

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

OLEUROPEİN'İN NEUROBLASTOMA HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE MORFOLOJİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Şerife KARAKAYA

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2020

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

OLEUROPEİN'İN NEUROBLASTOMA HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE MORFOLOJİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Şerife KARAKAYA

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK

ESKİŞEHİR

2020

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI**T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA**

Dr. Şerife KARAKAYA'ya ait "Oleuropein'in Neuroblastoma Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Morfolojik Etkilerinin İncelenmesi" adlı çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Aydan ÖZGÖRGÜLÜ
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Tahsin Murad AKTAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun .../.../.....
Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla Onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ

Dekan

TEŞEKKÜR

Tezimde her aşamada desteğini esirgemeyen tez danıŐman hocam Prof. Dr. Varol Şahintürk'e, deney çalıŐmalarını birlikte yürüttüğümüz ArŐ. Gör. Dr. Sedat Kaçar'a, asistanlık süresince desteklerinden dolayı Doç.Dr. Dilek Burukoęlu Dönmez'e, Doç.Dr. Erhan Őahin'e, ArŐ. Gör. Dr. Eda Denizci'ye tekniker Huri ınar'a ve personel Fatma Yaz'a, tezimi proje olarak destekleyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonuna teşekkür ederim.

ÖZET

Karakaya Ş. Oleuropein'in Neuroblastoma Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Morfolojik Etkilerinin İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir 2020. Nöroblastom sempatik sinir sisteminden kaynaklanan bebeklik çağında en sık görülen solid tümördür. Gelişimini ve farklılaşmasını tamamlamamış nöral krest prekürsör hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Oleuropein antioksidan, antiinflamatuvar, antitümöral, antidiyabetik, antiaterojenik, antihipertansif, hipolipidemik bir maddedir. Ayrıca hepatoprotektif, neuroprotektif ve kardiyoprotektif etkisi de vardır. Yapılan deneylerimizde nöroblastoma hücrelerinde Oleuropein'in nöroblastom hücreleri üzerindeki etkilerini inceledik. Hücre kültürü çalışmamızda SHSY-5Y hücre hattını kullandık. DMEM high glukoz ve F12 besiyerlerinin karışımı içine %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin eklenerek elde edilen besiyerinde bu hücreler çoğaltıldı. Oleuropeinin 206 mM stok solüsyonu hazırlandı. Oleuropein'in bu hücreler üzerine etkisini sitotoksisite testleri (MTT, Nötral red, Sulforhadamine B), ışık mikroskop incelemeleri (Hematoksilen-Eozin boyama, immünohistokimyasal boyama), inverted mikroskop incelemeleri, yara iyileşmesi testi ve western blot analizleri ile araştırdık. Yaptığımız deneylerde Oleuropein'in artan dozlarında hücre canlılığının azaldığı, çekirdek ve sitoplazma morfolojisinin bozulduğu, apoptotik yollarda görev alan proteinlerin ifadesinin arttığı ve anti-apoptotik olanın ise azaldığı tespit edildi. Sonuç olarak, Oleuropein'in nöroblastom hücreleri üzerindeki etkileri nedeniyle nöroblastom tedavisi açısından incelenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Oleuropein, Nöroblastom, SHSY-5Y, Hücre Kültürü

Destekleyen Kurumlar: ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından B tipi proje olarak 2019-2457 kodu verilerek desteklenmiştir.

ABSTRACT

Karakaya Ş. Investigation of the Cytotoxic and Morphological Effects of Oleuropein on Neuroblastoma Cells, Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Histology and Embryology Department. Medical Specialty Thesis, Eskişehir 2020. Neuroblastoma is the most common solid tumor originating from the sympathetic nervous system. It is thought to be caused by neural crest precursor cells that have not completed development and differentiation. Oleuropein is an antioxidant, anti-inflammatory, antitumoral, antidiabetic, antiatherogenic, antihypertensive, hypolipidemic substance. It also has hepatoprotective, neuroprotective and cardioprotective effects. In our experiments, we examined the effects of Oleuropein on neuroblastoma cells. We used SHSY-5Y cell line in our cell culture study. These cells were grown in the medium obtained by adding 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin into a mixture of DMEM high glucose and F12 media. 206 mM stock solution of Oleuropein was prepared. We investigated the effect of oleuropein on these cells with cytotoxicity tests (MTT, Neutral red, Sulforhadamine B), light microscope examinations (Hematoxylin & Eosin staining, immunohistochemical staining), inverted microscope examinations, wound healing test and western blot analysis. In our experiments, it was determined that the cell viability decreased in the increasing doses of Oleuropein, the nucleus and cytoplasm morphology deteriorated, the expression of the proteins involved in the apoptotic pathways increased and the anti-apoptotic one decreased In conclusion, we think that Oleuropein should be examined in terms of neuroblastoma treatment due to its effectsonneuroblastomacells..

Key Words: Oleuropein, Neuroblastoma, SHSY-5Y, Cell Culture

Supporting Institutions: This study was supported by ESOGU Scientific Research Projects Commission by giving the 2019-2457 code as a type B project.

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sinir Sistemi Gelişimi	4
2.1.1.Myelensefalon	4
2.1.2.Metensefalon	5
2.1.3.Mezensefalon	5
2.1.4.Diensefalon	5
2.1.5.Telensefalon	5
2.1.6.Medulla Spinalisin Gelişimi	6
2.1.7.Nöral Krest	6
2.1.8.Otonom Sinir Sistemi	6
2.2.Sinir Doku Histolojisi	7
2.2.1.Nöron	7
2.2.2.Nöroglia Hücreleri	8
2.2.3.Merkezi Sinir Sistemi	9
2.2.4.Periferik Sinir Sistemi	10
2.2.5.Otonom Sinir Sistemi	10
2.3.Sinir Doku Kaynaklı Kanserler	11
2.3.1.Gliomlar	11
2.3.2.Nöronal Tümörler	11
2.3.3.Az Differansiye Neoplazmlar	11
2.3.4.Diğer Parankim Tümörleri	12
2.3.5.Metastatik Tümörler	12
2.4.Embriyonik Kökenli Tümörler (Nöroblastomlar)	12

2.4.1.Genetik Sebepler	12
2.4.2.Hastalığın Evrelemesi	13
2.4.3.Nöroblastom Tedavisi	14
2.4.4.Yüksek Nüks Riskli Nöroblastom	14
2.5.SH-SY5Y Hücre Hattı	15
2.6.Oleuropein	16
2.6.1.Oleuropein'in Tanım ve Tarihçesi	16
2.6.2.Oleuropein'in Fiziksel Özellikleri ve Kimyasal Yapısı	16
2.6.3.Oleuropein'in Farmakolojik Etkileri	17
2.6.4.Toksisite	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1.Hücre Hattı ve Kullanılan Besiyeri	24
3.2.Hücrelerin Büyütülmesi ve Deneylere Hazırlanması	24
3.3.Thoma Lamında Hücre Sayımı ve 96 Kuyucuklu Plakalarda Deney Kurulması	25
3.4.Oleuropeinin Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Deneylerde Kullanılacak Dozun Belirlenmesi	25
3.5.Sitotoksisite Testleri ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	25
3.5.1 MTT Testi	25
3.5.2.Nötral Kırmızısı Yöntemi	26
3.5.3.Sulforhodamine B (SRB) Yöntemi	26
3.6.Mikroskopik İnceleme Yöntemleri	27
3.6.1.İnverted Mikroskop İncelemesi	27
3.6.2.Işık Mikroskop İncelemesi (Hematoksilen-Eozin)	27
3.6.3.Konfokal Mikroskop İncelemesi	28
3.7.TUNEL Yöntemiyle Apoptoz İncelemesi	28
3.8.İmmünohistokimya	28
3.9.Western Blot Analizi	29
3.10. Akış Sitometresi Analizi	30
3.11.Migrasyon (Yara İyileşme) Testi	30
3.12. İstatistiksel Analiz	31
4.BULGULAR	32
4.1.Sitotoksisite Sonuçları	32
4.1.1. MTT Sonuçları	32
4.1.2. Nötral Kırmızısı Sonuçları	32

4.1.3. Sulforhadamine B (SRB) yöntemi	33
4.2.İnverted Mikroskop Sonuçları	34
4.3.Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları	36
4.4.Konfokal Mikroskopi Sonuçları	38
4.5.TUNEL Sonuçları	39
4.6.İmmüsitokimya Sonuçları	39
4.7.Western Blot Sonuçları	46
4.8.Akış Sitometresi Sonuçları	47
4.9.Migrasyon Deneyi Sonuçları	47
5.TARTIŞMA	51
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	AlaninaminoTransferaz
AST	Aspartat Transaminaz
BHT	butile edilmiş hidroksitolüen
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BUN	Blood Urea Nitrojen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrihidrazil
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
ERK1/2	Extracellular Regulated Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
GER	Granüler Endoplazmik Retikulum
GİS	Gastro İntestinal Sistem
IC50	The half maximal inhibitory concentration
INGR	Uluslararası Nöroblastom Risk grup sınıflandırılması
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5- Difeniltetrazolium Bromid
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa β
OSS	Otonom Sinir Sistemi
PBS	Phosphate Buffered Saline
PSS	Periferik Sinir Sistemi
ROS	Reaktif O ₂ Substance
SK-N-SH	SK Human Caucasian Neuroblastoma
SOD	Süperoksit Dismutaz
SRB	Sulforhodamine B
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA	Trikloroasetik asit
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling

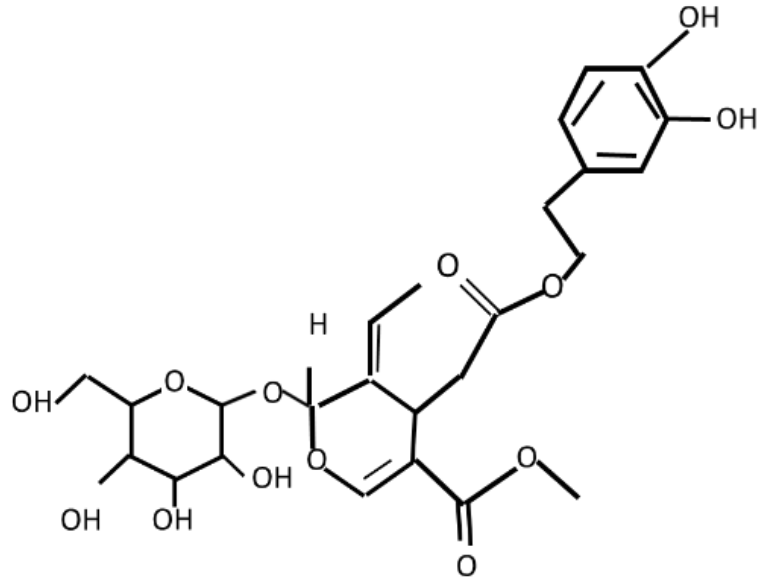
ŞEKİLLER	Sayfa
1.1 : Oleuropein'in kimyasal yapısı.	1
2.1: Nöron yapısı	8
4.1: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin MTT sonuçları	31
4.2: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin nötral red sonuçları	32
4.3: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin sulforhodamine B sonuçları	33
4.4: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin inverted mikroskop sonuçları	34
4.5: SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilin-eozin boyama sonuçları	35
4.6: 250µM Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilin-eozin boyama sonuçları	35
4.7: 300 µM Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilin eozin boyama sonuçları.	36
4.8: 350µM Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilin eozin boyama sonuçları.	36
4.9: 400µM Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilin eozin boyama sonuçları.	37
4.10: Konfokal mikroskopi sonuçları.	37
4.11: TUNEL boyama sonuçları	38
4.12: APAF proteinin immünohistokimya resimleri	39
4.13: Bad proteinin immünohistokimya resimleri.	40
4.14: Bax proteinin immünohistokimya resimleri	41
4.15: Bcl-2 proteinin immünohistokimya resimleri	41
4.16: Kaspaz 3 proteinin immünohistokimya resimleri	42
4.17: Kaspaz 7 proteinin immünohistokimya resimleri	42

4.18: Kaspaz 9 proteinin immünhistokimya resimleri	43
4.19: P53 proteinin immünhistokimya resimleri	44
4.20: Western blot sonuçları	45
4.21: Akış Sitometresi Sonuçları	46
4.22: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi sonuçları-Kontrol	47
4.23: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi-250 μ M Oleuropein	47
4.24: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi-300 μ M Oleuropein	48
4.25: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi-350 μ M Oleuropein	48
4.26: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi-400 μ M Oleuropein	49

TABLolar	Sayfa
2.1: Sekonder veziküllerden gelişen yapılar	4
4.1: Çeşitli dozlarda Oleuropein verilen SHSY-5Y hücrelerinde yara iyileşme testi sonuçları	49

1. GİRİŞ

Zeytin ve ürünleri yüzyıllardır sağlıklı yaşam için kullanılmıştır. Mısırdaki mumyalama amacıyla da kullanılmıştır. Ateş düşürücü olarak halk arasında yaygın olarak tercih edilmiştir. 1800'li yıllarda İngiltere, kolonilerinde yaygın olan malarya gibi tropikal hastalıkların tedavisinde kullanmıştır (1). Akdeniz diyetinin temel yağı olan saf zeytinyağı koroner kalp hastalıklarının bu bölgede düşük insidansı ile ilişkilendirilmiştir (2). Oleuropein zeytin ve bazı zeytingillerden elde edilen sekoiriodid türevi bir bileşiktir (3). Oleuropein'in kimyasal yapısı $C_{25}H_{32}O_{13}$ şeklindedir. Oleuropein üç alt ünitelerden oluşur: bir polifenol (4-2-hidroksietil benzen-1,2-diol-hidroksitrosol), elenolik asit ve glukoz molekülü (4). Oleuropein'in kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir.



Şekil 1.1: Oleuropein'in kimyasal yapısı.

Oleuropein antioksidan (5), antiinflamatuvar (6), antitümöral (7), antidiyabetik (8), antiaterojenik (9), antihipertansif (10), hipolipidemik (11) bir maddedir. Ayrıca hepatoprotektif (12), nöroprotektif (13) ve kardiyoprotektif (4) etkileri de vardır. Oleuropein'in antitümöral etkisi hücre büyümesini, hareketini ve invazyonunu inhibe etmesinden kaynaklanır (7). Oleuropein'in antitümöral ve kemoprotektif etkileri hücre siklusu durması, apoptozun uyarılması, antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler, anjiyogenezin baskılanması ve tümör süpresör genlerin aktivasyonu yoluyla

gerçekleşir (14). Oleuropein ve Oleuropeinden zengin özlerin gıda ve ilaç olarak kullanımını çok yaygın olsa da güvenilirlik ve toksisite verileri çok sınırlıdır. Eski çalışmalarda yüksek dozlarda bile toksik etkisi gözlenmemiştir (15). Buna rağmen 14 hafta boyunca yüksek doz zeytin yaprağı kullanımı karaciğer lezyonuna, kolestaza ve safra kanalı hiperplazisine sebep olmuştur (16).

Sinir sistemi merkezi ve periferik olmak üzere iki bölümde incelenir. Merkezi sinir sistemi beyin ve omurilikden oluşur. Periferik sinir sistemi afferent, efferent, kranial, spinal ve periferik sinirlerden, ganglionlardan ve özelleşmiş motor ve duysal sinir sonlanmalarından oluşur (17, 18).

Nöral krest hücreleri nöral oluşun iki yanında nöral plağın katlanması esnasında ortaya çıkar. Spinal sinirlerin duyu ganglionlarını (dorsal kök nöronları), sempatik nöroblastları, odontoblastları, Schwann hücrelerini, meninksleri ve pigment hücrelerini meydana getirirler (19).

Nöroblastom santral sinir sistemi tümörleri içinde embriyolojik kökenli tümörlerdir. Nöroblastom; sempatik sinir sisteminden kaynaklanan, bebeklik çağında en sık görülen, solid ve çocukluk çağının ikinci sık ekstra kranial tümürüdür (20). Nöral krest prekürsör hücrelerinin gelişimini ve farklılaşmasını tamamlamamasından kaynaklanır. Hastalığın seyri, belirti vermeyen kitleden ciddi klinik tablo arasında değişkenlik gösterir (21). İnsanda en çok spontan ve tam iyileşme gösteren kanser olmasına rağmen çocukluk çağlarında en çok ölüme neden olan kanserdir (22).

SH-SY5Y hücreleri SK Human Caucasian Nneuroblastoma (SK-N-SH) ana hattının alt grubudur (23). Primer insan nöronundaki etik sorunlar yoktur.

Çalışmamızda bu hücre hattı üzerine Oleuropein'in sitotoksik, morfolojik, antiproliferatif ve apoptotik etkilerini detaylı bir şekilde analiz etmeyi amaçladık. İlk başta sitotoksikite testleri olan MTT (3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium Bromid) SRB (Sulforhodamine B) ve nötral kırmızı ile Oleuropeinin etkili dozu IC50 (The half maximal inhibitory concentration) bulundu. Sonrasında Oleuropeinin etkisi inverted, ışık ve konfokal mikroskopuyla morfolojik olarak incelendi, apoptotik etkisine Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labelin (TUNEL), immunositokimya, western blot ve akış

sitometrisi yöntemleriyle bakıldı. En son antiproliferatif etkisini daha detaylı incelemek için yara iyileşme testi yapıldı. Zeytinde en fazla bulunan fenolik bileşik olan Oleuropein'in etkilerinin detaylı olarak nöroblastoma hücrelerinde incelenmesi Oleuropein'in ilerde tedavide kullanılma potansiyelinin açığa çıkması için önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinir Sistemi Gelişimi

Santral sinir sistemi, gelişimin 3.haftasının başında embriyonun orta dorsal bölgesinde bulunan nöral plaktan gelişir. Nöral katlantılar ise nöral plağın lateral kenarlarının katlanmasıyla oluşur. Nöral katlantılar birbirine yapışır ve nöral oluk oluşur. Bu oluk yaklaşık olarak 28. günde kapanır. Nöral tüpün sefalik ucunda prosensefalon, mezensefalon ve rombosefalon denilen primer beyin vezikülleri bulunur. Servikal fleksür ve sefalik fleksür de sefalik uçtaadır. Beşinci haftada prosensefalondan telensefalon ve diensefalon; mezensefalondan mezensefalon; rombosefalondan metensefalon ve myelensefalon gelişir.

Tablo 2.1: Sekonder beyin veziküllerinden gelişen yapılar.

Telensefalon	Beyin hemisferleri
Diensefalon	Optik veziküller, talamus, hipotalamus, hipofiz
Mezensefalon	Anterior ve posterior kollikuli (koku ve işitme)
Metensefalon	Serebellum, pons
Myelensefalon	Medulla oblangata

2.1.1. Myelensefalon

Kaudal bölümü (medulla oblangatanın kapalı kısmı) yapı ve gelişim bakımından medulla spinalise benzer. Nöral kanaldan küçük santral kanalı oluşur. Medulla spinalisten farklı olarak alar plak kökenli nöroblastlar marginal tabakaya göç ederek nukleus cuneatus (lateral) ve nucleus gracilisi (medial) oluşturur. Ventral kısımda piramis denilen sinir lifleri bulunur. Myelensefalonun rostral kısmının (medulla oblangatanın açık kısmı) boşluğu 4.ventrikülü oluşturur. Medulla oblangatanın bazal plak kaynaklı nöroblastları motor nöronlara farklılaşır. Alar plak kaynaklılar ise 4 grup duyu nükleusu ve nuclei olivaresi oluşturur (19, 24).

2.1.2. Metensefalon

Metensefalonun duvarından serebellum ve pons, ortasındaki boşluktan 4. ventrikülün üst kısmı oluşur. Bazal plaklardaki nöroblastlardan motor çekirdekler meydana gelir. Alar plakların dorsal bölümünün kalınlaşması sonucu serebellum oluşur. Marjinal tabakaya göç eden bazı alar plak nöroblastları serebellum korteks nöronlarını oluşturur. Alar plağın diğer nöroblastları en büyüğü nucleus dentatus olan merkezi çekirdekleri; pontin, kohlear vestibuler nükleusları ve trigeminal sinirin duysal çekirdeklerini oluşturur. Serebrum ve serebellum kortekslerini medulla spinalise bağlayan sinir lifleri metensefalonun ventral kısmının marginal tabakasındadır. Bu kısımdan pons (köprü) gelişir (19, 24).

2.1.3. Mezensefalon

Arka beynin kaudal kısmından sonra en az değişime uğrayan beyin bölgesidir. Nöral kanal daralarak aqueductus cerebri'yi oluşturur. Bu yapı 3. ve 4. ventrikülleri birbirine bağlar. Alar plak kaynaklı nöroblastlar tectuma göç eder ve kollikulus superior ve inferioru oluşturur. Bazal plak kökenli nöroblastlar tegmentuma göç ederek nuclei ruber, nuclei reticularis ve 3-4. kafa çiftlerine ait çekirdekleri oluşturur. Substantia nigranın bazal plak kökenli hücrelerden oluştuğu kabul edilmesine rağmen karşıt görüşler de vardır (19, 24).

2.1.4. Diensefalon

Epitalamus, talamus ve hipotalamus 3. ventrikül lateral duvarından gelişir. Epifiz bezi diensefalon tavanının kaudal bölümünden gelişir. Hipofiz bezi ektodermal kaynaklıdır. Stomadeumun ektodermal tavanından yukarı doğru büyür ve hipofizyal divertikülü oluşturur. Diensefalon nöroektoderminden aşağıya doğru büyüyerek nörohipofizyal divertikülü oluşturur (19, 24).

2.1.5. Telensefalon

Serebral vezikül olarak adlandırılan iki lateral ventrikül ve bir median bölümden oluşur. Serebral veziküller serebral hemisferleri, median bölüm ise 3. ventrikül ön kısmı oluşturur. 6. haftada hemisferlerin tabanında şişkinlik (corpus striatum) oluşur. Serebral korteks gelişirken bu yapıdan geçen lifler tarafından kaudat çekirdek ve lentiform çekirdek olarak ikiye ayrılır. Hemisferleri birbirine bağlayan

sinir demetlerinden (kommissür) ilk oluşanı olfaktör bulbusları bağlayan anterior kommissürdür. İkinci olarak hipokampal yapıları bağlayan hipokampal kommissür gelişir. Korpus kallosum ise beynin olfaktör alanları dışındaki kısımlarını bağlayan en önemli kommissürdür (19, 24).

2.1.6. Medulla Spinalisin Gelişimi

Nöroepitelyal hücreler kapanan nöral tüpün duvarındaki hücrelerdir ve nöroepitelyal tabakayı oluştururlar. Bu hücreler daha sonra primitif sinir hücresi nöroblastlara farklılaşır. Bu hücreler intermediyat (mantle) tabakasını oluşturur. Nöroblastlar uzantıları oluşunca nörona farklılanır. Nöroblastların nöroepitelyal tabakanın etrafında oluşturduğu mantle tabakasından daha sonra medulla spinalisin gri cevheri oluşacaktır. Mantle tabakasından çıkan lifler beyaz cevhere farklılanarak marjinal tabakayı oluşturur. Mantle tabakasındaki nöroblastlar çoğalarak dorsal ve ventral kalınlaşmalar oluşturur. Dorsal katlantı (alar plak) medulla spinalisin duyu, ventral katlantı (bazal plak) ise motor bölgesini oluşturur. İkisi arasında daha sonra otonom sempatik ganglionların (T1-T12, L2-L3) gelişeceği intermediyat boynuz vardır (19, 24).

İlkel destek hücreleri olan glioblastomalar nöroblastom oluşumu bittikten sonra nöroepitelyal hücreler tarafından üretilirler. Nöroepitelyal hücreler bu görevlerini tamamladıktan sonra ependim hücrelerine farklılaşır. Retinoik asit medulla spinalis gelişiminde temel moleküldür (19, 24).

2.1.7. Nöral Krest

Nöral krest hücreleri nöral oluşun iki yanında nöral plağın katlanması esnasında ortaya çıkar. Ektodermden köken alan bu hücreler laterale göç ederek spinal sinirlerin duyu ganglionlarını (dorsal kök nöronları) oluşturur. Nöral krest hücrelerinden ayrıca sempatik nöroblastlar, odontoblastlar, Schwann hücreleri, meninksler ve pigment hücreleri de meydana gelir (19, 24).

2.1.8. Otonom Sinir Sistemi

Otonom sinir sisteminin nörotransmitter olarak asetilkolini kullanan parasempatik ve noradrenalini kullanan sempatik sistem olarak iki bölümü vardır. Otonom sinir sistemi, gövdesi santral sinir sistemindeki gri cevherde bulunan

preganglionik ve otonom ganglionlarda bulunan postganglionik iki nörondan oluşur. Sempatik sistemin preganglionik hücre gövdesi medulla spinalisin T1-L2 düzeyinde postganglionik kısmı ise paravertabral ve periarortik ganglionlarda yer alır. Bu yapılar gelişimin 5. haftasında nöral krestten torakal bölüme göç eden hücrelerden köken alır.

Parasempatik sistemdeki preganglionik nöronlar beyin sapı (3-7-9-10. sinirler) ve medulla spinalisin S2-S4 seviyesindedir. Postganglionik lifler sempatik sistemdeki gibi nöral krest hücrelerinden köken alır (19, 24).

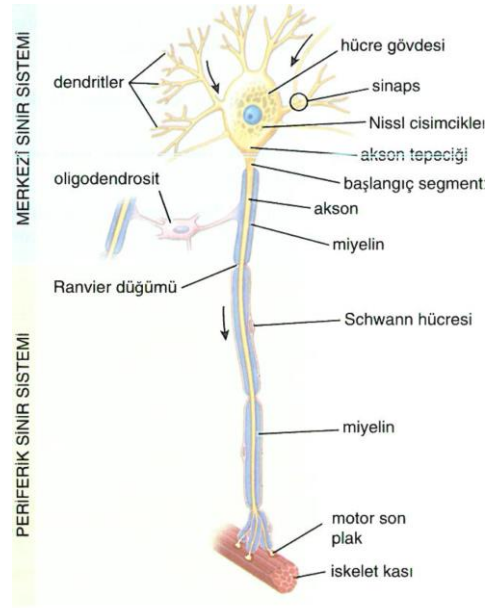
2.2. Sinir Doku Histolojisi

Sinir sistemi iç ve dış uyaranlara cevap vermemizi sağlar; organ ve sistemlerin aktivitelerini kontrol ve entegre eder. Sinir sistemi Merkezi ve Periferik olmak üzere iki bölümde incelenir. Merkezi sinir sistemi (MSS) beyin ve omurilikten oluşur. Periferik sinir sistemi (PSS) afferent ,efferent, kranial, spinal ve periferik sinirlerden, ganglionlardan ve özelleşmiş motor ve duyuşal sinir sonlanmalarından oluşur. Sinir dokusu temel olarak 2 tip hücreden oluşur. Başka hücrelerden uyarı alıp uzantıları aracılığı ile bunları iletmek için özelleşmiş nöron hücreleri ve iletim fonksiyonu olmayan destek (nöroglia) hücreleri. Destek hücreleri oligodendrositler, astrositler, mikroglialar, ependim, satellit ve Schwann hücrelerinden oluşur. Destek hücrelerinin nöron hücrelerine fiziksel destek, sinir impuls hızını artırma, nöronal hasarın onarılması, sinaptik aralıklardan nörotransmitterleri uzaklaştırma ve MSS iç sıvı ortamını düzenleme gibi görevleri vardır (17, 18).

2.2.1. Nöron

Sinir sisteminin ana hücresi olan nöronların sayısı insan vücudunda yaklaşık 10 milyardır. Duyuşal, motor ve ara nöron olmak üzere üç grupta incelenirler. Nöron hücre gövdesi, akson, dendritler ve sinaptik bağlantılardan oluşur. Nöronlar hücre gövdesindeki uzantı sayısına göre sınıflandırılır. Mültipolar nöronlar bir akson ve iki ya da daha fazla dendritten oluşur. Hücrenin iletili kısmı aksondur. Sinir sistemindeki mültipolar nöronların büyük kısmı motor ve ara nöronlardır. Bipolar nöronlar bir akson ve bir dendritten oluşur. Örneğin, gözde retinada ve 8.sinir ganglionunda bulunur. Psödounipolar nöron iki uzun dala ayrılan tek aksona sahiptir.

Büyük çoğunluğu MSS ye yakın duyuşal nöronlardır. Nöron hücreleri belirgin çekirdekçik, büyük ökratik çekirdek, bol miktarda granüler endoplazmik retikulum (GER) ve serbest ribozom içerir. Sinir hücresindeki GER kümesine Nissl cisimciğı adı verilir. Hücrenin aksonal tarafında büyük organel bulunmaz. Bu özellik akson dendrit ayırımında kullanılır.



Şekil 2.1: Nöron yapısı (18).

Nöronlar bölünmezler fakat bazı nöronal kök hücreler farklılaşarak hasarlı bölgede nöronun yerini alır. Dendritler diğer nöronlardan ya da dış ortamdan uyarıları alır, aksonlar ise diğer nöronlara ve efektör hücelere uyarı iletir. Nöronlar diğer nöronlarla ve efektör hücelerele sinapslarla iletişim kurarlar. Sinapslar aksodendrik, aksosomatik ve aksoaksonik olarak 3 çeşittir. Sinapslar elektriksel ve kimyasal olarak da sınıflandırılabilir (17, 18).

2.2.2. Nöroglia Hücreleri

Periferik ve merkezi olmak üzere iki grup nöroglia hücresi vardır. Periferik nöroglialar Schwann hücreleri, satellit hücreler, terminal nöroglia, enterik nöroglia ve Müller hücreleridir.

Schwann hücreleri: PSS de miyelin kılıf üretiminden sorumludur. Nöral kristadan gelişirler. İki komşu Schwann hücresi arasındaki kavşak Ranvier boğumu olarak adlandırılır. Burada miyelin kılıf bulunmaz.

Satellit hücreler: Ganglionlarda nöron gövdelerini çeviren kübik hücrelerdir. Schwann hücreleri gibi nöronlar için gerekli ortamı sağlamakla görevli olsa da miyelin kılıf üretmezler.

Enterik nöroglialar: Otonom Sinir Sistemi (O.S.S) nin enterik bölümündeki nöronlardır. Görev ve yapı olarak astrositlere benzer. Enterik sinir iletimi ve immün sistem koordinasyonunda da rol oynarlar.

Müller hücreleri: Retinadaki hücrelerdir.

Merkezi nöroglialar: Astrositler, oligodendrositler, mikroglia ve ependim hücrelerinden oluşur.

Astrositler; nörogliaların en büyüğü olan bu hücreler nöronlara destek olur ve fonksiyonlarını düzenler. Protoplazmik ve fibröz olarak iki tiptir.

Oligodendrositler; MSS de miyelin kılıf üretirler. Miyelin kılıf MSS de P.S.S.'den farklıdır. Ranvier düğümleri daha geniştir ve sıçrayıcı iletim daha etkindir.

Mikroglialar; Mononükleer fagositik sistemin bir üyesidir ve nörogliaların en küçüğüdür. Mikroorganizmalara ve neoplastik hücrelerin yok edilmesinde kritik önemi vardır.

Ependimal hücreler; MSS'nin sıvı dolu boşluklarını döşerler. Yüzeyindeki mikrovilluslar B.O.S.(Beyin Omurilik Sıvısı) emiliminde görevlidir (17, 18).

2.2.3. Merkezi Sinir Sistemi

MSS beyin, beyincik ve medulla spinalisten oluşur. Bu yapılar beyin zarı denilen 3 kat zarla (durameter, araknoid ve piamater) kaplıdır ve ak ve gri madde olmak üzere iki kısımdan oluşurlar. Ak madde miyelinli aksonlar, oligodendrositler, astrositler ve mikroglialardan; gri madde ise nöron gövdeleri, dendritler, aksonların miyelinsiz kısımları, astrosit ve mikroglialardan oluşur (17, 18).

Beyin korteksi 6 tabakadan oluşur.

- Moleküler tabaka
- Dış granuler tabaka
- Dış piramidal tabaka
- İç granüler tabaka
- İç piramidal tabaka
- Polimorf tabaka

Beyincik korteksi ise 3 tabakalı bir yapıdır.

- Moleküler tabaka
- Ganglionik tabaka
- Granüler tabaka

Omurilikte farklı olarak gri madde iç kısımda ak madde dış kısımdadır. Medulla spinalis ön boynuzunda motor nöronlar, arka boynuzda ise duysal nöronlar bulunur. Orta kısmında nöral tüp lümeninden gelişen ve ependim hücreleriyle döşeli santral kanal bulunur. Burada BOS bulunur ve beyin ventrikülleriyle devam eder (17, 18).

2.2.4. Periferik Sinir Sistemi

Ganglionlardan ve periferik sinirlerden oluşur. Periferik sinir bağ dokusuyla korunan sinir lifleridir (miyelinli, miyelinsiz akson ve Schwann hücresi). Tek sinir lifini çevreleyen bağ dokusu endonörium, sinir fasikülünü çevreleyen perinörium, periferik siniri çevreleyen ise epinörium olarak adlandırılır. Bu sinirlerin gövdeleri ya ganglionlarda ya da MSS de bulunur. Ganglionlarda ise nöron hücre gövdeleri ve afferent ve efferent uzantılar vardır. Motor nöronların hücre gövdeleri MSS de duysal nöronları ganglionlardadır (17, 18).

2.2.5. Otonom Sinir Sistemi

Temel olarak parasempatik, sempatik ve enterik sinir sistemi olarak ayrılır. Parasempatik sistemin presinaptik nöronları omuriliğin T1-L2 bölümünde sempatik sisteminkiler ise beyin sapı ve omuriliğin S2-4 segmentindedir. Enterik sinir sistemi

ise sindirim sistemini innerve eden sinirlerden ve bu sinirlerin kaynaklandığı ganglionlardan meydana gelir ve bağırsakların beyni olarak nitelenebilir (17, 18).

2.3. Sinir Doku Kaynaklı Kanserler

Bu tümörlerin benign-malign ayırımı zordur. Düşük derecedeki tümörler bile geniş alanları invaze eder ve kötü prognozludur. Tümör bulunduğu anatomik bölgede bası etkisiyle ölümcül sonuçlara neden olur. En malign tipleri bile MSS dışına nadiren metastaz yapar. İnsidansı yüz binde 11-19 dur. Çocukluk çağı tümörleri arasında önemli yer tutar (25).

2.3.1. Gliomlar

Beyin parankiminden kaynaklanırlar. Astrositom, oligodendriogliom ve ependimom alt tipleridir.

Astrositom: Fibriler ve pileositik astrositom en sık görülen alt tipleridir. Fibriler astrositom erişkin primer MSS tümörlerinin %80'ni oluşturur. 40-60 yaş arası görülür. Diffrensiyasyonuna göre astrositom, anaplastik astrositom ve glioblastoma multiforme

Oligodendrogliom: Gliomların %5-15'ini oluşturur. 40-60 yaşta görülürler. Yıllar süren nöbet ve nörolojik şikâyetler görülür. Prognoz astrositomlara göre daha iyidir.

Ependimom: Ependimomlar medulla spinalisin santral kanalını da içeren ependimle döşeli ventriküler sistemden kaynaklanırlar. 10-30 yaşta sık görülürler (25).

2.3.2. Nöronal Tümörler

Santral nörositom düşük evreli nöronal bir tümördür. Gangliogliomlar glial elemanların ve matür nöronların karışımıdır. Nöbet sık görülür.

Disembriyoplastik nöroepitelial tümörler çocukluk çağında görülen düşük evreli tümörlerdir. İyi prognozludur (25).

2.3.3. Az Differansiye Neoplazmlar

Nöroektodermal kökenli olsa da fenotipik markerların çok azını taşırlar. En sık görüleni medulloblastom çocukluk çağı tümörüdür ve serebellumda yerleşir, maligndir. Prognoz tedavisiz vakalarda çok kötüdür. Radyosensitifdir (25).

2.3.4. Diğer Parankim Tümörleri

Primer MSS lenfoması immün sistemi baskılanmış hastalarda Epstein-Barr-virus (EBV) enfeksiyonlarına bağlı olarak görülür. Prognoz kötüdür. Germ hücreli tümörler pineal ve suprasellar alanlarda bulunur. 0-20 yaş arasında görülür. Meningeomlar ise erişkinlerde görülür, duraya yapışıktır. Genellikle bası bulgusuyla ortaya çıkarlar (25).

2.3.5. Metastatik Tümörler

Hastanedeki intrakranial tümörlü hastaların % 25-50'sinden sorumludur. En sık akciğer, meme, deri, böbrek ve gastrointestinal sistemden (GİS) kaynaklanır (25).

2.4. Embriyonik Kökenli Tümörler (Nöroblastomlar)

Nöroblastom sempatik sinir sisteminden kaynaklanan bebeklik çağında en sık görülen, solid ve çocukluk çağının ikinci sık ekstrakranial tümörüdür (20). Gelişimini ve farklılaşmasını tamamlamamış nöral krest prekürsör hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tümör adrenal medulla, paraspinal ganglion gibi sempatik doku hücrelerinde ortaya çıktığı için boyun, göğüs ve pelviste kitle oluşturabilir. Klinik belirti göstermeyen bir kitleden lokal invazyon ya da yaygın hastalığın neden olduğu ciddi hastalık tablosu arasında değişkenlik gösterir (21). Çocukluk çağlarında en çok ölüme neden olan kanser olmasına karşın insanda en çok spontan ve tam iyileşme gösteren kanserdir (22). Spontan iyileşme oranı %54 iken (1975-1977) %74'e (1999-2005) yükselmiştir (21). Bu yükselme, yüksek riskli hastalardan daha çok iyi huylu formdaki hastaların iyileşmesindeki artışın sonucudur (26). Histopatolojik olarak teşhis konulduğunda ortalama yaş 17 aydır (27).

2.4.1. Genetik Sebepler

Nöroblastom sempatik sinir sisteminin atipik gelişmesinin ortaya çıkarttığı klinik tablodur. Birçok kanser türünde olduğu gibi nöroblastomun bazı alt tipleri otozomal dominant geçiş gösterir (28). Kalıtsal nöroblastom vakalarının çoğunda anaplastik lenfoma kinaz (ALK)'nın tirozin kinaz alanındaki mutasyonu aktive olmuştur (29). Bu germ çizgisi mutasyonları kinazda tek bazlı anahtar bölgesini kodlayarak inhibe eder. Onkogen aktive eden bu mutasyonlar %5-15 somatik olarak ortaya çıkar (30). Kalıtsal ya da sporadik nöroblastom PHOX2B genin fonksiyonunu

engelleyen mutasyonu nedeniyle ise genellikle konjenital santral hipoventilasyon sendromu, Hirschsprung hastalığı ya da ikisi birden eşlik eder (31). Yapılan gen çalışmasında nöroblastom hastalarında kontrollerden farklı olarak FLJ22536 (6p22.3) ve BARD1 (2q35) genlerinde tek nükleotid polimorfizmi varyasyonları görülür (32, 33). Ayrıca 1q21 kopya numara varyasyonlarında da nöroblastom görülür (34). Hasta yaşı, tümör evresi gibi kolay ölçülebilen klinik verilerle özel biyolojik değişkenler birleştirilerek hastalık değerlendirilir. Tanı yaşının küçük olması iyi klinik seyir için bir kriterdir. Yaş prognoz açısından sürekli değişken olmasına rağmen 12 veya 18 ay klinik için eşik değer olarak kullanılabilir (27).

2.4.2. Hastalığın Evrelemesi

Hastalığın yaşa ve evreye göre hazırlanmış spektrumunun uç kısımlarındaki risk sınıflamasında ihtilaf yoktur. Dördüncü evrede hastalığı olan (metastaz yapmış) büyük çocuklarda ölüm riski yüksektir. Buna karşın lokalize tümörlü bebeklerde çoğunlukla tedavisiz iyileşme mevcuttur. Bu grupların arasında kalan hastaların riski hakkında fikir birliğine ulaşmak zordur (21). Bu risk sınıflandırmasını yapmak için 1990 ve 2002 yılları arası kayıtlı 8.800 nöroblastom hastasının verisi toplanmıştır (35). Bu verilerin analizi lokalize tümörleri cerrahi risk varlığına ya da yokluğuna göre iki gruba ayırır (36). Bu verilere dayanarak 18 ay eşik değer olarak belirlenmiştir. 13 prognostik faktöre dayanarak 16 risk grubunun olduğu Uluslararası Nöroblastom Risk Grup Sınıflandırılması (INGR) (37) yapılmıştır. Bu sınıflamada çok düşük risk (5 yıllık sağ kalım >% 85), düşük risk (%75-85), orta risk (%50-75) ve yüksek risk (<%50) olmak üzere 3 ana grup vardır. Tanı yaşı, INRG tümör evresi, histolojik kategori, tümör farklılaşma aşaması, DNA kromozom sayısı, 11q kromozomundaki MYNC onkojenindeki kopya sayısı sınıflamada ana etmenlerdir (21). 1980'lerde MYCN onkogeninin yeni teşhis edilmiş nöroblastom vakalarının %20 sinde fazla ekspresye olduğu görülmüştür. Klinik seyrinde MYCN geninin amplifikasyonunun etkisi olduğu için biyomarker olarak kullanılmıştır (38). Daha sonra histopatolojik sınıflama, kromozom sayısı, tekrarlayan spesifik segmental kromozomal bozukluklar da biyomarker özellikleri açısından araştırılmıştır (39). DNA kopya sayısının prognoz üzerine etkisi 2 ana grupta incelenebilir. Hiperploidiyle sonuçlanan tüm kromozom kazanımlarında olumlu prognoz gözlenirken; kısmi kromozom bozuklukları ve kısmi kazanım ya da kayıplarda kötü

prognoz görülür (40). Kısmi kromozom bozuklukları olmayan tüm kromozom duplikasyonlarında klinik olumlu olsa da kısmi kromozom bozukluklarında fenotip çok çeşitlidir. Yüksek riskli grubu alt bölümlere ayırmak için mutasyonlar, RNA özellikleri, epigenetik değişiklikler kullanılır (21). Bu sınıflamanın amacı en uygun tedaviyi uygulamaktır.

2.4.3. Nöroblastom Tedavisi

Nöroblastomdaki biyolojik çeşitlilik birbirine zıt tedavi stratejilerini ortaya çıkartmıştır. Olumlu özelliklere sahip tümörlerde düşük yoğunluklu tedavi uygulanmaktadır. Olumsuz biyolojik özelliklere sahip tümörlerde ise yoğun kemoradyoterapi verilmektedir. Yüksek riskli nöroblastomda tedavi 3 ayrı aşamada gerçekleştirilmektedir; iyileşmeyi başlatma, iyileşmeyi pekiştirme ve minimal rezidüel hastalığı yok etme (21). Tedavi yoğunluğunun artırılması tedaviye yanıtı ve sağ kalım oranını artırmıştır (41). En çok kullanılan kemoterapotik rejimde sisplatin, etopozid, vinkristin, doksorubusin ve siklofosamid dönüşümlü kullanılmaktadır (42). Nüks ve tedaviye direnç durumunda bu rejime topotekan eklenmektedir (43). Tedavinin başarısını ölçmek ve yönlendirmek için kanser hücreleri ve bu hücrelerden elde edilen nükleik asitler kullanılır. Çoğu yüksek riskli nöroblastom ilk aşamada tedaviye cevap verdiği için, kazanılmış ilaç direnci veya heterojen bir tümörde dirençli klonların çoğalmasının neden olduğu düşünülmüştür. Kemoterapi ışın tedavisi ve otolog kemik iliği tedavisi sağ kalım süresinde diğer solid tümörlerde görülmeyen bir etkiye neden olmaktadır. Kemik iliği yok edici tedaviden sonra isoretionin uygulanması relapsı azaltmaktadır (44). 3F8 fare antikorusunun özellikle kemik iliği metastazında etkili olduğu gösterilmesine rağmen randomize kontrollü bir çalışma yoktur (45). Şimerik GD-2 monoklonal antikoru da antitümoral etki göstermektedir (46).

2.4.4. Yüksek Nüks Riskli Nöroblastom

Son yıllarda tedavide kullanılan yeni yöntemler sağ kalımı ve sağlıklı dönemi uzatsa da yüksek nüks riskli grupta %50-60 oranında nüks vardır ve bunlarda kesin bir tedavi yoktur. Tanıdan sonra kısa süreli yoğun bir tedavi tercih edilse de nüks

durumunda kronik bir hastalık kabul edilip yıllar sürebilen bir tedavi düzenlenebilir (21).

Nöroblastom sempatik sistemden kaynaklanan bir tümör olduğu için bu tümör yüzeyinde norepinefrin taşıyıcı vardır. Bu yüzden yıllarca norepinefrin analogu iyodin-131-metalodobenzilguanidin tanıda kullanılmış, fakat yapılan çalışmalar özellikle nüks vakalarda radyoterapik etkisinin de olduğunu göstermiştir (47).

2.5. SH-SY5Y Hücre Hattı

Embriyonel merkezi sinir sisteminden elde edilen primer memeli nöronlarının kullanılışı, bu hücreler olgun bir nöron hücresi olduğunda çoğalma yeteneğini kaybettiği için, sınırlıdır. Nöron benzeri hücre hatları bu sınırlamanın üstesinden gelmek için kullanılmaktadır. İlk olarak metastatik kemik tümör biyopsisinden elde edilen SH-SY5Y hücreleri SK-N-SH ana hattının alt grubunu oluşturur. Bu hattın 3 alt grubu vardır. SH-SY, SH-SY5, SH-SY5Y. SH-SY5Y L. Biedler tarafından Haziran 1970 de ATCC® de depolanmıştır (23). Bu hücre hattında hem yapışan hem yüzen hücreler olmasına rağmen medyum değişiminde yüzen hücreler atıldığından gözardı edilir. SK-N-SH hücreleri nöroblast hücre benzeri ve epitel hücre benzeri morfoloji gösterir (48). Bu iki fenotip N ve S olarak isimlendirilir (49). Nöron benzeri hücrelerde tirozin hidroksilaz ve dopamin B hidroksilaz gibi katekolaminerjik nöron belirteçleri pozitif iken epitel benzeride negatiftir (48). SH-SY5Y daha olgun bir nöron tipi fenotipe farklılaşabilir. Primer nöron kültürüne göre daha kolay ve ucuzdur. Bu hücreler bir hücre hattı olarak kabul edildiğinden primer insan nöronundaki etik sorunlar yoktur. İnsan kaynaklı olduğundan kemirgen kültürlerinde olmayan insana özgü proteinler üretirler. Ayrıca farklılaşma hücre döngüsüyle senkronize olduğu için homojen bir nöron popülasyonu üretilir (49). Nöronal farklılaşmada plazma membranının uyarılabilirliği artar, sinaptofizin pozitif fonksiyonel sinapslar oluşur ve nörona özgü enzimler nörotransmitterler ve reseptörleri tetiklenir (50, 51). Bazı tetikleyici ajanlarla uzun ve hassas bir süreçle SH-SY5Y hücreleri primer nörona daha çok benzer (52). Olgunlaşan hücreler çoğalma yeteneğini kaybettiğinden kültür proliferasyonu azalır, nöron spesifik enolaz aktivitesi artar (49, 52). Kültür şartlarına göre kolinerjik, adrenerjik ve dopaminerjik

fenotipe sahip olabilirler (53). SHSY hücrelerinin farklılaşmasında en çok kullanılan madde güçlü bir büyüme engelleyici ve hücre farklılaştırıcı olan A vitamini türevi retinoik asittir (54). Retinoik aside cevap olarak kolinerjik nörona dönüşür. Fakat noradrenalin salınımını da artırır (49). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13 acetate uygulanması ise adrenerjik fenotipe farklılaştırır (55).

2.6. Oleuropein

2.6.1. Oleuropein'in Tanım ve Tarihçesi

Zeytin ve ürünleri yüzyıllardır sağlıklı yaşam için ve muhafaza amaçlı kullanılmıştır. Mısırdaki mumyalama amaçlı da kullanılmıştır. Daha sonra ateş düşürücü olarak halk arasında yaygın olarak tercih edilmiştir. 1800'lü yıllarda İngiltere, kolonilerinde yaygın olan malarya gibi tropikal hastalıkların tedavisinde kullanmıştır (1). Akdeniz diyetinin temel yağı olan saf zeytinyağı koroner kalp hastalıklarının bu bölgedeki düşük insidansı ile ilişkilendirilmiştir (2). Bu biyolojik etkilerinin fenolik bileşiklerine bağlı olduğu bulunmuştur (56). Bu fenolik bileşikler fenolik alkoller, sekoiridoid türevler, fenolik asitler, lignanlar ve flavonoidlerdir (57). Yapılan son çalışmalara göre kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkisinin temel olarak bir sekoiridoid olan Oleuropein'e bağlıdır (4). Oleuropein işlenmemiş zeytinin karakteristik acı tadından da sorumludur (58). Zeytinin olgunlaşması ya da yağ üretimi gibi işlenmesi sırasında Oleuropein konsantrasyonunu azaltan ve Oleuropein'in ana yıkım ürünü olan hidroksitirozol konsantrasyonunu artıran kimyasal reaksiyonlar meydana gelir.

2.6.2. Oleuropein'in Fiziksel Özellikleri ve Kimyasal Yapısı

Oleuropein'in kimyasal yapısı $C_{25}H_{32}O_{13}$ şeklindedir. Oleuropein üç alt ünitelerden oluşur: bir polifenol (4- 2-hidroksietil benzen-1,2-diol - hidroksitirozol), elenolik asit ve glukoz molekülü (4). Zeytinden Oleuropein biyosentezi kapsamlı ve tam olarak anlaşılabilir değildir (59). Oleuropein miktarı bitkinin cinsine, bitkide bulunduğu kısma, hasattaki olgunluğa ve hasat yöntemine göre değişir (57). Oleuropein temel olarak zeytingiller ailesinden elde edilir (3). Bu aile içinde en çok

zeytin ağacından elde edilse de leylak (60), kurtbağrı (61), yasemin (62), dişbudak (63) gibi üyelerinden de elde edilir. Oleuropein antioksidan (5), antienflamatuvar (6), antitümöral (7), antidiyabetik (8), antiaterojenik (9), antihipertansif (10), hipolipidemik (11) bir maddedir. Ayrıca hepatoprotektif (12), nöroprotektif (13) ve kardiyoprotektif (4) etkisi de vardır.

2.6.3.Oleuropein'in Farmakolojik Etkileri

Anti-tümöral etkileri

Oleuropein *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda hücre büyümesini, hareketini ve invazyonunu inhibe eder. Glioblastoma, eritrolösemi, renal hücreli adenokarsinom, infiltratif duktal karsinom, meme adenokarsinomun plevral effüzyonu, malign melanomun lenf infiltrasyonu, kolorektal kanserin supraklavikular metastazı gibi durumlarda aktin iskeletini bozarak hücre yuvarlanmasını indükler ve antitümöral etki gösterir (7). İnsan meme kanser hücre hattında (MCF-7) Oleuropein tedavisi doza bağlı olarak hücre çoğalmasını inhibe eder, apoptozu indükler (64). Oleuropein'in bu hücre hattındaki antiproliferatif etkisinin ERK1/2 (extracellular regulated kinase)'ın östrojen bağımlı aktivasyonunun inhibisyonuna bağlıdır (65). Ayrıca bu hücre hattında Oleuropein'in, etkinliği Bcl genini down regüle ve bax genini upregüle eden bir p53 yolağıyla da apoptozu artırır (14). Oleuropein apoptozu prokanserojen NF-kB ve onun ana kanserojen hedefi siklin D1'i inhibe, önemli bir tümör süpresör olan p21'i upregüle ederek mitokondrial yolakla da apoptozu indükler (66). Kolon adenokarsinom hücre hatlarına (SW480 ve HT29) Oleuropein uygulanması hücre çoğalmasını inhibe eder, apoptozu artırır (67). Oleuropein C6 glioma hücre hattında proliferasyonda doza bağlı inhibisyona sebep olur (68). SH-SY5Y nöroblastom hücrelerine Oleuropein uygulanması proliferasyon inhibisyonuna ve apoptoz artışına neden olur (69). Oleuropein jurkat hücre hattında (lenfoblastik lösemi) proliferasyonu azaltır (70). Ayrıca HepG2 (hepatoselüler karsinom) hücre hattında da antikanserojen etkisi vardır (71). Oleuropein'in *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda antimelanom aktivitesi de vardır (72). Oleuropein'in mesane kanserinde de antikanserojen etkisi vardır (73). HL60 insan promiyelositik lösemi

hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda antiproliferatif etki göstermiştir (74). Deneysel oluşturulmuş dil kanserinde de kanser önleyici etkisi c-met ve ki-67 gibi immünohistokimyasallar kullanılarak gösterilmiştir (75). Oleuropein ayrıca tiroid (76), prostat (77), pankreas (78) kanserleri ve osteosarkomda da (79) antitümöral etki gösterir. Oleuropein'in antitümöral ve kemoprotektif etkileri hücre siklusu durması, apoptozun uyarılması, antioksidan ve antiinflamatuvar etkiler, anjiyogenezin baskılanması ve tümör süpresör genlerin aktivasyonu yoluyla gerçekleşir (14).

Antioksidan etkileri

Oleuropein'in en belirgin özelliği başlıca serbest radikal temizleyici özelliğine bağlı olan antioksidan fonksiyonudur (80). Yapılan deneylerde Oleuropein 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikalini sentetik bir antioksidan olan butile edilmiş hidroksitolüen'den (BHT) daha fazla temizlemiştir (81). Antioksidan etkisi elektron verme kabiliyetine bağlanmıştır (82). Oleuropein'in güçlü antioksidan etkisi yapısındaki hidroksil grubuna (özellikle 1,2 dihidroksibenzen kısmı) bağlıdır. Bu hidroksil grubu oksidasyonu engellemek için H verebilir (57). Hem radikal temizleme hem metal şelatlama özelliğinden dolayı Oleuropein, membranı metal bağımlı lipid oksidasyonundan korur. Ayrıca nötrofil hücrelerinde HOCl oluşumunu katalizleyen myeloperoksidaz miktarını da azaltır (83). Oleuropein, *in-vitro* çalışmalarda meme kanseri hücre hattında H₂O₂ kaynaklı reactive O₂ substance (ROS) artışını belirgin şekilde inhibe etmiştir (84). Lökositlerle yapılan deneylerde Oleuropein verilmesi oksidatif strese bağlı DNA hasarını azaltmıştır (85). Endotel progenitör hücrelerine Oleuropein verilmesi antioksidan enzimlerin üretimini artırır, oksidatif strese neden olan anjiotensin II'yi inhibe eder, O radikali oluşumunu azaltır, hemoksijenaz aktivitesini artırır (86). Deneysel diyabet oluşturulmuş tavşanlarda Oleuropein süperoksit dismutaz (64), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz gibi enzimatik; glutatyon, α -tokoferol, β -karoten ve askorbik asit gibi nonenzimatik antioksidanların miktarını artırır (87). CCl₄ uygulanarak hepatotoksisite oluşturulmuş farelerde Oleuropein aspartat transaminaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) miktarını düşürür; Cu, Zn ,SOD ve glutatyon miktarlarını artırır (12). Oleuropein kreatinin fosfokinaz, kreatin fosfokinaz-MB,

laktat dehidrojenaz, AST ve ALT aktivitesini artırır; tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve protein karbonillerin oluşumunu önler, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu inhibe eder (88). İnsanlarda yapılan çift kör randomize çalışmalarda Oleuropein'den zengin saf zeytinyağı alımı total antioksidan kapasite, katalaz, protein karbonil miktarını artırır; SOD, glutasyon peroksidaz aktivitesini bunları kodlayan genlerin ekspresyonunu etkilemeden azaltır. Bu da Oleuropein'in doğrudan radikal temizleyici olarak etki ettiğini ve antioksidan enzimlere olan ihtiyacı azalttığını düşündürür (89). Oleuropein azot varlığında NO oluşumunu indükler. Bu da midede mukus tabakasının kalınlaşması, *Helicobakter pylori* gibi patojenlerin öldürülmesi ve kas gevşemesi gibi faydalı etkiler oluşturur (90). İnsan HL60 lösemi hücrelerinde Oleuropein'in prooksidan özelliği gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalar Oleuropein'in antitümoral, apoptotik ve sitotoksik özelliklerinin prooksidan özelliğine bağlı olduğunu düşündürmektedir (91).

Antiinflamatuvar etkileri

İnflamasyon, doku hasarı veya enfeksiyon tarafından indüklenen önemli ve koruyucu bir yanıttır. Hasarlı dokular TNF- α , IL1, IL-6, IL-8, IL-17, MCP-1, COX, iNOS, metalloproteinaz gibi inflamatuvar sitokinleri veya mediatörleri serbest bırakır. Karmaşık bir yolla nükleer faktör Kappa β (NF-k β), çok sayıda proinflamatuvar mediatörün üretiminde önemli bir faktördür (92). Proinflamatuvar mediatörleri ve NF-kB'yi inhibe eden maddeler alternatif antiinflamatuvardır. Oleuropein de kısmen antioksidan etkisinden kaynaklanan antiinflamatuvar etki gösterir (93). Deneysel omurilik hasarlı farelerde Oleuropein verilmesi NF-kB, TNF- α , IL-8 β , PG-E₂ salınımını azaltır (94). Bu sonuçlar Oleuropein'in monositin damar duvarına yapışmasını engelleyen VCAM, ICAM, E-selektin gibi faktörleri azaltmasıyla ilişkilendirilmiştir (95). Dekstran sodyumsülfatla kolit oluşturulmuş farelerde Oleuropein verilmesi NO, IL-1, IL-6 ve TNF- α üretimi; iNOS, COX-2 ve MMP-9 ekspresyonunu azaltır (96). Oleuropein'in antiinflamatuvar özelliği endojen bir glukokortikoid mediatörü ve güçlü bir antiinflamatuvar Ca bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein olan Anneksin A1'in upregülasyonu yoluyla p38 mitojen-aktive protein kinazın (MAPK) fosforilasyonunu baskılamasından kaynaklanır (92). İnsanda yapılan çalışmalarda Oleuropein'den zengin saf zeytinyağı alınmasının plazma TXB2 (güçlü bir vazokonstriktör ve trombosit agregasyon faktörü), LTB4 ve

CRP (koroner kalp hastalıklarının belirteci) düzeylerini azalttığını göstermiştir (80). Bu etkiler interferon- γ , F2 isoprostan ve s-P-selektin gibi belirteçleri azaltmasıyla ilişkilidir (97). Damar hastalığı için yüksek riskli deneklerde uzun süreli (1 yıl) zeytinyağı içeren Akdeniz diyeti alınımı IL-6, TNFR 60, TNFR80 ve ICAM-1 gibi inflamatuvar biyomarkerları azaltmıştır (98). Oleuropein kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanserlerde inflamatuvar süreci inhibe etmektedir (80).

Kardiyoprotektif etkileri

Doksorubisin verilerek akut kardiyotoksisite oluşturulmuş sıçanlarda Oleuropein verilmesi kreatin fosfokinaz, kreatin fosfokinaz-MB, laktat dehidrojenaz, AST ve ALT değerlerini düşürmüştür. İmmünohistokimya ve western blot çalışmalarında protein karboniller, nitrotirozin (miyokard dokusunda fonksiyon bozukluğunu gösterir), iNOS ve lipid peroksidasyonu azalmış bulunur. Histopatolojik olarak da kalpte toksisiteye bağlı oluşan vakuollerini azaltmıştır (88). Kardiyoprotektif özellikleri bozulmuş enerji yollarının kompanse edilmesine bağlıdır. Oleuropein oksijen tüketimi, yağ oksidasyonu miyokardiyal β -hidroksiaçil koenzim A dehidrojenaz ve CAT-SOD-glutatyon gibi antioksidan maddeleri artırır; lipid-hidroperoksit seviyesini azaltır (99). Evre 1 hipertansiyonlu hastalarda Oleuropein'den zengin saf zeytin yaprağı alınması sistolik ve diyastolik kan basıncını total trigliserid ve LDL-kolesterol miktarını düşürür (100). Oleuropein'in tansiyon düşürücü etkisi Ca^{2+} kanal agonisti etkisi, ROS oluşumunu azaltması ve NO kaynaklı relaksasyon yapmasına bağlıdır (101). Oleuropein hücreden kolesterol çıkışını ve arter duvarından lipid yüklü makrofaj çıkışını artırarak kardiyoprotektif ve ateroprotektif etki gösterir (102). Oleuropein'in antiagregan (103) ve düz kas proliferasyonunu (104) engelleyici etkisi de kardiyoprotektif etkisinde rol oynar. Endotelial progenitör hücrelere anjiotensin II ve Oleuropein verildiğinde ROS oluşumu ve yaşlı hücre oranı azalmış, telomeraz aktivitesi artmıştır (86).

Nöroprotektif etkileri

Oleuropein'in nöroprotektif etkisi birçok deneyde gösterildiğinden nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde alternatif olarak kullanılabilceği öngörülür. Farelerde zeytin polifenollerinin intraperitoneal enjeksiyonu öğrenme ve hafıza süreçleriyle ilgili limbik sistem ve olfaktör bulbusta sinir büyüme faktörü ve beyin kaynaklı nörotrofik faktörün miktarını ve ana reseptörlerinin miktarını artırmıştır (105). Yaygın geçici serebral iskemi ile hipokampal hasar oluşturulmuş Moğolistan gerbillerine Oleuropein uygulanması süperoksit ve NO oluşumunu inhibe etmiş; lipid peroksidasyonunu azaltmış ve SOD enzimini artırmıştır (106). Sıçanlarda iskemi-reperfüzyon uygulamasında oral zeytin yaprağı özü verilmesi LDL/HDL oranı, enfarktüs hacmi, beyin ödemi ile kan-beyin bariyeri geçirgenliğini azaltır; nörolojik hasar skorlarını da iyileştirir (107). Oleuropein Alzheimer hastalığındaki kognitif gerilemeden ve Pick hastalığındaki bazı nörolojik patolojilerden sorumlu olarak bilinen tau proteini birikimini de inhibe etmektedir (108). Ayrıca Alzheimer hastalığındaki senil plakların ana bileşeni olan amiloid- β peptit birikimini de inhibe etmiştir (109). İnsan böbrek epitel hücre hattında amiloid prokürsör peptiti APP695 ekspresyonunu inhibe etmekte; insan nöroblastoma hücre hattında sA β PPa (güçlü bir nörotrofik faktör terminal parça) miktarını artırmaktadır (110). Çift transgenik farelerde yapılan çalışmalarda Oleuropein aglikon verilmesi bilişsel fonksiyonları düzeltmiş, A β 40 ve 42 seviyelerini ve A β plakların boyutunu ve yoğunluğunu azaltmıştır (111). 6-Hidroksidopamin verilerek deneysel Parkinson hastalığı oluşturulmuş sıçan adrenal feokromastoma (PC12) hücre hattında Oleuropein hücre içi ROS, aktif kaspaz 3, Bax/Bcl-2 oranı ve DNA kırılmasını azaltmıştır (112).

Hepatoprotektif etkileri

CCl₄ ile hepatik hasarlı farelerde Oleuropein tedavisi plazma ALT ve AST miktarını doza bağımlı olarak belirgin derecede düşürmüştür. Ayrıca Zn, Cu, SOD aktivitesi ve glutatyon miktarı artmış ve nekrotik alanlar azalmıştır. İmmünohistokimyasal çalışmalarda Oleuropein doz bağımlı olarak NT3 (2-3-NT3-nitrotyrosine) oluşumunu NF- κ B ve kaspaz-3 aktivasyonunu azaltmış; TNF- α , COX-2 and iNOS ekspresyonunu düşürmüştür (12). BHT uygulanmış sıçanlarda Oleuropein verilmesi serum BUN düzeyi, AST, ALT, ALP, LDH, trigliserid ve kreatinin miktarını düşürür (113). İmmünohistokimyasal analizler Oleuropein'in

karaciğer nekrozu ve fibrozisini azalttığını; a-SMA, CD14, TLR-4, NADPH oksidaz, NF- κ B TGF- β ekspresyonunu düşürdüğünü göstermiştir (114).

Gastroprotektif etkileri

Oleuropein'in antioksidatif, antiinflamatuvar, mukozal membran bütünlüğü koruyucu ve mukozal bariyer güçlendirici etkileri gastroprotektif özellik göstermesine neden olur. Etanol ile oluşturulan mide lezyonlu sıçanlarda Oleuropein verilmesi mukozal lezyonlarda ülser ve erozyon göstergelerinde azalmaya neden olmuş; lipid peroksidasyonunu inhibe etmiş; katalaz ve SOD gibi antioksidan enzimlerin etkisini artırmıştır (115). İndometazin verilmiş sıçanlarda Oleuropein ülseratif lezyonları ve kanama skorunu hasarlı alanların etrafındaki mukus salgılayan hücre sayısını artırarak azaltmaktadır (116).

Antidiyabetik etkileri

Zeytin yaprağı kaynatılarak ve demlenerek diyabet tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (117). Yüksek konsantrasyondaki glukoz ve Oleuropein'den zengin ortamda inkübe edilen pankreas dokusunda insülin salgısı artmıştır (118). Alloksan verilerek diyabet oluşturulmuş sıçanlarda Oleuropein uygulanması plazma glukoz seviyesini düşürmekte; SOD, CAT, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz enzim aktivitelerini artırmaktadır (87). Streptozosin verilerek diyabet oluşturulmuş farelerde Oleuropein TNF, IFN- γ , IL-2, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltmakta; IL-10 seviyesini ve İnsülin reseptör maddesi-1 salınımını artırmaktadır (119, 120). İnsanda yapılmış çift kör randomize çalışmada dişbudak bitkisinden elde edilmiş Oleuropein'den zengin öz muhtemelen insülin direncini düzelterek ve insülin sekresyonunu artırarak postprandiyal hiperglisemide azalmaya sebep olmuştur (121). Uzun dönem günlük Oleuropein'den zengin zeytinyağı kullanımının sağlıklı gönüllülerde glikoz seviyesini düşürdüğü; HDL seviyesini artırdığı saptanmıştır (89).

Lipid düzenleyici etkileri

Kolesterolden zengin beslenmiş sıçanlarda Oleuropein verilmesi toplam kolesterolü, trigliseridi, LDL-kolesterolü düşürür; HDL-kolesterolü yükseltir (122). Oleuropein'in lipid düşürücü etkisi (PPAR) γ , (C/EBP α), (SREBP-1c) gibi bazı

adipogenez transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını azaltmasına bağlıdır (123). Oleuropein ayrıca asetil-CoA karboksilaz ve yağ asidi sentetaz gibi önemli yağ asidi biyosentez enzimlerini; diaçilgliserolaçıl transferaz gibi trigliserit sentez enzimlerini ve 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA-redüktaz gibi kolesterogenez enzimlerini inhibe eder (124). İnsanlarda yapılan randomize kontrollü deneyde kolesterol akışı ile ilişkili genleri upregüle ettiği belirlenmiştir (125).

Obezite üzerine etkileri

Bol yağlı diyetle metabolik sendrom oluşturulmuş farelerde Oleuropein en son vücut ağırlığını ve kilo alımını azaltırken toplam O₂ tüketimini ve termogenezi artırır (126). Buna rağmen insanda yapılan az sayıda randomize kontrollü çalışmada Oleuropein vücut kitle indeksi, LDL kolesterol ve trigliserit miktarında değişiklik yapmazken VLDL'nin trigliserit ve fosfolipid miktarını değiştirir (127). Multifaktöriyel bir hastalık olan obezitenin üzerinde tedavi etkisini anlamak için daha fazla insan çalışmasına ihtiyaç vardır.

Oleuropein'in diğer etkileri

Oleuropein gut hastalığı ile ilişkili enzim ksantin oksidazı inhibe eder (128). İnsan kemik iliği hücrelerinde yapılan çalışmalarda yaşa bağlı kemik kaybı ve osteoporozda koruyucu etkisi bulunmuştur (129). Sıçan beyinde glutatyon redüktaz enzimini inhibe ettiği; muhtemel anksiyete önleyici etki yaptığı görülmüştür (130). Zengin Oleuropein içerikli kozmetik ürünün UV ışınlarına karşı koruyucu olduğu bulunmuştur (131). Bağlamsal hafızayı güçlendirici, proteazom aktive edici, DNA'nın oksidatif hasarını azaltıcı etkileri nedeniyle yaşlanmayı önlediği düşünülmektedir (132). Fare deneyinde Oleuropein yara kollajen birikimini ve epitelizasyonu artırarak yara iyileşmesini hızlandırır (133). Sıçanlarda yapılan kuyruk sıkma ve sıcak plaka testlerinde Oleuropein analjezik etki göstermiştir (134). Oleuropein zengin özüt tip 1 diyabet farelerde otoimmün inflamasyon sürecini ve T lenfosit proliferasyonunu baskılayarak immünmodülatör etki göstermiştir (135).

2.6.4. Toksikite

Oleuropein ve Oleuropeinden zengin özlerin gıda ve ilaç olarak kullanımı çok yaygın olsa da güvenilirlik ve toksisite verileri çok sınırlıdır. Eski çalışmalarda

yüksek dozlarda bile toksik etkisi gözlenmemiştir (15). Buna rağmen 14 hafta boyunca yüksek doz zeytin yaprağı kullanımını karaciğer lezyonuna, kolestaza ve safra kanalı hiperplazisine sebep olmaktadır (16).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürü çalışmalarımızda hücreler belirli koşullar altında yetiştirildi ve deneyler yapıldı. Çalışmalarımızda SH-SY5Y (İnsan nöroblastom hücre hattı) kullanıldı.

2.7. Hücre Hattı ve Kullanılan Besiyeri

Çalışmamıza Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06/11/2018 tarih ve 30 nolu kararıyla başlandı. Çalışmamızda SHSY-5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanıldı. Stok hücre Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) yüksek glukoz ve F12 besiyerlerinin karışımı içine alındı. Bu besiyeri karışımının içine ayrıca %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penisilin-streptomisin de ilave edildi. Falcon tüpe alınan bu karışım 800 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre peletine besiyeri ilave edildi. Süspansiyon haline getirilmiş hücre 25 cm²'lik flaska ekildi, %5 CO₂ içeren ve 37 ° C'ye ayarlı inkübatörde yetiştirildi.

2.8. Hücrelerin Büyütülmesi ve Deneylere Hazırlanması

25 cm²'lik flaska ekilen hücrelerin yukarıda bahsedilen besiyerinde büyümeleri inverted mikroskopla takip edildi. Besiyeri kullanılıp renk değiştirmişse (fenol red reaksiyonu) besiyeri değiştirildi. Flask tabanınının %80-90'ı hücreyle dolduğunda besiyeri flasktan uzaklaştırıldı. Flaska PBS (phosphate buffered saline) verildi. Böylece FBS uzaklaştırılıp uygulanacak tripsinin aktivitesi artırıldı. Sonra sırasıyla

EDTA (5 dk) ve tripsin (5 dk) ile hücreler flask tabanından uzaklaştırıldı. Daha sonra besiyeri eklenerek %5'lik CO₂, %100'lük nem ve 37 °C ortamlı inkübatöre yerleştirildi.

2.9. Thoma Lamında Hücre Sayımı ve 96 Kuyucuklu Plakalarda Deney Kurulması

Besiyerinin uzaklaştırılması sonrası PBS ile yıkanan flaska EDTA ilave edildi. EDTA'lı flask 5 dk. inkübatörde bekletildi. EDTA uzaklaştırıldıktan sonra % 0.25'lik tripsin ilave edildi. Flask tabanından ayrılan hücreler tüpe alındı ve 500 g, +4 °C de 8-10 dk santrifüj edildi. Alttaki hücre peletinden 10 µL alınıp Thoma lamında sayılarak 1 mL'deki hücre sayısı hesaplandı. Mililitrede 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000 hücreler ekildi. Deneyler için en uygun hücre sayısı hesaplandı ve deneylerde 10.000 hücre ekilmesine karar verildi.

2.10. Oleuropeinin Stok Solüsyonunun Hazırlanması ve Deneylerde Kullanılacak Dozun Belirlenmesi

Deneyde kullanacağımız Oleuropein Cayman etiketli ve >%98 saflıktaydı. DMSO içinde çözüldü ve 206 mM stok solüsyon hazırlandı. Yapılan literatür taraması sonrası Oleuropein'in sitotoksosite testlerinde ilk etapta 0-2000 µM aralığındaki dozlarda uygulanmasına karar verildi (69).

2.11. Sitotoksosite Testleri ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücreler Oleuropein ile muamele edildikten sonra hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT), Sulforhodamine B (SRB) ve nötral kırmızısı yöntemleriyle belirlendi.

3.5.1 MTT Testi

Mossmann tarafından tanımlanmış bu yöntem hücre canlılığını tespit etmede yaygın olarak kullanılır. Bu yöntemde hücre canlılığı kolorimetrik ve spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu test MTT'nin hücre içine girip mitokondrideki reaksiyon sonucu formazana indirgenmesine dayanır. Formazan renkli ve suda çözülmeyen bir maddedir. MTT'nin formazana indirgenmesi hücre mitokondrisinde gerçekleştiği için bu reaksiyon oranı hücre canlılığını gösterir. MTT boyası PBS (phosphate buffered saline) içinde 5 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 96 kuyucuklu

plakalardaki medyumunu uzaklaştırıldı. Hazırlanan MTT boyası medyumla 1/10 oranında seyreltilip kuyucuklara 100 µL miktarında ilave edildi. 3-4 saat 37 °C ve %5 CO₂ koşulları altında inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklardaki boya uzaklaştırıldı ve dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edildi. ELISA okuyucuda 570 nm dalga boyunda, oluşan formazan absorbansı okutuldu. Farklı miktarlarda Oleuropein verilmiş ve sadece besiyeri verilerek kontrol olarak kullanılmış kuyucuklardan okunan optik yoğunluğa göre hücre canlılığı tespit edildi. Bu veriler kontrolün ortalama % fraksiyonu ± standart hata işlemiyle hesaplandı. Tek yönlü varyans analizi yapıldıktan sonra Tukey'in çok yönlü karşılaştırma testiyle istatistiksel analiz yapıldı.

3.5.2. Nötral Kırmızısı Yöntemi

Nötral kırmızısı yönteminde hücre canlılığı lizozomal aktivite yoluyla değerlendirilir. Borenfreund ve Puerner tarafından 1985 yılında bulunmuştur. Doğada saf olarak bulunur. Canlı organları ve lizozomu kırmızıya boyar. Nötral kırmızısı canlı hücre lizozomlarının boyayla birleşmesine bağlıdır. Kolayca hücre zarını geçer ve lizozomlarda birikir. Hücre yüzeyi ve lizozomdaki değişiklikler geri dönülmez hale gelir. Spektrometrede 540 nm'deki değerler sağlam membranlı hücre sayısı ile orantılıdır. Bu teste NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2003) tarafından hazırlanan prosedür kullanıldı. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 10×10³ hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi. Hücreler standart şartlarda 24 saat inkübe edildi. Sonrasında hücreler 100 µL/kuyucuk PBS ile yıkandı. Takiben kuyucuklara %1 oranındaki nötral kırmızısı boyası uygulanarak 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası medyum uzaklaştırılıp hücreler tekrar PBS ile yıkandı. 100 µL DESORB (%1 glacial asetik asit, %49 etanol) kuyucuklara ilave edildi. ELISA okuyucuda 540 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerlerine göre hücre canlılığı tespit edildi.

3.5.3. Sulforhodamine B (SRB) Yöntemi

Skehan ve arkadaşlarının bulduğu bu yöntem *in-vitro* sitotoksitesite taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır. SRB, hücrelerin protein bileşenlerine sitokiyometrik bir şekilde bağlanır. Dolayısıyla, boyanmış hücrelerden ekstrakte edilen boya

miktarı, hücre kütlesi ile doğru orantılıdır. SRB ayrıca hücre yoğunluğu tayini için de kullanılabilir. 96 kuyucuklu plakaya 10×10^3 hücre 200 μL medyum içinde ekildi. Kör olarak kullanılan kuyulara 200 μL medyum eklendi. Kuyucuklara çeşitli miktarlarda Oleuropein ilave edildi. 24 saat inkübasyondan sonra proteinleri fikse etmek için, her kuyuya 50 μL %50'lik trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 saat fikse edildi. TCA plakadan ters çevrilerek döküldü. TCA'yı plakadan tamamen uzaklaştırmak için kuyular birkaç kez distile su ile yıkandı (Distile su doğrudan şişeden kuyuların üzerine döküldü ve sonrasında plaka ters çevrilerek uzaklaştırıldı). Hazırlanan SRB solüsyonundan her kuyuya 50 μL eklendi ve karanlıkta 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. SRB solüsyonu plakadan dökülerek uzaklaştırıldı. Kuyular 5 kez %1'lik asetik asit ile yıkanarak bağlanmamış SRB boya ları uzaklaştırıldı. (Asetik asit doğrudan şişeden kuyuların üzerine döküldü ve sonrasında plaka ters çevrilerek uzaklaştırıldı). Plaka kuyular içerisinde hiç sıvı kalmayacak şekilde kurumaya bırakıldı. Proteinlere bağlanan boyanın çözünmesi için, 10 mM tris bazı (150 μL /kuyu) eklendi. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için, plaka en az 10 dk. çalkalayıcıda inkübe edildi. (yaklaşık 150 rpm). Optik yoğunluk ELISA okuyucuda 564 nm'de okundu.

3.6. Mikroskopik İnceleme Yöntemleri

3.6.1. İverted Mikroskop İncelemesi

SHSY5Y hücreleri, 6 kuyucuklu plakalarda lameller üzerinde ekilip inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 250, 300, 350 ve 400 μM dozunda Oleuropein ilave edildi. 24 saat inkübasyon periodundan sonra hücrelerdeki morfolojik değişiklikler inverted mikroskopta incelendi ve kayda alındı.

3.6.2. Işık Mikroskop İncelemesi (Hematoksilen-Eozin)

Hematoksilen-eozin histolojide en sık kullanılan ikili boyama yöntemidir. Işık mikroskopta hücreleri ve dokuları incelemede kullanılır. Hematoksilen bazik bir boyadır ve hücrenin çekirdeğini boyar, eozin asidik bir boyadır ve hücre sitoplazmasını boyar. Bizim bu çalışmamızda, 6 kuyucuklu plakalarda lameller üzerinde hücreler büyütüldü ve 250, 300, 350 ve 400 μM Oleuropein ilave edildi. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler -20°C metanolla 10 dk. fikse edildi. PBS ile yıkandı. Sonra 5 dk. hematoksilen uygulandı ve çeşme suyunda yıkandı. Distile su ile yıkanan örnekler eozinde 5 dk. bekletildi. Sonrasında distile su ile yıkandı

kurutuldu ve su bazlı kapatma solüsyonu ile lam üzerine kapatıldı. Işık mikroskopunda hücrelerdeki değişiklikler incelendi.

3.6.3. Konfokal Mikroskop İncelemesi

Hücre görüntüleri floresan boya kullanarak ve konfokal mikroskop yardımıyla elde edildi. Floresan boyalar hücre çekirdeğini DNA'ya bağlanarak görünür hale getirdi. Bunun için önce SHSY-5Y hücreleri 12 kuyucuklu plakalarda lameller üzerinde büyütüldü. 350 μ M Oleuropein kuyucuklara uygulandı. Bu mikroskop çalışmasında falloidinle hücre iskeleti boyandı. Bu şekilde konfokal mikroskop ile incelemeye hazır hale getirildi. Oleuropein uygulaması sonrası hücrelerin çekirdek ve iskelet yapısı incelendi. Bu yöntemde ölü hücrelerde ölümün apoptozis ve nekrozis yollarından hangisiyle olduğu nükleus morfolojisine bakılarak tespit edildi.

3.7. TUNEL Yöntemiyle Apoptoz İncelemesi

TUNEL yöntemiyle apoptoz sırasında oluşan DNA kırıkları gösterilir. Bu yöntemde, DNA kırıklarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile digoksinenli nükleotitler eklenir. Sonra hasarlı hücreler peroksidazlı anti-digoksinenin uygulanarak saptanır. Bu çalışmamızda hücreler 12'lik plakaya ekildi. Oleuropein uygulayıp bir gün inkübatörde bekletildi. Daha sonra soğuk metanol ile fikse edildi. 10 dk. equilibrium buffer'da tutuldu. Sonrasında 30 μ L TdT ve 270 μ L biotin-dUTP karışımında 1 saat 37 °C'de bekletildi. 3 defa 2'şer dk. PBS ile yıkandı. Sonra hücreleri %3'lük H₂O₂ (PBS içinde) solüsyonunda 10 dk. oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. 3 defa 2'şer dk. PBS ile yıkandıktan sonra %1'lik streptavidin (PBS içinde) uygulanarak 30 dk. ışıktan koruyarak oda sıcaklığında tutuldu. 3 defa 2'şer dk. PBS ile yıkandı, kromojende 1-5 dk. Bekletildi ve 3 defa 2'şer dk. PBS ile yıkadıktan sonra su bazlı madde ile preparat kapatıldı.

3.8. İmmünohistokimya

Bu aşamada Bax, Bcl-2, kaspaz 3, cleaved kaspaz 7 ve 9, p53, APAF-1, bad gibi apoptozla ilişkili proteinlerin aktiviteleri immünohistokimya yoluyla belirlendi. Hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve 24'lü plakalara ekildi. Hücrelere 350 μ M Oleuropein 24 saat uygulandı. Daha sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve 24'lü plaka PBS ile yıkandı. Hücre fiksasyonu için soğuk metanol kullanıldı. 24'lü plaka 3 kere daha PBS ile yıkandı. Hücre porlarının boyayı alabilmesi amacıyla triton X kullanıldı.

Sonrasında hücreler PBS ile yıkandı. Ardından oda sıcaklığında 10 dk. Ultra V bloklandı. Daha sonra hücreler Bax, Bcl-2, kaspaz 3, cleaved kaspaz 7 ve 9, p53, APAF-1, bad, primer antikörlerinde 3 saat bekletildi. Biotinleşmiş anti-keçi polivalant antikörünün 10 dk. Süreyle uygulanmasını takiben PBS ile 3 kez yıkandı ve sonra 10 dk. streptavidin peroksidazda bekletildi. 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra kromojende 7-10 dk. tutuldu. Sonrasında hücrelere 7 dk. hematoksilen uygulandı. Lameldeki hücreler su bazlı kapama sıvısı ile lama kapatıldı.

3.9. Western Blot Analizi

Bu yöntemle kaspaz 7 protein miktarı tayin edildi. Western blot yöntemi poliakrilamid jelde elektroforez işlemiyle göç ettirilen proteinlerin membrana transferi ve membranda bulunan proteinlerin immünolojik olarak tayin edilmesi temeline dayanmaktadır. Böylece hazırlanan örneklerdeki protein miktarları belirlenebilmektedir. Öncelikle protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, hücreler Oleuropein ile 24 saat inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırılarak soğuk PBS ile yıkandı. Sonra flasklara 1 mL RIPA lizis tamponu konularak hücreler kazındı. Parçalanmış hücreleri içeren süpernatant buz üzerinde tutuldu ve vortekslendi. Sonra 14.000 g'de 10 dk. döndürülüp sıvı kısım alınarak proteinleri izole edildi. Ardından, proteinlerin mL'deki miktarını tayin etmek için Qubit 2.0 cihazında kullanılan yöntemle floresanla etiketlenerek mL'deki miktarları tayin edildi. Bu işlemde 10 µL protein izolatı 1 µL Qubit florofor 199 µL Qubit tamponu içinde hazırlanan karışımdan 190 µL'lik kısmıyla karıştırıldı ve çıkan protein miktarı seyreltme miktarıyla çarpılarak µg/mL protein bulundu.

Protein tayini yapıldıktan sonra elektroforez için gerekli jel hazırlandı ve herbir kuyucuğa 30-50 µg/µL arası protein hesaplanarak yükleme tamponu ve kuyucuklara β-merkaptoetanol ile birlikte yüklendi. Önceden hazırlanmış running tamponuyla elektroforez aparatına konuldu ve önce yavaş akımda, sonra yüksek akımda proteinler en alt seviyeye ulaşana kadar yürütüldü. Jelde proteinlerin düzgün yürüyüp yürümediği coomassive blue boyasıyla kontrol edildi.

Proteinlerin yürümesinde bir sorun yoksa watman kâğıdı + PVDF membran + jel + watman kâğıdı şeklinde hazırlandı ve western blot cihazıyla jeldeki proteinler PVDF membrana aktarıldı. Aktarım bitince %5 BSA membran ile 1 saat bloke

edildi, TBST ile 10'ar dk. 3 kez yıkandı. Primer antikorda 4 °C'de bir gece inkübe edildi. Sabah membran TBST ile 3 kez 10'ar dk. yıkandıktan sonra sekonder antikorla 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Tekrar membran TBST 3 defa 10'ar dk. yıkandıktan sonra, luminol substratıyla kemoluminesans olarak görüntülendi.

3.10. Akış Sitometresi Analizi

Oleuropein'in SHSY-5Y hücreleri üzerindeki sitotoksitesine ve apoptotik etkisine aneksin V yöntemi ile bakıldı. Muse™ Annexin V & Dead Cell Kiti kullanıldı. Fosfatidilserin molekülleri normalde hücre zarının iç yüzeyine bakan fosfolipid sırada yerleşirken hücre apoptoza gittiğinde zarın dış yüzeyindeki sıraya geçer. Bu yer değiştirme apoptozda erken safhalarda gerçekleşir. Hücre zarı henüz bütünlüğünü kaybetmemiştir. Bu safha erken apoptoz olarak değerlendirilir. Anneksin V hücrenin dış yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir, floresan isotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. FITC-anneksin V bileşiminin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı ölçülür (136). Anneksin V bağlanması nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de görülebildiği için apoptoz kriteri olarak hücre ölümü belirteci olan 7-amino aktinomisin D (7-AAD) boyası kullanıldı. Hücre zarı bütünlüğünü kaybetmiş ölü hücreler boyayı alır ve floresan ışımaya yaparken canlı hücreler ve erken apoptotik hücreler bu boyayı hücre içine almaz (37). Çalışmamızda SHSY-5Y hücreleri flasklardan kaldırılarak 12'lik plakalara ekildi. Hücrelere Oleuropein verildikten sonra hücrelerin besiyerleri atıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. PBS-EDTA ile yıkanan hücreler 5 dk. tripsin-EDTA'da bekletildi. Bu yöntemle hücre kaldırılmış oldu. 150 g'de 10 dk. santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve %1 BSA içeren taze besiyeri pelete eklendi. 100 µL aneksin V ve propidium ioditi içeren solüsyon Eppendorf tüplere aktarıldı. Sonrasında üzerine hazırlanan hücre süspansiyondan 100 µL kadar eklendi. Bu iki solüsyon oda sıcaklığında karanlıkta 20 dk. inkübe edildi. Daha sonra Muse™ Cell Analyzer (Merck, Millipore, Hayward, CA, USA) ile hücreler analiz edildi.

3.11. Migrasyon (Yara İyileşme) Testi

Altı kuyucuklu plakalarda hücreler büyütüldü ve yapışmaları sağlandı. Sonra herbir kuyucuğa sarı pipet ucuyla dikey olarak boydan boya eşit büyüklükte çizgi

çekilerek hücreler arası boşluk (yara) oluşturuldu. Takiben PBS ile plaka yıkandı ve yüzeye çıkan hücrelerin temizlenmesi sağlandı. Ardından Oleuropein'in hazırladığımız 250, 300, 350 ve 400 μ M konsantrasyonları uygulandı. Kontrol grubunda ise sadece yara oluşturuldu. İverted mikroskopta 6'lı plakadaki yara (boşluk) kapanması zaman göz önüne alınarak fotoğraflandı ve değerlendirildi.

3.12. İstatistiksel Analiz

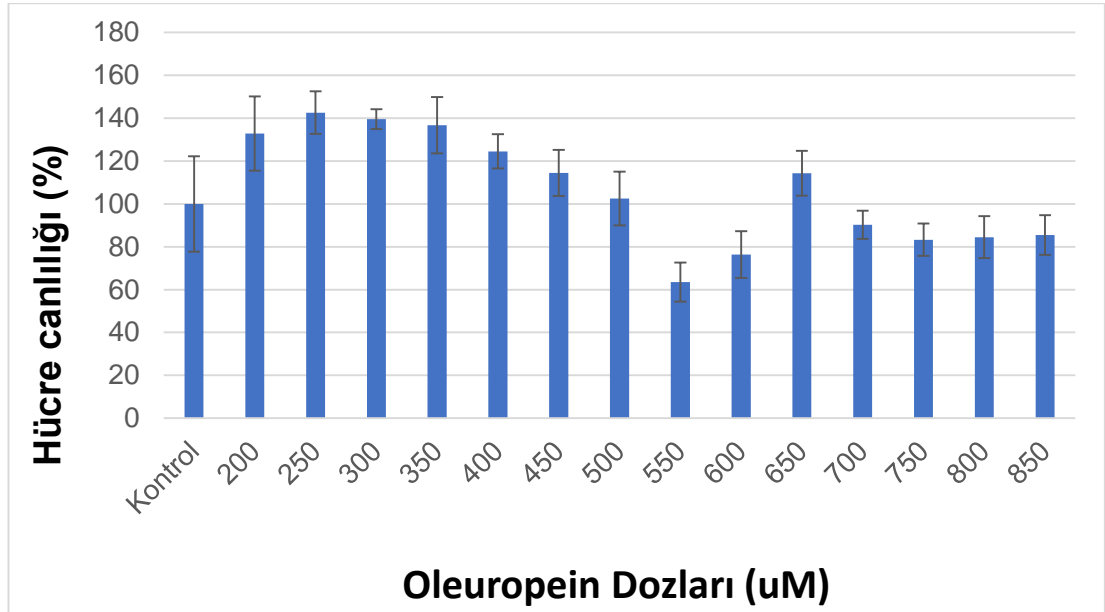
Shapiro-Wilk normalite testi ile değişkenlerin normal dağılım izleyip izlemediği kontrol edildi. Normal dağılım gösteren veriler arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Varyansları ANOVA'da Levene's testinde homojen dağılan veriler Tukey çoklu karşılaştırma testi, varyansları homojen dağılmayan veriler Tamhane çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yorumlandı. Kruskal-Wallis testi ise normal dağılım göstermeyen veri setlerinde yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ ise * şeklinde ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Sonuçları

4.1.1. MTT Sonuçları

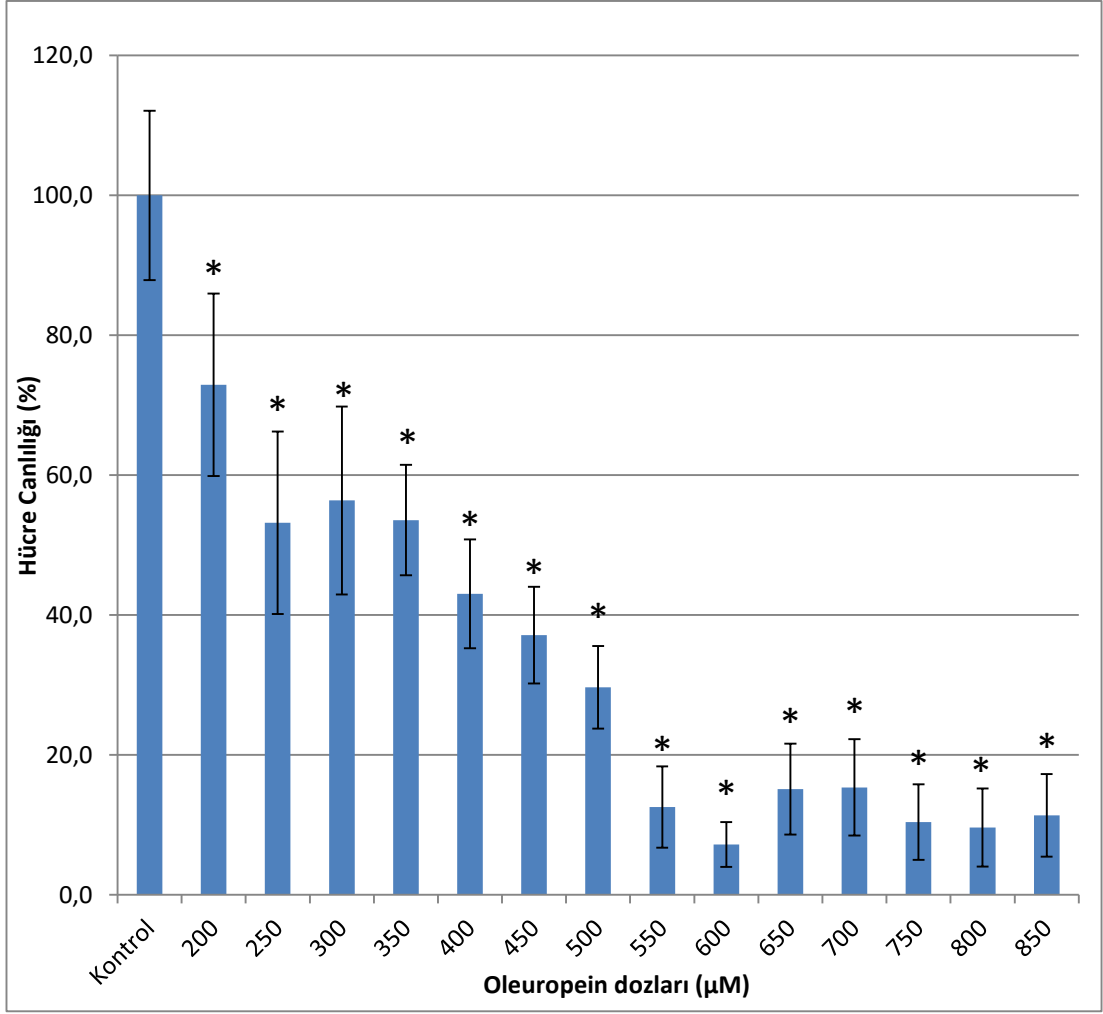
MTT deneyimizde SHSY-5Y hücrelerine 200 ile 850 μM arasında değişen dozlar uygulandı. Dozlar arasında kontrole göre anlamlı bir fark ortaya çıkmadı ($p>0.05$). 200-500 μM uygulanan gruplarda canlılık kontrole göre yüksekti. 550 μM canlılığın (%63,6) en düşük olduğu doz olarak tespit edildi. 600-850 μM dozlarında canlılık 550 μM 'a göre arttı ve dalgalanmalar gösterdi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin MTT sonuçları. $p>0.05$.

4.1.2. Nötral Kırmızısı Sonuçları

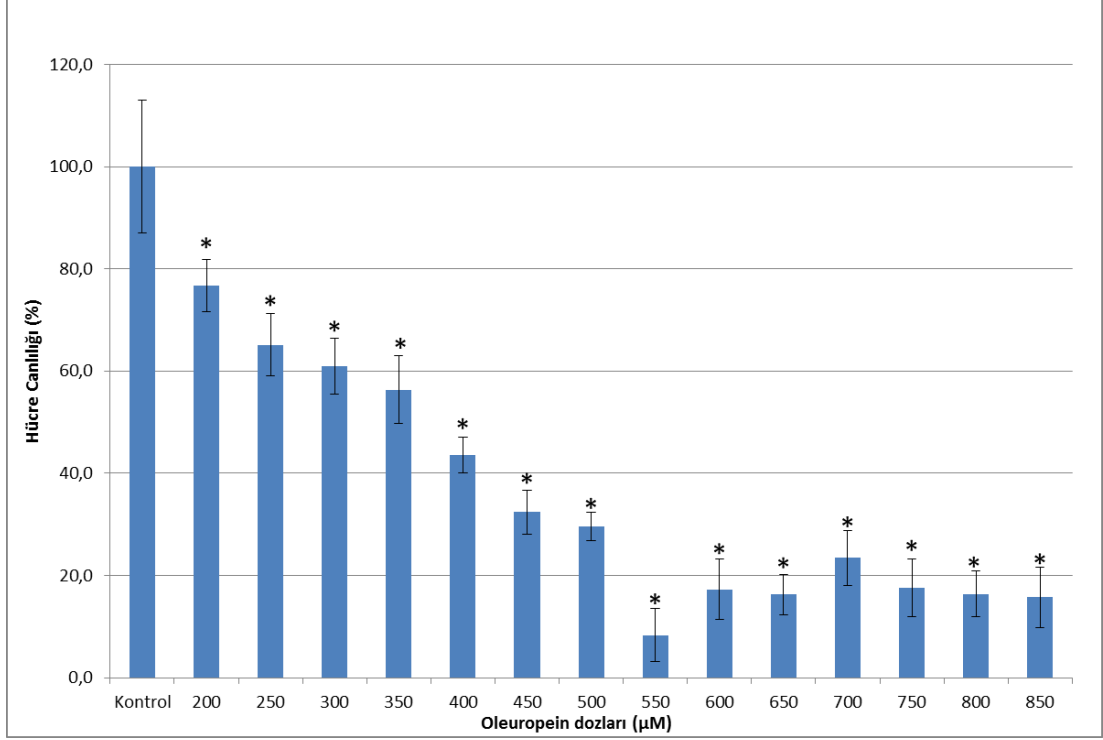
Nötral kırmızısı çalışmamızda hücelere 200 ile 850 μM arasında değişen dozlar uygulandı. Sonuçlara bakıldığında hücre canlılığının 250 μM uygulanan gruptan sonra artan dozla beraber 600 μM 'a kadar düştüğü gözlemlendi ($p>0.05$). 600 μM 'da canlılık %7,2 idi. 600 ile 850 μM dozlarda canlılık dalgalanmalar gösterdi.



Şekil 4.2: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin nötral kırmızısı sonuçları. *: $p < 0.05$.

4.1.3. Sulforhadamine B (SRB) yöntemi

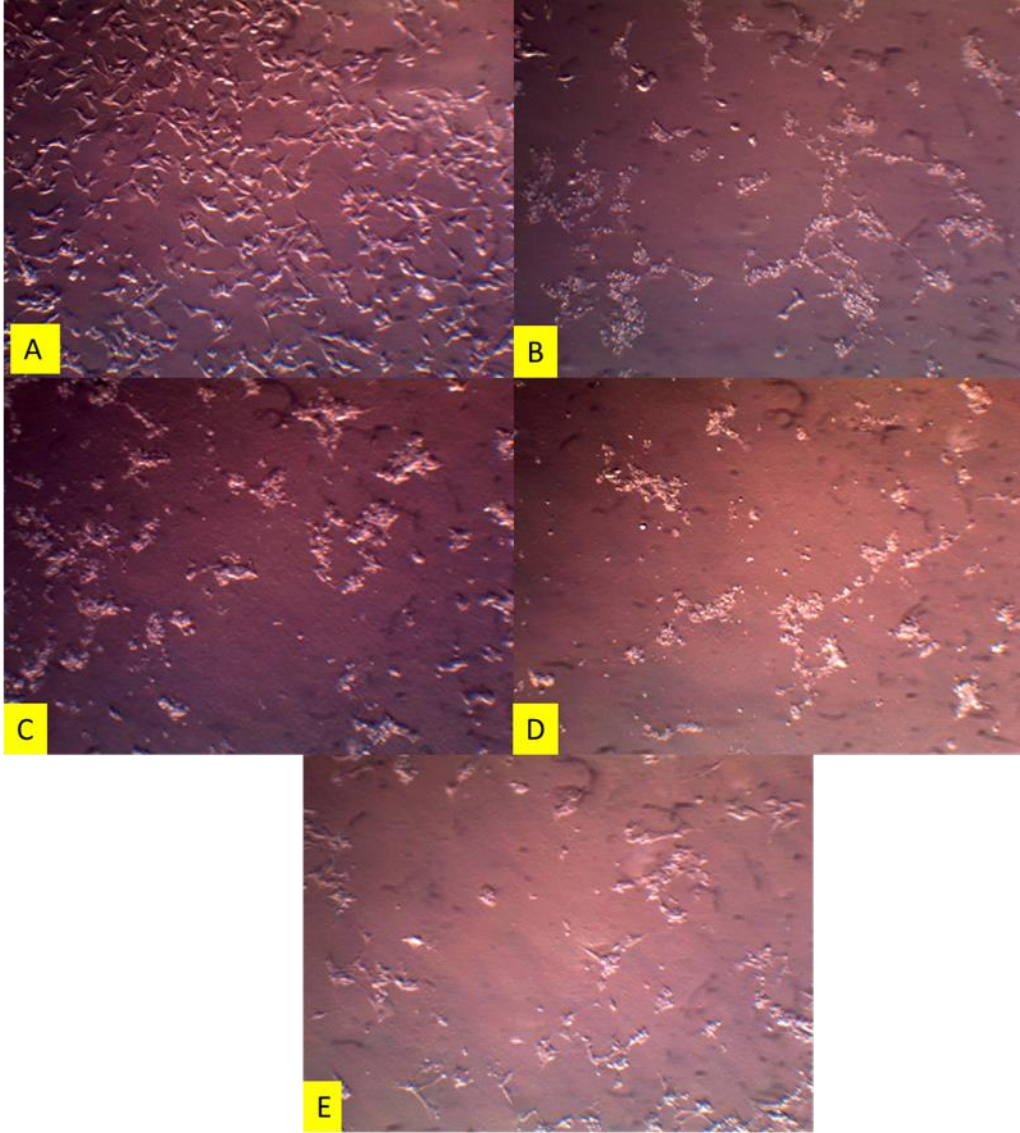
Sulforhodamine B çalışmamızda hücrelere 200 ile 850 µM arasında değişen dozlar uygulandı. Sonuçlara bakıldığında hücre canlılığının 250 µM uygulanan gruptan sonra artan dozla beraber 550 µM'a kadar anlamlı bir şekilde düştüğü gözlemlendi ($p < 0.05$). 550 µM'da canlılık %8,4 idi. 600 ile 850 µM dozlarda canlılık 550 µM'a göre arttı ve dalgalanmalar gösterdi. Tüm dozlardaki değişim kontrole göre anlamlıydı ($p < 0.05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin sulforhadamine B sonuçları. *: $p < 0.05$.

4.2. İverted Mikroskop Sonuçları

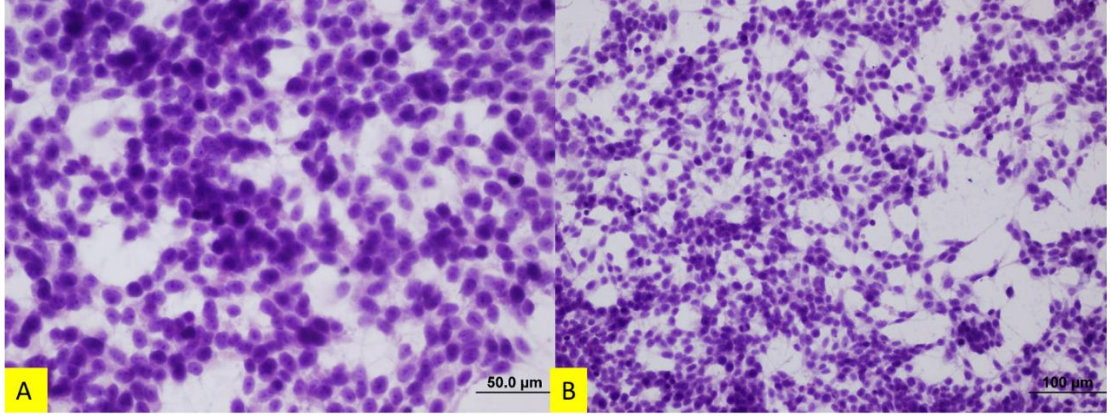
İverted mikroskop incelemelerimiz sonucunda Oleuropein'in artan dozla beraber hücre yoğunluğunda azalmaya neden olduğu ve hücrelerin uzantılarını kaybettiği ve yuvarlaklaştığı görüldü (Şekil 4.4).



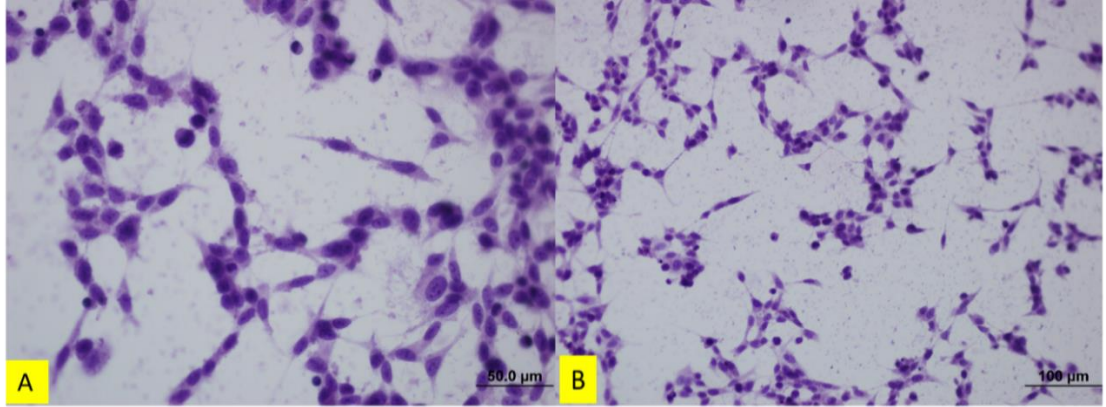
Şekil 4.4: Çeşitli dozlarda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin inverted mikroskop sonuçları. A: Kontrol, B: 250 µM, C: 300 µM, D: 350 µM ve E: 400 µM. Görüntüler mikroskopta 10X objektif ile çekildi.

4.3. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları

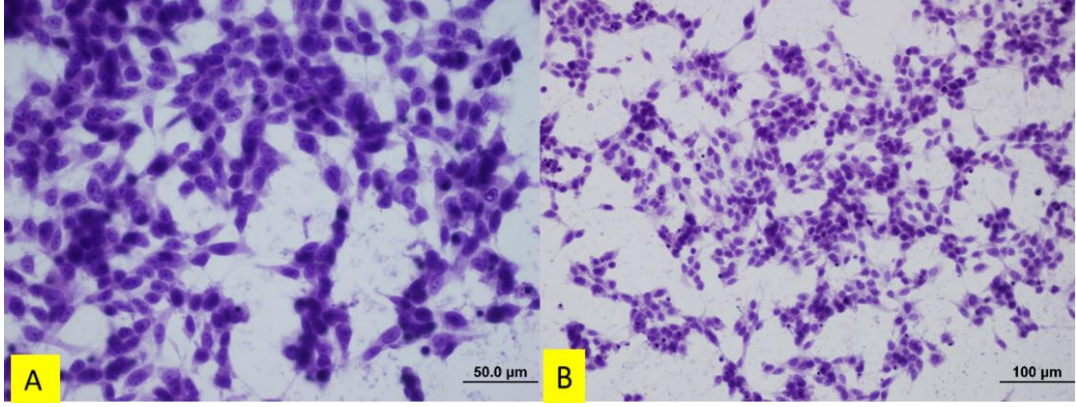
Çalışmamızın hematoksilen-eozin boyama sonuçlarına baktığımızda, kontrol grubundaki hücrelerin sitoplazma ve çekirdekleri normal görünümdeydi. Oleuropein'in artan dozlarıyla beraber hücrelerde hacimsel küçülme, piknotik çekirdek sayısında artma ve hücre yoğunluğunda azalma tespit edildi (Şekil 4.5-4.9).



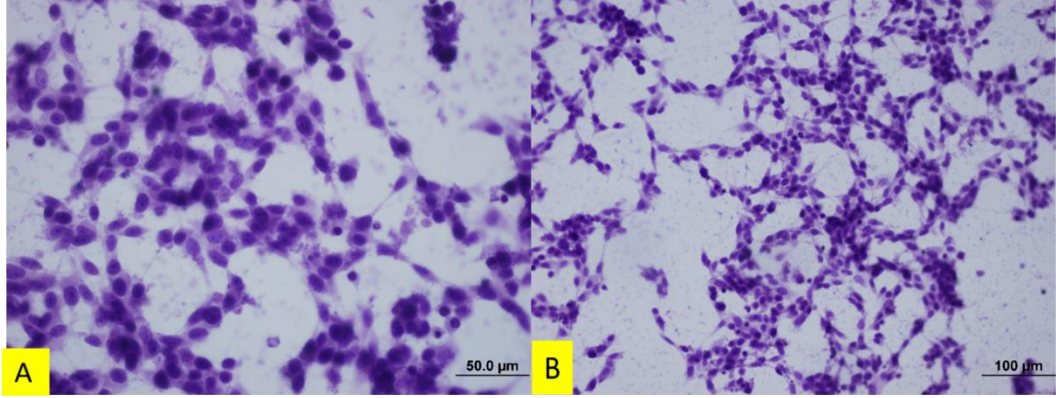
Şekil 4.5: SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilen-eozin boyama sonuçları. A: Kontrol grubu, bar=50µm ve B: Kontrol grubu bar=100 µm.



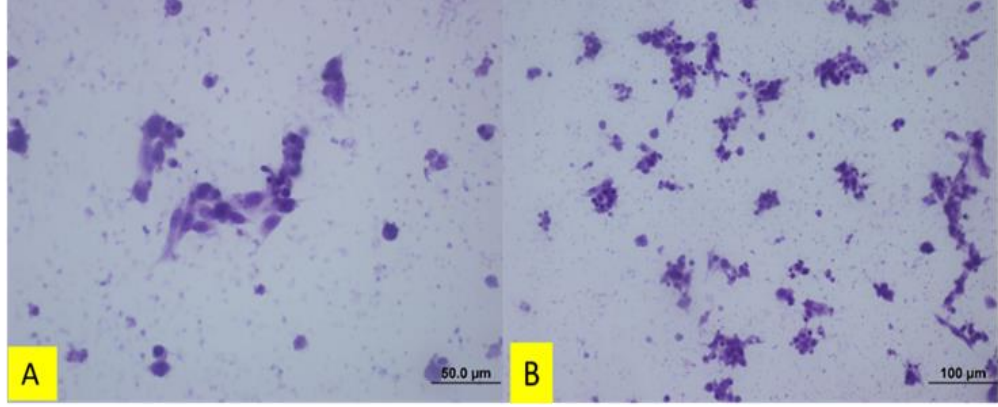
Şekil 4.6: 250 µM dozunda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilen-eozin boyama sonuçları. A: 250 µM bar=50µm ve B: 250 µM bar=100µm.



Şekil 4.7: 300 µM dozunda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoxilen-eozin boyama sonuçları. A: 300 µM bar=50µm ve B: 300 µM bar=100 µm.



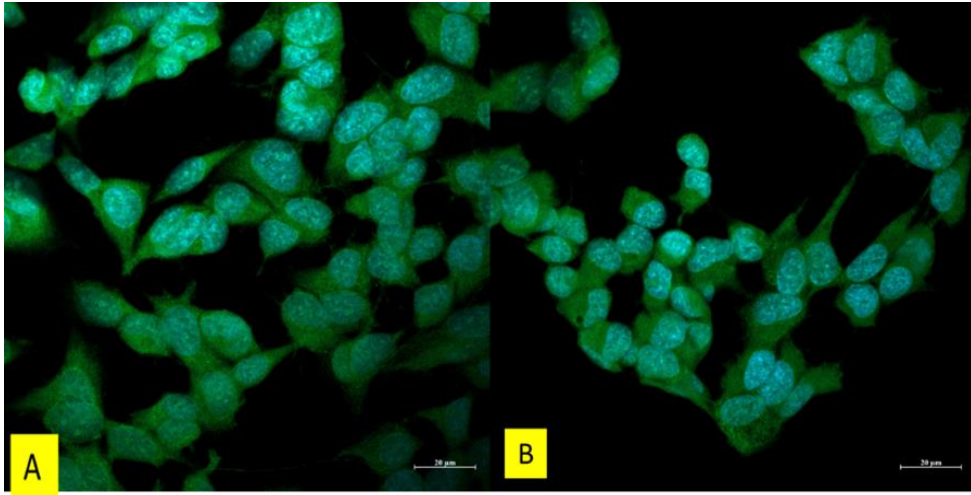
Şekil 4.8: 350 µM dozunda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoxilen-eozin boyama sonuçları. A: 350 µM bar=50µm ve B: 350 µM bar=100 µm.



Şekil 4.9: 400 μM dozunda Oleuropein uygulanan SHSY-5Y hücrelerinin hematoksilin-eozin boyama sonuçları. A: 400 μM bar=50 μm ve B: 400 μM bar=100 μm .

4.4. Konfokal Mikroskopik Sonuçları

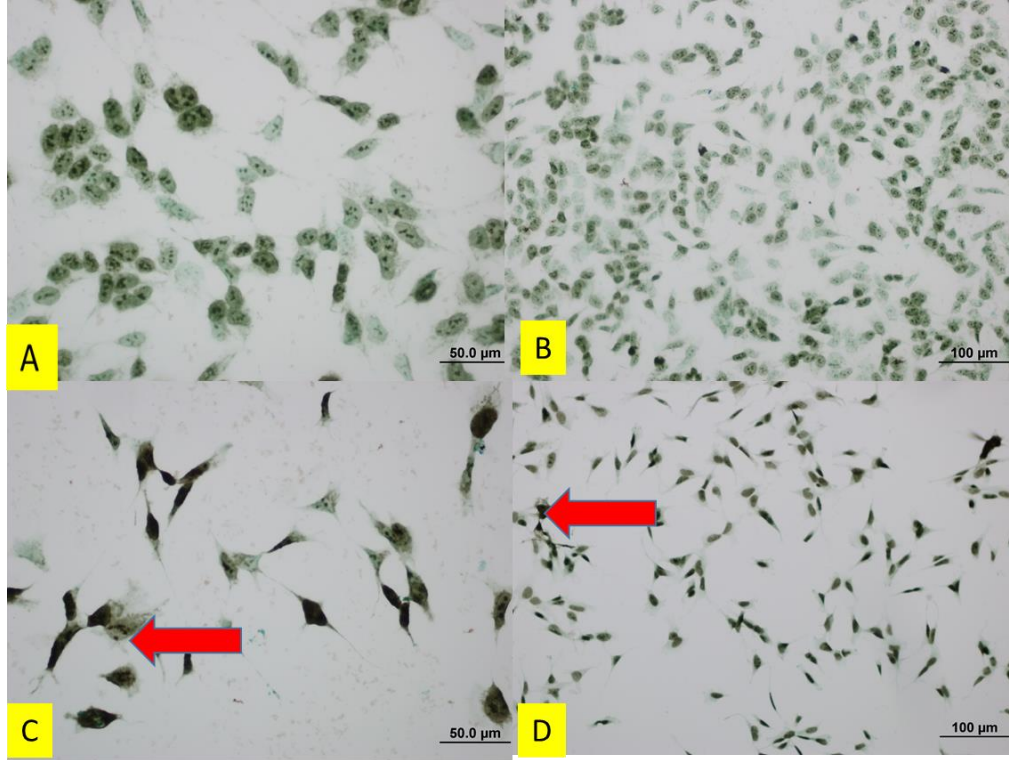
Konfokal mikroskop incelememiz sonucunda kontrol grubundaki hücreler normal büyüklükte ve şekilde sitoplazmaya ve çekirdeğe sahip olarak gözlemlendi. Oleuropein uyguladığımız hücrelerde çeşitli dejenerasyonlar gözlemlendi. Hücre boyutunda küçülme, hücre çekirdeğinde yoğunlaşma, çekirdeğin eksantrik yerleşimi ve at nalı şeklinde görünümü, sitoplazmik fragmentasyon gözlemlendi (Şekil 4.10),



Şekil 4.10: Konfokal mikroskop görüntüleri. A: Kontrol grubu, Bar 20 μm B: 350 μM Oleuropein uygulanan grup Bar 20 μm .

4.5. TUNEL Sonuçları

Tunel boya protokolü uyguladığımız preparatlarda kontrol grubunda hücre morfolojisi normal ve boyama negatif iken Oleuropein uygulanmış grupta hücre sayısı az, morfolojisi bozuk ve boyanma pozitif (Şekil 4-11).

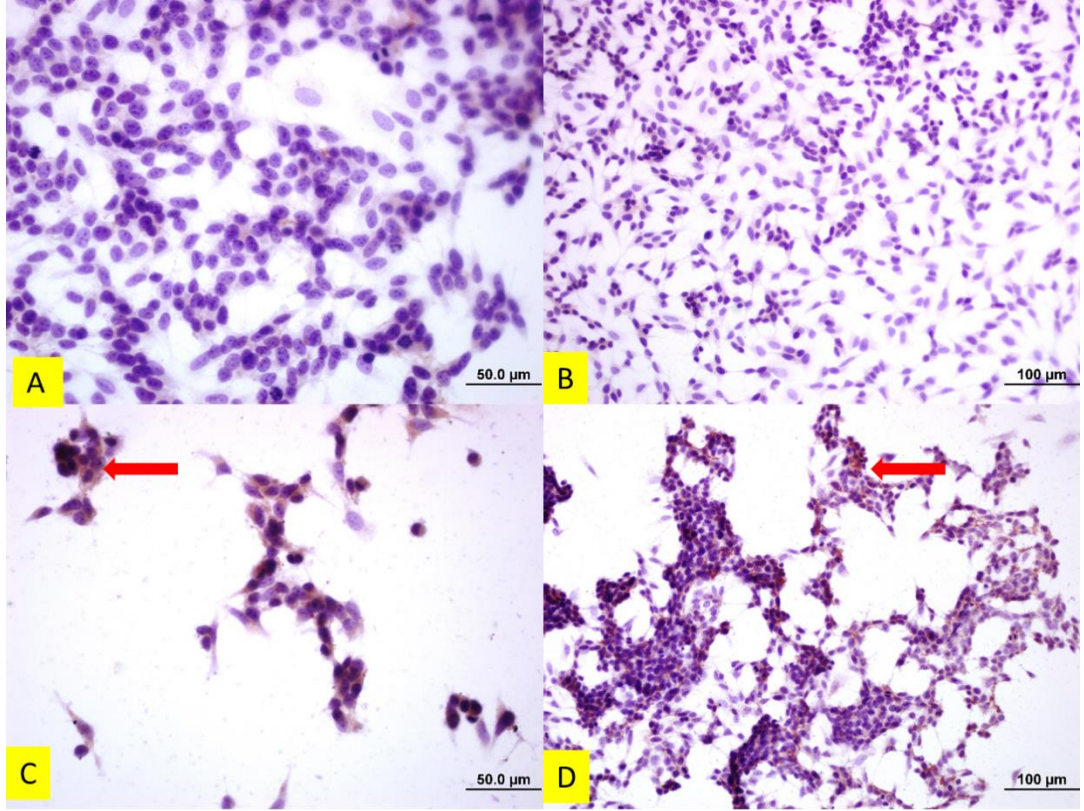


Şekil 4.11: TUNEL boyama görüntüleri. A: Kontrol grubu bar=50 µm, B: Kontrol grubu bar=100 µm, C: Oleuropein uygulanmış grup bar=50 µm ve D: Oleuropein uygulanmış grup bar=100 µm.

4.6. İmmünohistokimya Sonuçları

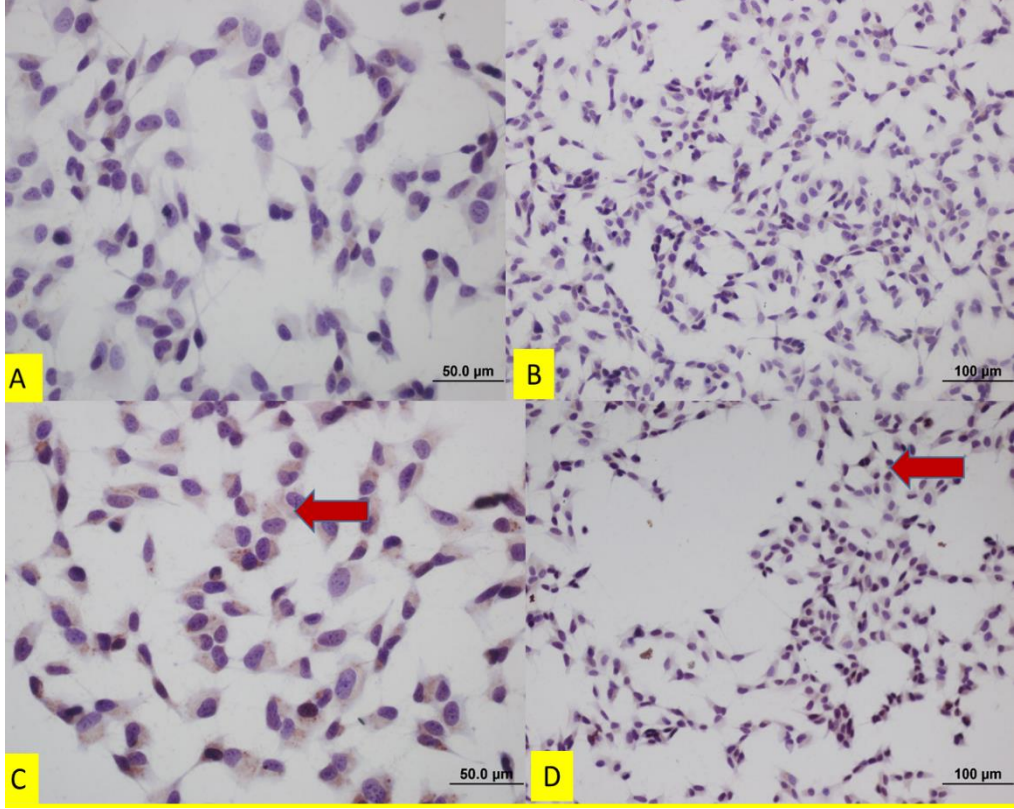
İmmünohistokimya deneylerimizde kontrol ve 350 µM Oleuropein uygulanan gruplar oluşturuldu. Apoptotik proteinler olan Bax, p53, kaspaz 3, cleaved kaspaz 7, cleaved kaspaz 9, APAF-1 ve bad proteinlerinde kontrole kıyasla 350 µM Oleuropein uygulanan grupta daha yüksek immünoreaksiyon görüldü. Ayrıca hücre sayısının azaldığı ve boyut olarak da hücrelerin küçüldüğü gözlemlendi (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19).

Anti-apoptotik bcl-2 proteininde ise kontrol grubunda 350 µM Oleuropein uygulanan gruba göre daha fazla immünoreaksiyon görüldü (Şekil 4.15).

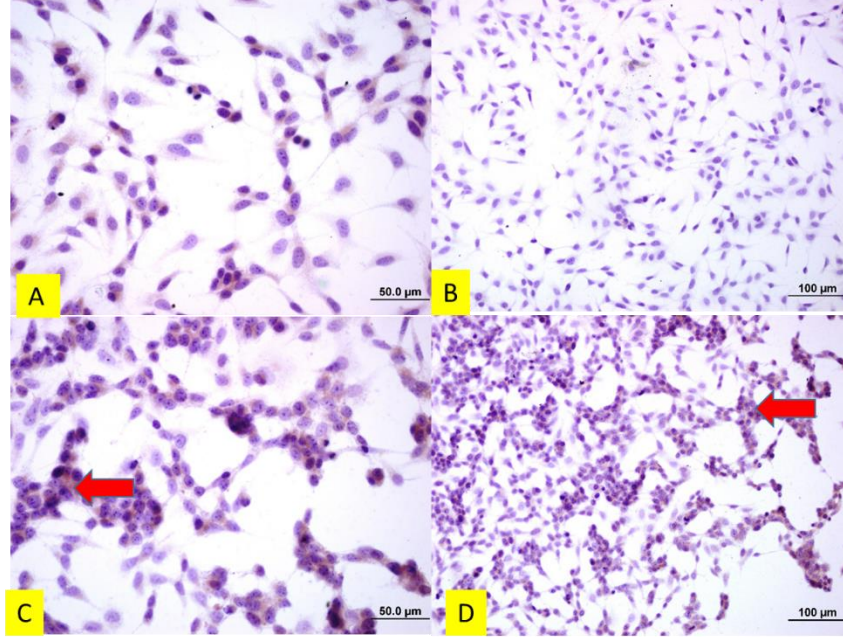


Şekil 4.12: APAF-1 proteinin immünsitokimya görüntüleri. İmmünoreaksiyon (ok).

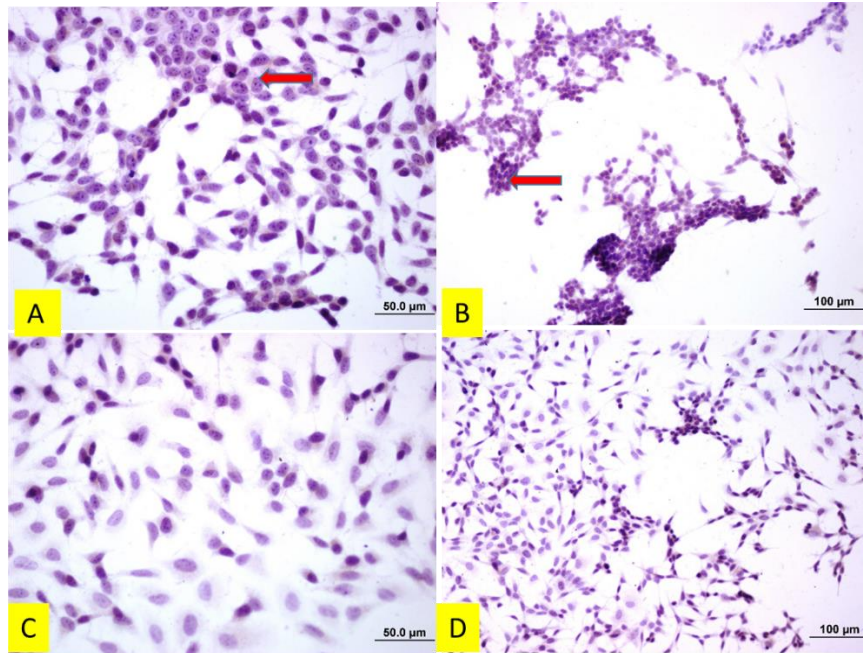
A: Kontrol grubu bar=50 μm, B: Kontrol grubu bar=100 μm, C: Oleuropein uygulanan grup bar=50 μm ve D: Oleuropein uygulanan grup bar=100 μm.



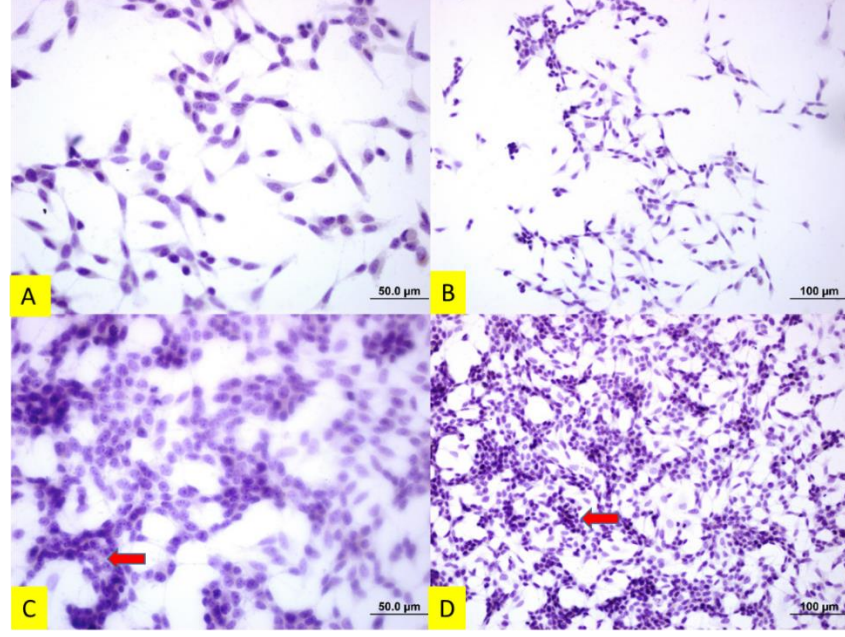
Şekil 4.13: Bad proteinin immünsitokimya görüntüleri. İmmünoreaksiyon (*ok*). A: Kontrol grubu bar=50 µm, B: Kontrol grubu bar=100 µm, C: Oleuropein uygulanan grup bar=50 µm ve D: Oleuropein uygulanan grup bar=100 µm.



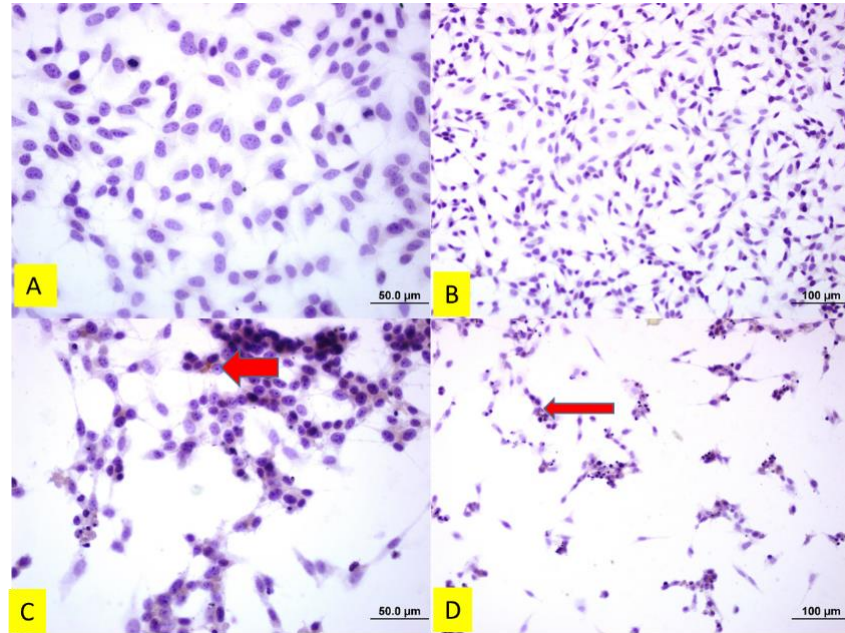
Şekil 4.14: Bax proteinin immünsitokimya görüntüleri. İmmünoreaksiyon (ok). A: Kontrol grubu bar=50 µm, B: Kontrol grubu bar=100 µm, C: Oleuropein uygulanan grup bar=50 µm ve D: Oleuropein uygulanan grup bar=100 µm.



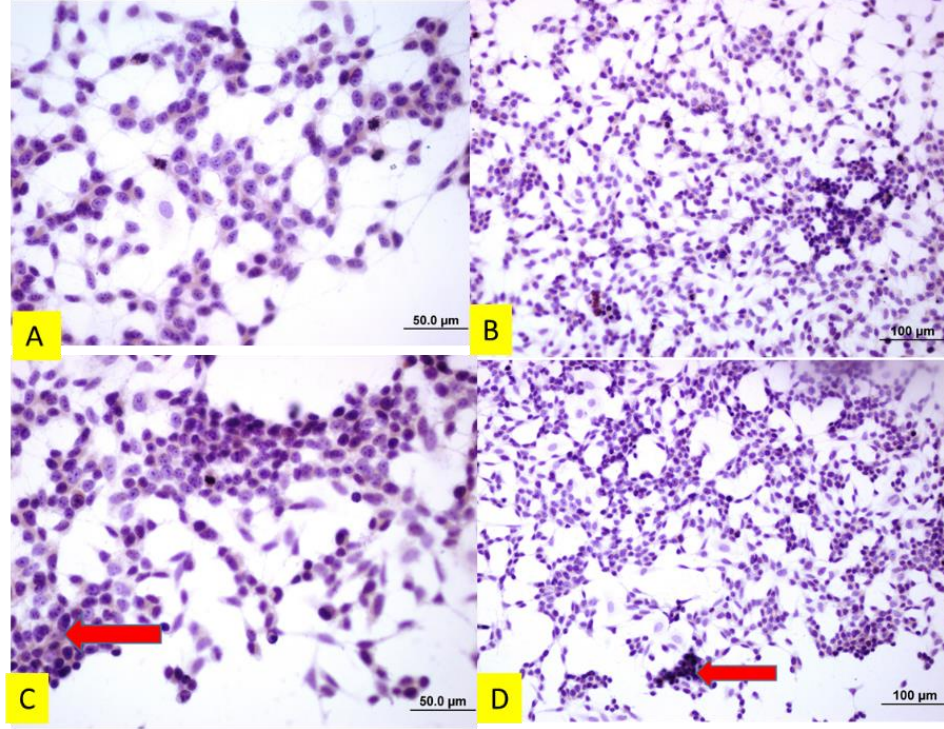
Şekil 4.15: Bcl-2 proteinin immünhistokimya resimleri. İmmünreaksiyon (Ok). A) Kontrol grubu 50 µm B)Kontrol grubu 100 µm C)Oleuropein uygulanan grup 50 µm D)Oleuropein uygulanan grup 100µm



Şekil 4.16: Kaspaz 3 proteininin immünsitokimya görüntüleri. İmmünoreaksiyon (ok). A: Kontrol grubu bar=50 µm, B: Kontrol grubu bar=100 µm, C: Oleuropein uygulanan grup bar=50 µm ve D: Oleuropein uygulanan grup bar=100 µm.

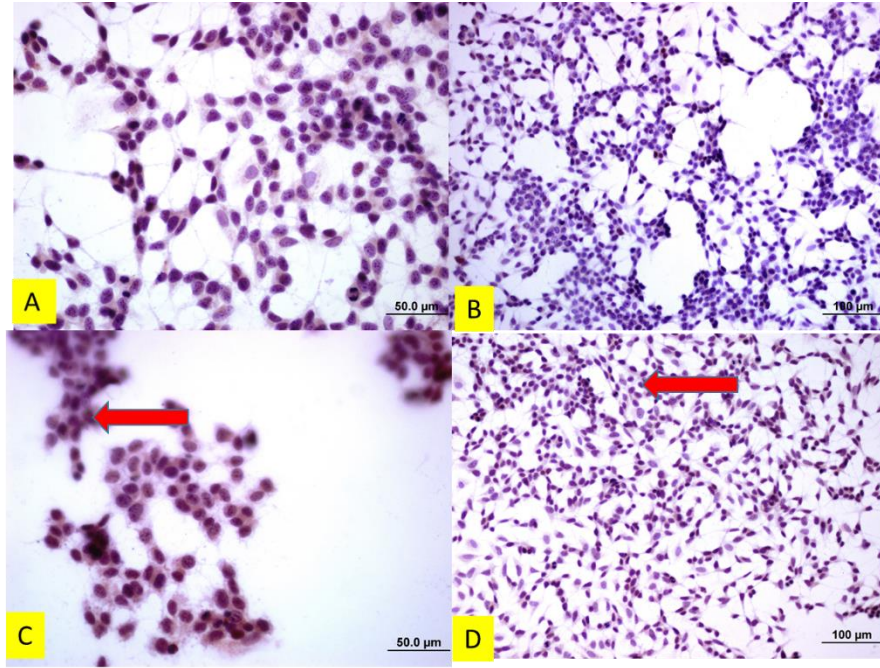


Şekil 4.17: Kaspaz 7 proteininin immünsitokimya görüntüleri. İmmünoreaksiyon (ok). A: Kontrol grubu bar=50 µm, B: Kontrol grubu bar=100 µm, C: Oleuropein uygulanan grup bar=50 µm ve D: Oleuropein uygulanan grup bar=100 µm.



Şekil 4.18: Kaspaz 9 proteininin immünsitokimya görüntüleri. İmmünoreaksiyon (*ok*).

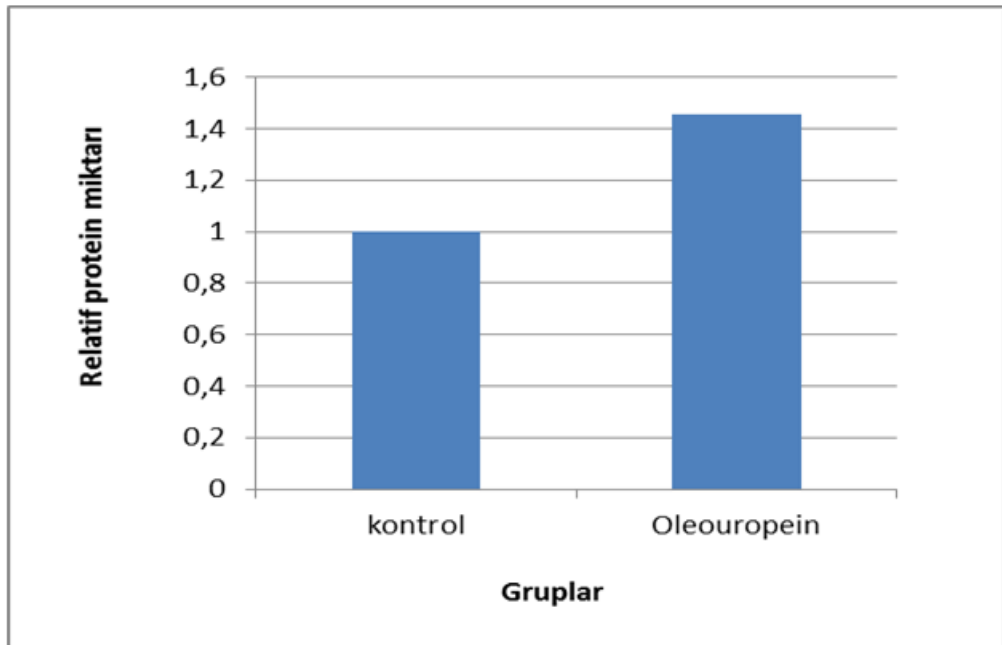
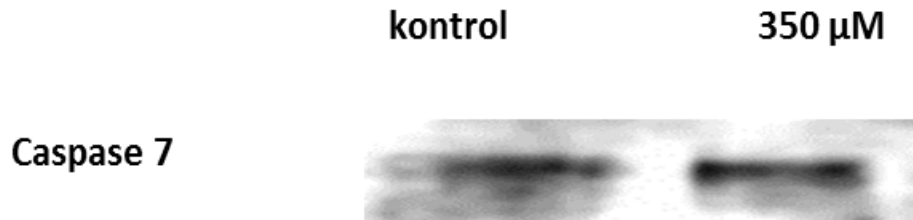
A: Kontrol grubu bar=50 µm, B: Kontrol grubu bar=100 µm, C: Oleuropein uygulanan grup bar=50 µm ve D: Oleuropein uygulanan grup bar=100 µm.



Şekil 4.19: P53 proteinin immünohistokimya görüntüleri. İmmünoreaksiyon (*ok*). A: Kontrol grubu bar=50 µm, B: Kontrol grubu bar=100 µm, C: Oleuropein uygulanan grup bar=50 µm ve D: Oleuropein uygulanan grup bar=100 µm.

4.7. Western Blot Sonuçları

Western blot sonuçlarına göre Oleuropein uyguladığımız hücrelerde reaktif cleaved kaspaz 7 protein miktarı %40'dan fazla bir oranda artış gösterdi.

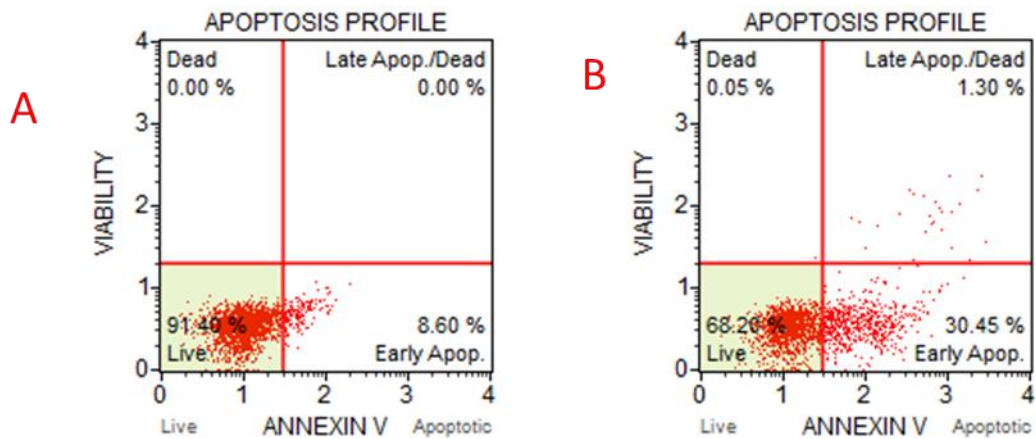


Şekil 4.20: Oleuropein uygulanan hücrelerde cleaved kaspaz 7 western blot sonuçları.

4.8. Akış Sitometresi Sonuçları

350 μ M Oleuropein uyguladığımız ve kontrol grubu olmak üzere iki SHSY-5Y hücre grubumuz vardı. Kontrol grubu hücrelerinde hücre canlılığı %91,4 bulunurken, erken apoptotik hücre oranı % 8,6 ve geç apoptotik hücre oranı %0 olmak üzere toplamda %8,6 olarak saptandı. 350 μ M Oleuropein verilen hücrelerde hücre canlılığı %68,2'e düşerken, apoptotik hücre yüzdesi erken apoptotik hücre oranı %30,45 ve geç apoptotik hücre oranı %1,3 olmak üzere %31,75 olarak; ölü hücre oranı ise %0,05 olarak bulundu (Şekil 4.22).

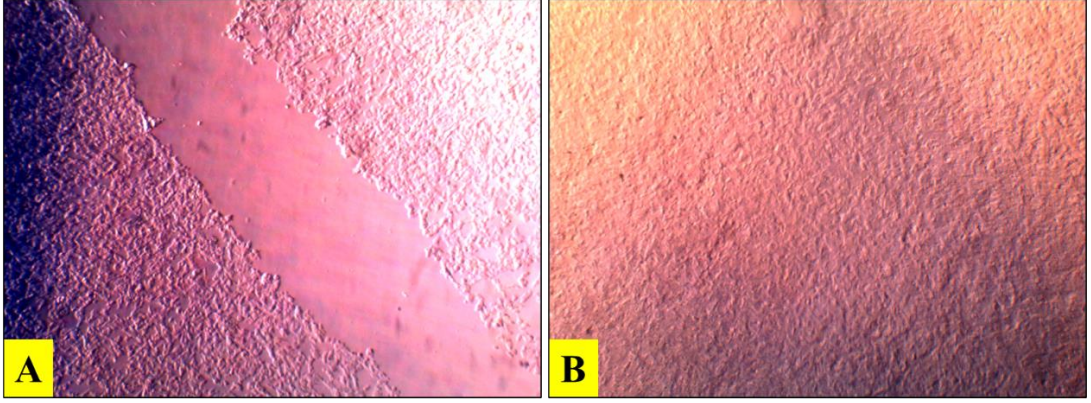
Oleuropein'in anneksin V sonuçlarına bakıldığında 350 μ M dozda hücre canlılık ve apoptoz oranlarına bakıldığında, apoptozun anlamlı şekilde arttığı görüldü.



Şekil 4.21: Akış sitometresi sonuçları. A: Kontrol grubu ve B: 350 μ M Oleuropein uygulanan grup.

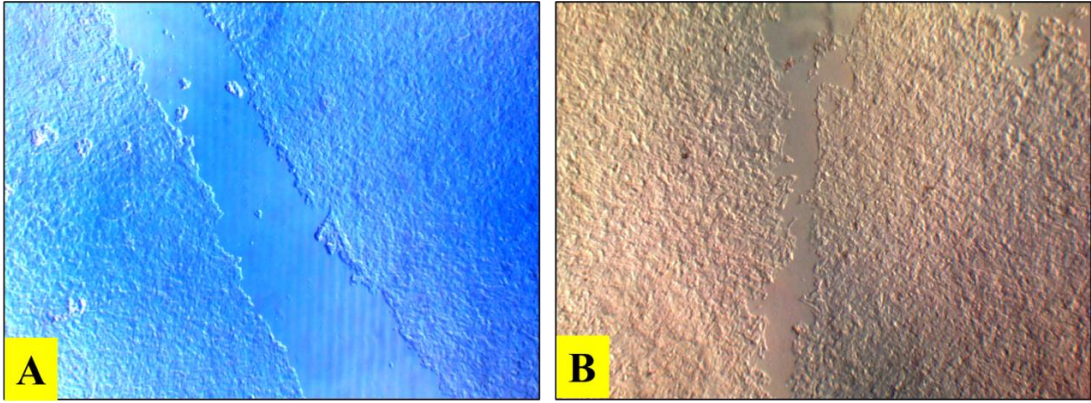
4.9. Migrasyon Deneyi Sonuçları

Yaptığımız migrasyon testinde Oleuropein'in 250, 300, 350 ve 400 μ M dozları kullanıldı. Oleuropein'in 24 saatlik uygulamasında hücre hareketinin artan dozla yavaşladığı görüldü. Dolayısıyla artan dozda yara kapanma oranının azaldığı görüldü (Şekil 4.23).



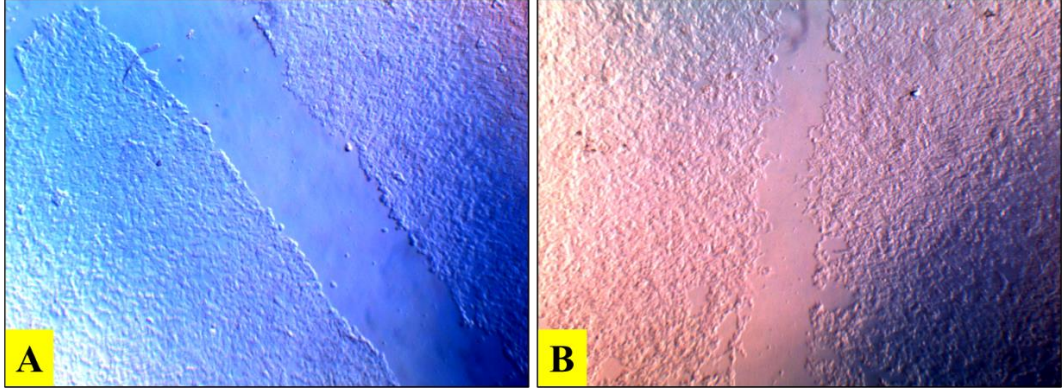
Migrasyon kontrol

Şekil 4.22: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi görüntüleri. A: Kontrol 0. saat ve B: Kontrol 24. saat. (Objektif büyütme 10X)



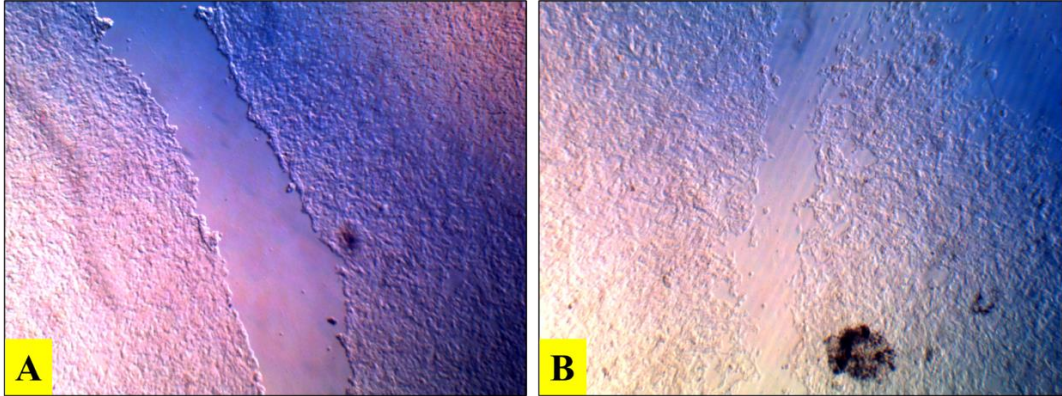
250 μ M migrasyon

Şekil 4.23: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi görüntüleri. A: 250 μ M Oleuropein 0. saat ve B: 250 μ M Oleuropein 24. saat. (Objektif büyütme 10X)



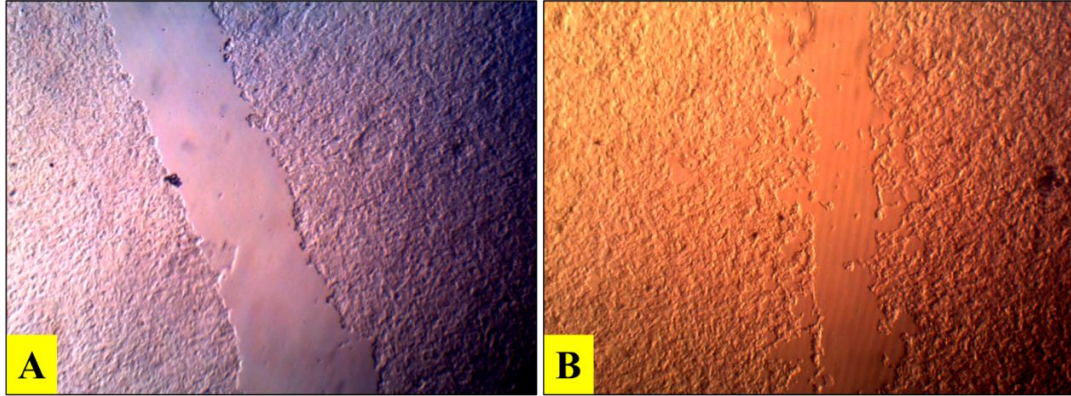
300 μ M migrasyon

Şekil 4.24: : SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi görüntüleri. A: 300 μ M Oleuropein 0. saat ve B: 300 μ M Oleuropein 24. saat. (Objektif büyütme 10X)



350 μ M migrasyon

Şekil 4.25: SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi görüntüleri. A: 350 μ M Oleuropein 0. saat ve B: 350 μ M Oleuropein 24. saat. (Objektif büyütme 10X)



400 μ M migrasyon

Şekil 4.26 : SHSY-5Y hücrelerinin migrasyon deneyi görüntüleri. A: 400 μ M Oleuropein 0. saat ve B: 400 μ M Oleuropein 24. saat. (Objektif büyütme 10X)

Tablo 4.1: Çeşitli dozlarda Oleuropein verilen SHSY-5Y hücrelerinde yara iyileşme testi sonuçları. Yara iyileşme testinde Oleuropein'in yükselen dozlarında yara açıklık oranının arttığı, kapanma oranının ise azaldığı görülmüştür.

	Kontrol	250 μM	300 μM	350 μM	400 μM
0. saat	790,4 \pm 73,9	598,8 \pm 100,6	664,7 \pm 65,8	599,7 \pm 71,1	681,4 \pm 80,5
24 saat	0	298,1 \pm 23,8	412,3 \pm 72,6	437,6 \pm 89,6	528,3 \pm 119,4
Yara Açıklık Oranı (%)	0	49,8	62,0	73,0	77,5
Yara Kapanma Oranı (%)	100,0	50,2	38,0	27,0	22,5

5. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin çeşitli sebeplerden anormal şekilde çoğalmalarına bağlı gelişen kompleks bir hastalıktır. Tümörler bulunduğu dokuya bağlı olarak belirti vermekte ve bazen ölümle sonuçlanabilecek durumlara yol açmaktadır. Kanser tedavilerini daha başarılı hale getirmek için yapılan çok sayıda çalışmaların devam etmesine ve yeni tedavi yöntemleri bulunmasına karşın kanser hala ölüm sebepleri arasında ilk sıralardadır .Bir diğer handikapta mevcut kanser tedavi rejimlerinin yan etkiler, tedavi rejiminin etkisiz hale gelmesi ya da kemoterapotiklere direnç gelişmesi nedeniyle kullanılabilirliğini yitirmesidir . Alternatif tedavi protokollerinin bulunması veya yeni kimyasal, farmakolojik, biyolojik, genetik, hedefe yönelik ajanların geliştirilmesi çalışmalarının sürdürülmesini gerektirmektedir. Nöroblastoma biyolojik ve klinik olarak farklı özellikler gösteren nöral krest hücrelerinden köken alan çoğu zamanda ölümcül sonuçlara yol açan bir tümördür. Nöroblastom çocukluk çağında en sık görülen tümörlerdendir(20). Nöroblastom köken aldığı embriyolojik yapı, klinik bulguları, biyolojik yapısı, salgıladığı hormonların neden olduğu tablolar nedeniyle diğer çocukluk çağı kanserlerinden farklı bir tümördür. Nöroblastom tedavisinde kullanılan ana kemoteropatik ajan olan sisplatinin doz sınırlayıcı önemli yan etkileri nedeniyle klinikte yeni anti-tümoral ajanlara ihtiyaç vardır.

İlk olarak metastatik kemik tümör biyopsisinden elde edilen SH-SY5Y hücreleri SK-N-SH ana hattının alt grubunu oluşturur. SH-SY5Y daha olgun bir nöron tipi fenotipe farklılaşabilir. Primer nöron kültürüne göre daha kolay ve ucuzdur. Bu hücreler bir hücre hattı olarak kabul edildiğinden primer insan nöronundaki etik sorunlar yoktur.

. Zeytin ve ürünleri yüzyıllardır sağlıklı yaşam için ve muhafaza amaçlı kullanılmıştır. Akdeniz diyetinin temel yağı olan saf zeytinyağı koroner kalp hastalıklarının bu bölgedeki düşük insidansı ile ilişkilendirilmiştir (2). Bu biyolojik etkilerinin fenolik bileşiklerine bağlı olduğu bulunmuştur (56). Yapılan son çalışmalara göre kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkisinin temel olarak bir sekoiriodid olan Oleuropein'e bağlıdır (4). Zeytinin olgunlaşması ya da yağ üretimi gibi işlenmesi sırasında Oleuropein konsantrasyonunu azaltan ve Oleuropein'in ana

yıkım ürünü olan hidroksitirozol konsantrasyonunu artıran kimyasal reaksiyonlar meydana gelir.

Oleuropein antioksidan (5), antiinflamatuvar (6), antitümöral (7), antidiyabetik (8), antiaterojenik (9), antihipertansif (10), hipolipidemik (11) bir maddedir. Ayrıca hepatoprotektif (12), nöroprotektif (13) ve kardiyoprotektif (4) etkisi de vardır.

Çalışmamızda antitümöral etkinliği gösterilmiş Oleuropein'in nöroblastom hücreleri üzerinde sitotoksik ve morfolojik etkilerini sitotoksisite testleri (MTT, Nötral red, Sulforhadamine B), ışık mikroskop incelemeleri (Hematoksilen-Eozin boyama, immünohistokimyasal boyama), inverted mikroskop incelemeleri, yara iyileşmesi testi ve western blot analizleri ile inceledik.

İlk olarak flasklarda büyüttüğümüz nöroblastom hücrelerinin sitotoksisite testleriyle IC50 değerini 24 saat için 413 μM olarak bulduk. Seçme ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bu değer 48 saat için 350 μM olarak bildirilmiştir (69). Oleuropein'in osteosarkom için IC50 değeri MG63 hücreleri için 247.4–475.0 μM ve Saos2 hücreleri için 359.9-798.7 μM olarak bulunmuştur (79). HL60 insan promiyelositik lösemi hücreleri için bu değer 170 μM dır (74). Malign mezotelyoma ren hücre hattı için 22 μM 'dır (137). MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 değeri 48 saat için 600 $\mu\text{g/mL}$ bulunmuştur(138). 500–800 μM 'de Oleuropein, tüm melanom hücre hatlarının canlılığını neredeyse tamamen azaltabilen çok toksik bir etkiye neden olmuştur (139). 48 saat boyunca Oleuropein uygulanmasının (50–1.200 $\mu\text{g/mL}$), MCF-7 hücre proliferasyonunu, doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (IC50 588 $\mu\text{g/mL}$)(140). 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinde IC50 değeri 391.47 \pm 1.22 μM bulunmuştur (141). MCF-7 hücrelerinde WST-1 testi ile Oleuropein için 48. saatte bulunan bulunan IC50 değeri 247.5 μM 'dir (142). HT-29 kolon kanseri hücrelerine artan Oleuropein dozları uygulandığında IC50 değeri 600 μM olarak belirlenmiştir (143). Human gastric adenocarcinoma (AGS) hücre hattında nanooleuropeinin IC50 değeri 24saatte 23.6 $\mu\text{g/mL}$, 48saatte 15.2 $\mu\text{g/mL}$ ve 72 saatte 9.2 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır (144). MCF-7 hücrelerinde yapılan diğer çalışmalarda IC50 değeri 11.02 \pm 0.52 bulunmuştur (145). Oleuropein'in pankreas kanser hücre hattı MIA PaCa-2 için IC50 değeri 150.1 μM 'dir (146). 48 saat 600 $\mu\text{g/mL}$ Oleuropein uygulanması, hücrelerin yarısında apoptozu indüklemiştir (147).

MAT-LyLu hücreleri için yapılan çalışmada oleuropeinin (IC₅₀) değeri 47.0 ± 0.01 μM ol(148). Mao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda oleuropeinin, insan akciğer karsinomu A549 hücrelerinde IC₅₀ $59.96 \mu\text{M}$ 'de hesaplandı.(149).Al-karaki ve arkadaşlarının HT-116 kolon kanser hattında yaptığı çalışmada IC₅₀ değeri $185 \mu\text{g/ml}$ olarak bulundu(150).Altun ve arkadaşlarının LAN hücre hattında (nöroblastom kemik metastaz hücresi) yaptıkları sitotoksisite testlerinde Oleuropeinin IC₅₀ değeri $500\mu\text{M}$ olarak bulundu(151).

Nöroblastoma hücresi SH-SY5Y üzerinde yapılan deneylerde Thioridazine IC₅₀ 11 ± 1.2 , Chlorpromazine IC $50 15 \pm 2.3$, Trifluoperazine IC $50 14 \pm 2.5$, Perphenazine IC₅₀ $15 \pm 1.7i$, Fluphenazine IC $50 15 \pm 1.6$ olarak bulunmuştur (152). Nöroblastoma hücresi SH-SY5Y hücre çalışmalarında 1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) için IC₅₀ değeri 48 saatte 70.4 ± 14.8 , 72 saatte 34.2 ± 9.2 , 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) için IC₅₀ değeri 48 saatte >1000 , 72 saatte 94.2 ± 11 bulunmuştur (153). Prodigiosinin (*Serratia marcescens* bakterisinin birçok suşunun yanı sıra *Vibrio psychroerythrus* ve *Hahella chejuensis* gibi diğer Gram-negatif gama proteobakterileri tarafından üretilen kırmızı pigment) SH-SY5Y hücre hattında IC₅₀ değeri $1.5 \mu\text{M}$, sisplatinin ise $50 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir (154). SH-SY5Y hücre hattında Celecoxib (IC₅₀) $31 \mu\text{M}$, Diclofenac (IC₅₀) $68 \mu\text{M}$, SC-560 (cox-1inhibitörü)(IC₅₀) $>400 \mu\text{M}$ 'dir (155). Axitinib'in SH-SY5Y hücre hattında IC₅₀ değeri 274 nmol/L dir (156). Levkovitzin çalışmasında Paroksetinin IC₅₀ değeri $53.8 \mu\text{M}$ bulunmuştur (157). Wickström ve arkadaşları melphalan ön ilacı J1in IC₅₀ değerini 0.0028 mol/L olarak saptamışlardır (158). Samarghandian ve arkadaşları safranalın IC₅₀ değerini 48 saatte $11,1$ ve 72 saatte $23,2 \mu\text{g/mL}$ bulmuşlardır (159). 6-OHDA konsantrasyonlarının etkisi, MTT testi kullanılarak SH-SY5Y hücrelerinin canlılığı üzerinde analiz edildi. 6-OHDA'nın SH-SY5Y hücrelerinin yaşayabilirliğini azaltabildiği ve bu toksisitenin doza bağlı olduğunu görüldü. Hücre hasarını indüklemek ve oreksin-A'nın koruyucu etkilerini değerlendirmek için $\% 55.5 \pm 1.38$ nispi hücre canlılığı ile sonuçlanan $150 \mu\text{M}$ 6-OHDA seçildi. 80 pM dozundaki oreksin-A, 24 saat sonra 6-OHDA'nın neden olduğu toksisiteyi önemli ölçüde inhibe etti ve 40 pM 'de orta derecede bir etkiye sahipken, $1, 10, 20$ ve 160 pM dozunda hücre hasarını önleyemedi(160). HepG2 2.2.15 hücrelerinin Ole ile reaksiyona sokulması, HBeAg miktarı sabit kalırken, doza

bağımlı bir şekilde HBsAg ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe etti ($p < 0.05$). Ole'nin HBsAg için IC50 değeri 23,2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ idi

Daha sonra kontrol ve Oleuropein verilmiş hücreleri hematoksilin-eozin uyguladık. Oleuropein uygulanmış hücrelerde hücre morfolojisinin bozulduğu, çekirdeklerin piknotik görünümde olduğunu gördük. Literatürde Oleuropein uygulanmış SH-SY5Y hücrelerine hematoksilin-eozin uygulanması ile ilgili bir çalışma bulamadık. *In-vivo* çalışmalarda ise sisplatinin nefrotoksik etkisinin Oleuropeinle engellenebileceği gösterilmiştir (161). Ayrıca diyabet oluşturulmuş sıçanlarda Oleuropein kalbi hasardan korumuştur (162). Genç erkek farelerde yaralı cilde Oleuropein uygulanması sonrasında yapılan hematoksilin-eozin boyamasında kontrol grubuna göre daha az hücre infiltrasyonu ve daha iyi reepitelizasyon görülmüştür (163). Sisplatinle böbrekleri hasarlanmış sıçanlara Oleuropein uygulanan grupta hematoksilin-eozin boyamada kontrol grubuna göre nekroz ve tübüler dilatasyona daha az rastlanmıştır (164). Sisplatinle oluşturulmuş pankreas hasarında Oleuropein verilmiş ve hematoksilin-eozin boyamada dilate asinüsler, fibrozis, infiltrasyon, Langerhans adacıklarının fokal nekrozu, dejenerasyon gibi hasar belirtilerinin azaldığı saptanmıştır (165). Alloksanla diyabet oluşturulmuş sıçanlarda Oleuropein uygulanması sonrası hematoksilin-eozin boyamada parankimal yapının ve hepatik çatının korunduğu görülmüştür (166). Deltametrin uygulanmış sıçanlarda Oleuropein tedavisi sonrası hematoksilin-eozin boyamada Purkinje hücrelerinde piknotik çekirdek ve sitoplazmada azalma gibi dejenerasyon belirtilerinin azaldığı gözlenmiştir (167). Yüksek yağlı diyetle karaciğer yağlanması oluşturulmuş ratlarda Oleuropein tedavisinin hematoksilin-eozin boyamada mikro ve makrovakuolizasyonu azalttığı görülmüştür (168). Doksorubisin kardiyotoksitesisi oluşturulmuş gruplarda Oleuropein tedavisi miyositlerdeki vakuolizasyonu azaltmıştır (88). Ovalbümin ile pulmoner toksisite oluşturulmuş hayvanlarda Oleuropein tedavisinin havayolu fibrozunu azalttığı gösterilmiştir (169).

İmmünohistokimyasal yöntemle Bax, Bcl-2, kaspaz 3, cleaved kaspaz 7 ve 9, p53, APAF-1, bad proteinlerini de çalıştık. Bcl-2 kontrol grubunda daha fazla immünoreaksiyon gösterirken Bax, kaspaz 3, cleaved kaspaz 7 ve 9, p53, APAF-1, bad Oleuropein uygulanan hücrelerde daha fazla immünoreaksiyon gösterdi. Oleuropeinin apoptozu mitokondrial yolak aracılığıyla indüklediği Bax ve kaspaz-3

ekspresyonunu arttırdığı, Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı, 200µM oleuropein uygulanan grupta Bax/Bcl-2 oranının kontrol grubuna göre 7 kat daha yüksek olduğunu gösterilmiştir.(66). Hücre döngüsü ile apoptoz entegrasyonunu sağlayan anahtar faktör p53'dür. Esas fonksiyonu, DNA hasarlandığı zaman hücre döngüsünün dolayısıyla hücre proliferasyonunun durdurulup hücrelerin hasarı tamir etmesi için ona zaman kazandırmaktadır. Oleuropein maruziyeti ile p53 ekspresyonunda değişim, hücre döngüsünün durmasına bu şekilde katkı yapmış olabilir. Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırır ve hücre hasarlanmış DNA'sını tamir eder. Hasar tamir edilemiyorsa bu kez p53 hücreyi apoptoza götürür. p53'ün apoptozu indüklemesi Bax ekspresyonunu arttırması ve böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bad, bir çok normal hücrede bulunmaktadır Fosforile iken diğer anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştiremez. Defosforile olduğu zaman sitokrom c salınımını ve kaspazların aktifleşmesini sağlamaktadır. Nöroblastomlarda gerçekleşen apoptozun mitokondride içsel yol kaynaklı olduğunu gösteren bulgular vardır (170).

Kaspazlar apoptozun başlamasından sorumlu olan enzim grubudur. Kaspazların aktivasyonu; hücrenin çekirdeği küçülür, kromotin kondanse olur, DNA fragmente olur ve sonunda hücreler komşu hücreler tarafından sindirilir. *In-vivo* bir çalışmada spinal kord travması oluşturulmuş sıçanlarda Oleuropein tedavisi bax ekspresyonunu azaltırken bcl ekspresyonunu arttırmıştır (171). Farelerde yapılan bir çalışmada sisplatinle hasarlanmış dokuda p53, bax ekspresyonu artmış, bcl-2 ise azalmıştır; Oleuropein verilmesi p53 ve bax ekspresyonlarındaki artışı ve bcl-2 ekspresyonundaki azalışı düşürmektedir (164). Ligasyon yöntemiyle periodontit oluşturulmuş sıçanlarda Oleuropein verilmesi kaspaz 3 ekspresyonunu azaltmış, bcl-2 ekspresyonunu ise arttırmıştır (172). Delmatrin ile hasarlanmış Purkinje nöronlarında Oleuropein verilmesi bcl-2 ekspresyonunu arttırmış, bax ekspresyonunu ise azaltmıştır (167). CCl₄ uygulanarak karaciğer hasarı oluşturulmuş farelerde Oleuropein tedavisi cleaved kaspaz 3 ekspresyonunu azaltmıştır (12). Gliserol rabdomiyolizine bağlı akut böbrek hasarı oluşturulmuştur. Kontrol ve oleuropein verilen grupta caspas 3 ekspresyonu normal düzeydeydi. Hasar oluşturulan grupta caspas 3 ekspresyonu artmıştı. Hasar oluşturulmadan önce Oleuropein verilmesi kaspaz 3 ekspresyonunu azalttı (173). Deksametazon uygulanmış farelerde

Oleuropein tedavisi bax ekspresyonunu azaltmış, bcl-2 ekspresyonunu ise artırmıştır (174). MAT-LyLu prostat adenokarsinom hücre hattında Oleuropein 250 μ M ve üzerindeki dozlarda migrasyonu inhibe etmiştir (148).

Yaptığımız yara iyileşmesi testlerinde kontrol grubunun yaanında Oleuropein'in 250, 300, 350 ve 400 μ M dozlarını kullandık. Oleuropein'in artan dozlarında hücre hareketlerinin azaldığını gördük. Seçme ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yara iyileşmesi testinde kontrol ve 350 μ M dozunda Oleuropein kullanılmış, 0,16 ve 24. saatlerde alınan görüntülerde Oleuropein grubunda yara iyileşmesinin yavaşladığı görülmüştür (69). Abdin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oleuropeinin MCF-7 hücre hattının göç etme yeteneği yara iyileştirme deneyi kullanılarak belirlendi. Oleuropein ile tedavi edilen MCF - 7 hücreleri, çizilmeden 6 ve 12 saat sonra hücre göçünü inhibe etti. Oleuropein uygulanan hücrelerde, kontrol hücrelerine kıyasla boşluk kapanmasında istatistiksel açıdan önemli düşüşler gözlemlendi(138). MDA - MB - 231 meme hücresi hattında Oleuropein uygulanması doza bağlı olarak hücre migrasyonunu azaltmaktadır (119). Przychodzen ve arkadaşlarının Oleuropeinin antimigratuar etkilerini 143B OS hücrelerinde inceledikleri çalışmada 60 saatlik inkübasyondan sonra, kontrol grubunda yara tamamen kapandı.100 μ M oleuropein, 10 μ M 2-ME (2-methoxyestradiol) uygulanan grupta kontrol ile karşılaştırıldığında 143B OS hücrelerinin göçü yavaşlamıştır. 43B OS kontrol hücrelerinin 48 saatlik göç hızı $7,1 \pm 5,9 \mu\text{m} / \text{saat}$ olarak belirlenmiştir. 48 saat için 10 μ M 2-ME uygulanan hücrede göç oranı $12,0 \pm 4,0 \mu\text{m} / \text{saat}$ bulundu. Oleuropein (100 μ M) uygulaması 143B OS hücre göçünü tamamen inhibe etti.100 μ M oleuropein, 10 μ M 2-ME (2-methoxyestradiol) uygulanan grupta $1,7 \pm 2,4 \mu\text{m} / \text{saat}$ bulundu(175).

Tünel boyasıyla yaptığımız apoptoz incelemesinde oleuropein uygulamadığımız SH-SY5Y hücrelerine göre 350 μ M Oleuropein uyguladığımız hücrelerde daha yoğun apoptoz gözlenmiştir. Seçme ve arkadaşlarının yaptığı tünel çalışmasıyla Oleuropeinin SH-SY5Y hücre dizisindeki apoptotik etkisi değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla oleuropein uygulanan grupta apoptozda artış gözlemlendi. Kontrol % $8 \pm 1,02$ ve oleuropein % $36,4 \pm 3,27$ (69). 22Rv1 hücrelerinde, kontrole kıyasla doza bağımlı bir şekilde Oleuropein uygulanmış hücrelerde apoptozda artış gözlemlendi(141). Sıçanlarda yapılan çalışmada sahte

ameliyat edilen grupta neredeyse hiç Tunel pozitif hücre tespit edilemedi; oysa travma grubundan elde edilen dokularda birçok hücre (0.77 ± 0.04) yoğun şekilde boyanmıştır. Oleuropein uygulanan sıçanlardan elde edilen dokularda az sayıda Tunel pozitif hücre tespit edildi (0.22 ± 0.05)(171). İskemi reperfüzyon hasarı uygulanmış sıçanlarda yapılan tünel çalışmasında Sham grubunda az sayıda Tunel pozitif ölü hücre bulundu. Deney grubunun iskemik bölgesindeki hücre kaybı indeksi, sham grubuna kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Deney grubuna Oleuropein uygulaması Tünel-pozitif hücreleri önemli ölçüde azaltmıştır(176).

Yaptığımız western blot çalışmasında kaspaz 7'nin Oleuropein verilen grupta kontrol grubuna göre 1:1.4 oranında eksprese olduğunu gördük. Seçme ve arkadaşlarının yaptığı western blot çalışmasında 350 μ M Oleuropein verilen SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubuna göre CCND1 ve bcl-2 protein ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir (69). Oleuropein uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde GAP43 proteiniyle yapılan western blot çalışmasında protein miktarının azaldığı görülmüştür.(177). MIA PaCa-2 (Pankreas kanser hücre hattı) na Oleuropein uygulanması sonrası yapılan western blot çalışmasında bax ve bcl-2 protein miktarının azaldığı, bak'ın miktarında ise önemli bir değişiklik olmadığı; HPDE'de (pankreas kanser hücre hattı) bax ve bak miktarında azalma, bcl-2'de ise artış görüldüğü bildirilmiştir (146). Malign glioma hücrelerine Oleuropein uygulanması sonrası yapılan western blot analizinde bax ekspresyonu artmış, bcl-2 ise azalmıştır (178). Western blot analizi, 48 saatte angelisinin, SH-SY5Y hücrelerinde anti-apoptotik bcl-2, bcl-xL ve mcl-1 miktarlarını azalttığını göstermiştir (179). Western blot analizi 48 saat boyunca oleuropein ile tedavi üzerine SK-N-SH hücrelerinin süpernatantlarında sAPPa seviyelerinde maksimum altı kat artış gözlendi(110). Yan ve arkadaşlarının HCC üzerinde yaptıkları western blot çalışmasında BAX proteini artmış ve Bcl-2'nin azalmıştır. Bu, oleuropeinin, HCC hücre apoptozunu indüklediğini ve bu ilerlemeye, mitokondriyal proteinlerin ekspresyonunun düzenlenmesine ek olarak kaspazların aktivasyonu yoluyla aracılık edildiğini göstermektedir(180). Liu ve arkadaşlarının yaptığı western blot çalışmasında oleuropein uygulanan U251 ve A172 hücrelerinde Bcl-2'nin miktarı azalırken Bax miktarı arttı(178). HIF-1 α , hücre hareketi adhezyonu süreçlerinde yer alan genlerin düzenlenmesinde görevlidir. Cardeno ve arkadaşlarının HT-29 kolon kanser hücre

hattı üzerindeki yaptığı çalışmada HIF-1 α protein ekspresyonu oleuropein uygulanmasından sonra önemli ölçüde azaldı. HIF-1 α protein azalması, kontrol ile karşılaştırıldığında 400 ve 800 μ M Oleuropein verilmesinden 2 saat sonra tespit edilebildi. Aynı çalışmada p53 protein ekspresyonu, 48 saatlik 800 μ M Oleuropein uygulanmasından sonra önemli ölçüde artmıştır(181).Chimento ve arkadaşlarının 100 μ M Oleuropein uygulanan SKBR3 ER negatif meme kanser hücre hattında yaptığı western blot çalışmasında p21 ve p53 proteinin arttığı siklin D1'in ise azaldığı görüldü(182).Elamin ve arkadaşlarının 200 μ M oleuropein uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda kaspaz-3'ün aktif formunun, 72 saatlik grupta 14,8 kat yükseldiği görüldü. Aynı çalışmada 72 saatlik grupta pro-apoptotik Bax proteini seviyesi artarken, anti-apoptotik Bcl-2 proteini seviyesi düşmüştür (66).Grossi ve arkadaşlarının N2a nöroblastoma hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada çeşitli zaman periyotları boyunca artan miktarlarda oleuropein kullanıldı. 90 μ M oleuropein uygulanan hücrelerde, 6 saatlik muameleden sonra kontrol hücrelerine kıyasla daha yüksek Beclin 1 ve p62 miktarı gözlemlendi(111).

Yaptığımız akış sitometri çalışmamızda 350 μ M Oleuropein uyguladığımız ve kontrol grubu olmak üzere iki SHSY-5Y grubumuz vardı. Kontrol grubu hücrelerinde hücre canlılığı %91,4 bulunurken, apoptotik hücre yüzdesi erken apoptotik hücre oranı % 8,6 ve geç apoptotik hücre oranı %0 olmak üzere toplamda %8,6 olarak saptanmıştır. 350 μ M Oleuropein verilen hücrelerde ise hücre canlılığı %68,2'e düşerken, apoptotik hücre yüzdesi erken apoptotik hücre oranı %30,45 ve geç apoptotik hücre oranı %1,3 olmak üzere toplamda %31,75; ölü hücre oranı da %0,05 olarak bulunmuştur. Akış sitometri çalışmasında CHP-134 hücre hattındaki OLE'nin IC50 dozu %12 apoptotik hücre ölümü, %45 nekrotik hücre ölümü, LAN5 hücre hattında, OLE'nin IC50 dozu % 10 apoptotik hücre ölümü ve% 3 nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanmıştır (151). Oleuropein MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (200, 275 ve 312 μ g/mL) uygulandığında ve 48 saat sonra yapılan akış sitometri çalışmasında apoptoz oranının kontrol hücrelerine kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmüştür (183).Yapılan akış sitometri çalışmasında toplam apoptotik HepG2 hücreleri kontrol grubunda %15.96 \pm 0.81'den 1400 μ g/mL zeytin özütü ilavesinden sonra %72,46 \pm 4,5'e yükselmiştir. Benzer şekilde, Caco-2 hücre hattında, toplam apoptotik hücreler 1000 μ g/mL özüte yanıt olarak %7,5 \pm

0,5'ten % $38,35 \pm 3,41$ 'e yükselmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında yapılan akış sitometri çalışmalarında Oleuropein'in artan dozlarda apoptotik hücre oranının da arttığı gösterilmiştir (119). U251 glioblastoma hücre hattında yapılan çalışmada apoptotik hücre oranı %1,17'den (0 μ M Oleuropein) %8,92'ye (200 μ M Oleuropein) ve %15,46'ya (400 μ M Oleuropein) yükselmiştir (178). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında yapılan akış sitometri çalışmasında ise apoptotik hücre oranı kontrol grubunda %6 iken Oleuropein uygulanan grupta %40 olarak ölçülmüştür (184). Nassir ve arkadaşlarının çalışmasında, Yüzde Annexin V bağlanması Oleuropein grubunda kontrole (6.55 ± 0.95) kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti (% 27.9 ± 1.63). (141). MCF-7 hücre hattında yapılan çalışmada kontrol grubuna göre erken apoptotik evredeki hücrelerin %1,70'den %14,85'e, kontrol grubuna göre geç apoptotik evredeki değerinin %31,60'dan %40,15'e çıktığı gözlemlendi. (142). MCF-7 hücrelerinde indüklenen hücre ölümü tipini belirlemek için Annexin V - PI boyama testi ve ardından akış sitometrisi kullanıldı. Toplam 500.000 hücre, 48 saat boyunca üç farklı oleuropein konsantrasyonuyla (200, 600, 1000 μ g / mL) uygulandı. Apoptoz yüzdesi, erken ve geç apoptoz oranlarının toplamı olarak hesaplandı. Sonuçlar farklı oleuropein konsantrasyonlarının, MCF-7 hücreleri üzerinde doza bağlı bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterdi (138). 48 saat boyunca tek başına DOX (0.05-0.5 μ M) ve DOX (0.05-0.5 μ M) + OLEU (300 μ g / ml) uygulandı. 0.05, 0.2 ve 0.5 uM DOX ile tedavi edilen hücreler ve apoptoz yüzdesi (erken ve geç apoptozun toplamı) sırasıyla % 6.97, % 36.06 ve % 55.37 idi. 0.05, 0.2 ve 0.5 uM DOX ile işlenmiş hücrelerde geç / erken apoptoz oranı sırasıyla 0.95, 0.74 ve 1.5 idi. Oysa birlikte tedavi grubunda bu oran 1.2, 1.19 ve 4.43'tür. Bu nedenle, DOX - OLEU'nun birlikte tedavisi, tek başına DOX tedavisine kıyasla geç / erken apoptoz oranını artırmıştır (140). 30 μ M oleuropein ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde Annexin V-FITC / PI boyaması ile değerlendirildi. 48 saatlik tedavinin ardından, HepG2 hücrelerinin önemli bir yüzdesinin apoptoza uğradığı gözlemlendi (180). Zhao ve arkadaşlarının yenidoğan sıçandan elde edilmiş kardiyomiyositte yaptığı çalışmada kontrol hücrelerinin apoptoz oranı sadece % 4.7 ± 0.6 idi. İskemi grubunda, kontrol hücrelerine kıyasla apoptoz oranında % $61,3 \pm 12,3$ 'e önemli bir artışa neden olurken, oleuropein tedavisi apoptoz oranını 100 μ g / mL'de % $44,5 \pm 16,4$, 200 μ g / mL 'de % $35,7 \pm 6,8$ ve 400 μ g / mL % $20,1 \pm 4,9$

oranında önemli ölçüde düşürmüştür(185). Elamin ve arkadaşlarının yaptığı flowsitometri Oleuropein (200 μ M),% 50'den fazla MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu tetiklerken, MCF-7'nin% 5'inden azı aynı doza yanıt olarak apoptotik olmuştur. Apoptotik hücrelerin oranı, 300 μ M oleuropein ile tedavi edildiğinde MCF-7 hücrelerinin% 25'ine ulaşmıştır. 200 μ M oleuropein uygulanan hücrelerde nekroz oranı MDA-MB-231 hücrelerinde% 20'ye ulaştı ve MCF-7 hücrelerinde sadece% 5 idi. Bu oran, 300 μ M oleuropeine yanıt olarak MCF-7 hücrelerinin% 30'una ulaştı. Maksimum hücre ölüm oranlarına MDA-MB-231 için 72 saatlik tedaviden sonra ulaşıldı(66).

Konfokal mikroskop incelememiz sonucunda kontrol grubundaki hücreler normal büyüklükte ve şekilde sitoplazmaya ve çekirdeğe sahip iken Oleuropein uyguladığımız hücrelerde çeşitli dejenerasyonlar gözlenmiştir. Rigacci ve arkadaşlarının yaptığı konfokal mikroskopi çalışmasında AMPK inhibitörü Bileşik (CC)'in, SH-SY5Y'de kendi başına otofajiyi indüklediği ve Oleuropein kaynaklı otofajiyi (AMPK aracılı olduğu için) azalttığı görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada oleuropein uygulanmış hücrelerde sitozolik Ca^{+2} artışı ve AMPK fosforilasyonu arasında geçici bir korelasyon olduğu konfokal mikroskop çalışmasıyla gösterildi(186). PC12 feokromastroma hücre hattında yapılan konfokal mikroskop çalışmasında Oleuropeinin lizozom sayılarını etkilemese de asiditesini azalttığı görülmüştür (187).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Yapılan sitotoksosite testlerinden MTT’de anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Oleuropein’in MTT ile reaksiyona girdiği düşünöldü.
- Diğer sitotoksosite testlerinden nötral kırmızısı ve sulforhodamine–B de istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi. IC50 değeri 413 µM olarak bulundu.
- Hematoksilen-eozin boyamada çeşitli dozlarda Oleuropein verdiğimiz hücrelerin hacimsel olarak küçöldüğü, yoğunluğunda azalma olduğı ve çekirdeğinin piknotik bir görünüm aldığı gözlemlendi.
- İmmünsitokimyasal boyamada apoptotik proteinlerin ekspresyonunun Oleuropein uygulanmasıyla arttığı, antiapaptotik protein bcl-2 ekspresyonunun ise azaldığı göröldü.
- İverted mikroskop görüntölemede Oleuropeinin artan dozlarında hücrelerin yoğunluğunun azaldığı gözlendi.
- Western blot çalışmasında kaspaz 7 protein miktarı tayin edilmiştir. Oleuropein verilen grupta protein miktarının arttığı göröldü.
- Yara iyileşmesi deneyinde Oleuropein’in artan dozlarında yara iyileşmesinde yavaşlama olduğı göröldü.
- Sonuç olarak, Oleuropein’in nöroblastom hücrelerindeki saptadığımız olumlu etkileri nedeniyle bu maddenin nöroblastom tedavisinde yararlı olabileceğini ve bu konuda ileri çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Soler- Rivas, C., J.C. Espín, and H.J. Wichers. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 2000; 80 (7): 1013-1023.
2. Estruch, R., et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of internal medicine*. 2006; 145 (1): 1-11.
3. Jensen, S.R., H. Franzyk, and E. Wallander. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*. 2002; 60 (3): 213-231.
4. Omar, S.H. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2010; 18 (3): 111-121.
5. Fabiani, R., et al. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *The Journal of Nutrition*. 2008; 138 (8): 1411-1416.
6. Visioli, F., S. Bellosta, and C. Galli. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life sciences*. 1998; 62 (6): 541-546.
7. Hamdi, H.K. and R. Castellon. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical biophysical research communications*. 2005; 334 (3): 769-778.
8. Kaeidi, A., et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: in vitro and in vivo studies. *Journal of ethnopharmacology*. 2011; 136 (1): 188-196.
9. Carluccio, M.A., et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet

- phytochemicals. *Arteriosclerosis, thrombosis, vascular biology*. 2003; 23 (4): 622-629.
10. Nekooeian, A.A., A. Khalili, and M.B. Khosravi. Effects of oleuropein in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: a study of antihypertensive mechanisms. *Journal of Asian natural products research*. 2014; 16 (9): 953-962.
 11. Nakbi, A., et al. Hypolipidemic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fractions in 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutrition*. 2012; 28 (1): 81-91.
 12. Domitrović, R., et al. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacological research*. 2012; 65 (4): 451-464.
 13. Bazoti, F.N., et al. Noncovalent interaction between amyloid- β -peptide (1–40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006; 17 (4): 568-575.
 14. Hassan, Z.K., et al. Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013; 14 (11): 6739-6742.
 15. Kendall, M., et al. Zero effect of multiple dosage of olive leaf supplements on urinary biomarkers of oxidative stress in healthy humans. *Nutrition*. 2009; 25 (3): 270-280.
 16. Arantes-Rodrigues, R., et al. High doses of olive leaf extract induce liver changes in mice. *Food chemical toxicology*. 2011; 49 (9): 1989-1997.
 17. Junqueira, L.C. and A.L. Mescher, *Junqueira's basic histology: text & atlas*/Anthony L. Mescher. 2019: New York [etc.]: McGraw-Hill Medical. 161-192.
 18. Pawlina, W. and M.H. Ross, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 2018: Lippincott Williams & Wilkins. 352-372.
 19. Moore, K.L., et al., *Klinik yönleri ile insan embriyolojisi*. 2016: Nobel Tıp Kitabevleri. 379-415.
 20. Park, J.R., A. Eggert, and H. Caron. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatric Clinics of North America*. 2008; 55 (1): 97-120.
 21. Maris, J.M. Recent advances in neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2010; 362 (23): 2202-2211.

22. Carlsen, N. How frequent is spontaneous remission of neuroblastomas? Implications for screening. *British journal of cancer*. 1990; 61 (3): 441.
23. Kovalevich, J. and D. Langford, Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology, in *Neuronal cell culture*. 2013, Springer. p. 9-21.
24. Sadler, T.W., *Langman's medical embryology*. 2017: Lippincott Williams & Wilkins. 307-341.
25. Kumar, V., A.K. Abbas, and J.C. Aster, *Robbins basic pathology* 2018: Elsevier Health Sciences. 881-888.
26. Maris, J.M., et al. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007; 369 (9579): 2106-20.
27. London, W., et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology*. 2005; 23 (27): 6459-6465.
28. Knudson Jr, A.G. and L.C. Strong. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *American journal of human genetics*. 1972; 24 (5): 514.
29. Mossé, Y.P., et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008; 455 (7215): 930.
30. George, R.E., et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. 2008; 455 (7215): 975.
31. Mosse, Y.P., et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2004; 75 (4): 727-730.
32. Capasso, M., et al. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nature genetics*. 2009; 41 (6): 718.
33. Maris, J.M., et al. Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358 (24): 2585-2593.
34. Diskin, S.J., et al. Copy number variation at 1q21. 1 associated with neuroblastoma. *Nature*. 2009; 459 (7249): 987.
35. Cohn, S.L., et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG task force report. *Journal of clinical oncology*. 2009; 27 (2): 289.
36. Monclair, T., et al. The international neuroblastoma risk group (INRG) staging system: an INRG task force report. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27 (2): 298.

37. Schmid, I., et al. Dead cell discrimination with 7- amino- actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. 1992; 13 (2): 204-208.
38. Seeger, R.C., et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *New England Journal of Medicine*. 1985; 313 (18): 1111-1116.
39. Wei, J.S., et al. Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma. *Cancer research*. 2004; 64 (19): 6883-6891.
40. Janoueix-Lerosey, I., et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *Clin Oncol*. 2009; 27 (7): 1026-1033.
41. Pearson, A.D., et al. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *The lancet oncology*. 2008; 9 (3): 247-256.
42. Kushner, B.H., et al. Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age. *Journal of Clinical Oncology*. 1994; 12 (12): 2607-2613.
43. Garaventa, A., et al. A phase II study of topotecan with vincristine and doxorubicin in children with recurrent/refractory neuroblastoma. *Cancer letters*. 2003; 98 (11): 2488-2494.
44. Matthay, K.K., et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341 (16): 1165-1173.
45. Cheung, N.-K.v., et al. Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *Journal of clinical oncology*. 1987; 5 (9): 1430-1440.
46. Barker, E., et al. Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer research*. 1991; 51 (1): 144-149.
47. Matthay, K.K., et al. Phase II study on the effect of disease sites, age, and prior therapy on response to iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy in refractory neuroblastoma. *Journal of clinical oncology*. 2007; 25 (9): 1054-1060.
48. Ross, R.A., B.A. Spengler, and J.L. Biedler. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983; 71 (4): 741-747.

49. Encinas, M., et al. Sequential treatment of SH- SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of neurochemistry*. 2000; 75 (3): 991-1003.
50. Lopes, F.M., et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*. 2010; 1337: 85-94.
51. Tosetti, P., V. Taglietti, and M. Toselli. Functional changes in potassium conductances of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during in vitro differentiation. *Journal of neurophysiology*. 1998; 79 (2): 648-658.
52. Pålman, S., et al. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell differentiation*. 1984; 14 (2): 135-144.
53. Xie, H.-r., L.-s. Hu, and G.-y. Li. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal*. 2010; 123 (8): 1086-1092.
54. Melino, G., et al. Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *Journal of neuro-oncology*. 1997; 31 (1-2): 65-83.
55. MURPHY, N.P., S.G. BALL, and P.F. VAUGHAN, *Potassium-and carbachol-evoked released of [3H] noradrenaline from human neuroblastoma cells, SH-SY5Y*. 1990, Portland Press Limited.
56. Visioli, F., A. Poli, and C. Gall. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*. 2002; 22 (1): 65-75.
57. Hassen, I., H. Casabianca, and K. Hosni. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. *Journal of Functional Foods*. 2015; 18: 926-940.
58. SHASHA, B. and J. LEIBOWITZ. On the Oleuropein, the Bitter Principle of Olives¹. *The Journal of Organic Chemistry*. 1961; 26 (6): 1948-1954.
59. Shamshoum, H., F. Vlavcheski, and E. Tsiani. Anticancer effects of oleuropein. *Biofactors*. 2017; 43 (4): 517-528.
60. Deng, R.-X., et al. Chemical constituents from *Syringa pubescens* Turcz. *Biochemical Systematics Ecology*. 2010; 38 (4): 813-815.

61. Tattini, M., et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*. 2004; 163 (3): 547-561.
62. Teerarak, M., C. Laosinwattana, and P. Charoenying. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology*. 2010; 101 (14): 5677-5684.
63. Iossifova, T., B. Vogler, and I. Kostova. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus ornus* bark. *Phytochemistry*. 1998; 49 (5): 1329-1332.
64. Han, J., et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*. 2009; 59 (1): 45-53.
65. Sirianni, R., et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF- 7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular nutrition food research*. 2010; 54 (6): 833-840.
66. Elamin, M.H., et al. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food chemical toxicology*. 2013; 53: 310-316.
67. Fernández-Arroyo, S., et al. Application of nanoLC-ESI-TOF-MS for the metabolomic analysis of phenolic compounds from extra-virgin olive oil in treated colon-cancer cells. *Journal of pharmaceutical biomedical analysis*. 2012; 63: 128-134.
68. Carrera-González, M., et al. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in food science technology*. 2013; 31 (2): 92-99.
69. Seçme, M., et al. Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Gene*. 2016; 585 (1): 93-99.
70. Fares, R., et al. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2011; 66 (1): 58-63.
71. Kyriakopoulou, K., et al. Oleuropein protects HepG2 cells against oxidative stress-induced DNA damage. *Toxicology Letters*. 2012; (211): S106.
72. Mijatovic, S.A., et al. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *International journal of cancer*. 2011; 128 (8): 1955-1965.

73. Goulas, V., et al. Phytochemicals in olive- leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular nutrition food research*. 2009; 53 (5): 600-608.
74. Anter, J., et al. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*. 2011; 723 (2): 165-170.
75. Grawish, M.E., M.M. Zyada, and A.R. Zaher. Inhibition of 4-NQO-induced F433 rat tongue carcinogenesis by oleuropein-rich extract. *Medical Oncology*. 2011; 28 (4): 1163-1168.
76. Bulotta, S., et al. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2013; 51 (1): 181-189.
77. Acquaviva, R., et al. Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International journal of oncology*. 2012; 41 (1): 31-38.
78. Goldsmith, C., et al. Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules*. 2015; 20 (7): 12992-13004.
79. Moran, J.M., et al. Antiproliferative properties of oleuropein in human osteosarcoma cells. *Natural product communications*. 2016; 11 (4): 1934578X1601100418.
80. Cicerale, S., et al. Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical reviews in food science nutrition*. 2008; 49 (3): 218-236.
81. Mancebo-Campos, V., M.D. Salvador, and G. Fregapane. Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40 C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food chemistry*. 2014; 150: 374-381.
82. Lee, O.-H., et al. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource technology*. 2009; 100 (23): 6107-6113.
83. Czerwińska, M., A.K. Kiss, and M. Naruszewicz. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food chemistry*. 2012; 131 (3): 940-947.
84. Bulotta, S., et al. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *J Food chemistry*. 2011; 127 (4): 1609-1614.

85. Čabarkapa, A., et al. Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicology in Vitro*. 2014; 28 (3): 451-456.
86. Parzonko, A., et al. 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; 20 (12): 1088-1094.
87. Al-Azzawie, H.F. and M.-S.S. Alhamdani. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life sciences*. 2006; 78 (12): 1371-1377.
88. Andreadou, I., et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of molecular cellular cardiology*. 2007; 42 (3): 549-558.
89. Oliveras-López, M.-J., et al. Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Archives of gerontology geriatrics*. 2013; 57 (2): 234-242.
90. Rocha, B.S., et al. Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. *Toxicology in Vitro*. 2009; 265 (1-2): 41-48.
91. Odiatou, E.M., A.L. Skaltsounis, and A.I. Constantinou. Identification of the factors responsible for the in vitro pro-oxidant and cytotoxic activities of the olive polyphenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Cancer letters*. 2013; 330 (1): 113-121.
92. Giner, E., et al. Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *Journal of natural products*. 2013; 76 (6): 1113-1120.
93. Quiñones, M., M. Miguel, and A. Aleixandre. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological research*. 2013; 68 (1): 125-131.
94. Impellizzeri, D., et al. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochemical pharmacology*. 2012; 83 (10): 1413-1426.
95. Caramia, G., et al. Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics. *European journal of lipid science technology*. 2012; 114 (4): 375-388.
96. Dell'Agli, M., et al. Olive oil phenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor- κ B signaling. *Journal of agricultural food chemistry*. 2010; 58 (4): 2246-2252.

97. Smith, C.E. Plant oils and cardiometabolic risk factors: The role of genetics. *Current nutrition reports*. 2012; 1 (3): 161-168.
98. Urpi-Sarda, M., et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacological research*. 2012; 65 (6): 577-583.
99. Ebaid, G.M., et al. Effects of olive oil and its minor phenolic constituents on obesity-induced cardiac metabolic changes. *Nutrition journal*. 2010; 9 (1): 46.
100. Susalit, E., et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine*. 2011; 18 (4): 251-258.
101. Bester, D., et al. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutrition Research Reviews*. 2010; 23 (2): 334-348.
102. Stock, J. HDL function and cardiovascular risk: Debate continues.... *Atherosclerosis*. 2013; 229 (1): 38-41.
103. Fuentes, E. and I. Palomo. Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions. *Journal of Functional Foods*. 2014; 6: 73-81.
104. Abe, R., et al. Olive oil polyphenol oleuropein inhibits smooth muscle cell proliferation. *European Journal of Vascular Endovascular Surgery*. 2011; 41 (6): 814-820.
105. De Nicoló, S., et al. Effects of olive polyphenols administration on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the mouse brain. *Nutrition*. 2013; 29 (4): 681-687.
106. Dekanski, D., et al. Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. *Phytomedicine*. 2011; 18 (13): 1137-1143.
107. Mohagheghi, F., et al. 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): 170-175.
108. Daccache, A., et al. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry international*. 2011; 58 (6): 700-707.
109. Bazoti, F.N., et al. Localization of the noncovalent binding site between amyloid- β -peptide and oleuropein using electrospray ionization FT-ICR mass

- spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2008; 19 (8): 1078-1085.
110. Kostomoiri, M., et al. Oleuropein, an anti-oxidant polyphenol constituent of olive promotes α -secretase cleavage of the amyloid precursor protein (A β PP). *Cellular molecular neurobiology*. 2013; 33 (1): 147-154.
 111. Grossi, C., et al. The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PLoS one*. 2013; 8 (8): e71702.
 112. Pasban-Aliabadi, H., et al. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein. *Rejuvenation research*. 2013; 16 (2): 134-142.
 113. Lin, H., et al. Protective effects of *Ligustrum lucidum* fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2007; 111 (1): 129-136.
 114. Fang, H.-L., J.-T. Lai, and W.-C. Lin. Inhibitory effect of olive oil on fibrosis induced by carbon tetrachloride in rat liver. *Clinical Nutrition*. 2008; 27 (6): 900-907.
 115. Alirezaei, M., et al. Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats. *Journal of physiology biochemistry*. 2012; 68 (4): 583-592.
 116. Motilva, V., et al. Mechanisms of increased gastric protection after NSAID-administration in rats consuming virgin olive oil diets. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition Metabolism*. 2008; 3 (1): e9-e16.
 117. Mootosamy, A. and M.F. Mahomoodally. Ethnomedicinal application of native remedies used against diabetes and related complications in Mauritius. *Journal of ethnopharmacology*. 2014; 151 (1): 413-444.
 118. Hamden, K., et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-biological interactions*. 2009; 180 (3): 421-432.
 119. Liu, L., et al. Oleuropein induces apoptosis via abrogating NF- κ B activation cascade in estrogen receptor-negative breast cancer cells. 2019; 120 (3): 4504-4513.
 120. Park, J.-H., et al. Olive leaf down-regulates the oxidative stress and immune dysregulation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Nutrition Research Reviews*. 2013; 33 (11): 942-951.

121. Visen, P., et al. Acute effects of *Fraxinus excelsior* L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers. *Journal of ethnopharmacology*. 2009; 126 (2): 226-232.
122. Jemai, H., et al. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*. 2008; 176 (2-3): 88-98.
123. Drira, R., S. Chen, and K. Sakamoto. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3 T3-L1 cells. *Life sciences*. 2011; 89 (19-20): 708-716.
124. Priore, P., L. Siculella, and G.V. Gnoni. Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2014; 25 (7): 683-691.
125. Farràs, M., et al. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013; 24 (7): 1334-1339.
126. Park, S., et al. Oleuropein attenuates hepatic steatosis induced by high-fat diet in mice. *Journal of hepatology*. 2011; 54 (5): 984-993.
127. Masella, R., et al. Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids*. 2001; 36 (11): 1195-1202.
128. Flemmig, J., et al. *Olea europaea* leaf (Ph. Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine*. 2011; 18 (7): 561-566.
129. Santiago-Mora, R., et al. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporosis international*. 2011; 22 (2): 675-684.
130. Pitozzi, V., et al. Effects of dietary extra-virgin olive oil on behaviour and brain biochemical parameters in ageing rats. *British Journal of Nutrition*. 2010; 103 (11): 1674-1683.
131. Perugini, P., et al. Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation. *International journal of cosmetic science*. 2008; 30 (2): 113-120.
132. Jacomelli, M., et al. Dietary extra-virgin olive oil rich in phenolic antioxidants and the aging process: long-term effects in the rat. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010; 21 (4): 290-296.

133. DESEADCH, O. Therapeutic effects of oleuropein on wounded skin in young male BALB/c mice. *Wounds*. 2014; 26 (3): 83-88.
134. Zare, L., et al. Oleuropein, Chief Constituent of Olive Leaf Extract, Prevents the Development of Morphine Antinociceptive Tolerance through Inhibition of Morphine- induced L- type Calcium Channel Overexpression. *Phytotherapy research*. 2012; 26 (11): 1731-1737.
135. Cvjetićanin, T., et al. Dried leaf extract of *Olea europaea* ameliorates islet-directed autoimmunity in mice. *British journal of nutrition*. 2010; 103 (10): 1413-1424.
136. Vermes, I., et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. 1995; 184 (1): 39-51.
137. Marchetti, C., et al. Oleuropein-enriched olive leaf extract affects calcium dynamics and impairs viability of malignant mesothelioma cells. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 2015; 2015.
138. Abtin, M., et al. Simultaneous downregulation of miR- 21 and miR- 155 through oleuropein for breast cancer prevention and therapy. 2018; 119 (9): 7151-7165.
139. Ruzzolini, J., et al. Oleuropein, the main polyphenol of *Olea europaea* leaf extract, has an anti-cancer effect on human BRAF melanoma cells and potentiates the cytotoxicity of current chemotherapies. *Nutrients*. 2018; 10 (12): 1950.
140. Choupani, J., et al. Oleuropein inhibits migration ability through suppression of epithelial-mesenchymal transition and synergistically enhances doxorubicin-mediated apoptosis in MCF-7 cells. 2019; 234 (6): 9093-9104.
141. Nassir, A.M., et al. Surface functionalized folate targeted oleuropein nano-liposomes for prostate tumor targeting: In vitro and in vivo activity. 2019; 220: 136-146.
142. Arı, M. Meme Kanseri Hücre Dizisinde (MCF-7) Oleuropein ve D Vitamininin Antiproliferatif, Apoptotik ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. 2018.
143. Balkan, E., *Investigation of the effects of plant phenolic oleuropein on expression levels of xenobiotic metabolizing enzymes along with potential cytotoxic and genotoxic impact on human colon cancer cell line HT-29*. 2018, MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY.

144. Barzegar, F., et al. Synthesis of nano-paramagnetic oleuropein to induce KRAS over-expression: a new mechanism to inhibit AGS cancer cells. 2019; 55 (7): 388.
145. Liman, R., et al. Antiangiogenic and Apoptotic Effects of Oleuropein on Breast Cancer Cells. 2017: 1-10.
146. Goldsmith, C.D., et al. The olive biophenols oleuropein and hydroxytyrosol selectively reduce proliferation, influence the cell cycle, and induce apoptosis in pancreatic cancer cells. 2018; 19 (7): 1937.
147. Mansouri, N., et al. The hopeful anticancer role of oleuropein in breast cancer through histone deacetylase modulation. 2019; 120 (10): 17042-17049.
148. Aktas, H.G., H.J.N. Ayan, and Cancer. Oleuropein: A Potential Inhibitor for Prostate Cancer Cell Motility by Blocking Voltage-Gated Sodium Channels. 2020: 1-10.
149. Mao, W., et al. Anti-proliferation and migration effects of oleuropein on human A549 lung carcinoma cells. 2012; 31 (8): 1217-21.
150. Al-Karaki, R., et al. Preparation, Characterization and Cytotoxic Activity of New Oleuropein Microemulsion Against HCT-116 Colon Cancer Cells. 2020: 1-4.
151. Altun, Z., et al. *The Effects of Oleuropein on Different Clinically Types of Human Neuroblastoma Cells.* in *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings.* 2018.
152. Gil-Ad, I., et al. Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines. 2004; 22 (3): 189-198.
153. Storch, A., et al. 1-Methyl-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) is toxic to dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via impairment of cellular energy metabolism. 2000; 855 (1): 67-75.
154. Francisco, R., et al. Mechanisms of prodigiosin cytotoxicity in human neuroblastoma cell lines. 2007; 572 (2-3): 111-119.
155. Johnsen, J.I., et al. NSAIDs in neuroblastoma therapy. 2005; 228 (1-2): 195-201.
156. Rössler, J., et al. The selective VEGFR1- 3 inhibitor axitinib (AG- 013736) shows antitumor activity in human neuroblastoma xenografts. 2011; 128 (11): 2748-2758.
157. Levkovitz, Y., et al. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines. 2005; 27 (1): 29-42.

158. Wickström, M., et al. The novel melphalan prodrug J1 inhibits neuroblastoma growth in vitro and in vivo. 2007; 6 (9): 2409-2417.
159. Samarghandian, S., et al. Anti-tumor activity of safranal against neuroblastoma cells. 2014; 10 (Suppl 2): S419.
160. Esmaeili-Mahani, S., et al. Protective effect of orexin-A on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. 2013; 63 (8): 719-725.
161. Geyikoglu, F., et al. Effect of oleuropein against chemotherapy drug-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damages in rat kidney injury. *Journal of food drug analysis*. 2017; 25 (2): 447-459.
162. Jemai, H. and S. Sayadi. Heart histopathology and oxidative features in diabetic rats and protective effects of oleuropein. *Advances in Bioscience Biotechnology*. 2015; 6 (06): 383.
163. DESEADCH, O.J.W. Therapeutic effects of oleuropein on wounded skin in young male BALB/c mice. 2014; 26 (3): 83-88.
164. Potočnjak, I., et al. Oral administration of oleuropein attenuates cisplatin-induced acute renal injury in mice through inhibition of ERK signaling. *Molecular nutrition food research*. 2016; 60 (3): 530-541.
165. Bakir, M., et al. Therapeutic effects of oleuropein on cisplatin-induced pancreas injury in rats. 2018; 14 (3): 671.
166. Jemai, H., et al. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. 2009; 57 (19): 8798-8804.
167. Khalatbary, A., et al. Oleuropein Attenuates Deltamethrin-induced Apoptosis in Rat Cerebellar Purkinje Neurons. 2015; 3 (4): 10-16.
168. Porcu, C., et al. Oleuropein induces AMPK-Dependent autophagy in NAFLD mice, regardless of the gender. 2018; 19 (12): 3948.
169. Kim, Y.-H., et al. Oleuropein curtails pulmonary inflammation and tissue destruction in models of experimental asthma and emphysema. 2018; 66 (29): 7643-7654.
170. Johnsen, J.I., et al. Embryonal neural tumours and cell death. 2009; 14 (4): 424-438.
171. Khalatbary, A.R. and H. Ahmadvand. Neuroprotective effect of oleuropein following spinal cord injury in rats. *Neurological research*. 2012; 34 (1): 44-51.

172. Taskan, M.M., et al. Evaluation of the effect of oleuropein on alveolar bone loss, inflammation, and apoptosis in experimental periodontitis. 2019; 54 (6): 624-632.
173. Yin, M., et al. Oleuropein suppresses oxidative, inflammatory, and apoptotic responses following glycerol-induced acute kidney injury in rats. 2019; 232: 116634.
174. Khalatbary, A.R., et al. Immunohistochemical and electron microscopic study of the inhibitory effects of olive oil polyphenol on dexamethasone-induced apoptosis. 2017; 12 (1): 45.
175. Przychodzen, P., et al. Anticancer potential of oleuropein, the polyphenol of olive oil, with 2-methoxyestradiol, separately or in combination, in human osteosarcoma cells. 2019; 39 (3): 1243-1251.
176. Zhang, W., et al. Protective effects of oleuropein against cerebral ischemia/reperfusion by inhibiting neuronal apoptosis. 2018; 24: 6587.
177. Capo, C.R., et al. Oleuropein shows copper complexing properties and noxious effect on cultured SH-SY5Y neuroblastoma cells depending on cell copper content. 2017; 44: 225-232.
178. Liu, M., et al. Oleuropein inhibits the proliferation and invasion of glioma cells via suppression of the AKT signaling pathway. 2016; 36 (4): 2009-2016.
179. Rahman, M.A., et al. Angelicin induces apoptosis through intrinsic caspase-dependent pathway in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. 2012; 369 (1-2): 95-104.
180. Yan, C.M., et al. Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. 2015; 11 (6): 4617-4624.
181. Cárdeno, A., et al. Oleuropein, a secoiridoid derived from olive tree, inhibits the proliferation of human colorectal cancer cell through downregulation of HIF-1 α . 2013; 65 (1): 147-156.
182. Chimento, A., et al. Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/GPR 30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR 3 breast cancer cells. 2014; 58 (3): 478-489.
183. Asgharzade, S., et al. The effect of oleuropein on apoptotic pathway regulators in breast cancer cells. 2020; 886: 173509.
184. Elamin, M.H., et al. Synergistic anti-breast-cancer effects of combined treatment with oleuropein and doxorubicin in vivo. 2017; 23 (7).

185. Zhao, Q., et al. Oleuropein protects cardiomyocyte against apoptosis via activating the reperfusion injury salvage kinase pathway in vitro. 2017; 2017.
186. Rigacci, S., et al. Oleuropein aglycone induces autophagy via the AMPK/mTOR signalling pathway: a mechanistic insight. 2015; 6 (34): 35344.
187. Achour, I., et al. Oleuropein prevents neuronal death, mitigates mitochondrial superoxide production and modulates autophagy in a dopaminergic cellular model. 2016; 17 (8): 1293.

