikrini geliştirmekte ve bu konuda umut vermektedir. Oleuropein üzerinde yapılan çalışmaların ilerlemesi ve ilaç etken maddesi olarak kullanılabilmesi veya mevcut ilaçlarla kombine takviyelere destek sağlayıp sağlayamayacağının belirlenmesi, yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasında önemli olacaktır. Faz I olarak adlandırılan *in vitro* çalışmaların daha da detaylandırılıp, sonrasında test bileşenlerinin deney hayvanları üzerindeki etkilerinin de izleneceği faz II çalışmalarının yapılması oleuropeinin potansiyel ilaç yapımında kullanılabilmesi için gereklidir. Elde ettiğimiz tüm verilerimizi genel olarak değerlendirdiğimizde literatüre önemli katkı yapacağı ve ileri düzey araştırmalara katkı sağlayacağı açıktır.

7. KAYNAKLAR

Abdel-Hamid NM, Fawrzy MA, El-Moselhy MA. Evaluation of Hepatoprotective and Anticancer Properties of Aqueous Olive Leaf Extract in Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Rats. **American Journal of Medicine and Medical Sciences** 2011;1(1):15-22.

Acquaviva R, di Giacomo C, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, Gangia S, D'Orazio N, Abraham NG, Vanella L. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. **Int. J. Oncol** 2012;41:31–38.

Agli M, Fagnani R, Galli GV, Maschi O, Gilardi F, Bellosta S, Crestani M, Bossio E, Fabiana E, Caruso D. Olive oil Phenols Modulate the Expression of *Metalloproteinase 9* in THP-1 Cells by acting on Nuclear Factor kappa B Signaling. **J. Agric. food Chem** 2010; 58: 2246-2252.

Aksoylar S. Nöroblastom. **Klinik Gelişim** 2007; 20:62-72.

Al-Azzawie HF, Alhamdani MS. Hypoglisemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sci** 2006;78:1371-1377.

Algier LA, Hanoglu Z, Ozden G, Kara F. The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patients in Turkey. **Eur J Oncol Nurs** 2005;9(2):138-46.

Aydın GB. Nöroblastom: klinik özellikler ve tedavi sonuçları. Uzmanlık Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı**, Ankara, 2006, s.130

Armutcu F, Akyol S, Hasgül R, Yiğitoğlu R.M. Zeytin Yaprağının Biyolojik Etkileri ve Tıpta Kullanımı. **Spatula DD** 2011; 1(3):159-165.

Arslan A.S. Çeşitli bor bileşiklerinin glioma ve nöroblastoma kanserli hücre hatlarında apoptotik etkilerinin in vitro yöntemlerle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. **Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Eskişehir, 2011, s.108.

Bağcı Ö, Nöroblastik Tümörlerde anaplastik Lenfoma Kinaz Gen mutasyonlarının Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi. **Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, İzmir, 2009,s.59.

Baskın Y, Olgun N. Translasyonel çalışmalar için in vitro nöroblastoma sağaltım modeli. **Türk Hij Den Biyol Derg** 2007; 64(3):27-33.

Bazoti FN, Bergquist J, Markides KE, Tsarbopoulos A. Noncovalent interaction between amyloid-beta-peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom** 2006;17(4):568-75.

Bernard WS, Chistoper PW. **World Cancer Report 2014**. 2014, s 630. ISBN-13 9789283204299.

Bertin R, Acquaviva C, Mirebeau D, Guidal-Girouc C, Vilmer E, Cave H. CDKN2A, CDKN2B, and MTAP Gene Dosage Permits Precise Characterization of Mono- and Bi-Allelic 9p21 Deletions in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, **Genes Chromosomes Cancer** 2003;37:44-57.

Bertram JS. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine** 2001;21, 167-223.

Bodeker G, Kronenberg F. A public health agenda for traditional, complementary, and alternative medicine. **Am J Public Health** 2002;92(10):1582-91.

Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. **Food Chem Toxicol** 2011; 49(1): 179-184.

Brenes M, DeCastro A. Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. **J. Sci. Food Agric** 1998;77:353–358.

Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nature Reviews Cancer** 2003;3, 203-216.

Bulotta S, Corradino R, Celano M, D'Agostino M, Maiuola j, Oliverio M, Procopi A, Lannone M, Rotiroti D, Russo D. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. **Food Chemistry** 2011; 127:1609-1614.

Bulotta S, Corradino R, Celano M, Maiuolo J, D'Agostino M, Oliverio M, Procoppio A, Filetti S, Russo D. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology** 2013; 51:181-189.

Büyükbalcı A, El, SN. (2008), Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. **Plant Foods Hum Nutr** 2008; 63(1):27-33.

Cabadak H. Hücre siklusu ve Kanser. **ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi** 2008;9(3):51-61.

Campbell NA, Reece JB. Biology. 6. Edition. **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2008, s.362-375.

Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Rosillo MA, Alarcón de la Lastra C. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through down-regulation of HIF-1 α . **Nutr. Cancer** 2013;65:147–156.

Carrera-Gonzales MP, Ramirez-Exposito MJ, Mayas MD, Martinez-Martoz JM. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. **Trend in Food Science&Technology** 2013;31: 92-99.

Castle VP, Heidelberg KP, Bromberg J, Ou X, Dole M, Nunez G. Expression of the apoptosis suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. **The American Journal of Pathology** 1993;143(6):1543-50.

Ceylan S, Hamzaoğlu O, Kömürcü S, Beyan C, Yalçın A. Survey of the use of complementary and alternative medicine among Turkish cancer patients. **Complement Ther Med** 2002;10(2):94-9.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudry JM, et al. The E2F Transcription Factor is a Cellular Target for the Rb Protein. **Cel.**, 1991;65:1053-1062.

Cheung NV, Cohn SL. Neuroblastoma. **Springer- Verlag** 2005;44: 543-545.

Chimento A, Casaburi I, Rosana C, Avena P, Luca A, Campana C, Martine e, Santallo MF, Maggiolini M, Pezzi V, Srianni R. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. **Mol.Nutr.food Res** 2014;58:478-489.

Cingöz A. Nöroblastoma tümör hücrelerine karşı adipoz doku kaynaklı insan kök hücrelerinin apoptoz etkinliğinin araştırılması. Yüksek lisans Tezi, **Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul.2013, s. 80.

Cooper, G.M., Hausman, R.E.(2004). The Cell, A molecular Approach. Third Edition, **ASM Press**, Washington, USA, 2004, s 631-632.

Corona G, Deiana M., Incani A, Vauzour D, Dessi AM, Spencer PE. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. **Biochemical and Biophysical Research communications**. 2007; 362:606-611.

Daccache A, Lion C, Sibille N, et al. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. **Neurochem Int** 2011;58(6):700-7.

Dangelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Caspasso G, Pantoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. **Drug Metabolism and Disposition** 2001; 29:1492–1498.

Dekanski D, Selakovic V, Piperski V, Radulovic Z, Korenic A, Radenovic L. Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. **Phytomedicine** 2011;18(13):1137-43.

De la Puerta R, Martínez Domínguez ME, Ruíz-Gutierrez V, Flavill JA, Houtl JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitergic neurotransmission. **Life Sci** 2001;69:1213–1222.

Demirelli FH. Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi ve Monoklonal Antikorlar. **Ankem Dergisi** 2005;19 (Ek 2): 123-125.

Demirkaya M, Sevinir B. Nöroblastom. **Güncel Pediatri** 2006;3:128-132.

De la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Houtl JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. **Biochem. Pharmacol** 1999;57:445–449.

DeVita, Jr VT., Hellman Se, Rosenberg S.A., 1997. Cancer; principles and practice of oncology. 5.Edition. **Aptara In**, Lippincott-Raven, Philadelphia 1997, s 2-128.

Dilsiz N. Moleküler Biyoloji. **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2004, s.155-177.

Domitrović R, Jakovac H, Marchesi VV, Šain I, Romić Ž, Rahelić D. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Pharmacol. Res** 2012;65:451–464.

Drira R, Chen S, Sakamoto K. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 t3-L1 cells. **Life Sciences** 2011; 89: 708-716.

Easton J, Wei T, Lahti JM, Kidd VJ. Disruption of the cyclin D/cyclindependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. **Cancer Res** 1998;58:2624–32.

Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, Elobeid MA, Virk P, Al-Olayan EM, Hassan ZK, Mohammed OB, Abdelilah A. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on Er-negative cells. **Food and Chemical Toxicology** 2013;53:310-316.

El SN, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutr Rev** 2009; 67(11):632-8.

Ernst E, Cassileth BR. The prevalence of complementary/alternative medicine in cancer: a systematic review. **Cancer** 1998;83(4):777-82.

Ersus S, Esen Y. Oleuropein and other phenolic compounds in olive leaves and their health benefits. **Akademik Gıda** 2008; 682): 34-38.

Eser S, *Childhood Cancer Incidence in Izmir, Turkey*. **J Paediatr Hematol Oncol** 2007; 29(6).

Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: gubacon 2008. **International Journal of Cancer**. 2010;127, 2893-2917.

Fesik SW, Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nat Rev Cancer** 2005;5,876-885.

Fezai M, Laura S, Jemaa M, Ben-Attia M. Analgesic, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Extra Virgin Olive- Oil. **Journal of lipids** 2013; Article ID: 129736.

Franks LM, Teich N. Cellular and Molecular Biology of Cancer, 3rd Edition, **Oxford University Press**, New York, USA, 1996, s2-4, 21-25.

Furneri PM, Piperno A, Bisignano G. Antimycoplasmal activity of oleuropein. In: V.R. Preedy, & R.S. Watson (Eds.), *Olive and olive oil in health and disease prevention*. **UK: Academic Press** 2009; s.1355-1361.

Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. **Nature Reviews Cancer** 2004;4:177-183.

Galli C, Visioli F. Antioxidant and other activities of phenolics in Olives/ olive oil, Typical Components of the Mediterranean Diet. **Lipids** 1999; 34(supplements):s.23-26.

Giamarellos-Bourboulis EJ, Geladopoulos T, Chrisofos M, Koutoukas P, Vassiliadis J, Alexandrou I, Tsaganos T, Sabracos L, Karagianni V, Pelekanou E, *et al*. Oleuropein:

A novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Shock** 2006;26: 410–416.

Gonzales M, Zarzuelo A, Gamez MJ, Utrilla MP, Jimenez J, Osuna I. Hypoglycemic activity of olive leaf, **Plante Med** 1992;(58): 513-515.

Gonzales P, Folrido FB, Saenz de San Pedro F, de laTorre F, Rico P, Martin S. Immunotherapy with an extracts of *Olea europaea* quantified in mass units. Evaluation of the safety and efficiency after one year of treatment. **J. Investing. Allergol. Clin. Immunol** 2002; 12: 263-271.

Goulas V, Exarchou V, Troganis AN, Psomiadou E, Fotsis T, Briasoulis E, Erothanassis IP. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. **Mol. Nutr. Food Res** 2009;53:600–608.

Gözüm S, Tezel A, Koc M. Complementary alternative treatments used by patients with cancer in eastern Turkey. **Cancer Nurs** 2003;26(3):230-6.

Guimaras CA, Linden R. Apoptosis and alternative deastyles. **Eur J Biochem** 2004; 271: 1638-50.

Gutierrez Vr, Puerta R, Calata A. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Molecular and Cellular Bioc** 2001; 217:60-67.

Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. **Veteriner Fakültesi Dergisi** 2008 ;2: 73-78.

Haase GM, Perez C, Atkinson JB. Current aspects of biology, risk assessment and treatment of neuroblastoma. **Seminars in surgical Oncology** 1999;16(2),91-104.

Hall M, Bates S, Peters G. Evidence for different Modes of Action of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: p15 and p16 Bind to Kinases, p21 and p27 Bind to Cyclins, **Oncogene** 1995; 11, 1581-1588.

Hamdi HK, Tavis R, Castellon R. Methods for inhibiting angiogenesis. U.S. Patent 6632798 B2, 14 October 2003.

Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 2005;334:769–778.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011;4:144(5):646-74.

Han J, Taloreta TPN, Yamada PP, Isoda H. Antiproliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. **Cytotechnology** 2009; 59(1):45-53

Harry WF, Lubing G, Andrew MY, Muxiang Z. Expression and Regulation of Bcl-2, Bcl-XI, and Bax Correlate with p53 Status and Sensitivity to Apoptosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, **Blood** 1997;89-8:2986-2993.

Hassan KZ. Elamin HN, Daghestani MH, Omer SA, et al. Oleuropein induces anti-metastatic effects i breast cancer. **Asian Pacific J Cancer Prev** 2012; 13(9),4555-4559.

Hassan KZ, Elamin MH, Omer AS, Daghestani HM, Al-Olayan SE, Elobeid MA, Virk P. Oleuropein induces apoptosis via p53 pathway in Breast Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** 2013;14:6739-6742.

Hashimoto N, Tachibana M, Dhar DK, Yoshimura H, Nagasue N. Expression of p53 and Rb Proteins in Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: Their Relationship with Clinicopathologic Characteristics. **Annals of Surgical Oncology** 1999;6(5):489-494.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. **Science** 1991; 253:49-53.

Isikhan V, Komurcu S, Ozet A, Arpacı F, Oztürk B, Balbay O. The status of alternative treatment in cancer patients in Turkey. **Cancer Nur** 2005;28(5):355-62.

Ito Y, et al. Expression and Prognostic Roles of the G1-S Modulators in Hepatocellular Carcinoma: p27 Independently Predicts the Recurrence, **Hepatology** 1999;30:p.90-9.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal of Clinicians** 2005; 55(1),10-30.

Johnsen J, Kogner P, Albiñ A, Henriksson M. Embryonal neural tumours and cell death. **Apoptosis** 2009; 14:424–438.

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH. A Cell-Cycle Regulator Potentially Involved in Genesis of Many Tumor Types, **Science** 1994;264: 436-440.

Karp G. Cell and molecular Biology, Concepts and Experiments, Second Edition, **John Wiley&Sons, Inc**, 1999. s 533-686.

Kars A. Gen Tedavisi. XIII TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, **Non-Hodgkin Lenfom**, 2004;59-63.

Kav S, Hanoğlu Z, Algier L. Türkiye’de kanserli hastalarda tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerinin kullanımı: Literatür taraması. **Uluslararası Hematoloji- Onkoloji Dergisi** 2008;18(1):32-8.

Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX, dheng XM, Minegishi M, Hanada R, Horibe K, hongo T, Kaneko Y, Bessho F, Yanagisawa M, Sekiya T, Hayashi Y. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS Genes in Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia, **Leukemia Res** 1999;23:115-126.

Klug WS, Cummings MR. Genetik. **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2002; 28, s635-651.

Kayaalp, S.O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. **Hacettepe Taş**, Cilt1, Ankara,2000, s. 704.

Kenichi H, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. **Cancer research** 2002; 62:5897-5901.

Khalatbary AR, Ahmadvand H. Neuroprotective effect of oleuropein following spinal cord injury in rats. **Neurol Res** 2012;34(1):44-51.

Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Abdallah DM, Nassar NN, Okpanyi SN, Kreuter M. Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. **Arzneim.-Forsch./Drug Res** 2002;52(11): 797-802.

Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive Leaf Extract and Its main Component Oleuropein prevent Chronic Ultraviolet B radiation -Induced Skin Damage and Carcinogenesis in Hairless Mice. **Journal of Nutrition** 2009;139(11): 2079-2086.

Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. **A Cancer Journal for Clinicians** 2012; 62(5),309-335.

Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. **Biochemistry** 2000;65(1),2-27.

Koçkar F, Türkoğlu SA, Aydın M. Oleuropein'in Prostat(PC-3), Meme (MCF-7) ve Heatoma (HEP3B) Kanseri Hücrelerinde Anti-tümör Etkisinin Belirlenmesi. **Bibad Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi** 2010; 3(2): 185-190.

Krasnoselsky AL, Whiteford CC, Wei JS, Bilke S, Westermann F, Chen QR, et al. Altered expression of cell cycle genes distinguishes aggressive neuroblastoma. **Oncogene** 2005; 24:1533–41.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pathologic Basis of Disease, **Elsevier** 7. Ed. 2005 ISBN:0-8089-2302-1.

Kuş Ç. Nöroblastomalarda PI3-K Sağkalım Sinyal İletimini Değiştirerek Oluşan Apoptoz Sensitasyonu. Yüksek Lisans Tezi. **Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 2010, s.78.

Kushner BH, Cheung NK. (1988). Neuroblastoma. **Pediatr Ann. Apr** 17(4):269-76, 278-84.

Kutluk T, *First national pediatric cancer registry in Turkey: a Turkish pediatric oncology group study (abstract)*. **Ped Blood & Cancer** 2004; **43**:452.

Kutluk T, Yesilipek A, *On behalf of Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) and Turkish Pediatric Hematology Society (TPHD). Pediatric Tumor Registry for 2002-2005 in Turkey*. **J Pediatr Hematol Oncol** 2007;29(1): 12-13.

Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2003;307:1029-1037.

Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. fusion [corrected] inhibition. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 2007;354:872–878.

Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. integrase inhibition. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 2007, 354, 879–884.

Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57KIP2, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor with Unique Domain Structure and Tissue Distribution, **Genes Dev** 1995;9:639-49.

Levin B, Boyle P. Dünya Kanser Raporu 2008, Dünya Sağlık Örgütü Raporu, **Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC)**, 69372 Lyon Cedex 08, Fransa. 2008.

Lin J, Reichner C, Wu X, Levine AJ. Analysis of Wildtype and Mutant p21waf-1 Gene Activities. **Mol. Cell Biol** 1996;16: 1786-1793.

Livolsi VA, Merino MJ, Brooks JSJ, Saul SH, Tomaszewski JE. Patoloji, 2.baskı, **Saray Kitap Evleri**, İzmir,1992, s 33-36.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploeg H, Matsudaira P. Molecular Cell Biology. 6th. Edititon. **W.H.Freeman and Company**, New York,USA.2008. s 1107-1108.

Lodish H, Berk A, Zipurskyb SL, Matsudairan P, Baltimore D, Darnell J. (2001). Molecular Cell Biology: Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle, 4 th ed. W.H. **Freeman and Company**, New York; 2001, s.495-536.

Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following Uv or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? **Cell** 1993;75(4):765- 78.

Luccarini I, Dami TE, Grossi C, Rigacci S, Stefanib M, Casamenti F. Oleuropein aglycone counteracts A₄₂ toxicity in the rat brain. **Neuroscience Letters** 2014;558: 67– 72.

Lukas J, Lucas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. **DNA Repair** 2004; 3:997-1007.

Lüleyap HÜ. Moleküler Genetiğin Esasları. **Nobel Kitabevi**, Adana. 2008 s 262-316.

Mao W, Shi H, Chen X, Yin Y, Yang T, Ge M, Luo M, Chen D, Qian X. Anti-proliferation and migration effects of oleuropein on human A549 lung carcinoma cells. **Lat. Am. J. Pharm** 2012;31:1217–1221.

Markin D, Duek I, Berdicevsky I. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses** 2003; 46: 132-136.

Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. **J Clin Oncol** 1999;17(7):2264-79.

Maris JM. The biological basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. **Current opinion in pediatrics** 2005;17:7-13.

Marsillo V, Lanza B. Characterization of an oleuropein degrading strain of Lactobacillus plantarum. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. **J.Sci.Food Agric** 1998; 76:520-524.

Matthey KK, George RMD, Yu LA. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. **Clin Cancer Res** 2012;18(10): 2740–2753.

- Menendez AJ, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-villalba R, Fernandes-gutierrez R, Segura-carretera A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. **BMC Cancer** 2007;7:80
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:924-935.
- Micol V, Caturla N, Pérez-Fons L, Más V, Pérez L, Estepa A. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). **Antivir. Res** 2005;66:129–136.
- Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasouljan B, Hashemi P, Pour MR. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. **Phytomedicine** 2011;18(2-3):170-5.
- Molassiotis A, Fernandez-Ortega P, Pud D, Ozden G, Scott JA, Panteli V, et al. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. **Ann Oncol** 2005;16(4):655-63.
- Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, Versteeg R, Caron H. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. **Cancer Res** 2008;68:2599–609.
- Molenaar JJ, Koster J, Ebus ME, van Sluis P, Westerhout EM, de Preter K, Gisselson D, Ora I, Speleman F, Caron H, Versteeg R. Copy number defects of G1-cell cycle genes in neuroblastoma are frequent and correlate with high expression of E2F target genes and a poor prognosis. **Genes Chromosomes Cancer** 2012;51:10–9.
- Mosse YP, Greshock J, Margolin A, Naylor T, Cole K, Khazi D, George H, Cynthia W, shahzad S, Asziz M, Biegel J, weber B, Maris J. High-resolution detection and mapping of genomic DNA alterations in neuroblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2005;43:390–403.
- Mosse YP, Diskin SJ, Wasserman N, Rinaldi K, Attiyeh EF, Cole K, Jagannathan J, Bhamhani K, winter C, Maris J. Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. **Genes Chromosomes Cancer** 2007;46:936–49.
- Negrini M, Silini E, Kozak C, Tsujimoto Y, Croce CM. Molecular analysis mbcl-2: structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. **Cell** 1987;49(4):455-63.
- Notarnikola M, Pisanti S, Tutino V, et al. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. **Genes Nutr** 2011; 6:63-69
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Tibbi Genetik. 6. Baskı. **Güneş Kitabevi**, İstanbul. 2005 s. 310-335
- Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. **Sci. Pharm** 2010;78:133–154.

Oğuz S, Pınar R. Which complementary therapies are preferred the most? 1st International & VIII. **National Nursing Conference**, Turkey, 29 October–2 November 2000:358-9.

Olgun HMN. Nöroblastoma Tedavi Sonuçları. Uzmanlık Tezi,9 **Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi**, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.1997, s.82

Olgun N, *On behalf of the Turkish Pediatric Oncology Group. An Intermediary Analysis of the Neuroblastoma Treatment Protocol 2003 of the Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) at October 2006.* **J Paediatr Hematol Oncol** 2007; **29**(14).

Olgun N, et al. Türk Pediatric Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastom-2009 tedavi Protokolü '2TPOG-NB-2009. 2009.

Olshan AF, De Roos AJ, Teschke K, Neglia JP, stram DO, Pollock BH, Castlebery RP. Neuroblastoma and parental occupation. **Cancer Causes Control** 1999;10:539-49.

Omar SH. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. **Saudi Pharm. J** 2010;18:111–121.

Owen RW, Haubner R, Würtele G, Hull E, Spiegelhalder B, Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. **Eur. J. Cancer Prev** 2004;13:319–326.

Özçelik H, Fadiloğlu Ç. Kanser hastalarının tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanım nedenleri. **Türk Onkoloji Dergisi** 2009;24(1):48-52.

Park MT, Lee SJ. Cell Cycle and Cancer. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 2002;36:1,60-65.

Park S, Choi Y, Um SJ, Yoon SK, Park T. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. **J. Hepatol** 2011;54:984–993.

Reed JC, Meister L, Tanaka S, Cuddy M, Yum S, geyer C, Pleasure D. Differential expression of bcl-2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. **Cancer Research** 1991;51(24):6529-38.

Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S Phase Transition by Expression of Cyclins D1 and E with an Inducible System. **Mol Cell Biol**; 1994;14:1669-79.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta** 2004;1644(2-3), 83-94.

Quirantes-Pine R, Zurek G, Barrojon-Catalan E, Bassman C, Micol V, Segure-Carretero A, Gutierrez A. A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC-ESI-QTOF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 2013; 72: 121-126.

Rader J, Russell MR, Hart LS, Nakazawa M.S.Belcastro LT. Martinez D, Li Y, Carpenter E, attiyeh EF, Diskin SJ, Kim s, Parasuraman S, Caponigro G, Schnepf RW, wood AC, Pawel B, Cole KA, Maris JM. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. **Clin Cancer Res** 2013;19:6173-6182.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. **Nature** 2000; 407:777-783.

Rigacci S, Guidotti V, Bucciantini M, Daniela N, Annalisa R, Andre B, Massimo S. Abeta(1-42) aggregates into non-toxic amyloid assemblies in the presence of the natural polyphenol oleuropein aglycon. **Curr Alzheimer Res** 2011;8(8):841-52.

Ross RA, Biedler JL, Spengler BA. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. **Cancer Lett** 2003;197,35-9.

Roy-byrne PP, Bystritsky A, Russo J, Craske MG, Sherbourne CD, Stein MB. Use of herbal medicine in primary care patients with mood and anxiety disorders. **Psychosomatics** 2005;46: 117–122.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase Activation: The Induced-Proximity Model. Proceeding of **The National Academy of Sciences of The USA**, 1999;96: 217-245.

Samet I, Han J, Jlaiel L, Sayadi S, Isoda H. Olive (olea europaea) Leaf Extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: Insight into the underlying mechanism. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2014. article ID 927619,16 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/927619>.

Samur M, Bozcuk HS, Kara A, Savas B. Factors associated with utilization of nonproven cancer therapies in Turkey. A study of 135 patients from a single center. **Support Care Cancer** 2001;9(6):452-8.

Saydere AC. Analysis of Isamp gene as a tumor suppressor in neuroblastoma.2009. Yüksek Lisans Tezi, **Bilkent Üniversitesi**, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul. 2009. s.74

Shimada H, Chatten J, Newton WA, Sachs N, Hamoudi A, Chiba t, Henry BM, Kazavaki M. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. **J Natl Cancer Inst** 1984;73:405-416.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, jun-ichi H, vijay V, Borghilde R, Daniel O, robert BG, John L, Katherine K, robert PC. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). **Cancer** 1999;86:364-372.

Shiotani B, Zou L. Single-Stranded DNA Orchestrates an ATM-to-ATR Switch at DNA Breaks, **Mol Cell** 2009;13;33: 547-58.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2013. **A cancer Journal for Clinicians** 2013;63:11-30.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics 2014, **Ca Cancer J Clin** 2014;64:9-29.

Simaan JA. Herbal medicine, what physicians need to know. **Lebanese Medical Journal** 2009;57:215-217.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins CI, Squire J, Dirks PB. Identification of A Cancer Stem Cell in human Brain Tumors. **Cancer Research** 2003;63, 5821-5828.

Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. **Mol.Nutr.fod Res** 2010;54:833-840.

Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. **Journal of Ethnopharmacology** 2003;84: 299-305.

Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB. Dasatinib (BMS-354825) Selectively Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells Dependent on Epidermal Growth Factor Receptor Signaling for Survival. **Cancer Res** 2006;66 (11): 5542-5548.

Sousa A, Ferreira ICFR, Calhella R, Andrade PB, Valentao P, Seabra R. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives "alcaparra". **Bioorg. Med.Chem** 2006;14:8533-8538.

Spix C, Pastore G, Sankila R, Stiller CA, Steliarova - Foucher E. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997). Report from the Automated Childhood cancer Information System project. **European Journal of Cancer** 2006;42,2081-2091.

Strauss M, Lukas J, Bartek J. Unrestricted Cell Cycling and Cancer, **Nat Med** 1995;1: 1245-6.

Sugiura Y, Shimada H, Seeger RC et al. Matrix metalloproteinases -2 and -9 are expressed in human neuroblastoma: contribution of stromal cells to their production and correlation with metastasis. **Cancer Research** 1998; 58:2209-2216.

Susin SA, Ddaugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Castantini P, Ferris KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TWO, Penninger J, Earnshaw WC, Kromer G, Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine** 2000;192:571-580.

Takeuchi S, Bartram CR, Seriu T, Miller CW, Tohler A, Janssen JW, Reiter A, Ludwig WD, Zimmermann M, Schwaller J. Analysis Of A Family Of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood, **Blood** 1995; 86:755-760.

Tas F, Ustuner Z, Can G, Eralp Y, Camlica H, Basaran M, Karogol H, Saker B, Disci R, Topuz E. The prevalence and determinants of the use of complementary and alternative medicine in adult Turkish cancer patients. **Acta Oncol** 2005;44(2):161-7.

Tassou CC, Nychas GJ, Board RG. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. **Biochem Appl. Biochem** 1991; 13:231-237.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** 1995; 267:1456-62.

Toğar B. Sağlıklı nöron ve N2A nöroblastom hücre kültürleri üzerine farnesen, zingiberen, gayazulen, kopaen ve siklosativen seskiterpenlerinin sitolojik,

biyokimyasal, ve genetik etkileri.. Doktora Tezi, **Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzurum, 2013, s.109.

Tozkoparan B, Aytaç SP. 2007 Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak Glutatyon S-Transferazlar, Hacettepe Üniversitesi, **Eczacılık Fakültesi Dergisi** 2007; 27:139-164.

Tuçcu B. Malign astrositler tümörlü hastalarda yaşam süresini etkileyen faktörler ve Ki-67 (mib 1) proliferasyon indeksinin prognoz üzerine etkisi. Uzmanlık Tez., **Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim Araştırma Hastanesi**, 2. Nöroşirurji Kliniği, 2004. İstanbul. s.50

Turan N, Öztürk A, Kaya N. Hemşirelikte yeni bir sorumluluk alanı: Tamamlayıcı terapi. **Maltepe Üniversitesi Hemşirelik Bilim ve Sanatı Dergisi** 2010;3(1):94.

Tutour B, Guedon D. Antioxidative activities of olea europea leaves and related phenolic compounds. **Phytochemistry** 1992; 31 (4) :1173-78.

Tümer S. Nöroblastik Tümörlerdeki bölgesel DNA kopya sayısı değişikliklerinin ve Allelik dengesizliklerinin tanımlanması, Doktora Tezi, **Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**. , İzmir. 2013, s.104.

Türker FA, Kayaalp SO. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. Ankara, **Feryal Matbaacılık**, 2002; s. 380-415.

Uguz CA, Nazıroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez BA, Pariente AJ. Selenium Modulates Oxidative StressInduced Cell Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells Through Regulation of Calcium Release and Caspase 3 and -9 Activities. **J Membran Biol** 20009;232:15-23.

Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Cadenas E, Spencer JP. Inhibition of Cellular Proliferation by the Genistein Metabolite 5,7,3',4'-Tetrahydroxyisoflavone is Mediated by DNA Damage and Activation of the ATR Signalling Pathway, **Arch Biochem Biophys** 2007;15;468:159-66.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR., Berneman ZN. (2003). Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation** 2003;36:165-175.

Vescovi, A.L., Galli,R., Reynolds, B.A. Brain tumour Stem Cells. **Nature Reviews** 2006;6: 425-436.

Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 1998;247:60–64.

Visioli F, Bellosta, CG. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages, **Life Sci** 1998: 62:541546.

Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. **Medicinal Research Revivs** 2002; 22(1): 65-75.

Vlahov G, Flavonoids in Three olive (Olea europaea) Fruit Varieties During Maturation. **J.Sc.Food.Agric** 1998; 58: 157-159.

Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symannowski J, Denham C, Kaukel E, ruffie P, Gatzemeimer U, Boyer M, emri S. Managold C, niyikiza C, Paoletti P. Phase II study

of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma, **J Clin Oncol** 2003;21:2636-2644.

Wang K, Shindoh H, Inoue T, Horii I. (2002), Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. **Journal of Toxicological Sciences** 2002; 27:229-237.

Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology** 2001;14:166 (1-2):3-10.

Wu YT, Lin LC, Tsai TH. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A** 2009;1216; 3501–3507.

Yachnis AT, Perry A, 2009. Embryonal (primitive) neoplasm of the central nervous system. In: Perry A, Brat DJ. Practical Surgical Neuropathology: A diagnostic Approach. Philadelphia: **Churchill Livingstone** 2009, s.163-176.

Yao J, Wu J, Yang X, Yang J, Zhang Y, Du L. Oleuropein induced apoptosis in HeLa cells via a mitochondrial apoptotic cascade associated with activation of the c-Jun NH2-Terminal Kinase. **Journal of Pharmacological Sciences** 2014;125:300-311.

Yıldız G ve Uylaşer V. Doğal Bir Antimicrobial: Oleuropein. **UÜ.Ziraat Fakültesi Dergisi** 2011; 25(1): 131-142.

Yokuş B, Çakır ÜD. Kanser Biyokimyası. **Dicle Üniv. Vet.Fak.Derg.** 2012: 1(2):7-18.
Zhang L, Plon SE, Nuchtern JG, Burlingame S, Blaney S, Rousseau R, et al. Cyclin D and cisplatin cytotoxicity in primary neuroblastoma cell lines. **Anticancer Drugs** 2004;15(9):883-8.

Web_1. T.C Sağlık Bakanlığı, Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü. T.C Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2012. Dünyada ve Türkiye'de Kanser. Basın Açıklaması. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-15486/dunya-ve-turkiyede-kanser.html> (son güncelleme tarihi: 04.04.2012, alındığı tarih: 07.11.2014).

Web_2. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society;014. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf> (son güncelleme tarihi: 01.03.2012, alındığı tarih: 07.11.2014).

Web_3, National Cancer Institute, Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, USA, http://seer.cancer.gov/publications/prostate/inc_mort.pdf (son güncelleme tarihi: 01.01.2013, alındığı tarih: 07.11.2014).

Web_4, Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*. SEER data submission. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2013. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, (son güncelleme tarihi: Kasım 2012, alındığı tarih: 15.11.2014).

Web_5, Oleuropein. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o8889?lang=en®ion=TR> (son güncelleme tarihi: 02.12. 2012, alındığı tarih: 12.10.2014).

Web_6, ATCC: http://www.lgcstandards-tcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cSH-SY5Y%7c3%7c.Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=SH-SY5Y&redir=1 (son güncelleme tarihi: 11.04.2013 , alındığı tarih: 8.11.2014)

Web_7, XTT Cell proliferation Kit,
<http://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx> (son
güncelleme tarihi: 2013, alındığı tarih: 5.11.2014)

Web_8, TUNEL Protokol, <http://www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis/index.jsp?&id=apotosis&fol=applications>. (son güncelleme tarihi: 2013, alındığı tarih: 8.11.2014)

Web_9: Nanodrop Technical support Bulletin;
http://www.bio.davidson.edu/GCA/protocols/NanoDrop_tip.pdf (son güncelleme tarihi: 2007, alındığı tarih: 15.11.2014).

Web_10: <http://www.pubmed.com> (alındığı tarih: 10.10.2014)

Web_11, Ulukaya E. Apoptoz ders notları. Uludağ Üniversitesi, Bursa
http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptoz_ders_notu.pdf (son güncelleme tarihi: 11.04.2003, alındığı tarih: 8.11.2014).

8. ÖZGEÇMİŞ

Mücahit SEÇME 1990 yılında Isparta'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Denizli'nin Tavas ilçesinde tamamladı. Lisans eğitimini, 2008-2012 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bitirdi. 2013 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji AD'da yüksek lisans eğitimine başladı.

9. EKLER

Çalışma sonucumuzda kontrol ve doz (350 µM OLE) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan ($p>0,05$) hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspersyon değişimleri Ek-1 de verilmiştir.

EK-1 Diğer Hücre Döngüsü ve Apoptoz İlişkili Genlerin Değişimi ($p>0,05$)

Hücre Döngüsü Genleri		Apoptoz Genleri	
Gen	Değişim	Gen	Değişim
ABL1	1,0045	AIFM1	1,0024
ANAPC2	47,8053	AKT 1	1,0018
ATM	3,1904	APAF1	-1,0026
ATR	-27,8892	BAG1	1,0017
AURKA	-1,3611	BAG3	2,049
AURKB	1,5187	BAK1	1,0064
BCCIP	1,6261	BCL10	4,0565
BIRC5	1,2163	BCL2A1	4,0397
BRCA1	1,3949	BCL2L1	-1,9911
BRCA2	-5,7385	BCL2L10	1,0038
CCNA2	-2,9125	BCL2L11	1,003
CCNB1	-1,3304	BCL2L2	-1,989
CCNB2	-21,8701	BRAF	1,0015
CCNC	1,4169	BIK	-2,0111
CCNE1	-21,4911	BIRC2	-1,0018
CCNF	5,7149	BIRC3	4,2849
CCNG1	-1,3156	BIRC6	2,017
CCNG2	-1,3415	BNIP2	2,0415
CCNH	-10,8968	BNIP3	-2,0252
CCNT1	12,6694	BNIP3L	2,0348
CDC16	-1,3552	BRAF	-1,006
CDC25C	-1,4036	CASP10	-1,0077
CDC34	-11,1366	CASP14	1,0038
CDC6	1,6141	CASP2	1,9994
CDK1	-1,3277	CASP4	1,0038
CDK2	-1,3294	CASP6	-1,0023
CDK5R1	-2,8556	CASP7	-1,0009
CDK5RAP1	5,9054	CD27	1,0038
CDK7	-5,5728	CD40	-1,9886
CDK8	-1,3305	CD40LG	1,0038
CDKN1B	49,911	CD70	2,0108
CDKN3	-1,3272	CFLAR	1,0059
CHEK1	-1,3067	CIDEB	1,0012

EK-1 Diğer Hücre Döngüsü ve Apoptoz İlişkili Genlerin Değişimi (p>0,05)

Gen	Değişim	Gen	Değişim
CHEK2	-1,41	CRADD	-1,0035
CKS2	-182,7187	CYCS	2,0201
CUL2	2,2269	DAPK1	-2,0161
CUL3	1,1234	DIABLO	2,0388
E2F1	2,6582	FADD	-1,0006
E2F4	-2,6925	FAS	-1,0012
KNTC1	-3,5215	FASLG	16,5986
KPNA2	-1,3399	HRK	-1,9861
MAD2L1	1,5833	IGF1R	-1,0016
MAD2L2	-187,4705	LTA	1,0079
MCM2	206,6362	LTBR	1,0038
MCM3	-2,7137	MCL1	2,0113
MCM4	1,6224	NAIP	1,0085
MCM5	-2,6549	NFKB1	-2,0116
MDM2	-85,338	NOD1	2,0368
MKI67	-2,75	NOL3	1,003
MNAT1	-1,3096	PYCARD	2,0102
MRE11A	6,4508	RIPK2	1,0052
NBN	-1,3372	TNF	1,063
RAD1	-10,5526	TNFRSF10A	1,0038
RAD17	-1,556	TNFRSF10B	2,0411
RAD51	-1,3323	TNFRSF11B	1,0038
RAD9A	-37,6967	TNFRSF1A	-1,0022
RB1	1,6195	TNFRSF1B	-2,1256
RBBP8	-1,3319	TNFRSF21	-1,0055
RBL1	-1,3389	TNFRSF25	-1,9834
RBL2	-1,7827	TNFRSF9	1,0807
TFDP1	-22,9405	TNFRSF10	1,0038
TFD2	-1,3176	TNFSF8	1,0038
		TP53BP2	1,0101
		TP73	2,0019
		TRADD	1,0092
		TRAF2	-1,9929
		TRAF3	1,0001