ARAŞTIRMA MAKALESİ / *RESEARCH ARTICLE*

Olivetol'ün SHSY-5Y Nöroblastoma Hücrelerinin Proliferasyonu ve İnvazyonu Üzerindeki İnhibe Edici Etkileri

The Inhibitory Effects of Olivetol on Cell Proliferation and Invasion of SHSY-5Y Neuroblastoma Cells

Harun Ün[1], Rüstem Anıl Ugan[2]

[1]Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Ağrı; [2]Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Famakoloji Ana Bilim Dalı, Erzurum, Türkiye

ABSTRACT

Aim: *Olivetol, is a phenolic compound found in certain species of lichen, is known with it's anti-oxidant and anti-cholinergic effects. However, the functions of olivetol in cancer cell have not been investigated yet. We evaluated the effects of olivetol on the cell proliferation and invasion of human neuroblastoma cells.*

Material and Method: *Human neuroblastoma SHSY-5Y cell line was used in this study. Olivetol was administered to groups at the doses of 50 and 100μM. Cell proliferation was analyzed by real time cell analyzer xCelligence. The expressions of matrix metalloproteinase (MMP2 and MMP9) were assessed by RT-PCR. Effects of olivetol on invasion were determined by transwell matrigel assays.*

Results: *It was investigated that olivetol inhibited human neuroblastoma SHSY-5Y cell proliferation. High dose of olivetol (100μM) almost killed the total cells at the end of the 72 hours. It was also seen that olivetol decreased MMP2 and MMP9 gene expressions of neuroblastoma cells in dose dependent manner. Looking at the invasion results, it was determined that olivetol treatment inhibited the invasion of SHSY-5Y cells.*

Conclusion: *This results showed that olivetol inhibits of neuroblastoma cell proliferations. Olivetol can be used to prevent invasion of SHSY-5Y cells, due to its inhibitory effect on MMP2 and MMP9. Olivetol can be considered as an alternative candidate in the treatment of neuroblastoma, as it suppresses matrix metalloproteinase levels.*

Key words: *olivetol; cell proliferation; neuroblastoma and matrix metalloproteinase*

ÖZET

Amaç: *Likenlerde bulunan ve fenolik yapılı doğal bir bileşik olan olivetol, antioksidan ve antikolinerjik etkisi ile bilinmektedir. Ancak olivetol'ün kanser hücreleri üzerindeki etkinliği henüz bilinmemektedir. Biz bu çalışmada olivetol'ün nöroblastoma hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonu üzerindeki etkilerini inceledik.*

Materyal ve Metot: *Bu çalışmada insan nöroblastoma SHSY-5Y hücre hattı kullanıldı. Olivetol deney gruplarına 50 ve 100μM dozlarında uygulandı. Hücre proliferasyon analizi eş zamanlı hücre sayım sistemi xCelligence ile yapıldı. Matriks metaloproteinaz (MMP2 ve MMP9) ekspresyonları RT-PCR ile analiz edildi. Olivetol'ün invazyon üzerindeki etkisi transwell matrijel deneyi ile yapıldı.*

Bulgular: *Olivetol'ün insan nöroblastoma SHSY-5Y hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edildi. Olivetol'ün 100 μM'ı hücreleri 72 saat sonunda neredeyse tamamen öldürdüğü belirlendi. Olivetol'ün MMP2 ve MMP9 ekspresyonlarını doza bağlı olarak azalttığı görüldü. İnvazyon sonuçlarına bakıldığında, olivetol'ün SHSY-5Y invazyonunu inhibe ettiği tespit edildi.*

Sonuç: *Bu sonuçlar, olivetol'ün nöroblastoma hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını göstermektedir. Olivetol, MMP2 ve MMP9 üzerindeki inhibe edici etkisinden dolayı, SHSY-5Y hücrelerinin invazyonunu önlemek için kullanılabilir. Olivetol'ün matriks metaloproteinaz seviyelerini baskılaması sebebiyle, nöroblastoma tedavisinde alternatif bir aday olabileceği düşünülebilir.*

Anahtar kelimeler: *olivetol; hücre proliferasyonu; nöroblastoma ve matriks metaloproteinaz*

Giriş

Nöroblastoma, sıklıkla bebeklik döneminde başlayan ve çocuklar arasında en sık görülen kanser türlerinden birisidir[1,2]. Klinikte tedavisi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve cerrahi yöntemlerle denenmektedir[3]. Çok sayıda anti-kanser ilacın denenmesine ve tedavide kullanılan tüm yöntemlere rağmen nöroblastoma, proliferasyonu ve migrasyonu önlenmesi zor bir kanser türüdür[4,5]. Mevcut kemoterapötik ilaçların hücre ölümünü sağladığı ancak invazyonun durdurulmasında yetersiz kaldığı için invazyonun

İletişim/Contact: *Harun Ün, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, Ağrı, Türkiye* • ***Tel:*** *0530 401 83 88* • ***E-mail:*** *bio.harun25@gmail.com* • ***Geliş/Received:*** *31.03.2020* • ***Kabul/Accepted:*** *08.06.2020*

ORCID: *Harun Ün, 0000-0003-1772-282X* • *Rüstem Anıl Ugan, 0000-0002-4837-2343*

engellenmesi için yenilikçi yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser hücrelerinin göçünü inhibe etmeyi hedefleyen yenilikçi terapötik yaklaşımların, özellikle ilaç ilişkili toksisitenin azaltılması ve hasta yaşam süresini iyileştirmesi beklenmektedir. Literatürde organik fenolik bileşiklerin kanser çalışmalarında etkili sonuçlar verdiği ve bu yenilikçi yaklaşımlar için önemli bir hedef oluşturabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır[6,7].

Olivetol, çoğunlukla likenlerde bulunan fenolik bir bileşiktir[8]. Bazı böceklerin olivetolü antiseptik ve koruyucu bir salgı olarak ürettikleri tespit edilmiştir[9]. Sentetik tetrahidrokannabinol sentezinde kullanılan Olivetol, kenevir bitkisinde olivetolik asit formunda bulunmakta ve kenevirin etkin maddesi olan kannabinoidlerin biyosentezinde rol almaktadır[10]. Kannabinoidlerin etkin maddesini oluşturduğu birçok ilacın piyasada özellikle nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir[11,12]. Son yıllarda kannabinoidlerin kanser tedavisinde kullanılabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır[13,14]. Ancak uyuşturucu ve diğer yan etkilerinden dolayı kannabinoidlerin kanser tedavisinde kullanılabilmeleri için daha fazla ön çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Olivetol kannabinoidlerin öncül maddesidir fakat herhangi bir uyuşturucu etkisinin olmaması ve fenolik yapıda bir organik madde olması sebebiyle, kanser tedavisinde kullanımının insan sağlığı açısından herhangi bir olumsuz etkisinin olmayacağını düşünmekteyiz. Literatürde olivetol'ün tümör hücreleri üzerindeki etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmada olivetol'ün SHSY-5Y hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonu üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

Materyal ve Metot

SHSY-5Y Kültür Ortamının Hazırlanması

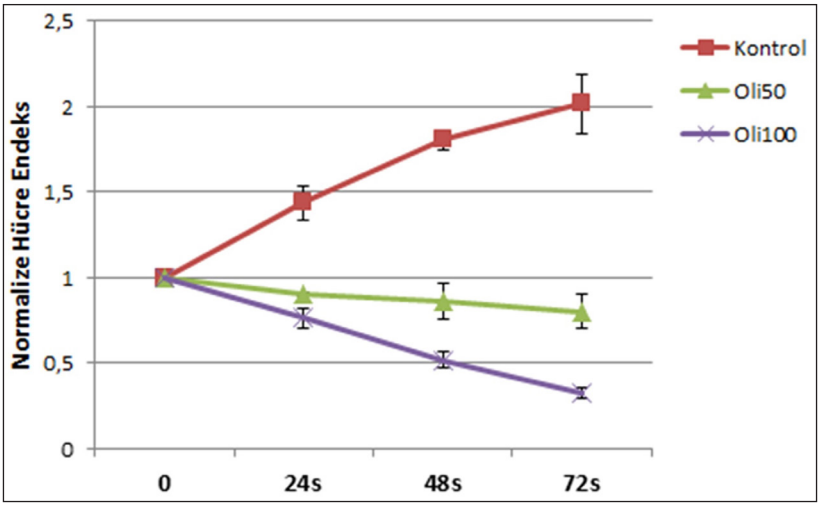
İnsan SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattı ATCC'den temin edildi. Hücreler; %10 sığır serum (FBS; Fetal Bovine Serum, Gibco, Thermo Fisher Scientific) ve %1 antibiyotik (PSA; Penicillin, Streptomycin Amphotericin, Gibco, Thermo Fisher Scientific) içeren uygun medyum (DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone, Thermo Fisher Scientific) içerisinde ve 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO_2 ortamında kültüre edildi. Hücreler gerekli çoğunluğa ulaşana kadar her 24 saatte bir kültür ortamı değiştirildi. Hücre sayımı Roche cihazı ile yapıldı. Bir ml medyum içerisinde süspanse edilen hücrelerden 10 µl hücre ve 10 µl %0,2'lik Trypan blue boyası karıştırıldı ve 10 µl karışım cihaz aparatı üzerine tatbik edilerek sayım yapıldı. Olivetol (CAS Number: 500–66–3 Sigma, Germany) hücrelere 50 ve 100µM konsantrasyonlarında uygulandı.

Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılık takibi xCelligence anlık hücre takip sistemi ile yapıldı. xCelligence hücre kuyucuklarına (Eplate), her grup dört tekrar olacak şekilde, $5x10^3$ hücre ekildi. Yirmi dört saat sonra Olivetol, tedavi gruplarına uygun dozlarda verildi ve canlılık takibine devam edildi. Yetmiş iki saat boyunca hücre takibi devam ettirildi. Yetmiş ikinci saatin sonunda xCelligence hücre empedans verisi alınarak 24, 48 ve 72. saatlerde ki hücre sayıları değerlendirmeye alındı. İlaç verildiği anda kuyucuklardaki hücre sayıları normalize edildi ve eşit kabul edildi. Daha sonra 72 saat boyunca hücre sayıları otomatik olarak kaydedildi.

İnvazyon Testi

SHSY-5Y hücrelerinin invazyon testi Tranwell (Corning Inc., NY, ABD) ile yapıldı.8,0µm lik por genişliğine sahip membran içeren Transwell kuyucukları, 24 kuyucuklu hücre plağına yerleştirildi. Membranlara matrijel (BD, Bioscience) eklenerek 16 saat etüvde bekletildi. Deneye alınacak olan SHSY-5Y hücreleri serumsuz medyum içerisinde 12 saat boyunca bekletildi. Daha sonra sayım işlemi yapılarak 200µl hücre, serumsuz medyum içerisinde $2,5x10^5$ hücre/ml olacak şekilde Transwell kuyucuklara ekildi. Hücre kuyucuklarına 750µl serumlu (%10 FBS) medyum konuldu. Daha sonra ilaç gruplarına uygun dozlarda Olivetol (50 ve 100µM) uygulanarak, plak 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda Transwell kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı ve 2 kez PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra kuyucuklara %3,7 lik formaldehit eklenerek 2 saat boyunca 37°C'de hücreler fikse edildi. Formaldehit uzaklaştırıldı ve %100 lük methanol eklenerek 20 dk oda sıcaklığında hücre permabilizasyonu sağlandı. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra Transwell kuyucukları 2 kez PBS ile yıkandı ve 200µl %0,1'lik Crystal Violet (Sigma Aldrich, Almanya) boyası uygulandı. Karanlıkta 15 dakika bekletildikten sonra Traswell kuyucukları PBS ile yıkandı ve steril pamuk çubuk ile temizlendi. Daha sonra ışık mikroskobu (Leica) ile invaze olan hücreler sayıldı. Her grup 3 tekrar olacak şekilde deney prosedürüne alındı ve ortalama hücre sayılarına göre grafik çizildi.



Şekil 1. *Hücre proliferasyon sonuçları.*

RT-PCR Gen Ekspresyon Analizi

SHSY-5Y hücreleri (1x10^5 hücre/2 ml medyum) altı kuyucuklu hücre plağına ekildi. Hücreler 24 saat 37˚C sıcaklık, %95 nem and %5 CO_2 ortamında inkübe edildi. Hücrelere uygun dozlarda Olivetol (50 ve 100μM) kuyucuklara uygulandı ve altı saat boyunca tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki hücreler kazınarak Qiacube (Qiagen, Hilden, Almanya) ile mRNA izolasyonu (Qiagen, RNaeasy mini kit-74104) yapıldı. RNA örnekleri (High-capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystem) kit prosedürüne göre cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA miktarları Take3 Plate (Epoch Spectrophotometer System, Biotek) ile belirlendi. Her gruptan 200ng cDNA'dan PCR cihazı ile (StepOne Plus Real Time PCR System technology, Applied Biosystem) MMP-2 (Hs01548727_m1) ve MMP-9 (Hs00957562_m1) ekspresyon analizi yapıldı. Kantitatif PCR analizi, TaqMan prob karışımlı solüsyon (Taqman Probe-based technology, Applied Biosystem) ile yapıldı. Beta actin geni endojen kontrol olarak kullanıldı. RT-PCR analizi için optik PCR plakları kullanıldı ve her grup 3 tekrar çalışıldı. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı[15] ve kontrol grubuna göre kat değişimi olarak verildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 20.0 software (IBM, ABD) programı ile yapıldı ve grafiklerde standart hata çubukları ile birlikte verildi. Analiz sonuçları one-way ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırmalı test ile yapıldı. Anlamlı farklılıklar tüm grupların kendi aralarında kıyaslanmasıyla belirlendi. Kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında * sembolü (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001), Oli50 ve Oli100 grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise # sembolü (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001) kullanıldı.

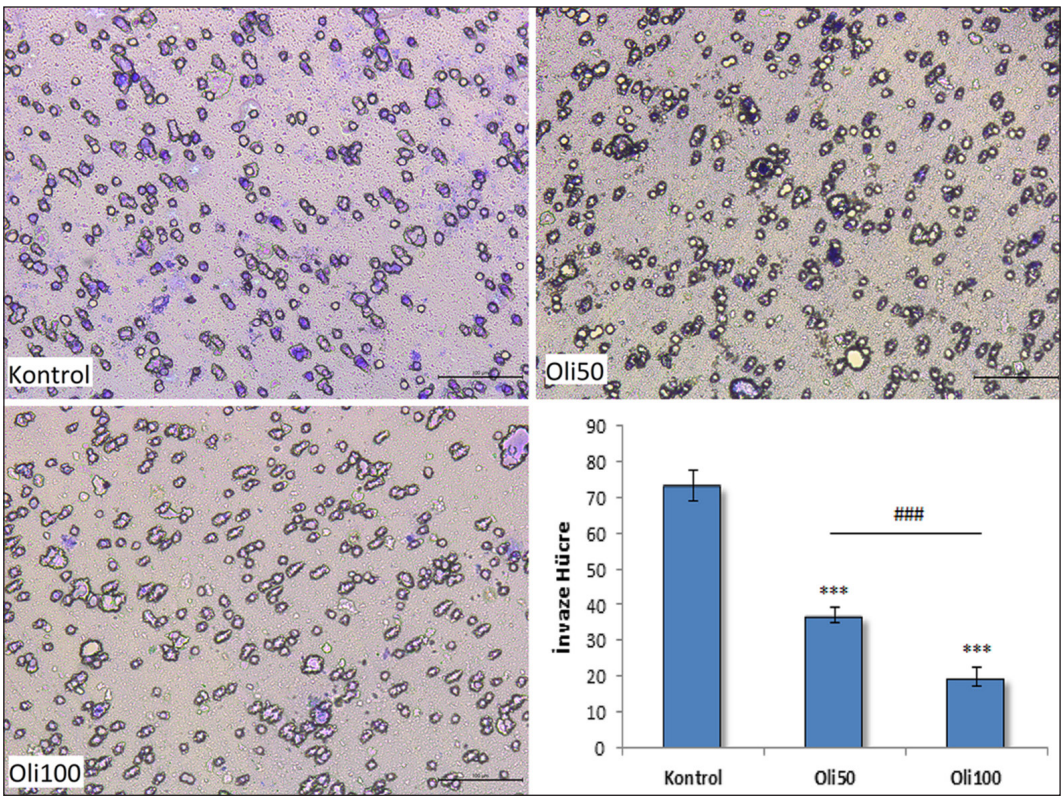
Sonuçlar

Hücre Canlılığı

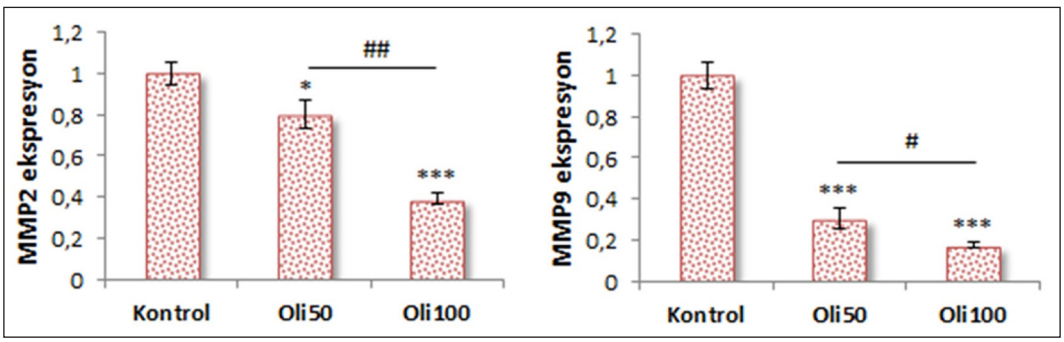
Olivetol'ün SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri xCelligence hücre canlılığı takip sistemi ile tespit edildi. Kontrol grubu hücrelerinin 72 saat boyunca artış gösterdiği tespit edildi. Olivetol'ün ilk uygulandığı andan itibaren SHSY-5Y hücre sayılarını önemli derecede azaltmaya başladığı görüldü. Olivetol uygulanan gruplarda (Oli50 ve Oli100) hücre sayılarının azaldığı ve bu azalmanın doza bağlı olduğu görüldü (Şekil 1).

İnvazyon Sonuçları

Transwell kuyucukları kullanılarak yapılan invazyon testi sonuçları Şekil 2'de gösterildi. Kontrol grubu SHSY-5Y hücrelerinin membran tabanına diğer gruplara kıyasla daha fazla invaze olduğu tespit edildi. Şekilde görüldüğü gibi 50 ve 100 μM olivetol uygulamalarının invaze olan hücre sayısını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlendi (p<0,001). Olivetol grupları kendi aralarında kıyaslandığında Oli100 grubundaki hücre sayılarının Oli50 grubuna göre anlamlı derecede daha az olduğu görüldü (p<0,001).



Şekil 2. *İnvazyon sonuçları.*



Şekil 3. *MMP2 ve MMP9 ekspresyon sonuçları.*

RT-PCR Gen Ekspresyon Sonuçları

Olivetol'ün MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonları üzerindeki etkileri Şekil 3'te gösterildi. Olivetol uygulaması ile MMP9 ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ($p<0,001$) ve bu azalmanın doza bağlı olarak Oli100 grubunda istatistiksel olarak daha fazla anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$). Benzer sonuçların görüldüğü MMP2 ekspresyonlarının 100 μM olivetol uygulanan grupta, kontrol ($p<0,001$) ve Oli50 ($p<0,01$) grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi.

Tartışma

Bu çalışmada olivetol'ün nöroblastoma SHSY-5Y hücrelerinin invazyon ve proliferasyonunu önlediğini ve bu etkisinin matriks metaloproteinaz enzimlerini baskılayarak yaptığını gösterdik. Bu sonuçlar ile doğal bir fenolik bileşik olan olivetol'ün nöroblastoma gibi yüksek metastatik kanser türlerinde koruyucu rollerinin olduğunu tespit ettik.

Nöroblastoma sempatik sinir sistemini etkileyen kompleks bir hastalıktır[16]. Nöroblastoma ile ilişkili

mortalitelerin çoğu, lenf düğümlerine ve kemiklere metastazı nedeniyle ortaya çıkar[17,18]. Bu nedenle kanser hücre invazyonu ve migrasyonunun engellenmesi metastazın önüne geçmek için önemli bir adımdır[19]. Nöroblastoma hücre invazivliği ve metastazı, tümör hücrelerinin, primer tümörden ayrılması ve kan dolaşımına veya lenfatik sisteme girmesi için ekstraselüler matriksi (ECM) parçalama yeteneğine, ardından uzak bölgelere giderek yeniden bağlanma yeteneğine bağlıdır[20]. Matriks Metalloproteinazlar (MMP), metastatik, agresif veya invaziv tümör fenotipleri ile ilişkili olduğu bilinen MMP2 ve MMP9 jelatinazları ile önemli bir ECM bozundurucu enzimler sınıfıdır[21]. Bu nedenle, MMP2 ve MMP9'un inhibisyonu, erken tümör evrelerinde metastaz oluşumu ve kanser ilerlemesini inhibe etmek için yararlı bir strateji olabilir. Bizim çalışmamızın sonuçları, olivetolün MMP2 ve MMP9'un mRNA'sını ve protein ekspresyonunu inhibe ettiğini gösterdi, bu da olivetolün MMP2 ve MMP9'u azaltarak SHSY-5Y hücrelerinin göçünü ve ilerlemesini belirgin bir şekilde engelleyebileceğini desteklemektedir.

Fenolik bileşiklerin vasküler endotelyal hücrelerde MMP2 ve MMP9 seviyelerini baskıladığı ve böylece dejeneratif hastalıklar için koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir[22]. MMP2 ve MMP9 enzimlerinin azalması ile tümör hücrelerinin büyümesi ve invazyonu azaltılmıştır[23]. Sentetik MMP inhibitörleri tümör metastazı ve büyümesine karşın denenmiş ancak ciddi yan etkileri olduğu tespit edilmiştir[24]. Ancak MMP inhibitörlerinin özellikle invazyon üzerindeki etkinliği birçok çalışma ile desteklenmiştir[25,26]. Bu nedenle doğal bileşiklerin tümör baskılayıcı etkilerinin araştırılması çalışmalarında MMP enzimleri hedef haline gelmiştir[27]. Doğal bir fenolik asit olan protokateşuik asidin MMP enzim seviyesini baskılayarak akciğer kanserinin baskılanmasını sağlamıştır[28]. Bir başka fenolik bileşik olan ferulik asidin melonama ve HUVEC hücrelerinde MMP protein seviyelerini baskıladığı tespit edilmiştir[29]. Bizde bu çalışmada fenolik bir bileşik olan olivetol'ün MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonlarını baskıladığını tespit ettik. Bu sonuç ile birlikte olivetol'ün, tümör mikroçevresinde aşırı miktarda eksprese olarak tümör hücrelerinin vasküler yapılara invaze olmasını sağlayan MMP enzimlerini baskılayarak nöroblastoma SHSY-5Y hücrelerinin invazyonunu azaltabileceğini gösterdik.

Doğal fenolik bileşiklerin anti-oksidan etkileri yapılan birçok çalışma ile tespit edilmiştir. Radikal süpürücü etkileri ile fenolik bileşikler kanser oluşum riskini de azaltmaktadır[30]. Yapılan bir in vitro çalışmada Olivetol'ün antioksidan etkinliği tespit edilmiştir[31]. Bu bileşiklerin primer olarak gösterdikleri antioksidan etkilerinin yanında karsinogenez üzerinde geniş spektrumlu bir biyolojik etkilerinin varlığı da tespit edildi[27]. Bu konuda yapılan çalışmalar fenolik bileşiklerin özellikle polifenollerin kanser oluşumunu engellediğini göstermektedir[27,32]. Tümör hücre büyümesi ve proliferasyonu üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir[33]. Fenolik yapılı doğal bileşiklerin insan tümör hücre hatlarında anti-proliferatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir[34]. Fenolik bileşiklerin anti-proliferatif etkinliklerinin ve dolayısıyla potansiyel anti-kanser etkilerinin aromatik halkaları ve hidroksilik gruplarından kaynaklandığı belirtilmiştir[35]. Bizim çalışmamızda da Olivetol nöroblastoma hücre hattı üzerinde anti-proliferatif bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Olivetol'ün kanser çalışmalarında kullanıldığını gösteren bir kaynak bulunmamaktadır. Bu çalışma da biz olivetol'ün daha önce yapılan fenolik bileşiklerin etkilerine benzer şekilde SHSY-5Y hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını tespit ettik.

Bitkisel fenolik bileşiklerin tümör büyümesi ve hücre proliferasyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmesine rağmen, kanser hastalığının mortalitesi ve tedavide görülen eksiklikler nedeniyle bu konuda daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Olivetol bu konuda daha az çalışılmış ve etkinliği henüz tam olarak bilinmeyen bir doğal bileşiktir. Bu çalışmada olivetol'ün insan nöroblastoma SHSY-5Y hücre hattında anti-proliferatif ve anti-invazif etkili olduğunu gösterdik. Olivetol'ün matriks metalloproteinaz seviyelerini baskıladığını gösterdik, ancak hangi hücre içi mekanizmalar üzerinden bu etkiyi gösterdiği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013;63(1):11–30.
2. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. Lancet 2007;369(9579):2106–2120.
3. Lee S, Qiao J, Paul P, Chung DH. Integrin beta1 is critical for gastrin-releasing peptide receptor-mediated neuroblastoma cell migration and invasion. Surgery 2013;154(2):369–75.
4. Beierle EA, Ma X, Stewart J, Nyberg C, Trujillo A, Cance WG, et al. Inhibition of focal adhesion kinase decreases tumor growth in human neuroblastoma. Cell Cycle 2010;9(5):1005–15.

5. Hayashi M, Okabe K, Kato K, Okumura M, Fukui R, Fukushima N, et al. Differential function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. Cancer Lett 2012;316(1):91–6.
6. Solarova Z, Liskova A, Samec M, Kubatka P, Busselberg D, Solar P. Anticancer Potential of Lichens' Secondary Metabolites. Biomolecules 2020;10(1).
7. Muller AG, Sarker SD, Saleem IY, Hutcheon GA. Delivery of natural phenolic compounds for the potential treatment of lung cancer. Daru 2019;27(1):433–49.
8. Oettl SK, Gerstmeier J, Khan SY, Wiechmann K, Bauer J, Atanasov AG, et al. Imbricaric acid and perlatolic acid: multi-targeting anti-inflammatory depsides from Cetrelia monachorum. PLoS One 2013;8(10): e76929.
9. Attygalle AB, Siegel B, Vostrowsky O, Bestmann HJ, Maschwitz U. Chemical composition and function of metapleural gland secretion of the ant, Crematogaster deformis smith (hymenoptera: Myrmicinae). J Chem Ecol 1989;15(1):317–28.
10. Taura F, Tanaka S, Taguchi C, Fukamizu T, Tanaka H, Shoyama Y, et al. Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. FEBS Lett 2009;583(12):2061–6.
11. Russo EB. Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. Ther Clin Risk Manag 2008;4(1):245–59.
12. Keating GM. Delta-9-Tetrahydrocannabinol/Cannabidiol Oromucosal Spray (Sativex((R))): A Review in Multiple Sclerosis-Related Spasticity. Drugs 2017;77(5):563–74.
13. Velasco G, Sanchez C, Guzman M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. Nat Rev Cancer 2012;12(6):436–44.
14. Abrams DIGuzman M. Can Cannabis Cure Cancer? JAMA Oncol 2020.
15. Livak KJSchmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. Methods 2001;25(4):402–8.
16. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. Nat Rev Cancer 2003;3(3):203–16.
17. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 1999;341(16):1165–73.
18. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. J Clin Oncol 2009;27(2):298–303.
19. Steeg PSTheodorescu D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. Nat Clin Pract Oncol 2008;5(4):206–19.
20. Wittekind CNeid M. Cancer invasion and metastasis. Oncology 2005;69Suppl 1:14–6.
21. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell 2010;141(1):52–67.
22. Calabriso N, Massaro M, Scoditti E, Pellegrino M, Ingrosso I, Giovinazzo G, et al. Red Grape Skin Polyphenols Blunt Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Activity and Expression in Cell Models of Vascular Inflammation: Protective Role in Degenerative and Inflammatory Diseases. Molecules 2016;21(9).
23. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. Int J Mol Sci 2016;17(6).
24. Tonn JC, Kerkau S, Hanke A, Bouterfa H, Mueller JG, Wagner S, et al. Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro. Int J Cancer 1999;80(5):764–72.
25. Radisky ES, Raeeszadeh-Sarmazdeh M, Radisky DC. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. J Cell Biochem 2017;118(11):3531–48.
26. Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. Mol Cancer Ther 2018;17(6):1147–55.
27. Amawi H, Ashby CR, Samuel T, Peraman R, Tiwari AK. Polyphenolic Nutrients in Cancer Chemoprevention and Metastasis: Role of the Epithelial-to-Mesenchymal (EMT) Pathway. Nutrients 2017;9(8).
28. Tsao SM, Hsia TC, Yin MC. Protocatechuic acid inhibits lung cancer cells by modulating FAK, MAPK, and NF-kappaB pathways. Nutr Cancer 2014;66(8):1331–41.
29. Yang GW, Jiang JS, Lu WQ. Ferulic Acid Exerts Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity by Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor 1-Mediated Angiogenesis. Int J Mol Sci 2015;16(10):24011–31.
30. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radic Res 1995;22(4):375–83.
31. Taslimi P, Gülçin I. Antioxidant and anticholinergic properties of olivetol. Journal of Food Biochemistry 2018;42(3): e12516.
32. Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. Nutr J 2016;15(1):99.
33. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JA. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. Nutr Res Rev 2000;13(1):79–106.
34. de Oliveira CB, Comunello LN, Maciel ES, Giubel SR, Bruno AN, Chiela EC, et al. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from Baccharis trimera in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action. Molecules 2013;18(9):11022–32.
35. Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. Cancer Lett 2000;153(1–2):51–6.