

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLEUROPEİN VE SİSPLATİN'İN NÖROBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

DUYGU DURSUN

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970184

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLEUROPEİN VE SİSPLATİN'İN NÖROBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

**TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

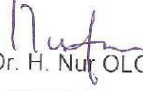
DUYGU DURSUN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nur OLGUN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2017KBSAG030 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970184

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Duygu DURSUN 'OLEUROPEİN VE SİSPLATİN'İN NÖROBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ' konulu Doktora tezini 27.12.2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. H. Nuri OLGUN
BAŞKAN
(DEÜ Onkoloji Enstitüsü)

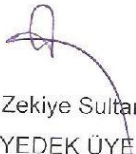
Prof. Dr. Erdener ÖZER
ÜYE
(DEÜ Tıp Fakültesi)


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
ÜYE
(DEÜ Onkoloji Enstitüsü)


Doç. Dr. A. Gülden DİNİZ ÜNLÜ
ÜYE
(Behçet Uz Çocuk Hastanesi)


Doç. Dr. Nüket ELİYATKIN
ÜYE
(Adnan Menderes Ün. Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Kemal ERGİN
YEDEK ÜYE
(Adnan Menderes Ün. Tıp Fakültesi)


Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
YEDEK ÜYE
(DEÜ Onkoloji Enstitüsü)

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	3
1.2. Araştırmanın Amacı	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Nöroblastom (NB)	4
2.2. Oleuropein (OLE).....	4
2.3. Sisplatin (Cis-diaminedichloroplatinum II- CDDP).....	5
2.4. Apoptotik Hücre Ölümü ve İlişkili Proteinler (BCL2, BCL-XL, BAX)	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	7
3.1. Araştırmanın tipi.....	7
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	7
3.3. Araştırmanın evreni ve örneklemei	7
3.4. Çalışma materyali	7
3.5. Araştırmanın değişkenleri	9
3.6. Veri toplama araçları.....	9
3.7. Araştırma planı.....	10

3.8. Verilerin değerlendirilmesi.....	10
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	10
3.10. Etik Kurul Onayı	10
4. BULGULAR	11
5. TARTIşMA	29
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	32
7. KAYNAKLAR.....	33
8. EKLER	37



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo1: Araştırma Plan ve Takvimi	10
Tablo 2: 24h, 48h ve 72h PSI WST-1 sonuçları.....	12
Tablo 3: 24h, 48h ve 72h SH-SY5Y WST-1 sonuçları	13
Tablo 4: 24h, 48h ve 72h KELLY WST-1 sonuçları	14
Tablo 5: PSI hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat flow sitometri sonuçları.....	15
Tablo 6: SH-SY5Y hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat flow sitometri sonuçları	19
Tablo 7: KELLY hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat flow sitometri sonuçları	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: PSI hücre hattının 24h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)	16
Şekil 2: 48h PSI Kontrol Hücreleri.....	17
Şekil 3: 48h PSI CDDP	17
Şekil 4: 48h PSI OLE	18
Şekil 5: 48h PSI Kombinasyon (OLE+CDDP).....	18
Şekil 6: PSI hücre hattının 72h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)	19
Şekil 7: SH-SY5Y hücre hattının 24h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d).....	21
Şekil 8: SH-SY5Y hücre hattının 48h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)	22
Şekil 9: SH-SY5Y hücre hattının 48h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d) 10x büyütmede Gösterimi	22
Şekil 10: SH-SY5Y hücre hattının 72h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d).....	23
Şekil 11: KELLY hücre hattının 24h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d).....	24
Şekil 12: 48h KELLY Kontrol.....	26
Şekil 13: 48h Kelly CDDP	26
Şekil 14: 48h KELLY OLE.....	27

Şekil 15: 48h KELLY Kombinasyonu (OLE+CDDP).....	27
Şekil 16: KELLY hücre hattının 72h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d).....	28



KISALTMALAR

OLEOleuropein

CDDP.....Sisplatin

NB.....Nöroblastom



TEŞEKKÜR

DEU Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Doktora Programı içerisinde tez çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi, manevi destek ve bilimsel katkılarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Nur OLGUN'a, bilimsel katkılarından dolayı Prof. Dr. Zekiye ALTUN ve Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a ve başta Şenay AÇIKALIN olmak üzere tüm Onkoloji Enstitüsü çalışanlarına ve her zaman kendisine yöneltilen soruları büyük bir özveriyle cevaplayan Elif POLATTÜRK'e ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca, her zaman her koşulda yanımda olan, desteğini ve ilgisini esirgemeyen, varlıkları ile beni her zaman motive eden ve hep başarmamı sağlayan kız kardeşim Gözde DURSUN'a, annem Zihnifer DURSUN'a ve babam Erol DURSUN'a çok teşekkür ederim.

Bu tezi hayattaki en büyük şansım olan aileme ithaf ediyorum.

OLEUROPEİN VE SİSPLATİN'İN (Bağımsız Değişken) NÖROBLASTOM HÜCRELERİ (Bağımlı Değişken) ÜZERİNE ETKİSİ

Duygu DURSUN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Onkoloji Enstitüsü, Temel
Onkoloji AD, İnciraltı/ İZMİR

ÖZET

Nöroblastom (NB), tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturur. Sisplatin (cis-diaminedichloroplatinum II; CDDP) çocukluk çağı ve erişkin dönemdeki birçok farklı insan kanserinin tedavisinde kullanılan yan etkileri bulunan bir kemoterapötiktir. Zeytin yaprağında bulunan Oleuropein'in (OLE) mezotelyoma ve malign melanom gibi kanser hücrelerinde hücre canlılığını azaltıcı etkisi daha önce gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı iyi prognostik SH-SY5Y N-MYC(-) ve kötü prognostik KELLY N-MYC(+) nöroblastom hücrelerinde ve fibroblast hücrelerinde (PSİ2 12S6), OLE'nin tek başına ve CDDP kombinasyonu ile olası anti-proliferatif etkisi ve apoptotik hücre ölümüne yol açıp açmadığının belirlenmesiydi.

PSİ2 12S6, SH-SY5Y ve KELLY hücrelerine OLE (500uM) ve CDDP (50uM) uygulanmıştır. CDDP, OLE ve OLE-CDDP kombinasyonu uygulanarak apoptotik hücre ölümleri Akım sitometrik olarak belirlenmiştir.

OLE'nin PSİ2 12S6 fibroblast hücrelerinde canlılığı azaltıcı ve apoptotik etkileri saptanmıştır. SH-SY5Y ve KELLY hücrelerinde OLE tek başına özellikle canlılığı azaltmış ve apoptotik etki göstermiştir.

OLE'nin nöroblastomda anti-proliferatif etki mekanizmalarının *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla değerlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, Oleuropein, Sisplatin, Apoptoz

THE EFFECTS OF OLEUROPEIN AND CISPLATIN ON NEUROBLASTOMA CELLS

ABSTRACT:

Neuroblastoma (NB) accounts for 8-10% of all childhood cancers. Cisplatin (cis-diaminedichloroplatinum II; CDDP) is a chemotherapeutic drug with side effects that are used in the treatment of many different human cancers in childhood and adulthood. Oleuropein (OLE), an olive leaf, has been shown to reduce cell viability in cancer cells such as mesothelioma and malign melanoma.

The aim of this study was to investigate OLE alone and in combination with CDDP has possible anti-proliferative effect and induce apoptotic cell death in good prognostic SH-SY5Y N-MYC (-) and poor prognostic KELLY N-MYC neuroblastoma and fibroblast cells.

OLE (500uM) and CDDP (50uM) were applied to PSI2 12S6, SH-SY5Y and KELLY cells. Apoptotic cell deaths were determined by Akim cytometry using CDDP, OLE and a combination of OLE-CDDP.

The anti-proliferatif and apoptotic effects of OLE on PSI2 12S6 fibroblast cells were determined. OLE and CDDP-OLE combinations reduced viability in SH-SY5Y and KELLY cells and showed apoptotic effects.

The mechanisms of anti-proliferative effects of OLE in neuroblastoma should be evaluated *in vitro* and *in vivo* studies.

KEY WORDS: Neuroblastoma, Oleuropein, Cisplatin, Apoptosis

1. Giriş ve Amaç:

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi:

Oleuropein (OLE); antioksidan, anti-mikrobik, anti-inflamatuar, anti-hipertansif ve anti-kanserojen etkilere sahip olduğu; hem kültür hücrelerinde hem de model organizmalarda nörodejenerasyona karşı yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Literatür taramalarında oleuropein ve nöroblastom ile ilgili 6 tane çalışma vardır. Bu 6 çalışmanın 4 tanesinde kullanılan nöroblastom hücre hatları Alzheimer üzerine araştırma yapmayı amaçlamıştır. Yalnızca bir tanesinde nöroblastom ana hedef olan çalışma vardır ve bu çalışmada da sadece SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı kullanılmıştır. Ayrıca oleuropein ve sisplatin (CDDP) kombinasyonunun nöroblastomdaki etkinliğini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır ve bu ilk kez *in vitro* olarak araştırılmıştır. Burada oleuropeinin CDDP varlığında nöroblastom hücre hatlarında etkinliği ilk kez *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu etkileşimin ileriye yönelik nöroblastom tedavi kombinasyonlarına yeni bir ajan olarak ışık tutucu bilgileri sunabileceği amacıyla böyle özgün bir çalışmayı gerçekleştirdik.

1.2. Araştırmanın Amacı:

Bu çalışmanın amacı insan kökenli farklı klinik özellikleri yansıtan; iyi prognostik grubu yansıtan N-MYC negatif SH-SY5Y, kötü prognozu yansıtan N-MYC pozitif KELLY nöroblastom hücrelerinde ve sağlıklı hücreleri temsil eden fibroblast (PSİ2 12S6) hücrelerinde oleuropeinin (OLE) tek başına ve sisplatin (CDDP) kombinasyonu ile olası anti-tümoral etkinliğini ve eğer varsa bu etkinliğin apoptoz (programlı hücre ölümü) mekanizması üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğinin araştırılmasıydı.

1.3. Araştırmanın Hipotezi:

Bizim bu çalışmada hipotezimiz; “Oleuropein sinerjetik etkisi (bağımsız değişken) ile CDDP’nin etkisini artırır ve Oleuropeinin Nöroblastomda tek başına ve sisplatin (bağımsız değişken) ile antitümoral etkisi vardır ve bu etki apoptoz hücre ölüm tipini (bağımlı değişken) uyararak meydana gelir” şeklindeydi. Çalışma sonucunda gördük ki; hipotezimiz SH-SY5Y nöroblastom hücreleri için doğrulanırken KELLY hücreleri için kısmen doğrulanmıştır.

2. Genel Bilgiler:

2.1. Nöroblastom:

Nöroblastom; adrenal medulla ya da sempatik nöronlardaki nöronal krest kökenli hücrelerin diferansiasyonun bozulmasına bağlı oluşan en sık rastlanan ekstrakraniyal çocukluk çağı solid tümörüdür (1,2).

Nöroblastom (NB) tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturmaktadır ve çocukluk çağı kanserlerinde ölüm nedeni olarak ilk sıraya yerleşmektedir.

Farklı bir biyolojik davranışa sahip olan nöroblastom, süt çocukluğu döneminde % 2 civarında spontan regresyon gösterebilirken, özellikle yüksek risk ileri evre metastatik hastalıkta multimodal intensif tedavi yaklaşımlarına rağmen 10 yıllık yaşam (overall survival) % 30 ların altında seyretmektedir (4). Tedavi protokolleri yaş, evre, histopatoloji, N-mycn gen amplifikasyon kopya sayısı, ploidi, 11q LOH gibi segmental aberasyonlara dayanarak hazırlanan risk protokollerine göre uygulanmaktadır ve bu protokollerde de uygulanan sisplatin ana ajandır. Yüksek doz kemoterapi protokollerine rağmen geline noktanın tatminkar olmayışı farklı tedavi ve kemoterapötik arayışlarını beraberinde getirmektedir (4).

2.2. Oleuropein (OLE):

Zeytin yaprağının aktif bileşeni olan oleuropein, polifenol grubuna aittir ve antioksidan, anti-mikrobik, anti-inflamatuar, anti-hipertansif ve anti-kanserojen etkilere sahiptir (6).

Zeytinyağında bulunan ana polifenol olan oleuropein aglycone'un (OLE) hem kültür hücrelerinde hem de model organizmalarda nörodejenerasyona karşı yararlı etkileri gösterilmiştir (5,7).

Otofaji stimülasyonunda, akdeniz diyetini niteleyen bazı bitki polifenollerinin sağlıklı etkilerinin, epigenetik ve biyolojik değişikliklerden kaynaklandığı gösterilmiştir. OLE'nin kültürlenmiş SH-SY5Y hücrelerinde otofajiyi Ca²⁺ + -CAMKK β -AMPK eksenini üzerinden tetiklediği saptanmıştır (7).

Ayrıca oleuropein, Bcl-2'yi inhibe ederek ve Bax, kaspaz-9 ve kaspaz-3 gen ekspresyonlarını aktive ederek SH-SY5Y hücrelerinde apoptozu uyarır (6).

OLE'nin SH-SY5Y hücrelerindeki invazyonu azalttığı gösterilmiştir. Oleuropein, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde hücre çoğalmasını, CCND1, CCND2, CDK4, CDK6, p53 ve CDK inhibitörlerinin gen ekspresyonu değişiklikleri yoluyla hücre döngüsü durdurarak inhibe ettiği dolayısıyla oleuropein'in nöroblastom tedavisinde terapötik bir madde olabileceği belirtilmiştir (6).

Oleuropein, SH-SY5Y'de intrinsik yol ile apoptotik mekanizmaları uyardığı belirtilmiştir (6). Oleuropein, SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde invazyon, migrasyon ve koloni oluşumunu azaltmaktadır (6).

2.3. Sisplatin (Cis-diaminedichloroplatinum II- CDDP)

CDDP, antimitotik aktivitesi ve antineoplastik özellikleri olan çocukluk çağı ve erişkin dönemdeki birçok farklı insan kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır. Hücre siklus bağımsız etki eden bir ajandır.

CDDP, neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılır ve etkisi DNA ile olan etkileşimine bağlıdır. CDDP, en iyi bilinen DNA hasar ajanıdır ve sitotoksik aktivitesini göstermesinde DNA-platin etkileşimi ilk adımı oluşturur. Aktif sisplatinin sitotoksik formu DNA zincirinde çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini baskılayıp bazı sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayarak apoptozu uyarır. CDDP, sitotoksik etkisini DNA'nın bütün bazlarına, özellikle guanin ve adeninin 7'inci pozisyonundaki azot atomuna bağlanarak gösterir. Mitokondriyal DNA, RNA ve diğer hücresel bileşenler, platin yapısı için güçlü reaktanlar içerirler (11,12). Sisplatinin nöroblastom tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmakla beraber nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite gibi doz sınırlayıcı etkileri bulunmaktadır (13).

2.4. Apoptotik Hücre Ölümü ve İlişkili Proteinler (BCL2, BCL-XL, BAX)

Kemoterapötik ajanların çoğu kanser hücrelerinde hücre ölümünü apoptozu tetikleyerek ortaya çıkarırlar. Burada intrensek ve ektrensek apoptotik yollar ve pro/apoptotik ve anti-apoptotik proteinler apoptotik süreci yönetirler. BCL-2 ve BCL-XL

proteinleri anti-apoptotik iken Bax aynı süreçte apoptotik aktiviteyi tetikleyen faktörlerdir. Bcl-2 ve Bcl-XL ile apoptozi başlatan yolların kesiştiği temel nokta mitokondridir. Bu nedenle mitokondrinin aktivasyonu apoptotik süreçte, geri dönüşümsüz noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör ise Bcl-2 ailesidir (14, 17). Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkili iki gruptan oluşur. Bu grupların biri anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL) diğeri ise pro-apoptotiktir (Bax) (15, 17). Antiapoptotik grup apoptozi baskılayıcıdır. Pro-apoptotik grup ise apoptozi indükleyici etkiye sahiptir. Hücrelerin apoptotik uyarıya hassaslığı pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonu apoptozi baskılarken, pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonu apoptoze neden olur (16, 17).



3. Gereç ve Yöntem:

3.1. Araştırmanın Tipi:

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Projeye Haziran 2017 de başlanmış olup Aralık 2017’de tez savunması ile sonlanmıştır.

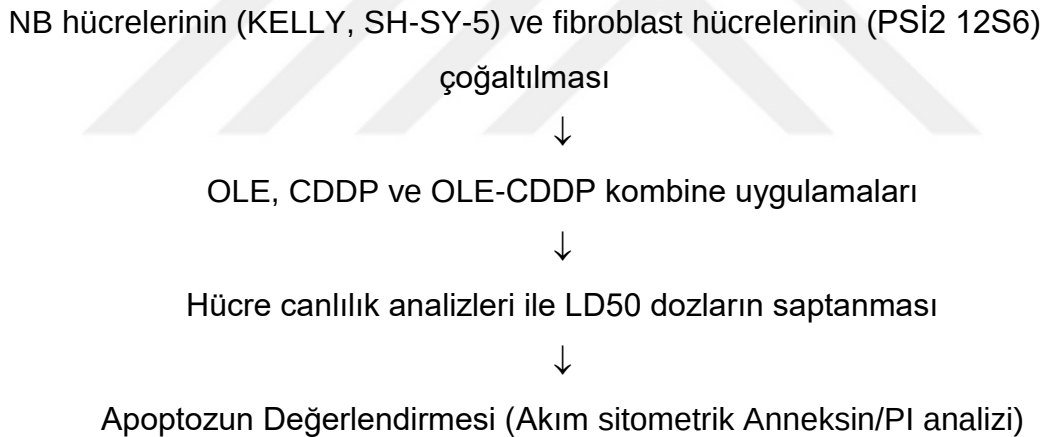
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları:

Çalışmada farklı klinik özellikleri yansıtan insan kökenli iki nöroblastom hücre hattı (iyi ve kötü prognostik) kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali:

Bu çalışmada farklı klinik durumu yansıtan insan kökenli iki nöroblastom hücre hattı olan SH-SY5Y ve KELLY (iyi ve kötü prognostik) ve sağlıklı fibroblast (PSİ2 12S6) hücreleri kullanılmıştır. Hücre hatları ticari olarak satın alınmıştır.

Deney Planı:



Hücre Kültürü

Yapılan bu çalışmada; SH-SY5Y (N-MYC negatif) ve KELLY (N-MYC pozitif), insan kökenli nöroblastom hücre hatları (DSMZ) kullanılmıştır. Ayrıca sağlıklı durumu yansıtan fibroblast hücre hattı (PSİ2 12S6) (DSMZ) kullanılmıştır. Nöroblastom hücre hatları (KELLY, SH-SY5Y) ve fibroblast hücre hattı (PSİ2 12S6) 25 cm² flasklara alınmıştır. Hücre hatları, 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/ streptomisin ilaveli %10 fetal

bovin serum içeren DMEM ve RPMI 1640 ortamlarında kültüre edilmiştir. Haftada 2 veya 3 defa ortamları tazelenerek 37°C de % 5 CO₂ 'lik inkübatörde inkübe edilmiştir. Kùltürler yaklaşık %80 sıklıkla eriştiğinde tripsin/EDTA solüsyonuyla kùltür kaplarından kaldırılarak 1:2 oranında pasajlanmıştır. Çalışmalar 3 farklı zamanda 3 tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Grupları:

Kontrol grubu: Herhangi bir ajan uygulanmayan hücre kùltür ortamları ile diğ er çalışma grupları ile eş zamanda idame edilen nöroblastom ve fibroblast hücreleri (KELLY, SH-SY5Y ve PSİ2 12S6)

Sisplatin uygulanacak grup (CDDP): 5-200 uM (5uM, 25uM, 50uM, 100uM, 200uM) aralığında hücre kùltür ortamlarında CDDP (Koçak farma) uygulanan gruptur (22). Bu uygulamalar sonucu LD50 dozu 50uM olarak bulunmuştur.

Oluepeinin grubu (OLE): 50-800 uM (50uM, 100uM, 200uM, 400uM, 800 uM) aralığında hücre kùltür ortamlarında OLE (Sigma) uygulanan grup(6). Bu uygulamalar sonucunda en etkin değ erin 500 uM oldu ğ u bulunmuştur.

Sisplatin ve Oluepeinin kombine uygulanan grup (CDDP-OLE): OLE ve CDDP'nin LD50 dozları diğ er gruplarda CDDP için 50uM ve OLE için 500uM olarak bulunmuş ve sonra bu grupta denenmiştir.

Oleuropein ve Sisplatin Uygulaması

Kùltüre edilen hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp, PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra tripsin-EDTA solüsyonu ile muamele edilerek hücrelerin flasklardan kalkması sağlanmıştır. 1:1 oranda ortamlar eklenip hücreler falkon tüpler içinde santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış tır. Hücreler üzerine farklı dozlarda hücre kùltür ortamları ile dilüe edilerek hazırlanmış CDDP (koçak farma) ve oleuropein (sigma) uygulanmıştır.

WST1 ile Hücre Proliferasyonunun Tayini

Hücreler her kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde 96 well plate ekilmiş, ertesi gün ortamları çekilerek ajanlar uygulanmıştır. Ajan uygulaması sonrasında 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek doz ve zaman bağımlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

İnkübasyonların sonunda hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu plate içinde boş bir kuyucuğa da sadece ortam koyularak kör olarak kullanılmıştır. 100 µl/kuyucuk hücre için her kuyucuğa 10 µl/kuyucuk WST1 hücre proliferasyon reaktifi eklenerek (1:10 dilüsyon) hücreler 35°C %5 CO₂ lik etüvde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Plate çalkalayıcıda 1 dk çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda 450 nm de okutulmuştur. Referans dalga boyu olarak 600 nm den fazlası (630 nm) seçilmiştir. Kontrol grubunun absorbans ortalamaları %100 canlılık olarak kabul edilerek diğer absorbanslar karşılaştırılarak hücre canlılık yüzdeleri tayin edilmiştir.

Akım sitometrik Annexin V-FITC/PI Boyaması ile Apoptoz tayini

Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) boyaması apoptotik hücre ölüm oranını kantitatif olarak belirlemek için; nöroblastom hücrelerine oleuropein ve CDDP uygulaması sonrasında yapılmıştır. Hücreler Annexin V-FITC apoptoz deteksiyon kiti (BD) kullanılarak protokole uygun olarak boyanmıştır. Ajan uygulamaları sonrasında hücreler PBS ile 3 er kez yıkanmış ve ortam içinde resüspanse edilmiştir. Daha sonra hücreler oda sıcaklığında 15 dakika Annexin V-FITC ve PI ile inkübe edilerek Akım sitometride analiz edilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Nöroblastoma uygulanan OLE ve CDDP bağımsız değişkenler olup, ajanlarla meydana gelecek hücre ölüm değişiklikleri (apoptozun değerlendirmesi) bağımlı değişkendir.

3.6. Veri Toplama Araçları:

Hücre canlılık analiz sonuçları, apoptoz sonuçları

3.7. Araştırma Plan ve Takvimi:

Haziran- Temmuz 2017	Ağustos-Ekim 2017	Kasım 2017	Aralık 2017
Deneylerin planı Malzeme temini	Hücrelerin Proliferasyonu Oleuropein Uygulama Cisplatin Uygulama Wst-1 testi Apoptoz testi	Değerlendirme Analiz Yazma Literatür güncelleme	Yayına dönüştürme Sunma Bitirme raporu

Tablo 1: Araştırma Plan ve Takvimi

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde incelenecektir. Bulgular, Kruskal-Wallis sonrası Mann Whitney-U testiyle analiz edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Bu araştırma hücre kültürü araştırması olup hasta örneği ve deney hayvanı aşamalarını içermemesi araştırmanın sınırlılıklarını oluşturur.

3.10. Etik Kurul Onayı:

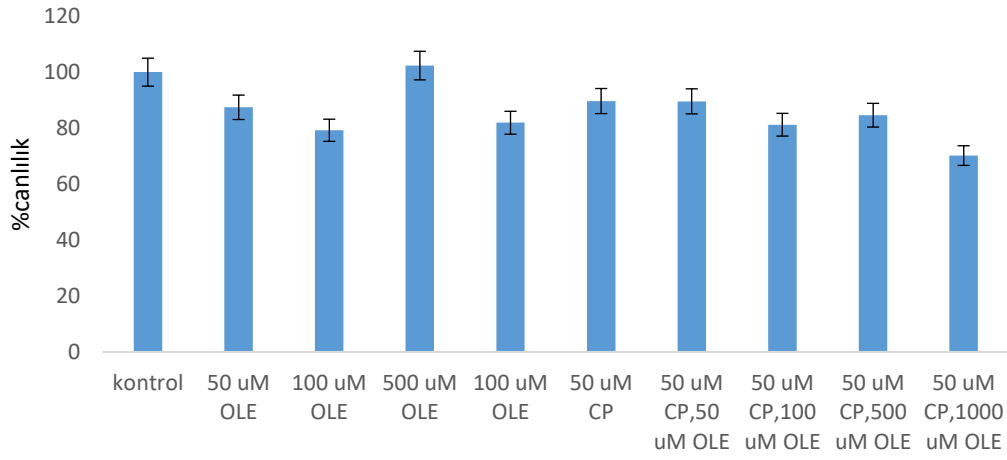
Bu çalışma için; 11.05.2017 tarih ve 2017/11-17 karar numaralı, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Onayı alınmıştır.

4. Bulgular:

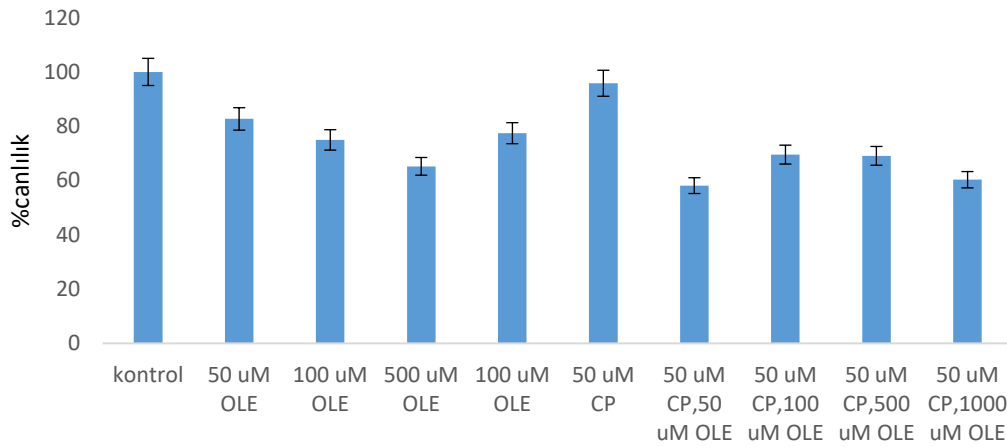
Nöroblastom hücre hatları olan KELLY (N-MYC pozitif) ve SH-SY5Y (N-MYC negatif) ile sağlıklı fibroblast hücre hattı olan PSİ2 12S6 hücre hatları, hücre kültüründe confluent olduktan sonra deney setleri kurulmuştur. Deney setlerinde sisplatin (CDDP) ve oleuropein (OLE) ve bunların çeşitli kombinasyonları için doz denemeleri gerçekleştirilmiş ve en etkili dozların 50uM CDDP ve 500uM OLE olduğu aşağıdaki grafiklerde de belirtilmiştir. Deney setleri 24h, 48h ve 72h için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



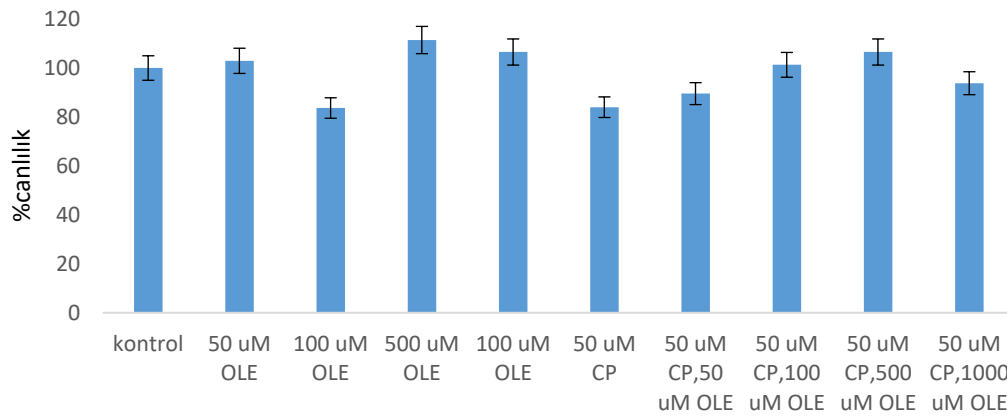
PSİ2 12S6 24H WST-1 SONUÇLARI



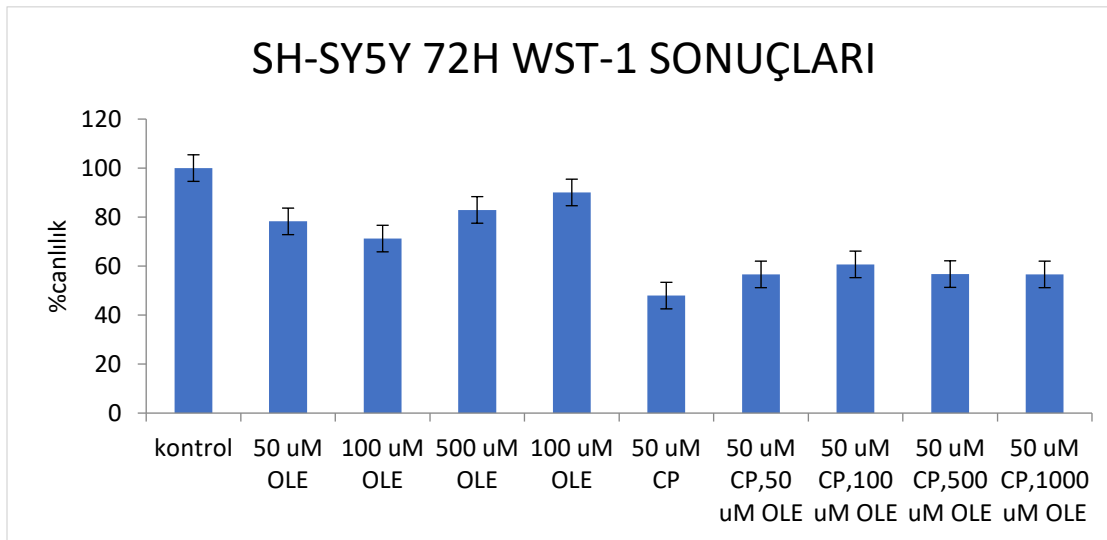
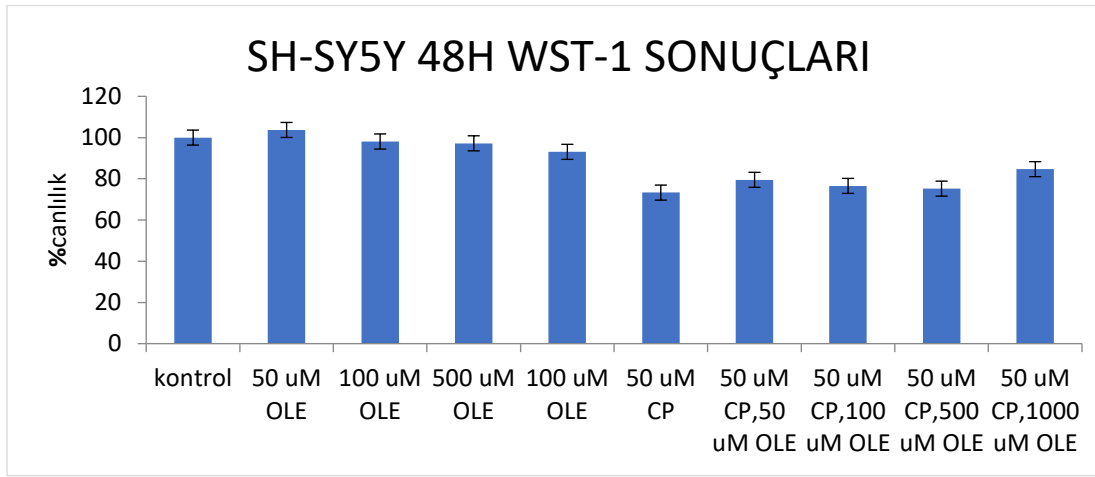
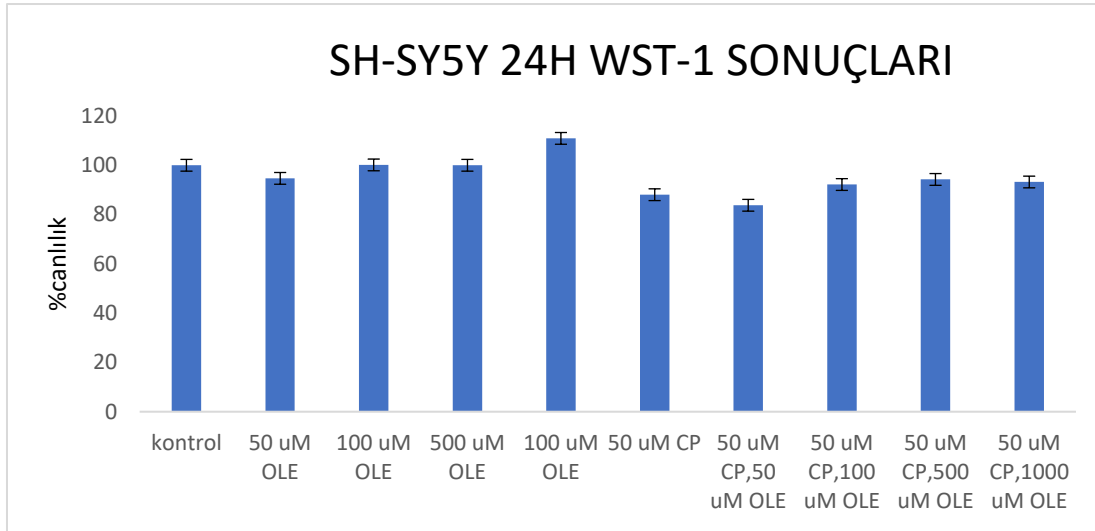
PSİ2 12S6 48H WST-1 SONUÇLARI



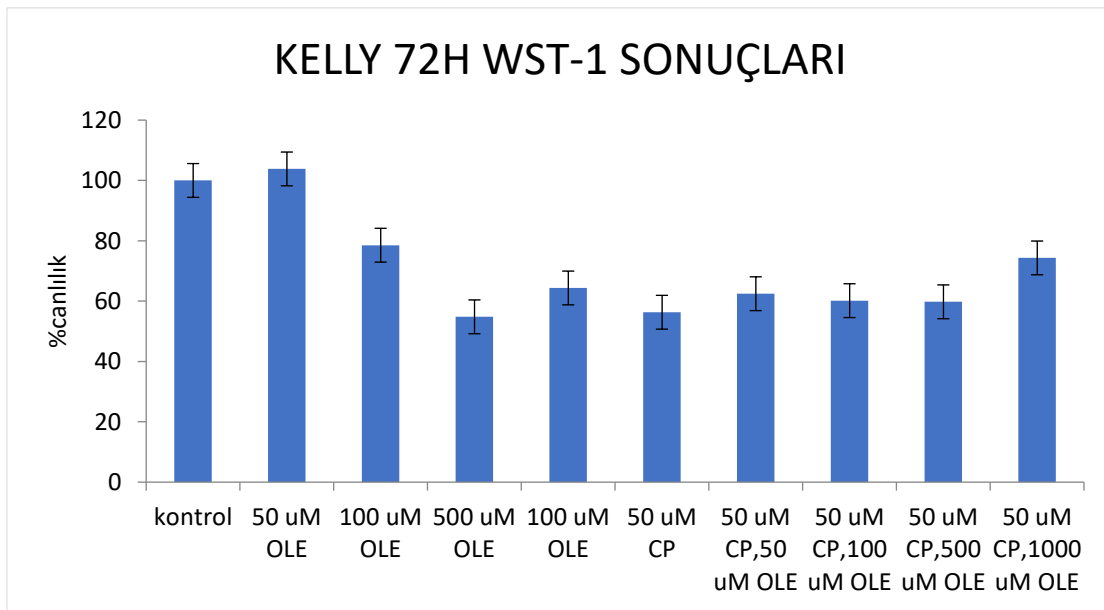
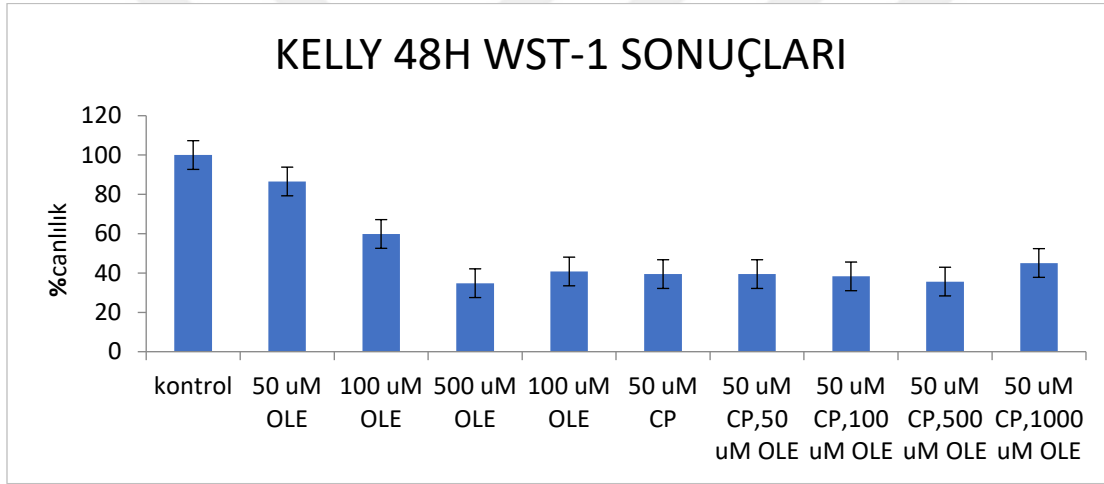
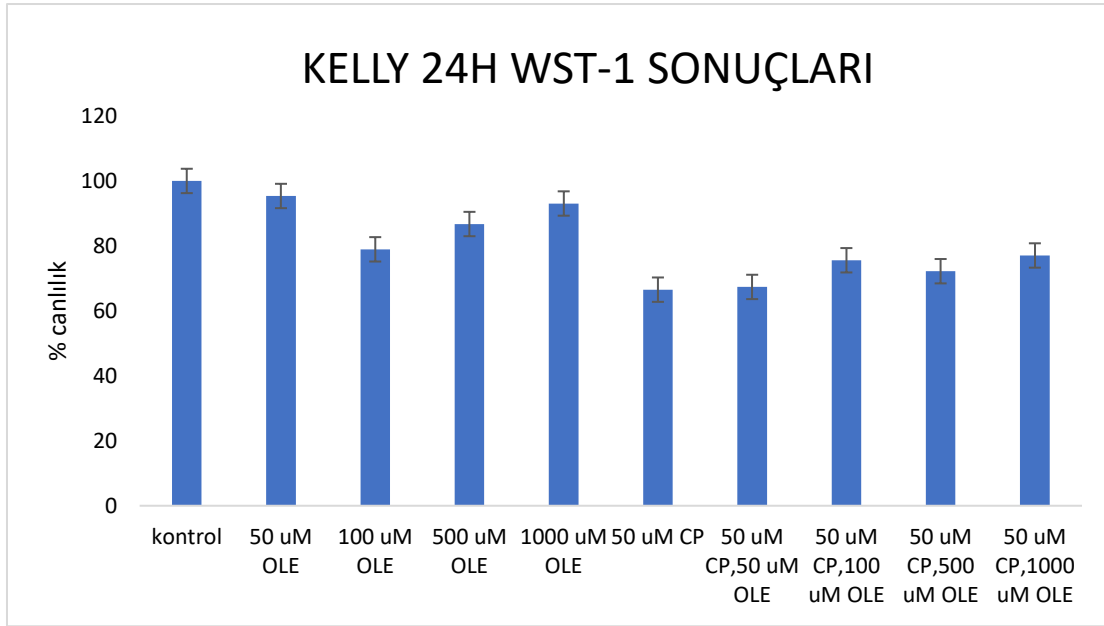
PSİ2 12S6 72H WST-1 SONUÇLARI



Tablo 2: 24h, 48h ve 72h PSİ2 12S6 WST-1 sonuçları



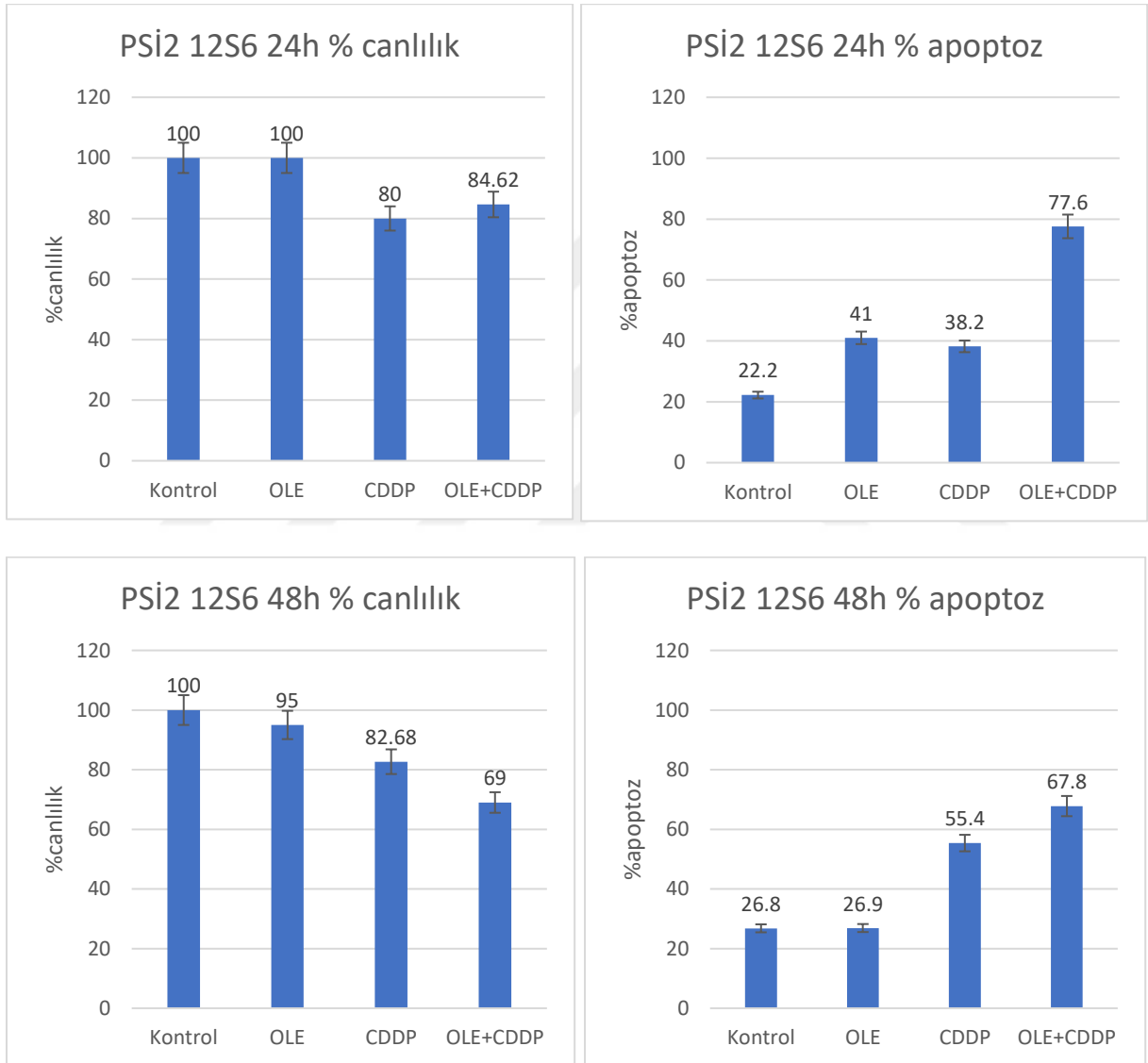
Tablo 3: 24h, 48h ve 72h SH-SY5Y WST-1 sonuçları

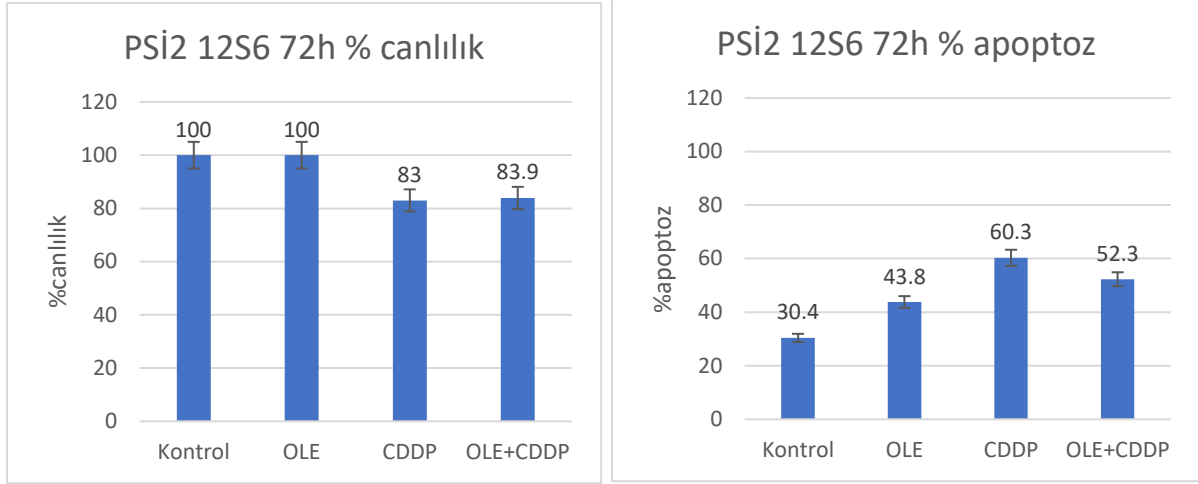


Tablo 4: 24h, 48h ve 72h KELLY WST-1 sonuçları

WST-1 deneyleri sonucu LD50 dozu CDDP için 50uM ve OLE için de yine en etkin dozun 500uM olduğu saptanmıştır. Bu dozlar ve bunların kombinasyonları ile hücre kültürü çalışmaları yapılmış, ardından Akım sitometri ile apoptotik hücre ölümü değerlendirilmiştir.

Sağlıklı fibroblast hücre hattımız olan PSİ2 12S6 hücrelerinin 24h, 48h ve 72h' lerde Akım sitometrik apoptoz değerlendirmelerine baktığımızda belirlenen % canlılık ve % apoptoz değerleri aşağıda ifade edilmiştir;

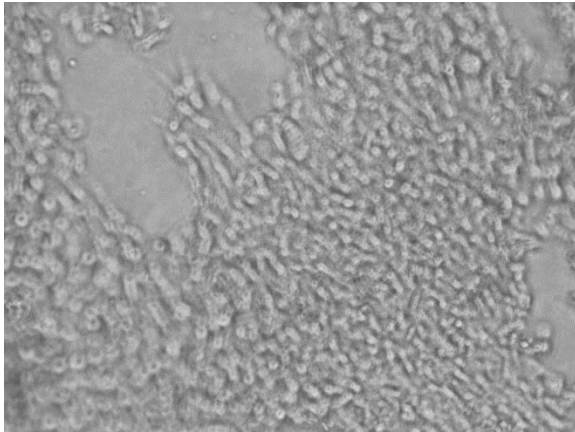




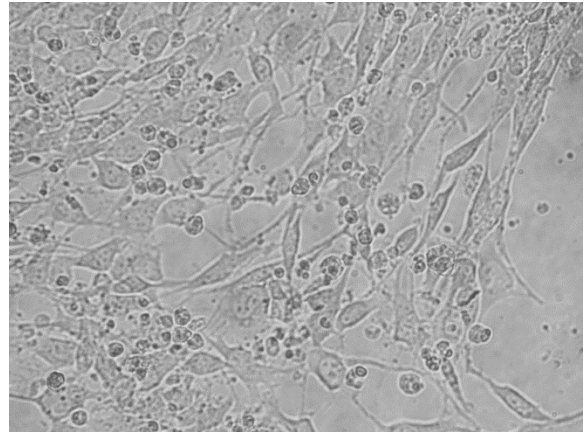
Tablo 5: PSİ2 12S6 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Akım sitometri sonuçları

Canlılık ve apoptoz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; bu çalışmada PSİ2 12S6 fibroblast hücrelerinde OLE'nin hücre canlılığını zaman bağımlı olarak hemen hemen değiştirmedeği saptanmıştır. Apoptoz değerlendirmesinde ise OLE tek başına özellikle 72.saatte daha belirgin olmak üzere apoptozu artırmıştır. OLE-CDDP uygulaması ise PSİ2 12S6 hücrelerinde OLE ile karşılaştırıldığında canlılığı azaltırken, apoptozu indüklediği saptanmıştır. Öte yandan CDDP ile OLE-CDDP kombinasyonu karşılaştırıldığında; canlılığı 48.saatte azaltırken, diğer saatlerde canlılığı pek değiştirmezken, 24 ve 48. saatlerde CDDP'ye göre apoptozu artırdığı saptanmıştır.

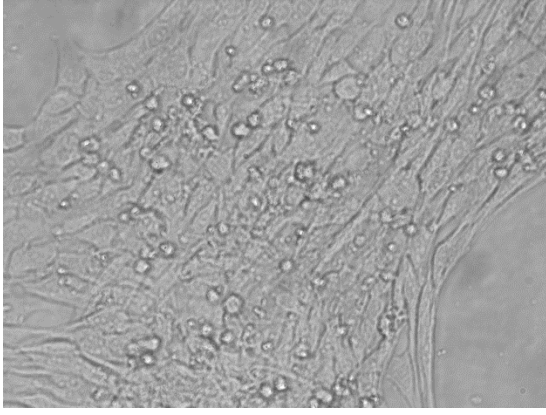
PSİ2 12S6 hücre hatlarının 24. saat hücre kültürü görüntüleri şekil 1'de aşağıda gösterilmiştir.



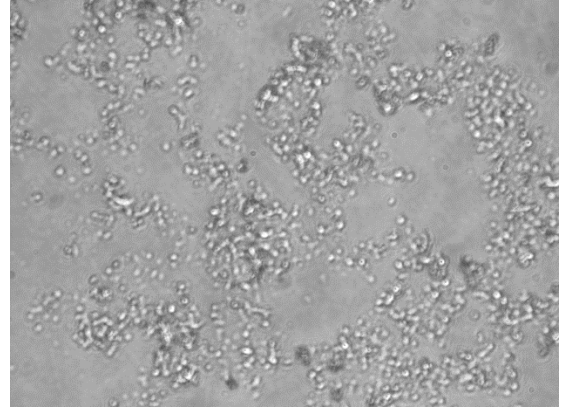
a) 24h PSİ2 12S6 Kontrol



b) 24h PSİ2 12S6 CDDP



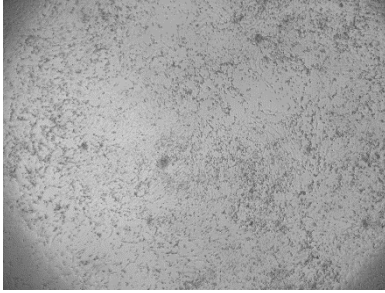
c) 24h PSİ2 12S6 OLE



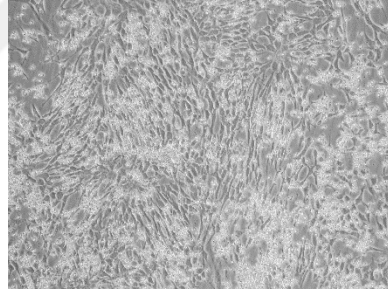
d) 24h PSİ2 12S6 Kombinasyon (OLE+CDDP)

Şekil 1: PSİ2 12S6 hücre hattının 24h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)

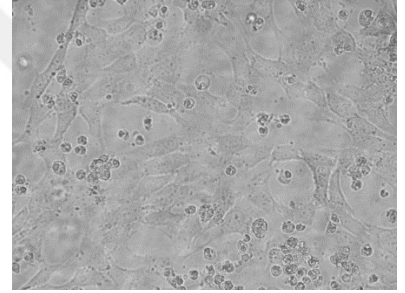
PSİ2 12S6 hücrelerinin genel durumunu da görmek için çeşitli büyütmelerde fotoğraflar alınmış ve bu fotoğraflarda Akım sitometri sonuçlarını desteklemiştir.



a) 4x

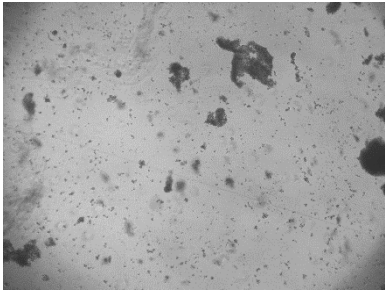


b) 10x

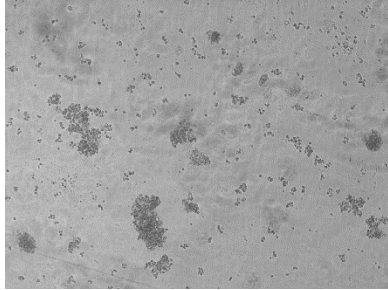


c) 40x

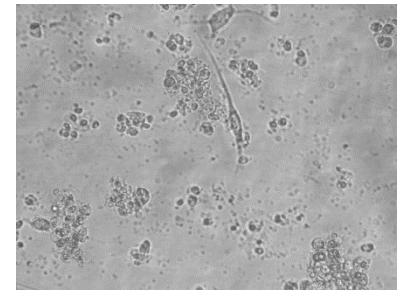
Şekil 2: 48h PSİ2 12S6 Kontrol Hücreleri



a) 4x



b) 10x



c) 40x

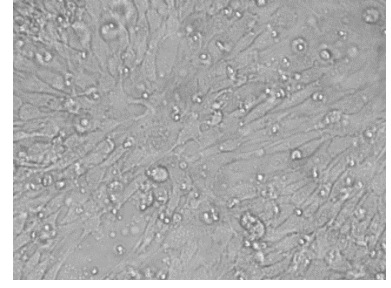
Şekil 3: 48h PSİ2 12S6 CDDP



a) 4x

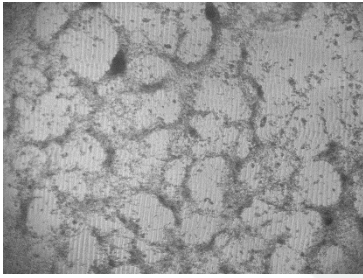


b) 10x

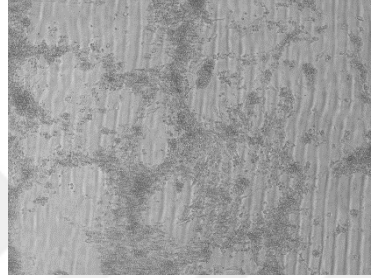


c) 40x

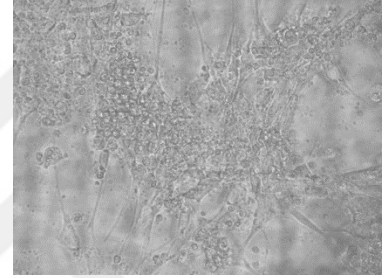
Şekil 4: 48h PSİ2 12S6 OLE



a) 4x



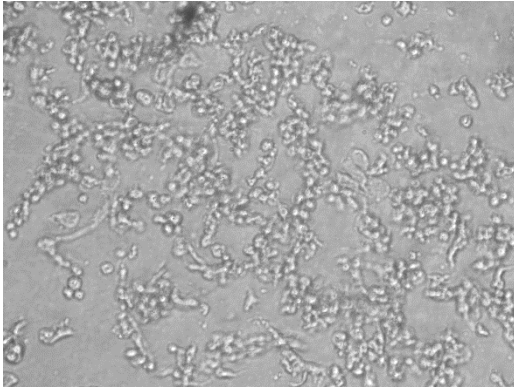
b) 10x



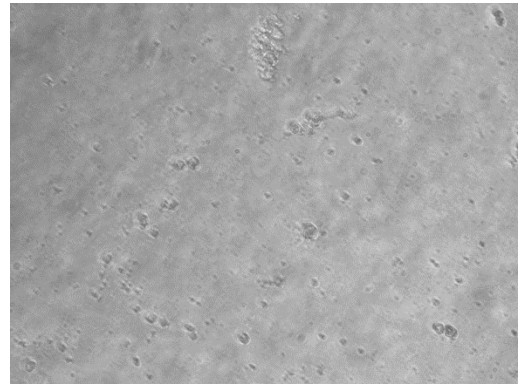
c) 40x

Şekil 5: 48h PSİ2 12S6 Kombinasyon (OLE+CDDP)

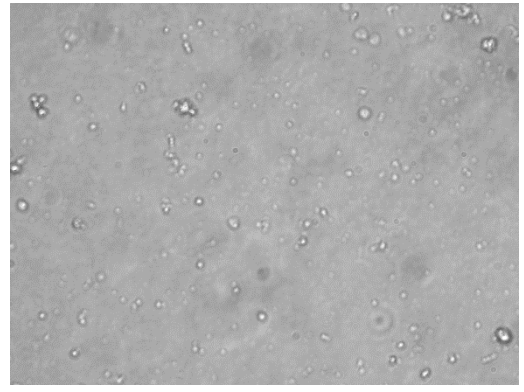
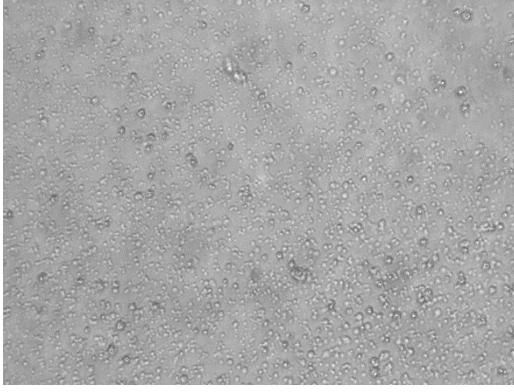
PSİ2 12S6 hücrelerinin 72.saat hücre kültürü görüntüleri aşağıdadır. OLE'nin PSİ2 12S6 hücreleri canlılığı üzerine, burada az da olsa katkısı olduğu görülmektedir.



a) 72h PSİ2 12S6 Kontrol



b) 72h PSİ2 12S6 CDDP

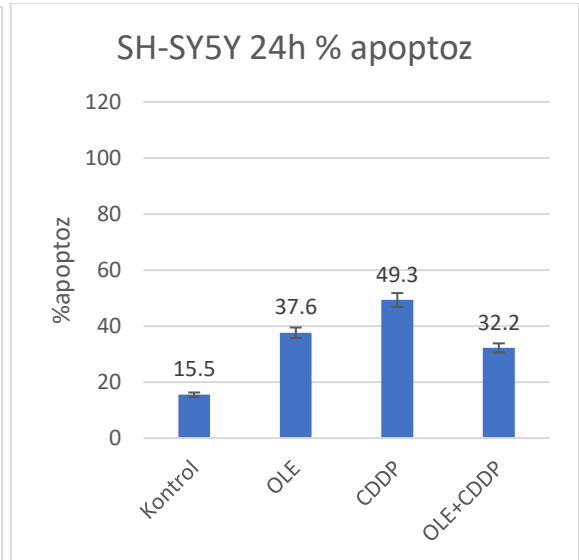
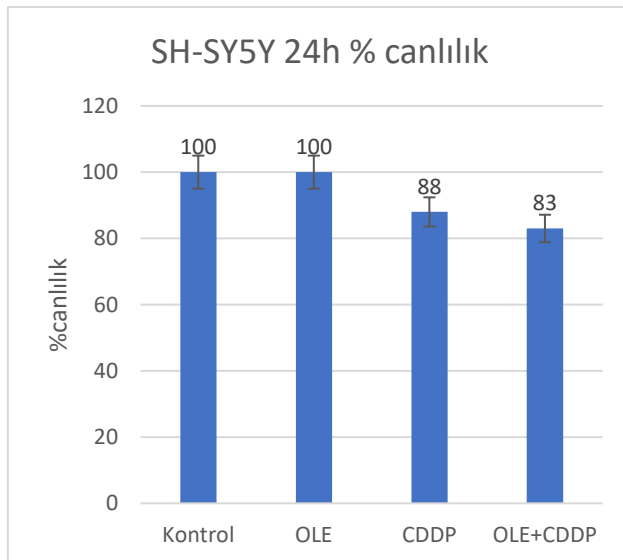


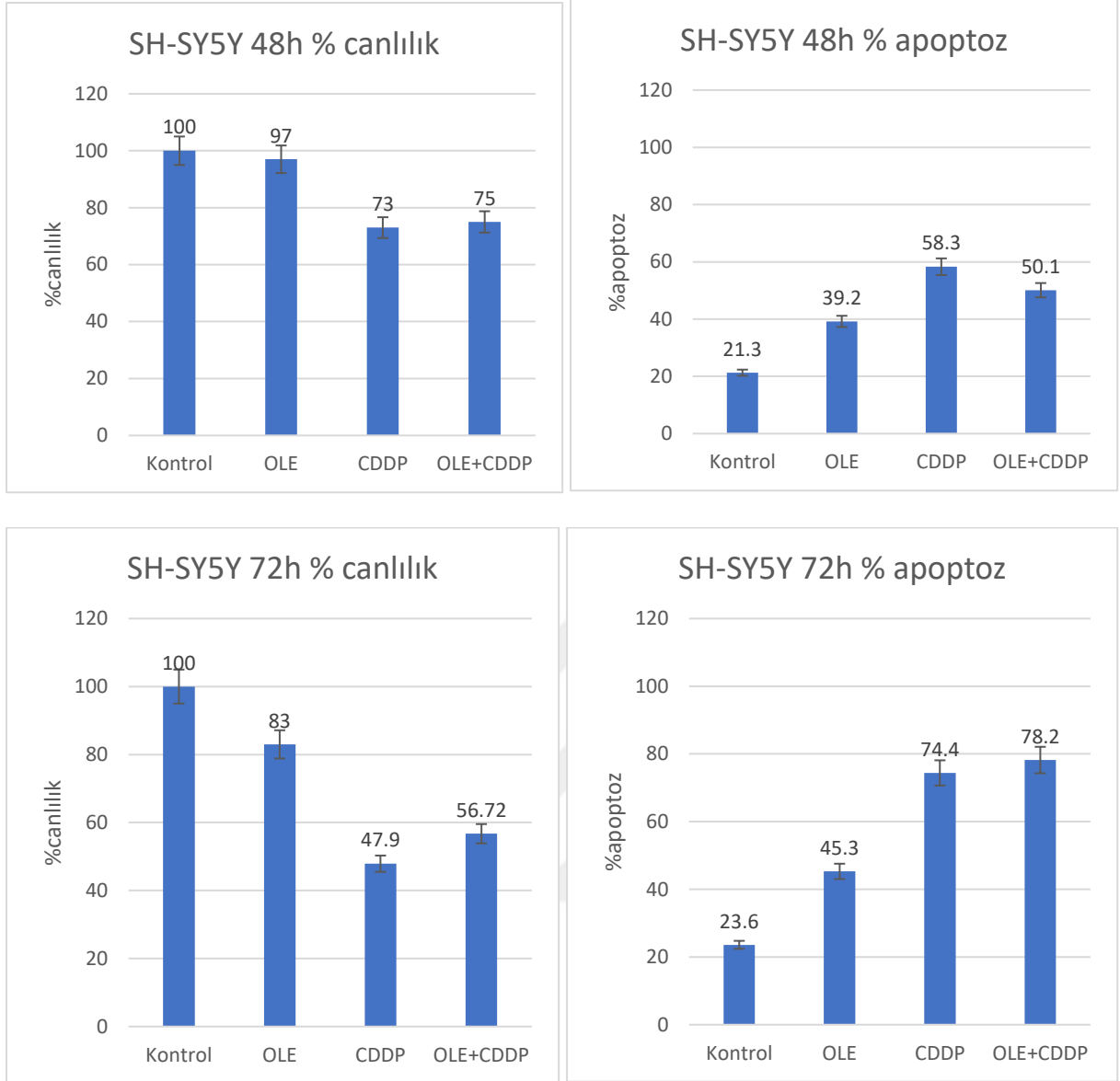
c) 72h PSİ2 12S6 OLE

d) 72h PSİ2 12S6 Kombinasyon (OLE+CDDP)

Şekil 6: PSİ2 12S6 hücre hattının 72h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)

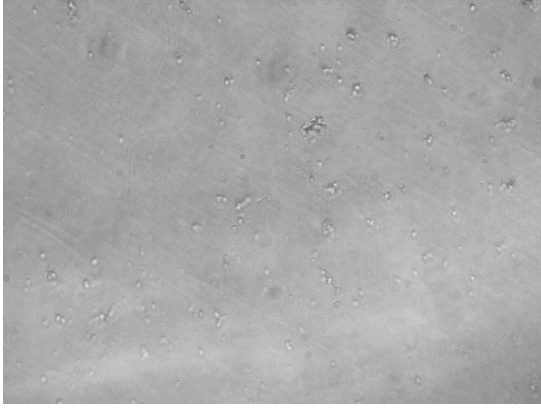
Canlılık ve apoptoz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; SH-SY5Y, N-MYC (–) iyi prognostik nöroblastom hücrelerinde OLE tek başına özellikle 72. saatte canlılığı azalttığı saptanmıştır. Yine OLE tek başına zamanla artış göstermeyen apoptoz artışına yol açmıştır. OLE ile OLE-CDDP kombinasyonu değerlendirildiğinde, canlılık zamanla azalırken apoptoz düzeyleri artış göstermiştir. CDDP ile OLE-CDDP kombinasyonu değerlendirildiğinde apoptotik hücre ölümünün sadece 72. saatte artış gösterdiği saptanmıştır.





Tablo 6: SH-SY5Y hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Akım sitometri sonuçları

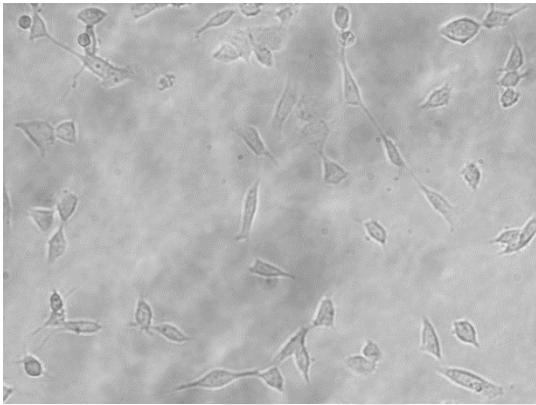
SH-SY5Y nöroblastom hücre hattının 24. saatte alınan fotoğrafları aşağıdaki gösterilmiştir. Fotoğraflardan da görüldüğü gibi özellikle OLE+CDDP kombinasyonunda hücrelerin çeper bütünlüğünün bozulduğu ve apoptoza girdiği fotoğraflanmıştır.



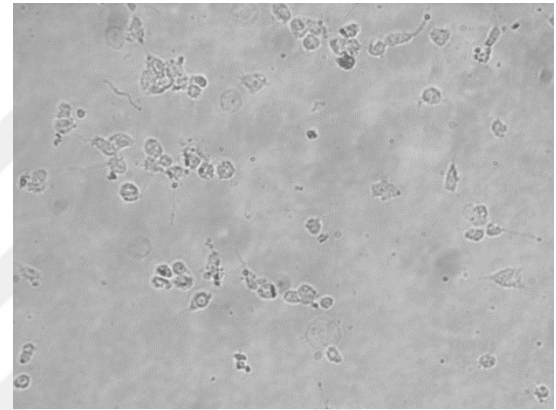
a) 24h SH-SY5Y Kontrol



b) 24h SH-SY5Y CDDP

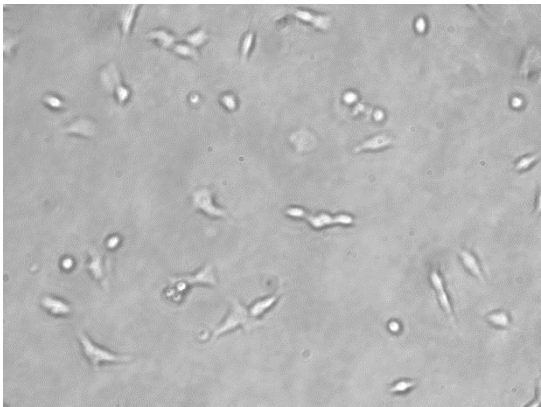


c) 24h SH-SY5Y OLE

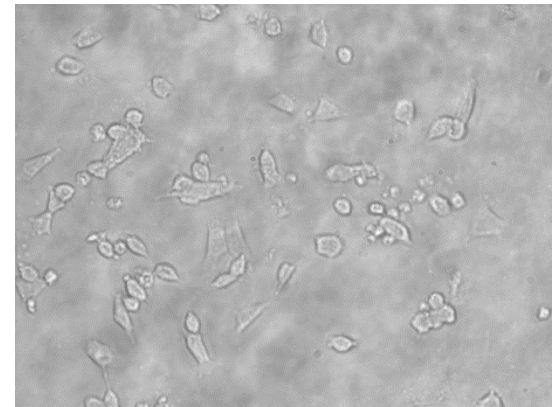


d) 24h SH-SY5Y Kombinasyon (OLE+CDDP)

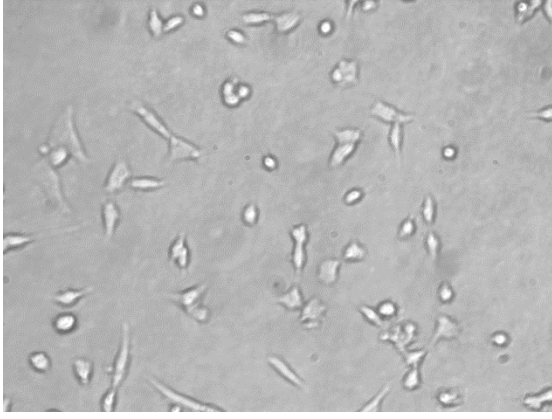
Şekil 7: SH-SY5Y hücre hattının 24h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)



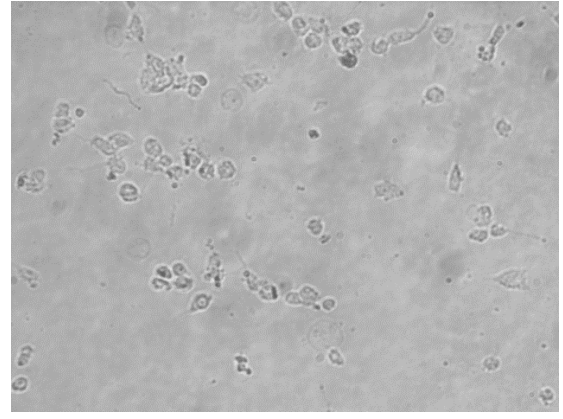
a) 48h SH-SY5Y Kontrol



b) 48h SH-SY5Y CDDP

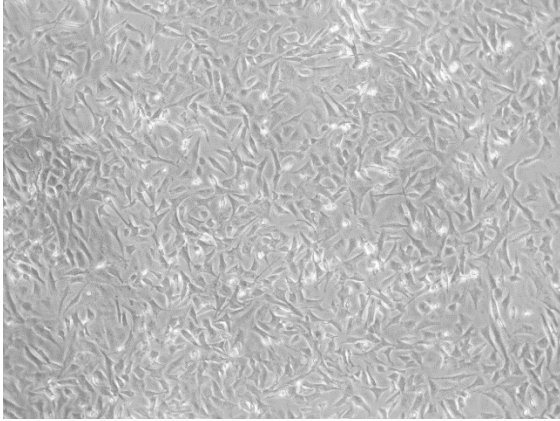


b) 48h SH-SY5Y OLE

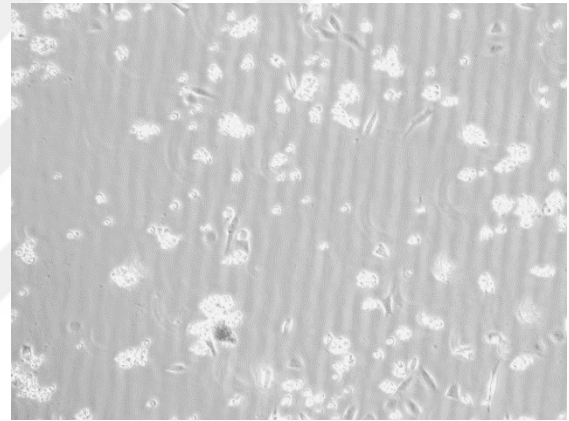


d) 48h SH-SY5Y Kombinasyon (OLE+CDDP)

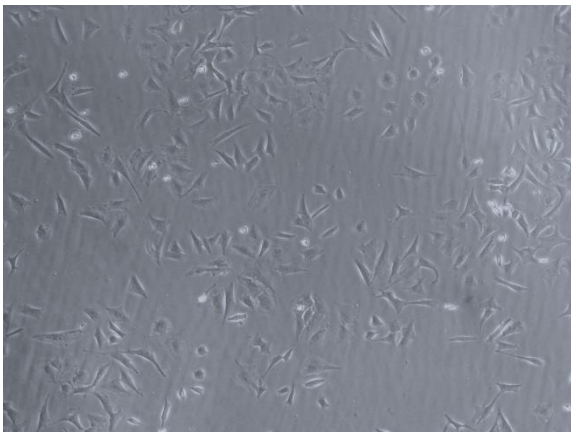
Şekil 8: SHSY5Y hücre hattının 48h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)



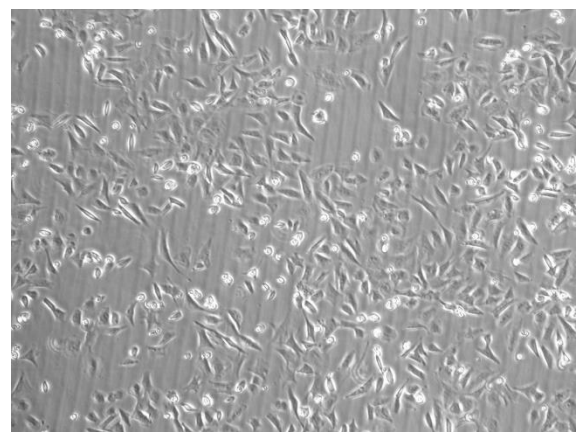
a) 48h SH-SY5Y Kontrol 10x



b) 48h SH-SY5Y CDDP 10x



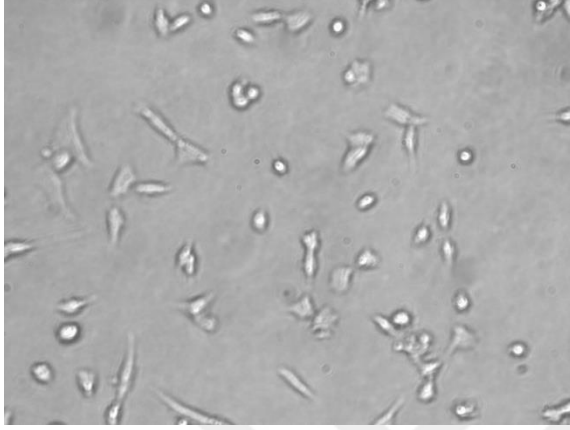
c)48h SH-SY5Y OLE 10x



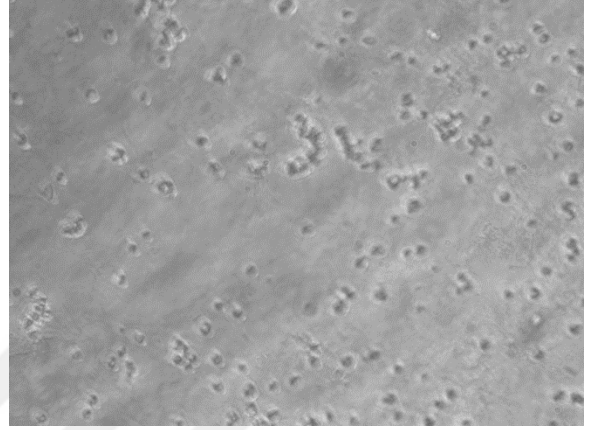
d) 48h SH-SY5Y Kombinasyon (OLE+CDDP) 10x

Şekil 9: SH-SY5Y hücre hattının 48h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d) 10x büyütmede gösterimi

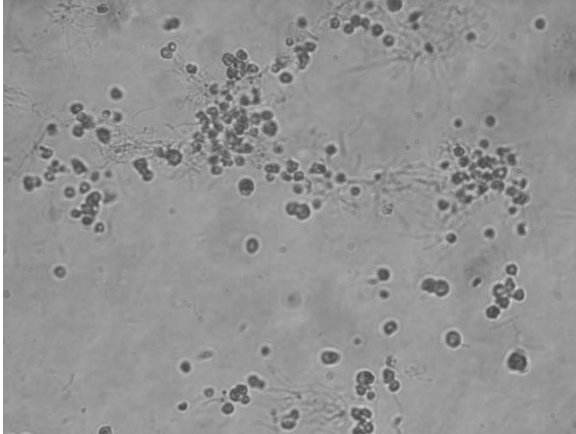
Hücrelerin genel durumu şekil 9'da 10x büyütmede daha net görülmektedir. SH-SY5Y hücreleri 48. saatte hem OLE'nin hem de CDDP'nin etkisi ile apoptoza girmektedir. SH-SY5Y hücrelerinin 72. saatte alınan şekil 10'daki, aşağıdaki görüntüleri hem OLE'nin hem de OLE+CDDP kombinasyonun SHSY5Y hücreleri canlılığı üzerine olumsuz etkileri olduğunu ortaya koymaktadır.



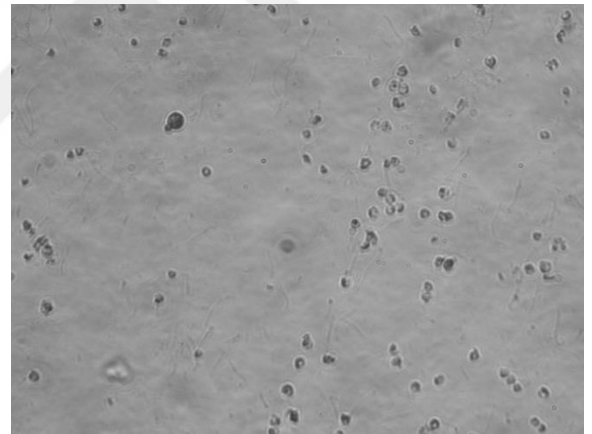
a) 72h SH-SY5Y Kontrol



b) 72h SH-SY5Y CDDP



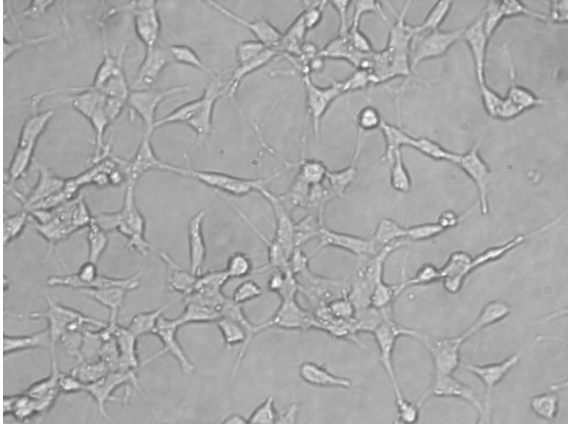
c) 72h SH-SY5Y OLE



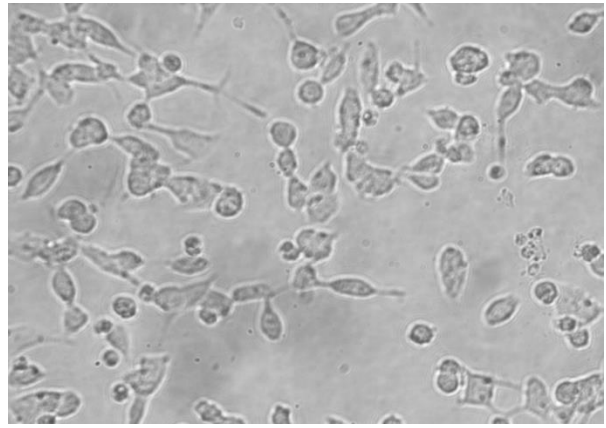
d) 72h SH-SY5Y Kombinasyon (OLE+CDDP)

Şekil 10: SH-SY5Y hücre hattının 72h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)

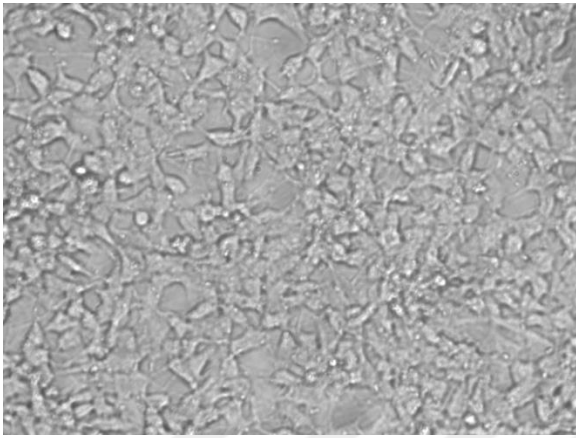
Hücre kültürü çalışmasında; KELLY hücre hattının, kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM CDDP ve 500uM OLE kombinasyonu (d) 24. saatte şekil 11' de aşağıda gösterilmiştir. CDDP'nin nöroblastom hücre hatlarını öldürdüğü çok net bir şekilde görülmektedir.



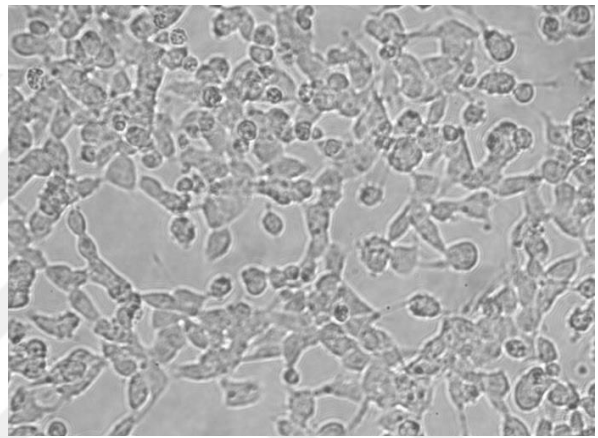
a) 24h KELLY kontrol



b) 24h KELLY CDDP



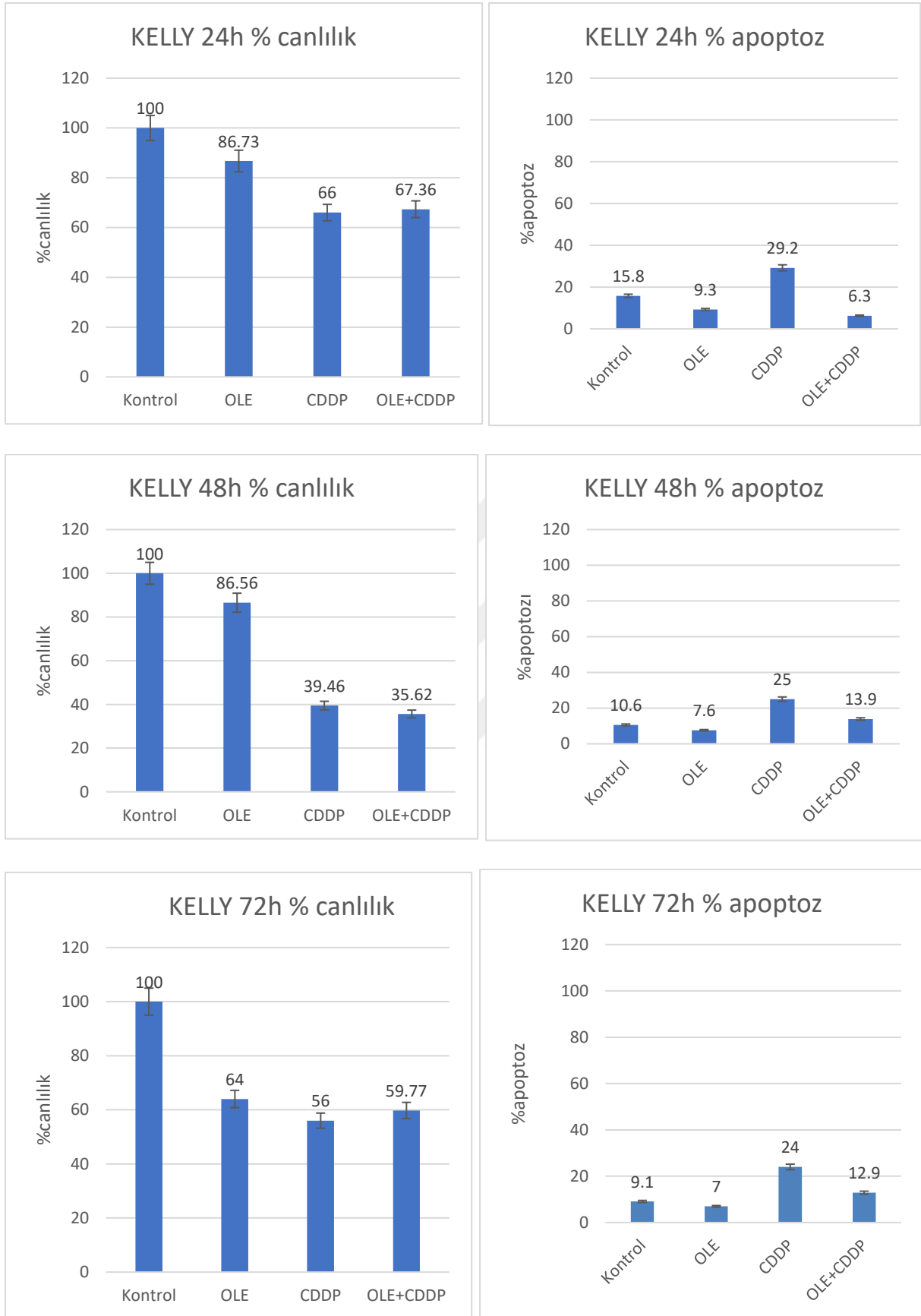
c) 24h KELLY OLE



d) 24h KELLY OLE+CDDP

Şekil 11: KELLY hücre hattının 24h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)

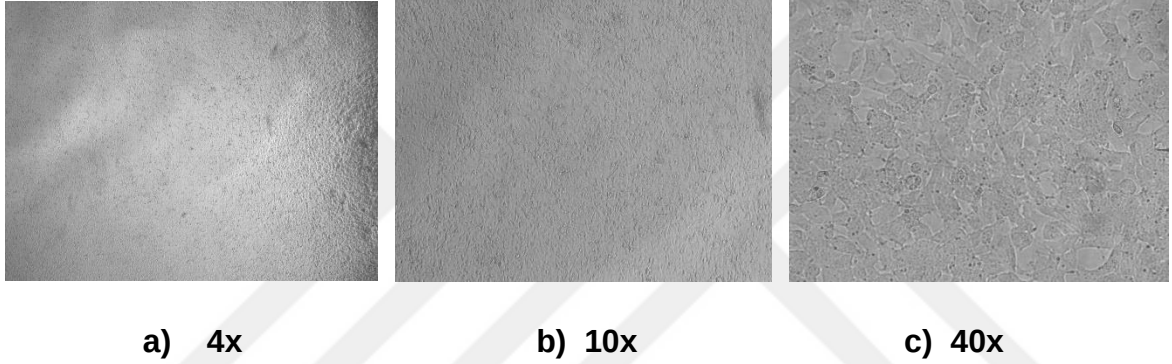
KELLY hücrelerinin 24h, 48h ve 72h'lerde OLE, CDDP ve bunların kombinasyonlarının Akım sitometri sonuçlarına aşağıda gösterilmektedir;



Tablo 7: KELLY hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Akım sitometri sonuçları

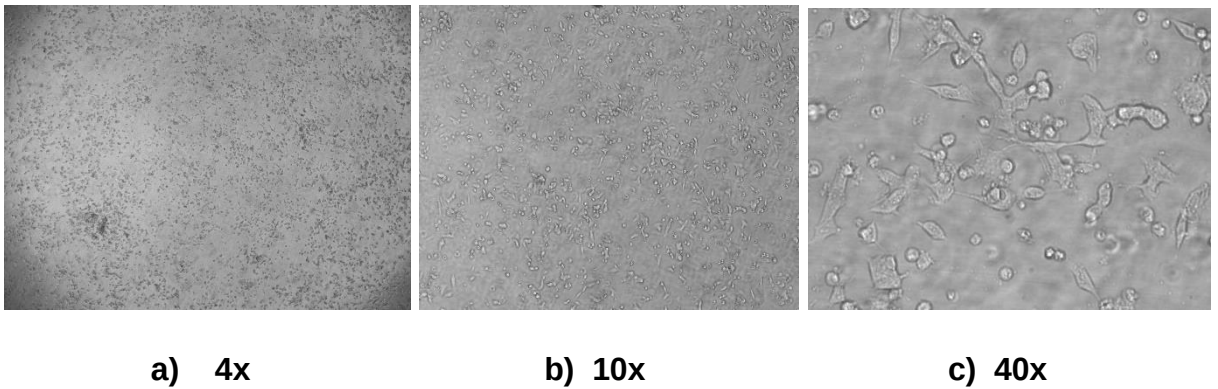
Canlılık ve apoptoz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; KELLY hücrelerinde OLE'nin canlılığı özellikle 72. saatte tek başına azalttığı saptanmıştır. OLE uygulaması OLE-CDDP kombinasyonu ile karşılaştırıldığında yine daha fazla canlılık azalmasına yol açmıştır. Tek başına CDDP ile OLE-CDDP uygulaması karşılaştırıldığında ise canlılığı pek fazla değiştirmemiştir. OLE'nin tek başına ya da CDDP ile kombine uygulaması belirgin apoptotik etki oluşturmamıştır. Sadece tek başına OLE ile karşılaştırıldığında 72. saatte apoptoz artışı yapmıştır. CDDP uygulamasına göre daha fazla apoptoz artışı göstermemiştir.

KELLY hücre hatlarının kontrol grubunun değişik büyütmelelerdeki fotoğrafları aşağıdaki gibidir.



Şekil 12: 48h KELLY Kontrol

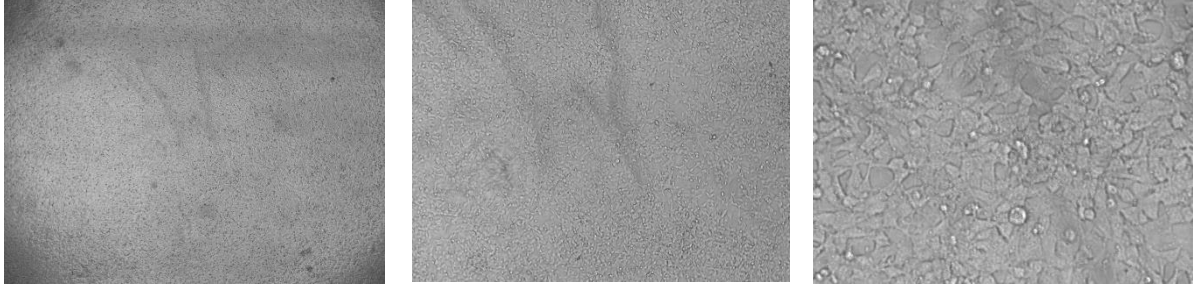
Şekil 12'de KELLY hücre hatlarının 48. saatte kontrol grubu 4x (a), 10x (b) ve 40x (c) büyütmede fotoğraflanmıştır.



Şekil 13: 48h KELLY CDDP

Şekil 13'de KELLY hücre hatlarının 48. saatte CDDP uygulanan grubu 4x (a), 10x (b) ve 40x (c) büyütmede fotoğraflanmıştır. Burada CDDP'nin KELLY hücreleri

üzerine olan öldürücü etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında net bir şekilde farkedilmektedir.



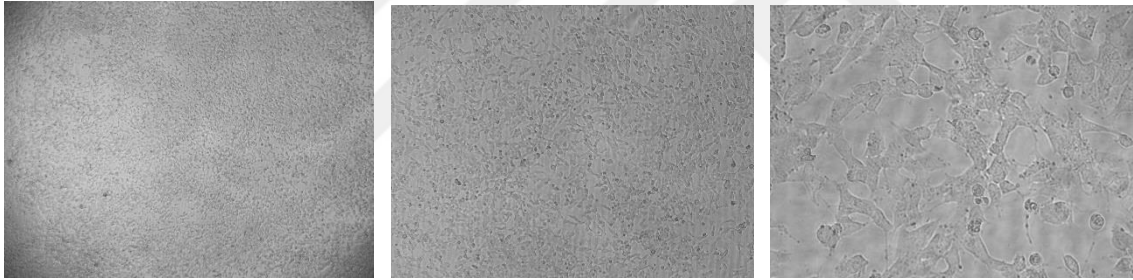
a) 4x

b) 10x

c) 40x

Şekil 14: 48h KELLY OLE

Şekil 14’de KELLY hücre hatlarının 48. saatte OLE uygulanan grubu 4x (a), 10x (b) ve 40x (c) büyütmede fotoğraflanmıştır.



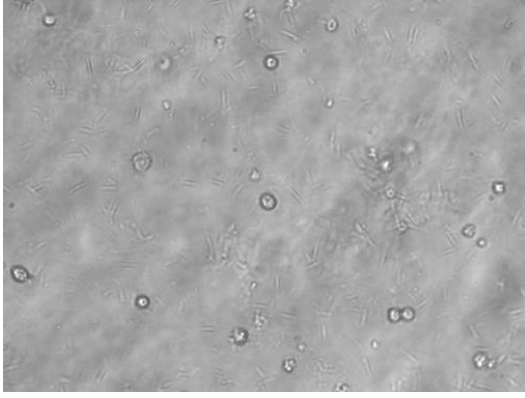
a) 4x

b) 10x

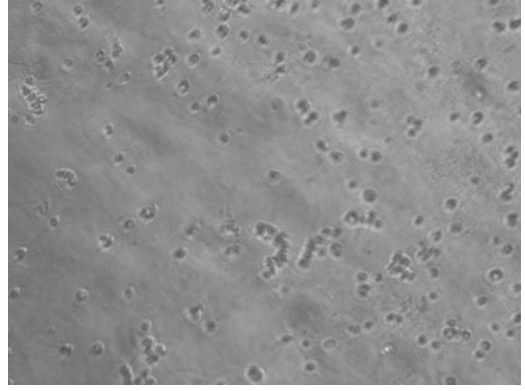
c) 40x

Şekil 15: 48h KELLY Kombinasyon (OLE+CDDP)

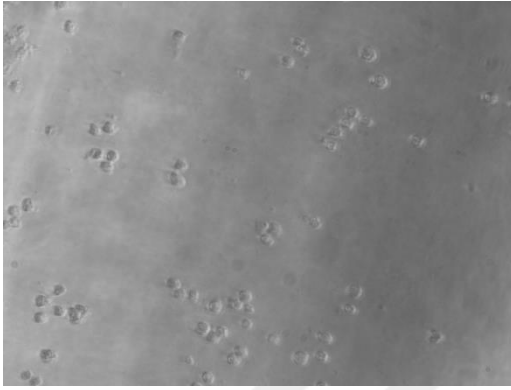
Şekil 15’de KELLY hücre hatlarının 48. saatte OLE+CDDP kombinasyonunun uygulandığı grup 4x (a), 10x (b) ve 40x (c) büyütmede fotoğraflanmıştır. Burada elde edilen sonuçlar da yine Akım sitometri ile gerçekleştirilen deneylerin sonuçlarını destekler niteliktedir.



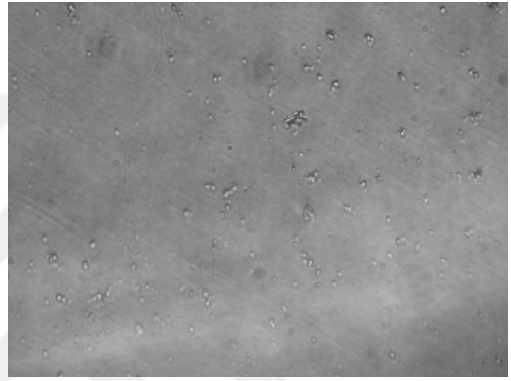
a) 72h KELLY Kontrol



b) 72h KELLY CDDP



c) 72h KELLY OLE



d) 72h KELLY (OLE+CDDP)

Şekil 16: KELLY hücre hattının 72h lik kontrol (a), sisplatin (b), oleuropein (c), 50uM sisplatin ve 500uM oleuropein kombinasyonu (d)

5. Tartışma:

Nöroblastom çocukluk çağında en sık görülen ikinci solid tümör olması ve tedavisinde kullanılan ana tedavi ajanı olan CDDP'nin doz sınırlayıcı önemli yan etkileri nedeniyle klinikte yeni anti-tümoral ajanlara ihtiyaç vardır. CDDP sadece nöroblastomda değil, erişkinde başta akciğer kanseri tedavisinde olmak üzere, sık kullanılan klasik kemoterapötik ajanlardan biridir. Aynı şekilde bu yan etkiler erişkin kanser tedavilerinde de önemli olmaktadır.

Oleuropein zeytin yaprağı ekstresinde bulunan ana etken maddedir. OLE'nin yapılan sınırlı sayıda çalışmalarda; hem antioksidan (29), anti-mikrobik (30), anti-inflamatuvar (31), anti-hipertansif etkileri hem de nörodejeneratif etkileri özellikle *in vitro* olarak ortaya konmuştur. Buna karşın OLE ve kanser ile ilgili yapılan hücre kültürü çalışmalarında; osteosarkom (32), melanom (33), mezotelyoma (34), glioblastoma (35), prostat (36), tiroid (37) ve meme (38) kanserinde hücre çoğalmasını azaltıcı ve çoğunlukla apoptozu arttırıcı etkiler saptanmıştır. Nöroblastom ve OLE ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında sadece bir çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde antikanser etki gösterdiği saptanmıştır (6). Yine OLE ve CDDP ile ilgili yapılan çalışmalarda sisplatin toksisitelerine karşı OLE'nin koruyucu etkileri *in vivo* olarak gösterilmiştir (39). Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada ise bugüne dek yapılan literatür taramasında incelenmemiş olan sağlıklı PSİ2 12S6 fibroblast hücreleri, nöroblastomda iyi prognozu temsil eden SH-SY5Y ve kötü prognozu temsil eden KELLY nöroblastom hücrelerinde OLE'nin tek başına ve CDDP ile kombine kullanımında olası anti-proliferatif ve apoptotik etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada PSİ2 12S6 fibroblast hücrelerinde OLE'nin hücre canlılığını zaman bağımlı olarak hemen hemen değiştirmedeği saptanmıştır. Apoptoz değerlendirmesinde OLE tek başına özellikle 72.saatte daha belirgin olmak üzere apoptozu arttırmıştır. OLE-CDDP uygulaması ise PSİ2 12S6 hücrelerinde OLE ile karşılaştırıldığında canlılığı azaltırken, apoptozu indüklediği saptanmıştır. Öte yandan CDDP ile OLE-CDDP karşılaştırıldığında canlılığı 48.saatte azaltıp, diğer saatlerde canlılığı pek değiştirmezken, 24 ve 48. saatlerde CDDP'ye göre apoptozu arttırdığı saptanmıştır.

OLE'nin PSİ2 12S6 fibroblast hücrelerinde canlılığı azaltıcı ve apoptotik etkileri saptanmıştır. Sağlıklı hücrelerde OLE'nin bu etkiyi göstermesi az da olsa yan etki

oluşumuna neden olabilecektir. Bugüne dek yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde özellikle Alzhemier modeline karşı çok daha düşük dozlarda uygulanan OLE'nin (OLE 10uM gibi) amiloid birikimini önlediği ve endoteliyal progenitör hücrelerde koruyucu etkileri değerlendirilmiştir (7, 40). Bununla birlikte OLE'nin sağlıklı nöronal hücrelerdeki etkilerinin doz bağımlı olarak değerlendirilmesi bu açıdan daha etkili olabilecektir. OLE doz bağımlı olarak farklı etkiler ortaya çıkartıyor olabilir.

N-MYC (–) iyi prognostik SHSY5Y, nöroblastom hücrelerinde OLE tek başına özellikle 72. saatte canlılığı azaltmış ve apoptotik etki göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları daha önce yine SH-SY5Y hücrelerinde OLE'nin 48 saatte LD50 doz 350uM ile buldukları çalışma ile benzer sonuçlar ortaya koymuştur (6). Yine bu çalışmada OLE'nin etki mekanizmasının Bcl2 inhibisyonu ve Bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9 ekspresyon artışı aracılığı ile ortaya çıktığı aynı zamanda hücre siklusunu inhibe ederek etki gösterdiği saptanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada da OLE'nin SH-SY5Y hücrelerinde AMPK/mTOR sinyal yolağı aracılığı ile otofajik hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır (7). Ancak yapılan bu çalışmalarda CDDP ile OLE kombinasyonu değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda OLE-CDDP kombinasyonu, OLE'nin tek başına uygulanmasına göre apoptozun daha belirgin olmasına yol açmıştır. CDDP ile OLE-CDDP kombinasyonu değerlendirildiğinde apoptotik hücre ölümünün sadece 72. saatte daha fazla indüklendiği saptanmıştır.

Ayrıca bizim çalışmamızda KELLY kötü prognozu temsil eden nöroblastom hücrelerinde OLE'nin etkisi değerlendirilmiştir. Tek başına ve CDDP ile OLE'nin kombine uygulaması sadece 72. saatte apoptotik etki ortaya çıkarmıştır. Yine tek başına CDDP'nin hücre canlılığını azaltıcı ve apoptotik etkisi ile kombine uygulama etkisi değerlendirildiğinde apoptoz artışına neden olmamıştır. Bu açıdan CDDP halen nöroblastom tedavisinde en etkin ajan olma özelliğini korumaktadır.

Bugüne dek OLE'nin, CDDP'nin ve kombine uygulaması ile ilgili iyi ve kötü prognozu temsil eden nöroblastom hücreleri üzerindeki hücre ölümünü, apoptotik hücre ölüm mekanizması üzerinden gerçekleştiği ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Buna karşın sağlıklı hücrelerde OLE apoptoza yol açıyor görünmektedir. Öte yandan nöroblastom tedavisinde kullanılan ana ajan olan CDDP uygulamasına göre karşılaştırıldığında OLE'nin özellikle kötü prognozlu hücreler üzerinde belirgin apoptoz ortaya çıkarmaması açısından dikkatli yaklaşmak gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada ki hipotezimiz; “Oleuropein sinerjetik etkisi ile sisplatinin etkisini artırır ve oleuropeinin nöroblastomda tek başına ve sisplatin ile antitümoral etkisi vardır ve bu etki apoptoz hücre ölüm tipini uyararak meydana gelir” şeklindeydi. Çalışma sonucunda; hipotezimizin SH-SY5Y nöroblastom hücreleri için doğrulanırken KELLY hücreleri için kısmen doğrulandığı saptanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen verilerin daha iyi ortaya konabilmesi için OLE’nin etki mekanizma bilgilerinin daha ayrıntılı olarak değeriendirilebileceğı *in vitro* ve *in vivo* alışmalarla değeriendirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.



6. Sonuç ve Öneriler:

Bu çalışmada OLE'nin tek başına ve CDDP kombine uygulaması ile hem sağlıklı hem de iyi ve kötü prognozlu nöroblastom hücrelerinde kısmen de olsa apoptotik hücre ölümü yaptığı saptanmıştır. Ancak diğer hücre ölüm tipleri üzerine etkisi ve apoptotik hücre ölüm mekanizmasının nasıl gerçekleştiği bu çalışmada incelenememiştir. Bu açıdan OLE'nin tek başına ve CDDP ile kombine etki mekanizmalarının hem *in vivo* ve hem de *in vitro* nöroblastom deney hayvanları modellerinde ortaya konması uygun olacaktır.



7. Kaynaklar:

1. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Cetingul N, Vergin C, Oniz H, Sarialioglu F, Kantar M, Uysal K, Tuncyurek M, Kargi A, Aktas S, Bayol U, Karaca I, Arikan A, Balik E, Aktug T, Elmas N, Kovanlikaya A, Kinay M, Anacak Y, Degirmenci B, Burak Z. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. *Pediatr Hematol Oncol*. 2003;20(3):211-8.
2. Castleberry RP. Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am*. 1997;44(4):919-37.
3. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(1):65-86.
4. Bradeur GM, Maris JM. Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* 5th ed. Philadelphia: *Lippincott-Raven*. 2006.
5. Luccarini I, Pantano D, Nardiello P, Cavone L, Lapucci A, Miceli C, Nediani C, Berti A, Stefani M, Casamenti F. The Polyphenol Oleuropein Aglycone Modulates the PARP1-SIRT1 Interplay: An In Vitro and In Vivo Study. *J Alzheimers Dis*. 2016; 6;54(2):737-50.
6. Seçme M, Eroğlu C, Dodurga Y, Bağcı G. Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*. 2016; 1;585(1):93-9.
7. Rigacci S, Miceli C, Nediani C, Berti A, Cascella R, Pantano D, Nardiello P, Luccarini I, Casamenti F, Stefani M. Oleuropein aglycone induces autophagy via the AMPK/mTOR signalling pathway: a mechanistic insight. *Oncotarget*. 2015; 3;6(34):35344-57.
8. Kostomoiri M, Fragkouli A, Sagnou M, Skaltsounis LA, Pelecanou M, Tsilibary EC, Tzinia AK. Oleuropein, an anti-oxidant polyphenol constituent of olive promotes α -secretase cleavage of the amyloid precursor protein (A β PP). *Cell Mol Neurobiol*. 2013;33(1):147-54.
9. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med*. 2009; 219(3):177-86.
10. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med*. 2009; 219(3):177-86.

11. Majumder P, Duchen MR, Gale JE. Cellular glutathione content in the organ of Corti and its role during ototoxicity. *Front Cell Neurosci.* 2015; 28;9:143.
12. Wong AC, Ryan AF. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front Aging Neurosci.* 2015 21;7:58.
13. Gunes D, Kirkim G, Kolatan E, Guneri EA, Ozogul C, Altun Z, Serbetcioglu B, Yilmaz O, Aktas S, Mutafoğlu K, Tufekci O, Erbayraktar Z, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy.* 2011;57(3):186-94.
14. Annamalai P, Thayman M, Rajan S, Raman LS, Ramasubbu S, Perumal P. Ethyl acetate extract from marine sponge *Hyattella cribriformis* exhibit potent anticancer activity by promoting tubulin polymerization as evidenced mitotic arrest and induction of apoptosis. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(42):345-55.
15. Papadopoulos EI, Yousef GM, Scorilas A. Gemcitabine impacts differentially on bladder and kidney cancer cells: distinct modulations in the expression patterns of apoptosis-related microRNAs and BCL2 family genes. *Tumour Biol.* 2015;36:3197-207.
16. Li JP, Yang YX, Liu QL, Pan ST, He ZX, Zhang X, Yang T, Chen XW, Wang D, Qiu JX, Zhou SF. The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 16;9:1627-52.
17. Kartlaşmış K, Kökbaş U, Kayrın L, Biochemistry of apoptosis, *Archives Medical Journal,* 2016; 25(1):52-69.
18. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(10):1102-9.
19. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol.* 2010 ;90(4):1383-435.
20. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(9):814-22.

21. Marshall KD, Baines CP. Necroptosis: is there a role for mitochondria? *Front Physiol.* 2014; 26;5:323.
22. Cecen E, Altun Z, Ercetin P, Aktas S, Olgun N. Promoting effects of sanguinarine on apoptotic gene expression in human neuroblastoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(21):9445-51.
23. Potočnjak I, Škoda M, Pernjak-Pugel E, Peršić MP, Domitrović R. Oral administration of oleuropein attenuates cisplatin-induced acute renal injury in mice through inhibition of ERK signaling. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60(3):530-41.
24. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Akim Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods.* 2015;423:99-103.
25. Miao B, Degterev A. Methods to analyze cellular necroptosis. *Methods Mol Biol.* 2009;559:79-93.
26. Degterev A, Zhou W, Maki JL, Yuan J. Assays for necroptosis and activity of RIP kinases. *Methods Enzymol.* 2014;545:1-33.
27. Altun ZS, Güneş D, Aktaş S, Erbayraktar Z, Olgun N. Protective effects of acetyl-L-carnitine on cisplatin cytotoxicity and oxidative stress in neuroblastoma. *Neurochem Res.* 2010;35(3):437-43.
28. Aktas S, Altun Z, Erbayraktar Z, Aygun N, Olgun N. Effect of cytotoxic agents and retinoic acid on Myc-N protein expression in neuroblastoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18(1):86-9.
29. De la Puerta R, Martínez Domínguez ME, Ruíz-Gutiérrez V, Flavill JA, Hoult JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life Sci.* 2001;27;69(10):1213-22.
30. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51(8):971-4.
31. Visioli F, Bellosta S, Galli C. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 1998;62(6):541-6.
32. Morana JM, Leal-Hernande O, Canal-Macías ML, Roncero-Martin R, Guerrero-Bonmatty R, Aliaga I, Zamorano JD. Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells. *Nat Prod Commun.* 2016;11(4):491-2.

33. Samara P, Christoforidou N, Lemus C, Argyropoulou A, Ioannou K, Vougianniopoulou K, Aligiannis N, Paronis E, Gaboriaud-Kolar N, Tsitsilonis O, Skaltsounis AL. New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo. *Eur J Med Chem.* 2017;8;137:11-29.
34. Marchetti C, Clericuzio M, Borghesi B, Cornara L, Ribulla S, Gosetti F, Marengo E, Burlando B. Oleuropein-Enriched Olive Leaf Extract Affects Calcium Dynamics and Impairs Viability of Malignant Mesothelioma Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;908493.
35. Tunca B, Tezcan G, Cecener G, Egeli U, Ak S, Malyer H, Tumen G, Bilir A. Olea europaea leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(11):1831-44.
36. 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(1):31-8.
37. Bulotta S, Corradino R, Celano M, Maiuolo J, D'Agostino M, Oliverio M, Procopio A, Filetti S, Russo D. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *J Mol Endocrinol.* 2013;29;51(1):181-9.
38. Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology.* 2009;59(1):45-53.
39. Geyikoglu F, Emir M, Colak S, Koc K, Turkez H, Bakir M, Hosseinigouzdagani M, Cerig S, Keles ON, Ozek NS. Effect of oleuropein against chemotherapy drug-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damages in rat kidney injury. *J Food Drug Anal.* 2017;25(2):447-459.
40. Parzonko A, Czerwińska ME, Kiss AK, Naruszewicz M. Oleuropein and oleacein may restore biological functions of endothelial progenitor cells impaired by angiotensin II via activation of Nrf2/heme oxygenase-1 pathway. *Phytomedicine.* 2013 15;20(12):1088-94.

8. Ekler:

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/11-17	Tarih:11.05.2017
	Prof.Dr.Nur OLGUN'un sorumlusu olduğu "Olcuropein ve Sisplatin'in Nöroblastom Hücreleri Üzerine Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UCKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Sevinç</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Müge</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Sevda</i>
Prof.Dr.Stilen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılmadı</i>
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Sefa</i>
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Aylin</i>
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ayhan</i>
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Murat</i>
Uzun.Dr.Ahmet Can BILGIN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ahmet</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	DEU Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Mehmet</i>



ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI

Duygu DURSUN

TC Kimlik No / Pasaport No:	11815677714
Doğum Yılı:	18.10.1986
Yazışma Adresi :	Eğitim Mah/ Ekrem Güer sok. No:42/5 Murat Öz Apartmanı Balçova İZMİR
Telefon :	+90505 808 92 86
e-posta :	duygu-dursun@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji Doktora	3.45	2017
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Temel Onkoloji Yüksek Lisans	3.67	2013
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	2.66	2010

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Onkoloji, Temel Onkoloji, Biyokimya, Biyoteknoloji

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Gen Ekspresyon Profili- İkincilik Ödülü	Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu	2013

YAYINLARI

Bilateral Breast Cancer with Neurofibromatosis Type 1 Patient: Case Report.

Duygu Dursun, Safiye Aktaş, Zekiye Altun, Nur Olgun

European Journal of Breast Health, 2017 Oct; 13(4): 213–215

Gene Expression Characteristics of Breast Cancer Stem Cells.

Murat Doğan, Pınar Erçetin, Zekiye Altun, **Duygu Dursun**, Safiye Aktaş, Nur Olgun

Journal of the Balkan Union of Oncology, 2015 Sep-Oct;20(5):1304-13.

Acetyl L Carnitine Interferes with Antitumor Effect of Cisplatin

Safiye Aktaş, Zekiye Altun, Ayça Pamukoğlu, Efsun Kolatan, Pınar Erçetin, **Duygu Dursun**, Efe Serinan, Banu Demir, Osman Yılmaz, Nur Olgun

Pediatric Blood&Cancer, 2014 Dec, Volume:61 Page:S327-S328

Clinical Significance of DNA Repair Genes Expressions in Neurofibromatosis Type 1 Cases

Duygu Dursun, Safiye Aktas, Pınar Ercetin, Zekiye Altun, Dilek Ince, Kamer Mutafoğlu, Nur Olgun

Pediatric Blood&Cancer, 2013 Sep, Volume:60 Page:19-19.

Evaluation of Gene Expression Profiles for The Differential Diagnosis of Lung Adenocarcinoma and Malignant Pleural Mesothelioma

Gökçen Şimşek, İsmail Ağababaoğlu, **Duygu Dursun**, Selver Özekinci, Pınar Erçetin, Safiye Aktaş, Hülya Ellidokuz, Duygu Gürel, İlhan Öztop, Atila Akkoçlu

Journal Of Thoracic Oncology, 2013 Nov, Volume: 8 Pages: S451-S452

Nörofibromatozis Tip 1 Olgularında DNA Tamir Genlerinin Ekspresyonunun Klinik Önemi

Duygu Dursun, Safiye Aktaş, Pınar Erçetin, Zekiye Altun, Kamer Mutafoğlu, Nur Olgun

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi Cilt: 27, Sayı: 1, Nisan 2013

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Nörofibromatozis Tip 1'e Eşlik Eden Bilateral Meme Kanseri: Olgu Sunumu Duygu Dursun, Pinar Ercetin, Zekiye Altun, Dilek Ince, Kamer Mutafoğlu, Safiye Aktas, Nur Olgun İzmir Onkoloji Günleri, Nadir Tümörler Sempozyumu, 28 Şubat- 02 Mart 2014, Kaya Termal, İzmir (<i>Poster Sunumu</i>)
The Effect of Rapamycin on Apoptosis and Apoptotic Gene Expressions in Breast Cancer Cells Ayşe Pinar Ercetin, Duygu Dursun, Ayca Pamukoglu, Safiye Aktas EACR Special Conference, Cell Death in Cancer, 30 January-01 February 2014, Amsterdam, Netherlands (<i>Sözlü Bildiri</i>)
Apoptosis Related Gene Expression Profile in Breast Cancer Stem Cells Ayşe Pinar Ercetin, Sait Murat Doğan, Duygu Dursun, Safiye Aktas EACR Special Conference, Cell Death in Cancer, 30 January-01 February 2014, Amsterdam, Netherlands (<i>Poster Sunumu</i>)
Evaluation of Gene Expression Profiles for the Differential Diagnosis of Lung Adenocarcinoma and Malignant Pleural Mesothelioma Gökçen Ömeroğlu Şimşek, İsmail Ağababaoğlu, Duygu Dursun, Selver Özekinci, Pinar Erçetin, Safiye Aktaş, Hülya Ellidokuz, Duygu Gürel, İlhan Öztop, Atila Akkoclu 15th World Conference on Lung Cancer (IASLC), October 27- October 31, 2013, Sydney, Australia (<i>Sözlü Bildiri</i>)
Clinical Significance of DNA Repair Genes Expressions in Neurofibromatosis Type 1 Cases (n=46) D. Dursun, S. Aktas, P. Ercetin, Z. Altun, D. Ince, K. Mutafoğlu, N. Olgun 45th Congress of The International Society of Paediatric Oncology (SIOP) 2013 Hong Kong, China, 25th–28th September, (<i>Sözlü Bildiri</i>)
Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Gen Ekspresyon Profili Sait Murat Doğan, Pinar Erçetin, Zekiye Altun, Duygu Dursun, Safiye Aktaş XX. Ulusal Kansere Kongresi, 19-23 Nisan 2013, Antalya (<i>Sözlü Bildiri</i>)

Nörofibromatozis Tip 1 Kanseri İlişkisine Moleküler Yaklaşım
Molecular Approach to Neurofibromatosis Type 1 and Cancer Relation

Duygu Dursun, Safiye Aktaş, Pınar Erçetin, Zekiye Altun, Nur Olgun

IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık, 2012, Bursa (*Sözlü Bildiri*)

Galectin-1 Nöroblastom Kök Hücre İlişkisi
The Relationship of Galectin-1 and Neuroblastoma Stem Cells

Pınar Erçetin, **Duygu Dursun**, Safiye Aktaş, Nur Olgun

IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık, 2012, Bursa (*Poster Sunumu*)

Rapamisininin Meme Kanseri Hücrelerinde Gen Ekspresyon Profiline Etkisi

Pınar Erçetin, **Duygu Dursun**, Zekiye Altun, Safiye Aktaş

IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık, 2012, Bursa (*Sözlü Bildiri*)

Kore Kırmızı Ginsenginin (Krg) Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisi
The Effect Of Korean Red Ginseng (Krg) On Breast Cancer Cells

Pınar Erçetin, Zekiye Sultan Altun, **Duygu Dursun**, Safiye Aktaş

IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık, 2012, Bursa (*Poster Sunumu*)

Clinical Significance of DNA Repair Genes Expressions in Neurofibromatosis Type1 Cases (n=24)

Duygu Dursun, Safiye Aktas, Pınar Ercetin, Zekiye Altun, Dilek Ince, Kamer Mutafoğlu, Nur Olgun

15th European NF Meeting, 6-9 September 2012, Istanbul (*Poster Sunumu*)