

Oleuropein'in Prostat (PC-3), Meme (MCF-7) ve Hepatoma (HEP3B) Kanser Hücrelerinde Anti-tümör Etkisinin Belirlenmesi

Feray KÖÇKAR*

Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

Meltem AYDIN

Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Balıkesir, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar

e-posta: : fkoçkar@balikesir.edu.tr

Geliş Tarihi : 31.01.2010

Kabul Tarihi : 27.02.2010

Özet

Bu çalışmada zeytin yaprağındaki en önemli fenolik bileşik olan oleuropein'in insan hepatoma (Hep3B), insan meme adenokarsinom (MCF-7) ve insan prostat kanser modeli (PC-3) hücrelerindeki anti-tümör aktivitesi araştırılmıştır. Hücreler, 24, 48 ve 72 saat sürelerinde, farklı konsantrasyonlarda oleuropein ile muamele edilmiştir. Oleuropein'in antitümör etkisi, her zaman aralığı için belirlenen dozlarda uygulama yapılan hücrelerde MTT testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel analiz (One-way anova) ile yorumlanmıştır. Oleuropeinin doza spesifik antitümör etkisi olduğu MCF-7 ve PC-3 hücre hattında belirlendi. Ayrıca, oleuropein'in hücre tipine spesifik olarak farklı etki gösterdikleri belirlenmiştir. Oleuropein insan hepatoma hücresinde (Hep3B) hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Oleuropein, anti-tümör etki, Hep3B, PC3, MCF-7, MTT

Determination of the Antitumor Effects of Oleuropein in Prostate (PC-3), Breast (MCF-7) and Hepatoma (Hep3B) Cells

Abstract

In the present study, the antitumor effects of oleuropein which the most important phenolic compounds in olive leave extract were investigated in Human hepatoma cells (Hep3B), Human breast adenocarcinoma (MCF-7) and human prostate cancer models (PC-3). Different concentration oleuropein were incubated in corresponding cells for 24h, 48h and 72h incubations. Antitumor effect of oleuropein was determined by MTT test was performed in each time points. The results were analyzed statistically by one way ANOVA test. The dose-dependent antitumor activity of oleuropein was determined in MCF-7 and PC-3 cells. In addition, the differential effect was observed due to the cell type specific activity of oleuropein since oleuropein led to the increase of cell proliferation in human hepatoma cells (Hep3B)

Key words: Oleuropein, anti tumor effect, Hep3B, PC3, MCF-7, MTT

GİRİŞ

Günümüzde yapılan çalışmalar ışığında genel bir kanı vardır ki Akdeniz diyeti beslenme tarzı kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi ciddi hastalıkları önlemede başarılı olmaktadır. Akdeniz diyetinin koruyucu etkisi meyve ve sebze açısından zengin olması ve zeytin ürünlerinden ileri gelmektedir. Beslenme üzerine yapılan birçok klinik çalışmada sadece meyve ve sebze açısından zengin beslenen kişilerle, buna ilave zeytin tüketen kişiler arasında bahsi geçen hastalıklar açısından ölüm oranının eşit olmadığı. Sebze ve meyveye ilave olarak zeytin ürünleri tüketen kişilerin bu hastalıklardan dolayı ölüm oranlarının daha az olduğu gösterilmiştir. 2003 yılında Filik ve Özyılkan'ın çalışmalarında zeytinin kansere karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Özellikle kansere olan etkisinin araştırılmaya başlandığı son yıllarda zeytinin en önemli bileşenlerinden olan oleuropein büyük ilgi görmektedir [1-6].

Oleuropein zeytin yaprağında bulunan en önemli fenolik bileşiktir. Ayrıca zeytin yağı ve meyvesinde de bulunmaktadır. Zeytin ve bileşenlerinin birçok kanser türünde anti-tümör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Fenolik bileşikler, gıdalarda bulunan ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri kanıtlanmış bileşiklerdir. Bu bileşikler, yağ elde etme işlemi sırasında yağa geçerek yağ oksidasyona karşı korur ve zeytinyağının lezzet özelliğini sağlarlar. Bu bileşikler insan sağlığı için zararlı olan oksidasyon ürünlerinin oluşmasını önlerler. Oleuropein reaktif oksijeni ve nitrojen türlerini uzaklaştırmaktadır [7-11].

Birçok hastalık açısından önemli etkiye sahip olduğu bilinen oleuropeinin farklı hücre hatlarında olan etkisi bu çalışmanın konusunu oluşturmaktadır. Bu çalışmada karaciğer kanser modeli olan Hep3B, prostat kanser modeli PC-3 ve meme kanseri modeli MCF-7 hücre hatlarında oleuropeinin anti tümör etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

İnsan hepatoma hücre hattı (Hep3B), ECACC'den (European Collection of Animal Cell Cultures), insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve insan prostat kanser hücre hattı (PC3) hücreleri Prof. Dr. İsmet Deliloğlu GÜRHAN'dan temin edilmiştir. Kullanılan bütün hücre kültürü materyalleri Greiner ya da Gibco'dan satın alındı.

Hücre Kültürü

İnsan hepatoma hücre hattı (Hep3B), insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve insan prostat kanser hücre hattı (PC-3) hücreleri, 15ml medyumda 75cm² flasklarda, içerisinde 0,2 mM L-Glutamin ve % 10 ısı ile inaktive edilmiş FCS (Fertal Calf Serum) içeren DMEM medyumunda, 37°C'de %5 CO₂ atmosferinde büyütüldü.

Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamak için, üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, 1mm² alan, 0.1mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı kullanılır. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilüsyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücreler oleuropein uygulamasından önce 96 kuyulu kültür kaplarına her kuyu için 5000 hücre olacak şekilde trypan blue uygulaması ile sayılarak konulmuş ve hücrelerin buldukları yüzeye tutunmaları için 24 saat beklenmiştir.

Oleuropein Uygulaması

Steril distile su içerisinde çözölen oleuropein 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek steril edildi. 3mg/mL, 2mg/mL, 1mg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL, 30µg/mL, 10µg/mL, 5µg/mL son konsantrasyonlarda olacak şekilde 96 kuyulu kültür kaplarındaki hücreler üzerine uygulandı.

MTT Testi:

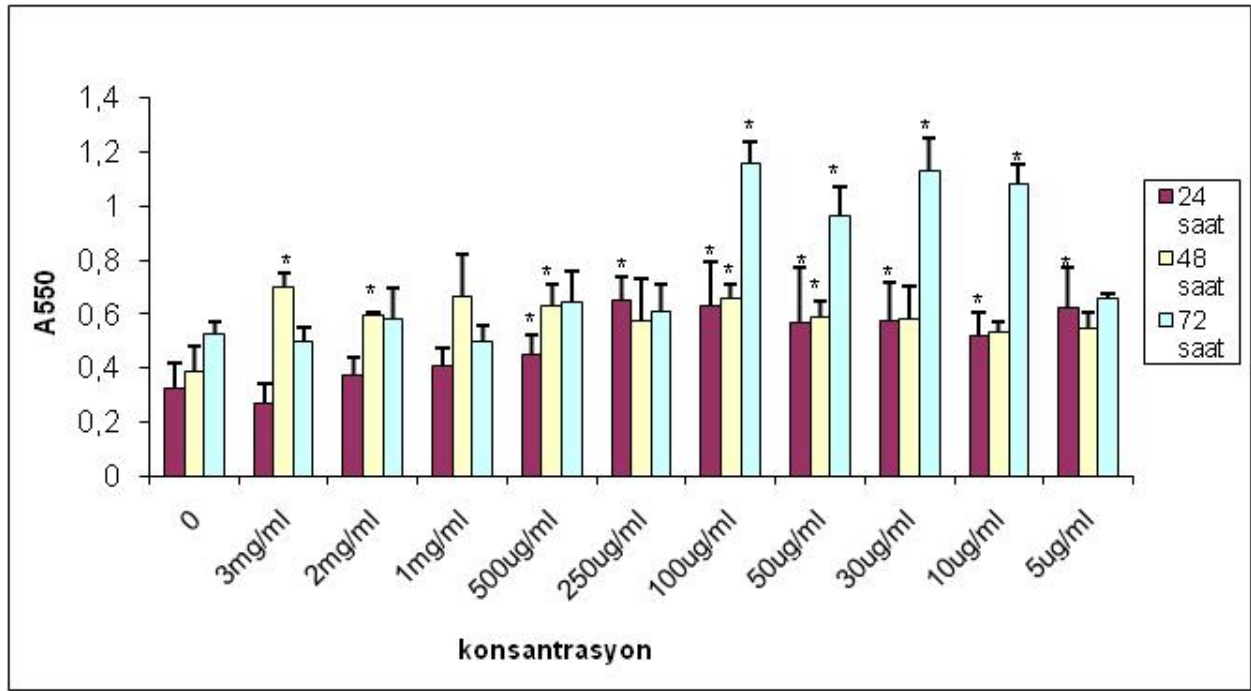
20µl MTT solusyonu herbir kuyuya uygulanmış ve hücrelerin MTT'yi metabolize etmeleri için 37°C'de 2 saat beklenmiştir. Medyum uzaklaştırılmıştır. 0,004M HCl içeren isopropanol uygulanarak oluşan Formazan kristalleri çözölmeleri için 150 rpm de 10 dakika çalkalanmıştır. Hücrelerin 550nm dalga boyunda absorbans değerleri alınmıştır.

İstatistiksel Analiz:

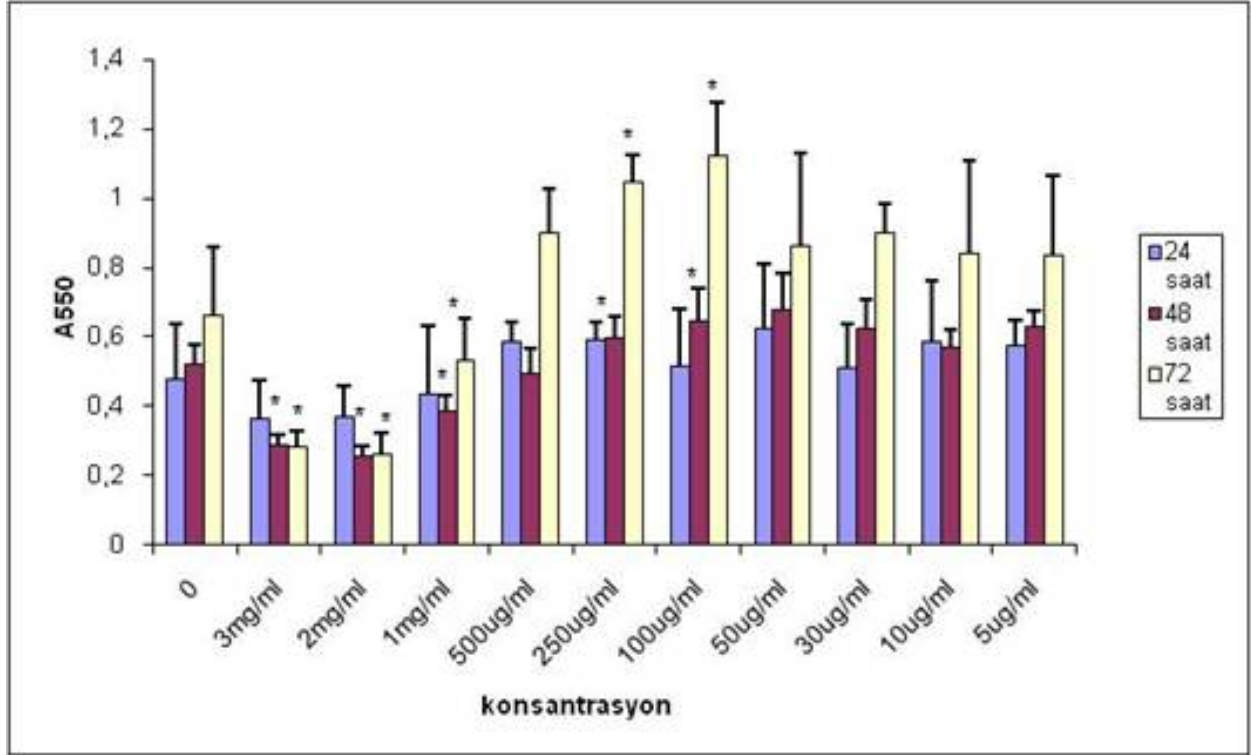
İstatistiksel analiz için Minitab 15. programı kullanıldı (ANOVA). İstatistiksel olarak p≤0.05 ise anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

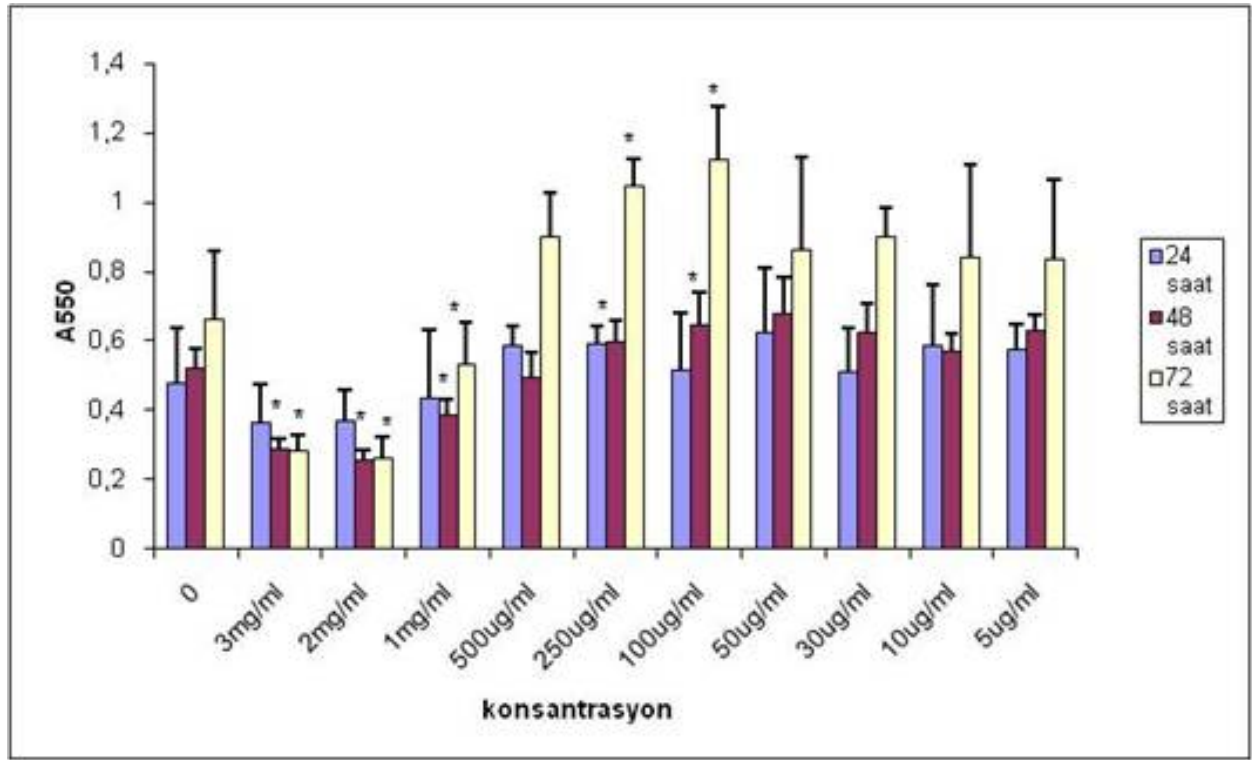
Oleuropein maddesinin farklı hücre hatlarında anti-tümör aktivitesinin belirlenmesi amacıyla MTT testi kullanıldı. Hep3B, MCF-7 ve PC-3 hücreleri farklı konsantrasyonlarda oleuropein ile (3mg/mL, 2mg/mL, 1mg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL, 30µg/mL, 10µg/mL, 5µg/mL) farklı zaman aralıklarında (24saat, 48saat, 72saat) inkübe edildi. Daha sonra hücrelerin canlılık oranlarını belirlemek için MTT yapıldı. Deneyler her defasında 6 lı ve en az iki bağımsız deney olacak şekilde dizayn edilmiştir. Alınan absorbans sonuçlarına göre istatistiksel analiz yapıldı. Şekil 1'de Hep 3B hücrelerine ait sonuçlar gösterilmiştir. Hep3B hücrelerinde, oleuropein 24, 48 ve 72 saatte, kontrol grubuna göre, proliferasyonda artış görölmüştür. PC-3 Prostat kanser ve MCF-7, meme kanseri modelinde, 24 saatlik biz zaman diliminde herhangi bir etki gözükmezken, 48 ve 72 saatte 3mg\ml, 2mg\ml, 1mg\ml konsantrasyonlarda, hücre canlılığında, istatistiki olarak anlamlı bir azalış görölmektedir (p<0.05). Sitotoksik etkide azalış diğer konsantrasyonlarda düşmekte ve istatistikî anlamlı azalış görölmemektedir. PC-3 hücrelerinde, ise 72 saate 250ug\ml ve 100ug\ml konsantrasyonlarda istatistiki olarak anlamlı artış dikkat çekmektedir. Prostat hücrelerinde 3mg\ml, 2mg\ml ve 1mg\ml azalışa karşılık daha düşük konsantrasyonlarda 250ug\ml, 100ug\ml konsantrasyonlarda anlamlı artış dikkat çekicidir. Şekil 3'de MCF-7 hücrelerine ait sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 1 24, 48 ve 72 saatte, 10 farklı konsantrasyonda oleuropein uygulanmış İnsan hepatoma modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. O, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir. * İstatistiki analizler sonucu anlamlı görülen yani $p < 0.05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.



Şekil 2 24, 48 ve 72 saatte, 10 farklı konsantrasyonda oleuropein uygulanmış prostat kanser modeli PC-3 hücrelerinin sitotoksik değerleri. O, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir. * İstatistiki analizler sonucu anlamlı görülen yani $p < 0.05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.



Şekil 3 24, 48 ve 72 saatte, 10 farklı konsantrasyonda oleuropein uygulanmış İnsan meme kanseri modeli MCF-7 hücrelerinin sitotoksik değerleri. O, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir. * İstatistikî analizler sonucu anlamlı görülen yani $p < 0.05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

1800 yıllarda zeytinin acı bileşenleri malarya ile meydana gelen ateşin giderilmesinde kullanılmıştır. Sonraki çalışmalar zeytinin anti-mikrobiyal, anti-viral ve anti-fungal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [12, 13]. 1960 yılında, Panizzi and Oriente oleuropein maddesini izole etmişlerdir [14]. 1970 yılında kimyasal yapısı Inouye ve arkadaşları tarafından aydınlatılmıştır [15]. Saffaştırılan oleuropein ve metaboliti olan elenolic asidin anti-mikrobiyal, anti-viral ve anti-fungal özellikleri araştırılmıştır [16]. Sonraki çalışmalar oleuropein maddesinin çok güçlü bir anti-oksüdant [17, 18] ve hipoglisemik [19] bir ajan olduğunu göstermiştir.

Ayrıca kalp hastalıklarına karşı koruyucu ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkisinin olduğu gösterilmiştir [20, 21]. Ayrıca, toksikolojik olarak, birçok hayvan türünde oleuropein ve metabolitlerinin tam olarak toksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir [22, 23].

Çok sayıda yararlı etkiye sahip olan, toksik etisi bulunmayan oleuropeinin kanser hücreleri üzerinde herhangi bir etkiye sahip olup olmadığı son yıllarda araştırma konusu olmuştur. Hamdi ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada [6, 24] oleuropeinin hücre büyümesi, hareketi ve yayılımını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca hayvan deneyleri sonucunda

oleuropeinin tümör büyümesini çok kısa sürede geriletmediğini tespit etmişlerdir. Fabiani ve arkadaşları, 2008 yılında, zeytin yağı etken maddelerinin PBMC (Preiferal blood mononuclear cells ve HL-60 (promyelocytic leukemia) hücrelerinde DNA hasarına karşı hücreleri koruduğu önerilmiştir [25]. Ayrıca Han ve arkadaşları tarafından, oleuropeinin meme kanseri modeli olan MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı azaldığı hücre proliferasyonunun inhibe olduğu ve apoptozisin indüklendiğini göstermişlerdir [26]. Ayrıca, Kimura ve arkadaşları 2009 yılında, UV ışığı ile irite olmuş deri kanseri modelinde, oleuropein uygulamasının MMP-2, MMP-9, MMP13, VEGF ve COX2 genlerinin ifadesini azalttığını bulmuşlardır [27]. Goulos ve arkadaşları 2009 yılında, MCF-7, T 24 (insan üriner bladder karsinoma) ve BBCE (Bovine Brain kapiller endotel) hücrelerinde zeytin yaprak ekstresinin, güçlü antioksidant özelliği gösterdiği ve hem kanser hem de endotel hücrelerinde hücre proliferasyonunun önlediği bulunmuştur [28].

Sadece sınırlı sayıda kanser hücre hatlarında güçlü antiproliferatif etkileri belirlenmiş Oleuropein'nin farklı kanser modellerinde etkilerinin belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda Oleuropein'nin antitümör etkileri prostat modelinde (PC-3), Karaciğer modelinde (Hep3B) ve meme kanseri (MCF-7) modelinde in vitro olarak çalışılmıştır. MCF-7 ve PC-3 hücrelerinde 48 ve 72 saat doz uygulamalarında antiproliferatif

etkisi belirlenmiştir. Düşük dozlarda PC-3 ve MCF-7 hücrelerinde hücre proliferasyonunu arttırdığı da gözlenmiştir. Oleuropein'in antitümör etkisi yanında 2009 da Huang ve arkadaşları tarafından anti-aging özelliğine sahip olduğu da hücre kültüründe fibroblast hücrelerinin yaşlanmasını geriletmesi nedeniyle anti aging ajan olabileceği de gösterilmektedir [29]. Oleuropein'nin farklı dozlarda farklı etkileri olduğu dikkat çekici olup iki farklı hücre hattında benzer etki görülmüştür. Çalışmamızda, detoksifite organı olan karaciğer model hücreleri olan HEP3B'lerde Oleuropein'nin hücre proliferasyonunu yaptığı gözlenmektedir. Antitümör etkiye rastlanmamıştır. Hücre proliferasyonunu arttırdığı bulgusu, tüm zaman aralıklarında ve pek çok dozda bulunmuştur. Bu da Oleuropein'nin dozlara bağlı olarak etkisinin de yanı sıra farklı hücre tiplerinde farklı olduğunu göstermektedir.

Teşekkürler

Bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi Biyoloji biriminde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda kullanılan oleuropein maddesi için, Faruk Durukan'a (Kale Kimya)'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] M. de Lorgeril, P. Salen, J.L. Martin, I. Monjaud, P. Boucher, N. Mamelle, Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate, *Arch. Intern. Med.* 158 (1998) 1181–1187.
- [2] A. Menotti, A. Keys, C. Aravanis, H. Blackburn, A. Dontas, F. Fidanza, M.J. Karvonen, D. Kromhout, S. Nedeljkovic, A. Nissinen, et al., Seven Countries Study. First 20-year mortality data in 12 cohorts of six countries, *Ann. Med.* 21 (1989) 175–179
- [3] A. Keys, A. Menotti, M.J. Karvonen, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, B.S. Djordjevic, A.S. Dontas, F. Fidanza, M.H. Keys, et al., The diet and 15-year death rate in the seven countries study, *Am. J. Epidemiol.* 124 (1986) 903–915.
- [4] A. Keys, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, A.S. Dontas, F. Fidanza, M.J. Karvonen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, S. Punsar, et al., Serum cholesterol and cancer mortality in the Seven Countries Study, *Am. J. Epidemiol.* 121 (1985) 870–883.
- [5] S. Renaud, M. de Lorgeril, J. Delaye, J. Guidollet, F. Jacquard, N. Mamelle, J.L. Martin, I. Monjaud, P. Salen, P. Toubol, Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (1995) 1360S–1367S.
- [6] Hamdi K. Hamdi, Raquel Castellon, Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (2005) 769–778
- [7] Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Río, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 68, 457–462.]
- [8] R. de la Puerta, M.E. Martínez Domínguez, V. Ruiz-Gutiérrez, J.A. Flavill, J.R. Hault, Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitric oxide neurotransmission, *Life Sci.* 69 (2001) 1213–1222.]
- [9] C. Manna, S. D'Angelo, V. Migliardi, E. Loffredi, O. Mazzoni, P. Morrica, P. Galletti, V. Zappia, Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6521–6526.]
- [10] H.K. Hamdi, J.H. Tavis, R. Castellon, in: USPTO, Antigen Biologicals Corporation, USA, 2003.]
- [11] M. Bonoli, A. Bendini, L. Cerretani, G. Lercker, T.G. Toschi, Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7026–7032.]
- [12] H.P. Fleming, W.M. Walter Jr., J.L. Etchells, Antimicrobial properties of Oleuropein and products of its hydrolysis from green olives, *Appl. Microbiol.* 26 (1973) 777–782.
- [13] W.M. Walter Jr., H.P. Fleming, J.L. Etchells, Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of Oleuropein from green olives, *Appl. Microbiol.* 26 (1973) 773–776.
- [14] S. Panizzi, M.L. Oriente, Structure of the bitter glucoside Oleuropein, *Gazz. Chim. Ital.* 90 (1960) 1449–1485.
- [15] T.Y.H. Inouye, S. Tobita, K. Tanaka, T. Nishioka, Absolute structure des oleuropeins und einiger verwandter glucoside, *Tetrahedron Lett.* 28 (1970) 2459–2464.]
- [16] K.L. Tuck, P.J. Hayball, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 636–644.]
- [17] K.L. Tuck, M.P. Freeman, P.J. Hayball, G.L. Stretch, I. Stupans, The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats, *J. Nutr.* 131 (2001) 1993–1996.] tansiyon düşürücü
- [18] A. Zarzuelo, J. Duarte, J. Jimenez, M. Gonzalez, M.P. Utrilla, Vasodilator effect of olive leaf, *Planta Med.* 57 (1991) 417–419].
ve hipoglisemik
- [19] M. Gonzalez, A. Zarzuelo, M.J. Gamez, M.P. Utrilla, J. Jimenez, I. Osuna, Hypoglycemic activity of olive leaf, *Planta Med.* 58 (1992) 513–515.] bir ajan olduğunu göstermiştir.
- [20] F. Visioli, S. Bellosta, C. Galli, Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production

- by mouse macrophages, *Life Sci.* 62 (1998) 541–546.] [F. Visioli, C. Galli, Phenolics from olive oil and its waste products. Biological activities in vitro and in vivo studies, *World Rev. Nutr. Diet.* 88 (2001) 233–237.
- [21] P. Gonzalez, F. Florido, B. Saenz de San Pedro, F. de la Torre, P. Rico, S. Martin, Immunotherapy with an extract of *Olea europaea* quantified in mass units. Evaluation of the safety and efficacy after one year of treatment, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 12 (2002) 263–271.]
- [22] G.A. Elliott, D.A. Buthala, E.N. DeYoung, Preliminary safety studies with calcium elenolate, an antiviral agent, *Antimicrob. Agents Chemother.* 9 (1969) 173–176.]
- [23] S. D_Angelo, C. Manna, V. Migliardi, O. Mazzoni, P. Morrica, G. Capasso, G. Pontoni, P. Galletti, V. Zappia, Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, *Drug Metab. Dispos.* 29 (2001) 1492–1498]
- [24] S.S. Martin, P. Leder, Human MCF10A mammary epithelial cells undergo apoptosis following actin depolymerization that is independent of attachment and rescued by Bcl-2, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 6529–6536
- [25] Fabiani, R., Rosignoli, P., Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G.F., Morozzi, G., Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells, *Journal of Nutrition*, (2008) 138, (8): 1411-1416
- [26] Han, J., Talorete, T.P.N., Yamada, P., Isoda, H., Anti-proliferative and apoptotic effects of oluropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells, *Cytotechnology*, (2009) 59 (1):45-53
- [27] Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Olive Leaf Extract and Its Main Competent Oluropein prevent Chronic Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Damage and Carcinogenesis in Hairless Mice, *Journal of Nutrition*, (2009) 139 (11): 2079-2086
- [28] Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, AN., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., Gerothanassis, IP, Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells, *Mol. Nut. And Food Research*, (2009), 53 (5): 600-608
- [29] Huang, L.; Chen, CH., Proteasome Regulators: Activators and Inhibitors, *Current Medicinal Chemistry*, (2009), 16 (8): 931-939