

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİTOKİMYASAL MADDELERİN
NÖROBLASTOM VE METASTAZ POTANSİYELİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

DR. DİLEK İNCE

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD- 2007970176

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİTOKİMYASAL MADDELERİN
NÖROBLASTOM VE METASTAZ POTANSİYELİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

DR. DİLEK (GÜNEŞ) İNCE

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Nur OLGUN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2007.KB.SAG.63 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD- 2007970176

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi
Dr. Dilek İNCE, ‘**Fitokimyasal Maddelerin Nöroblastom ve Metastaz
Potansiyeli Üzerine Etkileri**’ konulu Doktora tezini 11.01.2013 tarihinde başarılı
olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN
Prof. Dr. Nur OLGUN

ÜYE

Prof. Dr. Meral SAKIZLI



ÜYE

Prof. Dr. Nazan ÇETİNGÜL



ÜYE

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ



ÜYE

Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN



YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Mehmet KANTAR

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Yasemin BASKIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	i-iii
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v-vi
KISALTMALAR.....	vii-ix
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
1.1.Çocukluk çağı nöroblastomunda tedavi planlamasının önemi.....	3
1.2. Araştırmanın Amacı.....	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Nöroblastom.....	4
2.2. Metastaz ilişkili genler.....	6
2.3. Fitokimyasallar.....	8
2.3.1. Resveratrol.....	8
2.3.2. Allicin.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Araştırmanın tipi.....	11
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı.....	11
3.3. Araştırma evreni ve örnekleme.....	11
3.4. Çalışma materyali.....	11
3.4.1. Hücre kültürü.....	11
3.4.2.Kimyasallar.....	11
3.4.3. Deney modeli.....	11
3.4.4.Sitotoksitenin değerlendirilmesi, MTT testi.....	12
3.4.5.Apoptotik hücre ölümünün saptanması.....	13

	Sayfa No
3.4.6.PCR Array analizi.....	14
3.5. Araştırmanın değişkenleri.....	16
3.6. Veri toplama araçları	16
3.7.Araştırma planı	18
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	18
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	18
3.10. Etik Kurul Onayı	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Doz belirlenmesi ve sitotoksosite çalışmaları	19
4.1.1 Kelly hücre hattında Allicin uygulaması.....	19
4.1.2. SH-SY5Y hücre hattında Allicin uygulaması.....	20
4.1.3. Kelly Hücre hattında resveratrol uygulaması.....	20
4.1.4. SH-SY5Y Hücre hattında resveratrol uygulaması.....	21
4.1.5. Kelly Hücre hattında Allicin, Resveratrol, Sisplatin, Allicin+Sisplatin, Resveratrol+Sisplatin uygulamalarının sitotoksosite oranları.....	21
4.1.6. SH-SY5Y Hücre hattında Allicin, Resveratrol, Sisplatin, Allicin+Sisplatin, Resveratrol+Sisplatin uygulamalarının sitotoksosite oranları.....	23
4.2. Kelly ve SH-SY5Y nöroblastom hücre hatlarında grupların apoptoz oranları.	25
4.3.Kelly hücre hattında metastatik gen analizleri.....	25
4.3.1. Grup 2: Sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları...	26
4.3.2. Grup 3: Allicin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları.....	28
4.3.3. Grup 4: Resveratrol uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları...	30
4.3.4. Grup 5: Allicin ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları.....	33
4.3.5. Grup 6: Resveratrol ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları.....	35
4.4. SH-SY5Y hücre hattında metastatik gen analizleri.....	38
4.4.1. Grup 2: Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları...	39
4.4.2. Grup 3: Allicin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları...	41
4.4.3. Grup 4: Resveratrol uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları.....	44

	Sayfa No
4.4.4. Grup 5: Allicin ve Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı Bulguları.....	46
4.4.5. Grup 6: Resveratrol ve Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları.....	49
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
7. KAYNAKLAR.....	78
8. EKLER.....	92

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1.. RT-PCR ile çalışılan 84 tümör metastaz geni (SABiosciences, PAHS028).....	15
Tablo 2. Kelly hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	19
Tablo 3 SH-SY5Y hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	20
Tablo 4 Kelly hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	20
Tablo 5. SH-SY5Y hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	21
Tablo 6. Kelly hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasıyla uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	22
Tablo 7. Kelly hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	22
Tablo 8. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	23
Tablo 9. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi	24
Tablo 10. Kelly ve SH-SY5Y nöroblastom hücre gruplarının apoptoz oranları....	25
Tablo 11. Kelly ve SH-SY5Y nöroblastom hücre hatlarında Sisplatin, Allicin ve Sisplatin+Allicin uygulamalarıyla ekspresyonu üç katın üzerinde değişiklik gösteren genler	55
Tablo 12. Kelly ve SH-SY5Y nöroblastom hücre hatlarında Sisplatin, Resveratrol ve Sisplatin+Resveratrol uygulamalarıyla ekspresyonu üç katın üzerinde değişiklik gösteren genler	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Kelly hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	19
Şekil 2. SH-SY5Y hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	20
Şekil 3 Kelly hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	20
Şekil 4. SH-SY5Y hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	21
Şekil 5. Kelly hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	22
Şekil 6. Kelly hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	23
Şekil 7. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	24
Şekil 8. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi.....	24
Şekil 9: Sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	27
Şekil 10: Allicin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	29
Şekil 11: Resveratrol uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	32
Şekil 12. Allicin ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	34
Şekil 13. Resveratrol ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	36
Şekil 14. Kelly hücre hattında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulanması halinde ekspresyonu en fazla etkilenen genler...	38
Şekil 15: Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	40

	Sayfa No
Şekil 16. Allicin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	42
Şekil 17. Resveratrol uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	45
Şekil 18: Allicin ve sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	47
Şekil 19: Resveratrol ve sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi.....	50
Şekil 20. SH-SY5Y Hücre hattında allicin ve sisplatin uygulamalarının ekspresyonlarını en fazla etkilediği genler.....	53
Şekil 21. SH-SY5Y Hücre hattında resveratrol ve sisplatin uygulamalarının ekspresyonlarını en fazla etkilediği genler.....	53

KISALTMALAR

APC	Adenomatous polyposis coli
BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1
CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDH11	Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
CDH6	Cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
CHD4	Chromodomain helicase DNA binding protein 4
COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2
CST7	Cystatin F (leukocystatin)
CTBP1	C-terminal binding protein 1
CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
CTSK	Cathepsin K
CTSL1	Cathepsin L1
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DENR	Density-regulated protein
EPHB2	EPH receptor B2
ETV4	Ets variant 4
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1
FAT1	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4
FLT4	Fms-related tyrosine kinase 4
FN1	Fibronectin 1
FXRD5	FXRD domain containing ion transport regulator 5
GNRH1	Gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)
KISS1R	KISS1 receptor
HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
HPSE	Heparanase
HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
IL1B	Interleukin 1, beta
IL8RB	Interleukin 8 receptor, beta
ITGA7	Integrin, alpha 7
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
CD82	CD82 molecule
KISS1	KiSS-1 metastasis-suppressor
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
RPSA	Ribosomal protein SA
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)
MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
METAP2	Methionyl aminopeptidase 2
MGAT5	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
MTA1	Metastasis associated 1
MTSS1	Metastasis suppressor 1
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
MYCL1	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)
NF2	Neurofibromin 2 (merlin)
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in
NME2	Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in

NME4	Non-metastatic cells 4, protein expressed in
NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor
PNN	Pinin, desmosome associated protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB1	Retinoblastoma 1
RORB	RAR-related orphan receptor B
SET	SET nuclear oncogene
SMAD2	SMAD family member 2
SMAD4	SMAD family member 4
SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
SSTR2	Somatostatin receptor 2
SYK	Spleen tyrosine kinase
TCF20	Transcription factor 20 (AR1)
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TP53	Tumor protein p53
TRPM1	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1
TSHR	Thyroid stimulating hormone receptor
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
B2M	Beta-2-microglobulin
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPL13A	Ribosomal protein L13a
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB	Actin, beta

TEŞEKKÜR

“Fitokimyasal Maddelerin Nöroblastom ve Metastaz Potansiyeli Üzerine Etkileri” başlıklı doktora tez projemin gerçekleştirilmesinde emeği geçen ve büyük katkı sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. Nur OLGUN, Prof. Dr. Meral SAKIZLI, Prof. Dr. Safiye AKTAŞ, değerli meslekdaşım Doç. Dr. Zekiye ALTUN’a ve bana her zaman büyük destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Doç. Dr. Dilek İNCE

Fitokimyasal Maddelerin Nöroblastom ve Metastaz Potansiyeli Üzerine Etkileri

Dilek İNCE, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Dilek İNCE, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Mithatpaşa Caddesi, N0: 1606,
Balçova – İZMİR

ÖZET

Amaç: Nöroblastom hücre hatlarında allicin ve resveratrolün antitümöral etkisi ve sisplatinin etkisini değiştirici rolü olup olmadığının; bu fitokimyasalların metastaz ilişkili genlerin ekspresyonları üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Kelly ve SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hatları kullanıldı. Gruplar: Grup1:Kontrol, Grup2:Sisplatin, Grup3:Allicin, Grup4:Resveratrol, Grup5:Sisplatin+Allicin, Grup6:Sisplatin+Resveratrol. Ajanların sitotoksik etkisi MTT ve LDH yöntemiyle, apoptoz TUNEL yöntemiyle değerlendirildi. 84 tümör metastaz geni ve DDX1 geni ekspresyonları RT-PCR ile değerlendirildi. İstatistiksel analizler üretici firmanın internetteki PCR analiz sayfasında yapıldı. Mann Whitney U, Ki kare ve korelasyon analizi kullanıldı.

Bulgular: Allicin sitotoksiste, apoptoz yapmadı ve sisplatinin sitotoksik, apoptotik etkilerini de değiştirmede. Resveratrol apoptoz yapmadı, doza bağımlı sitotoksiste yarattı; sisplatinin sitotoksitesini değiştirmede, apoptotik etkisini azalttı. **KELLY:** Grup 3/4/5/6'da ekspresyonları en fazla artan ortak genler: CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10. Grup 2/3/4/5/6'da RB1 ve DENR ≥ 3 kat azaldı. Grup4'de DDX1, nm23-H1 arttı, nm23-H2 azaldı; grup 5'de nm23-H1 arttı. **SH-SY5Y:** Grup 3/5'de KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, ayrıca grup 3'de MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7 >100 kat azaldı. Grup 4/6'da MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, TIMP4 >100 kat azaldı. Grup 2/3/4/5/6'da PNN, grup4'de DENR ≥ 3 kat arttı. Grup 3/4/5/6'da DDX1 arttı, nm23-H1 azaldı, grup 2'de DDX1, nm23-H2 arttı.

Sonuç: Bulgularımız allicin ve resveratrolün çok sayıda metastaz geninde çok yönlü etkilenmeye neden olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda nöroblastomda bu fitokimyasalların kemoterapi beraberinde veya tekli kullanımının uygun olmadığını, sorgulanması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Nöroblastom, Metastaz, Sisplatin, Allicin, Resveratrol.

Effects of Phytochemicals on Neuroblastoma and Metastatic Potential

Dilek İNCE, Dokuz Eylül University Institute of Oncology

Dilek İNCE, Dokuz Eylül University Institute of Oncology, Mithatpaşa Caddesi, N0: 1606,
Balçova – İZMİR

ABSTRACT

Objective: To explore antitumoral effects of allicin, resveratrol, their changing effects on cisplatin; and effect of these phytochemicals on the expression of metastasis related genes in neuroblastoma cell lines.

Method: Kelly and SH-SY5Y human neuroblastoma cell lines were used. Groups: Group1:Control, Group2:Cisplatin, Group3:Allicin, Group4:Resveratrol, Group5:Cisplatin+Allicin, Group6:Cisplatin+Resveratrol. Cytotoxic effects of agents were assessed MTT and LDH assays, apoptosis was determined by TUNEL. DDX1 and 84 custom array genes of tumor metastasis were determined by RT-PCR. Expressions were calculated at manufacturer's online PCR expression analysis page. Mann-Whitney-U, chi-square, correlation analysis were used.

Results: Allicin didn't cause cytotoxicity, apoptosis, also didn't change cytotoxic, apoptotic effects of cisplatin. Resveratrol didn't cause apoptosis, however cause cytotoxicity. Cytotoxic effect of cisplatin didn't change, but apoptotic effect of cisplatin diminished by resveratrol.

KELLY: Groups3/4/5/6: CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 expressions increased. Groups2/3/4/5/6: RB1, DENR expressions decreased. Group4: DDX1, nm23-H1 increased, nm23-H2 decreased. Group5 nm23-H1 increased. **SH-SY5Y:** Groups3/5: KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, additionally MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7 expressions decreased in group3. Groups4/6: MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, TIMP4 expressions decreased. Groups2/3/4/5/6: PNN, Group4: DENR expressions increased. Groups3/4/5/6: DDX1 increased, nm23-H1 decreased; in group2 DDX1, nm23-H2 increased.

Conclusion: Our findings indicate allicin, resveratrol have versatile impacts on metastatic genes. Administration of these phytochemicals with or without chemotherapies are not appropriate and should be questioned in neuroblastoma.

Key Words: Neuroblastoma, Metastasis, Cisplatin, Allicin, Resveratrol.

1. Giriş ve Amaç

1.1.Çocukluk çağı nöroblastomunda tedavi planlamasının önemi:

Nöroblastom (NB), sempatik sinir sisteminin primitif nöral krest orjinli embriyonel bir tümörü olup çocukluk çağının en sık karşılaşılan ekstrakraniyal solid tümörüdür (1-4). Nöroblastom biyolojik davranış ve dolayısıyla klinik ve prognoz açısından çok değişkenlikler göstermektedir. Klinik yelpazenin bir ucunda kendiliğinden gerileyebilen nöroblastomlu hastalar var iken, diğer uçta tedaviye dirençli, ilerleyici ve yaygın hastalıklı, relapslarla giden, son dönemde ölümcül olabilen nöroblastomlu hastaların varlığı söz konusudur (1-3). Nöroblastom tedavisi planlanırken hastanın yaşı, NB evresi, tümörün histopatolojik özellikleri (Shimada patolojik sınıflaması), tümörün moleküler genetik özellikleri (MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, 11q kazanımı v.b.) ve tümörün DNA içeriği (DNA ploidi) dikkate alınarak bir risk sınıflaması yapılmakta ve risk grubuna uygun tedavi yöntemi seçilmektedir (1-3). Genel olarak bir yaşından küçük, bölgesel hastalıklı olgular iyi prognostik moleküler özellikler taşıırken; 1 yaşından büyük olgular agresif klinik gidişli, metastatik hastalıklı olup kötü prognostik moleküler özellikler göstermektedir. Bu ikinci grupta başlangıçta kemoterapi yanıtı iyi olsa da çoğu hastada zamanla relapslar ve ilaç direnci gelişmektedir. Pek çok merkezde, nöroblastomun farklı biyolojik davranışını aydınlatmaya ve değişik tedavi arayışlarına yönelik çalışmalar devam etmektedir.

1.2. Araştırmanın amacı:

Bu çalışmada NB için kötü prognostik önemi net olarak bilinen MYCN amplifikasyonu olan (Kelly) ve olmayan (SH-SY5Y) insan NB hücre hatlarında, allicin ve resveratrolün antitümöral etkisi olup olmadığının ve metastaz ilişkili genler üzerindeki etkisinin araştırılması; ayrıca nöroblastom tedavisinde etkin olduğu bilinen klasik kemoterapötik ajanlardan biri olan sisplatin varlığında allicin ve resveratrolün antitümöral etkiyi değiştirici rolü olup olmadığının, metastaz ilişkili genler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1.3. Araştırmanın hipotezleri:

Resveratrol ve allicinin nöroblastomda metastatik potansiyel ile ilişkisi şimdiye dek çalışılmamıştır. Bu fitokimyasalların nöroblastomda gerek tek başlarına gerekse kemoterapötik ajanlar varlığında antitümöral etki ve metastaz ilişkili genler üzerinde etkili olduklarının gösterilmesi halinde alınan sonuçlar, NB tedavisinde fitokimyasalların tedavi protokolleri içinde yerinin tartışılmasını gündeme getirebilecektir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Nöroblastom

Nöroblastom sempatik sinir sisteminin nöral krest kökenli, ilginç biyolojik davranışı ile dikkat çeken embriyonel tümörüdür. Nöroblastom tedavisi hastanın yaşı, hastalığın evresi, tümörün patolojik özellikleri, tümörün MYCN amplifikasyonu ve DNA ploidi göz önüne alınarak yapılan risk sınıflamasına göre belirlenmektedir. İleri evre hastalıkta yoğun protokoller ve alternatif tedavi yaklaşımlarına rağmen iki yıllık hastalıksız yaşam %30 – 40' lara ancak ulaşmaktadır. Bu nedenle tümörün biyolojik davranışına yönelik araştırmalar sürmekte, farklı protokoller geliştirilmeye çalışılmaktadır (1-3). Türkiye Ulusal Pediatrik Kanser Kayıt sistemi verilerine göre <19 yaş tüm çocukluk çağı malignansileri içinde sempatik sinir sistemi tümörleri 2002 – 2005 yıllarında %10,6 ile dördüncü sırada yer almaktadır (4). Ülkemizde çocukluk çağı nöroblastomunun tedavisi konusunda ilk çok merkezli çalışma 1992'de yapılmış ve bu çalışmanın sonuçları alındıktan sonra 2003 yılında ulusal bir tedavi protokolü geliştirilerek uygulanmaya başlanmıştır (5, 6). Bu ulusal tedavi protokolünün daha da iyileştirilmesi, iletilmesi konusunda çabalar devam etmektedir.

Nöroblastomda cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiden oluşan çoklu bir tedavi yaklaşımı uygulanmaktadır. *Cerrahi* tanısal ve tedavi amaçlı uygulanmaktadır. Primer cerrahi girişim; tanı, tümör evrelemesi ve tümörün çıkarılması içindir. Gecikmiş cerrahi ya da ikinci bakış cerrahi girişimler; kemoterapi +/- radyoterapi sonrası geride kalan tümör kitlesinin çıkarılması ve tedavi yanıtının belirlenmesi içindir. Evre 4S dışında tedavi amaçlı en uygun cerrahi yaklaşım gross total tümör rezeksiyondur. Ancak morbidite yaratmamak önemlidir. Süt çocukluğu döneminde gecikmiş cerrahi kararı komplikasyon oranlarını azaltmaktadır. *Kemoterapi*; düşük, orta risk grubunda olup yerleşim özelliği nedeni ile cerrahi morbidite olabilecek durumlar ve yüksek riskte ilk seçenektir. Günümüze ulaşan deneyimler sisplatin (CDDP), siklofosamid (CYC), doksorubisin (Doxo) ve epipodofilotoksin (VP-16) gruplarının ilk seçenek olması gerektiğine işaret etmektedir. Son yıllarda kamptotesin analogları olan topotekan- irinotekan özellikle relaps hastalarda etkin olduğu gösterilen kemoterapötik ajanlardandır. *İdame tedavide*; amaç geride kalan minimal rezidüel hastalığın eradikasyonudur. 13- cis retinoik asit (13-cis RA) diferansiye edici ajanlar, Anti GD₂ monoklonal antikorlar, tek başına veya kombine olarak kullanılabileceği gibi IL₂ ile kombine edilebilir. *Radyoterapi*; nöroblastoma oldukça radyosensitif bir tümördür. Bölgesel hastalığın kontrolünde radyoterapi planlanmaktadır. Radyoterapi uygulama kararı ve dozu; hastanın yaşı, tümör lokalizasyonu ve geride kalan tümör hacmine göre değişir.

Ne yazık ki nöroblastomlu hastaların yarısından fazlası tanı anında metastatik hastalıktır (6). Multimodal tedavi uygulamalarına rağmen genel yaşam ve olaysız yaşam hızları yüksek risk grubu nöroblastomda oldukça düşüktür (%20–30). Nöroblastomda tümörün moleküler genetik özellikleri, klinik gidiş ve tedavi yanıtı üzerinde etkilidir (1-3, 5-7). Nöroblastomda kötü prognostik özellikler: bir yaşından büyük olması, ileri evre hastalıklı olması, Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflaması (INPC) ile değerlendirmede Shimada histopatolojisinin kötü özellikte olması, DNA ploidisinin diploid karakterde olması ve tümörün bazı moleküler genetik özellikleri (MYCN amplifikasyonu, dengesiz 17q kazanımı, 1p delesyonu, 11q delesyonu, 3p delesyonu, 4p, 9p, 14q, 19q delesyonları, tirozin kinaz reseptör - B [TRK B] ekspresyonu) olup, prognostik faktörleri belirlemeye yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

MYCN geni amplifikasyonu bağımsız prognostik faktör olarak çok güçlüdür. MYCN geni 2. kromozomun kısa kolunun distalinde 2p24 lokusunda yerleşir ve 10 kopyanın üzerinde olması genomik amplifikasyon olarak kabul edilmektedir (1-3). MYCN amplifikasyonu prevalansı %20–25 olup, agresif tümör ve kötü prognoz ile ilişkilidir (1-3). Düşük evreli infantlar da dahil olmak üzere ileri evreli hastalık, kötü klinik seyir, kötü prognoz, hızlı tümör progresyonu ve yüksek relaps riski ile ilişkilidir. Genellikle MYCN ekspresyonu ve MYCN amplifikasyonu birbiriyle koreledir. Ancak MYCN amplifikasyonu yok iken, yüksek MYCN ekspresyonu varlığının prognostik olup olmadığı tartışmalıdır, sonuçlar çelişkilidir (1). Belki de bu artmış ekspresyon MYCN mRNA ve MYCN protein yıkımında bir sorundan kaynaklanıyor olabilir. MYCN geni amplifikasyonu Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Japonya’ da tedavi kolu seçiminde kullanılmaktadır. Ülkemizdeki ulusal nöroblastom tedavi protokolünde de MYCN amplifikasyonu risk grubunu ve tedavi kolunu belirlemede kullanılmaktadır (6).

2p24 lokusu geniş bir bölgedir ve MYCN dışında başka genleri de içermektedir ki bunlardan biri de DDX1 (Dead box protein) genidir. DDX1 geni olasılıkla RNA helikazı kodlamakta ve pek çok hücrel süreçte rol almaktadır. Bu genin kodladığı DEAD box proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Dağılım paternine göre bu ailenin bazı üyelerinin embriyogenez, spermatogenez ve hücrel büyüme, bölünme de rol aldığı düşünülmektedir. Retinoblastom ve nöroektodermal kaynaklı dokularda yüksek transkripsiyonu gösterilmiştir. Nöroblastom hücre hatlarında ve primer nöroblastom dokularında DDX1 geninin MYCN geni ile koamplifikasyonu gösterilmiştir ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (8-16). DDX1 geninin MYCN ile koamplifikasyonu halinde klinik gidişin daha iyi olduğu yönünde sonuçlar bulunsa da, sağkalım üzerine etkiler konusunda sonuçlar çelişkilidir (17 – 24).

Metastaz baskılayıcı genler (metastasis supressor genes), tümör baskılayıcı genlerin aksine primer tümörün büyümesini etkilemeksizin metastatik yayılımı kontrol etme kapasitesindedir (25). NM23-H1 (bir diğer adıyla NME1) geninin ürünü, insan nükleozid difosfat kinaz A (NDPK); NM23-H2 geninin ürünü, insan nükleozid difosfat kinaz B (NDPK) olup bunlar metastaz baskılayıcı proteinlerdir. NM23'ün invaziv migrasyonu inhibe ettiği, bu nedenle de metastatik yayılımın erken dönemlerinde önemli olduğu düşünülmektedir (25). Metastaz baskılayıcı genlerin ilki olan NM23 1988 yılında tanımlanmıştır, sonrasında pek çok tümör kohortunda çalışılmış ve çelişkili sonuçlar alınmıştır (25). Meme, kolon ve karaciğer kanseri gibi epiteliyal tümörlerde NM23 geninin azalmış ekspresyonu metastaz ve kötü klinik prognoz ile ilişkili bulunmuştur (25). Ancak NB ve hematolojik malignitelerde artmış NM23 ekspresyonu daha agresif hastalıkla ilişkili bulunmuştur (25-30). MYCN amplifikasyonu ile nm23-H1 ve nm23-H2 genlerinin mRNA ve protein ekspresyonlarının korele olduğu gösterilmiştir. Kötü gidişli (unfavourable) NB tümörigenezisinde her ikisinin de major rol oynadıkları öne sürülmüştür (26). MYCN amplifikasyonu olan Evre 3, 4 NBda, tümörde artmış p19/nm23 proteini agresif tümör ile ilişkili bulunmuştur (27). NBda 17q kazanımı olanlarda nm23-H1 ve nm23-H2 ekspresyonlarının da arttığı ve bunun da Nm23-H1 genomik amplifikasyonu, tümörde artmış nm23 RNA ekspresyonu ve azalmış sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (28).

2.2. Metastaz ilişkili genler

Kanser hücresinin metastaz fenotipini belirlemede iki grup genin rolü vardır; “metastaz teşvik edici” (metastasis promoters) genler (31, 32) ve “metastaz baskılayıcı” (metastasis supressors) genler (33, 34). Bu genler sadece metastazla ilişkili olmayıp hücrenin normal fizyolojik işlevsel süreçlerinde de rol almaktadırlar. Örneğin metastaz baskılayıcı gen olan KAI1/CD82'in NB'da bulunmadığı ya da düşük seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir (35).

İntravazasyon: Primer tümör büyüdüktan sonra metastaz için vasküler ya da lenfatik dolaşıma geçmesi gerekir. Bunun için de tümör hücresi motil olmalı, ekstrasellüler matriksi sindirmelidir. Proteaz aileleri, özgün olarak da matriks metalloproteazlar (MMP) intravazasyon ile en ilişkili olanlardır. Matrix metalloproteazlar ekstrasellüler matriks proteinlerini yıkan proteazlardır. Kollegenaz olarak bilinen bu enzim ailesi üyelerinin ekspresyonlarının NB'da arttığı gösterilmiştir (36).

Dolaşıma karışan metastatik kanser hücresi herhangi bir substrat ile teması olmamasına karşın yaşamaya devam eder ve ölüme direnç gösterir ki bu “anoikis” olarak adlandırılır. Kanserli hücrede anoikisi inhibe eden proteinler arasında galectin-3, MTA-1, fokal adhezyon

kinaz (FAK), integrin ailesi üyeleri, CEA ve TRKB sayılabilir (37). Bunlardan TRKB NB'da kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (38, 39).

Dolaşımda ilerleyen kanser hücrelerinin iki şekilde uzak organlarda yerleştiği düşünülmektedir. Birisi küçük damar lümeninde hücrenin sıkışması ve orada takılı kalması; diğeri reseptörle yönlendirilen bir ilişki sonucu kanser hücrelerinin konak vasküler yapıda kalmasıdır. Özgün adhezyon molekülleri ve reseptör ilişkisinin rolü üzerinde durulmaktadır. İntegrin ile endotel bazal membranının bir bileşeni olan laminin V ilişkisi tümör adherensinde önemlidir (37). Kemokinler de tümör hücrelerinin endotele adhezyonunu etkilemektedir (37).

Kanser hücrelerinin metastaz yaptığı uzak bir bölgede yaşamaya devam etmesi mikroçevresiyle ilişkilidir ki, integrinler, adhezyon molekülleri, kemokinler, kemokin reseptörleri ve diğer unsurlar rol oynamaktadır. *İntegrinler*; heterodimerik transmembran hücre yüzey glikoproteinlerinin oluşturduğu geniş bir ailedir. Ekstrasellüler matriks proteinleri için reseptör görevleri vardır. Hücre adhezyonu, migrasyonu, hücre iskeleti, angiogenez, hücrenin yaşamı, proliferasyonu ve diferansiasyonunda rol alırlar. 16 farklı alfa ve 8 beta zinciri tanımlanmıştır. Özellikle alfa V integrinler pek çok ekstrasellüler matriks proteini ile birleşebilir. *Hücrel adhezyon molekülleri (CAMs)*; transmembran glikoproteinlerdir ve kaynaklandıkları dokuya göre isimlendirilirler. Nöral-CAM (N-CAM), karsinoembriyonik antijen (C-CAM veya CEA), karaciğer-CAM (L-CAM), vasküler endoteliyal (V-CAM) ve intersellüler adhezyon molekülleri (I-CAM). CD44 de bir hücre yüzey glikoproteinidir ve hücre-hücre, hücre-substrat ilişkisini hızlandırır. CD44'ün iyi gidişli (favourable) NB genlerinden olduğu düşünülmekte ve metastaz ve progresyonda rolü olan bu hücre adhezyon molekülünün uluslar arası NB patoloji sınıflamasında (INPC) yer alması önerilmektedir (40). CD44 düşük ekspresyonu ve NM23 artmış ekspresyonu metastazla ilişkili bulunmuştur (29). Kadherinler hücrel etkileşmeyi kalsiyum bağımlı olarak düzenleyen transmembran glikoproteinlerdir. Kadherinler de CAM lar gibi dokuya özel ekspresyon paterni göstermektedir. En çok çalışılan epiteliyal kadherinlerdir (E-cadherinler) (37).

Tümörün büyümesi ve metastazında angiogenez anahtar rol oynamaktadır. Tümör kaynaklı büyüme faktörleri endoteliyal hücreleri ve endoteliyal progenitörleri aktive eder ve tümör bölgesinde yeni kapillerler oluşur. Anjiopoietinler, vasküler endoteliyal büyüme faktörü, trombospondin, interlökin 8, kemokinler, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, basic fibroblast büyüme faktörü, anjiogenin, p53, bax, bcl-2, TGF-beta, alfaV beta 3, matriks metalloproteinleri angiogenez ilişkili faktörlerdir (37).

2.3. Fitokimyasallar

2.3.1. Resveratrol: Resveratrol toksik olmayan polifenolik fitoöstrojendir. Trans-resveratrol formu daha stabildir. Resveratrol kırmızı üzümün kabuğunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen ve kardiyoprotektif etkileri vardır. Nöron koruyucu etkileri gösterilmiştir.

Dai ve ark (41) insan mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyonunda resveratrolün stimülatör etkisini ve bu etkinin doz bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Bu da spesifik terapötik etkileri için daha önceden doz çalışmalarının gereksinimini ortaya koymaktadır. Serbest radikalleri bağladığına ve apoptozu doza bağımlı indükleyip/inhibe ettiğine dair çalışmalar vardır. Resveratrol intrasellüler birçok molekülü etkilemektedir (42-45).

Resveratrolün kardiyoprotektif etkisinde, kardiyak hasara neden olan reaktif oksijen türlerini (ROS) baskıladığı, oksidatif stresi ve bir anlamda apoptozu engellediği ileri sürülmektedir. Resveratrolün sisplatine bağlı kardiyak toksisiteyi engellediğine dair *in vitro* çalışmalar da mevcuttur (42, 43). Ayrıca inflamasyonda rol oynayan proinflamatuvar mediatörleri inhibe ettiği ileri sürülmektedir. Hipoksiye karşı nöroprotektif etkiye (antioksidatif özellikleri ile) sahip olduğu bildirilmiştir (42, 45).

Resveratrol anti-kanser, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal, nöroprotektif etkileri olan doğal bir bileşendir. 1999 yılından itibaren NB'da resveratrol etkisine dair yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Kemoterapötik dozlarda sınırlı toksisitesi olan doğal bitkisel bir üründür. *In vitro* NB hücrelerinin canlılığını %70-90 azalttığı saptanmıştır (46). Nöroblastom fare ksenograft modelleri ve insan NB hücre hatlarında resveratrolün tümör büyümesini etkin şekilde önlediği ve mitokondri intrensik apoptotik yolu üzerinden tümör hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (46). Ancak resveratrolün metastaz potansiyeli üzerine etkisi sorgulanmamıştır. Glutasyon üzerinden serbest radikalleri azaltmaktadır (47, 48). Ksenograft fare nöroblastom modellerinde resveratrolün tümördeki büyümeyi önlediği gösterilmiştir, ancak resveratrol hızla metabolize olmaktadır (49).

MYCN amplifiye NB hücre hatlarında resveratrolün doz ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Önce geçici olarak p53 ekspresyonunun arttığı, p53'ün nükleer translokasyonunun indüklendiği ve takiben p21(WAF-1/CIP-1) ve Bax ekspresyonunun indüklendiği görülmüştür (50). Nöro2a NB hücrelerinde resveratrolün belirgin sitotoksikite yarattığı, apoptozu arttırdığı ve p21 down regulasyonu, siklinE apregulasyonu sonucunda hücrelerin S fazında biriktiği gösterilmiştir. Ayrıca NBLu farelerde resveratrolün antitümöral etkisi de gösterilmiştir (51). Nöroblastomlu farelerde immünoterapi beraberinde tümör bölgesine resveratrol ejeksiyonunun

antitümöral etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (52). Rat B103 NB hücrelerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkinin mekanizması incelenmiş, mitokondri ilişkili intrinsik kaspaz bağımlı yolun aktivasyonu ile gerçekleştiği gösterilmiştir (53).

Bu çalışmalarda resveratrolün anti-tümöral ve apoptozu indükleyici etkileri gösterilmiştir. Ancak resveratrolün NBda metastatik gen ekspresyonu üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya bugüne dek literatürde rastlanmamıştır.

2.3.2. Allicin: Allicin bitkisel kökenli sarımsak etken maddesidir. Antineoplastik etkisi üzerine bazı kanıtlar vardır (54 – 56). Sarımsak etken maddesi sülfid türevi maddelerin apoptoz üzerinden etki ettiğini gösteren çalışmalar vardır (57, 58, 59). Sarımsak geniş spektrumda pek çok hastalığa karşı etkilidir. Son 20 yılda sarımsak esasen kalp-damar hastalıkları ve kanser alanlarında çalışılmaktadır. Sarımsak bileşenlerinin antitümöral ve sitotoksik etki gösterdiği *in vitro* ve hayvan deneylerinde gösterilmiştir (60-62). Pre-klinik ve klinik çalışmalar immün sistemi nonspesifik olarak stimule ettiğini ve antitümöral etki geliştiğini göstermiştir. Sarımsağın organik alliylsülfür komponentleri (esasen allicin) biyolojik aktiviteyi yönlendirici etki göstermektedir. Bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri bunların sülfür gruplarının modifikasyonu ve antioksidan özellikleriyle ilişkili olabilir. Taze ezilmiş sarımsaktaki en iyi bilinen biyolojik aktif komponent allicindir (diallyl thiosulfinate). Bütünlüğü bozulmamış sarımsak allicin içermez, bunun kokusuz öncüsü olan alliin (S-allyl-L-cysteine sulfoxide) içerir. Alliin, pridoksal 5V-fosfat - bağımlı bir enzim olan alliinase (alliin lyase; EC 4.4.1.4) ile allicin, piruvat ve ammonia ya dönüşmektedir ki bu enzim sarımsak dişlerindeki hücrelerde bulunmaktadır. Sarımsak ezildiğinde alliin ile enzim karşılaşır ve reaksiyon gerçekleşir.

Allicin, serbest tiyol gruplarıyla hızla reaksiyona girer ve biyolojik membranları kolayca penetre eder (63, 64). Bu nedenle enjeksiyon sonrası birkaç dakika içinde dolaşımdan hızla kaybolur (63, 64). Bu nedenledir ki Allicinin potent antibiyotik ve sitotoksik etkileri ancak invitro koşullarda gösterilebilmiştir (65). Sarımsağın major biyoaktif ürünü allicindir. Farklı kanserlerde allicin etkisi çalışılmıştır ancak NB hücre hatlarında yapılmış bir araştırmaya İngilizce literatürde rastlanmamıştır. Hepatosellüler karsinom, HepG2 hücrelerinde allicin uygulamasının p53 ilişkili otofajiyi indüklediği, hücre canlılığını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca sitoplazmik p53, PI3K/mTOR sinyal yolu ve Bcl-2 düzeylerini azalttığı AMPK/TSC2 ekspresyonu ve Beclin-1 sinyal yolunun indüklediği gösterilmiştir (66). İnsan glioblastoma U87MG hücrelerinde allicinin doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını apoptoz yoluyla inhibe ettiği gösterilmiştir. Apoptozun mitokondriyal yol Bcl-2/Bax, MAPK/ERK sinyal yolu ve antioksidan enzim sistemi üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (67). Murin T lenfositlerde (EL-4) allicinin konsantrasyon bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği apoptozu

indüklediği ve kaspaz3, kaspaz12, sitokrom-c ekspresyonunu aktive ettiği, Bax/Bcl-2 oranını arttırdığı gösterilmiştir (68). Mide ve kolon kanserinde allicinin apoptozu indüklediği gösterilmiştir (69, 70). Mide SGC-7901 hücrelerinde allicin kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitelerini indükleyerek apoptozu indüklemektedir ki Fas, fosfo-Ask1, p53, ve JNK düzeylerinde artma, mitokondriyal membran potansiyellerinde azalma ve bunun sonucunda sitokrom-c salınımı, pro-kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün ayrılmasına neden olmaktadır (71).

Antiproliferatif, antikarsinojenik ve apoptozu indükleyici özellikleri olan allicin ile NB hücre hatlarında yapılmış bir araştırmaya İngilizce literatürde rastlanmamıştır. Ancak 2003-2012 yılları arasında yine sarımsak derivesi olan ve Allicinin yıkılmasıyla ortaya çıkan diallyl disulfide (DADS) ile NB hücre hatlarında yapılmış birkaç araştırma bulunmaktadır. İnsan malign NB SH-SY5Y hücrelerinde diallyl sulfide (DAS) ve diallyl disulfide (DADS) kullanımının antiapoptotik aktiviteleri baskıladığı, kalpain ve intrinsik kaspaz kaskadını indükleyerek apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (58). Nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde DADS uygulanmasının hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve mitokondriyal yolun aktivasyonu (Bcl-2 down regülasyonu, sitozole sitokrom c salınımı, kaspaz 9 ve 3 aktivasyonu) apoptozu indüklediği gösterilmiştir (59). Bir araştırmada SH-SY5Y hücrelerinde diallyl disulfide (DADS) kullanımının erken morfolojik değişikliklere, hücre iskeleti oksidasyonuna, mikofilament redüksiyonuna ve mikrotübül depolimerizasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (72). Süperoksitdismutaz enziminin artmış ekspresyonu, hücre iskeletinin destabilize olmasında süperoksidin önemli rol oynadığını düşündürmüştür. Nöroblastom hücrelerinde DADS ile yapılmış çalışmaların sonuçları da bu sayılanlarla sınırlıdır.

Miron T ve ark. (73) yaptıkları çalışmada alliinaz enzimini tümör ilişkili yüzey antijenine spesifik monoklonal antikor olan bir taşıyıcıya bağlayıp tümör dokusuna yönlendirip ardından da dolaşıma alliin uygulamış ve tümör dokusu düzeyinde allinin, alliinaz enzimiyle reaksiyonu sonucu allicinin doku düzeyinde oluşmasını sağlamışlardır. Bu tedavi yöntemi antikorla yönlendirilmiş enzim ön-ilaç tedavisi (antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)) olarak adlandırılmaktadır (74, 75). Bu yöntemde avantaj allicin ve öncülü olan allinin toksik olmayan doğal ürünler olmalarıdır. Allicin çok kısa yarılanma ömrü olmasına karşın çok güçlü bir antikanser ajandır. Ek olarak ortaya çıkan ikincil ürünler aliylmerkaptoglutatyon ve aliylmerkaptosistein de antioksidan özellikte moleküllerdir. Allicinin stabil olmadığı ve ömrünün kısa olduğu gösterilmiştir. Bu da kemoterapötik ajan olarak kullanım çabalarını boşa çıkarmıştır.

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırmanın Tipi: Bu araştırma deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı: Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda 2007 – 2011 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.3. Araştırma evreni ve örnekleme: Bu araştırma MYCN amplifikasyonu olan Kelly ve MYCN amplifikasyonu olmayan SH-SY5Y NB hücre hatlarında yapılmıştır. Araştırmanın evreni ve örnekleme Kelly ve SH-SY5Y NB hücre dizileridir.

3.4. Çalışma materyali:

3.4.1. Hücre Kültürü: İnsan NB SH-SY5Y (MYCN negatif) ve Kelly (MYCN pozitif) olmak üzere iki hücre hattı kullanıldı. İnsan NB SH-SY5Y (DMSZ, Almanya) hücre hattı Dulbecco'nun modifiye (Biochrom) ortamı kullanılarak %10 Fetal bovine serum, 2mM L-glutamin, 100U/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin ilavesi ile 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem ortamında kültüre edildi.

İnsan NB Kelly (DMSZ, Almanya) hücre hattı RPMI 1640 (Biochrom) ortamı kullanılarak %10 Fetal bovine serum, 2mM L-glutamin, 100U/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin ilavesi ile 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem ortamında kültüre edildi.

Üretilen hücreler yapılacak analizler için 96 kuyucuklu plaklara 4.5 x 10⁴ yoğunluğunda ekildi. Belirlenen gruplara uygulanacak olan sisplatin, allicin ve resveratrolün apoptotik etkisi 24. saatte aşağıda belirtilen parametreler incelenerek belirlendi.

3.4.2. Kimyasallar:

Sisplatin : Sisplatin (Sigma) DMSO (dimetil sülfoksit) içinde çözülerek stok solusyon 3.3mM elde edildi. Daha sonra her çalışmada ortamla dilüe edilerek taze olarak kullanıldı.

Resveratrol : Resveratrol (Sigma) %10 DMSO ile çözüldükten sonra ortamla dilüe edilerek 0-100 µM konsantrasyonda kullanıldı.

Allicin : Allicin (Sigma) %10 etanol çözüldükten sonra ortamla dilüe edilerek 0-100 µM konsantrasyonda kullanıldı.

3.4.3. Deney Modeli: İnsan NB SH-SY5Y (MYCN negatif) ve Kelly (MYCN pozitif) olmak üzere iki hücre hattının her biri için aşağıda sayılan altı grup oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol (Medium)

Grup 2: Sisplatin (5, 7.5, 15, 20, 50, 75, 100µM) uygulaması

Grup 3: Allicin (0.05, 1, 10, 25, 50, 75, 100µM) uygulaması

Grup 4: Resveratrol (10, 25, 50, 75, 100µM) uygulaması

Grup 5: Sisplatin + Allicin uygulaması

Grup 6: Sisplatin +Resveratrol uygulaması

3.4.4. Sitotoksitenin değerlendirilmesi: MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle niceliksel olarak saptanabilmektedir (Mosmann T, 1983) Hücre kültürlerinde sisplatin, allicin ve resveratrolün hücre çoğalmasını önleyici etkisi 3-(4,5-dimetiltiyazol-2yl)-tetrazolyum 2,5-difeniltetrazolyumbromid (MTT) (Sigma–Aldrich, USA) yöntemi ve LDH sitotoksiste kiti (Roche Diagnostics Mannheim, Germany) ile değerlendirildi. MTT yöntemi sağlam hücrelerde mitokondri içinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimin aktivitesine bağlı olarak MTT boyasının tetrazolium halkasının parçalanması ilkesine dayanmaktadır. MTT yöntemi kullanılarak 5-100 µM aralığındaki konsantrasyonlarda Sisplatin ile muamele edilen hücrelerin %50 oranında canlılığını kaybettiği sisplatin konsantrasyonu deneylerde kullanıldı. Ayrıca LDH (Roche) kiti ile sitotoksiste değerlendirmesi yapıldı.

MTT Testi: MTT testi sağlam hücrelerde mitokondri içinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimin aktivitesine bağlı olarak MTT boyasının tetrazolium halkasının parçalanması ilkesine dayanmaktadır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün solubilize edilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Ayrıntılı deney basamakları şu şekildeydi:

1. 100 mg MTT (Sigma) maddesi 10 mL hacimde PBS içinde çözülerek % 0.5'lik (10 mg/mL konsantrasyonda) stok MTT solüsyonu steril ve karanlık koşullarda hazırlandı. Solüsyon 0.22 µm'lik filtre ile süzülerek debrisler uzaklaştırıldı. Bu solüsyon karanlık ortamda ve 4°C sıcaklıkta bir ay süresince saklandı ve gerektiğinde kullanıldı.

2. Deneylerde herhangi bir toksik ya da koruyucu ajan eklenmeyen kültür koşulları kontrol olarak kullanıldı. 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilen ve değişik toksik ve/ya da koruyucu ajanların değişik dozlarıyla karşılaştırılan kültürlerle hedeflenen inkübasyon süresinin sonunda 10 µl/kuyucuk hacimde MTT solüsyonu eklendi.

3. Kültür plakları alüminyum folyo ile sarılarak % 5 karbondioksitli nemli hava içeren karbondioksit inkübatöründe 37°C sıcaklıkta 4 saat süreyle tutuldu.

4. Enkübasyon süresinin sonunda faz-kontrast “inverted” mikroskop altında canlı hücrelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu, ölü hücrelerin ise boyanmadığı saptandı.

5. Kültür plağı, plak rotoru kullanılarak 1250 rpm hızda 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

6. Formazan kristallerini solubilize duruma getirmek için önceden hazırlanmış solubilizasyon solüsyonu 100 µl/kuyucuk hacimde eklendi. Bu solüsyon isopropanolol içinde hazırlanmış 0.04 N HCl solüsyonundan oluşuyordu ve oda sıcaklığında saklandı.

7. Kültür plağı ELISA plak okuyucusunda (Thermo, Instruments Inc, USA) konularak absorbans değerleri 550 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 650 nm dalga boyu kullanıldı. Herhangi bir ajan eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması % 100 olarak kabul edildi. Değişik ajanlar eklenen kültür koşullarından elde edilen absorbans değerlerinin herbiri ortalama kontrol absorbans değerine oranlandı ve bu değerin yüzdesi olarak gösterildi.

3.4.5. Apoptotik Hücre Ölümünün Saptanması: Hücre kültürlerinde sisplatin, allicin ve resveratrolün apoptotik hücre ölümü oranına etkisini saptamak için TUNEL (the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end labeling) immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. Bu teknik için DeadEnd Colorimetric TUNEL system kiti (G7130, Promega, USA) kullanıldı. Herbir hücre hattı için altışar adet 25cm² flaskta üretilen hücrelere ajan verilmeden, 5ml medium için hesaplanan dozda sisplatin, allicin, resveratrol ve kombinasyonları verilerek 24 saat %5 CO₂ içeren nemli ortamda 37°C de inkübe edildi. Mediumlar uzaklaştırılıp 4'er mL PBS (Phosphate buffer saline) ile 5 dakika yıkama yapıp PBS uzaklaştırıldı. Hücre kazıyıcı ile hücreler kazındıktan sonra polilizinli lamlara hücre kazıyıcının ucu ile yayma yapıldı. Bu lamlar apoptoz çalışılana dek -20°C' de saklandı. Kazınan diğer hücreler, birer mililitre PBS eklenerek toplandı, 1.5mL lik ependorf tüplere alındı. Sıvı azot içine hemen daldırılıp 5 dakika tutuldu ve gen çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C' de saklandı. Apoptoz çalışması için lamlar -20°C' den çıkarıldı. Absolüt etanol ile 10 dakika fikse edildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda beş dakika bekletildi. Kesitler 15 dakika %4'lük paraformaldehit ile on dakika muamele edildikten sonra, 10 dakika 20-µg/mL proteinase K ile inkübe edildi ve ardından tekrar üç defa beşer dakika tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. İkinci kez %4'lük paraformaldehit beş dakika uygulanıp yıkandıktan sonra, tampon solüsyonu PBS ile beş dakika yıkanan kesitler TdT-enzimi solüsyonu ile 37°C de bir saat inkübe edildi. Lamlara 20µL TdT damlatıldıktan sonra lamel ile kapatıldı ve nemli bir kutu içinde etüve konuldu. Tampon solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla beş dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında on dakika yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz enzimi ile 30 dakika inkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan kesitler %80 ve

%95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dakika ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. Lamlar ışık mikroskobunda x400 büyütmede değerlendirildi. On farklı alanda yüzer hücre sayıldı. Herbir koşul için % apoptoz ortalaması alındı.

3.4.6. PCR Array Analizi: Kültüre NB hücrelerinden *in vitro* deney sonrasında RNA izolasyonu yapıldı. Kültür hücrelerinden total RNA izolasyonu protokolü (1×10^6 hücre için yaklaşık 15µg RNA eldesi için) şu şekilde uygulandı. Hücreler 200µL PBS içinde resüspanse edildi. 400µL Lysis/Binding Buffer eklenip 15sn vortekslendi. High pure filter tüp kolleksiyon tüpüne takıldı. Örnek üstteki filtreli tüpe aktarıldı. 15sn 8000g' de santrifüj yapıldı. Filtreli tüp kolleksiyon tüpünden çıkarıldı. Kolleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve aynı tüpler tekrar takıldı. Örnek başına 90µL DNAase inkübasyon tamponu reaksiyon tüpüne eklendi. 10µL DNA ase I eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım filtreli tüpe ilave edildi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Filtreli tüpe 500µL yıkayıcı tampon I eklendi ve 15sn 8000g'de santrifüj yapıldı. Alttaki kolleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Aynı tüpler tekrar takıldı. Filtreli tüpe 500µL yıkayıcı tampon II eklendi ve 15sn 8000g'de santrifüj yapıldı. Alttaki kolleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldı. Aynı tüpler tekrar takıldı. 200µL yıkayıcı tampon II filtreli tüpe eklendi ve 2 dakika 13000g maksimum hızda santrifüjlendi. Kolleksiyon tüpü atıldı. Filtreli tüp yeni bir steril 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne takıldı. RNA elüsyonu için 50-100µL elüsyon tamponu filtreli tüpe eklendi, 1 dakika 8000g'de santrifüj yapıldı. Elde edilmek istenen RNA alttaki 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpündeydi. Elde edilen RNA RT-PCR çalışmasında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu 260/280nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm ile değerlendirildi.

Complementary DNA (cDNA) sentezi termal cyclerda enkübe edilerek cDNA elde edildi. Complementary DNA (cDNA) sentezi için RT2 First Strand Kit kullanıldı. 25ng ile 5µg arasındaki RNA başlangıç için kullanıldı. Sentez iki aşamada yapıldı. Birinci aşamada RNA örneğinden 2-8µL, GE (5xgDNA Eliminasyon tamponu) 2µL, H₂O 6-0 µL örnek başına miktarlar kullanılarak karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım termal cyclerda 42°C'de 5 dakika bekletildi, hemen ardından buza alındı ve buzda 1 dakika bekletildi. İkinci aşamada BC3 (5x revers transkriptaz tampon 3) 4µL, P2 (primer ve eksternal kontrol karışımı) 1µL, RE3 (revers transkriptaz enzim karışımı) 2µL, H₂O 3µL örnek başına miktarlar kullanılarak karışım hazırlandı. Bu karışım, buzda bekleyen ilk karışımın içine eklendi. Termal cyclerda 42°C'de 15 dakika, 95°C'de 5 dakika tutuldu.

mRNA'sına özgül primerler (metastaz ilişkili 84 genin array olarak hazır ticari paketi, SABiosciences, PAHS.028) ile RT-PCR array yapıldı ve mRNA ekspresyon değişimleri

kantitatif olarak değerlendirildi. Çalışılan bu genler aşağıda Tablo1’de verilmiştir. Ayrıca DDX1 geni Real Time PCR ile çalışılmıştır.

Tablo1. RT-PCR ile çalışılan 84 tümör metastaz geni (SABiosciences, PAHS028)

Hücre adhezyon genleri:

Hücre-hücre adhezyonu: APC, CD44, CDH1 (cadherin-1 / E-cadherin), CDH11, CDH6, FAT, FXD5, ITGA7, PNN, SYK, VEGF.

Transmembran reseptörler: CD44, ITGA7, ITGB3, RPSA (LAMR1).

Adhezyon ile ilişkili diğer genler: CTNNA1, FN1, MCAM, MGAT5 (acetylglucosaminyltransferase V), MTSS1.

Ekstrasellüler Matriks Proteinleri:

Matriks metalloproteinazlar (MMP): MMP10, MMP11, MMP13, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9.

MMP İnhibitörleri: TIMP2, TIMP3, TIMP4.

Diğer ekstrasellüler matriks proteinleri: COL4A2 (collagen α 2(IV)), HPSE (heparanase).

Hücre döngüsü genleri:

Hücre döngüsünü kontrol eden genler: HRAS, IL1B, KRAS, TGFB1 (TGF- β 1), VEGFA.

Hücre döngüsünü negatif yönde kontrol eden genler: APC, BRMS1 (BrMS1), CDKN2A, MTSS1, NF2, NME1, NME2, PTEN, RB1, TP53.

Hücre döngüsünü durduran kontrol noktaları: CDKN2A, MYC (c-myc), RB1, TP53.

Hücre büyümesi ve proliferasyonu genleri:

Hücre proliferasyonunu negatif yönde kontrol eden genler: CDKN2A, CTBP1, GNRH1, IL1B, MDM2, NF2, NME1, NME2, SSTR2.

Hücre proliferasyonunu pozitif yönde kontrol eden genler: IGF1, IL18, TSHR, VEGFA.

Büyüme faktörleri ve hormonlar: GNRH1, HGF (Scatter Factor), IGF1, TGFB1 (TGF-B1), VEGFA.

Sitokinler ve kemokinler: CCL7, CXCL12, IL18, IL1B, TNFSF10.

Reseptörler: CXCR4, EPHB2, FGFR4, FLT4, KISS1R, IL8RB, MET, NR4A3, PLAUR (uPAR), RORB, SSTR2, TSHR.

Büyümeyle ilişkili diğer genler: DENR, EWSR1, HRAS (c-hRas), MYC (c-myc), SET, SRC (c-src), SYK, TRPM1.

Apoptosis genleri:

Apoptosis indüksiyonu: HTATIP2, IL18, TIMP3, TNFSF10, TP53.

Anti-apoptosis: HTATIP2, TGFB1.

Apoptosis ile ilişkili diğer genler: CXCR4, IL1B.

Transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri:

Transkripsiyon faktörleri: ETV4, HTATIP2, MTA1, MYC (c-myc), MYCL1, NME2, NR4A3, RB1, RORB, SMAD4, TCF20, TP53.

Regülatörler: CHD4, EWSR1, SMAD2.

Metastaz ile ilişkili diğer genler: CST7, CTSK, CTSL1 (cathepsin L), CD82 (KAI1), KISS1 (KiSS-1), METAP2, NME4.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Bu araştırmada Kelly ve SH-SY5Y hücre hatlarında kontrol grubu haricinde sisplatin, allicin, resveratrol, allicin+sisplatin, resveratrol+sisplatin uygulamalarıyla beş farklı koşul oluşturulmuştur. Değerlendirilen araştırma değişkenleri: sitotoksosite, apoptoz, DDX1 ve 84 tümör metastaz geninin (SABiosciences, PAHS028) ekspresyonlarıdır.

3.6. Veri toplama araçları:

Araştırmada kullanılan alet ve malzemelerin listesi aşağıda verilmiştir. Araştırmanın verileri Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Veri Kayıt Defterine (Cilt no: 0153) kaydedilmiştir.

Kullanılan Aletler

- 1- Klas 2 kabinet (Cojair),
- 2- inkübatör (Thermo),
- 3- Sıvı azot tankı (MVE),
- 4-Buzdolabı (Beko)
- 5-Su banyosu (Nüve)
- 6- Thermal Cycler cihazı (NYX Technic)
- 7- İnvrted mikroskop (Olympus)
- 8- Real-Time PCR cihazı (Roche)
- 9- – 80°C derin dondurucu
- 10- T80+UV/VIS Spektrofotometer cihazı (PG Instrument)

Kullanılan Malzeme Listesi:

- Hücre Hatları (SH-SY5Y, KELLY) (DSMZ)
- LDH, (Roche)
- MTT (Roche)
- TUNEL (Promega)
- Proteinase K
- L-Glutamin, (Biochrom)
- RPMI 1640 (Biochrom)
- Culture flask 25cm (Greiner)
- Culture flask 75cm (Greiner)
- Tripsin EDTA (Biochrom)
- FBS (Biochemica)

Penisilin/Streptomycin, (Biochemica)
Resveratrol (Sigma)
DMEM (Biochrom)
96 well plate (Grenier)
10 mL steril pipet (Grenier)
25 mL steril pipet (Grenier)
5 mL steril pipet (Grenier)
2 mL steril pipet (Grenier)
45 µM filtre (BD)
50 ml tüp (Grenier)
22 µM filtre (BD)
15 ml tüp (Grenier)
Cell scraper (steril) (Grenier)
PBS 500 mL (steril) (Biochrom)
Alkol (Sigma)
Lateks eldiven (pudrasız)
Sterilizasyon Bandı
Pipet ucu mavi
Pipet ucu sarı
2 ml'lik steril enjektör
5 ml'lik steril enjektör
20 ml'lik steril enjektör
Disinfection solution Pharmacidal (BO-GA Medikal) İnkübatör dezenfektanı.
Ameliyathane yer bandı
24 well plate
1.5 ml ependorf
Metastaz ilişkili gen PCR Array (SABioscience)
RNA izolasyon kiti (SABioscience)
cDNA sentez kiti(SABioscience)
Matrigel (BD)
Allicin (Biochemica)
Sterilizasyon bandı
Kriyotüp kutusu

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi:

Proje üç yıllık planlanmıştır. İlk 6 ay, malzemelerin alınması; ikinci 6 ayda, modelinin optimizasyonu; daha sonraki 12 aylık sürede in vitro deneylerin gerçekleştirilip analizlerinin yapılması; beşinci 6 aylık dönemde literatürlerin toplanması, yeniden gözden geçirilmesi, verilerin derlenmesi, sonuçların istatistiksel analizi ve yorumlanması, altıncı 6 aylık dönemde yazılıp yayın haline getirilmesi hedeflendi ve gerçekleştirildi.

3.8. Verilerin değerlendirilmesi:

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak yapıldır. Mann Whitney U test, Ki kare, korelasyon analizi kullanıldı. Grupların gen ekspresyonları Grup1 (kontrol grubu) ile karşılaştırıldı, biyoinformatik analizler www.sabiosciences.com'da PCR-Array-Data-Analysis-Web-Portalda yapıldı.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları:

Bütçe ve zaman kısıtlılığı nedeniyle çalışılan genlerin protein düzeyinde ekspresyonlarının değerlendirilememiş olması araştırmanın sınırlılığıdır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Bu proje için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'nun 07.01.2008/04 tarih ve sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayının bir örneği ektedir.

4. Bulgular

4.1. Doz belirlenmesi ve sitotoksosite çalışmaları

Kelly ve SH-SY5Y hücre dizileri için 6 grup oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol (Medium)

Grup 2: Sisplatin (5, 7.5, 15, 20, 50, 75, 100µM) uygulaması

Grup 3: Allicin (0.05, 1, 10, 25, 50, 75, 100µM) uygulaması

Grup 4: Resveratrol (10, 25, 50, 75, 100µM) uygulaması

Grup 5: Sisplatin + Allicin uygulaması

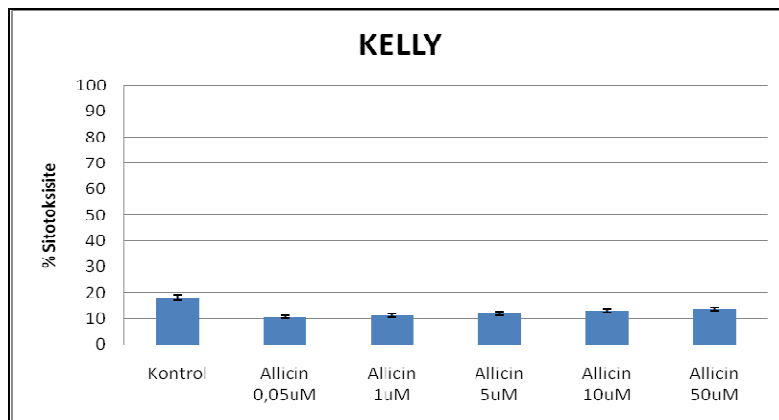
Grup 6: Sisplatin + Resveratrol uygulaması

Çalışmamızda kullanılacak optimum dozları belirlemek üzere farklı dozlarda sisplatin, allicin ve resveratrol uygulamaları yapılarak hücre canlılığı MTT testi ve LDH testi ile değerlendirildi. Sisplatin uygulanan hücrelerin %50 oranında canlılığını kaybettiği sisplatin konsantrasyonu (LD50) Kelly hücre hattı için 20µM , SH-SY5Y hücre hattı için 7.5µM olarak belirlendi ve deneylerde bu dozlar kullanıldı. Sisplatin ile birlikte uygulandığında sisplatinin LD50 sini bozmayan doz resveratrol için 25µM, allicin için 0.05µM bulundu.

4.1.1.Kelly hücre hattında Allicin uygulaması: Kelly hücre hatlarında Allicin 0.05, 1, 10, 25, 50, 75, 100µM dozlarda uygulanarak hücre canlılığı MTT ve LDH testleriyle değerlendirildi. Allicin'in artan dozlarıyla sitotoksitenin kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik yaratmadığı görüldü. LDH testi sonuçları Tablo 2 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kelly hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

<i>Allicin uygulama dozu</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Allicin 0,05uM</i>	<i>Allicin 1uM</i>	<i>Allicin 5uM</i>	<i>Allicin 10uM</i>	<i>Allicin 50uM</i>
%Sitotoksosite	18,21	10,69	11,30	11,90	12,90	13,50

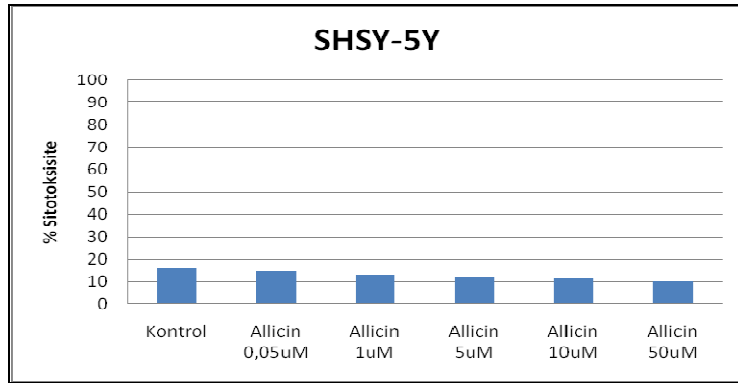


Şekil 1. Kelly hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

4.1.2. SH-SY5Y hücre hattında Allicin uygulaması: SH-SY5Y hücre hatlarında Allicin 0.05, 1, 10, 25, 50, 75, 100µM dozlarda uygulanarak hücre canlılığı MTT ve LDH testleriyle değerlendirildi. Allicin'in artan dozlarıyla sitotoksitenin kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik yaratmadığı görüldü. LDH testi sonuçları Tablo 3 ve Şekil 2'de gösterilmiştir.

Tablo 3 SH-SY5Y hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksiste üzerine etkisi

<i>Allicin uygulama dozu</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Allicin 0,05uM</i>	<i>Allicin 1uM</i>	<i>Allicin 5uM</i>	<i>Allicin 10uM</i>	<i>Allicin 50uM</i>
%Sitotoksiste	16,12	14,36	13,10	12,30	11,40	10,30

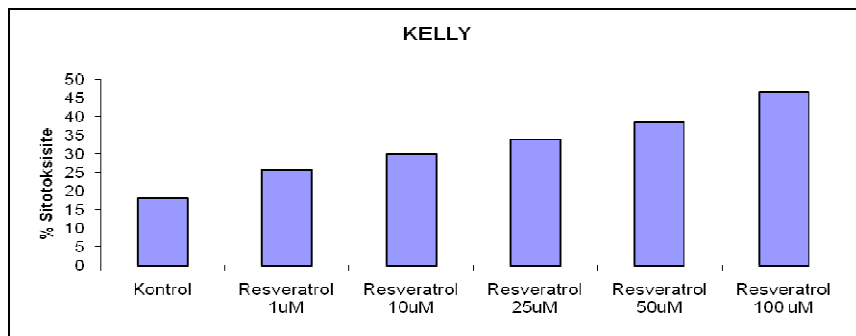


Şekil 2. SH-SY5Y hücre hattında artan dozda allicin uygulamasının sitotoksiste üzerine etkisi

4.1.3. Kelly Hücre hattında resveratrol uygulaması: Kelly hücre hatlarında resveratrol 10, 25, 50, 75, 100µM dozlarda uygulanarak hücre canlılığı MTT ve LDH testleriyle değerlendirildi. Resveratrol'ün artan dozlarıyla sitotoksitenin kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik yarattığı görüldü. LDH testi sonuçları Tablo 4 ve Şekil 3'de gösterilmiştir.

Tablo 4 Kelly hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksiste üzerine etkisi

<i>Resveratrol uygulama dozu</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Resveratrol 1uM</i>	<i>Resveratrol 10uM</i>	<i>Resveratrol 25uM</i>	<i>Resveratrol 50uM</i>	<i>Resveratrol 100 uM</i>
%Sitotoksiste	18,21	25,78	30,03	33,98	38,55	46,63

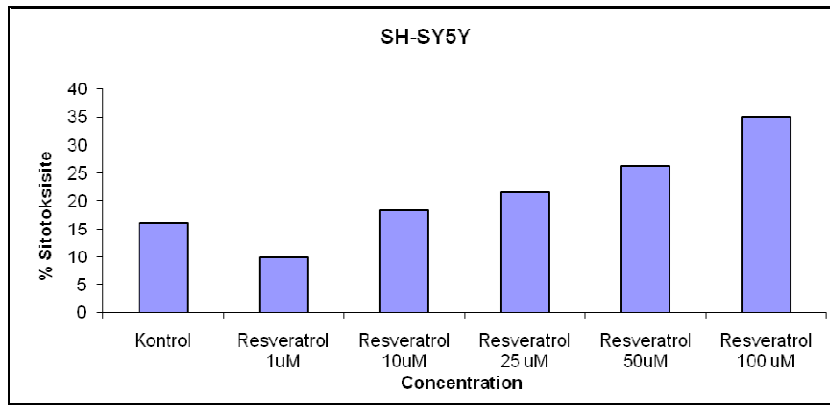


Şekil 3. Kelly hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksiste üzerine etkisi

4.1.4. SH-SY5Y Hücre hattında resveratrol uygulaması: SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol 10, 25, 50, 75, 100µM dozlarda uygulanarak hücre canlılığı MTT ve LDH testleriyle değerlendirildi. Resveratrol'ün artan dozlarıyla sitotoksitenin kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik yarattığı görüldü. LDH testi sonuçları Tablo 5 ve Şekil 4'de gösterilmiştir.

Tablo 5. SH-SY5Y hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

<i>Resveratrol uygulama dozu</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Resveratrol 1uM</i>	<i>Resveratrol 10uM</i>	<i>Resveratrol 25 uM</i>	<i>Resveratrol 50uM</i>	<i>Resveratrol 100 uM</i>
%Sitotoksosite	16,12	9,91	18,25	21,57	26,19	34,95



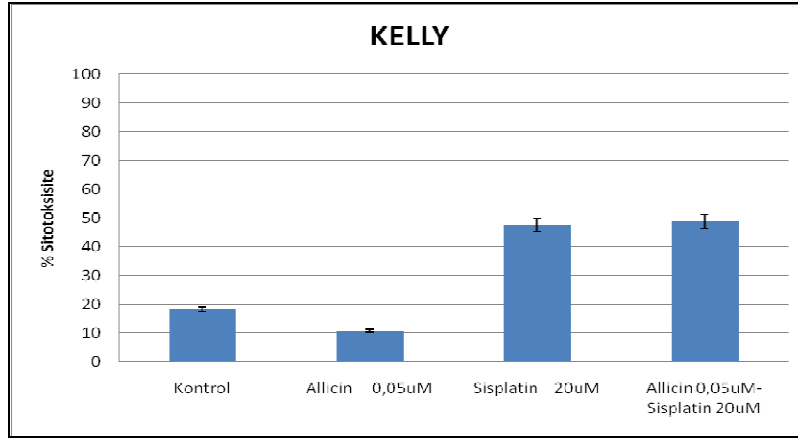
Şekil 4. SH-SY5Y hücre hattında artan dozda resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

4.1.5. Kelly Hücre hattında Allicin, Resveratrol, Sisplatin, Allicin+Sisplatin, Resveratrol+Sisplatin uygulamalarının sitotoksosite oranları

Kelly hücre hatlarında sisplatinin %50 hücre sitotoksitesine yol açan dozu ve sisplatinin bu %50'lik sitotoksik etkisini değiştirmeyen allicin dozu ve resveratrol dozu uygulanarak MTT ve LDH deneyleriyle değerlendirildi. Bunun için kontrol, allicin, sisplatin ve allicin+sisplatin uygulamaları sonrası MTT ve LDH testleri yapıldı. Tek başına allicin uygulamasının sitotoksositeyi arttırmadığı, kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratmadığı, allicin'in sisplatin ile birlikte uygulanmasının da sisplatine bağlı sitotoksositeyi değiştirmedığı doz saptandı. Sisplatinin tek başına uygulaması ile sitotoksosite anlamlı artış göstermişti, allicin+sisplatin uygulamasıyla yine sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermişti. Kelly hücre hatlarında sisplatinin %50 hücre sitotoksitesine yol açan dozu 20µM ve sisplatinin bu %50'lik sitotoksik etkisini değiştirmeyen allicin dozu 0.05µM ve resveratrol dozu 25 µM bulundu. LDH testi sonuçları Tablo 6 ve Şekil 5'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Kelly hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

<i>Uygulama dozları</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Allicin 0,05uM</i>	<i>Sisplatin 20uM</i>	<i>Allicin - 0,05uM</i>	<i>Sisplatin 20uM</i>
%Sitotoksosite	18,21	10,69	47,62	48,83	

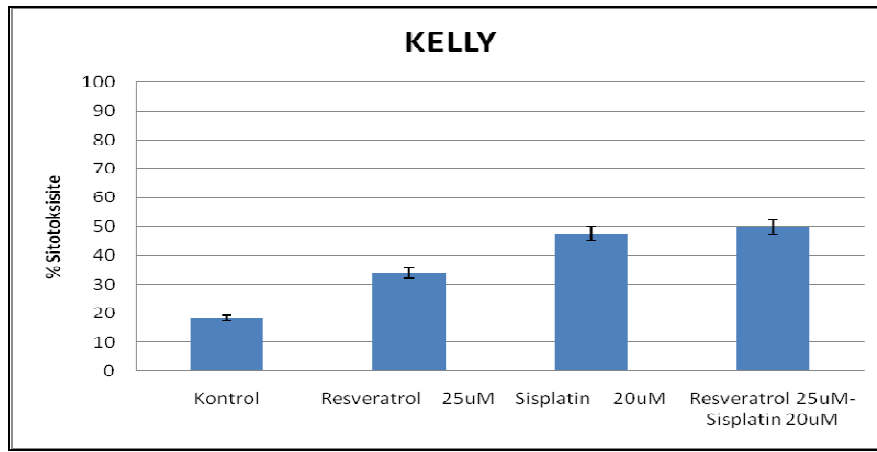


Şekil 5. Kelly hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

Kontrol, resveratrol, sisplatin ve resveratrol+sisplatin uygulamaları sonrası hücre canlılığı MTT ve LDH testleriyle değerlendirildi. Tek başına resveratrol (25µM) uygulamasının sitotoksosite oluşturduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı fark yarattığı görüldü. Sisplatinin (20µM) tek başına uygulaması ile sitotoksosite anlamlı artış göstermişti, resveratrol (25µM) + sisplatin (20µM) uygulamasıyla yine kontrol grubuna göre anlamlı artmış sitotoksosite izlendi. Resveratrol'ün sisplatin ile birlikte uygulamasının yarattığı sitotoksosite, tek başına sisplatin uygulamasının yarattığı sitotoksiteden %2 gibi hafif bir yükseklik gösterdiyse de fark anlamlı değildi. LDH testi sonuçları Tablo 7 ve Şekil 6'de gösterilmiştir

Tablo 7. Kelly hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

<i>Uygulama dozları</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Resveratrol 25uM</i>	<i>Sisplatin 20uM</i>	<i>Resveratrol - Sisplatin 25uM 20uM</i>
%Sitotoksosite	18,21	33,98	47,62	49,79



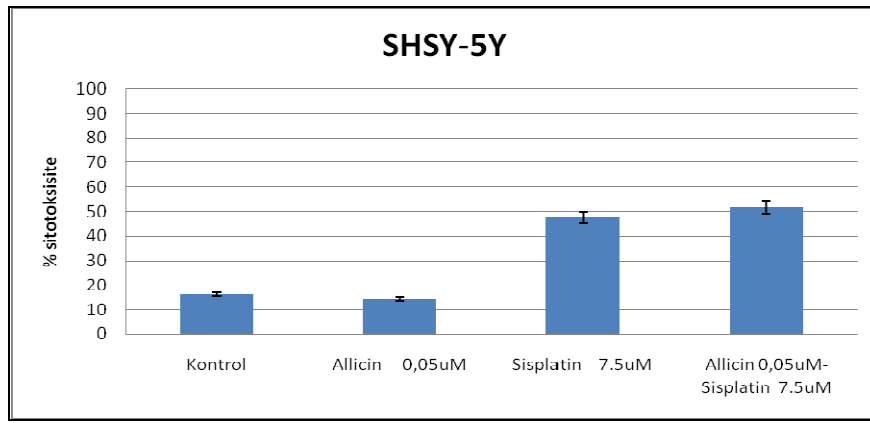
Şekil 6. Kelly hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksikite üzerine etkisi

4.1.6. SH-SY5Y Hücre hattında Allicin, Resveratrol, Sisplatin, Allicin+Sisplatin, Resveratrol+Sisplatin uygulamalarının sitotoksikite oranları

SHY5Y hücre hatlarında sisplatinin %50 hücre sitotoksikitesine yol açan dozu ve sisplatinin bu %50'lik sitotoksik etkisini değiştirmeyen allicin dozu ve resveratrol dozu uygulanarak MTT ve LDH deneyleriyle değerlendirildi. SHY5Y hücre hatlarında kontrol, allicin, sisplatin ve allicin+sisplatin uygulamaları sonrası sitotoksikite MTT ve LDH testleriyle değerlendirildi. SHY5Y hücre hatlarında sisplatinin %50 hücre sitotoksikitesine yol açan dozu 7.5 μ M ve sisplatinin bu %50'lik sitotoksik etkisini değiştirmeyen allicin dozu 0.05 μ M ve resveratrol dozu 25 μ M bulundu. Tek başına allicin (0.05 μ M) uygulamasının sitotoksikiteyi arttırmadığı, kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratmadığı görüldü. Sisplatinin (7.5 μ M) tek başına uygulaması ile sitotoksikite kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermişti, allicin (0.05 μ M) +sisplatin (7.5 μ M) uygulamasıyla yine sitotoksikite kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermişti. Tek başına sisplatin uygulaması ve allicin+sisplatin uygulamasıyla gelişen sitotoksikite arasında fark saptanmadı. Allicin'in sisplatin ile birlikte uygulanmasının da sisplatine bağlı sitotoksikiteyi değiştirmedeği görüldü. LDH testi sonuçları Tablo 8 ve Şekil 7'de gösterilmiştir

Tablo 8. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasının sitotoksikite üzerine etkisi

Uygulama dozları	Kontrol	Allicin 0,05uM	Sisplatin 7.5uM	Allicin -Sisplatin 0,05uM 7.5uM
%Sitotoksikite	16,12	14,36	47,51	51,82

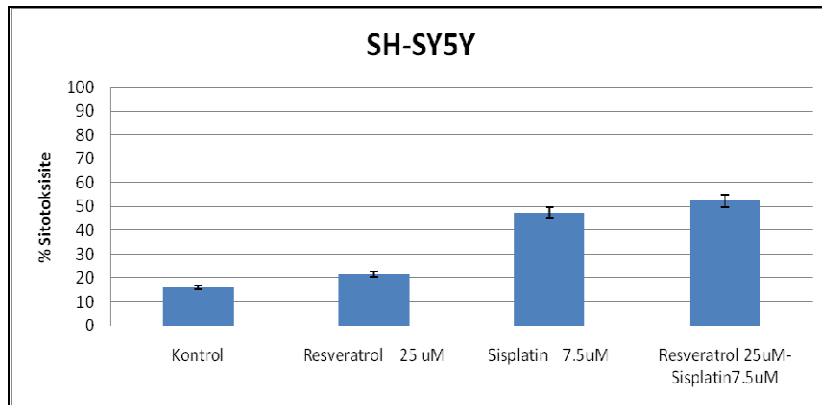


Şekil 7. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, allicin, sisplatin+allicin uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

SHY5Y hücre hatlarında kontrol, resveratrol, sisplatin ve resveratrol+sisplatin uygulamaları sonrası hücre canlılığı MTT ve LDH testleriyle değerlendirildi. Tek başına resveratrol uygulamasının kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratan sitotoksosite oluşturduğu görüldü. Sisplatinin (7.5 μ M) tek başına uygulaması yine kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratan sitotoksosite oluşmuştu. Resveratrol (25 μ M) + sisplatin (7.5 μ M) uygulamasıyla kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratan sitotoksosite oluştu ve bu sitotoksosite tek başına sisplatin uygulamasına göre %5 daha fazlaydı. Resveratrolün sisplatin ile birlikte uygulanması sisplatine bağlı sitotoksositeyi arttırdı. LDH testi sonuçları Tablo 9 ve Şekil 8’de gösterilmiştir

Tablo 9. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

<i>Uygulama dozlari</i>	<i>Kontrol</i>	<i>Resveratrol 25 uM</i>	<i>Sisplatin 7.5uM</i>	<i>Resveratrol - Sisplatin 25uM 7.5uM</i>
%Sitotoksosite	16,12	21,57	47,51	52,47



Şekil 8. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, resveratrol, sisplatin+resveratrol uygulamasının sitotoksosite üzerine etkisi

4.2. Kelly ve SH-SY5Y nöroblastom hücre hatlarında grupların apoptoz oranları

TUNEL yöntemiyle apoptoz oranları değerlendirildi ve gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. *Kelly hücre hatlarında*: Apoptoz gelişmesi kontrol grubu ve allicin uygulaması arasında fark göstermedi. Sisplatin uygulamasıyla oluşan apoptoz ile allicin+sisplatin uygulaması sonucu gelişen apoptoz arasında da fark bulunmadı. Apoptoz gelişmesi açısından kontrol grubu ve resveratrol uygulaması arasında fark göstermedi. Resveratrol+sisplatin birlikte uygulaması sonucu gelişen apoptoz, tek başına sisplatin uygulaması sonucu gelişen apoptozdan daha azdı (Tablo 10).

SH-SY5Y hücre hatlarında: Apoptoz gelişmesi kontrol grubu ve allicin uygulaması arasında fark göstermedi. Sisplatin uygulamasıyla oluşan apoptoz ile allicin+sisplatin uygulaması sonucu gelişen apoptoz arasında da fark bulunmadı. Apoptoz gelişimi açısından kontrol grubu ve resveratrol uygulaması arasında fark göstermiyordu. Resveratrol+sisplatin birlikte uygulaması sonucu gelişen apoptoz, tek başına sisplatin uygulaması sonucu gelişen apoptozdan anlamlı olarak daha azdı (Tablo 10).

Tablo 10. Kelly ve SH-SY5Y nöroblastom hücre gruplarının apoptoz oranları.

	<i>Uygulama</i>	<i>Kelly Hücre hatlarında</i>	<i>SH-SY5Y Hücre hatlarında</i>
		<i>Apoptoz %</i>	<i>Apoptoz %</i>
Grup 1	Kontrol	5	2
Grup 2	Sisplatin*	30	27
Grup 3	Allicin (0,05µM)	6	3
Grup 4	Resveratrol (25µM)	7	4
Grup 5	Allicin (0,05µM)+Sisplatin*	33	25
Grup 6	Resveratrol (25µM)+Sisplatin*	17	8

* *Sisplatin uygulama dozu Kelly hücre hatlarında: 20µM; SH-SY5Y hücre hatlarında: 15µM*

4.3. Kelly hücre hattında metastatik gen analizleri

Kelly hücre hattı kültüre edildi. Altı grup vardı.

Grup 1: Kontrol (Medium)

Grup 2: Sisplatin (20µM) uygulaması

Grup 3: Allicin (0.05µM) uygulaması

Grup 4: Resveratrol (25µM) uygulaması

Grup 5: Sisplatin (20µM) + Allicin (0.05µM) uygulaması

Grup 6: Sisplatin (20µM) + Resveratrol (25µM) uygulaması

Sisplatin uygulanan hücrelerin %50 oranında canlılığını kaybettiği sisplatin konsantrasyonu (LD50) Kelly hücre hattı için 20µM belirlendi ve deneylerde bu dozlar kullanıldı. Sisplatin ile birlikte uygulandığında sisplatinin LD50 sini bozmayan doz resveratrol için 25µM, allicin için 0.05µM olarak bulundu ve metastatik gen ekspresyon çalışmalarında bu dozlar kullanıldı.

4.3.1. Grup 2: Sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları

Kelly NB hücre hattında sisplatin uygulaması sonrası metastaz ilişkili genlerden FXYD5, MCAM, CXCR4, SSTR2, CDH1 ekspresyonlarında ≥ 3 kat artma; EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5 ekspresyonlarında ≥ 3 kat azalma izlendi. CTNNA1, RB1, CD44, VEGFA, MTA1, IGF1, FN1, APC, TCF20, SMAD2, MET, HGF, CD82, CTBP1, EWSR1, DENR MTSS1, FAT1, METAP2, NME4, CHD4, SRC, PTEN, TSHR, KRAS, CXCL12, NME1, MMP2 ve NF2 ekspresyonlarında <3 kat azalma; HRAS, SMAD4, CST7, MDM2, RPSA, FLT4, FGFR4, SET, TGFB1, TIMP2, PNN, CDKN2A, NME2, MMP9, BRMS1, CTSK, ITGB3, TP53, PLAUR, CCL7, CTSL1, ETV4, KISS1, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, MMP13, NR4A3, MMP11, TNSF10, TRPM1, GNRH1, HPSE ekspresyonlarında <3 kat artma oldu. (Şekil 9). Sisplatin uygulanan Kelly hücre hattında DDX1, nm23H1, nm23H2 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre farklı değildi.

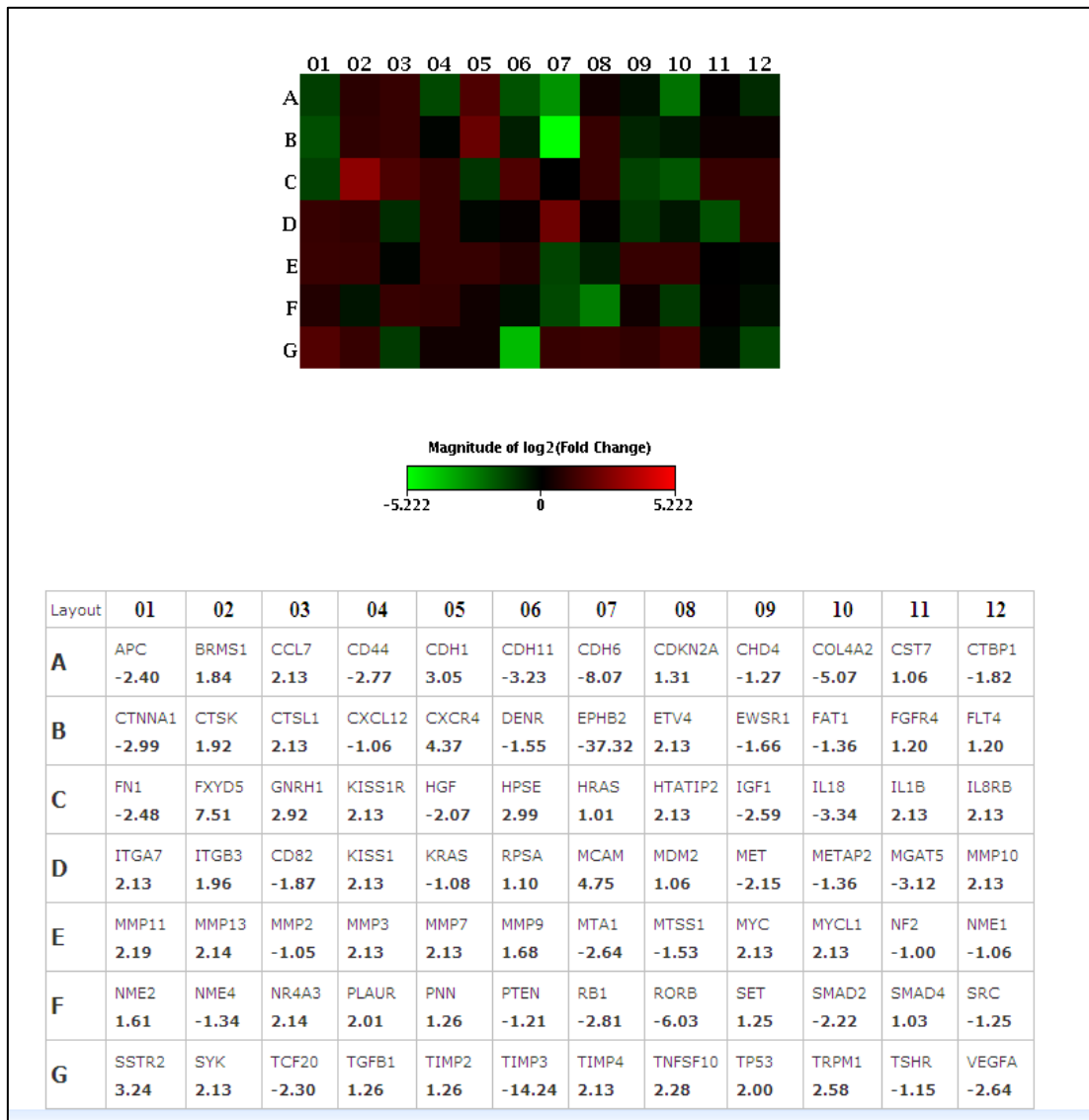
Sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artan genler

- *Hücre büyüme ve proliferasyon geni:*
 - o **SSTR2** (reseptör)
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **FXYD5** ve **CDH1** (hücre-hücre adhezyonu geni),
 - o **MCAM**.
- *Apoptoz ilişkili geni:*
 - o **CXCR4**

Sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat azalan genler

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **EPHB2** ve **RORB** (reseptör),
 - o **IL18** (hücre proliferasyonunun pozitif regulasyonu / sitokin ve kemokin)

- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **CDH6** ve **CDH11** (hücre-hücre adhezyon geni),
 - o **MGAT5**
- *Apoptoz genleri:*
 - o **TIMP3** ve **IL18** (apoptoz indüksiyonu)
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **TIMP3** (MMP inhibitörü),
 - o **COL4A2**
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri grubu:*
 - o **RORB** (transkripsiyon faktörü)



Şekil 9: Sisplatin uygulanan Kelly NB hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

Kelly hücre hattında sisplatin uygulanmasıyla ekspresyonu artan genler hücre adhezyon genleri (FXYD5, MCAM, CDH1), apoptoz genleri (CXCR4), hücre büyüme ve proliferasyon geni (SSTR2) idi; ekspresyonu azalan genler ise hücre adhezyon genleri (MGAT5, CDH11, CDH6), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (IL18, RORB, EPHB2), ekstrasellüler matriks proteinleri (TIMP3, COL4A2), transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri (RORB) idi.

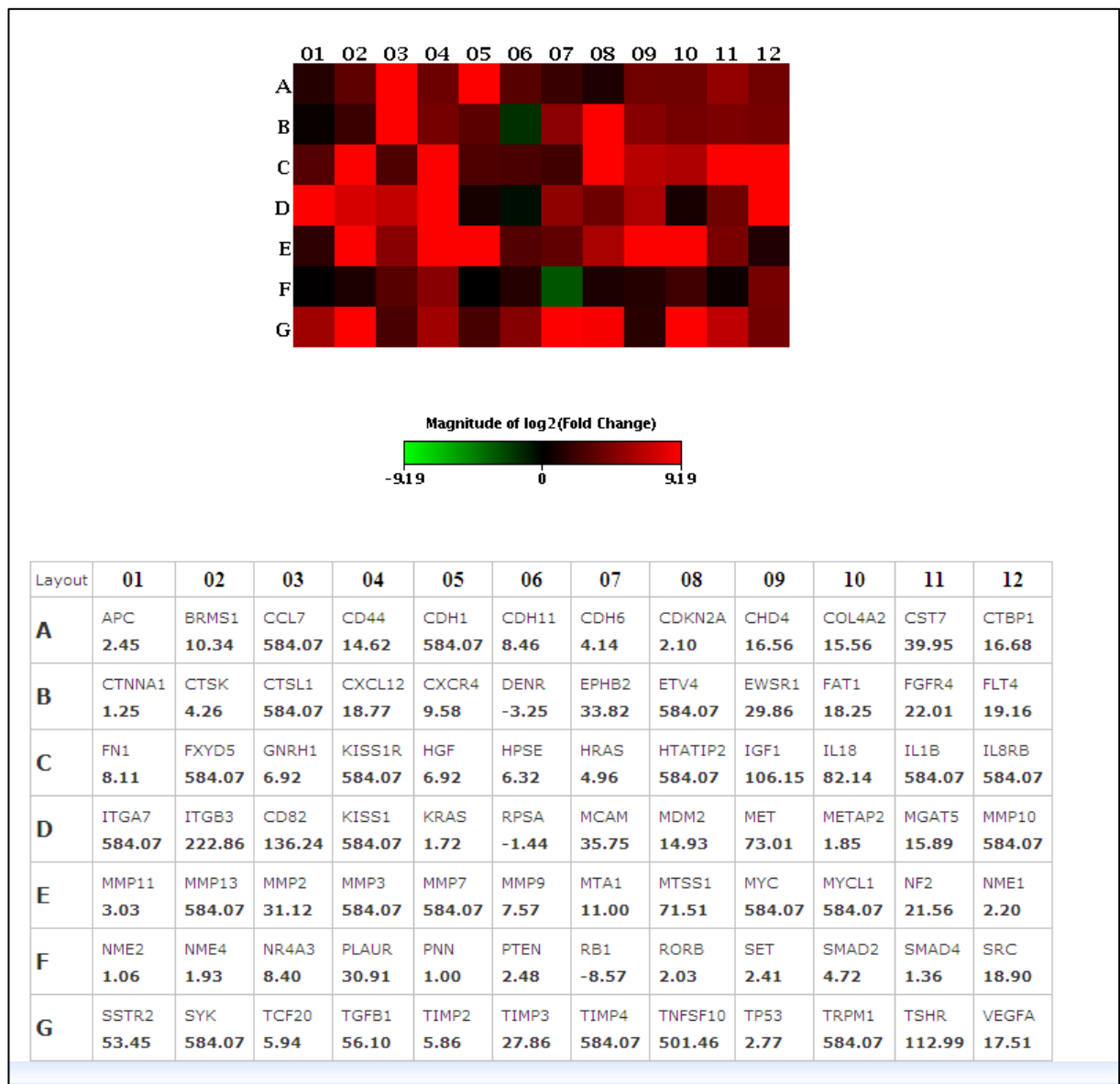
4.3.2. Grup 3: Allicin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları

Kelly NB hücre hatlarında allicin uygulaması sonrası, kontrol grubuna göre ekspresyonu ≥ 3 kat artış gösteren genler CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, ITGB3, VD82, TSHR, IGF1, IL18, MET, MTSS1, TGFB1, SSTR2, CST7, MCAM, EPHB2, MMP2, PLAUR, EWSR1, TIMP3, FGFR4, NF2, FLT4, SRC, CXCL12, FAT1, VEGFA, CTBP1, CHD4, MGAT5, COL4A2, MDM2, CD44, MTA1, BRMS1, CXCR4, CDH11, NR4A3, FN1, MMP9, HGF, GNRH1, HPSE, TCF20, TIMP2, HRAS, SMAD2, CTSK, CDH6, MMP11 olup, bunların içinde kontrol grubuna göre ekspresyonu en fazla (>500 kat) artan genler: CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 idi. Ekspresyonları <3 kat artış gösteren genler TP53, PTEN, APC, SET, NME1, CDKN2A, RORB, NME4, METAP2, KRAS, SMAD4, CTNNA1, NME2, PNN oldu. Kelly hücre hattında allicin uygulaması sonrası RB1, DENR genlerinin ekspresyonlarında ≥ 3 kat azalma, RPSA gen ekspresyonunda (<3 kat) azalma oldu. (Şekil 10). Allicin uygulanan Kelly hücre hattında DDX1, nm23H1, nm23H2 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre farklı değildi.

Kelly nöroblastom hücre hattında allicin uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre >500 kat artan genler:

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **KISS1R** ve **IL8RB** (reseptör),
 - o **CCL7** ve **TNFSF10** (sitokin ve kemokin),
 - o **IL1B** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu / sitokin ve kemokinler),
 - o **MYC, SYK, TRPM1**
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **CDH1, FXYD5, SYK** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **ITGA7** (hücre-hücre adhezyonu / transmembran reseptörleri)
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP10, MMP13, MMP3 ve MMP7** (matriks metalloproteinazları),
 - o **TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü)

- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri:*
 - o **ETV4** , **HTATIP2**, **MYCL1** ve **MYC** (transkripsiyon faktörü)
- *Apoptoz genleri:*
 - o **HTATIP2**, **TNFSF10** (apoptozun indüksiyonu),
 - o **IL1B**
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **IL1B** (hücre siklusunun regülasyonu),
 - o **MYC** (hücre siklus arresti ve kontrol noktası),
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **CTSL1**, **KISS1**



Şekil 10: Allicin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

Kelly nöroblastom hücre hattında allicin uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat azalan genler

- *Hücre büyüme ve proliferasyon geni: DENR*
- *Hücre siklus geni:*
 - o **RB1** (hücre siklusunun negatif regülasyonu / hücre siklus arrest ve kontrolü)
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri grubu:*
 - o **RB1** (transkripsiyon faktörleri)

Tümör metastaz PCR analizi sonucunda Kelly hücre hattında allicin uygulaması sonrası ekspresyonu en fazla (>500 kat) artan genler: Hücre büyüme ve proliferasyon genleri (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhezyon genleri (SYK, ITGA7, CDH1, FXYD5), transkripsiyon faktörleri (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptoz genleri (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), hücre siklus genleri (MYC, IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (CTSL1, KISS1) idi. Ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler ise hücre siklus genleri (RB1) ve hücre büyüme ve proliferasyon genleri (DENR) idi.

4.3.3. Grup 4: Resveratrol uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları

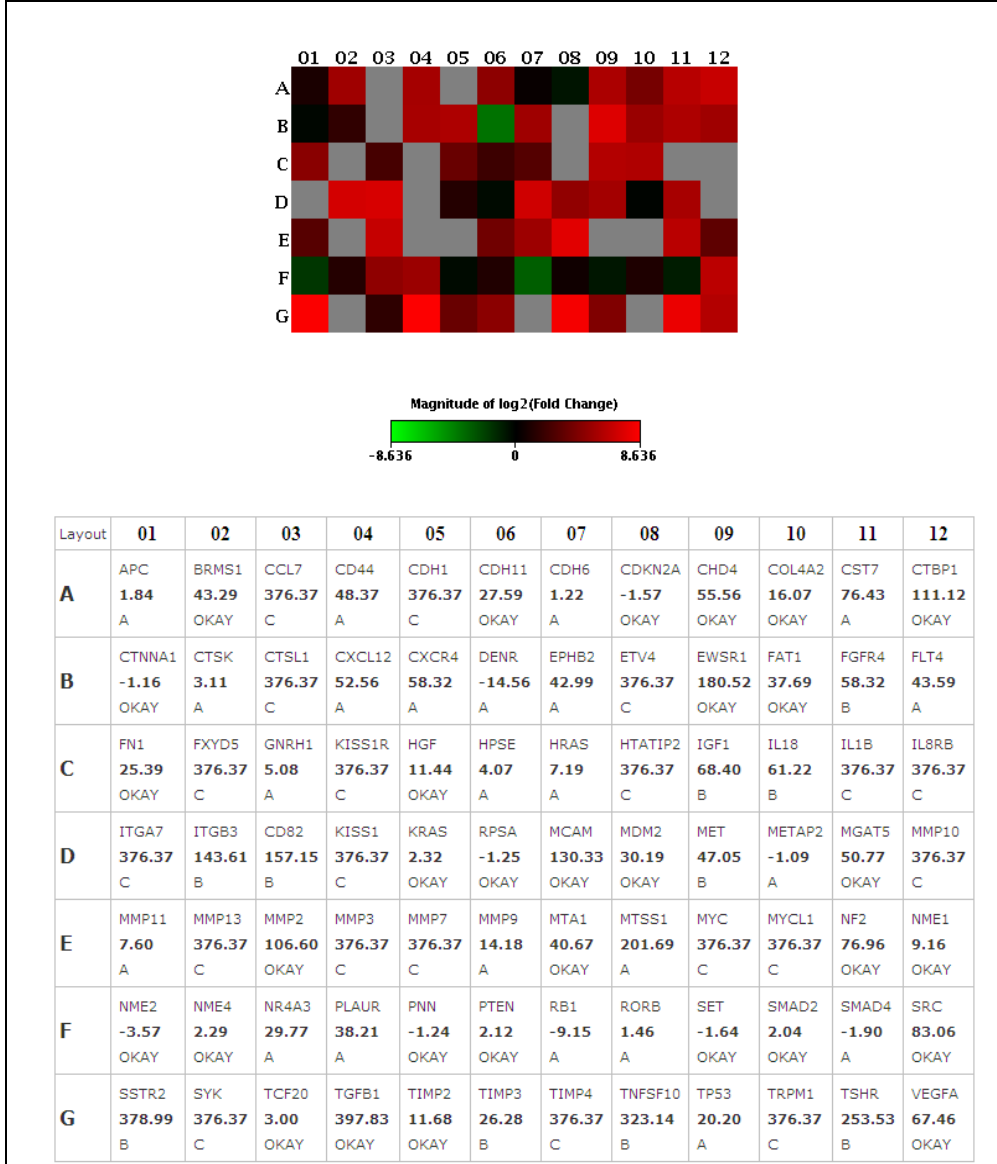
Kelly NB hücre hatlarında resveratrol uygulaması sonrası ekspresyonu ≥ 3 kat artan genler TGFB1, SSTR2, CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, TSHR, MTSS1, EWSR1, CD82, ITGB3, MCAM, CTBP1, MMP2, SRC, NF2, CST7, IGF1, VEGFA, IL18, FGFR4, CXCR4, CHD4, CXCL12, MGAT5, CD44, MET, FLT4, BRMS1, EPHB2, MTA1, PLAUR, FAT1, MDM2, NR4A3, CDH11, TIMP3, FN1, TP53, COL4A2, MMP9, TIMP2, HGF, NME1, MMP11, HRAS, GNRH1, HPSE, CTSK olup bunların içinde ekspresyonu en fazla (>300 kat) artan genler: TGFB1, SSTR2, CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 idi. Ekspresyonu minimal (<3 kat) artış gösteren genler: TCF20, KRAS, NME4, PTEN, SMAD2, APC, RORB, CDH6 idi. Ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler: DENR, RB1, NME2; <3 kat azalan genler SMAD4, SET, CDKN2A, RPSA, PNN, CTNNA1, METAP2 idi. (Şekil 11). Resveratrol uygulanan Kelly hücre hattında DDX1 ve nm23H1 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artma göstermişti (DDX1 x4 kat, nm23H1 x9 kat artış), nm23H2 gen ekspresyonu ise 3 kat azalmıştı.

Kelly nöroblastom hücre hattında resveratrol uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre >300 kat artan genler:

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **SSTR2** (reseptör / hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu),
 - o **IL1B** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu / sitokin ve kemokin),
 - o **TGFB1** (büyüme faktörü ve hormon),
 - o **CCL7** ve **TNFSF10** (sitokin ve kemokin),
 - o **KISS1R** ve **IL8RB** (reseptör),
 - o **MYC, SYK, TRPM1**
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **CDH1, SYK** ve **FXD5** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **ITGA7** (hücre-hücre adhezyonu / transmembran reseptörü),
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **IL1B** (hücre siklusunun regülasyonu),
 - o **MYC** (hücre siklus arrest ve kontrol noktası),
- *Apoptozis genleri:*
 - o **TNFSF10** (apoptoz indüksiyonu),
 - o **HTATIP2** (apoptozun indüksiyonu / antiapoptoz),
 - o **IL1B**
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri grubu:*
 - o **ETV4, HTATIP2** ve **MYC** (transkripsiyon faktörü),
 - o **MYCL1** (transkripsiyon faktörü),
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP10, MMP13, MMP3, MMP7** (matriks metalloproteinazları)
 - o **TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü)
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **CTSL1, KISS1**

Kelly nöroblastom hücre hattında resveratrol uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat azalan genler

- *Hücre büyüme ve proliferasyon geni:* **DENR**
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **RB1** (hücre siklusunun negatif regülasyonu, arrest ve kontrolü),
 - o **NME2** (hücre siklusunun negatif düzenleyicileri)
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri:*
 - o **NME2** ve **RB1** (transkripsiyon faktörleri)



Şekil 11: Resveratrol uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

Tümör metastaz PCR analizi sonucunda Kelly hücre hattında resveratrol uygulaması sonrası ekspresyonu en fazla artan genler: Hücre büyüme ve proliferasyon genleri (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK, TGFB1, SSTR2), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhezyon genleri (SYK, ITGA7, CDH1, FXD5), transkripsiyon faktörleri (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptoz genleri (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), hücre siklus genleri (MYC, IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (CTSL1, KISS1) idi. DDX1 ve nm23H1 genlerinin ekspresyonları da kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artma göstermişti. Ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler hücre siklus genleri ve transkripsiyon faktörleri (RB1, NME2), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (DENR, NME2).

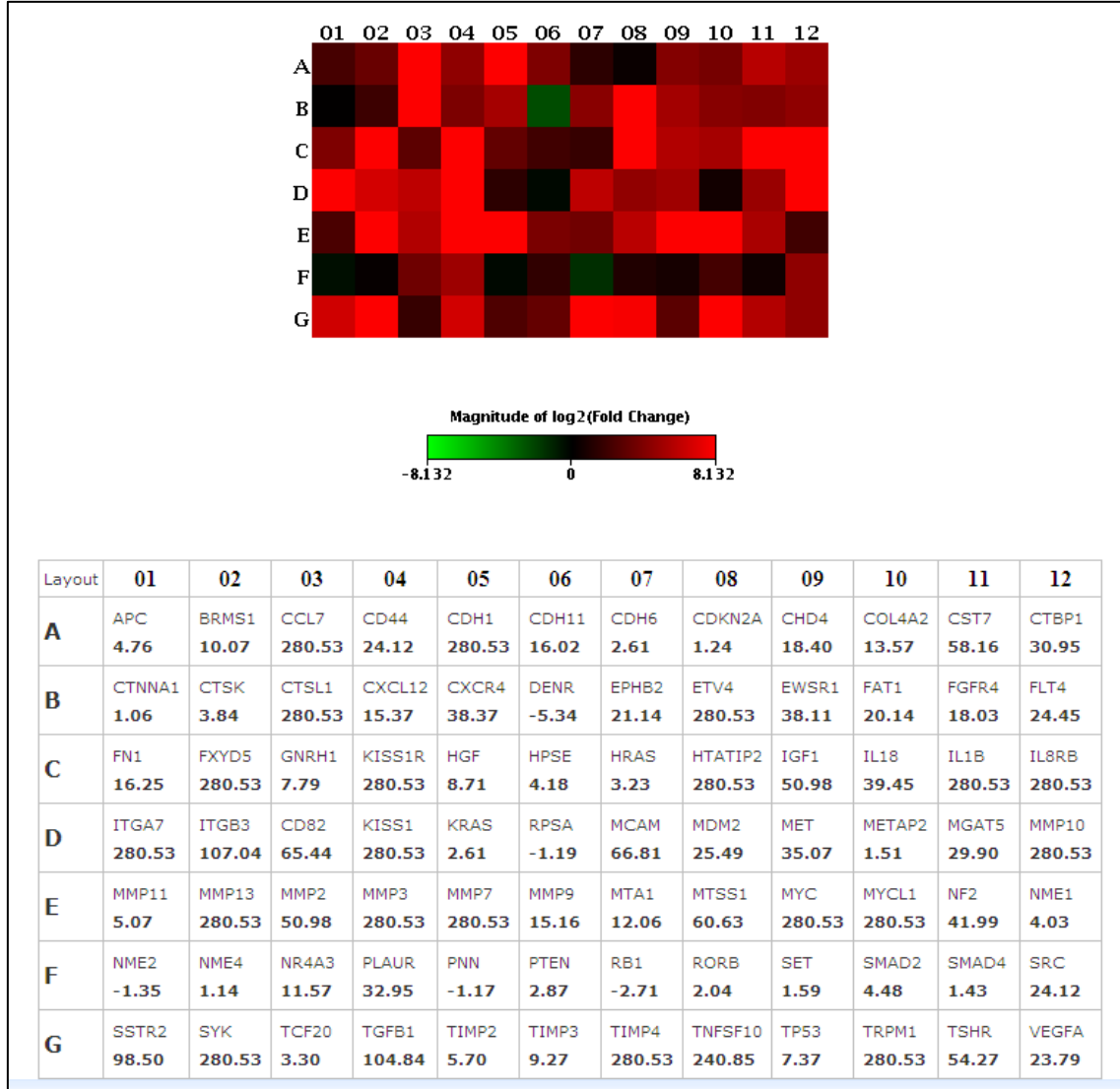
4.3.4. Grup 5: Allicin ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları

Kelly NB hücre hatlarında allicin ve sisplatin uygulaması sonrası, kontrol grubuna göre ekspresyonu ≥ 3 kat artan genler CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, ITGB3, TGFB1, SSTR2, MCAM, CD82, MTSS1, CST7, TSHR, IGF1, MMP2, NF2, IL18, CXCR4, EWSR1, MET, PLAUR, CTBP1, MGAT5, MDM2, FLT4, SRC, CD44, VEGFA, EPHB2, FAT1, CHD4, FGFR4, FN1, CDH11, CXCL12, MMP9, COL4A2, MTA1, NR4A3, BRMS1, TIMP3, HGF, GNRH1, TP53, TIMP2, MMP11, APC, SMAD2, HPSE, NME1, CTSK, TCF20, HRAS olup bunların içinde kontrol grubuna göre ekspresyonu en fazla (>200 kat) artan genler CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 idi. Ekspresyonları hafif (<3 kat) artış gösteren genler PTEN, CDH6, KRAS, RORB, SET, METAP2, SMAD4, CDKN2A, NME4, CTNNA1 idi. Ekspresyonları ≥ 3 kat azalma gösteren genler DENR, RB1, <3 kat azalma gösteren genler PNN, RPSA, NME2 idi (Şekil 12). Allicin+sisplatin uygulanan Kelly hücre hattında nm23H1 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat (4kat) artmıştı, DDX1 ve nm23H2 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre değişiklik göstermemişti.

Kelly nöroblastom hücre hattında allicin ve sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre >200 kat artan genler:

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **CCL7 ve TNFSF10** (sitokin ve kemokin),
 - o **IL1B** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu / sitokin ve kemokin),
 - o **KISS1R ve IL8RB** (reseptör),
 - o **MYC, SYK, TRPM1**
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **CDH1, FXYD5 ve SYK** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **ITGA7** (hücre-hücre adhezyonu / transmembran reseptörü),
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **IL1B** (hücre siklusunun regülasyonu),
 - o **MYC** (hücre siklus arrest ve kontrol noktası)
- *Apoptoz genleri:*
 - o **HTATIP2** (apoptozun indüksiyonu / antiapoptoz),
 - o **TNFSF10** (apoptozun indüksiyonu),

- o **IL1B**
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri:*
 - o **ETV4, HTATIP2, MYC ve MYCL1** (transkripsiyon faktörleri)
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP10, MMP13, MMP3 ve MMP7** (matriks metalloproteinazları)
 - o **TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü)
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **CTSL1, KISS1**



Şekil 12. Allicin ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

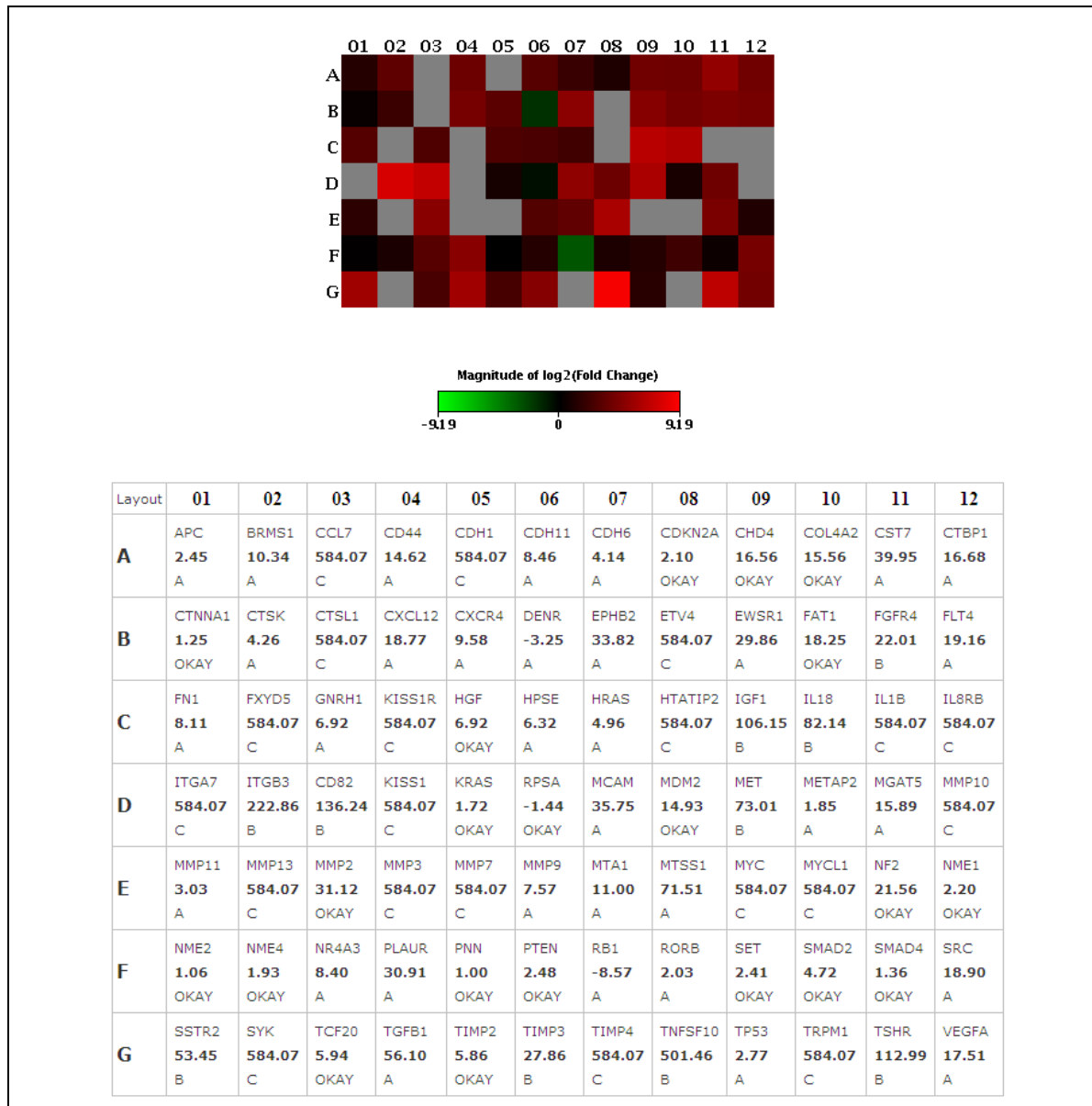
Kelly nöroblastom hücre hattında allicin ve sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat azalan genler

- *Hücre büyüme ve proliferasyon geni: DENR*
- *Hücre siklus geni:*
 - o **RB1** (hücre siklusunun negatif regülasyonu / hücre siklus arrest ve kontrol noktası)
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri:*
 - o **RB1** (transkripsiyon faktörleri)

Tümör metastaz PCR analizi sonucunda Kelly hücre hattında allicin ve sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonu en fazla (>200 kat) artan genler: Hücre büyüme ve proliferasyon genleri (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhezyon genleri (SYK, ITGA7, CDH1, FXYD5), transkripsiyon faktörleri (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptoz genleri (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), hücre siklus genleri (MYC, IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (CTSL1, KISS1) idi

4.3.5. Grup 6: Resveratrol ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattı bulguları

Kelly NB hücre hatlarında resveratrol ve sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonu ≥ 3 kat artan genler CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, TSHR, MTSS1, EWSR1, CD82, ITGB3, MCAM, CTBP1, MMP2, SRC, NF2, CST7, IGF1, VEGFA, IL18, FGFR4, CHD4, CXCL12, MGAT5, CD44, MET, FLT4, BRMS1, EPHB2, MTA1, PLAUR, FAT1, MDM2, TIMP3, COL4A2, TGFB1, SSTR2, CXCR4, NR4A3, CDH11, FN1, MMP9, HGF, GNRH1, HPSE, TCF20, TIMP2, HRAS, SMAD2, CTSK, CDH6, MMP11 olup bunların içinde ekspresyonu en fazla (>500 kat) artan genler: CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 idi. Ekspresyonu <3 kat artan genler: TP53, PTEN, APC, SET, NME1, CDKN2A, RORB, NME4, METAP2, KRAS, SMAD4, CTNNA1, NME2, PNN idi. Ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler: DENR, RB1, <3 kat azalan gen RPSA idi. (Şekil 13). Resveratrol+sisplatin uygulanan Kelly hücre hattında kontrol grubuna göre DDX1, nm23H1, nm23H2 genlerinin ekspresyonları kontrol grubuna göre farklı değildi.



Şekil 13. Resveratrol ve sisplatin uygulanan Kelly nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

Kelly nöroblastom hücre hattında resveratrol ve sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre >500 kat artan genler:

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o CCL7 ve TNFSF10 (sitokin ve kemokin),
 - o IL8RB ve KISS1R (reseptör),
 - o IL1B (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu / sitokin ve kemokin),
 - o MYC, SYK, TRPM1
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o CDH1, FXYD5, SYK (hücre-hücre adhezyonu),

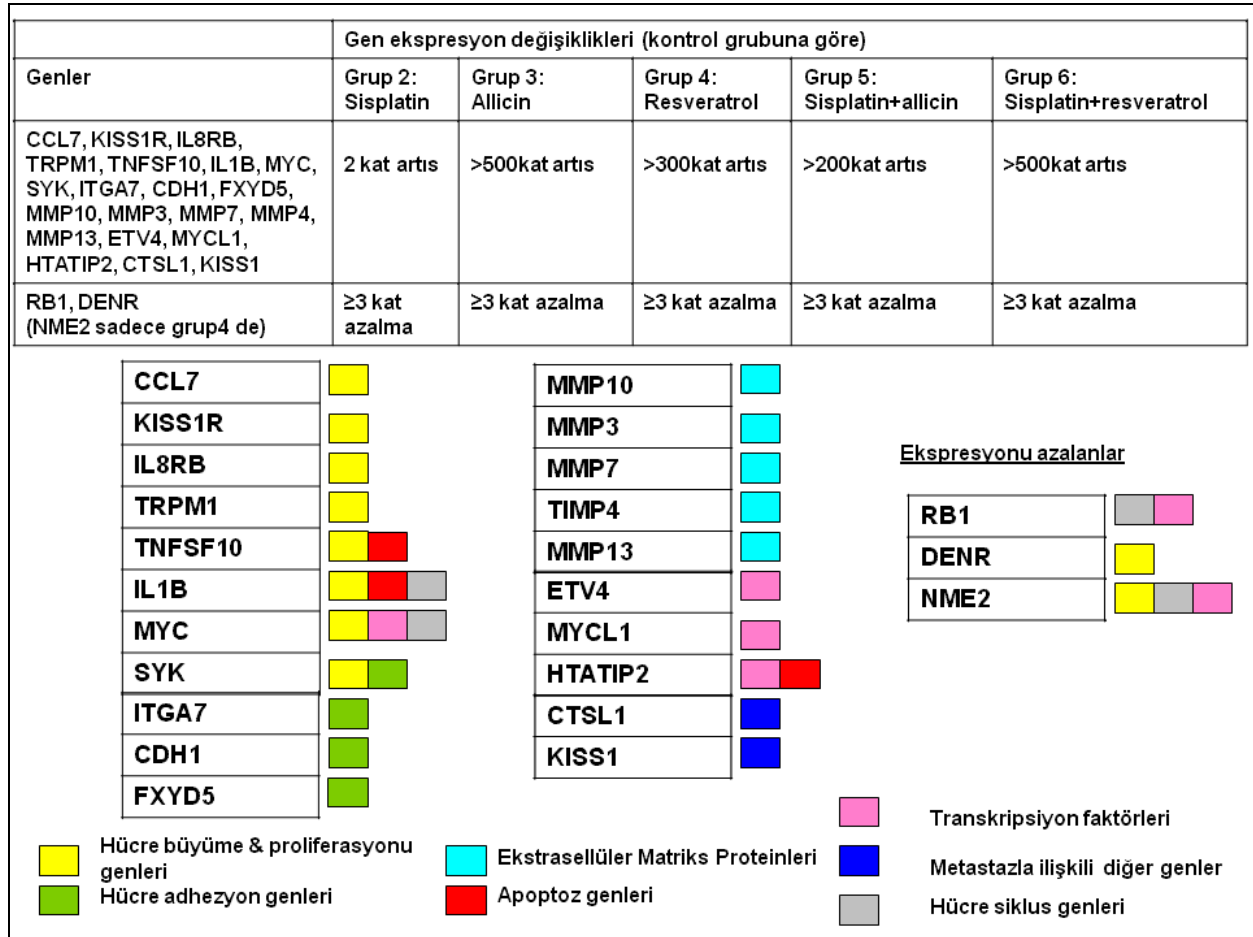
- o **ITGA7** (hücre-hücre adhezyonu / transmembran reseptörleri),
- *Apoptoz genleri:*
 - o **HTATIP2** (apoptozun indüksiyonu / antiapoptoz),
 - o **TNFSF10** (apoptozun indüksiyonu)
 - o **IL1B**
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **IL1B** (hücre siklusunun regülasyonu)
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri:*
 - o **ETV4, MYC, HTATIP2, MYCL1** (transkripsiyon faktörü),
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP10 MMP13 MMP3 ve MMP7** (matriks metalloproteinazları),
 - o **TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü),
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **MYC** (hücre siklus arrest ve kontrolü)
- *Metastaz ilişkili diğer genler: CTSL1, KISS1*

Kelly nöroblastom hücre hattında resveratrol ve sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat azalan genler

- *Hücre büyüme ve proliferasyon geni: DENR*
- *Hücre siklus geni:*
 - o **RB1** (hücre siklusunun negatif regülasyonu / hücre siklus arrest ve kontrol noktası)
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri:*
 - o **RB1** (transkripsiyon faktörleri)

Tümör metastaz gen PCR analizi sonucunda Kelly hücre hattında resveratrol ve sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonu en fazla artan genler: Hücre büyüme ve proliferasyon genleri (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhezyon genleri (SYK, ITGA7, CDH1, FXYD5), transkripsiyon faktörleri (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptoz genleri (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), hücre siklus genleri (MYC, IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (CTSL1, KISS1) idi.

Kelly hücre dizilerinin tüm çalışma grupları değerlendirildiğinde, allicin, resveratrol, allicin+sisplatin, resveratrol+sisplatin uygulamalarıyla ekspresyonları kontrol grubuna göre en fazla artış gösteren genlerin birbiriyle örtüştüğü görüldü. Bu genler gruplarına göre sınıflandırıldı ve şekil 14’de özetlendi.



Şekil 14. Kelly hücre hattında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulandığında ekspresyonu en fazla etkilenen genler

4.4. SH-SY5Y hücre hattında metastatik gen analizleri

SH-SY5Y hücre hattı kültüre edildi. Altı grup vardı.

Grup 1: Kontrol (Medium)

Grup 2: Sisplatin (7.5µM) uygulaması

Grup 3: Allicin (0.05µM) uygulaması

Grup 4: Resveratrol (25µM) uygulaması

Grup 5: Sisplatin (7.5µM) + Allicin (0.05µM) uygulaması

Grup 6: Sisplatin (7.5µM) +Resveratrol (25µM) uygulaması

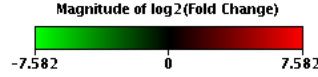
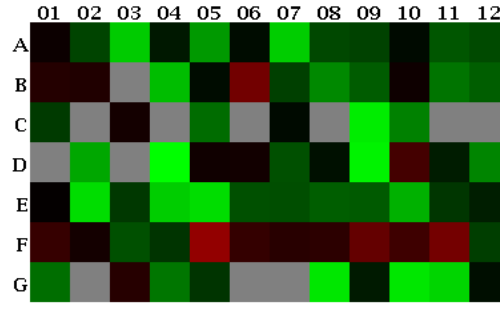
Sisplatin uygulanan hücrelerin %50 oranında canlılığını kaybettiği sisplatin konsantrasyonu (LD50) SH-SY5Y hücre hattı için 7.5µM olarak belirlendi ve deneylerde bu dozlar kullanıldı. Sisplatin ile birlikte uygulandığında sisplatinin LD50 sini değiştirmeyen doz resveratrol için 25µM ve allicin için 0.05µM bulundu.

4.4.1. Grup 2: Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları

SH-SY5Y hücre hattında sisplatin tek başına uygulandığında ekspresyonları ≥ 3 kat artan genler PNN, SMAD4, DENR, SET, METAP2, SMAD2, NME2 olup, ekspresyonları < 3 kat artan genler PTEN, RORB, RB1, TCF20, CTNNA1, CTSK, NME4, GNRH1, RPSA, KRAS, FAT1, APC, MMP11 idi. SH-SY5Y hücre hatlarında sisplatin tek başına uygulandığında ekspresyonları ≥ 3 kat azalan genler KISS1, TNFSF10, MET, IGF1, TRPM1, MMP13, MMP7, TSHR, MMP3, CDH6, CCL7, CXCL12, CTSL1, FXD5, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, TIMP4, SYK, CD82, HPSE, TIMP3, MYCL1, ITGB3, CDH1, ETV4, MMP10, IL18, TGFB1, FGFR4, SSTR2, HGF, FLT4, MTSS1, EWSR1, MYC, CST7, MMP9, MCAM, NR4A3, MTA1, CTBP1, CDKN2A, BRMS1, CHD4, EPHB2, SRC, FN1, MMP2, NF2 idi; ekspresyonları < 3 kat azalan genler TIMP2, PLAUR, NME1, MGAT5, TP53, CD44, MDM2, VEGFA, CXCR4, CDH11, HRAS, COL4A2 idi. (Şekil 15). SH-SY5Y hücre hatlarında sisplatin uygulamasıyla DDX1, nm23H2 genlerinin ekspresyonlarında kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artmış (DDX1 8 kat, nm23H2 3 kat), nm23H1 ekspresyonu değişmemişti.

SH-SY5Y Hücre hattında Sisplatin uygulamasıyla ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artan genler:

- **DDX1**
- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **NME2** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu),
 - o **DENR, SET**
- *Hücre adhezyon geni:*
 - o **PNN** (hücre-hücre adhezyonu),
- *Hücre siklus geni:*
 - o **NME2** (hücre siklusunun negatif düzenleyicisi),
- *Transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri:*
 - o **SMAD4 ve NME2** (transkripsiyon faktörü),
 - o **SMAD2** (regülatör)
- *Metastazla ilişkili diğer geni: METAP2*



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APC	BRMS1	CCL7	CD44	CDH1	CDH11	CDH6	CDKN2A	CHD4	COL4A2	CST7	CTBP1
	1.28	-4.09	-67.28	-1.67	-23.95	-1.26	-70.62	-4.38	-3.87	-1.22	-5.78	-4.54
	A	A	B	B	B	A	B	A	OKAY	A	B	OKAY
B	CTNNA1	CTSK	CTSL1	CXCL12	CXCR4	DENR	EPHB2	ETV4	EWSR1	FAT1	FGFR4	FLT4
	2.10	1.92	-43.77	-50.98	-1.28	10.54	-3.71	-17.05	-6.78	1.31	-10.94	-6.83
	A	A	C	B	A	A	A	B	A	A	B	A
C	FN1	FXYS5	GNRH1	KISS1R	HGF	HPSE	HRAS	HTATIP2	IGF1	IL18	IL1B	IL8RB
	-3.32	-43.77	1.48	-43.77	-9.14	-43.77	-1.22	-43.77	-	-14.74	-43.77	-43.77
	A	C	A	C	A	C	OKAY	C	B	B	C	C
D	ITGA7	ITGB3	CD82	KISS1	KRAS	RPSA	MCAM	MDM2	MET	METAP2	MGAT5	MMP10
	-43.77	-32.27	-43.77	-	1.41	1.46	-5.25	-1.41	-	4.02	-1.76	-15.80
	C	B	C	B	A	OKAY	A	OKAY	B	A	A	B
E	MMP11	MMP13	MMP2	MMP3	MMP7	MMP9	MTA1	MTSS1	MYC	MYCL1	NF2	NME1
	1.09	-97.82	-3.21	-71.11	-95.14	-5.29	-5.07	-6.83	-6.51	-39.18	-3.10	-1.86
	A	B	OKAY	B	B	A	OKAY	B	A	B	A	OKAY
F	NME2	NME4	NR4A3	PLAUR	PNN	PTEN	RB1	RORB	SET	SMAD2	SMAD4	SRC
	3.07	1.52	-5.21	-2.91	21.38	2.96	2.25	2.48	7.93	3.58	10.76	-3.64
	OKAY	OKAY	A	A	A	OKAY	A	A	OKAY	A	A	A
G	SSTR2	SYK	TCF20	TGFB1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	TNFSF10	TP53	TRPM1	TSHR	VEGFA
	-9.73	-43.77	2.22	-11.33	-2.97	-43.77	-43.77	-	-1.70	-	-83.98	-1.31
	B	C	A	B	OKAY	C	C	B	A	B	B	A

Şekil 15: Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

SH-SY5Y Hücre hattında sisplatin uygulamasıyla ekspresyonu kontrol grubuna göre >50 kat azalan genler:

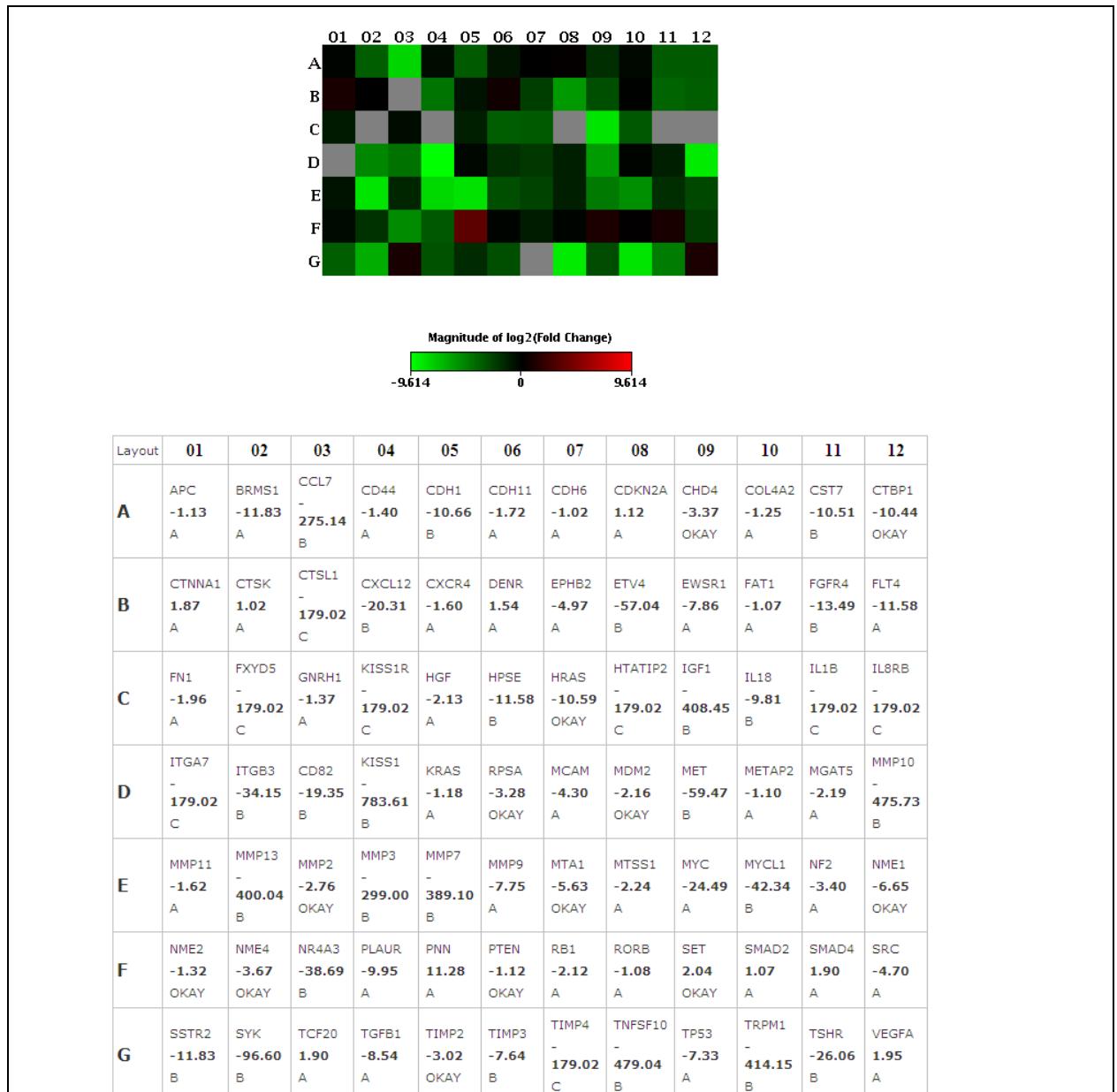
- *Hücre büyümesi ve proliferasyonu genleri:*
 - o **MET, TSHR** (reseptör),
 - o **TNFSF10, CCL7 ve CXCL12** (sitokin ve kemokin),
 - o **IGF1** (hücre proliferasyonunun pozitif yönde kontrolü),
 - o **TRPM1**

- *Apoptoz geni:*
 - o **TNFSF10** (apoptozun indüksiyonu)
- *Hücre adhezyonu geni:*
 - o **CDH6** (hücre-hücre adhezyonu)
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP13, MMP3, MMP7** (matriks metalloproteinazları)
- *Metastaz ilişkili diğer geni: **KISS1***

SH-SY5Y Hücre hatlarında Sisplatin uygulamasıyla ekspresyonları ≥ 3 kat artan genler hücre adhezyon genleri (PNN), transkripsiyon faktörleri (SMAD4, NME2, SMAD2), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (DENR, SET, NME2), hücre siklus genleri (NME2), metastaz ilişkili diğer genler (METAP2) idi. SH-SY5Y Hücre hatlarında Sisplatin uygulamasıyla gen ekspresyonlarında genel olarak azalma izlendi. Gen ekspresyonu >50 kat azalan genler, Hücre büyümesi ve proliferasyonu genleri (MET, IGF1, TRPM1, TNFSF10, CCL7, CXCL12, TSHR), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP13, MMP3, MMP7) apoptoz genleri (TNFSF10), metastaz ilişkili genler (KISS1), hücre adhezyonu genleri (CDH6) idi.

4.4.2. Grup 3: Allicin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları

SH-SY5Y hücre hattında allicin tek başına uygulandığında ekspresyonu ≥ 3 kat artan gen PNN geniydi, ekspresyonu <3 kat artan genler SET, VEGFA, SMAD4, TCF20, CTNNA1, DENR, CDKN2A, SMAD2, CTSK idi. Ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7, IL8RB, IL1B, HTATIP2, KISS1R, FXVD5, CTSL1, SYK, MET, ETV4, MYCL1, NR4A3, ITGB3, TSHR, MYC, CXCL12, CD82, FGFR4, SSTR2, BRMS1, HPSE, FLT4, CDH1, HRAS, CST7, CTBP1, PLAUR, IL18, TGFB1, EWSR1, MMP9, TIMP3, TP53, NME1, MTA1, EPHB2, SRC, MCAM, NME4, NF2, CHD4, RPSA, TIMP2 idi; ekspresyonu <3 kat azalan genler MMP2, MTSS1, MGAT5, MDM2, HGF, RB1, FN1, CDH11, MMP11, CXCR4, CD44, GNRH1, NME2, COL4A2, KRAS, APC, PTEN, METAP2, RORB, FAT1, CDH6 idi. (Şekil 16). SH-SY5Y hücre hatlarında allicin uygulamasıyla kontrol grubuna göre DDX1 ekspresyonu ≥ 3 kat (7 kat) artmış, nm23H1 gen ekspresyonu ≥ 3 kat azalmış, nm23H2 gen ekspresyonu değişmemişti.



Şekil 16. Allicin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

SH-SY5Y hücre hattında allicin uygulaması sonrası ekspresyonu ≥ 3 kat artan genler:

- **DDX1**
- *Hücre adhezyon geni:*
 - o **PNN** (hücre-hücre adhezyonu),

SH-SY5Y hücre hattında allicin uygulaması sonrası ekspresyonu >100 kat azalan genler:

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **TNFSF10 ve CCL7** (sitokin, kemokin),
 - o **KISS1R ve IL8RB** (reseptör),
 - o **IGF1** (hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonu / büyüme faktörü ve hormon),

- o **IL1B** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu / sitokin ve kemokinler),
- o **TRPM1**,
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **FXYD5** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **ITGA7** (hücre-hücre adhezyonu / transmembran reseptörü),
- *Hücre siklus geni:* **IL1B** (hücre siklusunun regülasyonu)
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP10, MMP13, MMP3 ve MMP7** (matriks metalloproteinazları),
 - o **TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü)
- *Apoptozis genleri:*
 - o **TNFSF10** (apoptoz indüksiyonu),
 - o **HTATIP2** (apoptozun indüksiyonu / antiapoptoz), **IL1B**
- *Transkripsiyon faktörü ve regülatörü:*
 - o **HTATIP2** (transkripsiyon faktörü),
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **KISS1, CTSL1**

SH-SY5Y hücre hattında allicin uygulaması sonrası ekspresyonu 10-100 kat azalan genler:

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **MET, NR4A3, FGFR4, FLT4** (reseptör),
 - o **TSHR** (hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonu / reseptör),
 - o **SSTR2** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu / reseptör),
 - o **CTBP1** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu),
 - o **CXCL12** (sitokin ve kemokin),
 - o **SYK, MYC, HRAS**
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **SYK ve CDH1** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **ITGB3** (transmembran reseptörü),
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **MYC** (hücre siklus arrest ve kontrol noktası),
 - o **BRMS1** (hücre siklusunun negatif regülasyonu),
 - o **HRAS** (hücre siklusu regülasyonu)
- *Ekstrasellüler matriks proteini:* **HPSE**
- *Transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri:*
 - o **ETV4, MYCL1, NR4A3 ve MYC** (transkripsiyon faktörleri),
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **CD82, CST7**

4.4.3. Grup 4: Resveratrol uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları

SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol uygulandığında ekspresyonu ≥ 3 kat artan genler PNN, DENR idi; ekspresyonu < 3 kat artan genler RB1, SMAD4 idi. Ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler IGF1, MMP10, CXCL12, TNFSF10, MMP7, MMP13, MET, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, KISS1, CTSL1, KISS1R, HTATIP2, IL8RB, TIMP4, FXYD5, IL1B, HPSE, ETV4, TSHR, ITGA7, MYCL1, CD82, TIMP3, EWSR1, SYK, BRMS1, ITGB3, SSTR2, HGF, CTBP1, IL18, MYC, PLAUR, CST7, MMP9, HRAS, NR4A3, FGFR4, CHD4, SRC, CDH1, FLT4, NF2, NME1, MTA1, TP53, MMP2, TGFB1, MTSS1, EPHB2, CDKN2A, FN1, COL4A2, MCAM, MDM2, TIMP2, MGAT5, CD44, CXCR4, CDH11, RORB, RPSA, METAP2, NME4, APC, MMP11; ekspresyonu < 3 kat azalan genler VEGFA, GNRH1, KRAS, PTEN, CTSK, NME2, TCF20, SMAD2, SET, CTNNA1, FAT1 idi. (Şekil 17) SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol uygulamasıyla kontrol grubuna göre DDX1 ekspresyonu ≥ 3 kat (17kat) artmış, nm23H1 ≥ 3 kat azalmış, nm23H2 değişmemişti.

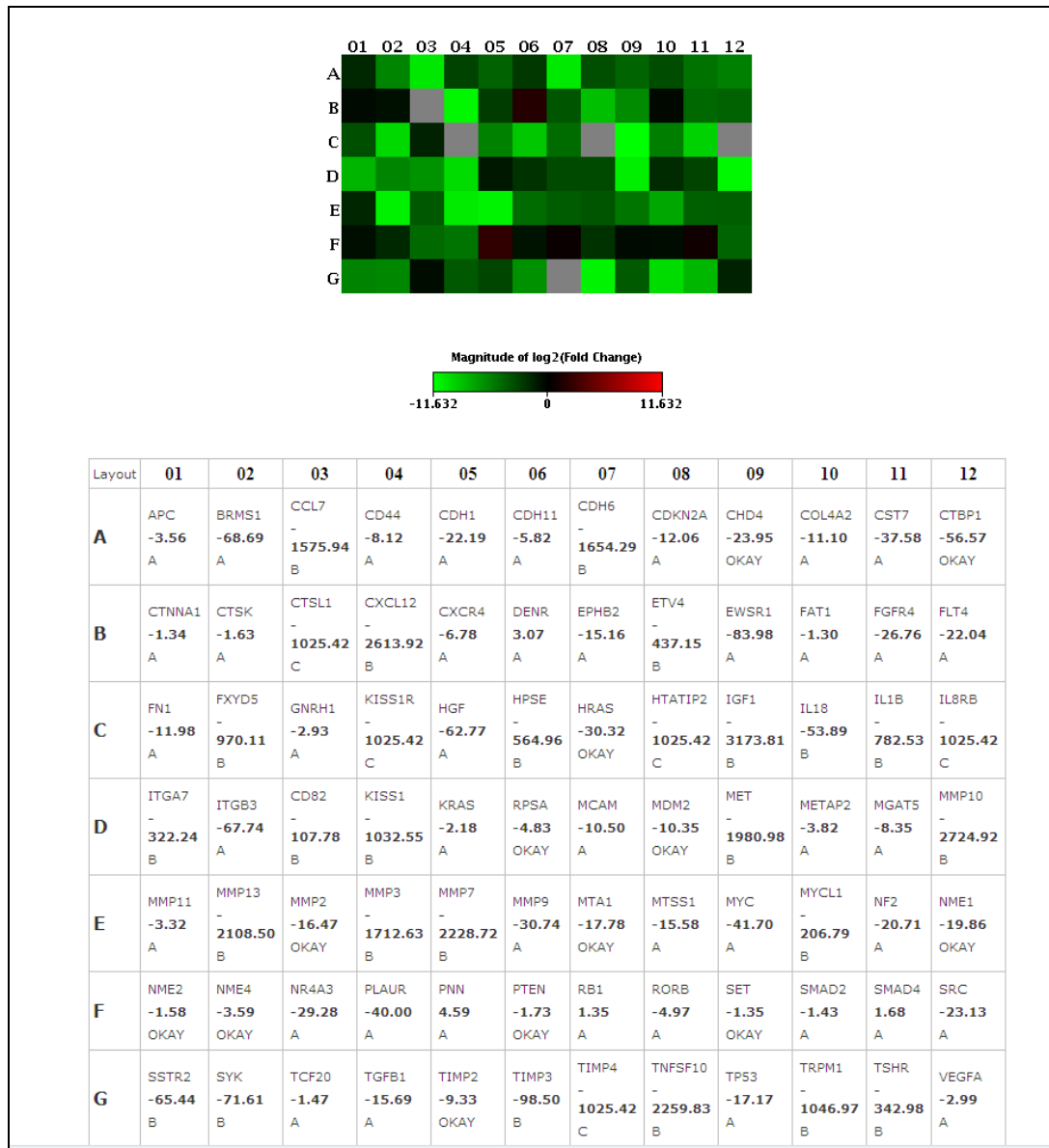
SH-SY5Y Hücre hattında resveratrol uygulamasıyla ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artan genler

- **DDX1**
- *Hücre adhezyon geni: PNN* (hücre-hücre adhezyonu),
- *Hücre büyüme ve proliferasyon geni: DENR*

SH-SY5Y Hücre hattında resveratrol uygulamasıyla ekspresyonu kontrol grubuna göre > 100 kat azalan genler

- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **IGF1** (hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonu / büyüme faktörü ve hormon),
 - o **CXCL12 ve TNFSF10, CCL7** (sitokin, kemokinler),
 - o **IL8RB ve MET** (reseptör),
 - o **IL1B** (hücre proliferasyonunun negatif regülasyonu / sitokin ve kemokin),
 - o **TSHR** (hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonu),
 - o **TRPM1**
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **CDH6, FXYD5** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **ITGA7** (hücre-hücre adhezyonu / transmembran reseptör)
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **IL1B** (hücre siklusu regülasyonu)
- *Transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri:*
 - o **HTATIP2, ETV4 ve MYCL1** (transkripsiyon faktörü)

- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP10, MMP7, MMP13, MMP3** (matriks metalloproteinazı),
 - o **TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü),
 - o **HPSE**
- *Apoptoz genleri:*
 - o **TNFSF10** (apoptozun indüksiyonu),
 - o **HTATIP2** (apoptozun indüksiyonu / antiapoptoz),
 - o **IL1B**
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **KISS1, CTSL1, KISS1R, CD82**



Şekil 17. Resveratrol uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

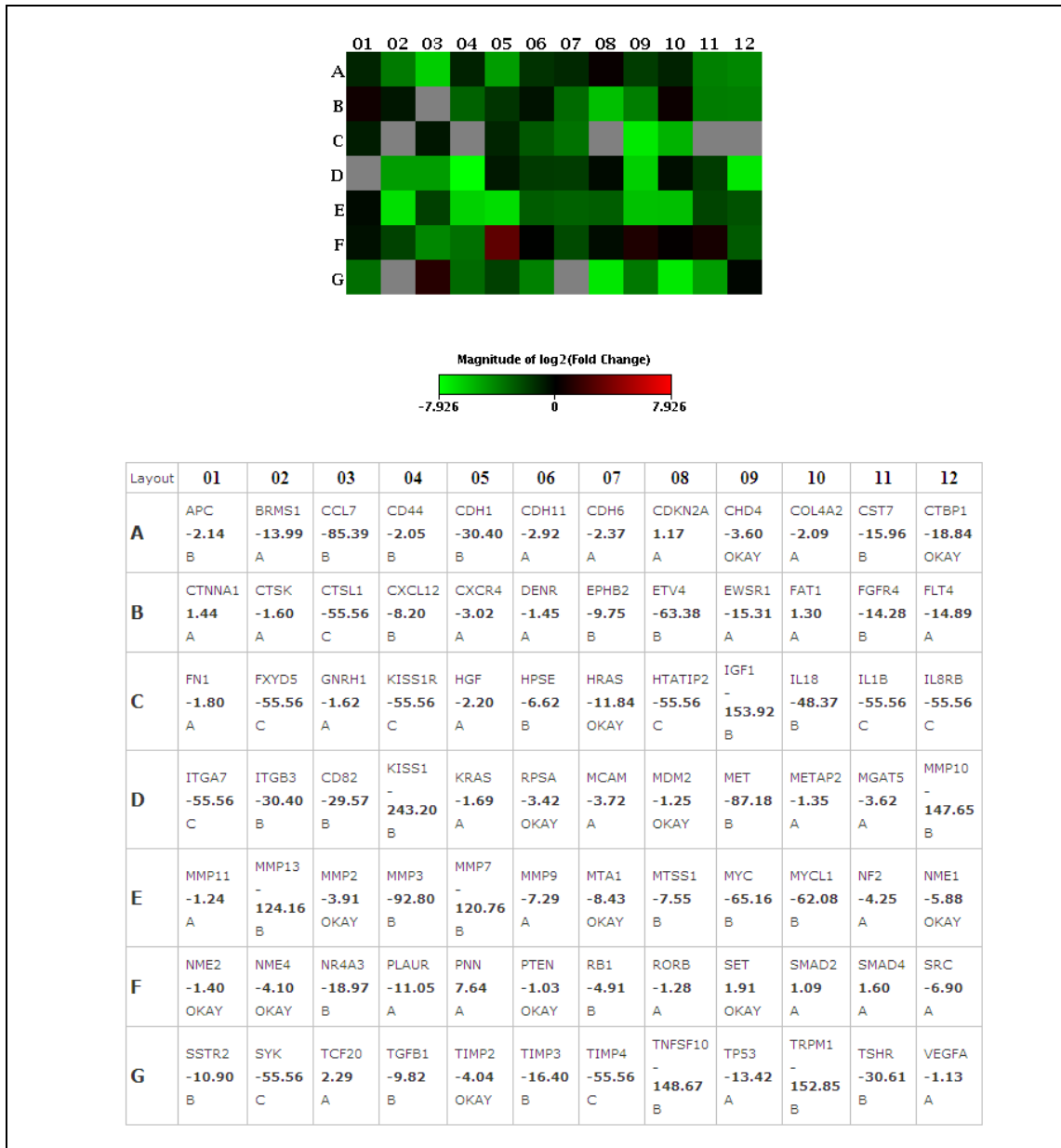
SH-SY5Y Hücre hattında resveratrol uygulamasıyla ekspresyonu 10-100 kat azalan genler

- *Hücre büyüme & proliferasyonu genleri:*
 - o **SSTR2, CTBP1, NME1, CDKN2A, MDM2 ve NF2** (Hücre büyüme & proliferasyonunun negatif regülasyonu),
 - o **HGF, TGFB1** (büyüme faktörü ve hormon),
 - o **PLAUR, NR4A3, FGFR4, FLT4, EPHB2** (reseptör),
 - o **EWSR1, SYK, MYC, HRAS, SRC**
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **ITGB3** (transmembran reseptörü),
 - o **CDH1, CHD4, SYK** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **FN1, MCAM**
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP9, MMP2**, (matriks metalloproteinazı),
 - o **TIMP3** (matriks metalloproteinaz inhibitörü),
 - o **COL4A2**
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **BRMS, MTSS1, NME1 ve NF2** (hücre siklusunun negatif regülasyonu),
 - o **MYC, CDKN2A ve TP53** (Hücre siklus genleri, hücre siklus arrest ve kontrol noktası),
 - o **HRAS, TGFB1** (hücre siklusunun regülasyonu)
- *Apoptoz genleri:*
 - o **TIMP3, IL18, TP53** (apoptozun indüksiyonu),
 - o **TGFB1** (antiapoptoz)
- *Transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri:*
 - o **MYC, NR4A3, MTA1, TP53** (Transkripsiyon faktörü),
 - o **EWSR1** (transkripsiyon faktör regülatörü)
- *Metastaz ilişkili diğer genler: CST7*

4.4.4. Grup 5: Allicin ve Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları

SH-SY5Y hücre hatlarında allicin ve sisplatin birlikte uygulandığında ekspresyonu ≥ 3 kat artan gen PNN; ekspresyonu < 3 kat artan genler TCF20, SET, SMAD4, CTNNA1, FAT1, CDKN2A, SMAD2 idi. SH-SY5Y hücre hatlarında allicin ve sisplatin birlikte uygulandığında ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler: KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, MMP3, MET, CCL7, MYC, ETV4, MYCL1, TIMP4, ITGA7, IL8RB, IL1B, HTATIP2,

KISS1R, FXYD5, CTSL1, SYK, IL18, TSHR, ITGB3, CDH1, CD82, NR4A3, CTBP1, TIMP3, CST7, EWSR1, FLT4, FGFR4, BRMS1, TP53, HRAS, PLAUR, SSTR2, TGFB1, EPHB2, MTA1, CXCL12, MTSS1, MMP9, SRC, HPSE, NME1, RB1, NF2, NME4, TIMP2, MMP2, MCAM, MGAT5, CHD4, RPSA, CXCR4 idi; ekspresyonu <3 kat azalan genler CDH11, CDH6, HGF, APC, COL4A2, CD44, FN1, KRAS, GNRH1, CTSK, DENR, NME2, METAP2, RORB, MDM2, MMP11, VEGFA, PTEN idi. (Şekil 18). SH-SY5Y hücre hatlarında allicin ve sisplatin uygulamasıyla kontrol grubuna göre DDX1 ekspresyonu ≥ 3 kat (13kat) artmış, nm23H1 ≥ 3 kat azalmış, nm23H2 değişmemişti.



Şekil 18: Allicin ve sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

SH-SY5Y Hücree hattında allicin ve sisplatin uygulamasıyla ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artan genler

- **DDX1**
- *Hücree adhezyon genleri:*
 - o **PNN** (hücree-hücree adhezyonu),

SH-SY5Y hücree hatlarında allicin ve sisplatin birlikte uygulandığında ekspresyonu 100 katın üzerinde azalma gösteren genler hücree büyüme ve proliferasyon genleri (IGF1, TRPM1, TNFSF10), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP7, MMP10, MMP13), apoptoz genleri (TNFSF10) ve metastaz ilişkili diğer genlerdi (KISS1).

SH-SY5Y Hücree hattında allicin ve sisplatin uygulamasıyla ekspresyonu >100 kat azalan genler:

- *Hücree büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **TNFSF10** (sitokin, kemokin),
 - o **IGF1** (hücree proliferasyonunun pozitif regülasyonu / büyüme faktörü ve hormon),
 - o **TRPM1**
- *Apoptozis genleri:*
 - o **TNFSF10** (apoptozun indüksiyonu),
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP10, MMP13 ve MMP7** (matriks metalloproteinazları)
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **KISS1**

SH-SY5Y Hücree hattında allicin ve sisplatin uygulamasıyla ekspresyonu 10-100 kat azalan genler:

- *Hücree büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **MET, KISS1R, IL8RB, NR4A3, FLT4 , FGFR4 , PLAUR** (reseptör),
 - o **CCL7** (sitokin, kemokin),
 - o **IL1B** (hücree proliferasyonunun negatif regülasyonu/ sitokin ve kemokinler),
 - o **CTBP1** (hücree proliferasyonunun negatif regülasyonu),
 - o **SSTR2** (Hücree büyüme ve proliferasyon genleri, hücree proliferasyonunun negatif regülasyonu / reseptör),
 - o **IL18** (hücree proliferasyonunun pozitif regülasyonu / sitokin ve kemokinler),

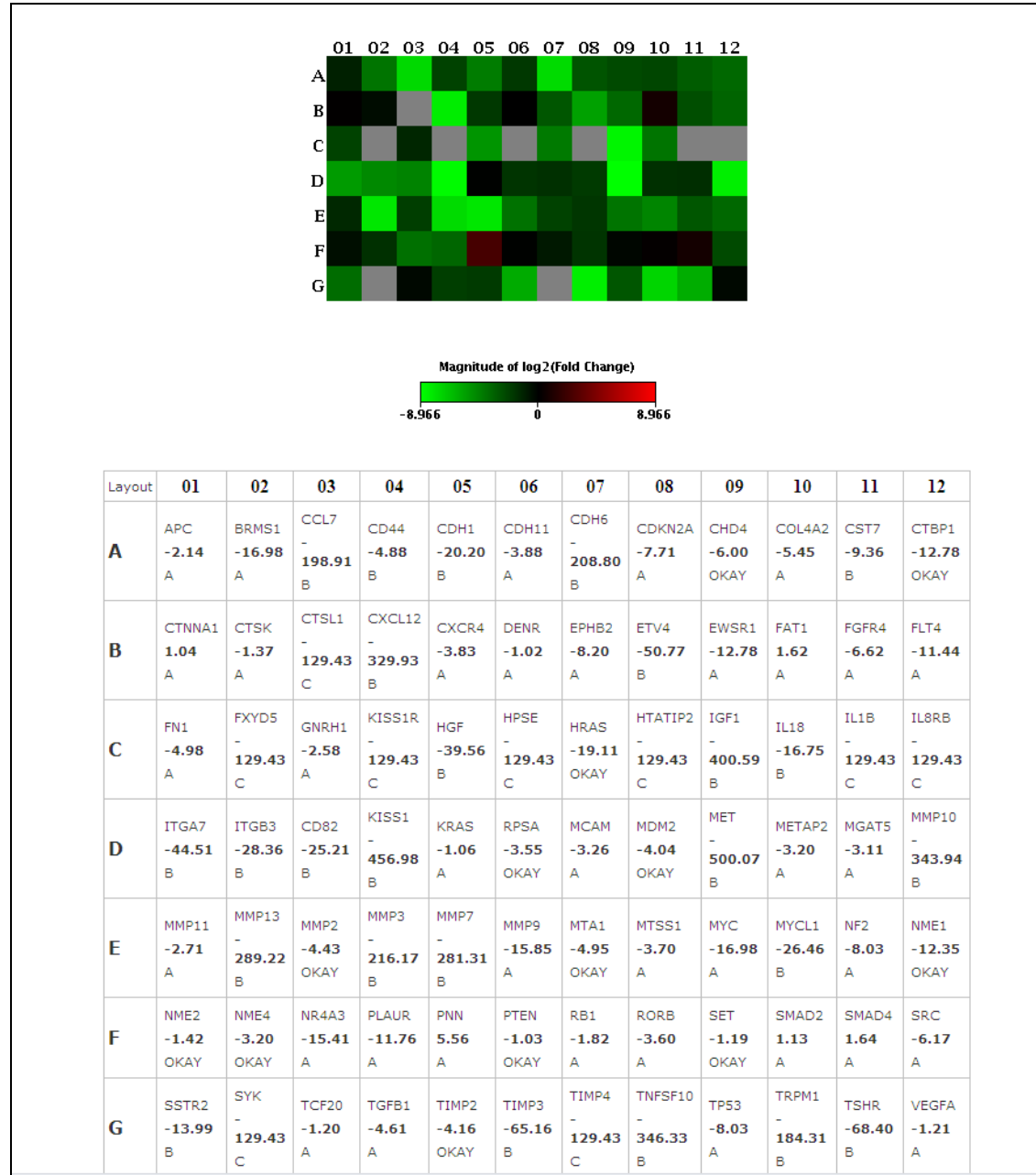
- o **TSHR** (hücre proliferasyonunun pozitif regülasyonu / reseptör),
- o **MYC, SYK, EWSR1, HRAS**
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **FXVD5, SYK, CDH1** (hücre-hücre adhezyonu),
 - o **ITGB3** (transmembran reseptörleri),
 - o **ITGA7** (hücre-hücre adhezyonu / transmembran reseptörü),
- *Transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri:*
 - o **MYC, ETV4, MYCL1, HTATIP2, NR4A3, TP53** (transkripsiyon faktörü),
 - o **EWSR1** (regülatör)
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **MYC** (hücre siklus arrest ve kontrol noktası),
 - o **IL1B ve HRAS** (hücre siklusunun regülasyonu),
 - o **BRMS1**, (hücre siklusunun negatif regülasyonu),
 - o **TP53** (hücre siklusunun negatif regülasyonu / hücre siklus arrest ve kontrol noktası),
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP3** (matriks metalloproteinazı),
 - o **TIMP3, TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü),
- *Apoptozis genleri:*
 - o **HTATIP2** (apoptozun indüksiyonu / antiapoptoz),
 - o **IL18, TIMP3, TP53** (apoptozun indüksiyonu), **IL1B**
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **CTSL1, CD82, CST7**

4.4.5. Grup 6: Resveratrol ve Sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattı bulguları

SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol uygulandığında ekspresyonu ≥ 3 kat artan gen PNN, <3 kat artan genler CTNNA1, SMAD2, SMAD4, FAT1 idi. SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol uygulandığında ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXVD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, SYK, TIMP4, TSHR, TIMP3, ETV4, ITGA7, HGF, ITGB3, MYCL1, CD82, CDH1, HRAS, BRMS1, MYC, IL18, MMP9, NR4A3, SSTR2, CTBP1, EWSR1, NME1, PLAUR, FLT4, CST7, EPHB2, NF2, TP53, CDKN2A, FGFR4, SRC, CDH4, COL4A2, FN1, MTA1, CD44, TGFB1, MMP2, TIMP2, MDM2, CDH11, CXCR4, MTSS1, RORB, RPSA, MCAM, METAP2, NME4, MGAT5 idi; ekspresyonu <3 kat azalan genler MMP11, GNRH1, APC, RB1, NME2, CTSK, VEGFA, TCF20, SET, KRAS, PTEN, DENR idi

(Şekil 19). SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol ve sisplatin uygulamasıyla kontrol grubuna göre DDX1 ekspresyonu ≥ 3 kat (15kat) artmış , nm23H1 ≥ 3 kat azalmış, nm23H2 değişmemiştir.

SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol uygulandığında ekspresyonu 200-500 kat azalma gösteren genler ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP7, MMP10, MMP13, MMP3), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (TNFSF10, CCL7, TRPM1), apoptoz genleri (TNSF10, HTATIP2), transkripsiyon faktörleri (HTATIP2), metastaz ilişkili diğer genler (KISS1) idi.



Şekil 19: Resveratrol ve sisplatin uygulanan SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre değişimi

SH-SY5Y Hücree hattında resveratrol ve sisplatin uygulamasıyla ekspresyonu kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artan gen

- **DDX1**
- *Hücree adhezyon genleri:*
 - o **PNN** (hücree-hücree adhezyonu),

SH-SY5Y Hücree hattında Resveratrol ve Sisplatin uygulamasıyla ekspresyonu kontrol grubuna göre >100 kat azalma gösteren genler

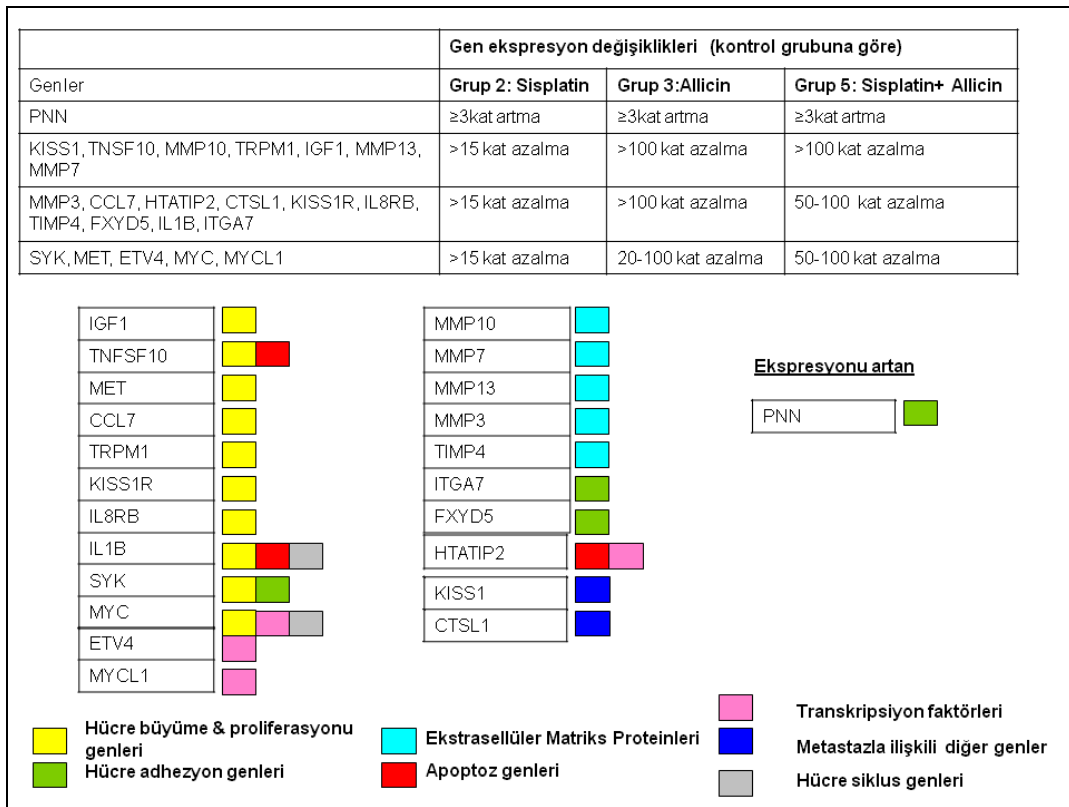
- *Hücree büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **TNFSF10, CCL7** (sitokin, kemokin),
 - o **MET, IL8RB** (reseptör),
 - o **IGF1** (hücree proliferasyonunun pozitif regülasyonu / büyüme faktörü ve hormon),
 - o **IL1B** (hücree proliferasyonunun negatif regülasyonu/ sitokin ve kemokinler),
 - o **CXCL12** (sitokin, kemokin),
 - o **TRPM1**
- *Hücree adhezyon genleri:*
 - o **CDH6, FXYD5, SYK** (hücree-hücree adhezyonu)
- *Hücree siklus genleri:*
 - o **IL1B** (hücree siklus regülasyonu)
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **MMP7, MMP10, MMP13, MMP3** (matriks metalloproteinazı),
 - o **TIMP4** (matriks metalloproteinaz inhibitörü),
 - o **HPSE**
- *Apoptozis genleri:*
 - o **HTATIP2** (apoptozun indüksiyonu/ antiapoptoz),
 - o **TNFSF10** (apoptozun indüksiyonu),
 - o **IL1B,**
- *Transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri:*
 - o **HTATIP2** (transkripsiyon faktörleri),
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **KISS1, CTSL1, KISS1R**

SH-SY5Y Hücre hattında Resveratrol uygulamasıyla ekspresyonu 10-100 kat azalan genler

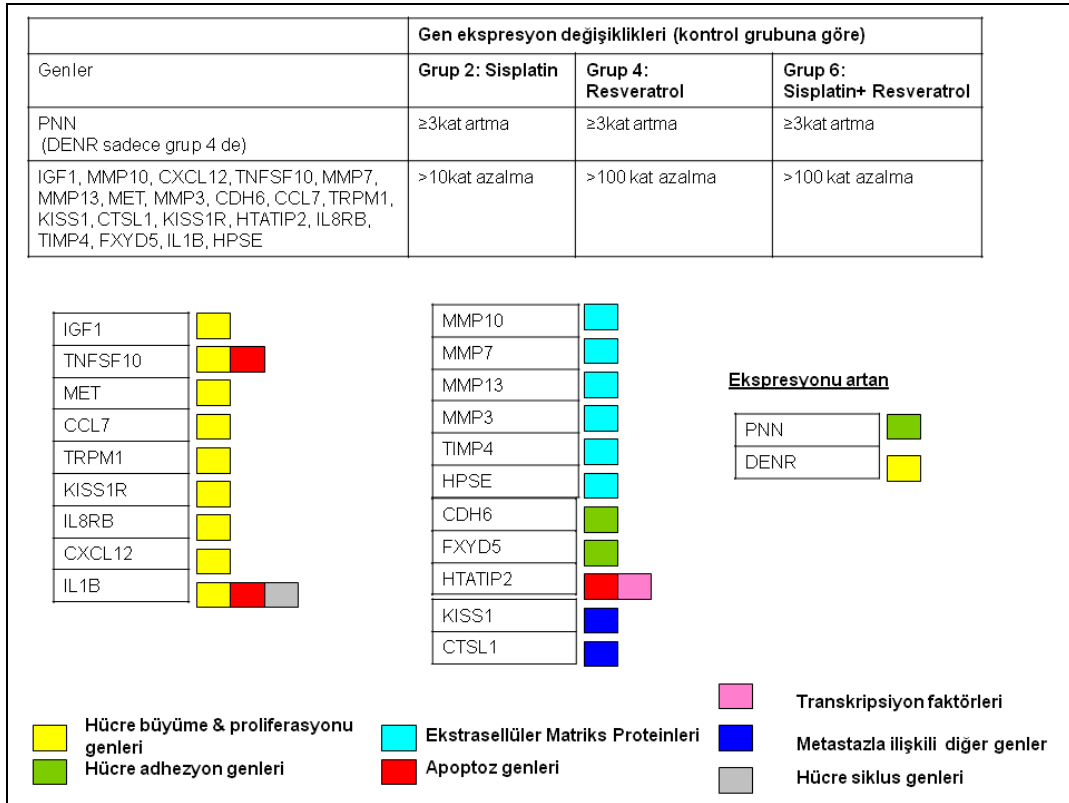
- *Hücre büyüme ve proliferasyon genleri:*
 - o **TSHR, NR4A3, PLAUR, FLT4** (reseptör),
 - o **HGF** (büyüme faktörü, hormon),
 - o **SSTR2, CTBP1, NME1**, (Hücre büyüme ve proliferasyonunun negatif regülasyonu),
 - o **IL18** (Hücre büyüme ve proliferasyonunun pozitif regülasyonu / sitokin, kemokin),
 - o **HRAS, MYC, EWSR1**,
- *Transkripsiyon faktörleri ve regülatörleri:*
 - o **ETV4, MYCL1, NR4A3, MYC** (transkripsiyon faktörleri),
 - o **EWSR1** (regülatör)
- *Hücre adhezyon genleri:*
 - o **ITGA7, ITGB3** (transmembran reseptörü),
 - o **CDH1** (hücre-hücre adhezyonu)
- *Hücre siklus genleri:*
 - o **MYC** (hücre siklus arrest ve kontrol noktası),
 - o **HRAS** (hücre siklus regülasyonu),
 - o **BRMS1, NME1** (hücre siklusunun negatif regülasyonu)
- *Ekstrasellüler matriks proteinleri:*
 - o **TIMP3** (matriks metalloproteinaz inhibitörü),
 - o **MMP9** (matriks metalloproteinazı),
- *Apoptozis genleri:*
 - o **TIMP3, IL18** (apoptoz indüksyonu)
- *Metastaz ilişkili diğer genler:* **CD82**

SH-SY5Y Hücre hatlarında sisplatin, allicin ve resveratrol uygulamalarının metastatik gen ekspresyonları üzerinde yaptığı değişiklikler aşağıdaki şekil 20 ve 21’de özetlenmiştir.

Kelly ve SHSY-5Y nöroblastom hücre hatlarında sisplatin, allicin ve sisplatin+allicin uygulamalarıyla ekspresyonu üç katın üzerinde değişiklik gösteren genler Tablo 11’de; sisplatin, resveratrol ve sisplatin+ resveratrol uygulamalarıyla ekspresyonu üç katın üzerinde değişiklik gösteren genler Tablo 12’de özetlenmiştir.



Şekil 20. SH-SY5Y Hücre hattında allicin ve sisplatin uygulamalarının ekspresyonlarını en fazla etkilediği genler



Şekil 21. SH-SY5Y Hücre hattında resveratrol ve sisplatin uygulamalarının ekspresyonlarını en fazla etkilediği genler

Tablo 11. Kelly ve SHSY-5Y nöroblastom hücre hatlarında Sisplatin, Allicin ve Sisplatin+Allicin uygulamalarıyla ekspresyonu üç katın üzerinde değişiklik gösteren genler

	Kelly nöroblastom hücre hattı		SHSY-5Y nöroblastom hücre hattı	
	Gen ekspresyonlarında		Gen ekspresyonlarında	
	≥3kat artma	≥3kat azalma	≥3kat artma	≥3kat azalma
Grup 2: Sisplatin	FXYD5, MCAM, CXCR4, SSTR2, CDH1	EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5	DDX1, PNN, SMAD4, DENR, SET, METAP2, SMAD2, NME2 (nm23H2)	KISS1, TNFSF10, MET, IGF1, TRPM1, MMP13, MMP7, TSHR, MMP3, CDH6, CCL7, CXCL12, CTSL1, FXYD5, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, TIMP4, SYK, CD82, HPSE, TIMP3, MYCL1, ITGB3, CDH1, ETV4, MMP10, IL18, TGFB1, FGFR4, SSTR2, HGF, FLT4, MTSS1, EWSR1, MYC, CST7, MMP9, MCAM, NR4A3, MTA1, CTBP1, CDKN2A, BRMS1, CHD4, EPHB2, SRC, FN1, MMP2, NF2
Grup 3: Allicin	CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, ITGB3, VD82, TSHR, IGF1, IL18, MET, MTSS1, TGFB1, SSTR2, CST7, MCAM, EPHB2, MMP2, PLAUR, EWSR1, TIMP3, FGFR4, NF2, FLT4, SRC, CXCL12, FAT1, VEGFA, CTBP1, CHD4, MGAT5, COL4A2, MDM2, CD44, MTA1, BRMS1, CXCR4, CDH11, NR4A3, FN1, MMP9, HGF, GNRH1, HPSE, TCF20, TIMP2, HRAS, SMAD2, CTSK, CDH6, MMP11	RB1, DENR	DDX1, PNN	KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7, IL8RB, IL1B, HTATIP2, KISS1R, FXYD5, CTSL1, SYK, MET, ETV4, MYCL1, NR4A3, ITGB3, TSHR, MYC, CXCL12, CD82, FGFR4, SSTR2, BRMS1, HPSE, FLT4, CDH1, HRAS, CST7, CTBP1, PLAUR, IL18, TGFB1, EWSR1, MMP9, TIMP3, TP53, NME1 (nm23H1), MTA1, EPHB2, SRC, MCAM, NME4, NF2, CHD4, RPSA, TIMP2
Grup 5: Allicin ve Sisplatin	CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, ITGB3, TGFB1, SSTR2, MCAM, CD82, MTSS1, CST7, TSHR, IGF1, MMP2, NF2, IL18, CXCR4, EWSR1, MET, PLAUR, CTBP1, MGAT5, MDM2, FLT4, SRC, CD44, VEGFA, EPHB2, FAT1, CHD4, FGFR4, FN1, CDH11, CXCL12, MMP9, COL4A2, MTA1, NR4A3, BRMS1, TIMP3, HGF, GNRH1, TP53, TIMP2, MMP11, APC, SMAD2, HPSE, NME1 (nm23H1), CTSK, TCF20, HRAS	DENR, RB1	DDX1, PNN	KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, MMP3, MET, CCL7, MYC, ETV4, MYCL1, TIMP4, ITGA7, IL8RB, IL1B, HTATIP2, KISS1R, FXYD5, CTSL1, SYK, IL18, TSHR, ITGB3, CDH1, CD82, NR4A3, CTBP1, TIMP3, CST7, EWSR1, FLT4, FGFR4, BRMS1, TP53, HRAS, PLAUR, SSTR2, TGFB1, EPHB2, MTA1, CXCL12, MTSS1, MMP9, SRC, HPSE, NME1 (nm23H1), RB1, NF2, NME4, TIMP2, MMP2, MCAM, MGAT5, CHD4, RPSA, CXCR4

Tablo 12. Kelly ve SHSY-5Y nöroblastom hücre hatlarında Sisplatin, Resveratrol ve Sisplatin+ Resveratrol uygulamalarıyla ekspresyonu üç katın üzerinde değişiklik gösteren genler

	Kelly nöroblastom hücre hattı		SHSY-5Y nöroblastom hücre hattı	
	Gen ekspresyonlarında		Gen ekspresyonlarında	
	≥3kat artma	≥3kat azalma	≥3kat artma	≥3kat azalma
Grup 2: Sisplatin	FXYD5, MCAM, CXCR4, SSTR2, CDH1	EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5	DDX1, PNN, SMAD4, DENR, SET, METAP2, SMAD2, NME2 (nm23H2)	KISS1, TNFSF10, MET, IGF1, TRPM1, MMP13, MMP7, TSHR, MMP3, CDH6, CCL7, CXCL12, CTSL1, FXYD5, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, TIMP4, SYK, CD82, HPSE, TIMP3, MYCL1, ITGB3, CDH1, ETV4, MMP10, IL18, TGFB1, FGFR4, SSTR2, HGF, FLT4, MTSS1, EWSR1, MYC, CST7, MMP9, MCAM, NR4A3, MTA1, CTBP1, CDKN2A, BRMS1, CHD4, EPHB2, SRC, FN1, MMP2, NF2
Grup 4: Resveratrol	DDX1, TGFB1, SSTR2, CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, TSHR, MTSS1, EWSR1, CD82, ITGB3, MCAM, CTBP1, MMP2, SRC, NF2, CST7, IGF1, VEGFA, IL18, FGFR4, CXCR4, CHD4, CXCL12, MGAT5, CD44, MET, FLT4, BRMS1, EPHB2, MTA1, PLAUR, FAT1, MDM2, NR4A3, CDH11, TIMP3, FN1, TP53, COL4A2, MMP9, TIMP2, HGF, NME1 (nm23H1), MMP11, HRAS, GNRH1, HPSE, CTSK	DENR, RB1, NME2	DDX1, PNN, DENR	IGF1, MMP10, CXCL12, TNFSF10, MMP7, MMP13, MET, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, KISS1, CTSL1, KISS1R, HTATIP2, IL8RB, TIMP4, FXYD5, IL1B, HPSE, ETV4, TSHR, ITGA7, MYCL1, CD82, TIMP3, EWSR1, SYK, BRMS1, ITGB3, SSTR2, HGF, CTBP1, IL18, MYC, PLAUR, CST7, MMP9, HRAS, NR4A3, FGFR4, CHD4, SRC, CDH1, FLT4, NF2, NME1 (nm23H1), MTA1, TP53, MMP2, TGFB1, MTSS1, EPHB2, CDKN2A, FN1, COL4A2, MCAM, MDM2, TIMP2, MGAT5, CD44, CXCR4, CDH11, RORB, RPSA, METAP2, NME4, APC, MMP11
Grup 6: Resveratrol ve Sisplatin	CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, TSHR, MTSS1, EWSR1, CD82, ITGB3, MCAM, CTBP1, MMP2, SRC, NF2, CST7, IGF1, VEGFA, IL18, FGFR4, CHD4, CXCL12, MGAT5, CD44, MET, FLT4, BRMS1, EPHB2, MTA1, PLAUR, FAT1, MDM2, TIMP3, COL4A2, TGFB1, SSTR2, CXCR4, NR4A3, CDH11, FN1, MMP9, HGF, GNRH1, HPSE, TCF20, TIMP2, HRAS, SMAD2, CTSK, CDH6, MMP11	DENR, RB1	DDX1, PNN	MET, KISS1, IGF1, TNFSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, SYK, TIMP4, TSHR, TIMP3, ETV4, ITGA7, HGF, ITGB3, MYCL1, CD82, CDH1, HRAS, BRMS1, MYC, IL18, MMP9, NR4A3, SSTR2, CTBP1, EWSR1, NME1 (nm23H1), PLAUR, FLT4, CST7, EPHB2, NF2, TP53, CDKN2A, FGFR4, SRC, CDH4, COL4A2, FN1, MTA1, CD44, TGFB1, MMP2, TIMP2, MDM2, CDH11, CXCR4, MTSS1, RORB, RPSA, MCAM, METAP2, NME4, MGAT5

5. Tartışma

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçtir ve pek çok sinyal yolu rol oynamaktadır. Çok ajanlı kombine kemoterapi protokollerinin uygulanmasıyla birden fazla hedefe yönelik ilaç kullanılarak etkinlik sağlanmaya ve artırılmaya çalışılmaktadır. Ne yazık ki bu süreçte toksisiteler kaçınılmazdır. Son yıllarda fitokimyasal ajanların kullanımıyla bu toksisite risklerini azaltmaya yönelik yapılan araştırmalar hız kazanmıştır. Bu fitokimyasal ajanların bazıları kendileri kanserli hücre proliferasyonunu önlemekte, büyüme faktörü sinyal yollarını inhibe ederek apoptozu indüklemektedir (76).

Bizim araştırmamızda allicin ve resveratrol kullanılmıştır. Resveratrol anti-kanser, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal, nöroprotektif etkileri olan doğal bir bileşendir. 1999 yılından itibaren NB'da resveratrol etkisine dair yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Mevcut NB alanındaki araştırmalar değerlendirildiğinde resveratrolün antitümöral, apoptozu indükleyici etkileri gösterilmiş ve hangi mekanizma üzerinden gerçekleştirildiği araştırılmıştır. Ancak resveratrolün NBda metastatik gen ekspresyonu üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya tıbbi literatürde rastlanmamıştır. Sarımsak derivativesi olan Allicin antikarsinojenik, antiproliferatif, apoptozu indükleyici etkileri olan bir organik sülfür bileşenidir. Allicin sarımsağın major biyoaktif ürünü olup, etkisi farklı kanserlerde çalışılmıştır. Allicin ile NB hücre hatlarında yapılmış bir araştırmaya İngilizce literatürde rastlanmamıştır. Ancak 2003-2012 yılları arasında yine sarımsak derivativesi olan ve Allicinin yıkılmasıyla ortaya çıkan diallyl disulfide (DADS) ile NB hücre hatlarında yapılmış birkaç araştırma bulunmaktadır (58, 59, 72). Nöroblastom hücrelerinde DADS ile yapılmış çalışmaların sonuçları da sınırlıdır. Bizim araştırmamız Kelly (N-MYC pozitif) ve SH-SY5Y (N-MYC negatif) NB hücre hatlarında gerek tek başına gerekse sisplatinle birlikte allicin ve resveratrol uygulamalarının etkilerini araştırıyor olmasıyla alanında bir ilk olma özelliğindedir.

Çalışmamızda Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında allicinin sitotoksik etki yapmadığı, apoptozu neden olmadığı, sisplatinle birlikte uygulandığında sisplatinin sitotoksitesini ve apoptoz yapıcı etkisini değiştirmediği gösterilmiştir. Allicinin antineoplastik etkisi üzerine bazı kanıtlar vardır (54 – 56). Apoptoz üzerinden etki ettiğini gösteren çalışmalar vardır (57, 58,59). Antiproliferatif, antikarsinojenik ve apoptozu indükleyici özellikleri olan allicin ile NB hücre hatlarında yapılmış bir araştırmaya İngilizce literatürde rastlanmamıştır. Ancak 2003-2012 yılları arasında yine sarımsak derivativesi olan ve Allicinin yıkılmasıyla ortaya çıkan DADS ile NB hücre hatlarında yapılmış birkaç araştırma bulunmaktadır. İnsan malign NB SH-SY5Y hücrelerinde DAS ve DADS kullanımının antiapoptotik aktiviteleri baskıladığı, kalpain ve intrinsik kaspaz kaskadını indükleyerek apoptozu yol açtığı gösterilmiştir (58).

Nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde DADS uygulanmasının hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve mitokondriyal yolun aktivasyonu (Bcl-2 down regülasyonu, sitozole sitokrom c salınımı, kaspaz 9 ve 3 aktivasyonu) apoptozu indüklediği gösterilmiştir (59). Bir araştırmada SH-SY5Y hücrelerinde diallyl disulfide (DADS) kullanımının erken morfolojik değişikliklere, hücre iskeleti oksidasyonuna, mikrofilament redüksiyonuna, mikrotübül depolimerizasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (72). Süperoksitdismutaz enziminin artmış ekspresyonu, hücre iskeletinin destabilize olmasında süperoksidin önemli rol oynadığını düşündürmüştür. Nöroblastom hücrelerinde DADS ile yapılmış çalışmaların sonuçları da bu sayılanlarla sınırlıdır.

Çalışmamızda Kelly ve SH-SY5Y NB hücrelerinde allicinin antitümöral, sitotoksik ve apoptotik etkiler oluşturmadığı gösterilmiştir ki bu bulgularla hipotetik olarak allicinin NB tedavisi için etkin bir ajan olmadığı düşünülebilir. Çalışmamızda uygulanan allicin dozlarının da sitotoksikite ve apoptoz oluşturmada yetersiz kalmış olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bir başka açıdan düşünür ve allicinin stabil olmadığını, ömrünün kısa olduğunu dikkate alırsak (73-75); uyguladığımız allicinin sitotoksik ve apoptotik etki oluşturamaması, allicin hızla metabolize olmasıyla ilişkili olabilir mi? Bunu açıklayabilmek için allicin metabolitlerinden diallyl disulfide (DADS) oluşum miktarına bakılabilir. Ancak allicin metabolize olup DADS oluşsa bile yine de DADS ile ilişkili apoptozun indüklenmesi beklenirdi. Ayrıca metastatik gen ekspresyonlarının allicin uygulanan gruplarda değişmiş olması da allicinin bu hücrelere ulaştığının ve etki gösterdiğinin bir göstergesidir.

Çalışmamızda Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında resveratrol uygulama dozuyla orantılı olarak sitotoksik etki oluşturmuş ve sisplatinle birlikte uygulandığında sisplatinin sitotoksik etkisini değiştirmemiştir. Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında resveratrol apoptoz yapmamıştır, ancak sisplatinle birlikte uygulandığında sisplatinin apoptoz yapıcı etkisini azaltmıştır. Kelly ve SH-SY5Y NB hücrelerinde tek başına resveratrol doz bağımlı antitümöral etki yaparken, apoptoz yapmadığı, sisplatinle birlikte uygulandığında sisplatinin antitümöral etkisini değiştirmezken apoptotik etkisini zayıflatmış görülmüştür. Bu bulgular literatür verisiyle uyumludur. Serbest radikalleri bağladığına, apoptozu doza bağımlı indükleyip/inhibe ettiğine dair çalışmalar vardır. Resveratrol intrasellüler birçok molekülü etkilemektedir (41-45). İn vitro NB hücrelerinin canlılığını %70-90 azalttığı saptanmıştır (46). Bizim çalışmamızda 100µM doz resveratrol Kelly hücre hatlarında %46,6, SH-SY5Y hücre hatlarında %34,9 oranlarında sitotoksikite oluşturmuştur. Sitotoksik etki doz bağımlı olduğundan daha yüksek resveratrol dozlarıyla daha yüksek oranda sitotoksikite görülmesi olasıdır. İnsan NB hücre hatlarında resveratrolün tümör büyümesini etkin şekilde önlediği ve mitokondri intrinsic apoptotik yolu üzerinden tümör hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir, hücre çoğalmasını mitokondri

üzerinden apoptozu uyararak önlediği gösterilmiştir (46). MYCN amplifiye NB hücre hatlarında resveratrolün doz ve uygulama süresine bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (50). Çalışmamızda resveratrolün sitotoksik ve apoptotik etkilerine dair sonuçlar literatür verisiyle uyumludur. Hipotetik olarak NB'da resveratrolün konvansiyonel kemoterapi sırasında kullanılmasıyla kemoterapinin apoptotik etkisinin bozacağı, azaltacağı; kemoterapi tamamlandıktan sonra resveratrolün tek başına kullanımı ile antitümöral etkinin sağlanabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda Kelly hücre hattında resveratrol uygulaması DDX1 gen ekspresyonunu kontrol grubuna göre arttırmıştır, diğer gruplarda etkilenme olmamıştır. SH-SY5Y hücre hattında sisplatin, allicin, allicin+sisplatin, resveratrol, resveratrol+sisplatin uygulamaları DDX1 gen ekspresyonunu kontrol grubuna göre arttırmıştır. Nöroblastom hücre hatlarında ve primer NB dokularında DDX1 geninin MYCN geni ile koamplifikasyonu gösterilmiştir ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (8-16). DDX1 geninin MYCN ile koamplifikasyonu halinde klinik gidişin daha iyi olduğu yönünde sonuçlar bulunsa da, sağkalım üzerine etkiler konusunda sonuçlar çelişkilidir (17 – 24). Çalışmamızda özellikle MYCN negatif SH-SY5Y NB hücre hattında fitokimyasal ajanların gerek tekli gerekse sisplatinle kombine uygulamaları DDX1 ekspresyonunu kontrol grubuna göre arttırmıştır. Resveratrol ve allicin uygulamalarının, MYCN ile koamplifiye olan ve NB'da kötü prognoz ile ilişkili olduğu öne sürülen DDX1 ekspresyonunun artırıyor olması bu iki ajanın NB tedavisinde gerek tekli gerekse kemoterapi beraberinde kullanılmasının uygun olmadığını düşündürmüştür.

NM23-H1 ve NM23-H2 esasen metastaz baskılayıcı genlerdir (25). Meme, kolon ve karaciğer kanseri gibi epiteliyal tümörlerde NM23 geninin azalmış ekspresyonu metastaz ve kötü klinik prognoz ile ilişkili bulunmuştur (25). Ancak NB ve hematolojik malignitelerde artmış NM23 ekspresyonu daha agresif hastalıkla ilişkili bulunmuştur (25-30). MYCN amplifikasyonu ile nm23-H1 ve nm23-H2 genlerinin mRNA ve protein ekspresyonlarının korele olduğu gösterilmiştir. Kötü gidişli (unfavourable) NB tümörigenezisinde her ikisinin de major rol oynadıkları öne sürülmüştür (26). Nöroblastomda 17q kazanımı olanlarda nm23-H1 ve nm23-H2 ekspresyonlarının da arttığı ve bunun da Nm23-H1 genomic amplifikasyonu, tümörde artmış nm23 RNA ekspresyonu ve azalmış sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (28).

Bizim çalışmamızda Kelly NB hücre hatlarında nm23H1 geni ekspresyonunu resveratrol uygulaması ile arttırmış ancak sisplatin+resveratrol uygulandığında değişmemiştir. Yine Kelly NB hücre hatlarında allicinin tek başına uygulanması nm23H1 geni ekspresyonunu değiştirmezken, sisplatin+allicin birlikte uygulandığında nm23H1 gen ekspresyonu artmıştır. Bu bulgu MYCN amplifikasyonu olan NB'da resveratrolün tek başına, allicinin ise

kemoterapötiklerle birlikte uygulanmasının kötü prognoza katkıda bulunabileceğine işaret etmektedir. SH-SY5Y NB hücrelerinde resveratrol ve allicin gerek tek başına gerekse sisplatinle birlikte uygulandığında kötü prognozla ilişkili olan nm23H1 gen ekspresyonunu azaltmıştır. Bu bulgu MYCN negatif NB'da allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse kemoterapötiklerle birlikte kullanımının prognozdan daha kötüye gitmemesi açısından avantaj sağlayıcı yönde etkileyebileceğini düşündürülebilir.

Kelly NB hücre hatlarında resveratrolün tek başına uygulaması nm23H2 geni ekspresyonunu azaltmış. SH-SY5Y NB hücre hatlarında resveratrol veya resveratrol+sisplatin uygulaması nm23H2 geni ekspresyonunu değiştirmemiştir. Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında allicin uygulaması, allicin+sisplatin uygulaması nm23H2 geni ekspresyonunu değiştirmemiştir. MYCN amplifikasyonu olan NBda resveratrol tek başına uygulandığında, yine esasen metastaz baskılayıcı gen olan ancak NBda agresif hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiş nm23H2 gen ekspresyonunu azaltmıştır, bu bulgu resveratrolün MYCN (+) NBda kullanımının prognozdan kötüye gitmesine katkı sağlamamak, gidişi iyileştirmek yönünde etkileyebileceğini düşündürülebilir.

Tümör metastaz gen PCR analizi sonucunda Kelly NB hücre hatlarında, allicin, resveratrol, allicin+sisplatin ve resveratrol+sisplatin uygulamaları sonrası ekspresyonları kontrol grubuna göre en fazla artış gösteren genler: CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 idi (Şekil 14). Bu genler hücre büyüme ve proliferasyon genleri (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhezyon genleri (SYK, ITGA7, CDH1, FXYD5), transkripsiyon faktörleri (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptoz genleri (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), hücre siklus genleri (MYC, IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (CTSL1, KISS1) idi. Resveratrol uygulanan grupta ayrıca TGFB1 ve SSTR2 gen ekspresyonları da en fazla artan genler arasındaydı. Kelly NB hücre hatlarında tüm gruplarda ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler hücre siklus genleri (RB1) ve hücre büyüme ve proliferasyon genleri (DENR) idi. Resveratrol uygulanan grupta ayrıca NME2 geni ≥ 3 kat azalan genler arasındaydı.

SH-SY5Y NB hücre hatlarında allicin ve sisplatin+allicin uygulanan gruplarda ekspresyonu >100 kat azalan genler KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7 olup, allicin alan grupta ek olarak MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7 ekspresyonları da >100 kat azalmıştı. Bu genler hücre büyüme ve proliferasyonu genleri (TNFSF10, IGF1, TRPM1, CCL7), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP13, MMP7, MMP3, TIMP4), hücre adhezyon genleri (ITGA7), apoptoz geni (TNFSF10) ve metastaz ilişkili diğer genlerdi (KISS1) (Şekil 20).

SH-SY5Y NB hücre hatlarında resveratrol ve sisplatin+resveratrol uygulanan gruplarda ekspresyonu en fazla etkilenen genler MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, TIMP4 olup, resveratrol+sisplatin alan grupta ek olarak SYK geni de vardı. Bu genler ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP7, MMP10, MMP13, MMP3, HPSE, TIMP4), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (TNSF10, CCL7, TRPM1, MET, IGF1, CXCL12, IL1B, IL8RB), apoptoz genleri (TNSF10, HTATIP2, IL1B), transkripsiyon faktörleri (HTATIP2), hücre adhezyon genleri (CDH6, FXYD5), hücre siklus genleri (IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (KISS1, CTSL1) idi (Şekil 21).

Kelly NB hücre hatlarında ekspresyon artışı, SH-SY5Y NB hücre hatlarında ekspresyon azalması şeklinde değişikliklerin en fazla izlendiği genler büyük oranda örtüşme gösteriyordu. Bu genler ile ilgili yorumlar aşağıda özetlenmiştir. Bizim çalışmamızın sonucunda Kelly (MYCN pozitif) ve SH-SY5Y (MYCN negatif) NB hücre hatlarında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulanmaları sonucu ekspresyonu en fazla etkilenen metastaz genleri belirlenmiştir. Metastaz gelişmesine müdahale etmede potansiyel hedef olabilecek bu genler daha ileri araştırmalarla değerlendirilmelidir.

Kemokin (C-C motif) Ligand 7 (CCL7): Bu gen 17. kromozom kodlanmakta olup, genin ürünü olan monosit kemotaktik protein 3 *in vivo* olarak matriks metalloproteinaz 2'nin substratıdır. Genin diğer isimleri: FIC; MARC; MCP3; NC28; MCP-3; SCYA6; SCYA7. Monosit kemotaktik protein 3 inflamasyonda ve metastazda makrofajlarla etkileşmektedir. Mide kanseri olan hastalarda CCL7'nin artmış ekspresyonu invazyon derinliği, lenf nodu metastazı ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (77). Oral skuamöz hücreli karsinomda karsinom hücreleri, karsinom ilişkili fibroblastlarla kültüre edildiğinde CCL7 ekspresyonunun belirgin arttığı gösterilmiştir. Burada CCL7'nin oral skuamöz hücreli kanser invazyon ve migrasyonunu yönlendirdiği, CCL7 nötralize edici antikorlarla tedavi uygulandığında invazivliğin önlendiği gösterilmiştir (78). Kolorektal kanserli hastalarda CCL7'nin artmış ekspresyonunun karaciğer metastazı varlığıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (79).

Bizim çalışmamızda Kelly hücre hatlarında sisplatin uygulamasıyla CCL7 ekspresyonu değişmezken, allicin uygulamasıyla >500kat, allicin+sisplatin uygulamasıyla >200kat, resveratrol uygulamasıyla >300 kat, resveratrol + sisplatin uygulamasıyla >500kat ekspresyon artışı olduğu görülmüştür. SH-SY5Y hücre hatlarında ise sisplatin uygulamasıyla 67 kat, allicin uygulamasıyla 275 kat, sisplatin+allicin uygulamasıyla 85 kat, resveratrol uygulamasıyla 1575 kat, resveratrol +sisplatin uygulamasıyla 198 kat CCL7 geni ekspresyon azalması saptanmıştır.

Nöroblastomda CCL7 nin ekspresyonunun nasıl olduğuna dair İngilizce literatür verisine rastlanmamıştır. CCL7 'nin artmış ekspresyonunun esasen skuamoz hücreli karsinomlarda metastaz ve tümör invazivliği ve kötü prognoz ile ilişkisi bildirilmiştir (77-79). Dengesiz 17q kazanımının kötü prognoz ve daha agresif nöroblastomla ilişkisi bilinmektedir (1). CCL7'nin de 17q11.2-q12 lokalizasyonunda olduğu dikkate alınırse artmış ekspresyonunun NB'da kötü prognoz ile ilişkili olabileceği öne sürülebilir. Bizim çalışmamızda Kelly hücre hatlarında fitokimyasal ajanlar gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulandığında CCL7 ekspresyonunda anlamlı artış olduğu görülmüştür. Bu bulgu neticesinde MYCN amplifikasyonu olan NB'da artmış CCL7 ekspresyonunun metastaz ile ilişkisi olabileceği yorumu yapılabilir ve CCL7'yi nötralize edici antikörlerle invazivliğin önlenmesi düşünülebilir. Bu konuda yapılacak yeni araştırmalara ihtiyaç vardır. SH-SY5Y (N-MYC negatif) hücre hatlarında ise fitokimyasalların ve sisplatinin uygulanmasıyla bu genin ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür ki bu tümör invazivliğini önleyici bir avantaj olabilir.

Katepsin L1 (CTSL1): Hücre içi protein katabolizmasında görevli lizozomal sistein proteinazı kodlayan gendir. Kollojen, elastin bu enzimin substratlarıdır. Katepsin L (sistein proteaz) kanser tedavisinde potansiyel hedeflerden biridir. Spesifik proteazların inhibisyonu kanser progresyonunu yavaşlatabilmektedir. Katepsin L inhibisyonu invazyon ve metastazı da azaltmaktadır. Ancak selektif katepsin L inhibisyonunda diğer katepsinler kompanzatuvar olarak aktivite göstermektedir. Katepsin L inhibisyonunun konvansiyonel tedavinin yanı sıra kullanımı umut vericidir. Kombinasyon tedavileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (80). Glioblastoma dahil pek çok tümörde katepsin L ekspresyonu da sekresyonu da artmaktadır. P53 katepsin L ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu da tümörigenez, anjiogenez ve tümör hücre invazyonunda rol oynamaktadır. Katepsin L inhibitörlerinin glioblastomda fayda sağlayacağı düşünülmektedir (81). İnsan mesane uroteliyal karsinomunda katepsin L tümörün invazivliği ile ilişkili olup prognostik önem taşımaktadır (82). Serumda artmış katepsin L, heparanaz, matriks metalloproteinaz9 düzeyleri, over kanserinde invazyon ve progresyonla ilişkili bulunmuştur (83). Kolorektal kanserlerde katepsin L ekspresyonu, kötü prognoz ve progresyonla ilişkili bulunmuştur (84).

Bizim çalışmamızda Kelly hücre hatlarında sisplatin uygulamasıyla CTSL1 ekspresyonu değişmezken, allicin uygulamasıyla >500kat, allicin+sisplatin uygulamasıyla >200kat, resveratrol uygulamasıyla >300 kat, resveratrol + sisplatin uygulamasıyla >500kat ekspresyon artışı olduğu görülmüştür. SH-SY5Y hücre hatlarında ise sisplatin ile 43 kat, allicin ile 179 kat, sisplatin+allicin ile 55 kat, resveratrol ile 1025 kat, sisplatin+resveratrol ile 129 kat CTSL1 ekspresyonu azalması olduğu görülmüştür. Nöroblastomda CTSL1 nin ekspresyonunun

nasıl olduğuna dair İngilizce literatür verisine rastlanmamıştır. CTSL1'in artmış ekspresyonunun esasen glioblastoma, over kanseri, mesane ürotelial karsinomu, kolorektal karsinom gibi tümörlerde metastaz ve tümör invazivliği ve kötü prognoz ile ilişkisi bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda allicin veya resveratrol gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulandığında CTSL1 ekspresyonunda anlamlı artış olduğu görülmüştür. Bu bulgu neticesinde NB'da artmış CTSL1 ekspresyonunun metastaz ile ilişkisi olabileceği yorumu yapılabilir. Nöroblastomda konvansiyonel tedavinin yanı sıra katepsin L inhibitörlerinin uygulanmasının metastazı önleyebileceği düşünülebilir. Ancak selektif katepsin L inhibisyonu yapılamadığından ve diğer katepsinler kompanzatuvar aktivite gösterebildiğinden katepsin L inhibisyonuyla metastazı önleyici bir sonuç alınamaması da olasıdır. Bu konuda yapılacak yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Eritroblast transformasyon spesifik (ETS) Varyant 4 (ETV 4): ETV1, ETV4, ETV5, eritroblast transformasyon spesifik (ETS) transkripsiyon faktörlerinin bir alt grubunu oluşturmaktadır. ETS ailesinin 27 üyesi bulunmaktadır. ETV4 aynı zamanda E1AF olarak da bilinmektedir. Eritroblast transformasyon spesifik onkogen ailesinden bir transkripsiyon faktörüdür. Çok sayıda MMP'ı aktive etmektedir, kanser hücrelerinin invazivliği ve metastatik aktivitelerine katkı sağlamaktadır (85). ETV1 ve ETV4'ü etkileyen kromozomal translokasyonlar Ewing sarkom karsinogenezinde rol oynamaktadır (86). ETS varyant 4 varlığı çocukluk çağı Ewing sarkomunda ve andiferansiye sarkomunda bildirilmiştir (87, 88).

ETS transkripsiyon faktörü E1AF (bir diğer adıyla ETV4) birçok matriks metalloproteinazı aktive etmekte ve tümör hücre invazyonunu arttırmaktadır. Farklı seviyelerde MYCN amplifikasyonu olan beş ayrı NB hücre hattında (TGW, GOTO, SK-N-BE, SK-N-SH and SK-N-AS), invaziv aktivite ve E1AF ekspresyonu incelenmiştir. MYCN amplifiye hücre hatlarında invaziv aktivite ile korele olarak E1AF mRNA üretimi orantılı yüksek bulunmuştur. Birçok MMP ve MMP'ların doku inhibitörleri (TIMP) içinde sadece membrana bağlı tip 1 MMP (MT1-MMP) MYCN amplifiye NB'da yüksek ve NB hücre invazyonuyla ilişkili bulunmuştur. MMP2, TIMP1, TIMP2 beş ayrı NB hücre hattında de eksprese edildiği görülmüştür. Transkripsiyon faktörlerinden E1AF ve MYCN, NB'un maliyn fenotipiyle ilişkili bulunmuştur (89).

Bizim çalışmamızda da Kelly hücre hattında ETV4 ekspresyonu sisplatin uygulamasıyla kontrol grubuna göre iki kat, allicin uygulamasıyla >500kat, allicin+sisplatin uygulamasıyla >200kat, resveratrol uygulamasıyla >300 kat, resveratrol + sisplatin uygulamasıyla >500kat artış göstermiştir. Buna göre NB invazyonuyla ilişkisi daha önce gösterilmiş ETV4 geni için bakıldığında, allicin ve resveratrolün MYCN pozitif NB hücre

hatlarında gerek tek başına gerekse sisplatinle birlikte uygulanmasının ETV4 ekspresyonunu arttırdığı izlenmiştir. Kelly hücre hatlarında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse kemoterapinin yanı sıra uygulanması NB metastazıyla ilişkili ETV4 gen ekspresyonunu arttırdığından sakınca yaratmaktadır. Yanı sıra SH-SY5Y hücre NB dizilerinde sisplatin uygulandığında 17 kat, allicin ile 57 kat, sisplatin+allicin ile 63 kat, resveratrol ile 437 kat, sisplatin + resveratrol ile 50 kat ETV4 gen ekspresyon azalması izlenmiştir. Dolayısıyla MYCN amplifikasyonu olmayan hücre hatlarında aynı fitokimyasal ajanların gerek tekli gerekse sisplatinle birlikte uygulanmaları ETV4 gen ekspresyonunu azaltmıştır. MYCN amplifikasyonu taşımayan NB hücre hatlarında bu ajanların uygulanması bir sakınca yaratmamıştır hatta bu fitokimyasal ajanlar ETV4 gen ekspresyonunu azaltarak avantaj sağlamıştır.

KISS1 Metastaz supressor: Bu gen bir metastaz baskılayıcı gen olup melanom ve meme karsinomunda tümörjenik etkiyi değiştirmeden metastazları baskılamaktadır. Kodladığı protein kemotaksis ve invazyonu önlemektedir. *KISS1 Reseptör (KISS1R =GPR54):* Bu genin kodladığı protein galanin-benzeri G protein ile birleşik reseptör olup bu reseptör metastin isimli peptid ile bağlanmaktadır. Metastin, metastaz baskılayıcı gen olan KISS1'in kodladığı bir peptiddir.

KISS-1 mide karsinomunda proliferasyon ve invazyonu önlemektedir (90). KISS1 ve GPR54 kanser hücrelerinin motilitesini inhibe ederek metastazı baskılamaktadır (91). Bu metastaz baskılayıcı etki özellikle melanomda gösterilmiştir (92-94). KISS1 artmış ekspresyonu meme kanser hücrelerinde de metastazı inhibe ettiği gösterilmiştir (95). Ancak bazı agresif kanserlerde KISS1'in mortalite ile pozitif korelasyonu da bildirilmiştir (96). Östrojen reseptörü pozitif meme kanserinde KISS1 kötü prognozla korele bulunmuştur (97). KISS1 ile ilişkili sonuçlar çelişkilidir. Over kanserlerinde metastazın potansiyel bir biyogöstergesidir (98).

KISS1R ekspresyonunun yokluğu renal hücreli karsinomda progresyonla ilişkili bulunmuştur (99). İnsandaki pek çok kanserde KISS1 metastaz baskılayıcı rol oynamaktadır. Ancak meme tümörlerinde KISS1 ve KISS1R ekspresyonlarının artması yüksek tümör derecesi ve metastaz potansiyeliyle ilişkili bulunmuştur (100).

Bizim çalışmamızda Kelly hücre hatlarında allicin, resveratrol ve sisplatinin tekli ve birlikte uygulamalarıyla KISS1 ve KISS1R ekspresyonları artmıştır; SH-SY5Y hücre hatlarında ise ekspresyonları azalmıştır. KISS1 ve KISS1R genlerinin invazyon ve kemotaksisi önleyerek maliyn melanomda metastazları azalttığı dikkate alınırsa, nöroblastom ve maliyn melanom aynı embriyolojik kökenden geldiklerinden belki KISS1 ve KISS1R ekspresyonlarının nöroblastomda artması da metastaz önleyici bir etki yaratabilir. Diğer tümörlerde ekspresyonu çelişkili sonuçlar doğuran, esasen metastazı baskılayıcı iken kötü prognoz göstergesi de olabilen bu KISS1 ve

KISS1R genlerinin NB'da nasıl bir sonuç doğuracağı konusunda elimizdeki veriyle yorum yapmak güçtür. Bu konuda ileri araştırmalarac ihtiyaç vardır.

HTATIP 2 (HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa): HTATIP2 (TIP30 veya CC3 olarak da isimlendiriliyor) tümör baskılayıcı protein, aynı zamanda anjiogenez inhibitörüdür. Sitoplazmik HuR birikimini arttırarak transkripsiyon faktörü p53'ün ekspresyonunu arttırır, tümör baskılayıcıdır, genom stabilitesini sağlamada ve kanser büyümesini önlemede önemli rol oynar (101). Ortopik hepatosellüler karsinomda sorafenib uygulaması HTATIP2 ekspresyonunu azaltmakta ve invazivlik ve metastazı arttırmaktadır (102). Hipoksik SH-SY5Y NB hücre hatlarında hücre-hücre, hücre-matriks ilişkisinin devamı için rol alan genlerin (*adenomatoz polipozis koli, E-cadherin, catenin, EphB2, fibronectin-1, HTATIP2, TIMP4*) %90 azaldığı; metastatik davranışla ilişkili genlerin (integrin $\alpha 7\beta 1$, hepatosit büyüme faktörü reseptörü, transforme edici büyüme faktörü beta 1, VEGF, kisspeptin, IL1B) dramatik olarak %200 arttığı gösterilmiştir (103). Bu değişikliklerin epitelial-mezenşimal dönüşümle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu süreç NB hücresinin adherent fenotipten yüksek derecede migratuvar, invaziv ve agresiv hücre tipine dönüşümüne neden oluyor olabilir (103).

Bizim çalışmamızda HTATIP2 ekspresyonunun SH-SY5Y hücre hatlarında azalırken, Kelly hücre hatlarında artmıştır. Çalışmamızda da SH-SY5Y hücre hatlarında allicin, resveratrol ve sisplatinin tekli ve kombine uygulamaları HTATIP2 ekspresyonunu azaltmıştır ki bu bulgu literatürle uyumludur (103). HTATIP2 geninin tümör baskılayıcı ve anjiogenez inhibitörü fonksiyonları dolayısıyla çalışmamızdaki uygulamalarla HTATIP2 ekspresyonunun SH-SY5Y hücre hatlarında azalmasının bir dezavantaj, Kelly hücre hatlarında artmasının bir avantaj yaratacağı düşünülebilir. Yine yapılan araştırmalarda HTATIP2 genindeki azalmaya metastatik davranışla ilişkili genlerin ekspresyonlarında artışın eşlik ediyor olduğunun ve bu sürecin nöroblastomda invaziv ve agresiv hücre tipine dönüşümüne neden olduğunun gösterilmiş olması da HTATIP2 ekspresyonunun SH-SY5Y hücre hatlarında azalmasının bir dezavantaj, Kelly hücre hatlarında artmasının bir avantaj yaratacağı düşüncesini desteklemektedir.

İnterlökin 1 beta (IL1B): Bu genin kodladığı protein, IL1 sitokin ailesinin bir üyesidir. Bu sitokin aktive makrofajlar tarafından proprotein olarak üretilir, kaspaz 1 tarafından proteolitik olarak işlenir ve aktif formuna dönüşür. Bu sitokin inflamatuvar cevabın önemli bir mediatörüdür. Hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozda görev alır. Bir metaanalizde IL-1B ve IL-1 RN polimorfizmi mide karsinomu gelişmesi ile anlamlı ilişkili bulunmuştur (104). Kas invazyonu yapmış mesane kanserinde IL1B, S100A8, S100A9 ve EGFR genleri tanısal bir araç ve progresyonun bir göstergesi olduğu gösterilmiştir (105).

Bizim çalışmamızda allicin, resveratrol ve sisplatinin tekli ve kombine uygulamalarıyla IL1B ekspresyonu Kelly hücre hatlarında artmış, SH-SY5Y hücre hatlarında ise azalmıştır. Hipoksik SH-SY5Y NB hücre hatlarında hücre-hücre, hücre-matriks ilişkisinin devamı için rol alan genler azalırken, IL1B dahil metastatik davranışla iikişkili genlerin arttığı bildirilmiştir (103). IL1B ekspresyonunun Kelly hücre hatlarında artmış, SH-SY5Y hücre hatlarında ise azalmış olması IL1B ekspresyonunun NB'un metastaz potansiyeline katkısı olduğunu ve kötü prognoz ile ilişkisini düşündürebilir.

İnterlökin 8 reseptör beta (IL8RB): İnterlökin 8 proinflamatuvar bir sitokindir. CXCR1 ve CXCR2 reseptörlerine bağlanarak kanserde anjiogenez, mitogenez ve motogenezi yönlendirir. Kolon kanserinde IL8 artmış ekspresyonu kolon kanserinin büyüme ve metastazı ile ilişkili iken, CXCR2 reseptörlerinin yokluğu kolon kanserinin büyümesini önlemektedir (106). IL8 endometriyum karsinomunda artmış ekspresyon göstermektedir. IL8 ve IL8 reseptörlerinin endometriyum karsinomu patogenezinde rol aldığı ve potansiyel prognostik biyobelirteç ve terapötik hedef olduğu bildirilmiştir (107). Nöroblastomda IL8RB ekspresyonuna dair İngilizce literatür bilgisi mevcut değildir. Ancak henüz yapılan bir araştırmada SH-SY5Y hücre hattında IL8RB için reseptör görevi yapan CXCR2 ekspresyonunun *Triptolide* isimli bir ajanla inhibe edildiği bildirilmiştir (109).

Bizim çalışmamızda Kelly hücre hattında allicin, resveratrol, sisplatin tekli veya kombine kullanımlarıyla ekspresyon artışı izlenen IL8RB için, SH-SY5Y hücre hatlarında ise ekspresyon azalması göstermiştir. IL8RB geninin NB'da metastaz potansiyeli üzerine etkisine dair yorum yapmak güçtür. IL8RB ekspresyonunun Kelly hücre hatlarında artmış, SH-SY5Y hücre hatlarında ise azalmış olması IL8RB ekspresyonunun nöroblastomda kötü prognoz ile ilişkisini düşündürebilir. Yapılacak daha ileri araştırmalarda nöroblastomda IL8RB nin kötü prognozla ilişkisi ispatlanır ise bu takdirde IL8RB için reseptör görevi yapan CXCR2 ekspresyonunu inhibe eden ajanların kullanımı tartışılabilir.

İntegrin alfa 7 (ITGA7): İntegrinler ekstrasellüler matriks proteinleri için reseptör ailesidir. İntegrinler heterodimerik integral membran proteinleridir. Geniş bir spektrumda hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimini yönlendirirler. Sonuçta hücre migrasyonu, morfolojik gelişimi, farklılaşma ve metastazda rol oynarlar. ITGA7 geninin kodladığı protein integrin alfa zincir ailesi üyesidir. Bu protein bazal membran proteini olan laminin-1 için reseptör fonksiyonu görür. Özellikle iskelet kası ve kalp kasında bulunur.

ITGA7 mutasyonları ve downregulasyonu pek çok kanserde (prostat kanseri, hepatosellüler karsinom, yumuşak doku leiomyosarkomu, glioblastoma multiforme) %25-83 sıklıkta tanımlanmıştır (109, 110). Prostat kanseri ve leiomyosarkom hücre hatlarında ITGA7

ekspresyonunun korunması tümör büyümesini baskılamış ve hücrelerin motilitesini baskılamıştır (109). ITGA7 ilişkili tümör baskılayıcı mekanizmanın nasıl olduğu tam bilinmemektedir.

Nöroblastomda ITGA7 ekspresyonuna dair veri bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda Kelly hücre hattında allicin, resveratrol, sisplatin tekli veya kombine kullanımlarıyla ekspresyon artışı izlenen ITGA7 için, SH-SY5Y hücre hatlarında ise ekspresyon azalması göstermiştir. Literatürde NB'da ITGA7 ekspresyonuna dair veri bulunmadığından, tümör baskılayıcı özellikte olan ITGA7 geninin NB'da metastaz potansiyeli üzerine etkisine dair yorum yapmak güçtür. Kelly hücre hattındaki yüksek ITGA7 ekspresyonu varlığında tümör baskılayıcı bir mekanizma ile tümör büyümesinin ve hücre motilitesinin engellenmesi ve metastaz baskılayıcı bir etkiyle sonuçlanması beklenir.

Matriks metalloproteinazlar (MMP3; MMP7; MMP10; MMP13) : Matriks metalloproteinazları ekstrasellüler matriks yıkımıyla görevlidir. Normal fizyolojik olaylarda örneğin embriyonik gelişim sırasında, doku remodelinginde, hastalıklarda örneğin artrit, metastazda rol oynarlar. Genelde inaktif proteinler olup hücre dışı proteinazlarla karşılaşınca aktive olurlar. *MMP3:* Bu genin kodladığı enzim fibronectin, laminin, kollojen III, IV, IX, X ve kıkırdak proteoglikanlarının yıkımından sorumludur. Yara iyileşmesi, ateroskleroz progresyonu ve tümör inisiasyonunda görev alır. *MMP7:* Bu genin kodladığı enzim proteoglikanlar, fibronectin, elastin, kazein yıkımından sorumludur. Yara iyileşmesinde rol alır ve intestinal mukozal savunma aktivitesini düzenler. *MMP10:* Bu enzim proteoglikanlar ve fibronectin yıkımında görevlidir. *MMP13:* Özellikle tip 2 kollojeni aktif şekilde yıkar. *Metalloproteinaz inhibitör 4 (TIMP4):* Matriks metalloproteinazlarının inhibitörünü kodlar. Sekrete edilen netrin komponenti trombosit agregasyonunda, hormonal regülasyon ve endometrial doku remodelinginde rol oynar. TIMP4'ün düşük dereceli astrositomlarda (WHO I) daha yoğun eksprese edildiği bildirilmiştir (111). Prostat kanserinde TIMP4 ekspresyonu Gleason skoru ile negatif korele bulunmuştur (112).

Bir metaanalizde MMP 1, 3, 7 ve 9'un bazı kanserlerde metastazla ilişkili olduğu gösterilmiştir (113). Pankreas karsinom modelinde MMP 7, 9, 10'un artmış ekspresyonu gösterilmiştir (114). Hipotetik olarak artmış MMP ekspresyonunun metastazla ve invaziv karaktere ilişkili olacağı düşünülebilir. Literatürde artmış MMP2 ve MMP9 ve azalmış TIMP2 ekspresyonlarının NB'da invazyon ve metastazla ilişkisine dair az sayıda veri bulunmaktadır (115, 116). Hipoksik SH-SY5Y NB hücre hatlarında TIMP4 dahil hücre-hücre, hücre-matriks ilişkisinin devamı için rol alan genler azalırken, metastatik davranışla ilişkili genlerin arttığı bildirilmiştir (103). Ancak MMP3, MMP7, MMP10, MMP13 nöroblastomdaki ekspresyonlarına dair İngilizce literatür verisi bulunamamıştır. MYCN amplifikasyonu olan NB'da MMP7,

MMP10, MMP13 ekspresyonlarının değerlendirildiği daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızda Kelly hücre hatlarında allicin, resveratrol ve sisplatin uygulamalarıyla MMP3, 7, 10, 13 ve TIMP4'ün ekspresyonlarının artmış olması NB'da metastaz ile ilişkili olabilir. TIMP4 ekspresyonunun metastazlar ile negatif korele olması beklenir.

V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC): Bu genin kodladığı protein çok fonksiyonlu bir nükleer fosfoproteindir. Hücre döngüsünün ilerlemesinde, apoptozda, hücrel transformasyonda rol oynar. Spesifik hedef genler için transkripsiyon faktörü olarak da görev yapar. Bu genin mutasyonu, artmış ekspresyonu, yeniden düzenlenmesi, translokasyonu pek çok hematopoietik tümör, lösemi ve lenfomalarla ilişkilidir. Esasen N-MYC amplifikasyonu nöroblastomla ilişkili olup, C-MYC ise lösemi ve lenfoma onkogenezi ile ilişkilidir (117, 118). Henüz yapılan çalışmalarda C-MYC ekspresyonunun medulloblastomda kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (119, 120). Bizim çalışmamızda Kelly hücre hattında artmış, SH-SY5Y hücre hattında azalmış C-MYC ekspresyonu saptanmıştır. Bu genin NB'da metastaz potansiyeli üzerine etkisine dair yorum yapmak güçtür.

V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, akciğer karsinomu kaynaklı (avian) (MYCL1): Transkripsiyon faktörü ve regülatörü fonksiyonları olan metastaz ilişkili bir genidir. MYCL1 genindeki polimorfizmin akciğer kanserine duyarlılık yarattığı bildirilmiştir (121, 122) MYCL1 deki allelik kayıp kolorektal kanserlerde kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (123, 124). Nöroblastomda MYCL1 ekspresyonuna dair veri İngilizce literatürde bulunamamıştır. Bu genin NB'da metastaz potansiyeli üzerine etkisine dair yorum yapmak güçtür.

SYK (Spleen tyrosine kinase): SYK, özellikle hematopoietik hücrelere özgü bir sinyal molekülü olup, hematopoietik olmayan bazı kanser tiplerinde de eksprese olduğu gösterilmiştir. Lenfositlerin maturasyonu ve immün hücrelerin aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Tirozin kinaz füzyon genleri lösemi ve solid tümörler için önemli bir onkogen sınıfıdır (125). SYK bu genlerden biridir ve reseptör tipinde olmayan tirozin kinazı kodlamaktadır. Bu protein hematopoietik hücrelerde yaygın olarak eksprese edilmektedir. SYK inhibitörlerinin kullanımı lösemi, lenfoma tedavisinde araştırılmaktadır (126-128). Meme kanserinde tümör baskılayıcı potansiyeli vardır. Meme kanseri progresyonunda SYK ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. SYK tümörigenezisi ve metastazı baskılayabilmektedir.

Nöroblastomda SYK gen ekspresyonunun nasıl olduğuna dair literatür verisi mevcut değildir. Bir onkogen olan SYK'nın ayrıca meme kanseri gibi bazı kanser tiplerinde tümör ve metastaz baskılayıcı özellik gösteriyor olması çelişkilidir. Bizim çalışmamızda fitokimyasalların tekli ve sisplatinle kombine uygulamaları SYK geni ekspresyonunu Kelly hücre hattında arttırmış, SH-SY5Y hücre hattında azaltmıştır. Bu SYK onkogeninin ekspresyonunun NB'da

metastatik potansiyel üzerine etkisine dair yorum yapmak güçtür ve ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1 (TRPM1, melastatin) : Bu gen geçici reseptör potansiyeli olan melastini kodlamaktadır. Bu, kalsiyum geçirgenliği olan bir katyon kanalıdır ve melanositlerde eksprese olur. Bu genin ekspresyonu melanom agresifliği ile ters korelasyon gösterir. Melanom metastazları için prognostik belirteç olma özelliğindedir. TRPM1 melanom için iyi prognostik bir göstergedir (129). TRPM1 öncelikle melanin üreten hücrelerde (melanositlerde, melanomda, beyinde ve retinada) bulunmaktadır, bir iyon kanalıdır (130). Literatürde TRPM1 geninin sadece melanomdaki ekspresyonuna dair veri bulunmakta olup bu genin NB'daki ekspresyonuna dair yorum yapmak güçtür (131-135). Ancak maliyn melanom ve nöroblastomun embriyolojik kökenleri ortak olduğundan, NB hücre hatlarında fitokimyasalların uygulanmasıyla TRPM1 geninin ekspresyonunun yüksek bulunuyor olması prognozla ilişkili olabilir. Bu konuda daha ileri çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (CDH1): Cadherinler hücre yüzeyi glikoprotein ailesi olup hücre-hücre adhezyonunda önemli rol oynamaktadır. Klasik tip 1 cadherin epitelyum dokusunda hücre – hücre adhezyonu oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. CDH1 tümör baskılayıcı gendir, 16q22.1 kromozom lokalizasyonunda bulunmaktadır ki bu bölge meme kanserinde heterozigosite kaybının (LOH) sık geliştiği bir bölgedir. Bu bölgede LOH gelişmesi CDH1 geninde fonksiyon kaybıyla sonuçlanmaktadır, bu da hastalıksız yaşam oranında azalma, kötü prognoz ve metastazla ilişkilidir. Pek çok kanser tipinde E-cadherinlerin tümör baskılayıcı rol oynadıkları gösterilmiştir. Deneysel olarak E-cadherin fonksiyonu veya ekspresyonunun baskılanmasının hücre migrasyonu, invazyonu ve metastazda artışla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu özellikle epiteliyal kanserlerde önem kazanmaktadır. Ayrıca E-cadherin kaybının onkojenik sinyal yollarını aktive ettiği bilinmektedir. (136,137) Bir tümör baskılayıcı gen olan CDH1'in metilasyonunun ve buna bağlı instabilitesinin NB patogeneğinde, tümörigeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (138, 139). Hipoksik SH-SY5Y NB hücre hatlarında *E-cadherin* dahil hücre-hücre, hücre-matriks ilişkisinin devamı için rol alan genlerin %90 azaldığı; metastatik davranışla ilişkili genlerin dramatik olarak %200 arttığı gösterilmiştir (103). Bu değişikliklerin epiteliyal-mezenşimal dönüşümle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu süreç NB hücresinin adherent fenotipten yüksek derecede migratuvar, invaziv ve agresiv hücre tipine dönüşümüne neden olabileceği yorumu yapılmıştır (103).

Bizim çalışmamızda CDH1 ekspresyonu Kelly hücre hattında artmış, SH-SY5Y hücre hattında azalmış bulunmuştur. Bu gendeki fonksiyon kaybının özellikle epiteliyal kanserlerde

metastaz artışıyla ilişkisi bilindiğinden NB metastaz potansiyeli ve CDH1 ekspresyonu ilişkisine dair mevcut veriyle yorum yapmak güçtür. Ancak ileri çalışmalarda NB'da CDH1 geninin metilasyonu ve bununla ilişkili fonksiyon kaybının metastatik potansiyelle ilişkisi araştırılmalıdır.

FXD5 (FXD domain containing ion transport regulator 5): Dysadherin kanser ilişkili hücre membran glikoproteinidir. İlk olarak kötü prognozlu meme kanseri ile ilişkisi gösterilmiş olup ardından pek çok erişkin kanser tipinde progresyonla ilişkisi öne sürülmüştür. Kolorektal kanser, baş boyun skuamoz hücreli karsinomu, testis tümörleri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, kutanöz malign melanom, serviks skuamoz hücreli karsinomu, dil kanseri, ösfagus skuamoz hücreli karsinomu, mide kanseri, tiroid kanseri, pankreatik duktal adenokarsinom ve meme kanserinde kötü prognoz ve hastalık progresyonu ile ilişkili bulunmuştur (140-144).

FXD5'in artmış ekspresyonunun esasen skuamoz hücreli karsinomlarda kötü prognoz ve hastalık progresyonu ile ilişkisi bildirilmiştir (140-144). Ancak NB'da FXD5 ekspresyonuna dair İngilizce literatür verisi bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda Kelly hücre hatlarında fitokimyasal ajanlar gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulandığında FXD5 ekspresyonunda anlamlı artış olduğu görülmüştür. Bu bulgu sonucunda MYCN amplifikasyonu olan NB'da artmış FXD5 ekspresyonunun metastaz ile ilişkisi olabileceğini düşündürebilir. SH-SY5Y (N-MYC negatif) hücre hattında ise fitokimyasalların ve sisplatinin uygulanmasıyla FXD5 ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür ki bu tümör invazivliğini önleyici bir avantaj sağlanacağını düşündürebilir.

Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TNFSF10) (TNF-related apoptosis inducing ligand TRAIL): Bu genin kodladığı protein TNF ligand ailesi içinde yer alan bir sitokindir. Bu protein tümör hücresinde apoptozu indüklemektedir. Bu proteinin reseptörlerine bağlanması MAPK8/JNK, kaspaz 8, ve kaspaz 3 aktivasyonunu tetiklemektedir. TRAIL [TNF (tumour necrosis factor)-related apoptosis-inducing ligand] klinik kullanımı umut veren bir ajandır çünkü normal hücreleri etkilemeden kanserli hücreyi öldürebilmektedir. TRAIL-R2 ve TRAIL-R3 NB hücrelerindeki esas TRAIL reseptörleridir. Nöroblastomda kaspaz8 yokluğunda TRAIL ilişkili apoptoza direnç gelişmektedir (145, 146). SH-SY5Y hücrelerinde sisplatin ve etoposidin TRAIL ile birlikte uygulanmasının tümör hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir. Kemoterapötik ajanlar hücrelerin TRAIL duyarlılığını arttırmıştır.(147, 148). Nöroblastomda TNFSF10 (TRAIL) gen ekspresyonunun metastazla ilişkisine dair literatür verisine rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda Kelly hücre hatlarında fitokimyasal ajanlar gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulandığında TNFSF10 ekspresyonunda anlamlı artış olduğu görülmüştür. Bu bulgu sonucunda MYCN amplifikasyonu olan NB'da artmış TNFSF10

ekspresyonunun metastaz ile ilişkisi olabileceği öne sürülebilir. Bu konuda yapılacak ileri araştırmalara gereksinim vardır.

IGF1 (insulin-like growth factor 1): İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF1) polipeptid protein hormondur, yapısı insüline benzemektedir. Çocukluk çağında büyümede, erişkin çağında anabolik etkilerde rol alır. IGF1 ve IGF1R'nün hücre büyüme, gelişmesinde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Bu moleküller hücre döngüsünün devamlılığı için de gereklidir. IGF1 sinyali pek çok kanserin gelişmesinde karsinogeneze rol oynamaktadır. Serumda yüksek IGF1 konsantrasyonu meme, prostat, kolorektal ve akciğer kanserleri için artmış risk yaratmaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörleri IGF1 ve IGF2 peptid hormonlardır, IGF1R reseptöre bağlanırlar ve hücre içi sinyal yolu aktive olur, hücre büyümesi ve proliferasyonu ile sonuçlanır. Kolorektal karsinom patogeneğinde bu yol önemlidir (149). IGF1 reseptör inhibitörleri prelinik modellerde geliştirilmiştir ve klinik çalışmaların erken fazlarında uygulanmaya başlanmıştır (150). Monoklonal antikolar, küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri, anti-sens oligonükleotidler IGF bağlayıcı proteinler IGF aksının hedefleri olarak geliştirilmiştir (151). Kolon kanserinde IGF1R, invazyonu arttırmakta, apoptoza direnci indüklemektedir (152).

Nöroblastomda IGF1'in NB hücrelerini hiperozmotik stres, peroksinitrit, hipoksi, doksorubisin veya TNF- α ile indüklenen apoptozdan koruduğu bildirilmiştir (153-157). Ancak NB'da IGF1'in metastatik potansiyel üzerine etkisine dair bir literatür verisine rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda IGF1 ekspresyonu Kelly hücre hatlarında artmış, SH-SY5Y hücre hatlarında azalmıştır. Pek çok kanserin gelişmesinde karsinogeneze rol oynayan IGF1'in NB'da metastaz potansiyelini nasıl etkilediğine dair yorum yapmak elimizdeki mevcut veri ile güçtür.

MET (Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)) Mezenşimal epiteliyal transisyon faktörü (MET), c-Met RTK ailesinin prototipik bir üyesidir. Yapısal olarak ailenin diğer üyelerinden farklıdır. Hepatosit büyüme faktörü (HGF) reseptörüne yüksek afinite gösterir. MET ve HGF normal memeli hücrelerinin gelişiminde, hücre migrasyonunda, morfojenik farklılaşmada, üç boyutlu tübüler yapıların organizasyonunda, hücre büyümesi ve angiogeneze önemli rol oynamaktadır (158). MET bir protoonkogendir, ürünü hepatosit büyüme faktörü reseptörüdür ve tirozin kinaz aktivitesini kodlamaktadır. MET genindeki pek çok mutasyon papiller renal karsinom ile ilişkilidir. MET geni kopya sayısının veya ekspresyonunun artması küçük hücreli dışı akciğer kanserinde kötü prognozla ilişkilidir (159). Az sayıda çalışmada NB'da TrkB ekspresyonunun hepatosit büyüme faktörü / c-MET üzerinden invaziv kapasiteyi arttırdığı öne sürülmüştür (160, 161).

Bizim çalışmamızda fitokimyasalların gerek tek başına gerekse sisplatinle birlikte uygulanmaları sonucu MET ekspresyonu MYCN pozitif NB hücre hattında artmış, MYCN

negatif hücre hattında azalmıştır. MYCN pozitif hücre hattındaki artmış MET ekspresyonu NB'un invaziv karakteri, metastaz potansiyeli ile ilişkili olabilir. PHA665752 gibi MET inhibitörü ajanlar mevcuttur (162). Metastaz riski yüksek NB'da MET'in bir tedavi hedefi olarak belirlenmesi halinde PHA665752 gibi MET inhibitörü ajanların uygulamaları gündeme gelebilir ve tartışılabilir.

CXCL12 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)) Bu gen stromal kaynaklı alfa kemokini kodlamaktadır. Bu gen ürünü ve onun reseptörü CXCR4 lenfositleri aktive edebilmekte ve meme kanseri gibi bazı kanserlerde metastazda rol oynayabilmektedir. Nöroblastomda CXCL12 ve reseptörleri olan CXCR4, CXCR7 tümör progresyonu ve disseminasyonunda rol oynamaktadır. Nöroblastomda CXCR4 ekspresyonu andiferansiye tümör ve kötü prognozla ilişkilidir (163). CXCR7 henüz tanımlanmıştır ve NB'daki yeri henüz net değildir (163). CXCL12 nin NB vasküler ve stromal yapılarıyla ilişkisi vardır. Nöroblastomda CXCR4/CXCL12 kemokin/reseptör aksı NB invazyon ve metastazında rol almaktadır (164). Bir çalışmada metastatik NB hücrelerinde CXCR4 eksprese edildiği ancak fonksiyonel olmadığı bu nedenle de NB metastazını önlemek üzere CXCR4 antagonistleri kullanmanın klinik fayda sağlamayacağı bildirilmiştir (165).

Bizim çalışmamızda fitokimyasalların gerek tek başına gerekse sisplatinle birlikte uygulanmaları sonucu CXCL12 ekspresyonu Kelly hücre hattında artmış, SH-SY5Y hücre hattında azalmıştır. MYCN pozitif hücre hattındaki artmış CXCL12 ekspresyonu NB'un metastaz potansiyeli ve kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Her ne kadar CXCL12'nin reseptörü olan CXCR4'e karşı CXCR4 antagonistlerinin kullanımının NB metastazını önlemede klinik fayda sağlamadığına dair az sayıda çalışma mevcutsa da bu konuda yapılacak ileri araştırmalara gereksinim vardır.

HPSE (Heparanase) Heparansülfat proteoglikanlar bazal membran ve ekstrasellüler matriksin major komponentleridir. Bu genin kodladığı protein heparansülfat proteoglikanları parçalayarak remodeling olan ekstrasellüler matriks boyunca hücrenin hareketine izin verir. Buna ek olarak ekstrasellüler matriksten biyoaktif moleküller salınır. Bu genin farklı izoformlarını kodlayan birçok transkript varyantı bulunmaktadır. HPSE geninde allelik kayıp, veya ekspresyon azalması hepatosellüler karsinom kötü prognozu ile ilişkili bulunmuştur (166). Yine HPSE genindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin mide kanseri progresyonu ile ilişkisi gösterilmiştir (167). Melanom ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinde de HPSE invazyonunun da HPSE ile ilişkisi gösterilmiştir (168, 169).

Epitelial kanserlerde ve melanomda kaybı veya inhibisyonunun tümör invazyonu, metastaz ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiş HPSE geninin NB'daki ekspresyonunun

nasıl olduğuna dair İngilizce literatür verisi bulunamamıştır. Melanom ve nöroblastomun ortak embriyolojik kökeni NB'da da HPSE geninin metastaz potansiyeliyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatinle birlikte uygulanmaları sonucu HPSE geni ekspresyonu Kelly hücre hattında artmış, SH-SY5Y hücre hattında azalmıştır. Bu veri ile HPSE geninin NB metastaz potansiyeli üzerine etkisine dair yorum yapmak güçtür.

CDH6 (Cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)) CDH6 geni cadherin süper ailesini kodlamaktadır. Cadherinler membran glikoproteinleridir ve homofilik hücre-hücre adhezyonunu yönetirler, hücre farklılaşması ve morfogenezde kritik rol oynarlar (136,137). Kodlanan protein tip II cadherin olup böbrek gelişiminde, endometriyum ve plasenta oluşumunda rol almaktadır. Bu genin azalmış ekspresyonu tümör büyümesi ve metastazla ilişkilidir. Bizim çalışmamızda SH-SY5Y hücre hatlarında resveratrol ve resveratrol + sisplatin uygulamalarıyla bu gende kontrol grubuna göre belirgin ekspresyon azalması olmuştur. Ki bu bulgu MYCN negatif hücre hattında metastaz ile ilişkili olabilir.

Çalışmamızda özellikle MYCN amplifikasyonu olan NB hücre hatlarında allicin ve resveratrolün tekli ve sisplatin ile kombine uygulamaları metastaz ilişkili genlerin ekspresyonlarında genel bir artış ile sonuçlanırken, özellikle 21 genin ekspresyonunda en belirgin artış izlenmiştir. MYCN amplifikasyonu olmayan NB hücre hatlarında allicin ve resveratrolün tekli ve sisplatin ile kombine uygulamaları metastaz ilişkili genlerin ekspresyonlarında genel bir azalma ile sonuçlanırken; allicin $\pm$ sisplatin uygulamasıyla 22 genin, resveratrol $\pm$ sisplatin uygulamasıyla 20 genin ekspresyonlarında en belirgin azalma izlenmiştir. Metastaz ilişkili genlerin bazıları onkogen, protoonkogen iken bazıları da tümör baskılayıcı, metastaz baskılayıcı genlerdir. Bu genlerin tümünde artma, azalma yönünde meydana gelen değişikliklerin kümülatif etkisini belirlemek, tahmin etmek mümkün değildir. Sonuçta çalışmamızın bulguları allicin ve resveratrol isimli fitokimyasalların gerek tek başına gerekse kemoterapinin yanısıra kullanılmalarının uygun olmadığına işaret etmektedir. Bizim çalışmamızın sonucunda Kelly (MYCN pozitif) ve SH-SY5Y (MYCN negatif) NB hücre hatlarında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulanmaları sonucu ekspresyonu en fazla etkilenen metastaz genleri belirlenmiştir. Metastaz gelişmesine müdahale etmede potansiyel hedef olabilecek bu genler daha ileri araştırmalarla değerlendirilmelidir.

6. Sonuçlar ve neriler

1. Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında
 - a. Allicinin artan dozları sitotoksisite oluşturmamıştır.
 - b. Allicin sisplatin ile birlikte uygulandığında sisplatine bağlı sitotoksisiteyi değiştirmemiştir.
2. Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında
 - a. Resveratol artan dozları ile orantılı olarak sitotoksisite oluşturmuştur.
 - b. Resveratol sisplatin ile birlikte uygulandığında sisplatine bağlı sitotoksisiteyi değiştirmemiştir.
3. Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında
 - a. Allicin uygulanan grup ve kontrol grubu arasında apoptoz oranları farklılık göstermedi
 - b. Resveratrol uygulanan grup ve kontrol grubu arasında apoptoz oranları farklılık göstermedi.
4. Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında
 - a. sisplatin uygulanan grup ve allicin+sisplatin uygulanan gruplar arasında apoptoz oranları farklılık göstermedi.
5. Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında
 - a. sisplatin+resveratrol uygulaması sonrası gelişen apoptoz oranı, sisplatin uygulaması sonrası gelişen apoptoz oranından daha düşük bulundu.
6. Kelly NB hücre hatlarında kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde
 - a. DDX1 geni ekspresyonu resveratrol uygulamasıyla ≥ 3 kat artmıştı, diğer gruplarda değişmemişti.
 - b. nm23H1 geni ekspresyonu resveratrol uygulamasıyla, sisplatin+allicin uygulamasıyla ≥ 3 kat kat artmış, diğer gruplarda değişmemişti.
 - c. nm23H2 geni ekspresyonu resveratrol uygulamasıyla 3kat azalmış, diğer gruplarda değişmemişti.
7. SH-SY5Y NB hücre hatlarında kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde
 - a. DDX1 geni ekspresyonu sisplatin, allicin, resveratrol, allicin+sisplatin, resveratrol+sisplatin uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna göre ≥ 3 kat artış göstermişti.

- b. nm23H1 geni ekspresyonu sisplatin uygulanan grupta değişmezken, allicin, resveratrol, allicin+sisplatin, resveratrol+sisplatin uygulanan gruplarda ≥ 3 kat azalmıştı.
 - c. nm23H2 geni ekspresyonu sisplatin uygulanan grupta 3 kat artarken, diğer gruplarda değişmemişti.
8. Kelly NB hücre hatlarında grupların gen ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde
- a. Sisplatin uygulaması sonrası FXYD5, MCAM, CXCR4, SSTR2, CDH1 ekspresyonlarında ≥ 3 kat artma; EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5 ekspresyonlarında ≥ 3 kat azalma izlendi. ekspresyonu artan genler hücre adhezyon genleri (FXYD5, MCAM, CDH1), apoptoz genleri (CXCR4), hücre büyüme ve proliferasyon geni (SSTR2) idi; ekspresyonu azalan genler ise hücre adhezyon genleri (MGAT5, CDH11, CDH6), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (IL18, RORB, EPHB2), ekstrasellüler matriks proteinleri (TIMP3, COL4A2), transkripsiyon faktörleri ve düzenleyicileri (RORB) idi.
 - b. Allicin, resveratrol, allicin+sisplatin ve resveratrol+sisplatin uygulamaları sonrası ekspresyonları kontrol grubuna göre en fazla artış gösteren genler: CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 idi. Bu genler hücre büyüme ve proliferasyon genleri (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhezyon genleri (SYK, ITGA7, CDH1, FXYD5), transkripsiyon faktörleri (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptoz genleri (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), hücre siklus genleri (MYC, IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (CTSL1, KISS1) idi. Resveratrol uygulanan grupta ayrıca TGFB1 ve SSTR2 gen ekspresyonları da en fazla artan genler arasındaydı.
 - c. Tüm gruplarda ekspresyonu ≥ 3 kat azalan genler hücre siklus genleri (RB1) ve hücre büyüme ve proliferasyon genleri (DENR) idi. Resveratrol uygulanan grupta ayrıca NME2 geni ≥ 3 kat azalan genler arasındaydı.
9. SH-SY5Y NB hücre hatlarında grupların gen ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde
- a. tüm gruplarda PNN ekspresyonu ≥ 3 kat artmıştı. Ek olarak resveratrol uygulanan grupta DENR ekspresyonu ≥ 3 kat artmıştı.

- b. SH-SY5Y NB hücre hatlarında tüm gruplarda KISS1, TNSF10, TRPM1, IGF1 >100kat azalmıştı.
- c. Sisplatin uygulaması sonrası ekspresyonları ≥ 3 kat artan genler PNN, SMAD4, DENR, SET, METAP2, SMAD2, NME2 olup, ekspresyonu >100kat azalan genler KISS1, TNSF10, TRPM1, IGF1, MET, idi. SH-SY5Y Hücre hatlarında Sisplatin uygulamasıyla ekspresyonları ≥ 3 kat artan genler hücre adhezyon genleri (PNN), transkripsiyon faktörleri (SMAD4, NME2, SMAD2), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (DENR, SET, NME2), hücre siklus genleri (NME2), metastaz ilişkili diğer genler (METAP2) idi. SH-SY5Y Hücre hatlarında Sisplatin uygulamasıyla gen ekspresyonlarında genel olarak azalma izlendi. Gen ekspresyonu >100 kat azalan genler, Hücre büyümesi ve proliferasyonu genleri (MET, IGF1, TRPM1, TNSF10), apoptoz genleri (TNFSF10), metastaz ilişkili genler (KISS1) idi.
- d. Allicin ve sisplatin+allicin uygulanan gruplarda ekspresyonu en fazla etkilenen genler değerlendirildiğinde allicin uygulanan ve allicin+sisplatin uygulanan gruplarda ekspresyonu >100 kat azalan genler KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7 olup, allicin alan grupta ek olarak MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7 ekspresyonları da >100 kat azalmıştı. Bu genler hücre büyüme ve proliferasyonu genleri (TNSF10, IGF1, TRPM1, CCL7), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP13, MMP7, MMP3, TIMP4), hücre adhezyon genleri (ITGA7), apoptoz geni (TNSF10) ve metastaz ilişkili diğer genlerdi (KISS1).
- e. Resveratrol ve sisplatin+resveratrol uygulanan gruplarda ekspresyonu en fazla etkilenen genler değerlendirildiğinde, Resveratrol uygulanan grupta ekspresyonu >500 kat azalan genler ve resveratrol+sisplatin uygulanan grupta >100kat azalan genler MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, TIMP4 olup, resveratrol+sisplatin alan grupta ek olarak SYK da >100 kat azalmıştı. Bu genler ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP7, MMP10, MMP13, MMP3, HPSE, TIMP4), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (TNFSF10, CCL7, TRPM1, MET, IGF1, CXCL12, IL1B, IL8RB), apoptoz genleri (TNSF10, HTATIP2, IL1B), transkripsiyon faktörleri (HTATIP2), hücre adhezyon genleri (CDH6, FXYD5), hücre siklus genleri (IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (KISS1, CTSL1) idi.

Bizim çalışmamız Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında allicinin antitümöral, apoptotik bir etkisi olmadığını, sisplatinle birlikte verilmesi halinde sisplatinin antitümöral,

apoptotik etkilerini değiştirmediğini göstermiştir. Bulgularımız Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında resveratrolün doz bağımlı antitümöral etki yaptiğını, sisplatinin antitümöral etkisini değiştirmezken apoptotik etkisini zayıflattiğını, bozduğunu göstermiştir. Allicin ve Resveratrolün gen ekspresyonları üzerine olan etkileri dikkate alınmadan sadece sitotoksosite ve apoptoz üzerine olan etkileri dikkate alındiğında; Allicin Kelly ve SH-SY5Y NB hücre hatlarında antitümöral veya apoptotik bir fayda sağlamamıştır, resveratrol ise tek başına uygulandığında doz bağımlı antitümöral etki yapmış, sisplatinle birlikte uygulandığında sisplatinin antitümöral etkisini azaltmış, bozmuştur. Sonuçta hipotetik olarak MYCN amplifikasyonu olan ve olmayan NB’da resveratrolün konvansiyonel kemoterapi sırasında kullanılmasıyla kemoterapinin apoptotik etkisinin zayıflaması, konvansiyonel kemoterapi tamamlandıktan sonra resveratrolün tek başına kullanımı ile antitümöral etki sağlanması düşünülebilir. Yine hipotetik olarak allicinin MYCN amplifikasyonu olan ve olmayan NB tedavisi için uygun bir ajan olmadiğı düşünülebilir. Ancak hücre hattı çalışmalarının sonuçlarını direk olarak kliniğe uyarlamak doğru olmayacaktır. Aynı ajan ile *in vitro* ve *in vivo* uygulamada alınan sonuçlar farklılık gösterebilir.

DDX1 genini Kelly hücre hattında sadece resveratrol tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre ekspresyon artışı göstermiştir. Oysa ki çalışmamızda allicin ve resveratrolün gerek tekli gerekse sisplatinle kombine uygulamalarının tümü SH-SY5Y NB hücre hattında DDX1 gen ekspresyonunu arttırmıştır. Resveratrol ve allicin uygulamalarının, NB’da kötü prognoz ile ilişkili olduğu öne sürülen DDX1 gen ekspresyonunu arttırmış olması bu iki ajanın NB tedavisinde kullanımının uygun olmadiğını dşndrmştir. MYCN amplifikasyonu olan NBda resveratrol tek başına uygulandığında, allicin sisplatinle birlikte uygulandığında esasen metastaz baskılayıcı gen olan ancak NB’da agresif hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiş nm23H1 gen ekspresyonunu arttırmıştır ve bu özellik resveratrolün ve allicinin MYCN amplifikasyonu olan NBda uygulanmaması gerektiğini dşndrmştir. Allicin ve resveratrol Kelly ve SH-SY5Y hücre hatlarında, yine esasen metastaz baskılayıcı gen olan ancak NB’da agresif hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiş nm23H2 geni ekspresyonu üzerinde belirgin etki yapmamıştır.

Bizim çalışmamızın sonucunda Kelly (MYCN pozitif) ve SH-SY5Y (MYCN negatif) NB hücre hatlarında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulanmaları sonucu ekspresyonu en fazla etkilenen metastaz genleri belirlenmiştir.

MYCN pozitif olan NB hücre hattında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatinle birlikte uygulanması metastaz ilişkili şu genlerin ekspresyonlarında en fazla artışa neden olmuştur: hücre büyüme ve proliferasyon genleri (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP3, MMP7, MMP10,

MMP13, TIMP4), adhezyon genleri (SYK, ITGA7, CDH1, FXD5), transkripsiyon faktörleri (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptoz genleri (TNSF10, IL1B, HTATIP2), hücre siklus genleri (MYC, IL1B), metastaz ilişkili diğer genler (CTSL1, KISS1) idi. Resveratrol uygulanan grupta ayrıca TGFB1 ve SSTR2 gen ekspresyonları da en fazla artan genler arasındaydı. Allicin ve resveratrolün MYCN pozitif olan NB hücre hattında metastaz ilişkili gen ekspresyonunu bu şekilde etkiliyor olması bu ajanların NB tedavisinde kullanımının dikkatle sorgulanması, tartışılması gerektiğini düşündürmüştür.

MYCN negatif NB hücre hattında allicin ve resveratrol PNN ekspresyonunu, resveratrol ek olarak DENR ekspresyonunu arttırmıştır ki bunlar hücre adhezyon genleri (PNN), hücre büyüme ve proliferasyon genleridir (DENR). Allicinin, ekspresyonunu en fazla oranda azalttığı genler: hücre büyüme ve proliferasyonu genleri (TNSF10, IGF1, TRPM1, CCL7), ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP13, MMP7, MMP3, TIMP4), hücre adhezyon genleri (ITGA7), apoptoz geni (TNSF10) ve metastaz ilişkili diğer genlerdir (KISS1). Resveratrolün ekspresyonunu en fazla oranda azalttığı genler: ekstrasellüler matriks proteinleri (MMP7, MMP10, MMP13, MMP3, HPSE, TIMP4), hücre büyüme ve proliferasyon genleri (TNSF10, CCL7, TRPM1, MET, IGF1, CXCL12, IL1B, IL8RB), apoptoz genleri (TNSF10, HTATIP2, IL1B), transkripsiyon faktörleri (HTATIP2), hücre adhezyon genleri (CDH6, FXD5), hücre siklus genleri (IL1B), metastaz ilişkili diğer genlerdir (KISS1, CTSL1). Allicin ve resveratrolün MYCN negatif NB hücre hattında metastaz ilişkili gen ekspresyonunu bu şekilde etkiliyor olması bu ajanların NB tedavisinde kullanımının dikkatle sorgulanması, tartışılması gerektiğini düşündürmüştür.

Bizim çalışmamızın sonucunda MYCN pozitif ve MYCN negatif NB hücre hatlarında allicin ve resveratrolün gerek tek başına gerekse sisplatin ile birlikte uygulanmaları sonucu ekspresyonu en fazla etkilenen metastaz genleri belirlenmiştir. Metastaz gelişmesine müdahale etmede potansiyel hedef olabilecek bu genler daha ileri araştırmalarla değerlendirilmelidir. Metastaz ilişkili genlerin bazıları onkogen, protoonkogen iken bazıları da tümör baskılayıcı, metastaz baskılayıcı genlerdir. Allicin ve resveratrolün DDX1, nm23H1, nm23H2 ve diğer metastaz genleri ekspresyonları üzerindeki etkileri dikkate alındığında, çok sayıda gende çok yönlü etkilenme söz konusudur. Bulgularımız bu fitokimyasal ajanların NB'da ne kemoterapi beraberinde ne de konvansiyonel tedavi sonrasında kullanımının uygun olmayacağını düşündürmüştür. Ancak hücre hattı çalışmalarının sonuçlarını direk olarak kliniğe uyarlamak doğru olmayacaktır. Nöroblastomda allicin ve resveratrol gibi fitokimyasal ajanların uygulamaları dikkatle sorgulanmalı ve tartışılmalıdır.

7. Kaynaklar

1. Bradeur GM, Hogarty MD, Mosse YP. Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Roven; 2011. p 886-922.
2. Maris JM, Bradeur GM. Genetics. In: Cheung NKV, Cohn SL eds. Neuroblastoma. Berlin. Heidelberg. Newyork; Springer;2005. p 21-26.
3. Caron HN, Pearson ADJ. Neuroblastoma IN: Voute PA, Borrett A, Stevens MCG, Caron HN eds. Cancer in children 5th eds. Oxford, Newyork; Oxford Univercity Pres;2005. p 337-352.
4. Kutluk T, Yesilipek A, on behalf of Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) and Turkish Pediatric Hematology Society (TPHD). Pediatric Tumor Registry for 2002-2005 in Turkey. J Pediatr Hematol Oncol. 2007;29 Suppl 1 :S12-13.
5. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, et al. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. Pediatr Hematol Oncol 2003 20(3):211-218.
6. Nur Olgun, on behalf of the Turkish Pediatric Oncology Group. An Intermediary Analysis of the Neuroblastoma Treatment Protocol—2003 of the Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) at October 2006. J Pediatr Hematol Oncol. 2007;29 Suppl 1 : S14.
7. Kushner BH, Cheung NK. Neuroblastoma-from genetic profiles to clinical challenge. N Engl J Med. 2005 Nov 24;353(21):2215-7.
8. Squire JA, Thorner PS, Weitzman S, Maggi JD, et. al. Co-amplification of MYCN and a DEAD box gene (DDX1) in primary neuroblastoma. Oncogene. 1995 Apr 6;10(7):1417-22.
9. Manohar CF, Salwen HR, Brodeur GM, Cohn SL. Co-amplification and concomitant high levels of expression of a DEAD box gene with MYCN in human neuroblastoma. Genes Chromosomes Cancer. 1995 Nov;14(3):196-203.
10. Noguchi T, Akiyama K, Yokoyama M, Kanda N, et. al. Amplification of a DEAD box gene (DDX1) with the MYCN gene in neuroblastomas as a result of cosegregation of sequences flanking the MYCN locus. Genes Chromosomes Cancer. 1996 Feb;15(2):129-33.
11. Amler LC, Schürmann J, Schwab M. The DDX1 gene maps within 400 kbp 5' to MYCN and is frequently coamplified in human neuroblastoma. Genes Chromosomes Cancer. 1996 Feb;15(2):134-7.
12. George RE, Kenyon RM, McGuckin AG, Malcolm AJ, et. al. Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase,

syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Oncogene*. 1996 Apr 4;12(7):1583-7.

13. George RE, Kenyon R, McGuckin AG, Kohl N, et. al. Analysis of candidate gene co-amplification with MYCN in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997 Oct;33(12):2037-42.

14. Kuroda H, White PS, Sulman EP, Manohar CF, et. al. Physical mapping of the DDX1 gene to 340 kb 5' of MYCN. *Oncogene*. 1996 Oct 3;13(7):1561-5.

15. Godbout R, Packer M, Bie W. Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. *J Biol Chem*. 1998 Aug 14;273(33):21161-8.

16. Akiyama K, Akao Y, Yokoyama M, Nakagawa Y, et. al. Expression of two dead box genes (DDX1 and DDX6) is independent of that of MYCN in human neuroblastoma cell lines. *Biochem Mol Biol Int*. 1999 Apr;47(4):563-8.

17. Scott D, Elsdén J, Pearson A, Lunec J. Genes co-amplified with MYCN in neuroblastoma: silent passengers or co-determinants of phenotype? *Cancer Lett*. 2003 Jul 18;197(1-2):81-6.

18. Defferrari R, Tonini GP, Conte M, Papio F, et. al. Concomitant DDX1 and MYCN gain in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2007 Oct 18;256(1):56-63.

19. Weber A, Imisch P, Bergmann E, Christiansen H. Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2004 Jul 1;22(13):2681-90.

20. De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, et. al. No evidence for correlation of DDX1 gene amplification with improved survival probability in patients with MYCN-amplified neuroblastomas. *J Clin Oncol*. 2005 May 1;23(13):3167-8; author reply 3168-70.

21. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, et. al. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Mar;133(3):185-92. Epub 2006 Oct 7.

22. de Souza DR, Sanabani SS, de Souza AC, Filho Odone V, et. al. Prognostic impact of MYCN, DDX1, TrkA, and TrkC gene transcripts expression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 May;56(5):749-56.

23. Godbout R, Li L, Liu RZ, Roy K. Role of DEAD box 1 in retinoblastoma and neuroblastoma. *Future Oncol*. 2007 Oct;3(5):575-87.

24. Bagci O, Tumer S, Olgun N, Altungoz O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Lett*. 2012 Apr 1;317(1):72-7.

25. Boissan M, Lacombe ML. NM23, an example of a metastasis suppressor gene. *Bull Cancer*. 2012 Mar 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22429909
26. Godfried MB, Veenstra M, v Sluis P, Boon K, et. al. The N-myc and c-myc downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2. *Oncogene*. 2002 Mar 27;21(13):2097-101.
27. Hailat N, Keim DR, Melhem RF, Zhu XX, et. al. High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J Clin Invest*. 1991 Jul;88(1):341-5.
28. Leone A, Seeger RC, Hong CM, Hu YY, et. al. Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene*. 1993 Apr;8(4):855-65.
29. Bénard J. Genetic alterations associated with metastatic dissemination and chemoresistance in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1995;31A(4):560-4.
30. Takeda O, Handa M, Uehara T, Maseki N, et. al. An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastomas. *Br J Cancer*. 1996 Nov;74(10):1620-6.
31. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003 Jan;33(1):49-54.
32. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*. 2000 Aug 3;406(6795):532-5. Erratum in: *Nature* 2001 Jun 21;411(6840):974.
33. Shevde LA, Welch DR. Metastasis suppressor pathways--an evolving paradigm. *Cancer Lett*. 2003 Jul 30;198(1):1-20.
34. Steeg PS. Perspectives on classic article: metastasis suppressor genes. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Mar 17;96(6):E4.
35. Aryee DN, Ambros I, Ambros PF, Muehlbacher K, et. al. Frequent low level expression in Ewing sarcoma family tumors and widespread absence of the metastasis suppressor KAI1/CD82 in neuroblastoma. *Pediatr Res*. 2002 Aug;52(2):279-85.
36. Ara T, Fukuzawa M, Kusafuka T, Komoto Y, et. al. Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in neuroblastoma: association with tumor progression and clinical outcome. *J Pediatr Surg*. 1998 Aug;33(8):1272-8.
37. Denny C, Sakamoto K. Biology of Childhood Cancer In: Pizzo PA, Poplack DG eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Roven; 2011. p 78-96.

38. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, et. al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1995 Apr 15;55(8):1798-806.
39. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, et. al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature.* 2004 Aug 26;430(7003):1034-9.
40. Munchar MJ, Sharifah NA, Jamal R, Looi LM. CD44s expression correlated with the International Neuroblastoma Pathology Classification (Shimada system) for neuroblastic tumours. *Pathology.* 2003 Apr;35(2):125-9.
41. Dai Z, Li Y, Quarles L. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* 2007;14:806-14
42. Luther DJ, Ohanyan V, Shamhart PE, Hodnichak CM, et. al. Chemopreventive doses of resveratrol do not produce cardiotoxicity in a rodent model of hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs.* 2011 Apr;29(2):380-91.
43. Gurusamy N, Lekli I, Mukherjee S. Cardioprotection by Resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovascular Research* 2010;86:103-12
44. Velioğlu-Oğünç A, Sehirli O, Toklu HZ, Ozyurt H, et. al. Resveratrol protects against irradiation-induced hepatic and ileal damage via its anti-oxidative activity. *Free Radic Res.* 2009;43(11):1060-71.
45. Sönmez U, Sönmez A, Erbil G, Tekmen I, et. al. Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. *Neurosci Lett.* 2007 Jun 13;420(2):133-7. Epub 2007 May 6.
46. van Ginkel PR, Sareen D, Subramanian L, Walker Q, et. al. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(17): 5162-9.
47. Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, et. al. Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med.* 2007; 39(3): 376-84.
48. Rigolio R, Miloso M, Nicolini G, Villa D, et. al. Resveratrol interference with the cell cycle protects human neuroblastoma SH-SY5Y cell from paclitaxel-induced apoptosis. *Neurochem Int.* 2005;46(3): 205-11

49. Kenealey JD, Subramanian L, Van Ginkel PR, Darjatmoko S, et. al. Resveratrol metabolites do not elicit early pro-apoptotic mechanisms in neuroblastoma cells. *J Agric Food Chem.* 2011 May 11;59(9):4979-86.
50. Liontas A, Yeger H. Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. *Anticancer Res.* 2004 Mar-Apr;24(2B):987-98.
51. Chen Y, Tseng SH, Lai HS, Chen WJ. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery.* 2004 Jul;136(1):57-66.
52. Soto BL, Hank JA, Van De Voort TJ, Subramanian L, et. al. The anti-tumor effect of resveratrol alone or in combination with immunotherapy in a neuroblastoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 May;60(5):731-8.
53. Rahman MA, Kim NH, Kim SH, Oh SM, et. al. Antiproliferative and cytotoxic effects of resveratrol in mitochondria-mediated. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012 Oct;16(5):321-6.
54. Karmakar S, Choudhury SR, Banik NL, Ray SK. Molecular mechanisms of anti-cancer action of garlic compounds in neuroblastoma. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 May 1;11(4):398-407.
55. Cox MC, Low J, Lee J, Walshe J, et. al. Influence of garlic (*Allium sativum*) on the pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Cancer Res.* 2006;12(15):4636-40.
56. Tattelman E. Health effects of garlic. *Am Fam Physician.* 2005; 72(1):103-6.]
57. Zhang ZM, Zhong N, Gao HQ, Zhang SZ, et. al. Inducing apoptosis and upregulation of Bax and Fas ligand expression by allicin in hepatocellular carcinoma in Balb/c nude mice. *Chin Med J (Engl).* 2006;119(5):422-5.
58. Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. Garlic compounds induced calpain and intrinsic caspase cascade for apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Apoptosis.* 2007; 12(4):671-84.
59. Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.* 2003; 63(18):5940-9.
60. Siegers CP, Steffen B, R bke A, Pentz R. The effects of garlic preparations against human tumor cell proliferation. *Phytomedicine.* 1999 Mar;6(1):7-11.
61. Sundaram SG, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jan 17;1315(1):15-20.

62. Pinto JT, Rivlin RS. Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. *J Nutr.* 2001 Mar;131(3s):1058S-60S.
63. Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, Wilchek M, et. al. S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Dec 11;1499(1-2):144-153.
64. Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, et. al. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jan 15;1463(1):20-30.
65. Hirsch K, Danilenko M, Giat J, Miron T, et. al. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutr Cancer.* 2000;38(2):245-54.
66. Chu YL, Ho CT, Chung JG, Rajasekaran R, et. al. Allicin Induces p53-Mediated Autophagy in Hep G2 Human Liver Cancer Cells. *J Agric Food Chem.* 2012 Aug 15.[Epub ahead of print]
67. Cha JH, Choi YJ, Cha SH, Choi CH, et. al. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis in U87MG human glioblastoma cells through an ERK-dependent pathway. *Oncol Rep.* 2012 Jul;28(1):41-8.
68. Wang Z, Liu Z, Cao Z, Li L. Allicin induces apoptosis in EL-4 cells in vitro by activation of expression of caspase-3 and -12 and up-regulation of the ratio of Bax/Bcl-2. *Nat Prod Res.* 2012;26(11):1033-7.
69. Zhang W, Ha M, Gong Y, Xu Y, et. al. Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic and intrinsic pathways. *Oncol Rep.* 2010 Dec;24(6):1585-92.
70. Bat-Chen W, Golan T, Peri I, Ludmer Z, et. al. Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2. *Nutr Cancer.* 2010;62(7):947-57.
71. Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1930–1934.
72. Aquilano K, Vigilanza P, Filomeni G, Rotilio G, et. al. Tau dephosphorylation and microfilaments disruption are upstream events of the anti-proliferative effects of DADS in SH-SY5Y cells. *J Cell Mol Med.* 2010 Mar;14(3):564-77.
73. Miron T, Mironchik M, Mirelman D, Wilchek M, et. al. Inhibition of tumor growth by a novel approach: in situ allicin generation using targeted alliinase delivery. *Mol Cancer Ther.* 2003 Dec;2(12):1295-301.

74. Bagshawe K. D., Sharma S. K., Burke P. J., Melton R. G., et. al. Developments with targeted enzyme in cancer therapy. *Curr.Opin. Immunol.*, 1999; 11: 579–583.
75. Senter P. D. and Springer C. J. Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal antibody-enzyme conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001; 53: 247–264.
76. Rajput S, Mandal M. Antitumor promoting potential of selected phytochemicals derived from spices: a review. *Eur J Cancer Prev.* 2012 Mar;21(2):205-15.
77. Hwang TL, Lee LY, Wang CC, Liang Y, et. al. CCL7 and CCL21 overexpression in gastric cancer is associated with lymph node metastasis and poor prognosis. *World J Gastroenterol.* 2012 Mar 21;18(11):1249-56.
78. Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, et. al. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer.* 2010 Jul 15;127(2):332-44.
79. Cho YB, Lee WY, Choi SJ, Kim J, et. al. CC chemokine ligand 7 expression in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2012 Aug;28(2):689-94.
80. Lankelma JM, Voorend DM, Barwari T, Koetsveld J, et. al. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci.* 2010 Feb 13;86(7-8):225-33.
81. Katara R, Mir RA, Shukla AA, Tiwari A, et. al. Wild type p53-dependent transcriptional upregulation of cathepsin L expression is mediated by C/EBP α in human glioblastoma cells. *Biol Chem.* 2010 Sep;391(9):1031-40.
82. Yan JA, Xiao H, Ji HX, Shen WH, et. al. Cathepsin L is associated with proliferation and clinical outcome of urothelial carcinoma of the bladder. *J Int Med Res.* 2010;38(6):1913-22.
83. Zhang W, Yang HC, Wang Q, Yang ZJ, et. al. Clinical value of combined detection of serum matrix metalloproteinase-9, heparanase, and cathepsin for determining ovarian cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 2011 Oct;31(10):3423-8.
84. Sullivan S, Tosetto M, Kevans D, Coss A, et. al. Localization of nuclear cathepsin L and its association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2009 Jul 1;125(1):54-61.
85. Shindoh M, Higashino F, Kohgo T. E1AF, an ets-oncogene family transcription factor. *Cancer Lett.* 2004 Dec 8;216(1):1-8. Review.
86. Oh S, Shin S, Janknecht R. ETV1, 4 and 5: An oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Aug;1826(1):1-12.
87. Rougemont AL, Bouron-Dal Soglio D, Patey-Mariaud de Serre N, Fetni R, et. al. A t(17;22)(q21;q12) with partial ETV4 deletion in a soft tissue Ewing sarcoma. *Cancer Genet.* 2012 Jan-Feb;205(1-2):55-60.

88. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, et. al. Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Feb;15(2):115-21.
89. Taguchi K, Yoshida K, Sasaki F, Fujinaga K. Two transcription factors, EIAF and N-myc, correlate with the invasiveness of neuroblastoma cell lines. *Jpn J Cancer Res*. 1997 Apr;88(4):394-400.
90. Li N, Wang HX, Zhang J, Ye YP, et. al. KISS-1 inhibits the proliferation and invasion of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2012 Apr 21;18(15):1827-33.
91. Cho SG, Li D, Tan K, Siwko SK, et. al. KiSS1 and its G-protein-coupled receptor GPR54 in cancer development and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 Dec;31(3-4):585-91.
92. Lee J. H., Miele M. E., Hicks D. J., Phillips K. K., et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996; 88(23), 1731–1737.
93. Ohtaki T., Shintani Y., Honda S., Matsumoto H., et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2001; 411(6837), 613–617.
94. Nash K. T., Phadke P. A., Navenot J. M., Hurst D. R., et al. Requirement of KISS1 secretion for multiple organ metastasis suppression and maintenance of tumor dormancy. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007; 99(4), 309–321.
95. Lee, J. H., & Welch, D. R. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Research*, 1997; 57(12), 2384–2387.
96. Martin, T. A., Watkins, G., & Jiang, W. G. (2005). KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2005; 22(6), 503–511.
97. Marot D., Bieche I., Aumas C., Esselin S., et al. (2007). High tumoral levels of Kiss1 and G-protein-coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 14(3), 691–702.
98. Jayasena CN, Comninou AN, Januszewski A, Gabra H, et. al. Plasma kisspeptin: a potential biomarker of tumor metastasis in patients with ovarian carcinoma. *Clin Chem*. 2012 Jun;58(6):1061-3.
99. Chen Y, Yusenko MV, Kovacs G. Lack of KISS1R expression is associated with rapid progression of conventional renal cell carcinomas. *J Pathol*. 2011 Jan;223(1):46-53.

100. Zajac M, Law J, Cvetkovic DD, Pampillo M, et. al. GPR54 (KISS1R) transactivates EGFR to promote breast cancer cell invasiveness. *PLoS One*. 2011;6(6):e21599.
101. Lee SH, Ju SK, Lee TY, Huh SH, et. al. TIP30 directly binds p53 tumor suppressor protein in vitro. *Mol Cells*. 2012 Nov;34(5):495-500.
102. Zhang W, Sun HC, Wang WQ, Zhang QB, et. al. Sorafenib Down-regulates Expression of HTATIP2 to Promote Invasiveness and Metastasis of Orthotopic Hepatocellular Carcinoma Tumors in Mice. *Gastroenterology*. 2012 Dec;143(6):1641-1649.e5.
103. Poomthavorn P, Wong SH, Higgins S, Werther GA, et. al. Activation of a prometastatic gene expression program in hypoxic neuroblastoma cells. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Sep;16(3):991-1004.
104. Xue H, Lin B, Ni P, Xu H, et. al. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Oct;25(10):1604-17.
105. Kim WJ, Kim SK, Jeong P, Yun SJ, et. al. A four-gene signature predicts disease progression in muscle invasive bladder cancer. *Mol Med*. 2011 May-Jun;17(5-6):478-85.
106. Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, et. al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. *Br J Cancer*. 2012 May 22;106(11):1833-41.
107. Ewington L, Taylor A, Sriraksa R, Horimoto Y, et. al. The expression of interleukin-8 and interleukin-8 receptors in endometrial carcinoma. *Cytokine*. 2012 Aug;59(2):417-22.
108. Wang J, Shi ZQ, Xu X, Xin GZ, et. al. Triptolide Inhibits Amyloid- β Production and Protects Neural Cells by Inhibiting CXCR2 Activity. *J Alzheimers Dis*. 2013 Jan 1;33(1):217-29.
109. Han YC, Yu YP, Nelson J, Wu C, et. al. Interaction of integrin-linked kinase and miniature chromosome maintenance 7-mediating integrin {alpha}7 induced cell growth suppression. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4375-84.
110. Zhu ZH, Yu YP, Zheng ZL, Song Y, et. al. Integrin alpha 7 interacts with high temperature requirement A2 (HtrA2) to induce prostate cancer cell death. *Am J Pathol*. 2010 Sep;177(3):1176-86.
111. Rorive S, Maris C, Debeir O, Sandras F, et. al. Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Aug;65(8):794-807.

112. Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, et. al. Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer*. 2005 Jun 20;92(12):2171-80.
113. Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, et. al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(2):e31251
114. Shi WD, Meng ZQ, Chen Z, Lin JH, et. al. Identification of liver metastasis-related genes in a novel human pancreatic carcinoma cell model by microarray analysis. *Cancer Lett*. 2009 Sep 28;283(1):84-91.
115. Zhu H, Zheng J, Xiao X, Zheng S, et al. Environmental endocrine disruptors promote invasion and metastasis of SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Oncol Rep*. 2010 Jan;23(1):129-39.
116. Cheng Y, Dong Q, Sun LR, Yang CM, Jiang BX. [Correlation between expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1 and metastasis of neuroblastoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2005 Mar;27(3):164-6. Chinese. (abstract)
117. Andersson A, Olofsson T, Lindgren D, Nilsson B, et al. Molecular signatures in childhood acute leukemia and their correlations to expression patterns in normal hematopoietic subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 27;102(52):19069-74. Epub 2005 Dec 14.
118. Busch K, Borkhardt A, Wössmann W, Reiter A, Harbott J. Combined polymerase chain reaction methods to detect c-myc/IgH rearrangement in childhood Burkitt's lymphoma for minimal residual disease analysis. *Haematologica*. 2004 Jul;89(7):818-25.
119. Ryan SL, Schwalbe EC, Cole M, Lu Y, et al. MYC family amplification and clinical risk-factors interact to predict an extremely poor prognosis in childhood medulloblastoma. *Acta Neuropathol*. 2012 Apr;123(4):501-13.
120. Bunt J, Hasselt NE, Zwijnenburg DA, Koster J, et al. Joint binding of OTX2 and MYC in promoter regions is associated with high gene expression in medulloblastoma. *PLoS One*. 2011;6(10):e26058.
121. Xiong F, Wu C, Chang J, Yu D, et. al. Genetic variation in an miRNA-1827 binding site in MYCL1 alters susceptibility to small-cell lung cancer. *Cancer Res*. 2011 Aug 1;71(15):5175-81.
122. Spinola M, Falvella FS, Galvan A, Pignatiello C, et. al. Ethnic differences in frequencies of gene polymorphisms in the MYCL1 region and modulation of lung cancer patients' survival. *Lung Cancer*. 2007 Mar;55(3):271-7.

123. Kambara T, Sharp GB, Nagasaka T, Takeda M, et. al. Allelic loss of a common microsatellite marker MYCL1: a useful prognostic factor of poor outcomes in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Mar 1;10(5):1758-63.
124. Chang SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY. Loss of heterozygosity: an independent prognostic factor of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 14;11(6):778-84.
125. Medves S, Demoulin JB. Tyrosine kinase gene fusions in cancer: translating mechanisms into targeted therapies. *J Cell Mol Med.* 2012 Feb;16(2):237-48.
126. Efremov DG, Laurenti L. The Syk kinase as a therapeutic target in leukemia and lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011 May;20(5):623-36.
127. Witzig TE, Gupta M. Signal transduction inhibitor therapy for lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:265-70.
128. Uckun FM, Qazi S. Spleen tyrosine kinase as a molecular target for treatment of leukemias and lymphomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010 Sep;10(9):1407-18.
129. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1772(8):937-46.
130. Oancea E, Vriens J, Brauchi S, Jun J, et. al. TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Sci Signal.* 2009 May 12;2(70):ra21.
131. Mazar J, DeYoung K, Khaitan D, Meister E, et al. The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness. *PLoS One.* 2010 Nov 1;5(11):e13779.
132. Devi S, Kedlaya R, Maddodi N, Bhat KM, et al. Calcium homeostasis in human melanocytes: role of transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) and its regulation by ultraviolet light. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 Sep;297(3):C679-87.
133. Erickson LA, Letts GA, Shah SM, Shackelton JB, Duncan LM. TRPM1 (Melastatin-1/MLSN1) mRNA expression in Spitz nevi and nodular melanomas. *Mod Pathol.* 2009 Jul;22(7):969-76.
134. Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, Donovan M, et al. Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):568-76.
135. Fang D, Setaluri V. Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Dec 9;279(1):53-61.
136. Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, Oliveira P, et. al. Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Dec;1826(12):297-311.

137. Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ. E-cadherin's dark side: Possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Aug;1826(1):23-31.
138. Kiss NB, Kogner P, Johnsen JI, Martinsson T, et al. Quantitative global and gene-specific promoter methylation in relation to biological properties of neuroblastomas. *BMC Med Genet*. 2012 Sep 17;13:83.
139. Hoebeeck J, Michels E, Pattyn F, Combaret V, et al. Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2009 Jan 18;273(2):336-46.
140. Nam JS, Hirohashi S, Wakefield LM. Dysadherin: a new player in cancer progression. *Cancer Lett*. 2007 Oct 8;255(2):161-9. Epub 2007 Apr 17. Review.
141. Giotakis I, Chrysovergis A, Georgolios A, Giotakis E, Manolopoulos L. Adhesion molecules in cancer of the head and neck: role of dysadherin. *J BUON*. 2011 Oct-Dec;16(4):609-12.
142. Schöler Y, Lee-Thedieck C, Geiger K, Kaiser T, et al. Osteoblast-secreted factors enhance the expression of dysadherin and CCL2-dependent migration of renal carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2012 Jan 15;130(2):288-99.
143. Maehata Y, Hirahashi M, Aishima S, Kishimoto J, et al. Significance of dysadherin and E-cadherin expression in differentiated-type gastric carcinoma with submucosal invasion. *Hum Pathol*. 2011 Apr;42(4):558-67.
144. Park JR, Kim RJ, Lee YK, Kim SR, et al. Dysadherin can enhance tumorigenesis by conferring properties of stem-like cells to hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol*. 2011 Jan;54(1):122-31.
145. Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, et al. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res*. 2001 Feb 15;61(4):1314-9.
146. Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlond KB, Brognara CB, et al. Loss of caspase-8 expression in neuroblastoma is related to malignancy and resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Med Pediatr Oncol*. 2000 Dec;35(6):608-11.
147. Tong HX, Lu CW, Zhang JH, Ma L, et al. Combination of gamma-interferon with TRAIL and cisplatin or etoposide induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Chin Med Sci J*. 2007 Mar;22(1):38-43.
148. Tong HX, Lu CW, Wang QS, Ma LY. Combination of IFN γ and chemotherapeutic agents increase TRAIL sensitivity of neuroblastoma cell lines. *Eur J Pediatr Surg*. 2011 Oct;21(5):304-9.

149. Ewing GP, Goff LW. The insulin-like growth factor signaling pathway as a target for treatment of colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer*. 2010 Oct;9(4):219-23
150. Boone DN, Lee AV. Targeting the insulin-like growth factor receptor: developing biomarkers from gene expression profiling. *Crit Rev Oncog*. 2012;17(2):161-73
151. Heidegger I, Pircher A, Klocker H, Massoner P. Targeting the insulin-like growth factor network in cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2011 Apr 15;11(8):701-7.
152. Sekharam M, Zhao H, Sun M, Fang Q, et. al. Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer Res*. 2003 Nov 15;63(22):7708-16.
153. van Golen CM, Schwab TS, Ignatoski KM, Ethier SP, et. al. PTEN/MMAC1 overexpression decreases insulin-like growth factor-I-mediated protection from apoptosis in neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 371–8.
154. Liu XH, Yu EZ, Li YY, Rollwagen FM, et. al. RNA interference targeting Akt promotes apoptosis in hypoxia-exposed human neuroblastoma cells. *Brain Res* 2006; 1070: 24–30.
155. Gil-Ad I, Shtaiif B, Luria D, Karp L, et. al. Insulin-like-growth-factor-I (IGF-I) antagonizes apoptosis induced by serum deficiency and doxorubicin in neuronal cell culture. *Growth Horm IGF Res* 1999; 9: 458–64.
156. Kenchappa P. Rescue of TNF α -inhibited neuronal cells by IGF-1 involves Akt and c-Jun N-terminal kinases. *J Neurosci Res* 2004; 76: 466–74.
157. Saeki M, Maeda S, Wada K, Kamisaki Y. Insulin-like growth factor-1 protects peroxynitrite-induced cell death by preventing cytochrome c-induced caspase-3 activation. *J Cell Biochem* 2002; 84: 708–16.
158. James G. Christensena, Jon Burrowsc, Ravi Salgia, c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention, *Cancer Lett*. 2005;25:1–26.
159. Park S, Choi YL, Sung CO, An J, Seo J, et. al. High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol*. 2012 Feb;27(2):197-207.
160. Hecht M, Schulte JH, Eggert A, Wilting J, Schweigerer L. The neurotrophin receptor TrkB cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness. *Carcinogenesis*. 2005 Dec;26(12):2105-15.

161. Hecht M, Papoutsis M, Tran HD, Wilting J, Schweigerer L. Hepatocyte growth factor/c-Met signaling promotes the progression of experimental human neuroblastomas. *Cancer Res.* 2004 Sep 1;64(17):6109-18.
162. Crosswell HE, Dasgupta A, Alvarado CS, Watt T, et al. PHA665752, a small-molecule inhibitor of c-Met, inhibits hepatocyte growth factor-stimulated migration and proliferation of c-Met-positive neuroblastoma cells. *BMC Cancer.* 2009 Nov 25;9:411.
163. Liberman J, Sartelet H, Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, et. al. Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. *PLoS One.* 2012;7(8):e43665.
164. Meier R, Mühlethaler-Mottet A, Flahaut M, Coulon A, Fusco C, Louache F, et. al. The chemokine receptor CXCR4 strongly promotes neuroblastoma primary tumour and metastatic growth, but not invasion. *PLoS One.* 2007 Oct 10;2(10):e1016.
165. Airoidi I, Raffaghello L, Piovan E, Cocco C, et. al. CXCL12 does not attract CXCR4+ human metastatic neuroblastoma cells: clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2006 Jan 1;12(1):77-82.
166. Huang GL, Li BK, Zhang MY, Wei RR, et al. Allele loss and down-regulation of heparanase gene are associated with the progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(8):e44061.
167. Li AL, Song YX, Wang ZN, Gao P, et al. Polymorphisms and a haplotype in heparanase gene associations with the progression and prognosis of gastric cancer in a northern Chinese population. *PLoS One.* 2012;7(1):e30277.
168. Liu X, Fang H, Chen H, Jiang X, et al. An artificial miRNA against HPSE suppresses melanoma invasion properties, correlating with a down-regulation of chemokines and MAPK phosphorylation. *PLoS One.* 2012;7(6):e38659. doi: 10.1371/journal.pone.0038659.
169. Liu H, Chen X, Gao W, Jiang G. The expression of heparanase and microRNA-1258 in human non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2012 Oct;33(5):1327-34.

8. Ekler

8.1. Kelly (N-MYC pozitif) ve SH-SY5Y (N-MYC negatif) hücre hatlarının DSMZ (Almanya) katalog bilgileri

8.2. GADPH geni analiz sonuçları

8.3. Amplifikasyon eğrileri, Erime noktası pikleri

8.4. Etik kurul raporu

8.5. Özgeçmiş

8.6. Tezden yapılan yayınlar

8.6.1. Ince Dilek, Aktas S, Altun ZS, Cubuk C, Olgun N. Effect of phytochemicals on neuroblastoma and metastatic potential. International Society of Paediatric Oncology SIOP XXXXIII Congress. 28-30 October, 2011, Auckland, New Zeland. Pediatric Blood & Cancer, 2011; 57(5): 705-897.

8.6.2. Gunes D, Aktas S, Altun Z, Olgun N. Allicin increases metastasis related genes in neuroblastoma. International Society of Paediatric Oncology SIOP XXXXII Congress. 21-21 October, 2010, Boston, United States. Pediatric Blood & Cancer, 2010; 55(5): 775-1014.

8.6.3. Gunes D, Aktas S, Altun Z, Olgun N. Allicin increases metastasis related genes in neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research 2010 (ANR 2010); 21-24 June, 2010, Stocholm, Sweeden.

8.6.4. Güneş D, Aktaş S, Altun Z, Olgun N. Nöroblastomda allicin metastaz ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. XVI. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 18-22 Mayıs, 2010, Samsun, Türkiye.

8.7. Tezin İngilizce makale taslağı



Cell line:	KELLY
DSMZ no.:	ACC 355
Species:	human (<i>Homo sapiens</i>)
Cell type:	neuroblastoma
Origin:	established from a patient with neuroblastoma; ca. 100-fold genomic amplification of NMYC in der(17)hsr
Reference(s):	14858 , 14947
Depositor:	Dr. R. A. F. MacLeod, DSMZ, Braunschweig, Germany
Biosafety level:	1
Permissions and restrictions:	A

DSMZ Cell Culture Data:

Morphology:	adherent, round to fusiform with polar neuritic processes, growing in mono- and multilayers
Medium:	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS
Subculture:	split confluent culture 1:3 to 1:10 every 3-6 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. $2-3 \times 10^6$ cells/80 cm ²
Incubation:	at 37 °C with 5% CO ₂
Doubling time:	ca. 30-40 hours
Harvest:	cell harvest of ca. $25-30 \times 10^6$ cells/80 cm ²
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 3×10^6 cells/ampoule

DSMZ Scientific Data:

Mycoplasma:	contamination was eliminated with Baytril (enrofloxacin), then negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	cytokeratin -, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 -, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 -, desmin -, endothel -, EpCAM -, GFAP -, neurofilament +, vimentin +
Fingerprint:	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species:	confirmed as human with IEF of AST, LDH, MDH
Cytogenetics:	

human near-diploid karyotype with 20% polyploidy - 46-47<2n>X, -7, -8, +16, +22, +2mar, del(1)(p34), t(2;7)(p12;q11), add(4)(p15.3), add(5)(p15), add(9)(q34), add(10)(q24), add(11)(q24), add(14)(q32), ins(17;2)(q21;p24 hsr)x2 - del(1p34) and 2p24 hsr are typical of late-stage neuroblastoma - resembles published karyotype

Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -

Supplied as:

- Frozen culture
- Growing culture (please inquire for exact delivery time)
- Cell pellet (10-20 x 10⁶ cells)
- DNA isolated from cell line (25 µg)

see price list

[Print data sheet](#)



Cell line:	SH-SY5Y
DSMZ no.:	ACC 209
Species:	human (<i>Homo sapiens</i>)
Cell type:	neuroblastoma
Origin:	clonal subline of the neuroepithelioma cell line SK-N-SH that had been established in 1970 from the bone marrow biopsy of a 4-year-old girl with metastatic neuroblastoma
Reference(s):	14388 , 14638 , 14901
Depositor:	Dr. J. Heikkilä, University of Turku, Turku, Finland
Biosafety level:	1
Permissions and restrictions:	A

DSMZ Cell Culture Data:

Morphology:	epithelial-/neuronal-like elongated cells growing as monolayer and in cell clusters; cells do not grow to complete confluency
Medium:	80-85% Dulbecco's MEM + 15-20% h.i. FBS
Subculture:	split culture 1-2 times a week using trypsin/EDTA; seed out at ca. 1×10^6 cells/80 cm ² ; selection of neuronal-like cells may be favored by reduction of glutamin (1 mM), passaging of semi- or half-confluent cultures; short-time trypsin exposure preferentially detaches the epithelial-like cells
Incubation:	at 37 °C with 5-10% CO ₂
Doubling time:	>55 hours
Harvest:	cell harvest of about 15×10^6 cells/175 cm ²
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 2×10^6 cells/ampoule

DSMZ Scientific Data:

Mycoplasma:	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	cytokeratin -, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 -, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 -, desmin -, endothel -, GFAP -, neurofilament +, vimentin +
Fingerprint:	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species:	confirmed as human with IEF of AST, MDH

Cytogenetics:	human near-diploid karyotype with 1.8% polyploidy - 46/47(42-48)<2n>X/XX, +7, ins(1)(q32q11q43), add(9)(q34), der(22)t(?17;22)(q22;q13) - resembles published karyotype
Viruses:	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -
Supplied as:	- Frozen culture - Growing culture (please inquire for exact delivery time) - Cell pellet (10-20 x 10⁶ cells) - DNA isolated from cell line (25 µg) see price list Print data sheet



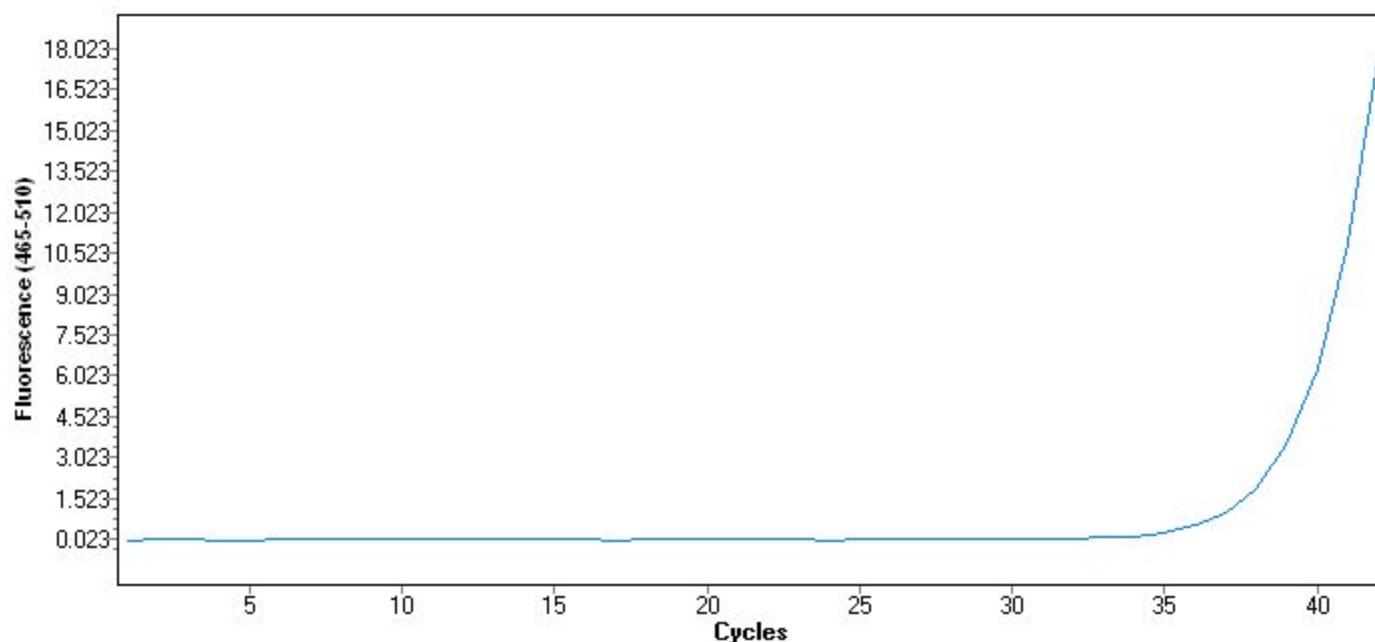
Abs Quant/2nd Derivative Max for New Subset 1 (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	kelly metastas 4	Unknown	37.00			>

Amplification Curves

-0.016	0	0.014	-0.015	-0.016	0.017	0.000	0.033	0	0.016	0.032	-0.001
0.016	0.000	0.002	0.017	-0.014	0	0.001	0.001	0.017	0.002	0.016	-0.047
0.017	-0.001	0.014	0.028	0.009	0.009	0.037	0.034	0.082	0.129	0.256	0.528
1.007	1.888	3.456	6.26	10.896	17.656						



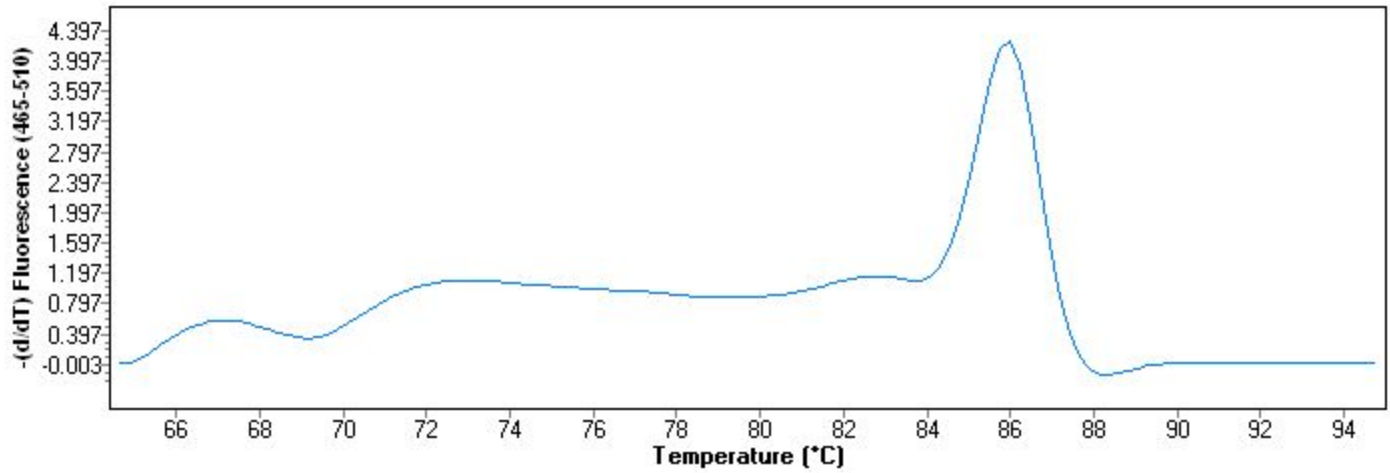
Tm Calling for New Subset 1 (Tm Calling)

Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2				Status
			Tm	Area	Width	Height	Tm	Area	Width	Height	
☒	A1	kelly metastas 4	78.84	5.72	7.57	0.76	85.90	10.13	2.55	3.97	

Melting Peaks

-	0.015	-	0.015	-	0.077	-	0.161	-	0.253	-	0.342	-	0.418	-	0.482	-	0.531	-	0.564	-	0.579	-	0.577	-	0.562
-	0.536	-	0.5	-	0.459	-	0.417	-	0.381	-	0.355	-	0.345	-	0.355	-	0.392	-	0.455	-	0.537	-	0.625	-	0.71
-	0.79	-	0.861	-	0.924	-	0.978	-	1.024	-	1.06	-	1.084	-	1.098	-	1.105	-	1.107	-	1.104	-	1.098	-	1.09
-	1.08	-	1.069	-	1.059	-	1.05	-	1.042	-	1.033	-	1.024	-	1.013	-	1.003	-	0.994	-	0.985	-	0.976	-	0.968
-	0.962	-	0.957	-	0.948	-	0.937	-	0.925	-	0.913	-	0.902	-	0.894	-	0.889	-	0.886	-	0.882	-	0.881	-	0.885
-	0.893	-	0.906	-	0.923	-	0.945	-	0.971	-	1.001	-	1.033	-	1.065	-	1.097	-	1.127	-	1.152	-	1.164	-	1.159
-	1.141	-	1.117	-	1.099	-	1.102	-	1.151	-	1.284	-	1.538	-	1.938	-	2.476	-	3.108	-	3.728	-	4.17	-	4.265
-	3.941	-	3.263	-	2.411	-	1.581	-	0.898	-	0.406	-	0.096	-	-0.07	-	-0.135	-	-0.14	-	-0.116	-	-0.083	-	-0.049
-	-0.02	-	0.002	-	0.017	-	0.025	-	0.027	-	0.026	-	0.022	-	0.019	-	0.016	-	0.014	-	0.014	-	0.013	-	0.014
-	0.015	-	0.017	-	0.018	-	0.019	-	0.019	-	0.018	-	0.015	-	0.012	-	0.009	-	0.007	-	0.007	-		-	



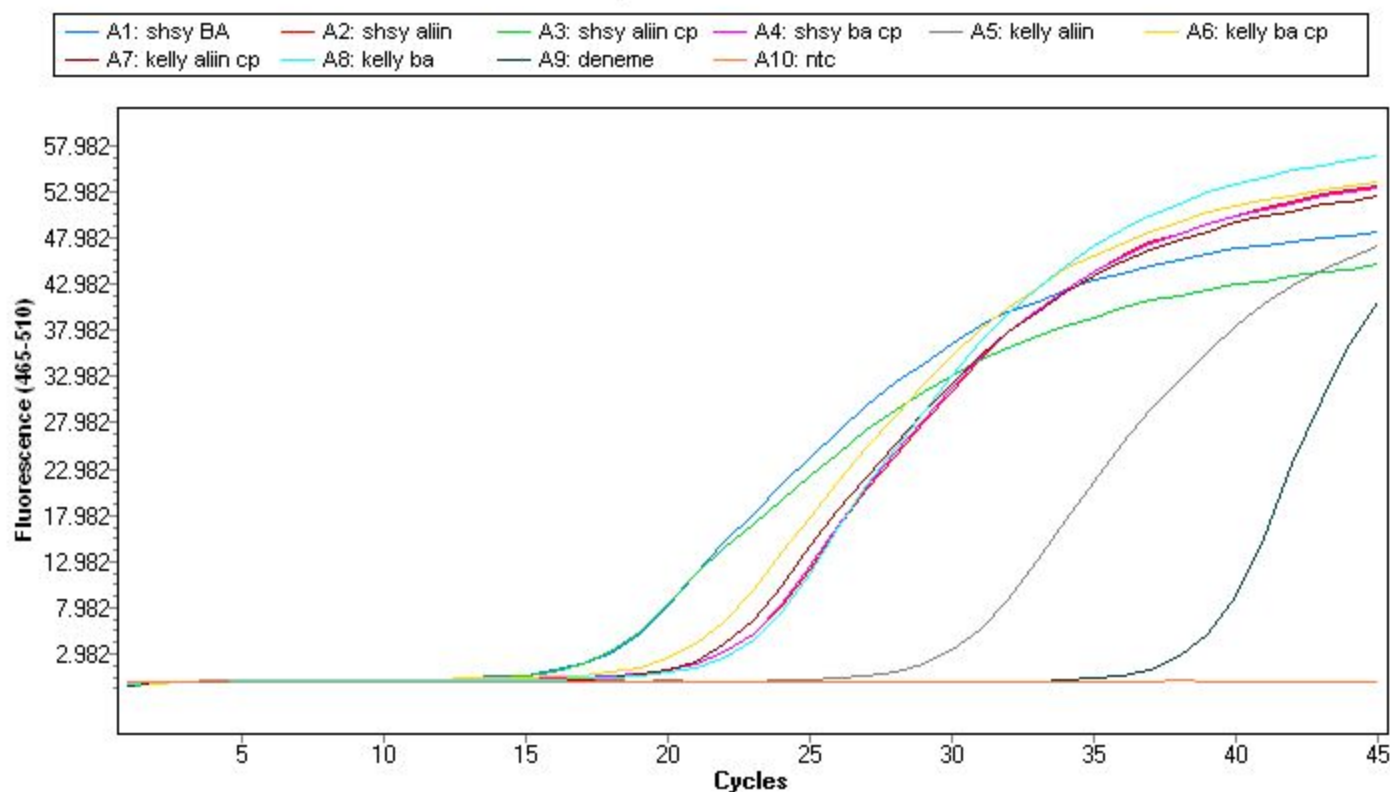


Abs Quant/2nd Derivative Max for New Subset 1 (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	shsy BA	Unknown	17.92			
☒	A2	shsy aliin	Unknown	22.35			
☒	A3	shsy aliin cp	Unknown	17.51			
☒	A4	shsy ba cp	Unknown	22.32			
☒	A5	kelly aliin	Unknown	30.24			
☒	A6	kelly ba cp	Unknown	20.86			
☒	A7	kelly aliin cp	Unknown	21.65			
☒	A8	kelly ba	Unknown	22.72			
☐	A9	deneme	Unknown				
☒	A10	ntc	Unknown				

Amplification Curves

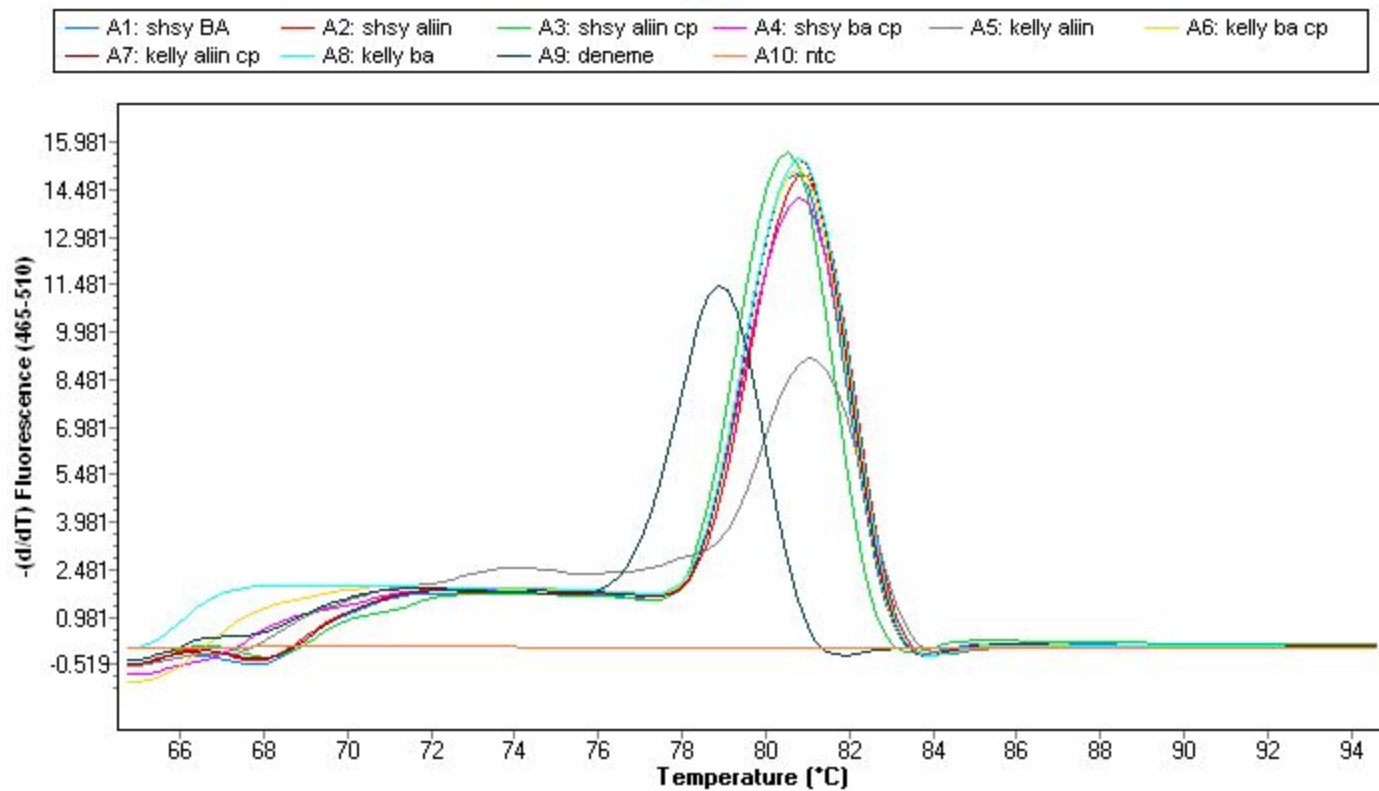


Tm Calling for New Subset 1 (Tm Calling)

Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2				Status
			Tm	Area	Width	Height	Tm	Area	Width	Height	
☒	A1	shsy BA	80.65	44.10	2.82	15.64					
☒	A2	shsy aliin	80.80	43.80	2.79	15.69					
☒	A3	shsy aliin cp	80.43	43.04	2.64	16.29					
☒	A4	shsy ba cp	80.72	42.67	2.86	14.93					
☒	A5	kelly aliin	75.06	21.80	8.60	2.54	81.02	27.12	2.83	9.59	
☒	A6	kelly ba cp	80.69	44.87	2.84	15.82					
☒	A7	kelly aliin cp	80.71	45.18	2.79	16.18					
☒	A8	kelly ba	80.85	44.20	2.73	16.20					
☒	A9	deneme	78.83	28.92	2.45	11.81					
☒	A10	ntc	73.31	0.22	6.08	0.04					

Melting Peaks



**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 07.01.2008/ 04

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus Karslı

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

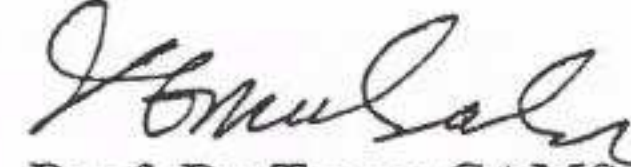
Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 03 Ocak 2008 tarih ve 04/01/2008 no.lu toplantısında; 393/2007 Protokol numaralı Onkoloji Enstitüsü Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Nur OLGUN'un proje yöneticisi, Doç.Dr.Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu, "**Fitokimyasal maddelerin Nöroblastom ve metastaz potansiyeli üzerine etkisi**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: DİLEK İNCE

TC Kimlik No / Pasaport No:	37684902054
Doğum Yılı:	1973
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Çocuk Onkoloji B.D. Mithatpaşa Caddesi No: 1606 35340 İnciraltı-İZMİR
Telefon :	02324126237
Faks :	02322789495
e-posta :	dilek.ince@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Hacettepe Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Tıp Doktorluğu	Lisans+ Yüksek Lisans	1997
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlığı	Tıpta Uzmanlık	2003
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Uzmanlığı	Yandal Uzmanlık	2012

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,	Türkiye	İzmir	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	Araştırma görevlisi	1999-2003
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,	Türkiye	İzmir	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	Uzman Doktor	2003-2004
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü & Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	Türkiye	İzmir	Klinik Onkoloji A.D. ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	Öğretim görevlisi	2006-2007
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü & Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	Türkiye	İzmir	Klinik Onkoloji A.D. ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	Yardımcı Doçent	2007-2011
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü & Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi	Türkiye	İzmir	Klinik Onkoloji A.D. ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	. Doçent	2011- ...

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Tıp Doktoru
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı
Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Uzmanı

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			1
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			0
Yayınlarla Alınan Toplam Atıf Sayısı			34
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans	-	-
	Doktora	-	-
	Uzmanlık	1	1
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	-		

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	XIII. Wheyt 2002 Araştırma Yarışması, Teşvik Ödülü [Deneyisel Çalışma Grubu]...	Wheyt	2002
	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu En İyi Sözel Bildiri Ödülü	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu	2008
	II. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu; En Başarılı 2. ÖÇM Çalışması	D.E.Ü.T.F.	2008
	Türk Kulak Burun Bogaz ve Bas Boyun Cerrahisi Vakfı "Prof. Dr. Orhan SUNAR" Poster Ödülü	Türk Kulak Burun Bogaz ve Bas Boyun Cerrahisi Vakfı	2008
	XVIII. Ulusal Kanser Kongresi Sözel Bildiri Birincilik Ödülü	Ulusal Kanser Kongresi	2009
	XVIII. Ulusal Kanser Kongresi Poster Birincilik Ödülü	Ulusal Kanser Kongresi	2009
	XVI. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi Özgün Araştırma Çalışması Ödülü / Birincilik	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu	2010
	XVI. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi En iyi Sözel Bildiri Ödülü	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu	2010
	19. Ulusal Kanser Kongresi Sözel Bildiri İkincilik	Ulusal Kanser Kongresi	2011

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1. Soylu A, Kavukçu S, **Güneş D**, Türkmen M, Gürcü O. Evaluation of the effects of vesicoureteral reflux on urine temperature. *Pediatr Nephrol.*, **18(7)**, 724-725 (2003).
2. Kavukçu S, Soylu A, Türkmen M, **Güneş D**, Bora S, Gülay H. A case of osteopoikilosis coexisting with amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol.*, **18(12)**, 1313-1314 (2003).
3. Turkmen M, Oztürk Y, Aslan N, **Gunes D**, Cakmakci H, Büyükgebiz B. Transient lymphoid hyperplasia and hypogammaglobulinemia secondary to giardiasis. *Pediatr Int.*, **46(2)**, 195-197 (2004).
4. **Gunes D**, Kavukcu S, Yilmaz O, Sarioglu S, Baskin H, Soylu A, Ormen M, Turkmen M. What is the risk of pyelonephritis due to desmopressin in rats with cystitis? *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, **28(10)**, 703-706 (2006).
5. Mutafoğlu Uysal K, Çetingöz R, **Güneş D**, Demiral A, Özer E, Çakmakçı H, Çeçen E, Sarıalioglu F, Olgun N. Clinical characteristics and therapy outcome of pediatric Hodgkin's lymphoma – a single center experience from the west part of Turkey. *Turkish Journal of Cancer*, **37(3)**, 98 – 107 (2007).
6. Cecen E, Uysal KM, Ozguven A, **Gunes D**, Irken G, Olgun N. Veno-occlusive disease in a child with rhabdomyosarcoma after conventional chemotherapy: report of a case and review of the literature. *Pediatr Hematol Oncol.*, **24(8)**, 615-621 (2007).
7. Ozbek Z, Makay B, Unsal E, Durak I, **Gunes D**, Anal O, Ozer E. Conjunctival involvement in chronic recurrent multifocal osteomyelitis. *Cornea*, **27(1)**, 117-119 (2008).
8. Cecen E, Ozguven AA, Uysal KM, **Gunes D**, Ozer E, Olgun N, Sarıalioglu F. Pilomatricoma in children: a frequently misdiagnosed superficial tumor. *Pediatr Hematol Oncol.*, **25(6)**, 522-527 (2008).
9. **Gunes D**, Uysal KM, Cecen E, Cakmakci H, Ozer E, Akgur FM, Olgun N. Stromal-predominant mesenchymal hamartoma of the liver with elevated serum alpha-fetoprotein level. *Pediatr Hematol Oncol.*, **25(7)**, 685-92 (2008).
10. Olmez D, Babayiğit A, Ateş O, Uzuner N, **Güneş D**, Karaman O, Ozer E, Akgür F. Late presentation of cystic adenomatoid malformation type 4 of lung in an asymptomatic child. *Tuberk Toraks.*, **56(4)**, 453-455 (2008).
11. **Güneş D**, Mutafoğlu-Uysal K, Canda T, Saydam S, Cemeroğlu AP, Olgun N. Unilateral juvenile (virginal) hypertrophy of the breast. *Turk J Pediatr.*, **50(3)**, 278-281 (2008).
- Güneş D**, Olgun N. Reply to “Letter to the Editor”. *Turk J Pediatr.*, **51**, 405-406 (2009).
12. **Gunes D**, Uysal KM, Cetinkaya H, Tekin HG, Yuceer N, Sarıalioglu F, Olgun N. Paravertebral malignant tumors of childhood: analysis of 28 pediatric patients. *Childs Nerv Syst.*, **25(1)**, 63-9 (2009).
13. Makay B, Unsal E, Anal O, **Güneş D**, Men S, Cakmakçı H, Ozer E. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis in a patient with selective immunoglobulin M deficiency. *Rheumatol Int.*, **29(7)**, 811-815 (2009).
14. Ozguven AA, Uysal K, **Gunes D**, Koroglu T, Gurcu O, Olgun N. Delayed renal excretion of methotrexate after a severe anaphylactic reaction to methotrexate in a child with osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.*, **31(4)**, 289-291 (2009).

15. **Güneş D**, Mutafoğlu-Uysal K, Sarialioğlu F, Cakmakçı H, Olgun N. Aneurysmal bone cyst of rib presenting as a huge chest wall mass. *Turk J Pediatr.*, **51(1)**, 82-85 (2009).
16. **Gunes D**, Kırkım G, Demiral P, Mutafoğlu Uysal K, Şerbetçioğlu B, Olgun N. Platinum-Induced Ototoxicity in Children and Adolescents with Cancer. *The Journal of International Advanced Otolaryngology*, **5(3)**, 345-355 (2009).
17. Mutafoğlu-Uysal K, **Güneş D**, Tufekci O, Kalelihan Cankal A, Sarialioglu F, Olgun N. The incidence of congenital malformations in children with cancer. *Turk J Pediatr.* **51(5)**, 444-452 (2009).
18. Tüfekçi Ö, **Gunes D**, Özoğul C, Kolatan E, Altun Z, Yılmaz O, Aktaş S, Erbayraktar Z, Kırkım G, Mutafoğlu K, Soylu A, Şerbetçioğlu B, Güneri EA, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl-L-carnitine on experimental cisplatin nephrotoxicity. (DOI: 10.1159/000240020) *Chemotherapy*, **55(6)**, 451-459 (2009)..
19. Altun Z, **Güneş D**, Aktaş S, Erbayraktar Z, Olgun N. Protective effects of acetyl-L-carnitine on cisplatin cytotoxicity and oxidative stress in neuroblastoma. (DOI : 10.1007/s11064-009-0076-8) *Neurochem Res.*, **35(3)**, 437-443 (2010).
20. Çeçen E, **Gunes D**, Mutafoğlu K, Yüceer N, Özer E. Atypical teratoid / Rhabdoid tumor in an infant conceived by in vitro fertilization. (DOI:10.1007/s00381-009-1005-5) *Childs Nerv Syst.*, **26(2)**, 263-6 (2010).
21. **Gunes D**, Çeçen RE, Özgüven AA, Kocaoğlu S, Kenan Y, Mutafoğlu Uysal K, Gül S, Olgun N. Çocukluk çağı hemanjiomları: 116 olgunun analizi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, **29(5)**, 1137 – 48 (2009).
22. Mutafoğlu Uysal K, Uzuner N, Cetingoz R, Ozguven AA, Babayigit A, Olmez D, Gunes D, Olgun N. Successful use of inhaled steroids for the management of radiation pneumonitis in an infant. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, **30(2)**, 808 – 811 (2010).
23. **İnce D**, Ölmez D, Köroğlu TF, Babayigit Hocoğlu A, Arslansoyu Çamlar S, Mutafoğlu Uysal K, Uzuner N, Olgun N. Hypersensitivity to Procarbazine and Severe RSV Pneumonia in a Child with Hodgkin's Lymphoma. *International Journal of Hematology and Oncology* 21(3), 183-187 (2011)
24. **İnce D**, Kırkım G, Kolatan E, Güneri EA, Özoğul C, Altun Z, Şerbetçioğlu B, Yılmaz O, Aktaş S, Mutafoğlu K, Tüfekçi Ö, Erbayraktar Z, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl-L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy*, 57(3), 186-194 (2011)
25. **İnce D**, Çeçen RE. İn vitro fertilizasyon ve çocukluk çağı kanserleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 31(1);206-214 (2011)
26. Cecen E, Olgun N, Mutafoğlu K, Olguner M, **İnce D**, Ozer E. Coexisting of Wilms tumor and ganglioneuroblastoma in a child. *Pediatr Hematol Oncol.* 28(7):619-21 (2011)
27. Cecen E, **İnce D**, Uysal KM, Ozer E, Cetingoz R, Ozguven AA, Cakmakci H, Sarialioglu F, Olgun N. Soft tissue sarcomas and central nervous system tumors in children with neurofibromatosis type 1. *Childs Nerv Syst.* 27(11):1885-93 (2011).
28. Cecen E, **Gunes D**, Mutafoğlu K, Sarialioglu F, Olgun N. The time to diagnosis in childhood lymphomas and other solid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2011 Sep;57(3):392-7.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan bildiriler(Proceedings)

1. Aksoylar S, Gunes D, Kansoy S, Unal E, Hazar V, Anak S, Koseoglu V, Oniz H, Tacyildiz N, Olgun N. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in patients with high-risk neuroblastoma. A report from the Turkish Pediatric Oncology Group Neuroblastoma 2003 (TPOG-NBL-2003) protocol. 6th Meeting of the EBMT Paediatric Diseases Working Party Poznan, Poland, June 02-04, 2008. *Bone Marrow Transplantation*, 42 (Suppl 2), S107 (2008).

2. Gunes D., Kavukcu S., Yilmaz O., Sarioglu S., Baskin H., Soylu A., Ormen M., Turkmen M., Ucar M. Evaluation of the effect of Desmopressin on urinary tract infections. *13th Congress of the International Pediatric Nephrology Association*, 29 August – 02 September 2004, Adelaide, Australia. *Pediatr Nephrol.*, **19 (9)**, C211 (2004).

3. Uysal K. M., Gunes D., Uzuner N., Ozguven A. A., Olmez D., Cakmakci H., Ozer E., Olgun N. Organized pneumonia mimicking pediatric chest wall tumors. *16th European Respiratory Society “ERS” Annual Congress*, September 2 – 6, 2006, Munich, Germany. *European Respiratory Journal*, **28 (Suppl 50)**, 489s (2006).

4. Mutafoğlu Uysal K, Özgüven A, Olgun N, Güneş D, Çetingöz R, Sarılioğlu F. Therapy related secondary neoplasms in pediatric oncology patients. (Publication only) *38th Annual Conference of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”*, September 18-21, 2006, Geneva, Switzerland. *Pediatr Blood Cancer.*, **47(4)**,530-531 (2006).

5. Mutafoğlu Uysal K, Güneş D, Olgun N, Çeçen E, Özgüven AA, Olguner M, Çakmakçı H, Özer E, Çetingöz R, Sarılioğlu F. Treatment results of pediatric germ cell tumors from a single institution. *39th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”*, November 1-3, 2007, Mumbai, India. *Pediatric Blood and Cancer*, **49(4)**, 471 – 472 (2007).

6. Mutafoğlu Uysal K, Güneş D, Tüfekçi Ö, Kalelihan Cankal A, Sarılioğlu F, Olgun N. The incidence of congenital malformations in children with cancer. *39th Annual Congress of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”*, November 1-3, 2007, Mumbai, India. *Pediatric Blood and Cancer*, **49(4)**, 480 (2007).

8. Gunes D, Aktas S, Altun Z, Olgun N. Allicin increases metastasis related genes in neuroblastoma. *International Society of Paediatric Oncology SIOP XXXXII Congress*. 21-21 October, 2010, Boston, United States. *Pediatric Blood & Cancer*, 2010; 55(5): 775-1014.

9. Gunes D, Aksoylar S, Büyükpamukçu M, Varan A, Hazar V, Vergin C, Sevinir B, Erbay A, Karasu G, Tanyeli A, Akıncı F, Oğuz A, Anak S, Dağdemir A, Canpolat C, Yıldız İ, Sarılioğlu F, Vural S, Güler E, Öniz H, Yarış N, Kebudi R, Çorapçıoğlu F, Büyükavcı M, Köksal Y, Ünal E, Tokuç G, Altungöz O, Özer E, Köseoğlu V, Emir S, İlhan İ, Yüksel Soyca L, Çakır B, Çetingül N, Olgun N. The Turkish Pediatric Oncology Group Neuroblastoma 2003 (TPOG-NBL-2003): Treatment results of the infants. *International Society of Paediatric Oncology SIOP XXXXII Congress*. 21-21 October, 2010, Boston, United States. *Pediatric Blood & Cancer*, 2010; 55(5): 775-1014.

10. Ince D, Aktas S, Altun ZS, Cubuk C, Olgun N. Effect of phytochemicals on neuroblastoma and metastatic potential. International Society of Paediatric Oncology SIOP XXXXIII Congress. 28-30 October, 2011, Auckland, New Zeland. Pediatric Blood & Cancer, 2011; 57(5): 705-897.

11. Örel B, Mutafoğlu K, Cilaker S, Bağrıyanık HA, Kiray M, Altun Z, Yılmaz O, Kolatan E, **İnce D,** Olgun N. The effect of resveratrol on ARA-C induced cerebellar toxicity. International Society of Paediatric Oncology SIOP XXXXIV Congress. 5-8 October, 2012, London, United Kingdom. Pediatric Blood & Cancer, 2012; 59(6): 965-1152.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

1. Güneş D, Kavukçu S. İdrar yolları epiteli renal tübül epiteli kadar yetenekli midir ? *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **11(2)**, 74-79 (2002).

2. Güneş D, Kavukçu S. Çocuklarda kan basıncı ölçümü ve hipertansiyon tanımı. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, 2004 Mart; **13(1)**, 50-56 (2004).

3. Güneş D, Uysal K.M. Yüksek doz kemoterapi ve hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulanan çocuklarda hemorajik sistit. *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, **17(2)**, 118–128 (2007).

4. Mutafoğlu-Uysal K, **Güneş D,** Uzuner N, Ölmez D, Babayiğit A, Özgüven A, Çakmakçı H, Olgun N. Organized pneumonia mimicking pediatric chest wall tumors. *Ege Tıp Dergisi*, **47(3)**, 211 – 213 (2008).

5. Güneş D, Çeçen RE, Özgüven AA, Gümüş İ, Toka A, Eroğlu ME, Aksoy S, Yazar ME. Nörofibromatozis tip 1 tanılı çocukların karakteristik özellikleri. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **9(3)**, 27–32 (2008).

6. Güneş D. Kaybedilmekte olan kanserli çocuk hastaya yaklaşım ve etik. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, **18(2)**, 117-124 (2009).

7. Kaya M, **Güneş D,** Koçak N, Mutafoğlu Uysal K, Özer E, Çakmakçı H, Kaynak S. Retinoblastoma tedavi kararındaki zorluklar. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **23(2)**, 91 – 97 (2009).

8. Güneş D, Mutafoğlu K, Çetinkaya H, Arslan H, Çakır D, Olgun N. Febrile Neutropenic Episodes in Children with Lymphoma and Malignant Solid Tumors. *J Pediatr Inf*, **4**, 1-8 (2010).

9. Güneş D. Çocukluk çağı kanserleri ve kemik ağrısı. *Türkiye Klinikleri Pediatri dergisi. J Pediatr Inf*, **19(3)**, 216-222 (2010).

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. Olgun N, **Güneş D,** Aksoylar S, Varan A, Vergin C, Ağaoğlu L, Oğuz A, Hazar V, Berrak SG, Sarılioğlu F, Çorapçıoğlu F, Kebudi R, Öñiz H, Yarış N, Dağdemir A, Yıldız İ, Çetingöl N, Mutafoğlu Uysal K, Altungöz O, Emir S, İlhan İ, Köseoğlu V, Tokuç G, Ünal E, Yüksel L, Kansoy S. The Turkish Pediatric Oncology Group Neuroblastoma 2003 (TPOG-NB-2003):Treatment Results of the Low and Intermediate Risk Groups. *40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology*, Berlin, Germany, October 2 – 6, 2008. *SIOP Abstract Book 2008*, Abstract No: O.074, Page: 38-39 (2008).

2. Olgun N, Aksoylar S, **Güneş D,** Varan A, Erbay A, Hazar V, Dağdemir A, Kebudi R, Ünal E, Çetingöl N, Canpolat C, Yıldız İ, Öñiz H, Anak S, Oğuz A, Taçyıldız N, Yarış N, Çorapçıoğlu F, İlhan İ, Sarılioğlu

F, Mutafoğlu Uysal K, Altungöz O, Köseoğlu V, Tokuç G, Betül B, Kansoy S. The Turkish Pediatric Oncology Group Neuroblastoma 2003 (TPOG-NB-2003):Treatment Results of the High Risk Group. 8th INCTR “The International Network for Cancer Treatment and Research” Meeting on Cancer in Countries with Limited Sources 2009, Antalya, Türkiye, March 22 – 24, 2009. INCTR Abstract Book, Abstract No: 5bis (2009).

3. Gunes D, Kırkım G, Kolatan E, Güneri EA, Özoğlu C, Şerbetçioğlu B, Yılmaz O, Tüfekçi Ö, Mutafoğlu K, Altun Z, Aktaş S, Erbayraktar Z, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl l-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. ANR 2010 “Advances in Neuroblastoma Research 2010”, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010.

4. Olgun N., Gunes D., Uysal K.M., Cetingoz R., Cakmakci H., Cecen E., Ozer E., Ceryan K., Sarialioglu F. Combined Therapy in Head and neck rhabdomyosarcomas of childhood. XVIII. International Federation of Oto – Rhino – Laryngological Society “IFOS” World Congress, 25 – 30 June 2005, Rome, Italy. Abstract Book, Abstract no: E9 (2005)

5. Olgun N., Uysal K.M., Gunes D., Cetingoz R., Cakmakci H., Olguner M., Ozer E., Sarialioglu F. High survival rates in rhabdomyosarcoma: A single institution’ s results. 6th INCTR “The International Network for Cancer Treatment and Research” Annual Meeting 2005, December 10th – 13th, 2005, Chennai, India. Abstract Book, Abstract No: 34 (2005).

6. Olgun N, Güneş D, Aksoylar S, Varan A, Erbay A, Hazar V, Dağdemir A, Kebudi R, Ünal E, Çetingül N, Canpolat C, Yıldız İ, Öniz H, Anak S, Oğuz A, Taçyıldız N, Yarış N, Çorapçioğlu F, İlhan İ, Sarialioğlu F, Mutafoğlu Uysal K, Altungöz O, Köseoğlu V, Tokuç G, Betül B, Kansoy S. The Turkish Pediatric Oncology Group Neuroblastoma 2003 (TPOG-NB-2003):Treatment Results of the High Risk Group. 40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”, October 2–6, 2008, Berlin, Germany. SIOP Abstract Book 2008, Poster no: D110, Page 140 (2008).

7. Gunes D, Mutafoğlu Uysal K, Cetinkaya H, Gazeteci Tekin H, Yuceer N, Sarialioglu F, Olgun N. Paravertebral malignant tumors of childhood: Analysis of 28 pediatric patients. 40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”, October 2–6, 2008, Berlin, Germany. SIOP Abstract Book 2008, Poster no: D132, Page 145 (2008).

8. Gunes D, Mutafoğlu Uysal K, Cetinkaya H, Arslan H, Cakir D, Olgun N. Febrile neutropenic episodes in children with cancer. 40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”, October 2–6, 2008, Berlin, Germany. SIOP Abstract Book 2008, Poster no: J034, Page 183 (2008).

9. Gunes D, Mutafoğlu Uysal K, Bora Makay B, Babayigit A, Olmez D, Yis U, Tufekci O, Olgun N. Non-Hodgkin lymphoma on the basis of primary and acquired immunodeficiencies. (Publication only) 40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”, October 2–6, 2008, Berlin, Germany. SIOP Abstract Book 2008, Poster no: 038, Page 238 (2008).

10. Güneş D, Mutafoğlu K, Özgüven A, Çeçen E, Çakmakçı, H, Sarialioğlu F, Olgun N. Clinical Characteristics and tumors in children and adolescents with neurofibromatosis type 1. 8th INCTR “The

International Network for Cancer Treatment and Research” Meeting on Cancer in Countries with Limited Sources 2009, Antalya, Türkiye, March 22 – 24, 2009. INCTR Abstract Book, Abstract No: 37 (2009).

11. Mutafoğlu K, Güneş D, Kır M, Çetinkaya H, Ünal N, Salyam G, Olgun N. Treatment related cardiotoxicity in children and adolescents with cancer^{8th} *INCTR “The International Network for Cancer Treatment and Research” Meeting on Cancer in Countries with Limited Sources 2009, Antalya, Türkiye, March 22 – 24, 2009. INCTR Abstract Book, Abstract No: 81 (2009)*

12. Mutafoğlu K, Güneş D, Arslansoyu Çamlar S, Çetingöz R, Kaynak S, Sarılioğlu F, Olgun N. Retinoblastoma: Experience from a single center in Turkey. ^{8th} *INCTR “The International Network for Cancer Treatment and Research” Meeting on Cancer in Countries with Limited Sources 2009, Antalya, Türkiye, March 22 – 24, 2009. INCTR Abstract Book, Abstract No: 81bis (2009).*

13. Gunes D, Kırkım G, Demiral P, Mutafoğlu Uysal K, Şerbetçioğlu B, Olgun N. *Platinum induced ototoxicity in children and adolescent with cancer. 41st Congress of the International Society of Paediatric Oncology “SIOP”, October 5–9, 2009, Sao Paulo, Brazil. SIOP Abstract Book 2009, Poster no: PQ.010, Page:855 (2009).*

14. Altun Z, Aktaş S, Gunes D, Olgun N. Betulinic acid affects metastasis related genes in neuroblastoma cells. *ANR 2010 “Advances in Neuroblastoma Research 2010”, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010.*

15. Gunes D, Aktaş S, Altun Z, Olgun N. Alicin increases metastasis related genes in neuroblastoma. *ANR 2010 “Advances in Neuroblastoma Research 2010”, Stockholm, Sweden, June 21-24, 2010.*

16. Güneş D, Kavukçu S, Yılmaz O, Sarıoğlu S, Baskın H, Soylu A, Örmən M, Türkmen M, Uçar M. Desmopressin’in İdrar Yolu Enfeksiyonları Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi. *Çocuklarda İdrar Kaçırma Enürezis ve İnkontinens Sempozyumu, 19 Aralık 2003, Crowne Plaza, İnciraltı, İzmir. Sempozyum kitabı (2003).*

17. Olgun N., Güneş D., Aksoylar S., Kansoy S., Uysal K.M., Ataman Ö.U. Hazırlama Kurulu Adına: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Nöroblastoma 2003 (TPOG NBL 2003) Tedavi Protokolü İlk Verileri. *XVI. Ulusal Kanser Kongresi, 20 – 24 Nisan 2005, Antalya. Program ve Bildiri Özeti Kitabı, Bildiri no: 378, Sayfa: 144-145 (2005).*

18. Olgun N., Güneş D., Aksoylar S., Kansoy S., Uysal K.M., Ataman Ö.U. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastoma 2003 Tedavi Protokolü İkinci Ara Değerlendirme Verileri. TPOG ve “TPOG NBL 2003” Hazırlama Kurulu Adına. *XIV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 18 – 20 Mayıs, 2006, İstanbul. Program ve Bildiri Kitabı, Bildiri no: S1, Sayfa: 172 (2006).*

19. Olgun N, Güneş D, Aksoylar S, Varan A, Vergin C, Ağaoğlu L, Oğuz A, Hazar V, Berrak SG, Sarılioğlu F, Çorapçıoğlu F, Kebudi R, Öniz H, Yarış N, Dağdemir A, Yıldız İ, Çetingül N, Mutafoğlu Uysal K, Altungöz O, Emir S, İlhan İ, Köseoğlu V, Tokuç G, Ünal E, Yüksel L, Kansoy S. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastoma 2003 Tedavi Protokolü Düşük ve Orta Risk Grubu Tedavi Sonuçları. *XV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 21 – 24 Mayıs , 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: S-16, Sayfa: 206-207 (2008).*

20. Olgun N, **Güneş D**, Aksoylar S, Varan A, Erbay A, Hazar V, Dağdemir A, Kebudi R, Ünal E, Çetingül N, Canpolat C, Yıldız İ, Öniz H, Anak S, Oğuz A, Taçyıldız N, Yarış N, Çorapçioğlu F, İlhan İ, Sarılioğlu F, Mutafoğlu Uysal K, Altungöz O, Köseoğlu V, Tokuç G, Betül B, Kansoy S. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastoma 2003 Tedavi Protokolü Yüksek Risk Grubu Tedavi Sonuçları. XV. *TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 21 – 24 Mayıs , 2008, Çeşme, İzmir. *Kongre Kitabı*, Bildiri no: S-17, Sayfa: 207-208 (2008).
21. Altun Z, **Güneş D**, Aktaş S, Erbayraktar Z, Sönmez A, Olgun N. L-Karnitin nöroblastomda sisplatinin hücre sitotoksitesitesi üzerine etkili midir ? XV. *TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 21 – 24 Mayıs , 2008, Çeşme, İzmir. *Kongre Kitabı*, Bildiri no: S-26, Sayfa: 214 (2008).
22. Kırkım G, Şerbetçioğlu B, **Güneş D**, Mungan S, Olgun N. Pediatrik onkoloji hastalarında sisplatin/karboplatine bağlı ototoksitesitenin farklı kriterlere göre değerlendirilmesi. IV. *Ulusal Odyoloji ve Konuşma Bozuklukları Kongresi*, 16 – 18 Ekim 2008, Samsun. *Kongre kitabı* (2008).
23. Olgun N, **Güneş D**, Aksoylar S, Varan A, Vergin C, Hazar V, Akıncı F, Vural S, Sevinir B, Güler E, Kebudi R, Kansoy S, Dağdemir A, Yarış N, Büyükavcı M, Ünal E, Yıldız İ, Çetingül N, Demirağ B, Canpolat C, Öniz H, Oğuz A, Anak S, Mutafoğlu K, Sarılioğlu F, Çorapçioğlu F, İlhan İ, Tokuç G, Emir S, Köksal Y, Köseoğlu V, Altungöz O, Özer E, Tunçyürek M, Demiral A, Anacak Y, Özgüven A, Çeçen E, Biner B. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Nöroblastoma 2003 (TPOG NBL-2003) Protokolü: Yüksek Risk Grubu Tedavi Sonuçları. XVIII. *Ulusal Kanser Kongresi*, 21-26 Nisan 2009, Antalya. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Bildiri no: S06, Sayfa:3 (2009)
24. **Güneş D**, Mutafoğlu K, Özgüven A, Çeçen E, Çakmakçı H, Sarılioğlu F, Olgun N. Nörofibromatozis tip 1 tanılı çocuk ve adölesanların klinik karakteristikleri ve gelişen tümörler. XVIII. *Ulusal Kanser Kongresi*, 21-26 Nisan 2009, Antalya. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Bildiri no: S27, Sayfa:11 (2009)
25. Mutafoğlu K, **Güneş D**, Söz Örel B, Çetingöz R, Özer E, Çakmakçı H, Olguner M, Sarılioğlu F, Olgun N. Dokuz Eylül Üniversitesi Non-Hodgkin lenfoma tedavi sonuçları. XVIII. *Ulusal Kanser Kongresi*, 21-26 Nisan 2009, Antalya. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Sayfa:31 (2009).
26. **Güneş D**, Kırkım G, Kolatan E, Güneri EA, Özoğul C, Şerbetçioğlu B, Yılmaz O, Tüfekçi Ö, Mutafoğlu K, Altun Z, Aktaş S, Erbayraktar Z, Olgun N. Asetil-L-karnitinin sisplatin ototoksitesitesi ve nörotoksitesitesi üzerine etkileri. XVI. *TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 18-22 Mayıs 2010, Samsun. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Sayfa 123 (2010).
27. Altun Z, Aktaş S, **Güneş D**, Olgun N. Betulinik asit nöroblastom hücrelerinde metastaz ilişkili genleri etkiler. XVI. *TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 18-22 Mayıs 2010, Samsun. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Sayfa 123-124 (2010).
28. **Güneş D**, Aktaş S, Altun Z, Olgun N. Nöroblastomda Alicin metastaz ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. XVI. *TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 18-22 Mayıs 2010, Samsun. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Sayfa 124 (2010).
29. Bağcı Ö, Tümer S, **Güneş D**, Olgun N, Altungöz O. Sporadik nöroblastomda 2p23.2 – 2p24.3 kromozom bölgesindeki segmental dengesizliklerle ALK geni değişiklikleri arasındaki ilişki. XVI. *TPOG*

Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 18-22 Mayıs 2010, Samsun. Program ve Bildiri Özet Kitabı, Sayfa 126 (2010).

30. **Güneş D**, Aksoylar S, Büyükpamukçu M, Varan A, Hazar V, Vergin C, Sevinir B, Erbay A, Karasu G, Tanyeli A, Akıncı F, Oğuz A, Anak S, Dağdemir A, Canpolat C, Yıldız İ, Sarılioğlu F, Vural S, Güler E, Öniz H, Yarış N, Kebudi R, Çorapçıoğlu F, Büyükavcı M, Köksal Y, Ünal E, Tokuç G, Altungöz O, Özer E, Köseoğlu V, Emir S, İlhan İ, Yüksel Soycan L, Çakır B, Çetingül N, Olgun N. TPOG-NB-2003 infant tedavi sonuçları. XVI. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 18-22 Mayıs 2010, Samsun. Program ve Bildiri Özet Kitabı, Sayfa 126-127 (2010).

31. **Çakır D**, **Güneş D**, Aktaş S, Altun Z, Kolatan E, Yılmaz O, Mutafoğlu K, Olgun N. Asetil-L-karnitinin sisplatine bağlı miyelosupresif etkiyi değiştirici rolü (*İn vivo* sıçan modeli). XVI. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 18-22 Mayıs 2010, Samsun. Program ve Bildiri Özet Kitabı, Sayfa 135 (2010).

32. Türkmen M, Öztürk Y, **Güneş D**, Aslan N, Küpelioglu A, Büyükgebiz B. Lenfoma izlenimi veren giardiasis olgusu. 45. Milli Pediatri Kongresi, 30 Eylül – 05 Ekim, 2001, Erzurum. Özet Kitabı, Bildiri no: P127, Sayfa:64 (2001).

33. Kavukçu S, Soylu A, **Güneş D**, Türkmen M, Kumral A. Hipernatremik dehidratasyon tedavisinde uygulanan parenteral sıvılardaki sodyum konsantrasyonları ile serum sodyum konsantrasyonlarındaki değişim arasındaki ilişki. 46. Milli Pediatri Kongresi, 15 – 19 Ekim, 2002, Mersin. Bilimsel Program ve Özet Kitabı, Bildiri no: PB250, Sayfa 267 (2002).

34. Soylu A, Kavukçu S, **Güneş D**, Türkmen M, Gürcü Ö. Vezikoüreteral reflünün idrar sıcaklığı üzerindeki etkisinin incelenmesi. V. Ulusal Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Kongresi, 21-25 Mayıs 2003, Antalya. Kongre Kitabı, Bildiri no: P021, Sayfa: 81 (2003).

35. **Güneş D**, Sarılioğlu F, Çakmakçı H, Büyükpamukçu N, Göğüş S, Olgun N. Dördüncü kostadan köken alan anevrizmal kemik kisti. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma, 18 – 22 Mayıs 2004, Kapadokya. Bildiri ve Program Kitabı, Bildiri no: P52, Sayfa: 170 (2004).

36. **Güneş D**, Kavukçu S, Yılmaz O, Sarıoğlu S, Baskın H, Soylu A, Öner M, Türkmen M, Uçar M. Desmopressin'in İdrar Yolu Enfeksiyonları Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi. 21. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi, 10 – 14 Eylül 2004, Antalya. Bildiri Özet Kitabı, Bildiri no: PS/DN-219, Sayfa: 104 (2004).

37. Erdağ T, İkiz AÖ, Ecevit C, Güneri EA, Akman F, Sarıoğlu S, Doğan E, Özer S, Güneş D, Mutafoğlu Uysal K, Güneri A, Ceryan K. Pediatrik malign baş boyun tümörleri ve tedavi sonuçlarımız. Baş Boyun Kanserlerinde Multi Disipliner Yaklaşım Kongresi. Eylül, 2004, Çeşme. (Poster)

38. Olgun N, Çeçen E, Uysal KM, **Güneş D**, Özgüven AA, Çakmakçı H, Sarılioğlu F. Nörofibromatozis Tip 1 (NF 1)' de kraniyal MRG bulguları NF 1 tanısı için yeni bir kriter olabilir mi? XVI. Ulusal Kanser Kongresi, 20 – 24 Nisan 2005, Antalya. Program ve Bildiri Özet Kitabı, Bildiri no: 782, Sayfa: 153 (2005).

39. Uysal KM, Özgüven AA, Çeçen E, **Güneş D**, Akyol H, Olgun N, Sarılioğlu F. Yüksek doz (12g/m²) metotreksat uygulanan osteosarkomlu olgularda gecikmiş MTX eliminasyonu ve hepatotoksisite. XVI. Ulusal Kanser Kongresi, 20 – 24 Nisan 2005, Antalya. Program ve Bildiri Özet Kitabı, Bildiri no: 797, Sayfa: 153 (2005).

- 40.** Olgun N, **Güneş D**, Uysal KM, Çetingöz R, Çakmakçı H, Olguner M, Özer E, Sarılioğlu F. Rabdomiyosarkom tedavisinde Dokuz Eylül Deneyimi. *XVI. Ulusal Kanser Kongresi*, 20 – 24 Nisan 2005, Antalya. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Bildiri no: 170, Sayfa: 155 (2005).
- 41.** Makay B, Ünsal E, Özbek Z, Durak İ, **Güneş D**. Kronik Rekürren Multifokal Osteomiyelitte Göz Tutuluşu: İnflamasyonun Yeni Bir Bulgusu mu? *II. Ulusal Romatizmal Hastalıklar Kongresi*, 26 – 30 Nisan 2006, Antalya. *Kongre Kitabı* (2006).
- 42.** Uysal KM, **Güneş D**, Uzuner N, Özgüven AA, Ölmez D, Çakmakçı H, Özer E, Olgun N. Çocukluk Çağının Göğüs Ön Duvarı Tümörlerini Taklit Eden Organize Pnömoni. *XIV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 18 – 20 Mayıs, 2006, İstanbul. *Program ve Bildiri Kitabı*, Bildiri no: P-37, Sayfa: 196 (2006).
- 43.** Mutafoğlu Uysal K, Özgüven AA, Olgun N, **Güneş D**, Çetingöz R, Sarılioğlu F. Pediatrik Onkoloji Hastalarında Tedaviye İkincil Neoplazmlar. *XIV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 18 – 20 Mayıs, 2006, İstanbul. *Program ve Bildiri Kitabı*, Bildiri no: P-41, Sayfa: 197 (2006).
- 44.** Yılmaz Ş, Ören H, İrken G, Mutafoğlu Uysal K, **Güneş D**, Demircioğlu F, Olgun N. Evre IVSB Hodgkin lenfomalı hastada kemoterapi ve otolog kök hücre nakli sonrası gelişen ikincil AML. *4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi*, 1 – 4 Mart, 2007, Bursa. *Bildiri Kitabı*, Bildiri no: 55, Sayfa: 25 (2007)
- 45.** **Güneş D**, Mutafoğlu Uysal K, Çeçen E, Yılmaz Ş, Özgüven AA, Ören H, Olguner M, Sarılioğlu F, İrken G, Olgun N. Yüksek doz kemoterapi ve otolog kök hücre transplantasyonu sonrası hemorajik sistit: Bir olgu sunumu. *XVII. Ulusal Kanser Kongresi*, 19 – 23 Nisan, 2007, Antalya. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Bildiri no: 480, Sayfa: 156 (2007).
- 46.** Mutafoğlu Uysal K, **Güneş D**, Olgun N, Çeçen E, Özgüven AA, Olguner M, Çakmakçı H, Özer E, Çetingöz R, Sarılioğlu F. Dokuz Eylül Üniversitesi pediatrik onkoloji grubunca izlenen germ hücreli tümörler. *XVII. Ulusal Kanser Kongresi*, 19 – 23 Nisan, 2007, Antalya. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Bildiri no: 481, Sayfa: 157 (2007).
- 47.** Çeçen E, Mutafoğlu Uysal K, Özgüven AA, **Güneş D**, İrken G, Olgun N. Konvansiyonel kemoterapi sonrası gelişen hepatik venooklüziv hastalık. *XVII. Ulusal Kanser Kongresi*, 19 – 23 Nisan, 2007, Antalya. *Program ve Bildiri Özet Kitabı*, Bildiri no: 482, Sayfa: 157 (2007).
- 48.** Ölmez D, Babayiğit Hocaoglu A, Ateş O, Uzuner N, **Güneş D**, Karaman Ö, Özer E, Akgür F. Asemptomatik bir çocukta akciğerin geç prezentasyonlu tip 4 kistik adenomatoid malformasyonu. *V. Ulusal Çocuk Solunum yolu Hastalıkları Kongresi*, 4 – 6 Mayıs.2008, Adana. *Poster ve Bildiri Özetleri Kitabı*, Bildiri no: P-23 (2008).
- 49.** Çeçen E, **Güneş D**, Mutafoğlu Uysal K, Özer E, Yüceer N. Beyinde atipik teratoid/rabdoid tümör: İn vitro fertilizasyon ile ilişkili midir ? *XV. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. *Kongre Kitabı*, Bildiri no: P-028, Sayfa: 245-246 (2008).
- 50.** **Güneş D**, Kırkım G, Demiral P, Mutafoğlu Uysal K, Şerbetçioğlu B, Olgun N. Çocuk onkoloji hastalarında sisplatin ve karboplatin ototoksitesinin değerlendirilmesi. *XV. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. *Kongre Kitabı*, Bildiri no: P-035, Sayfa: 250-251 (2008).
- 51.** **Güneş D**, Uysal K, Çetinkaya H, Gazeteci Tekin H, Yüceer N, Sarılioğlu F, Olgun N. Çocukluk çağı paravertebral maliyn tümörleri: 28 hastanın analizi. *XV. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal*

Pediatric Cancer Congress, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: P-040, Sayfa: 255 (2008).

52. Güneş D, Uysal K, Çetinkaya H, Arslan H, Çakır D, Olgun N. Lenfoma ve maliyn solid tümör tanımlı çocuklarda gelişen febril nötroopenik ataklar. *XV. Türk Pediatric Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatric Cancer Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: P-064, Sayfa: 272-273 (2008).

53. Güneş D, Mutafoğlu Uysal K, Makay B, Babayiğit Hocaoglu A, Ölmez D, Yiş U, Tüfekçi Ö, Olgun N. Primer ve kazanılmış immün yetmezlik zemininde gelişen Non-Hodgkin lenfoma. *XV. Türk Pediatric Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatric Cancer Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: P-082, Sayfa: 284-285 (2008).

54. Güneş D, Erdağ T, Akman F, Uysal K, Özer E, Altungöz O, Olgun N. Çocukluk çağı larinks skuamoz hücreli karsinomu: Olgu sunumu. *XV. Türk Pediatric Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatric Cancer Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: P-084, Sayfa: 285-286 (2008).

55. Çeçen E, Olgun N, Mutafoğlu Uysal K, Olguner M, **Güneş D**, Özer E. Çocukluk çağında eş zamanlı Wilms tümörü ve ganglionöroblastom. *XV. Türk Pediatric Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatric Cancer Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: P-092, Sayfa: 292 (2008).

56. Güneş D, Ölmez D, Köroğlu T, Babayiğit Hocaoglu A, Arslansoyu Çamlar S, Mutafoğlu Uysal K, Olgun N. Prokarbazin hipersensitivitesi ilişkili solunum yetmezliği: Bir olgu sunumu. *XV. Türk Pediatric Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatric Cancer Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: P-108, Sayfa: 302-303 (2008).

57. Güneş D, Mutafoğlu Uysal K, Makay B, Özden Ö, Havitçioğlu H, Özer E, Olgun N. Osteosarkom ayırıcı tanısında kronik osteomyelit: Olgu sunumu. *XV. Türk Pediatric Onkoloji Grubu “TPOG” Ulusal Pediatric Cancer Kongresi*, 21 – 25 Mayıs, 2008, Çeşme, İzmir. Kongre Kitabı, Bildiri no: P-121, Sayfa: 312-313 (2008).

58. Akarsu S, **Güneş D**, Fetil E, Mutafoğlu K, Güneş A. Eruptif melanositik nevus ve Langerhans hücreli histiyositoz birlikteliği. 3. Ulusal Pediatric Dermatoloji Günleri, 04 – 08 Haziran 2008, Trabzon. (Poster)

59. Kırkım G, Şerbetçioğlu B, **Güneş D**, Güneri A, Kolatan E, Yılmaz O, Olgun N. Ratlarda sisplatin ototoksitesinin objektif radyolojik testlerle değerlendirilmesi. *30. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi*, 8 – 12 Ekim 2008, Antalya. Program Kitabı (2008).

60. Olgun N, **Güneş D**, Aksoylar S, Varan A, Sevinir B, Erbay A, Oguz A, Hazar V, Agaoglu L, Vural S, Yaris N, Kansoy S, Sarialioglu F, Berrak SG, Mutafoğlu K, Tuğcu D, Kebudi R, Oniz H, Corapcioglu F, Cetingul N, Dagdemir A, Yildiz I, Güler E, Köksal Y, Tokuc G, Emir S, Taçyıldız N, İlhan I, Altungöz O, Özer E, Tunçyürek M, Çevik A, Olguner M, Karaca İ, Koseoglu V, Yuksel Soykan L, Büyükavcı M, Çeçen E, Özgüven A. Türk Pediatric Onkoloji Grubu Nöroblastoma 2003 (TPOG NB 2003) Tedavi Protokolü Düşük ve Orta Risk Grubu Tedavi Sonuçları. *XVIII. Ulusal Cancer Kongresi*, 21 – 26 Nisan, 2009, Antalya. Program ve Bildiri Özet Kitabı, Bildiri no: P-312, Sayfa: 160-161 (2009).

61. Güneş D, Aksoylar S, Varan A, Hazar V, Vergin C, Anak S, Büyükavcı M, Güler E, Kebudi R, Oğuz A, Öniz H, Olgun N, Sevinir B, Tokuç G, Ünal E, Yarış N, Demirağ B. Türk Pediatric Onkoloji Grubu Nöroblastoma 2003 (TPOG NB 2003) protokolünde santral sinir sistemi hastalığı. *XVIII. Ulusal Cancer*

<i>Kongresi</i> , 21 – 26 Nisan, 2009, Antalya. <i>Program ve Bildiri Özet Kitabı</i> , Bildiri no: P-313, Sayfa: 161 (2009).
62. Altınsoy C, Çakır D, Güneş D , Kurul S, Erdağ T, Berk T, Çakmakçı H, Mutafoğlu K, Olgun N. PACHES Sendromu. 53. <i>Türkiye Milli Pediatri Kongresi</i> , 21-25 Ekim, 2009, Muğla. <i>Kongre CD</i> , Bildiri no: P-270, e-poster (2009).
63. Çağan Y, Güneş D, Olguner M, Çakmakçı H, Özer E, Mutafoğlu K, Olgun N. Çocukluk Çağının Nadir Tümörü: İnflamatuvar Myofibroblastik Tümör. 53. <i>Türkiye Milli Pediatri Kongresi</i> , 21-25 Ekim, 2009, Muğla. <i>Kongre CD</i> , Bildiri no: P-272, e-poster (2009).
64. Güneş D , Çeçen E, Özgüven A, Özkan B, Özer S, Olguner M, Özer E, Çakmakçı H, Mutafoğlu K, Olgun N. Çocukluk çağı enfeksiyöz lenfadenopatileri. 53. <i>Türkiye Milli Pediatri Kongresi</i> , 21-25 Ekim, 2009, Muğla. <i>Kongre CD</i> , Bildiri no: P-273, e-poster (2009).
65. Gençpınar P, Güneş D, Erdağ T, Çakmakçı H, Özer E, Mutafoğlu K, Olgun N. Nörofibromatozis tip 2 ve Pilomatrikoma Tanısı Alan Çocuk Olgu Sunumu. 53. <i>Türkiye Milli Pediatri Kongresi</i> , 21-25 Ekim, 2009, Muğla. <i>Kongre CD</i> , Bildiri no: P-274, e-poster (2009).
66. Mutafoğlu K, <u>Aktaş S</u> , Çakır D, Çelik A, Güneş D , Altun Z, Yılmaz O, Olgun N. Asetil-L-karnitin sisplatine bağlı kornea toksisitesini önüyor mu? Santral sinir sistemi ve testisler nöroblastom için sığınak bölgeler midir? XVI. <i>TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi</i> , 18-22 Mayıs 2010, Samsun. <i>Program ve Bildiri Özet Kitabı</i> , Sayfa: 165 (2010).
67. <u>Mutafoğlu K</u> , Güneş D , Çakmakçı H, Olguner M, Özer E, Çakır D, Olgun N. İnfant adrenal kitlelerinde “Bekle & Gör” yaklaşımı. XVI. <i>TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi</i> , 18-22 Mayıs 2010, Samsun. <i>Program ve Bildiri Özet Kitabı</i> , Sayfa: 166 (2010).
68. <u>Kebudi R</u> , Güneş D , Olgun N. Santral sinir sistemi ve testisler nöroblastom için sığınak bölgeler midir? XVI. <i>TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi</i> , 18-22 Mayıs 2010, Samsun. <i>Program ve Bildiri Özet Kitabı</i> , Sayfa: 166 – 167 (2010).
69. <u>Mutafoğlu K</u> , Güneş D , Kaynak S, Çetingöz R, Özer E, Günenç Ü, Saatçi O, Sarılioğlu F, Olgun N. Dokuz Eylül Üniversitesi retinoblastom tedavisi sonuçları. XVI. <i>TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi</i> , 18-22 Mayıs 2010, Samsun. <i>Program ve Bildiri Özet Kitabı</i> Sayfa: 176 – 177 (2010).
70. <u>Çeçen E</u> , Güneş D , Mutafoğlu K, Sarılioğlu F, Olgun N. Çocukluk çağı kanserlerinde tanı süresi. XVI. <i>TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi</i> , 18-22 Mayıs 2010, Samsun. <i>Program ve Bildiri Özet Kitabı</i> Sayfa: 185 – 186 (2010).

43rd CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF PAEDIATRIC ONCOLOGY (SIOP) 2011 AUCKLAND, NEW ZEALAND, 28th–30th OCTOBER, 2011 SIOP ABSTRACTS

801 abstracts were received in March 2010 and were evaluated by the SIOP scientific committee. The accepted abstracts are printed here in order of:

- 174 Oral presentations (O + number), this includes Nurses sessions (N + number), Radiation Oncology Free Paper sessions (RO + number) and all Free Paper sessions (FP + number).
- 26 IPSO Oral presentations (IPSO + number)
- 15 ICCCPPO Oral presentations (ICCCPO + number)
- 451 Poster presentations (P+ letter discipline + number)
- 71 Publication only (Pub + number)

There are no Symposia lectures, Guest lectures or IPSO Symposia lectures. The IPSO abstracts are all included in the IPSO sessions of the programme.

ABSTRACT CONTENTS:

Oral presentations (O + number)

O001	O004	FP 1	Acute Leukemia 1
O005	O006	FP 2	Medulloblastoma
O009	O012	FP 3	Late Effects 1
O013	O017	FP 4	Ewing's Sarcoma
O018	O023	FP 5	Glioma/Spinal Tumors
O024	O029	FP 6	Late Effects 2
O030	O035	N 1	Planning Care: Perspectives of Parents, Patients and Professionals
O036	O041	FP 7	Osteosarcoma
O042	O047	FP 8	New Drugs and Experimental Therapeutics
O048	O053	FP 9	Psychosocial 1
O054	O059	RO 1	CNS/Ewing's Sarcoma
O060	O065	N 2	International and Multicultural Collaboration in Paediatric Oncology Nursing
O066	O071	SIOP	SIOP award session
O072	O075	N 3	Meeting the Needs of Teenagers and Young People
O076	O079	FP 10	Acute Leukemia 2
O080	O083	FP 11	CNS Miscellaneous
O084	O087	FP 12	Hepatic Tumors
O088	O091	RO 2	Radiation Miscellaneous
O092	O095	N 4	Promoting Safe Care in Cancer Treatments
O096	O101	FP 13	Acute Lymphoblastic Leukemia
O102	O106	FP 14	Clinical Advances in Neuroblastoma
O107	O112	FP 15	Adolescents and Young Adults
O113	O118	N 5	Challenges and Collaboration in Care and Aftercare
O119	O124	FP 16	Leukemia and Lymphoma
O125	O130	FP 17	Neuroblastoma. From translational research to personalised medicine.
O131	O136	FP 18	Epidemiology
O137	O142	FP 19	Clinical Aspects of Renal Tumors
O143	O148	FP 20	Germ Cell Tumors
O149	O154	FP 21	Psychosocial 2
O155	O156	N 7	Emerging Directions in Planning Care
O157	O162	FP 22	Soft Tissue Sarcomas
O163	O168	FP 23	Rare Tumors: Retinoblastoma and more
O169	O174	FP 24	Supportive Care

IPSO Oral presentations (IPSO + number)

IPSO001	IPSO002	IPSO 1	Renal Tumors
IPSO003	IPSO006	IPSO 2	Soft Tissue Tumors
IPSO007	IPSO012	IPSO 3	Surgical Techniques & Bone Tumors
IPSO013	IPSO016	IPSO 5	PBC/IPSO Session
IPSO017	IPSO021	IPSO 6	Adrenal Tumors
IPSO022	IPSO026	IPSO 7	Germinal, Endocrine Tumors and Rare Tumors

ICCCPO Oral presentations (ICCCPO + number)

ICCCPO001	ICCCPO015	Parents and Survivors
-----------	-----------	-----------------------

PD015

EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR: IS IR A FEASIBLE TARGET FOR THE TREATMENT OF OSTEOSARCOMA?

Jun Ah Lee¹, Yunmi Ko¹, Jae-Soo Koh², Dae-Geun Jeon³, Soo-Yong Lee³, Dong Ho Kim¹

¹Korea Cancer Center Hospital, Pediatrics, Seoul, Korea (Republic Of)

²Korea Cancer Center Hospital, Pathology, Seoul, Korea (Republic Of)

³Korea Cancer Center Hospital, Orthopedic Surgery, Seoul, Korea (Republic Of)

Purpose: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is recognized as a central regulator of proliferation and progression in many human cancers. We analyzed its expression in osteosarcoma and performed in vitro studies to characterize the downstream pathways of EGFR in osteosarcoma cell lines as well as to test EGFR inhibitors as new therapeutic candidates.

Method: We retrospectively analyzed 37 biopsy samples of osteosarcoma for EGFR protein expression by immunohistochemistry (IHC). Those cases were diagnosed at the Korea Cancer Center Hospital between 1995 and 2007 and treated with combination chemotherapy and surgery. The relationship between EGFR protein expression and clinicopathologic characteristics and treatment outcome were evaluated. Four osteosarcoma cell lines (HOS, U2OS, MG-63, KHOS/NP) were analyzed for EGFR, p-EGFR expression by western blot analysis. Two EGFR inhibitors, gefitinib and BIBW2992, were tested for their effect on osteosarcoma cells using MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), colony forming and trypan blue staining assay.

Results: EGFR protein was positive in 33 (89%) biopsy samples (6 low, 16 intermediate, 11 high) and in three cell lines (HOS, MG-63 and KHOS/NP). Intermediate or high staining for EGFR protein was related to peripherally located tumor ($P=0.04$) and tumor volume less than 150 mL ($P<0.001$). Female gender and osteoblastic subtype tended to be associated with low staining for EGFR protein. EGFR protein expression was not associated with histologic response to preoperative chemotherapy ($P=0.99$) or with the survival ($P=0.29$). Gefitinib and BIBW2992 were tested at various concentrations (0.01–20 microM), however, did not have any significant inhibitory effect on the viability and proliferation of osteosarcoma cells.

Conclusion: Although our study is retrospective in nature and limited in case numbers, EGFR does not seem to be a feasible target for the treatment of osteosarcoma, contrasting to epithelial carcinomas.

PD016

PREDICTORS OF ACUTE CHEMOTHERAPY-ASSOCIATED TOXICITY IN PATIENTS WITH EWING SARCOMA

Jeremy Sharib¹, Jobin Cyrus¹, Andrew Horvai², Florette K Gray Hazard³, Katherine K Matthay¹, Robert Goldsby¹, Neyssa Marina⁴, Steven G DuBois¹

¹University of California, Pediatric Oncology, San Francisco, CA

²University of California, Pathology, San Francisco, CA

³Stanford University, Pathology, Palo Alto, CA

⁴Stanford University, Pediatric Oncology, Palo Alto, CA

Purpose: Ewing sarcoma (ES) is a malignant small round blue cell tumor of bone and soft tissue of childhood. Patients with ES are treated with intensive chemotherapy regimens. We sought to describe predictors of toxicity in this population.

Method: In this retrospective cohort study, medical records of patients with pathologically confirmed ES, extraskelatal ES, and primitive neuroectodermal tumor (PNET) treated at the University of California San Francisco and Stanford University between 1980 and 2010 were reviewed. Grade 3 and 4 non-hematologic chemotherapy-associated toxicities during initial frontline therapy were recorded for each patient, along with potential clinical and demographic predictors of toxicity. Univariate analyses were performed using the Fisher exact test. Multivariate analysis was performed using logistic regression methods.

Results: The cohort included 143 patients (89 males; median age 14 years, range 2 months–49 years) with ES/PNET and available toxicity data. The most common grade 3 or 4 non-hematologic toxicities were febrile neutropenia ($n=74$ patients), infection ($n=46$ patients), and mucositis ($n=11$ patients). On univariate analyses, age <12 years at diagnosis ($p=0.01$), Latino ancestry ($p=0.004$), and treatment on a clinical trial ($p=0.005$) were associated with higher incidence of toxicity. Tumor size, site, stage, mode of local control, and overall chemotherapy exposure were not associated statistically with the incidence of toxicity. On multivariate analysis, Latino ethnicity (odds ratio 3.8, 95% CI 1.2–12.0, $p=0.02$), treatment on a clinical trial (odds ratio 3.1, 95% CI 1.01–9.3, $p=0.04$), and age <12 years (odds ratio 3.1, 95% CI 1.04–9.4, $p=0.04$) were independent significant predictors of toxicity.

Conclusion: Patients with ES/PNET who are younger or of Latino ethnicity have higher rates of toxicity that may necessitate increased supportive care measures. Treatment on a clinical trial was associated with higher rates of toxicity, though this finding may represent ascertainment bias.

PH001

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF APN/CD13 IN HEPATOBLASTOMA

Pediatr Blood Cancer DOI 10.1002/pbc

Satoshi Saido¹, Ken-Ichiro Watanabe², Shinya Okamoto³, Shinji Uemoto³, Tomoro Hishiki⁴, Itaru Kato², Shiro Tanaka⁵, Souichi Adachi⁶, Toshio Heike²

¹Kyoto University, Pediatrics, Kyoto, Japan

²Kyoto University Graduate School Of Medicine, Department Of Pediatrics, Kyoto, Japan

³Kyoto University Graduate School Of Medicine, Division Of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery And Transplantation, Kyoto, Japan

⁴Chiba University Graduate School Of Medicine, Department Of Pediatric Surgery, Chiba, Japan

⁵Kyoto University, Division Of Clinical Trial Design And Management, Translational Research Center, Kyoto, Japan

⁶Kyoto University Graduate School Of Medicine, Department Of Human Health Sciences, Kyoto, Japan

Purpose: Hepatoblastoma is a rare malignant tumor of childhood originating from immature hepatic cells. Aminopeptidase-N/CD13 is an ectopeptidase that plays important roles in the progression of other tumors by promoting tumor invasion and metastasis. Although CD13 is expressed in fetal stage hepatic progenitor cells, the relationship between hepatoblastoma and CD13 expression has remained unresolved. We investigated the clinical significance of CD13 in hepatoblastoma by studying CD13 protein expression.

Method: The expression pattern of CD13 was investigated in 30 tissue samples from 27 cases of hepatoblastoma by immunohistochemical staining, including 16 of predominantly embryonal type histology (pE), and 14 samples of predominantly fetal type histology (pF). We also quantified the staining data using the immunoreactive score (IRS) scale, and investigated the relationship between the expression level of CD13, clinicopathological factors, and clinical outcomes. Furthermore, we studied the biological function of CD13 in the hepatoblastoma cell lines, Huh6 and HepG2.

Results: CD13 showed positive staining in all specimens. Hepatoblastoma of the pE type showed higher expression of CD13 compared to pF hepatoblastoma [median IRS 4 (range: 2–9) versus 2 (range: 1–4)]. Strong expression of CD13 correlated with the presence of vascular invasion. CD13 low cases showed a significantly better 5-year event-free survival than CD13 high cases (100% versus 51.0%; $P=0.026$). The 5-year overall survival rate of the CD13 low cases was also better than those with CD13 high tumors (100% versus 74.0%; $P=0.114$). Both CD13 neutralizing-antibody and the potent CD13 inhibitor, Ubenimex, significantly suppressed invasive activity in the hepatoblastoma cell line HepG2 in vitro.

Conclusion: Our study suggests that CD13 may be a novel prognostic marker for hepatoblastoma and that CD13 is associated with the invasion capacity of hepatoblastoma.

PH002

EFFECT OF PHYTOCHEMICALS ON NEUROBLASTOMA AND METASTATIC POTENTIAL

Dilek Ince¹, Safiye Aktas², Zekiye Sultan Altun², Cankut Cubuk³, Nur Olgun⁴

¹The Turkish Pediatric Oncology Group, TPOG, Izmir, Turkey

²Dokuz Eylul University Institute Of Oncology, Department. Of Basic Oncology, Izmir, Turkey

³Dokuz Eylul University, Institute Of Health Sciences, Izmir, Turkey

⁴Dokuz Eylul University Institute Of Oncology, Department. Of Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

Purpose: To explore effect of cisplatin, allicin, resveratrol on the expression of metastasis related genes in neuroblastoma (NB) cell lines.

Method: Kelly and SHSY5Y cell lines were used. Groups: Gr1:Control, Gr2:Cisplatin, Gr3:Allicin, Gr4:Resveratrol, Gr5:Cisplatin+Allicin, Gr6:Cisplatin+Resveratrol. Agents were administered at pre-optimized doses for 24 hour. After RNA isolation and cDNA converting, expression of 84 custom array genes of tumor metastasis (SABiosciences, PATS028A) was determined by RT-PCR for each condition. Fold changes of gene expressions according to Gr1 of each condition were calculated at manufacturer's online free data PCR expression analysis page.

Results: KELLY: In Gr2 expression of EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5, CTNNA1, RB1, CD44, MTA1, VEGFA decreased. Allicin caused increase in expression of ITGB3, TNFSF10, HGDC, CCL7, CTS1, ETV4, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, MMP13, TRPM1, CDH1, and FXYD5. This high expression wasn't observed in Gr2 and Gr5. Expression of all genes increased in Gr4 and Gr6. Expression of DDX1, nm23-H1 and nm23-H2 increased in Gr1 and Gr2, decreased in Gr3, prominently decreased in Gr4, and not changed in Gr5, and Gr6. SYSH5Y: Cisplatin caused decrease in expression of KISS1, MET, TRPM1, IGF1, TNFSF10, TSHR, MMP13, MMP3, MMP7, CDH6, CCL7, CXCL12 and an increase in expression of PNN, SMAD4, DENR, SET, NME2. Allicin caused decrease in expression of HGDC, KISS1, TNFSF10, MMP10, IGF1, TRPM1, MMP7, MMP3, CCL7, PPC, CTS1, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, and TIMP4. Expression of genes decreased in Gr4, Gr5, and Gr6.

Conclusion: Expression of genes increased in MYCN (+) NB, decreased in MYCN (–) NB cell lines administration of allicin, resveratrol, so additive treatment by these agents should be questioned in MYCN (+) NB. In MYCN (+) NB, expressions of DDX1, nm23-H1, nm23-H2 reduced by using allicin, resveratrol as a single agent, this finding indicates that allicin, resveratrol administration have to be discussed for maintenance treatment in MYCN (+) NB.

INTERNATIONAL SOCIETY OF PAEDIATRIC ONCOLOGY SIOP XXXII CONGRESS

BOSTON, UNITED STATES OCTOBER 21–24, 2010 SIOP ABSTRACTS

SYMPOSIA LECTURES (SL)

SL005

CELL SPECIFIC GENE EXPRESSION AND WHAT WE THINK WE KNOW ABOUT LCH

C. E. Allen

Baylor College of Medicine, Pediatrics, Houston, United States

Purpose: Langerhans Cell Histiocytosis (LCH) is a rare disease characterized by heterogeneous lesions containing CD207+ Langerhans cells and lymphocytes that can arise in almost any tissue and may cause significant morbidity and mortality. After decades of research, the pathogenesis of LCH remains speculative. This study was performed to test the prevailing model of LCH pathogenesis that lesions arise due to malignant transformation of epidermal Langerhans cells (LCs).

Method: LCH CD207+ cells were isolated from LCH lesions, control LCs were isolated from normal skin, and gene expression was compared. Similarly, gene expression in LCH lesion CD3+ cells was compared to gene expression in peripheral blood CD3+ cells from LCH patients with active disease.

Results: Compared to control epidermal CD207+ cells, the LCH CD207+ cells yielded 2900 differentially-expressed probes. Expression of many genes previously associated with LCH, including cell-cycle regulators, pro-inflammatory cytokines and chemokines were not significantly different from control LCs in our study. The study also identified several interesting genes not previously associated with increased expression in LCH including genes involved in regulation of cell cycle (CDC2A, AFF3, SMYD3, HOXB7), apoptosis (BAX, BCL2L1, CFLAR) signal transduction (DUSP4, JAK3, PRKCA, TLR2, TLR4, SOCS3, JAG2), tumor invasion and metastasis/tissue invasion (CEACAM6, MMP1, TGFB1), myeloid cell maturation (CD1d, CD13, CD14, CD33, ITGA2B, ITGAX, ITGAM, CD300LF) and lymphocyte trafficking (SPP1, VNN1, NRP1, CCR1). A large number of the cells with decreased or absent expression in the LCH-CD207 cells are involved in cell-cell adhesion, including TACSTD1.

Compared to the peripheral CD3+ cells from LCH patients, the LCH lesion CD3+ cells yielded only 162 differentially-regulated probes, and the expression profile of the LCH lesion CD3+ cells was consistent with an activated regulatory T cell phenotype, including increased expression of FOXP3 and CTLA4. SPP1 had the highest relative expression in both LCH lesion CD207+ and CD3+ cells.

IL-17 is a proinflammatory cytokine recently associated with LCH pathogenesis. In this study, IL-17 expression was absent from control and LCH CD207+ cells. Very little IL-17 expression was detected in T cells from LCH lesions, but abundant message was detected from tonsil lymphocytes.

Conclusion: We propose a revised model of LCH pathogenesis in which lesions do not arise from epidermal Langerhans cells, but from accumulation of bone-marrow derived immature myeloid dendritic cells that recruit activated lymphocytes. Until the cell of origin can be identified, perhaps "LCH" should return to "Histiocytosis X".

SL007

SURGICAL APPROACHES TO THE TREATMENT OF LOW-GRADE GLIOMAS

R. M. Scott

United States

Purpose: To describe recent advances in the neurosurgical treatment of low-grade gliomas in children

Method: The author reviewed 5 years of experience with the use of intraoperative MRI, ultrasound, and image-guidance in the surgical treatment of low grade gliomas

Results: These technologies were deemed to be important in the total excision of these tumors in approximately 50% of surgical candidates.

Conclusion: Technological advances in the operating room appear to have led to greater operative safety and improved surgical results

SL009

LOW GRADE GLIOMA IN CHILDREN: MOLECULAR GENETICS AND NOVEL SYSTEMIC THERAPIES

Olaf Witt¹, Huriye Cin², Jan Gronych², Marc Remke³, Hendrik Witt³,
Till Milde⁴, Pablo Hernaiz-Driever⁵, Andrey Korshunov⁶, Peter Lichter²,
Stefan Pfister³

¹German Cancer Research Center, CCU Pediatric Oncology, Heidelberg, Germany

²German Cancer Research Center, Molecular Genetics, Heidelberg, Germany

³German Cancer Research Center and University Hospital, Molecular Genetics and Pediatric Oncology, Heidelberg, Germany

⁴German Cancer Research Center, CCU Pediatric Oncology and Department of Pediatric Oncology, Heidelberg, Germany

⁵Charite University Hospital, Pediatric Oncology, Berlin, Germany

⁶German Cancer Research Center, CCU Neuropathology, Heidelberg, Germany

Purpose: To give an update on the molecular genetics and novel targeted therapies in pediatric low grade glioma

Method: Using primary tumor material, in vitro and in vivo models, the understanding of the molecular origin of low grade gliomas in children has recently made significant progress with the identification of BRAF/MAPK pathway alterations in a high percentage of pilocytic astrocytoma in children

Results: The first specific mutation identified was the KIAA1549-BRAF fusion protein leading to constitutive activation of the MAPK pathway due to loss of the BRAF auto-inhibitory domain. Subsequently, several other fusion proteins involving BRAF and CRAF as well as activating BRAF mutations were identified pointing towards loss of regulation of auto-inhibition as the common molecular theme in the molecular pathogenesis of pilocytic astrocytoma. Using lentiviral gene-transfer, we for the first time were able to generate a mouse model for pilocytic astrocytoma, that is ideally suited for preclinical testing

Conclusion: As several compounds targeting the BRAF/MAPK pathway are clinically available, novel treatment options for pediatric low grade glioma are beginning to emerge

SL15

CLINICAL RESEARCH IN PEDIATRIC RARE CANCERS

Carlos Rodriguez-Galindo

Dana-Farber Cancer Institute, Pediatric Oncology, Boston, United States

Purpose: Advances in the treatment of rare pediatric cancers are hampered by the low number of patients, which limits the design of effective clinical trials, the use of

displayed highest cytotoxicity activity while NKp30b isoform signals for Th1 cytokines and NKp30c isoform induce IL-10 secretion with defective cytotoxic activity.

Neuroblastoma (NB) is known to be sensitive to NK cytotoxicity, a true link between innate and cognate immunity

Aim: To evaluate NKp30 spliceforms in NB patients and their influence on disease presentation and prognosis.

Method: NKP30 spliceforms were analyzed by Real-time PCR in peripheral mononuclear blood cells from 94 NB patients treated in Gustave Roussy Institut from 1964 to 2010. Unsupervised hierarchical clustering was applied to data obtained and correlated with patient's clinical data.

Results: Unsupervised hierarchical clustering classified patients in 3 subgroups. Forty-four out of 94 patients (47%) exhibit the predominant NKp30b isoform, 28 (30%) the predominant NKp30c isoform and 22 (23%) the NKp30a isoform. Among the 39 metastatic NB, 27 (69%) exhibit the predominant NKp30b, 6 (15%) the predominant NKp30a and 6 (15%) the predominant NKp30c isoform while among the 50 localized NB, 15 (30%) exhibit the predominant NKp30b, 14 (28%) exhibit the predominant NKp30a and 21 (42%) the predominant NKp30c isoform ($p=0.001$). Finally, among the 40 localized NB with a follow-up more than 2 years, 1/12 (8%) with predominant NKp30a isoform relapsed comparing with 4/28 (14%) with predominant NKp30b or c isoforms.

Conclusion: NKp30 profiles appear to correlate with metastatic dissemination of NB. Prospective studies are in progress to confirm the impact of NKp30 spliceforms on NB prognosis. New drugs that modulate alternative splicing of NKp30 receptor may therefore represent a new therapeutic approach in NB.

PH031

THE HEDGEHOG SIGNAL IN NEUROBLASTOMA

Ryota Souzaki¹, Tatsuro Tajiri¹, Yoshiaki Kinoshita², Kohashi Kenichi³, Yoshinao Oda³, Tomoaki Taguchi²

¹Kyushu University, Pediatric Surgery, Fukuoka, Japan

²Kyushu University, Pediatric Surgery, Fukuoka, Japan

³Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Anatomic Pathology, Fukuoka, Japan

Purpose: It has been reported that the hedgehog (Hh) signaling pathway is activated in adult cancer such as gastric cancer, pancreatic cancer and breast cancer. On the other hand, the Hh signaling pathway plays an important role of development of neural crest in embryo. The Aim of this study is to show the activation of Hh signaling pathway in neuroblastoma (NB) that is child malignancy arising from neural crest cells and to reveal the meaning of Hh signaling pathway in NB development.

Method: We analyzed the expression of Shh, Gli1 and patch that are transactivators of Hh signalling pathway by immunohistochemistry for 58 NB cases. Seventeen of 58 cases showed MYCN amplification.

Results: Of all 58 NB samples, 31 samples showed positive for Shh, Gli1 and patch (Hh positive) and 27 samples showed negative (Hh negative). All 17 MYCN amplified samples show Hh negative. Of 41 samples without MYCN amplification, 31 samples showed Hh positive and 10 samples showed Hh negative. In the cases without MYCN amplification, the prognosis of Hh negative cases are poorer than that of Hh positive cases. In the NB samples with Hh positive, no sample showed nuclear Gli1 staining that means activation of Hh signaling pathway in adult cancers.

Conclusion: Contrary to the adult cancer, these findings show that the activation of Hh signaling pathway in NBs acts for the differentiation of the NB and good prognosis.

PH032

ALLICIN INCREASES METASTASIS RELATED GENES IN NEUROBLASTOMA

Dilek Gunes¹, Safiye Aktas², Zekiye Altun², Nur Olgun³

¹Dokuz Eylul University Institute of Oncology, Dept. of Pediatric Oncology, Izmir, Turkey

²Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Izmir, Turkey

³Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Izmir, Turkey

Purpose: Overcoming of toxic effects of cisplatin in neuroblastoma treatment is a current issue. The try of discovering new agents to decrease toxicity of chemotherapeutic agents needs very much careful assessment not to cause tumor progression. The aim of this study is to explore effect of cisplatin, allicin and their combination on metastasis related genes in neuroblastoma.

Method: Kelly cell line was cultured and the agents and their combinations were applied for 24 hour in pre-optimized doses. After RNA isolation and cDNA

converting, expression of 84 custom array genes of tumor metastasis (SABiosciences, PATS028A) was determined by Real Time PCR for each condition. Kelly neuroblastoma cell line without any agent was used as control. Fold changes according to control group of each three condition were calculated at manufacturer's online free data PCR expression analysis page.

Results: High expressed genes after allicin application are ITGB3, TNFSF10, HGDC, CCL7, CTSL1, ETV4, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, MMP13, TRPM1, CDH1, and FXD5. The high expressed genes are related with cell growth and proliferation, extracellular matrix proteins, transcription factors. This high expression was not observed alone with cisplatin, but also observed in cisplatin+allicin combination. Cisplatin alone caused decrease in expression of EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5, CTNNA1, RB1, CD44, MTA1, VEGFA; genes related with extracellular matrix proteins, cell growth and proliferation but also cell adhesion molecules.

Conclusion: Allicin showed prominent effect of gene expression related with tumor metastasis after application to neuroblastoma cells alone and in combination with cisplatin application. Our data showing increase effect of allicin on metastasis related genes indicates that allicin additive treatment as a protective agent of chemotherapy toxicity should be very well questioned in neuroblastoma.

PH033

THE CALCIUM-SENSING RECEPTOR GENE IS INACTIVATED BY GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS IN NEUROBLASTIC TUMOURS AND ITS OVEREXPRESSION REDUCES NEUROBLASTOMA PROLIFERATION

Carmen de Torres¹, Carla Casala², José Luis Ordóñez³, Solange Miguel⁴, Francina Munell⁵, Patricia Galván², Eva Rodríguez², Gemma Mayol², Idoia García², Cinzia Lavarino², Elisa Martí⁶, Enrique de Alava³, Jaume Mora²

¹Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Oncology, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

²Hospital Sant Joan de Déu, Developmental Tumor Biology Laboratory, Barcelona, Spain

³Centro de Investigaciones del Cáncer, Molecular Pathology Laboratory, Salamanca, Spain

⁴Hospital Vall d'Hebron, Research Unit, Barcelona, Spain

⁵Hospital Vall d'Hebron, Research Unit, Barcelona, Spain

⁶Instituto de Biología Molecular, CSIC, Developmental Biology, Barcelona, Spain

Purpose: We have previously reported that the calcium-sensing receptor (CaR) is expressed in differentiated, favourable neuroblastic tumours (NT) and it is up-regulated upon differentiation induction. However, CaR expression is undetectable in undifferentiated neuroblastomas (NB) and CaR promoter 2 (P2) is GC rich. We have analyzed the genetic and epigenetic mechanisms potentially responsible for the inactivation of the CaR gene in NT.

Method: CaR mRNA was analyzed by qRT-PCR in NB cell lines treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) and/or trichostatin A (TSA). Methylation status of P2 was evaluated by bisulfite specific PCR and sequencing of at least 10 clones. A specific probe for CaR locus was generated to perform fluorescence in situ hybridization (FISH). Two cell lines were stably transfected with pCMV-GFP or pCMV-CaR-GFP. Proliferation rate of independent clones was assessed in vitro and in nu/nu mice. Their metastatic pattern was evaluated in a chick embryo model.

Results: CaR mRNA was undetectable in 7/9 cell lines. Increased CaR mRNA levels were seen in all NB cell lines following DAC+/-TSA, except in SH-SY5Y and SK-N-AS. Percentage of methylated cytosines in P2 was < 6% in control tissues, SH-SY5Y and SK-N-AS cells, and 21-56% in the other cell lines. Hypermethylation of P2 among primary NT correlated with undifferentiated NB ($P=0.002$), age at diagnosis > 12mo ($P=0.026$), high clinical risk ($P=0.009$), MYCN amplification ($P=0.04$) and absence of CaR expression ($P=0.002$). Allelic losses of the CaR locus and/or the entire chromosome 3 were detected in 70% of NB, ganglioneuroblastomas and ganglioneuromas. The percentage of cells with one chromosome 3 ranged from 10% to 60% of total tumour cells. pCMV-CaR-GFP clones displayed statistically significant decreased in vitro and in vivo proliferation rates compared to pCMV-GFP clones. Their metastatic patterns were similar.

Conclusion: The CaR gene is silenced by genetic and epigenetic mechanisms and it exhibits tumor suppressor properties in NT.

PH034

PATTERNS OF TUMOUR GROWTH AND DISSEMINATION ON METAIODOBENZYLGUANIDINE (MIBG) SCANS SEEM TO CORRELATE WITH GENE EXPRESSION DATA OF STAGE 4 NEUROBLASTOMA TUMOURS

POC48 Efficacy of Treosulfan as a single agent in newly diagnosed neuroblastoma stage IV patients

Page 213

Boyarsinov Vasilii; Dolgoplov Igor; Pimenov Roman; Mentkevich George
Russian Federation

POC49 Irinotecan/Temodal therapy as salvage treatment for children with neuroblastoma - single centre experience

Page 213

Aleksandra Wieczorek; Walentyna Balwierz
Poland

POC50 Minimal disease detection in non-metastatic neuroblastoma patients

Page 213

Yania Yañez; Elena Grau; Silvestre Oltra; Adela Cañete; Francisco Martinez; Carmen Orellana; Rosa Noguera; Samuel Navarro; Victoria Castel
Spain

POC51 Clinical report on the treatment of children in the late stage of neuroblastoma using chemotherapy combined with Zhongluo 3

Page 214

Jinhua Zhang; Suning Chen; Fei Yu
China

Posters – Late Breakers

POLB1 Effect of retinoic acid and chemotherapeutic agents on ultrastructural localization of Myc-N in neuroblastoma

Page 214

Safiye Aktas; Zekiye Altun; Candan Ozogul; Nur Olgun; Dilek Gunes
Turkey

POLB2 Betulinic acid affects metastasis related genes in neuroblastoma cells

Page 214

Zekiye Altun; Safiye Aktas; Dilek Gunes; Nur Olgun
Turkey

POLB3 Human neuroblastoma microenvironment supports T-cell activation in tumor associated lymphocytes

Page 215

Lena-Maria Carlson; Anna DeGeer; Baldur Sveinbjörnsson; Abiel Orrego; Tommy Martinsson; Per Kogner; Jelena Levitskaya
Sweden

POLB4 Expectant management of congenital adrenal neuroblastoma

Page 215

Dennis A Cozzi; Amalia Schiavetti; Ermelinda Mele; Silvia Ceccanti; Simone Frediani; Anna Clerico; Carlo Dominici
Italy

POLB5 Allicin increases metastasis related genes in neuroblastoma

Page 215

Dilek Gunes; Safiye Aktas; Zekiye Altun; Nur Olgun
Turkey

POLB6 Diagnostics and treatment of children with localized and locally advanced thoracoabdominal neuroblastoma

Page 215

Anatoly Kazantsev; Andrey Ryabov; Polad Kerimov; Andrey Volobuev; Mikhail Rubansky
Russian Federation

POLB7 Modeling the p53-Mdm2 core module in neuroblastoma

Page 216

Florian Lamprecht; Daniel Dreidax; Sina Gogolin; Christina Pöhler; Manfred Schwab; Frank Westermann; Thomas Höfer
Germany

POLB8 Biological characteristics of neuroblastoma in children of Belarus

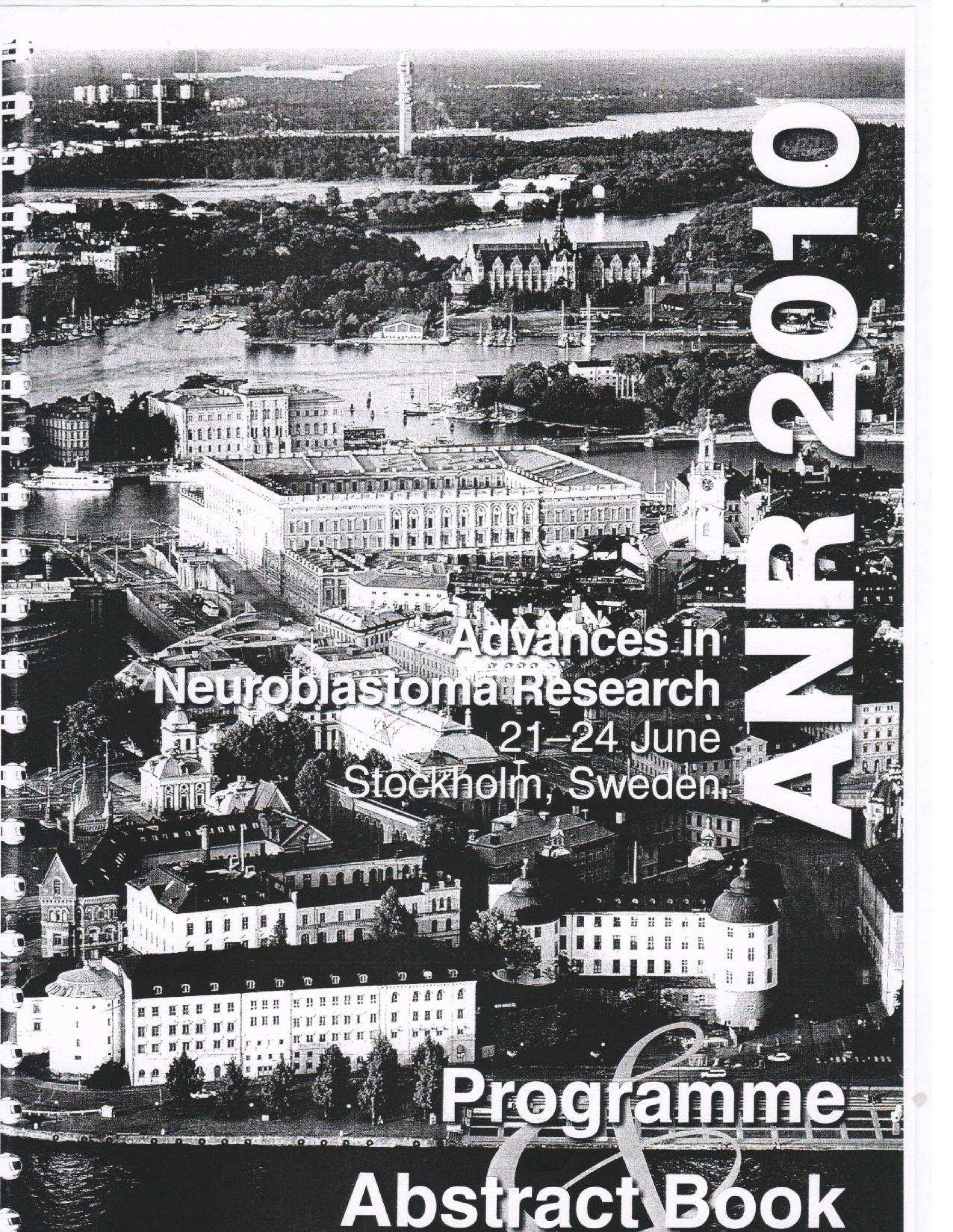
Page 216

Inna Proleskovskaya; Alena Valochnik; Natallia Savva
Belarus

POLB9 Treatment results for neuroblastoma in children of Belarus

Page 216

Inna Proleskovskaya; Tatyana Savich; Dmitriy Kochubinsky; Natallia Savva; Olga Aleinikova
Belarus



OTON
er
Z
A

Advances in
Neuroblastoma Research
21-24 June
Stockholm, Sweden.

Programme
Abstract Book

POLB3

Human neuroblastoma microenvironment supports T-cell activation in tumor associated lymphocytes

Carlson, Lena-Maria¹; DeGeer, Anna²; Sveinbjörnsson, Baldur³; Orrego, Abiel⁴; Martinsson, Tommy⁵; Kogner, Per⁶; Levitskaya, Jelena⁷

¹Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Department of Oncology-Pathology, Department of Women's and Children's Health, Stockholm, Sweden; ²Karolinska Institutet, Department of Oncology-Pathology, Stockholm, Sweden; ³Karolinska Institutet, Department of Women's and Children's Health, Stockholm, Sweden; ⁴Karolinska Institutet, Department of Oncology-Pathology, Baltimore, Sweden; ⁵Göteborg University, Sahlgrenska University Hospital, Department of Clinical Genetics, Göteborg, Sweden; ⁶Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Department of Women's and Children's Health, Stockholm, Sweden; ⁷Johns Hopkins University, School of Public Health, W. Harry Feinstone Department of Molecular Microbiology and Immunology, Baltimore, Sweden

Background: Although lymphocytic infiltration has been previously linked to increased survival of patients with neuroblastoma (NB), the development of these tumors was not prevented by the presence of T cells in their microenvironment, suggesting that either the tumor milieu is not permissive for T cell activation, or lymphocytic NB infiltrates are devoid of T-cells, able to efficiently control tumor progression. Here, we report systematic analysis of T-cell subsets present in the peripheral blood and tumor samples from NB patients, representing all clinical and genetic forms of the tumor. We also characterize the pattern of cytokine production by T-cells in both compartments.

Method/approach: Analysis of T-cell phenotype was done by immunostaining and flow cytometry. Neuroblastoma-infiltrating T-cells were visualised by immunohistochemistry. In vitro cytokine production was measured using multiplex analysis and ELISA. All patients followed for >3 years.

Results: This study shows that tumor-associated lymphocytes (TALs) from NB lesions and peripheral blood lymphocytes (PBLs) analyzed on the day of tumor excision differ in their subset composition, phenotype and functional characteristics. The NB microenvironment promoted accumulation of CD3+CD8+ T-cells with activated effector memory phenotype. Ex vivo stimulation with autologous tumors increased the proportion of effector memory T-cells and led to upregulation of CD25 and downregulation of TGF β and FoxP3 expression in short term cultures of PBLs. In situ proliferation and characteristic pattern of T-cell receptor aggregation at the contacts with tumor cells were revealed by immunostaining of TALs in tumor biopsies.

Conclusion: Our results are consistent with ongoing specific activation of CD8+ T-cells in NB microenvironment, which appears to be permissive for effector memory T-cell differentiation and suppress the development of regulatory T-cells.

Email: jelevits@jhsph.edu

POLB4

Expectant management of congenital adrenal neuroblastoma

Cozzi, Dennis A¹; Schiavetti, Amalia²; Mele, Ermelinda¹; Ceccanti, Silvia¹; Frediani, Simone¹; Clerico, Anna²; Dominici, Carlo²

¹University Sapienza, Pediatrics - Unit of Surgery, Rome, Italy; ²University Sapienza, Pediatrics - Unit of Oncology, Rome, Italy

Background: There are no established guidelines for the management of congenital adrenal neuroblastoma. We describe our single institution experience on managing this tumour with a wait-and-see policy.

Methods: Thirteen consecutive patients with adrenal mass detected antenatally or within the first 3 months of life were enrolled between February 2002 and March 2010. Diagnostic work-up included a combination of the following investigations: urinary catecholamine metabolites, imaging studies (US, MRI or CT scan), MIBG scan or trucut needle biopsy.

Results: Male to female ratio was 1.6 to 1. Median tumour size at presentation was 29 mm (range, 10 to 50). Overall, 7 of 13 lesions were antenatally detected. Ten lesions were diagnosed as localised neuroblastoma (by urinary catecholamines, MIBG or needle biopsy). Four of these were excised because of parental preference (n=2), tumour persistence over 10 mos (n=1) or enlargement (n=1). The remaining 6 patients uneventfully underwent watchful clinical observation, which showed progressive tumour shrinking and complete regression within a period ranging from 8 to 39 months (median 12). Regression started at a median time of 3.5 months (range 2-5). Furthermore, 3 small adrenal lesions without clear-cut diagnosis were managed non invasively. All 13 patients are alive and disease-free at mean follow-up of 59 months (range 2-101, median 73). One of the 10 localised neuroblastoma progressed to stage 4 despite early surgery performed at 28 days of age because of tumor enlargement. The child received high-dose chemotherapy with stem cell rescue and is disease-free 2 months after transplantation.

Conclusions: Congenital adrenal neuroblastoma carries a good outcome in most cases. A wait-and-see strategy seems a safe and effective approach that reduces unnecessary surgical procedures. In cases with a large tumour and/or tumour enlargement early surgery can be recommended, although in our patient this approach did not prevent tumor progression. Prolonged expectant management of stable and persistent lesions for more than several months may not be cost-effective.

Email: amalia.schiavetti@uniroma1.it

POLB5

Allicin increases metastasis related genes in neuroblastoma

Gunes, Dilek¹; Aktas, Safiye²; Altun, Zekiye²; Olgun, Nur¹

¹Dokuz Eylul University Institute of Oncology, Dept. of Pediatric Oncology, Izmir, Turkey; ²Dokuz Eylul University Institute of Oncology, Dept. of Basic Oncology, Izmir, Turkey

Purpose: Overcoming of toxic effects of cisplatin in neuroblastoma treatment is a current issue. The try of discovering new agents to decrease toxicity of chemotherapeutic agents needs very much careful assessment not to cause tumor progression. The aim of this study is to explore effect of cisplatin, allicin and their combination on metastasis related genes in neuroblastoma.

Method: Kelly cell line was cultured and the agents and their combinations were applied for 24 hour in pre-optimized doses. After RNA isolation and cDNA converting, expression of 84 custom array genes of tumor metastasis (SABiosciences, PATS028A) was determined by Real Time PCR for each condition. Kelly neuroblastoma cell line without any agent was used as control. Fold changes according to control group of each three condition were calculated at manufacturer's online free data PCR expression analysis page.

Results: High expressed genes after allicin application are ITGB3, TNFSF10, HGDC, CCL7, CTSL1, ETV4, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, MMP13, TRPM1, CDH1, and FXD5. The high expressed genes are related with cell growth and proliferation, extracellular matrix proteins, transcription factors. This high expression was not observed alone with cisplatin, but also observed in cisplatin+allicin combination. Cisplatin alone caused decrease in expression of EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5, CTNNA1, RB1, CD44, MTA1, VEGFA; genes related with extracellular matrix proteins, cell growth and proliferation but also cell adhesion molecules.

Conclusion: Allicin showed prominent effect of gene expression related with tumor metastasis after application to neuroblastoma cells alone and in combination with cisplatin application. Our data showing increase effect of allicin on metastasis related genes indicates that allicin additive treatment as a protective agent of chemotherapy toxicity should be very well questioned in neuroblastoma.

Email: dilek.gunes@deu.edu.tr

POLB6

Diagnostics and treatment of children with localized and locally advanced thoracoabdominal neuroblastoma

Kazantsev, Anatoly¹; Ryabov, Andrey²; Kerimov, Polad²; Volobuev, Andrey²; Rubansky, Mikhail²

¹N.N.Blokhin Russian Cancer Center, Institute of Oncology Haematology, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russian Federation; ²N.N. Blokhin Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences, Institute of Paediatric Oncology and Hematology, Moscow, Russian Federation

Aim: to improve the results of treatment of children with localized and locally advanced thoracoabdominal neuroblastoma.

Methods: 54 patients were enrolled between 2008 and 2010. There were 14 stage I patients, 25 stage II patients and 15 stage III patients. After evaluation included imaging, MIBG, bone marrow morphology, molecular studies, immunohistochemistry all patients proceeded to surgery/ biopsy. After pathology report INSS and risk group was assigned which directed further radio and chemotherapy with VP-16, CBCDA, CPM and doxorubicin, according to COG D9641, A3961 protocols.

Results: all 54 patients are alive without evidence of metastasis and/or progression of the disease with a followup of 2 to 24 months.

Conclusion: decrease of intensity and length of treatment does not compromise survival of patients with localized and locally advanced neuroblastoma.

Email: oncoanat@rambler.ru

XVI. TPOG
ULUSAL PEDIATRİK KANSER KONGRESİ
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
ATATÜRK KONGRE ve KÜLTÜR MERKEZİ - SAMSUN

18 - 22 Mayıs 2010

www.tpog2010.org



PROGRAM, KONUŞMA VE

SÖZLÜ BİLDİRİLER

şeklinde hesaplandı.

Bulgular: Betulinik asit uygulamasından sonra SHSY5Y hücrelerinde yalnızca PNN geni ve Kelly hücrelerinde metastatik genlerin çoğu (MGAT5, NF2, MCAM, CHD4, IGF1, CD44, MTA1, PLAUR, VEGFA, EWSR1, CTBP1, vs) yüksek eksprese oldu. Betulinik asit, sisplatin ve kombinasyonları SHSY5Y hücrelerinde metastatik genlerin çoğunda düşük ekspresyona neden oldu. Betulinik asit-Sisplatin kombinasyonu her bir hücre hattında betulinik asit ile benzer metastatik gen ekspresyon paterni gösterdi. Sisplatinin gen ekspresyonunu arttırdığı genler Kelly hücrelerinde yalnızca adhezyon ilişkili FXD5 iken, SHSY5Y hücrelerinde DENR, SMAD ve PNN oldu. Kelly hücrelerinde sisplatin bazı metastatik genlerin ekspresyonunu azaltırken, Betulinik asit ya da Betulinik asit-Sisplatin kombinasyonu yalnızca DEBR ve RB1 gen ekspresyonlarını azalttı. Betulinik asit uygulaması ile çoğalma ile ilişkili DNR geni SHSY5Y hücrelerinde artarken, Kelly hücrelerinde azaldı.

Sonuç: Betulinik asit tek başına ya da sisplatin ile kombinasyonu özellikle N-Myc pozitif Kelly hücrelerinde metastaz ilişkili gen ekspresyonuna belirgin pozitif etki gösterdi. Zıt olarak, Betulinik asit ve kombinasyonları sisplatine benzer olarak N-Myc negatif SHSY5Y hücrelerinde metastaz ilişkili gen ekspresyonlarını azalttı. Bu sonuçlar, agresif nöroblastom tedavisinde sisplatinin hala en uygun ajan olduğunu önermektedir. N-Myc ekspresyonu betulinik asit tedavisi adına belirleyici bir faktör olabilir.

Anahtar kelimeler: Betulinik asit, Nöroblastom, Metastaz ilişkili genler

S12

NÖROBLASTOMDA ALLICIN METASTAZ İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYONUNU ARTTIRMAKTADIR

Dilek Güneş¹, Safiye Aktaş², Zekiye Altun², Nur Olgun¹
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Çocuk Onkoloji Bilim Dalı¹,
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Bilim Dalı²

Amaç: Nöroblastomun tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan sisplatinin toksik etkileri doz ve kullanımı sınırlayıcı olabilmektedir. Kemoterapötik ajanların toksik etkilerinin azaltılması için yeni ajanlar araştırılmaktadır ki bunların kemoterapötik

ajanların antitümöral etkisini azaltmaması yanısıra tümör progresyonuna neden olmaması da gerekmektedir. Burada nöroblastom hücre dizilerinde sisplatin ve allicinin etkilerinin ve bunların birlikte kullanımının metastaz ilişkili genler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Kelly hücreleri çoğaltıldı; sisplatin, allicin ve kombinasyonları önceden optimize edilmiş dozlarda 24 saat uygulandı. RNA izole edilip cDNA elde edildikten sonra 84 genlik tümör metastaz geninin ekspresyonu custom array (SABiosciences, PATS028A) kullanılarak Real Time PCR ile değerlendirildi. Hiçbir ilaç uygulaması yapılmayan Kelly nöroblastom hücre dizisi kontrol olarak kullanıldı. Üç ayrı koşulda, kontrol grubuna göre gen ekspresyonlarında kaç kat değişiklik olduğu üreticinin online serbest veri PCR ekspresyon analiz sayfasına göre hesaplandı.

Sonuçlar: Allicin uygulamasından sonra ekspresyonu artan genler: ITGB3, TNFSF10, HGDC, CCL7, CTS1, ETV4, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, MMP13, TRPM1, CDH1 ve FXD5 idi. Ekspresyonu artan genler hücre büyümesi ve proliferasyonu, ekstrasellüler matriks proteinleri ve transkripsiyon faktörleriyle ilişkiliydi. Sadece sisplatin veya sisplatin+allicin uygulamalarında bu artmış ekspresyon izlenmedi. Sisplatinin tek başına kullanımı ile ekspresyonu azalan genler: EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5, CTNNA1, RB1, CD44, MTA1, VEGFA idi ve bu genler ekstrasellüler matriks proteinleri, hücre büyümesi ve proliferasyonu ile ilişkiliydi ancak hücre adhezyon molekülleriyle ilişkili değildi.

Yorum: Allicin nöroblastom hücre dizilerine tek başına veya sisplatin ile birlikte uygulandığında tümör metastazıyla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde belirgin etki göstermektedir. Bu araştırma sonucunda allicinin nöroblastomda metastaz ilişkili genlerin ekspresyonunu artırıcı etkisinin gösterilmiş olması, allicinin kemoterapi toksisitesini önleyici bir ajan olarak kullanımının uygun olmadığına işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Allicin, Sisplatin, Nöroblastom, Metastatik gen ekspresyonu

S13

NÖROBLASTOM'DA P14ARF METİLASYONUNUN MİNİMAL REZİDÜEL HASTALIKTA ROLÜ

Zübeyde Erbayraktar¹, Zeynep Zadeoğulları², Safiye Aktaş³, Hülya Ellidokuz⁴, Güldal Kırkalı⁵, Nur Olgun⁶

Effects of Phytochemicals on Neuroblastoma and Metastatic Potential

.....

.....

ABSTRACT

Objective: To explore antitumoral effects of allicin, resveratrol, their changing effects on cisplatin; and effect of these phytochemicals on the expression of metastasis related genes in neuroblastoma cell lines.

Method: Kelly and SH-SY5Y human neuroblastoma cell lines were used. Groups: Group1:Control, Group2:Cisplatin, Group3:Allicin, Group4:Resveratrol, Group5:Cisplatin+Allicin, Group6:Cisplatin+Resveratrol. Cytotoxic effects of agents were assessed MTT and LDH assays, apoptosis was determined by TUNEL. DDX1 and 84 custom array genes of tumor metastasis were determined by RT-PCR. Expressions were calculated at manufacturer's online PCR expression analysis page. Mann-Whitney-U, chi-square, correlation analysis were used.

Results: Allicin didn't cause cytotoxicity, apoptosis, also didn't change cytotoxic, apoptotic effects of cisplatin. Resveratrol didn't cause apoptosis, however cause cytotoxicity. Cytotoxic effect of cisplatin didn't change, but apoptotic effect of cisplatin diminished by resveratrol.

KELLY: Groups3/4/5/6: CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10 expressions increased. Groups2/3/4/5/6: RB1, DENR expressions decreased. Group4: DDX1, nm23-H1 increased, nm23-H2 decreased. Group5 nm23-H1 increased. **SH-SY5Y:** Groups3/5: KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, additionally MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7 expressions decreased in group3. Groups4/6: MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, TIMP4 expressions decreased. Groups2/3/4/5/6: PNN, Group4: DENR expressions increased. Groups3/4/5/6: DDX1 increased, nm23-H1 decreased; in group2 DDX1, nm23-H2 increased.

Conclusion: Our findings indicate allicin, resveratrol have versatile impacts on metastatic genes. Administration of these phytochemicals with or without chemotherapies are not appropriate and should be questioned in neuroblastoma.

Key Words: Neuroblastoma, Metastasis, Cisplatin, Allicin, Resveratrol.

INTRODUCTION

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in children (1-7). It shows variable biologic features, clinical outcome and prognosis. Tumor may regress spontaneously, particularly in infants, or may mature into a ganglioneuroma. However most children have extensive, metastatic disease and poor prognosis. Molecular genetic and biologic features of neuroblastoma have been shown that associated with clinical outcome, and also powerful predictors of response to therapy. Genetic and biologic analysis of neuroblastoma provides important information for guiding optimal treatment plan of patients.

Patients have been treated according to the risk stratification based treatment modalities. Age of patient, stage of disease, histopathologic features of tumor, and molecular genetic features of NB (MYCN amplification, deletion of 1p, gain of 11q etc.) have been used for making risk stratification of NB (1-7). Treatment modalities including chemotherapy, surgery, radiotherapy and immunotherapy have been used in the management of NB. Improvements in outcome for neuroblastoma patients are come from more effective and less toxic therapies. Studies are going on for identify new genetic and biologic features of NB and developing new treatment strategies. Cisplatin is one of the main cytotoxic agents that have been used in NB treatment. Cisplatin is an effective agent for the treatment of many childhood tumors, and associated with significant nephrotoxicity, ototoxicity and neurotoxicity. The divided dose and continuous-infusion schedules may lessen toxicities.

Phytochemicals are of great interest for developing new therapeutic agents as a complementary medicine for treatment of cancers. Anticancer potential of garlic compounds and resveratrol are underinvestigated. Allicin is garlic-derived and resveratrol is red grape derived phytochemicals. In this study we aimed to explore antitumoral effects of allicin, resveratrol, their changing effects on cisplatin; and also to explore the effect of allicin, resveratrol and cisplatin on the expression of metastasis related genes in neuroblastoma cell lines. Amplification of MYCN is associated with advanced stages of disease and a poor outcome. So Kelly (MYCN-positive) and SHSY-5Y (MYCN-negative) neuroblastoma cell lines were used in our study.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials

The neuroblastoma cell lines SHSY-5Y (MYCN-negative) and KELLY (MYCN-positive) were obtained from DSMZ, Germany. SHSY-5Y cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and KELLY cells were grown in RPMI medium plus 10% foetal

bovine serum, L-glutamine (2 mmol/l) penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 lg/ml) in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C. Seeding density was 50,000 cells/cm² in SHSY-5Y and KELLY cells.

Chemicals

Cisplatin was freshly dissolved in %10 dimethyl sulfoxide (DMSO) prior to all experiments and immediately diluted into mediums. Stock solution of cisplatin (3.3 mM) was prepared with isotonic solution. Aliquots were stored at -20 °C until used. Cisplatin was used in 5µM, 7.5µM, 15µM, 20µM, 50µM, 75µM, 100µM doses in the cell growth inhibition assays.

Allicin was freshly dissolved in %10 ethanol prior to all experiments and immediately diluted into mediums. Allicin was used in 0.05µM, 1µM, 10µM, 25µM, 50µM, 75µM, 100µM doses in the cell growth inhibition assays.

Resveratrol was freshly dissolved in %10 DMSO prior to all experiments and immediately diluted into mediums. Resveratrol was used in 10µM, 25µM, 50µM, 75µM, 100µM doses in the cell growth inhibition assays.

All reagents were purchased from Sigma–Aldrich (USA). Serum free mediums were used in all experiments.

Study groups

Group 1:Control (Medium)

Group 2: Cisplatin (5µM, 7.5µM, 15µM, 20µM, 50µM, 75µM, 100µM) administration

Group 3: Allicin (0.05µM, 1µM, 10µM, 25µM, 50µM, 75µM, 100µM) administration

Group 4: Resveratrol (10µM, 25µM, 50µM, 75µM, 100µM) administration

Group 5: Cisplatin and allicin administration

Group 6: Cisplatin and resveratrol administration

These six groups were done for both Kelly and SHSY-5Y cells. The concentrations of allicin, resveratrol and cisplatin were determined by cell growth inhibition assays.

Growth Inhibition Assays

Inhibition of cell growth in response to allicin, resveratrol and cisplatin were assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-tetrazolium 2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma–Aldrich, USA) assay for manufacturer's instructions and LDH Cytotoxicity Kit (Roche Diagnostics Mannheim, Germany). The concentration of the cisplatin was identified according to the 50% lethal concentrations (LD50) of cisplatin when it administered to the cell cultures. The concentrations of the allicin and resveratrol were identified according to the LD50 of cisplatin when they administered to the cell cultures with cisplatin. **Treatment**

Schedule : Twenty-four hours after seeding (time 0) medium of cells were removed and exchanged with serum free medium (control) and cisplatin, allicin or resveratrol were added to serum free medium. In six groups cells were incubated for 24 h in all experiments. Cisplatin and phytochemicals were also used 24 h incubation.

MTT

Briefly, cells were dispersed by trypsin-EDTA treatment and 5×10^4 cells/mL resuspended in mediums and seed into 96-well culture plates with six replicates. After 24 h of plating, incubation was continued for another 24 h in absence (control) or presence of cisplatin, allicin, and resveratrol. At the end of the incubation period, the reaction was terminated by adding 10 μ L MTT reagent to each well. The reaction was allowed to proceed for 4 h at 37°C. The formazan crystals were dissolved by adding solubilization solution. The intensity of the color developed, which is the reflection of number of live cells, was measured at a wavelength of 550 nm by ELISA reader (Thermo, Instruments Inc, USA). All values were compared to the corresponding controls. All assays were performed with 6 replicates.

LDH

Cell culture supernatants were used for cytotoxicity assay.

Assessment of Apoptosis

The degree of apoptosis was assessed by the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) immunohistochemical staining method for detection of apoptosis. The procedure was performed by using an DeadEnd Colorimetric TUNEL system (G7130, Promega, USA) according to the manufacturer's protocol.

Gene Expression Analysis

After experimental procedure, RNA isolation was done from neuroblastoma cell cultures. Purity and concentration of RNA were determined by spectrophotometric method. Complementary DNA (cDNA) synthesis was obtained by thermal cycling. Specific primers for mRNA were analyzed by RT-PCR array. Changes in expressions of mRNA of human tumor metastasis genes, and DDX1 were evaluated by quantitatively.

After RNA isolation and cDNA converting, expression of 84 custom array genes of tumor metastasis (SABiosciences, PAHS.028) was determined by RT-PCR for each condition (Table 1). These genes are listed below. Fold changes of gene expressions according to control of each condition were calculated at manufacturer's online free data PCR expression analysis page (www.sabiosciences.com).

Statistical Analysis

After RNA isolation and cDNA converting, expression of DDX1 and 84 custom array genes of tumor metastasis (SABiosciences, PATS028A) was determined by RT-PCR for each condition. Fold changes of gene expressions according to Group1 of each condition were calculated at manufacturer's online free data PCR expression analysis page (www.sabiosciences.com). All statistical analyses were performed using the SPSS 15.0 software program. Mann whitney U test, chi square test, correlation analysis were used. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Growth Inhibition Assays & Dose Determination:

Allicin: Allicin was administered at doses of 0.05, 1, 10, 25, 50, 75, 100 μ M to Kelly and SHSY-5Y NB cell lines, and cytotoxicity was assessed by MTT and LDH tests. In both NB cell lines, these doses of allicin did not make any cytotoxic effect when compared to control group (Figure 1, 2).

Resveratrol: Resveratrol was administered at doses of 10, 25, 50, 75, 100 μ M to Kelly and SHSY-5Y NB cell lines, and and cytotoxicity was assessed by MTT and LDH tests. In both NB cell lines, gradually increased cytotoxic effect was observed with gradually increased doses of resveratrol when compared to control group (Figure 3, 4).

The LD50 dose of cisplatin was identified as 20 μ M for Kelly NB cell line, and 7.5 μ M for SHSY-5Y NB cell line. When allicin and resveratrol coadministered with cisplatin, the doses of phytochemicals were identified as unchanged concentrations of LD50 dose of cisplatin. The administration doses of phytochemicals were determined as 25 μ M for resveratrol and 0.05 μ M for allicin.

Assessment Apoptosis

The degree of apoptosis was assessed by TUNEL method, and groups were compared.

Kelly NB Cell Line: Apoptosis induction was not different between the allicin administered group and the control group. Also, there was no difference between cisplatin induced apoptosis and apoptosis caused as a result of allicin and cisplatin coadministration. In terms of apoptosis development, the resveratrol-administered and the control group did not show any difference. The rate of apoptosis caused by allicin and cisplatin coadministration was less than that of induced by cisplatin-only administered group (Table 2).

SHSY-5Y NB Cell Line: Apoptosis induction was not different between the allicin administered group and the control group. Also, there was no difference between cisplatin induced apoptosis

and apoptosis caused as a result of allicin and cisplatin coadministration. In terms of apoptosis development, the resveratrol-administered and the control group did not show any difference. The rate of apoptosis caused by resveratrol and cisplatin coadministration was significantly less than that of induced by cisplatin-only administered group (Table 2).

Gene Expression Analysis

Kelly NB Cell Line:

In Group2 expression of FXYD5, MCAM, CXCR4, SSTR2, CDH1 ≥ 3 fold increased, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5 ≥ 3 fold decreased. In groups 3, 4, 5, and 6 maximum increased in expression of these common genes CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10. These genes were cell growth and proliferation genes (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), extracellular matrix proteins (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhesion genes (SYK, ITGA7, CDH1, FXYD5), transcription factors (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptosis genes (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), cell cycle genes (MYC, IL1B), and other genes that related to metastasis (CTSL1, KISS1). (Figure 5) In groups 2, 3, 4, 5, and 6 expressions of RB1 and DENR ≥ 3 fold decreased, additionally expression of NME2 ≥ 3 fold decreased in group4. Expression of DDX1 increased in group4, expression of nm23-H1 increased in group 4 and 5, expression of nm23-H2 decreased in grup4. In Kelly neuroblastoma cell line; genes that expressions were maximally effected by administration of phytochemicals and coadministration of phytochemicals with cisplatin were shown in figure5, 6.

SHSY-5Y NB Cell Line:

In groups 2, 3, 4, 5, and 6 expression of PNN ≥ 3 fold increased, additionally expression of DENR ≥ 3 fold increased in group4. In group2, expressions of PNN, SMAD4, DENR, SET, METAP2, SMAD2, NME2 ≥ 3 fold increased; expressions of KISS1, TNSF10, TRPM1, IGF1, MET >100 fold decreased. In groups 3 and 5, expressions of KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7 >100 fold decreased, additionally expressions of MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7 >100 fold decreased in group3. These genes were cell growth and proliferation genes (TNSF10, IGF1, TRPM1, CCL7), extracellular matrix proteins (MMP13, MMP7, MMP3, TIMP4), cell adhesion genes (ITGA7), apoptosis genes (TNSF10) and other genes that related to metastasis (KISS1). Expression of MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE,

HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, TIMP4 >500 fold decreased in group4 and >100fold decreased in group6, additionally expression of >100fold SYK decreased in group6. These genes were cell growth and proliferation genes (TNFSF10, CCL7, TRPM1, MET, IGF1, CXCL12, IL1B, IL8RB), extracellular matrix proteins (MMP7, MMP10, MMP13, MMP3, HPSE, TIMP4), apoptosis genes (TNFSF10, HTATIP2, IL1B), transcription factors (HTATIP2), cell adhesion genes (CDH6, FXYD5), cell cycle genes (IL1B), other genes that related to metastasis (KISS1, CTSL1). Expression of DDX1 increased in groups 2, 3, 4, 5 and 6; expression of nm23-H1 decreased in group 3, 4, 5, and 6; expression of nm23-H2 increased in group2. In SHSY-5Y neuroblastoma cell lines; genes that expressions were maximally effected by administration of phytochemicals and coadministration of phytochemicals with cisplatin were shown in figure 7, 8, 9.

The metastasis related genes that are most effected are listed in table 3 and table 4.

DISCUSSION

Carcinogenesis is a multi-step process and many signal path acts. With administration of multi-agent combined chemotherapy protocols, multi-targeted drugs are administered to strive for providing effectiveness and increasing it. Unfortunately, during this process toxicities are inevitable. Recent years, research with aim of reducing risks of this toxicity using phytochemical agents have gained momentum. Some of these phytochemical agents themselves prevent proliferation of cancer cells, inducing apoptosis by inhibiting growth factor signal paths (8). Our research study as being an investigation on the effects of either cisplatin-only or cisplatin in combination with allicin and resveratrol administrations in Kelly (N-MYC positif) and SH-SY5Y (N-MYC negatif) NB cell lines is the first one in the field of neuroblastoma.

Resveratrol is an anticancer, antiinflammatory, antimicrobial and neuroprotective agent. Since 1999, there were a few number of research about effects of resveratrol on neuroblastoma. One study established 70-90% reduction of cell viability of NB cells *in vitro* (9). It was shown that resveratrol significantly inhibits tumor growth in mice neuroblastoma xenograft models and human NB cell lines, and causes cell death through intrinsic mitochondria-mediated apoptotic pathway (9). However, the effect of resveratrol on metastasis potential was not investigated.

In our study dose dependent cytotoxic effect of resveratrol was observed, however resveratrol didn't change cytotoxic effect of cisplatin when applied together. Apoptosis making effect of resveratrol wasn't observed, however it diminished apoptotic effect of

cisplatin when applied together. These findings agree with the literature. Resveratrol decreases free radicals through glutathione (10, 11). In mice neuroblastoma xenograft models, resveratrol has been shown to inhibit tumor growth, but resveratrol is rapidly metabolized (12). Depending on its dose and administration period, resveratrol has been shown to reduce cytotoxicity, stop cell cycle and induce apoptosis within MYCN-amplified NB cell lines. First temporary increased expression of p53, the induction of nuclear translocation of p53 and following the induction of p21(WAF-1/CIP-1) and Bax expression were observed (13). It has been shown that resveratrol causes distinctive cytotoxicity in N2a NB cell cells, increasing apoptosis and down-regulation of p21, and accumulation of cells in S phase due to cyclinE regulation. Also, for NB mice antitumor effects of resveratrol has been shown (14). Resveratrol injection in combination with immunotherapy onto tumor site in neuroblastoma-bearing mice has been shown to increase the antitumor effect (15). The mechanism of antiproliferative and cytotoxic effects of resveratrol was analyzed in rat B103 NB cells, its existence with activation of intrinsic mitochondrial caspase-dependent pathway has been shown (16). In above mentioned studies, antitumor and apoptosis inducing effects of resveratrol has been shown. However, until now there hasn't been any research study on the effects of resveratrol on metastatic gene expression of NB available in the literature.

In our study cytotoxicity and apoptosis making effect of allicin were not observed. Also allicin didn't change cytotoxic and apoptotic effects of cisplatin when applied together. In our study, allicin has been shown to not generate the antitumor, cytotoxic and apoptotic effects in kelly and SH-SY5Y NB cells that these findings may suggest thinking allicin as a noneffective agent for neuroblastoma treatment or the insufficient administration of doses in our study to induce apoptosis and cytotoxicity. Allicin is an organic sulphur compound and has anticarcinogenic, antiproliferative, apoptotic effects. Since 2003, there were a few number of research about effects of diallyl disulfide (DADS) which is the fragmentation product of allicin, on field of neuroblastoma (17 – 19). In one report, application diallyl sulfide (DAS) ve DADS in SH-SY5Y human NB cell lines results in inhibition of antiapoptotic effects, cause to apoptosis via induction of calpain and intrinsic caspase (17). It has been shown that in SH-SY5Y cells neuroblastoma stops the G2/M phase of the cell cycle following DADS treatment and induces apoptosis through activation of mitochondrial pathway (Bcl-2 down-regulation, cytochrome c release into the cytosol, and activation of caspase-9 and caspase-3) (18). In one research study, treatment of SH-SY5Y cells with diallyl disulfide (DADS) has been shown to cause early morphological changes, cytoskeleton oxidation, microfilaments reduction and

depolymerization of microtubules (19). The results of the studies which worked with DADS in neuroblastoma cells are also limited by the above mentioned ones.

In Kelly NB cell line resveratrol cause increase in DDX1 gene expression; in SH-SY5Y NB cell line both allicin, resveratrol and coadministration of these agents with cisplatin cause increase in DDX1 gene expression. In neuroblastoma cell lines and primary NB tissues, co-amplification of DDX1 gene with MYCN gene has been shown and it was proposed to be related to poor prognosis (20-28). Although there are results leading to better clinical outcome for the case of co-amplification of DDX1 gene with MYCN gene, there are conflicting results about the effects on survival (29-36). Administration of resveratrol and allicin causing increased expression of DDX1 which coamplifies with MYCN and is suggested to be related to poor prognosis in NB.

NM23-H1 and NM23-H2 actually are metastasis suppressor genes (37). Decreased expression of the NM23 gene in epithelial tumors such as breast, colon and liver cancers are found to be related to metastasis and poor clinic prognosis (37). However, increased NM23 expression in NB and hematological malignities is found to be associated with more aggressive disease (37-42). Amplification of MYCN and mRNA and protein expressions of nm23-H1 and nm23-H2 genes are shown to be correlated. Both factors are suggested to play major role in unfavourable NB tumorigenesis (38). For 17q gain in neuroblastoma, increased expressions of nm23-H1 and nm23-H2 and also Nm23-H1 genomic amplification, increased RNA expression of nm23 in tumor and decreased survival are found to be related (40).

In our study, resveratrol only administration in Kelly NB cell lines increased expression of the nm23H1 gene. Coadministration of allicin and cisplatin increased expression of nm23H1. For neuroblastoma with amplification, this finding indicates administration of resveratrol alone and coadministration of allicine with chemotherapeutics could contribute to poor prognosis. In SHSY5Y NB cells, administration of resveratrol and allicin either alone or coadministration with cisplatin decreased expression of the nm23H1 gene. For MYCN negative neuroblastoma, this finding then suggests administration of resveratrol and allicin either alone or coadministration with chemotherapeutics could provide no contribution leading to poor prognosis and could be thought to effect on improving prognosis.

In Kelly NB cell lines, administration of resveratrol alone decreased expression of the nm23H2 gene, in SHSY5Y NB cell lines administration of resveratrol or resveratrol+cisplatin coadministration did not change expression of the nm23H2 gene. In Kelly and SHSY5Y NB cell lines, administration of allicin or allicin+cisplatin coadministration did not change

expression of the nm23H2 gene. In neuroblastoma with MYCN amplification, administration of resveratrol alone decreased expression of the nm23H2 gene which is actually a metastasis suppressor gene however it was shown to be associated with more aggressive disease in NB. This finding suggest administration of resveratrol in MYCN positive NB could provide no contribution leading to poor prognosis and could be thought to effect on improving prognosis.

In Kelly neuroblastoma cell lines, the genes which are most effected by cisplatin, resveratrol, and resveratrol+cisplatin administrations were cell growth and proliferation genes (CCL7, KISS1R, IL8RB, TRPM1, TNFSF10, IL1B, MYC, SYK), extracellular matrix proteins (MMP3, MMP7, MMP10, MMP13, TIMP4), adhesions genes (SYK, ITGA7, CDH1, FXYD5), transcription factors (ETV4, MYC, MYCL1, HTATIP2), apoptosis genes (TNFSF10, IL1B, HTATIP2), cell cycle genes (MYC, IL1B), and other genes that related to metastasis (CTSL1, KISS1) (Figure 5). In Kelly neuroblastoma cell lines, expression of cell cycle gene (RB1) and cell growth and proliferation gene (DENR) decreased more than three fold.

In SHSY5Y neuroblastoma cell lines, the genes which are most effected by allicin and cisplatin+allicin administrations were cell growth and proliferation genes (TNFSF10, IGF1, TRPM1, CCL7), extracellular matrix proteins (MMP13, MMP7, MMP3, TIMP4), cell adhesion genes (ITGA7), apoptosis genes (TNFSF10) and metastasis related other genes (KISS1) (Figure 6). In SHSY5Y neuroblastoma cell lines, the genes which are most effected by resveratrol and cisplatin+ resveratrol administrations were cell growth and proliferation genes (TNFSF10, CCL7, TRPM1, MET, IGF1, CXCL12, IL1B, IL8RB), apoptosis genes (TNFSF10, HTATIP2, IL1B), extracellular matrix proteins (MMP7, MMP10, MMP13, MMP3, HPSE, TIMP4), transcription factors (HTATIP2), cell adhesion genes (CDH6, FXYD5), cell cycle gene (IL1B), and metastasis related other genes (KISS1, CTSL1) (Figure 7).

The genes which are most effected and increased in Kelly NB cell line were covered by the genes which are most effected and decreased in SHSY5Y NB cell line.

CONCLUSION:

Cytotoxicity and apoptosis making effect of allicin were not observed in Kelly and SHSY5Y NB cells, so hypothetically we thought that allicin is not an effective cytotoxic agent for NB at 0.05-100 μ M doses *in vitro* conditions. Dose dependent cytotoxic effect of resveratrol was observed, however resveratrol did not change cytotoxic effect of cisplatin when applied together. On the other hand resveratrol diminished apoptotic effect of cisplatin when applied together in Kelly and SHSY5Y NB cells. In this case hypothetically we thought

that apoptosis related to chemotherapy may be impaired by administration of resveratrol when it is used together with conventional chemotherapy. However resveratrol may provide antitumoral effect when it is administered after completion of conventional chemotherapy. In Kelly NB cells expressions of DDX1 and nm23H1 which were related to poor prognosis in NB, increased and nm23H2 decreased by resveratrol. In SHSY5Y cells expression of DDX1 increased, expression of nm23H1 decreased by resveratrol and allicin. Expression of metastasis related genes increased in Kelly NB cells, and decreased in SHSY5Y NB cells by administration of allicin and resveratrol. When we take into account the effects of allicin and resveratrol on DDX1, nm23H1, nm23H2 and other metastasis related genes, there were a lot of genes and versatile impact. Our findings indicate that allicin, resveratrol have versatile impacts on metastatic genes and seems that not appropriate for using neither together with chemotherapy nor alone after completion of conventional chemotherapy. Administration of allicin and resveratrol should be questioned in neuroblastoma.

REFERENCES

1. Bradeur GM, Hogarty MD, Mosse YP. Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Roven; 2011. p 886-922.
2. Maris JM, Bradeur GM. Genetics. In: Cheung NKV, Cohn SL eds. Neuroblastoma. Berlin. Heidelberg. Newyork; Springer;2005. p 21-26.
3. Caron HN, Pearson ADJ. Neuroblastoma IN: Voute PA, Borrett A, Stevens MCG, Caron HN eds. Cancer in children 5th eds. Oxford, Newyork; Oxford Univercity Pres;2005. p 337-352.
4. Kutluk T, Yesilipek A, on behalf of Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) and Turkish Pediatric Hematology Society (TPHD). Pediatric Tumor Registry for 2002-2005 in Turkey. J Pediatr Hematol Oncol. 2007;29 Suppl 1 :S12-13.
5. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, et al. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. Pediatr Hematol Oncol 2003 20(3):211-218.
6. Nur Olgun, on behalf of the Turkish Pediatric Oncology Group. An Intermediary Analysis of the Neuroblastoma Treatment Protocol—2003 of the Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG) at October 2006. J Pediatr Hematol Oncol. 2007;29 Suppl 1 : S14.
7. Kushner BH, Cheung NK. Neuroblastoma-from genetic profiles to clinical challenge. N Engl J Med. 2005 Nov 24;353(21):2215-7.

8. Rajput S, Mandal M. Antitumor promoting potential of selected phytochemicals derived from spices: a review. *Eur J Cancer Prev.* 2012 Mar;21(2):205-15.
9. van Ginkel PR, Sareen D, Subramanian L, Walker Q, et. al. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(17): 5162-9.
10. Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, et. al. Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med.* 2007; 39(3): 376-84.
11. Rigolio R, Miloso M, Nicolini G, Villa D, et. al. Resveratrol interference with the cell cycle protects human neuroblastoma SH-SY5Y cell from paclitaxel-induced apoptosis. *Neurochem Int.* 2005;46(3): 205-11
12. Kenealey JD, Subramanian L, Van Ginkel PR, Darjatmoko S, et. al. Resveratrol metabolites do not elicit early pro-apoptotic mechanisms in neuroblastoma cells. *J Agric Food Chem.* 2011 May 11;59(9):4979-86.
13. Lontas A, Yeger H. Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. *Anticancer Res.* 2004 Mar-Apr;24(2B):987-98.
14. Chen Y, Tseng SH, Lai HS, Chen WJ. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery.* 2004 Jul;136(1):57-66.
15. Soto BL, Hank JA, Van De Voort TJ, Subramanian L, et. al. The anti-tumor effect of resveratrol alone or in combination with immunotherapy in a neuroblastoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 May;60(5):731-8.
16. Rahman MA, Kim NH, Kim SH, Oh SM, et. al. Antiproliferative and cytotoxic effects of resveratrol in mitochondria-mediated. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012 Oct;16(5):321-6.
17. Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. Garlic compounds induced calpain and intrinsic caspase cascade for apoptosis in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Apoptosis.* 2007; 12(4):671-84.
18. Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR. Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res.* 2003; 63(18):5940-9.

19. Aquilano K, Vigilanza P, Filomeni G, Rotilio G, et. al. Tau dephosphorylation and microfilaments disruption are upstream events of the anti-proliferative effects of DADS in SH-SY5Y cells. *J Cell Mol Med*. 2010 Mar;14(3):564-77.
20. Squire JA, Thorner PS, Weitzman S, Maggi JD, et. al. Co-amplification of MYCN and a DEAD box gene (DDX1) in primary neuroblastoma. *Oncogene*. 1995 Apr 6;10(7):1417-22.
21. Manohar CF, Salwen HR, Brodeur GM, Cohn SL. Co-amplification and concomitant high levels of expression of a DEAD box gene with MYCN in human neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995 Nov;14(3):196-203.
22. Noguchi T, Akiyama K, Yokoyama M, Kanda N, et. al. Amplification of a DEAD box gene (DDX1) with the MYCN gene in neuroblastomas as a result of cosegregation of sequences flanking the MYCN locus. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Feb;15(2):129-33.
23. Amler LC, Schürmann J, Schwab M. The DDX1 gene maps within 400 kbp 5' to MYCN and is frequently coamplified in human neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Feb;15(2):134-7.
24. George RE, Kenyon RM, McGuckin AG, Malcolm AJ, et. al. Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Oncogene*. 1996 Apr 4;12(7):1583-7.
25. George RE, Kenyon R, McGuckin AG, Kohl N, et. al. Analysis of candidate gene co-amplification with MYCN in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997 Oct;33(12):2037-42.
26. Kuroda H, White PS, Sulman EP, Manohar CF, et. al. Physical mapping of the DDX1 gene to 340 kb 5' of MYCN. *Oncogene*. 1996 Oct 3;13(7):1561-5.
27. Godbout R, Packer M, Bie W. Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. *J Biol Chem*. 1998 Aug 14;273(33):21161-8.
28. Akiyama K, Akao Y, Yokoyama M, Nakagawa Y, et. al. Expression of two dead box genes (DDX1 and DDX6) is independent of that of MYCN in human neuroblastoma cell lines. *Biochem Mol Biol Int*. 1999 Apr;47(4):563-8.
29. Scott D, Elsdon J, Pearson A, Lunec J. Genes co-amplified with MYCN in neuroblastoma: silent passengers or co-determinants of phenotype? *Cancer Lett*. 2003 Jul 18;197(1-2):81-6.
30. Defferrari R, Tonini GP, Conte M, Papio F, et. al. Concomitant DDX1 and MYCN gain in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2007 Oct 18;256(1):56-63.

31. Weber A, Imisch P, Bergmann E, Christiansen H. Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2004 Jul 1;22(13):2681-90.
32. De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, et. al. No evidence for correlation of DDX1 gene amplification with improved survival probability in patients with MYCN-amplified neuroblastomas. *J Clin Oncol*. 2005 May 1;23(13):3167-8; author reply 3168-70.
33. Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, et. al. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Mar;133(3):185-92. Epub 2006 Oct 7.
34. de Souza DR, Sanabani SS, de Souza AC, Filho Odone V, et. al. Prognostic impact of MYCN, DDX1, TrkA, and TrkC gene transcripts expression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 May;56(5):749-56.
35. Godbout R, Li L, Liu RZ, Roy K. Role of DEAD box 1 in retinoblastoma and neuroblastoma. *Future Oncol*. 2007 Oct;3(5):575-87.
36. Bagci O, Tumer S, Olgun N, Altungoz O. Copy number status and mutation analyses of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in 90 sporadic neuroblastoma tumors. *Cancer Lett*. 2012 Apr 1;317(1):72-7.
37. Boissan M, Lacombe ML. NM23, an example of a metastasis suppressor gene. *Bull Cancer*. 2012 Mar 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22429909
38. Godfried MB, Veenstra M, v Sluis P, Boon K, et. al. The N-myc and c-myc downstream pathways include the chromosome 17q genes nm23-H1 and nm23-H2. *Oncogene*. 2002 Mar 27;21(13):2097-101.
39. Hailat N, Keim DR, Melhem RF, Zhu XX, et. al. High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J Clin Invest*. 1991 Jul;88(1):341-5.
40. Leone A, Seeger RC, Hong CM, Hu YY, et. al. Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene*. 1993 Apr;8(4):855-65.
41. Bénard J. Genetic alterations associated with metastatic dissemination and chemoresistance in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1995;31A(4):560-4.
42. Takeda O, Handa M, Uehara T, Maseki N, et. al. An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastomas. *Br J Cancer*. 1996 Nov;74(10):1620-6.

Table 1: Human tumor metastasis PCR Array Genes

Cell Adhesion Genes:

Cell to Cell Adhesion: APC, CD44, CDH1 (cadherin-1 / E-cadherin), CDH11, CDH6, FAT, FXYD5, ITGA7, PNN, SYK, VEGF.

Transmembrane Receptors: CD44, ITGA7, ITGB3, RPSA (LAMR1).

Other Genes Related to Adhesion: CTNNA1, FN1, MCAM, MGAT5 (acetylglucosaminyltransferase V), MTSS1.

Extracellular Matrix Proteins:

Matrix Metalloproteinases: MMP10, MMP11, MMP13, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9.

MMP Inhibitors: TIMP2, TIMP3, TIMP4.

Other ECM Proteins: COL4A2 (collagen $\alpha 2(IV)$), HPSE (heparanase).

Cell Cycle Genes:

Regulation of the Cell Cycle: HRAS, IL1B, KRAS, TGFB1 (TGF- $\beta 1$), VEGFA.

Negative Regulation of the Cell Cycle: APC, BRMS1 (BrMS1), CDKN2A, MTSS1, NF2, NME1, NME2, PTEN, RB1, TP53.

Cell Cycle Arrest and Checkpoint: CDKN2A, MYC (c-myc), RB1, TP53.

Cell Growth and Proliferation Genes:

Negative Regulation of Cell Proliferation: CDKN2A, CTBP1, GNRH1, IL1B, MDM2, NF2, NME1, NME2, SSTR2.

Positive Regulation of Cell Proliferation: IGF1, IL18, TSHR, VEGFA.

Growth Factors and Hormones: GNRH1, HGF (Scatter Factor), IGF1, TGFB1 (TGF-B1), VEGFA.

Cytokines and Chemokines: CCL7, CXCL12, IL18, IL1B, TNFSF10.

Receptors: CXCR4, EPHB2, FGFR4, FLT4, KISS1R, IL8RB, MET, NR4A3, PLAUR (uPAR), RORB, SSTR2, TSHR.

Other Genes Related to Growth: DENR, EWSR1, HRAS (c-hRas), MYC (c-myc), SET, SRC (c-src), SYK, TRPM1.

Apoptosis genes:

Induction of Apoptosis: HTATIP2, IL18, TIMP3, TNFSF10, TP53.

Anti-apoptosis: HTATIP2, TGFB1.

Other Genes Related to Apoptosis: CXCR4, IL1B.

Transcription Factors and Regulators:

Transcription Factors: ETV4, HTATIP2, MTA1, MYC (c-myc), MYCL1, NME2, NR4A3, RB1, RORB, SMAD4, TCF20, TP53.

Regulators: CHD4, EWSR1, SMAD2.

Other Genes Related to Metastasis: CST7, CTSK, CTSL1 (cathepsin L), CD82 (KAI1), KISS1 (KiSS-1), METAP2, NME4.

Table 2. Assesment of apoptosis in Kelly ve SHSY5Y NB cell line groups.

	<i>Administration</i>	<i>Kelly NB cell line</i>	<i>SHSY-5Y NB cell line</i>
		<i>Apoptosis %</i>	<i>Apoptosis %</i>
Group 1	Control	5	2
Group 2	Cisplatin*	30	27
Group 3	Allicin (0,05µM)	6	3
Group 4	Resveratrol (25µM)	7	4
Group 5	Allicin (0,05µM)+Cisplatin*	33	25
Group 6	Resveratrol (25µM)+Cisplatin*	17	8

* Administration dose of Cisplatin was 20µM for Kelly NB cell line; 15µM for SHSY-5Y NB cell line

Table 3. In Kelly and SHSY-5Y neuroblastoma cell lines, the genes which show more than three fold changes in expressions by cisplatin, allicin, and allicin+cisplatin administrations.

	Kelly neuroblastoma cell line		SHSY-5Y neuroblastoma cell line	
	Gene expression		Gene expression	
	≥3 fold increase	≥3fold decrease	≥3 fold increase	≥3fold decrease
Group 2: Cisplatin	FXYD5, MCAM, CXCR4, SSTR2, CDH1	EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5	DDX1, PNN, SMAD4, DENR, SET, METAP2, SMAD2, NME2 (nm23H2)	KISS1, TNFSF10, MET, IGF1, TRPM1, MMP13, MMP7, TSHR, MMP3, CDH6, CCL7, CXCL12, CTSL1, FXYD5, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, TIMP4, SYK, CD82, HPSE, TIMP3, MYCL1, ITGB3, CDH1, ETV4, MMP10, IL18, TGFB1, FGFR4, SSTR2, HGF, FLT4, MTSS1, EWSR1, MYC, CST7, MMP9, MCAM, NR4A3, MTA1, CTBP1, CDKN2A, BRMS1, CHD4, EPHB2, SRC, FN1, MMP2, NF2
Group 3: Allicin	CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, ITGB3, VD82, TSHR, IGF1, IL18, MET, MTSS1, TGFB1, SSTR2, CST7, MCAM, EPHB2, MMP2, PLAUR, EWSR1, TIMP3, FGFR4, NF2, FLT4, SRC, CXCL12, FAT1, VEGFA, CTBP1, CHD4, MGAT5, COL4A2, MDM2, CD44, MTA1, BRMS1, CXCR4, CDH11, NR4A3, FN1, MMP9, HGF, GNRH1, HPSE, TCF20, TIMP2, HRAS, SMAD2, CTSK, CDH6, MMP11	RB1, DENR	DDX1, PNN	KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, MMP3, CCL7, TIMP4, ITGA7, IL8RB, IL1B, HTATIP2, KISS1R, FXYD5, CTSL1, SYK, MET, ETV4, MYCL1, NR4A3, ITGB3, TSHR, MYC, CXCL12, CD82, FGFR4, SSTR2, BRMS1, HPSE, FLT4, CDH1, HRAS, CST7, CTBP1, PLAUR, IL18, TGFB1, EWSR1, MMP9, TIMP3, TP53, NME1 (nm23H1), MTA1, EPHB2, SRC, MCAM, NME4, NF2, CHD4, RPSA, TIMP2
Group 5: Allicin ve Sisplatin	CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, ITGB3, TGFB1, SSTR2, MCAM, CD82, MTSS1, CST7, TSHR, IGF1, MMP2, NF2, IL18, CXCR4, EWSR1, MET, PLAUR, CTBP1, MGAT5, MDM2, FLT4, SRC, CD44, VEGFA, EPHB2, FAT1, CHD4, FGFR4, FN1, CDH11, CXCL12, MMP9, COL4A2, MTA1, NR4A3, BRMS1, TIMP3, HGF, GNRH1, TP53, TIMP2, MMP11, APC, SMAD2, HPSE, NME1 (nm23H1), CTSK, TCF20, HRAS	DENR, RB1	DDX1, PNN	KISS1, TNFSF10, MMP10, TRPM1, IGF1, MMP13, MMP7, MMP3, MET, CCL7, MYC, ETV4, MYCL1, TIMP4, ITGA7, IL8RB, IL1B, HTATIP2, KISS1R, FXYD5, CTSL1, SYK, IL18, TSHR, ITGB3, CDH1, CD82, NR4A3, CTBP1, TIMP3, CST7, EWSR1, FLT4, FGFR4, BRMS1, TP53, HRAS, PLAUR, SSTR2, TGFB1, EPHB2, MTA1, CXCL12, MTSS1, MMP9, SRC, HPSE, NME1 (nm23H1), RB1, NF2, NME4, TIMP2, MMP2, MCAM, MGAT5, CHD4, RPSA, CXCR4

Table 4. In Kelly and SHSY-5Y neuroblastoma cell lines, the genes which show more than three fold changes in expressions by cisplatin, resveratrol, and resveratrol+cisplatin administrations.

	Kelly neuroblastoma cell line		SHSY-5Y neuroblastoma cell line	
	Gene expression		Gene expression	
	≥3 fold increase	≥3fold decrease	≥3fold increase	≥3fold decrease
Group 2: Cisplatin	FXYD5, MCAM, CXCR4, SSTR2, CDH1	EPHB2, TIMP3, CDH6, RORB, COL4A2, IL18, CDH11, MGAT5	DDX1, PNN, SMAD4, DENR, SET, METAP 2, SMAD2, NME2 (nm23H2)	KISS1, TNFSF10, MET, IGF1, TRPM1, MMP13, MMP7, TSHR, MMP3, CDH6, CCL7, CXCL12, CTSL1, FXYD5, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, TIMP4, SYK, CD82, HPSE, TIMP3, MYCL1, ITGB3,CDH1, ETV4, MMP10, IL18, TGFB1, FGFR4, SSTR2, HGF, FLT4, MTSS1, EWSR1, MYC, CST7, MMP9, MCAM, NR4A3, MTA1, CTBP1, CDKN2A, BRMS1, CHD4, EPHB2, SRC, FN1, MMP2, NF2
Group 4: Resveratro l	DDX1, TGFB1, SSTR2, CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, TSHR, MTSS1, EWSR1, CD82, ITGB3, MCAM, CTBP1, MMP2, SRC, NF2, CST7, IGF1, VEGFA, IL18, FGFR4, CXCR4, CHD4, CXCL12, MGAT5, CD44, MET, FLT4, BRMS1, EPHB2, MTA1, PLAUR, FAT1, MDM2, NR4A3, CDH11, TIMP3, FN1, TP53, COL4A2, MMP9, TIMP2, HGF, NME1 (nm23H1), MMP11, HRAS, GNRH1, HPSE, CTSK	DENR, RB1, NME2	DDX1, PNN, DENR	IGF1, MMP10, CXCL12, TNFSF10, MMP7, MMP13, MET, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, KISS1, CTSL1, KISS1R, HTATIP2, IL8RB, TIMP4, FXYD5, IL1B, HPSE, ETV4, TSHR, ITGA7, MYCL1, CD82, TIMP3, EWSR1, SYK, BRMS1, ITGB3, SSTR2, HGF, CTBP1, IL18, MYC, PLAUR, CST7, MMP9, HRAS, NR4A3, FGFR4, CHD4, SRC, CDH1, FLT4, NF2, NME1 (nm23H1), MTA1, TP53, MMP2, TGFB1, MTSS1, EPHB2, CDKN2A, FN1, COL4A2, MCAM, MDM2, TIMP2, MGAT5, CD44, CXCR4, CDH11, RORB, RPSA, METAP2, NME4, APC, MMP11
Group 6: Resveratro l & Sisplatin	CCL7, CDH1, CTSL1, ETV4, FXYD5, KISS1R, HTATIP2, IL1B, IL8RB, ITGA7, KISS1, MMP10, MMP13, MMP3, MMP7, MYC, MYCL1, SYK, TIMP4, TRPM1, TNFSF10, TSHR, MTSS1, EWSR1, CD82, ITGB3, MCAM, CTBP1, MMP2, SRC, NF2, CST7, IGF1, VEGFA, IL18, FGFR4, CHD4, CXCL12, MGAT5, CD44, MET, FLT4, BRMS1, EPHB2, MTA1, PLAUR, FAT1, MDM2, TIMP3, COL4A2, TGFB1, SSTR2, CXCR4, NR4A3, CDH11, FN1, MMP9, HGF, GNRH1, HPSE, TCF20, TIMP2, HRAS, SMAD2, CTSK, CDH6, MMP11	DENR, RB1	DDX1, PNN	MET, KISS1, IGF1, TNSF10, MMP10, CXCL12, MMP13, MMP7, MMP3, CDH6, CCL7, TRPM1, CTSL1, FXYD5, HPSE, HTATIP2, IL1B, IL8RB, KISS1R, SYK, TIMP4, TSHR, TIMP3, ETV4, ITGA7, HGF, ITGB3, MYCL1, CD82, CDH1, HRAS, BRMS1, MYC, IL18, MMP9, NR4A3, SSTR2, CTBP1, EWSR1, NME1 (nm23H1), PLAUR, FLT4, CST7, EPHB2, NF2, TP53, CDKN2A, FGFR4, SRC, CDH4, COL4A2, FN1, MTA1, CD44, TGFB1, MMP2, TIMP2, MDM2, CDH11, CXCR4, MTSS1, RORB, RPSA, MCAM, METAP2, NME4, MGAT5

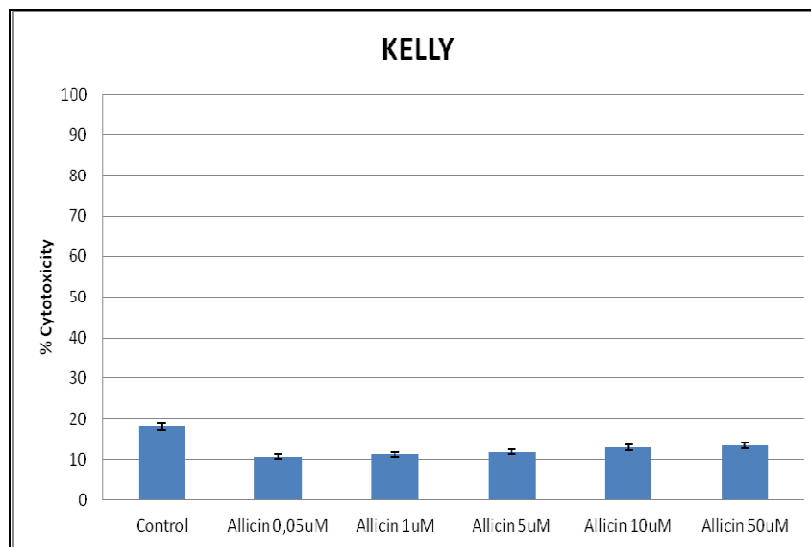


Figure1: In Kelly neuroblastoma cell line, the effects of gradually increased doses of allicin on cytotoxicity.

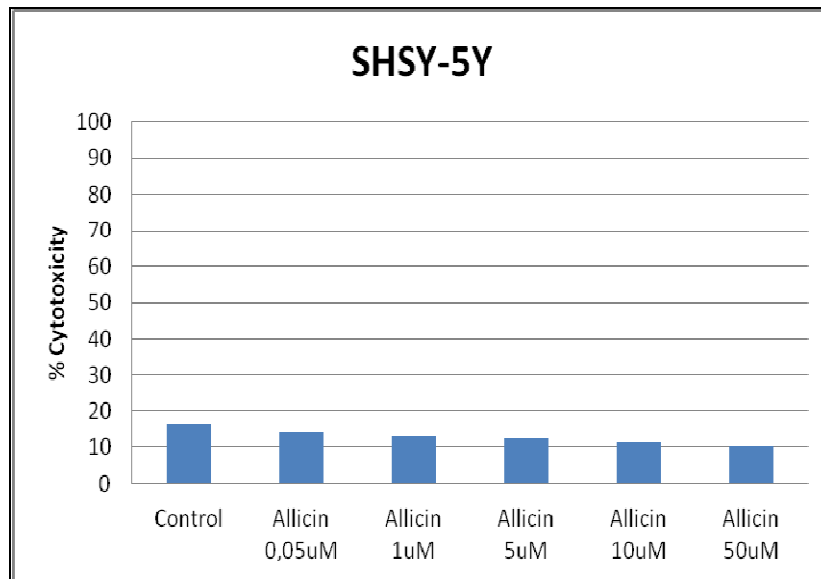


Figure2: In SHSY-5Yneuroblastoma cell line, the effects of gradually increased doses of allicin on cytotoxicity.

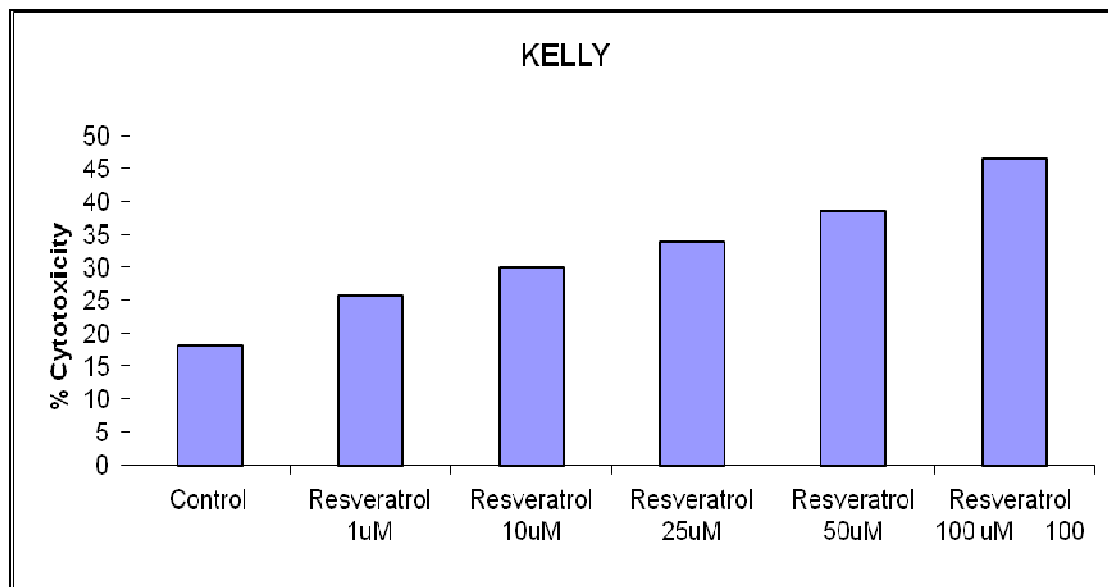


Figure3: In Kelly neuroblastoma cell line, the effects of gradually increased doses of resveratrol on cytotoxicity.

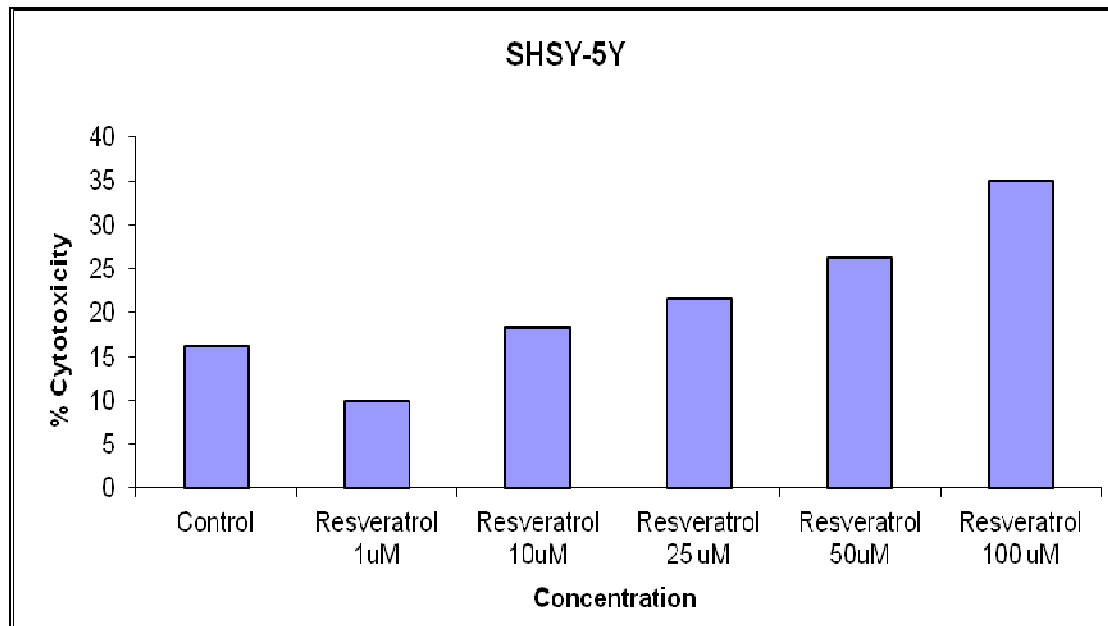


Figure4: In SHSY-5Yneuroblastoma cell line, the effects of gradually increased doses of resveratrol on cytotoxicity.

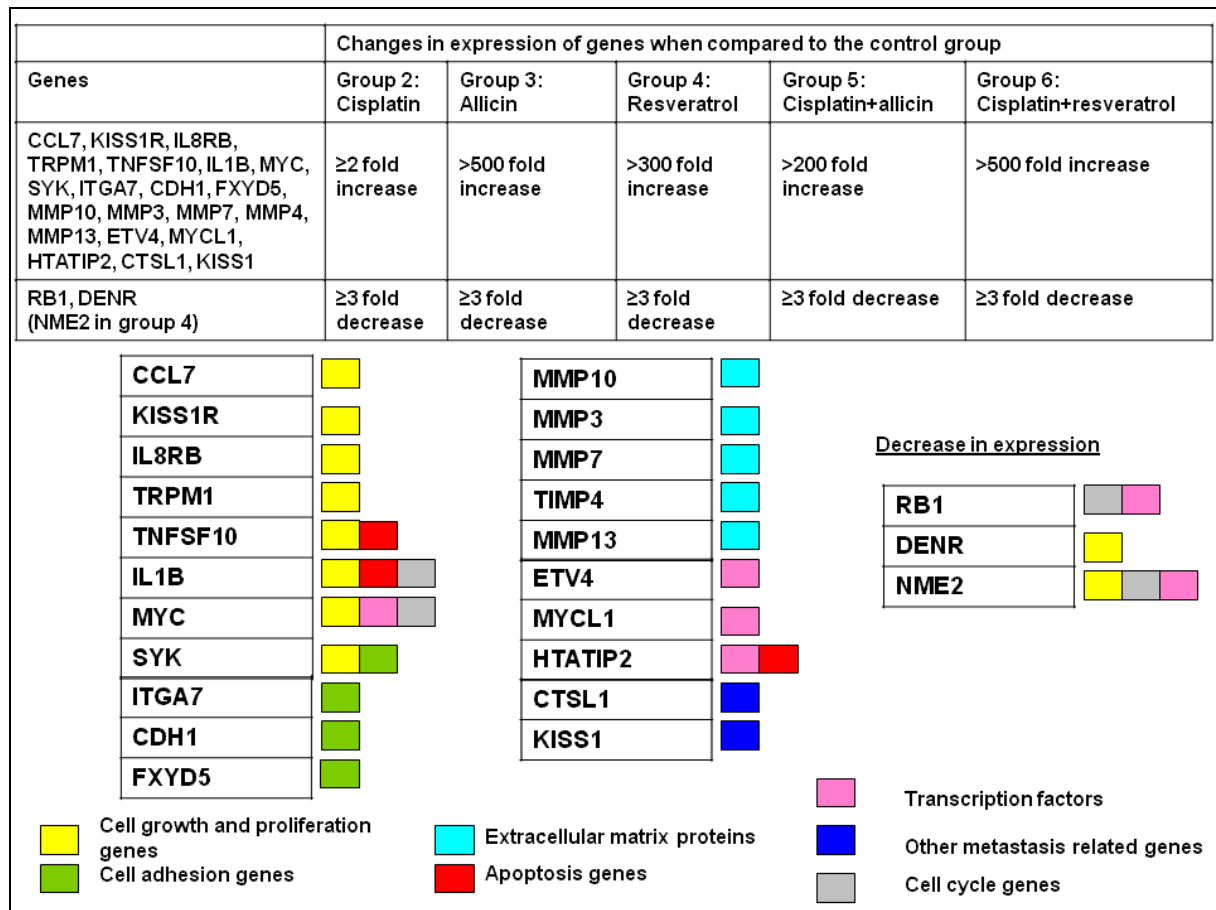


Figure 5: In Kelly neuroblastoma cell line; genes that expressions were maximally effected by administration of allicin, resveratrol and coadministration of these phytochemicals with cisplatin.

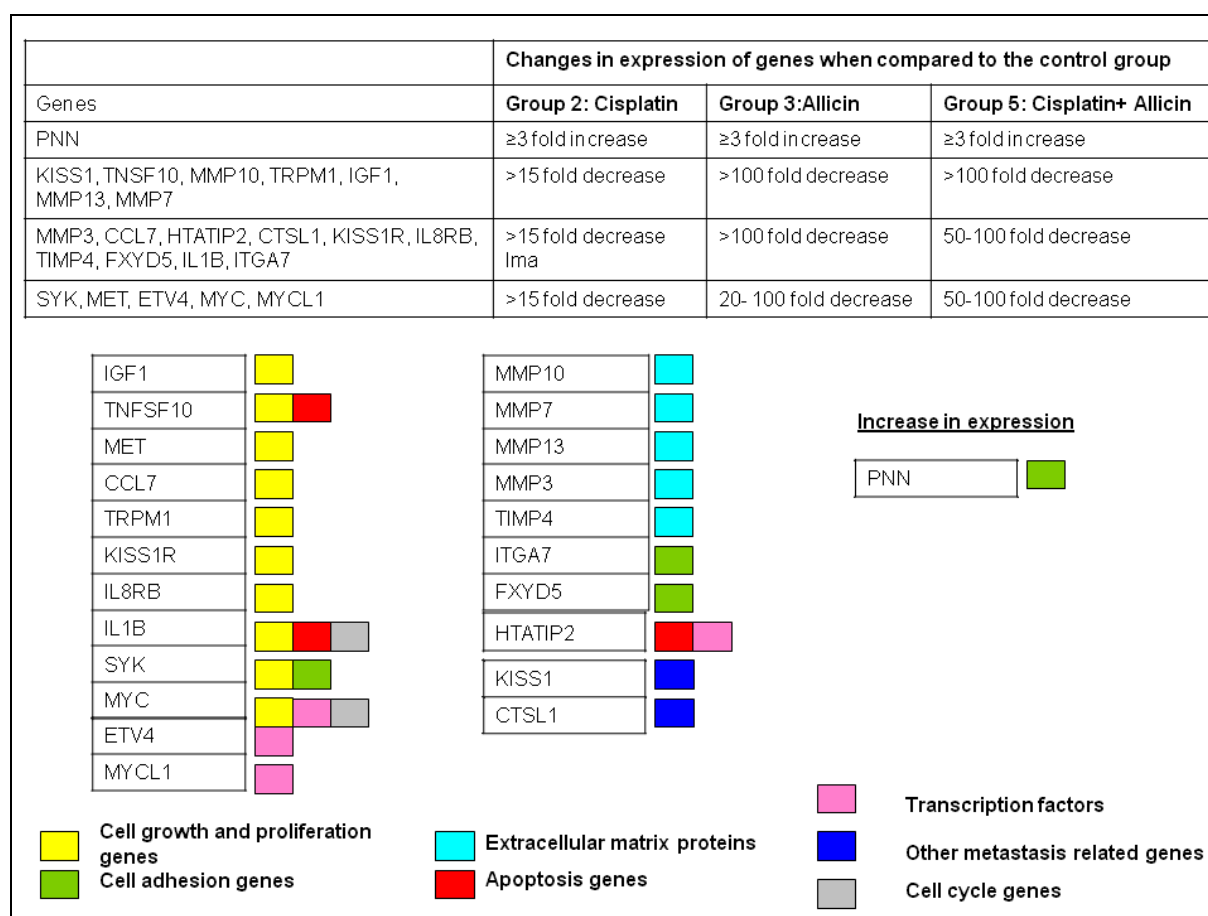


Figure7: In SHSY-5Y neuroblastoma cell lines; genes that expressions were maximally effected by administration of allicin, and coadministration of allicin with cisplatin.

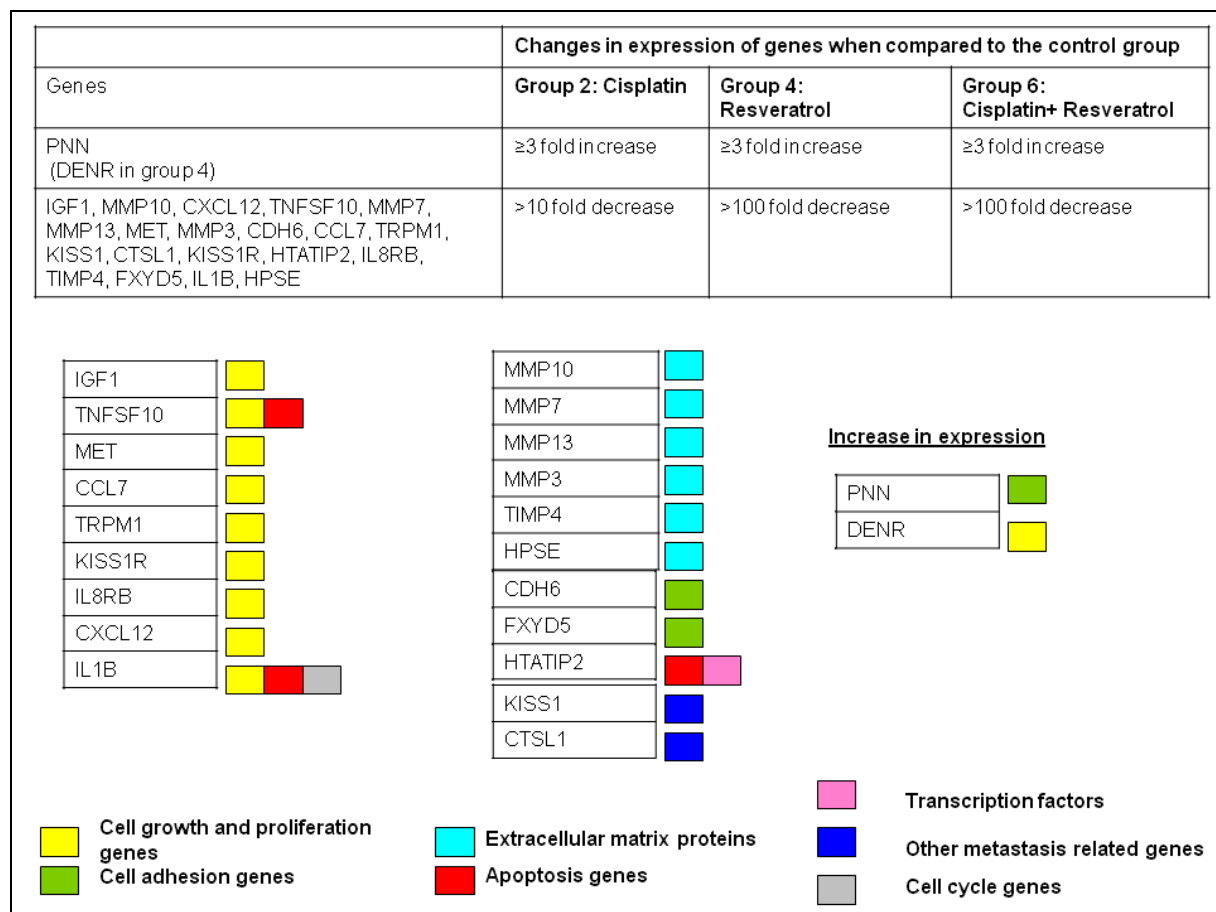


Figure8: In SHSY-5Y neuroblastoma cell lines; genes that expressions were maximally effected by administration of resveratrol, and coadministration of resveratrol with cisplatin.

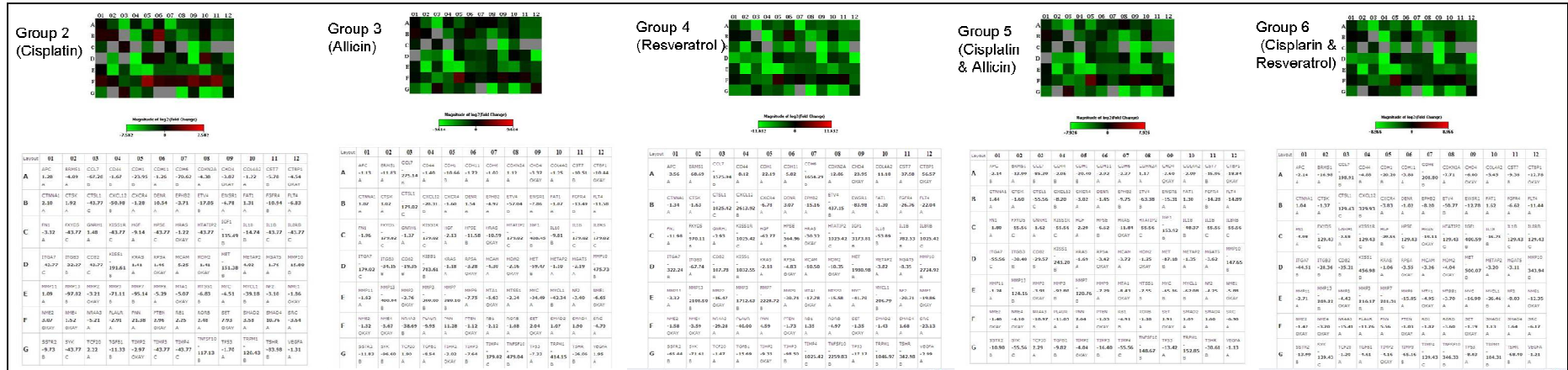


Figure 9. In SHSY-5Y neuroblastoma cell line, expressions of metastatic genes of all administration groups (groups 2-6) relative to group 1.