

SİÇAN KOLON EPİTELİ PROLİFERASYONUNA ORLİSTAT VE YEŞİL ÇAYIN ETKİSİ, BETA-KATENİN İLE OLAN İLİŞKİSİ

Dr. Elif İlkay Taşkın¹, Doç. Dr. Kadriye Akgün Dar², Ayşegül Kapucu²,
Yrd. Doç. Dr. Korhan Altunbaş³, Doç. Dr. İbrahim Fırat⁴, Prof. Dr. Hüsnüye Doğruman¹

¹ İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Morfoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

² İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

³ Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, AFYON

⁴ İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

- Amaç:** Orlistat ile yeşil çayın gastrointestinal etkilerinin beta-katenin ve proliferasyon ile olan ilişkisini immunohistokimyasal olarak araştırmak.

- Material ve Metod:** Çalışmamızda 40 adet dişi Wistar albino sıçan eşit şekilde kontrol, orlistat, yeşil çay ekstresi, yeşil çay ekstresi+orlistat gruplarına ayrıldı.

Deney gruplarına orlistat (10mg/kg/gün), yeşil çay ekstresi (40mg/kg/gün) gavaj yoluyla 1 ay süreyle uygulandı. Bu sürenin sonunda hayvanlardan alınan kalın barsak dokuları rutin laboratuvar yöntemleri uygulanarak parafine gömildü. Elde edilen parafin

kesitlere beta-katenin ve Ki-67 uygulanarak, sonuçlar değerlendirildi.

- Bulgular:** Orlistat ve yeşil çay ekstresi+orlistat uygulanan grupta kontrol ve yeşil çay ekstresi gruba göre proliferasyon ve beta-katenin H-skoru sonuçlarında artış olduğu gözlandı ($p<0,001$). Yeşil çay ekstresinin uygulandığı grupta ise kontrole göre değişiklik gözlenmedi.

- Sonuç:** Çalışmamızda, orlistatın proliferasyonu uyardığı, yeşil çayın ise proliferasyon üzerine etkisi olmadığı sonucuna varıldı.

- Anahtar Kelimeler:** Orlistat, beta-katenin, kolon, yeşil çay, sıçan. Nobel Med 2008; 4(3): 15-19

ABSTRACT

THE RELATION OF ORLISTAT AND GREEN TEA WITH BETA-CATENIN AND PROLIFERATION ON GASTROINTESTINAL EPITHELIAL CELLS

• **Objective:** To investigate the relation of gastrointestinal effects of orlistat and green tea with beta-catenin and proliferation immunohistochemically.

• **Material and Method:** In our study, 40 female Wistar albino rats were divided into 4 groups as control, orlistat, green tea extract, orlistat+green tea extract. orlistat (10mg/kg/day), green tea extract (40mg/kg/day) via gavage were applied for a duration of 1 month. At the end of the duration, colons of all animals were removed and inbedded in parafin

following routine histological procedures. beta-catenin and Ki-67 were applied to the obtained sections and the results were scored.

• **Results:** Proliferation and H-score results were significantly higher in orlistat and orlistat+green tea extract-applied groups than control or green tea extract-applied groups ($p<0.001$). No difference was observed in green tea extract applied group when compared with control group.

• **Conclusion:** In this study, we suggest that orlistat stimulates proliferation. However, green tea has no effect on the reversal of proliferation.

• **Key Words:** Orlistat, beta-catenin, colon, green tea, rat. Nobel Med 2008; 4(3): 15-19

GİRİŞ

Obezite kardiyovasküler risk faktörü olup, farklı ilaçlarla ve farklı farmakolojik dozlarda tedavi edilmektedir. Orlistat (tetrahidrolipstatin:THL) yaygın olarak obezite tedavisinde kullanılan lipofilik bir ilaçtır. Streptomyces toxyticini'den izole edilen ve lipstatin'in hidrojenlenmiş analogu olan orlistat, lipaz inhibitörüdür ve diyetteki lipitlerin sindirim ve emilimini engelleyerek vücut ağırlığının azalmasına neden olur.¹ Kısa süreli orlistat uygulamasının barsak mukozası üzerinde uyarılabilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) artışı ile hasara yol açabileceği bildirilmiştir.²

Yeşil çay, yan etkileri olmadığı için birçok ülkede yaygın olarak tüketilmektedir. İçerdeği polifenollerin anti-mutajenik, anti-inflamatuvar ve anti-tümoral etkilerinin olduğu in vitro ve in vivo hayvan deneyleriyle gösterilmiştir.³ beta-katenin ise kolon epitel hücrelerinde hücre çoğalması kontrolünde rol oynayan bir proteindir.

Kolon kanserinin erken dönemlerinde beta-katenin geni ve ürünündeki değişimlerin tümör oluşumu ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. Beta-katenin kodlayan gende mutasyonların gerçekleşmesi sonucunda hücre çoğalması gözlenir.⁴

Kolon kanseri oluşumunun erken safhasında, intestinal epitel hücrelerinde Wnt-beta-katenin sinyal yolu anormal aktivasyonu erken bir kanıt olarak kabul edilmektedir.^{5,6} Beta-katenin gen mutasyonları, beta-kateninin nukleus içerisinde aşırı birikimine ve hedeflediği genlerin uyarılmasına yol açar.^{7,8}

Bu çalışmada amacımız, uzun süreli orlistat ve yeşil çay uygulamalarının gastrointestinal etkilerinin, beta-katenin ve proliferasyon ile olan ilişkisini ortaya koymaktır.

MATERIAL ve METOD

Deney Protokolü

Çalışmamızda ağırlıkları 200 ± 10 gr olan 40 adet dişi Wistar albino sincan kullanıldı. Hayvanlar deney süresince polipropilen kafesler içinde, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodunda %50-60 nemli ortamda tutuldu. Deney süresince hayvanlara pelet yem ve taze çesme suyu ile ad libidum olarak beslendi. Her grupta 10 hayvan olacak şekilde kontrol, orlistat (10mg/kg/gün), yeşil çay (40mg/kg/gün) ekstresi ve yeşil çay ekstresi+orlistat (10mg/kg/gün+40mg/kg/gün) çalışma grupları oluşturuldu. Tüm uygulamalar bir ay süresince her gün, gavaj yöntemiyle yapıldı. Bu sürenin sonunda, hayvanlardan alınan kalın barsak dokuları, rutin histolojik takip yöntemleri uygulanarak parafine gömüldü.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde SPSS yazılımı kullanıldı (SPSS 8.0, SPSS for Windows Advanced Statistics Release 8.0, 1997). Elde edilen H-skor ve proliferasyon indeks değerlerinin dağılımı Kolmogorow-Simirnov testi ile sinandı. Tek yönlü ANOVA istatistiksel analiz uygulandıktan sonra Post-Hoc testi olarak Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi uygulandı. $p<0,05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. →

Işık Mikroskobu ve İmmunohistokimyasal Yöntemler

Kolon hücrelerinin proliferasyon yoğunluğu Ki-67 antijeni, beta-katenin birikimi monoklonal anti-beta-katenin antikoru ile Streptavidin Peroksidaz teknigi kullanılarak (Zymed Histostain Plus Broad Spectrum, South San Francisco, CA, US) saptandı. Bu amaçla, parafin bloklardan 4 μ m kalınlığında alınan kesitler, Poly L Lysine (PLL) ile kaplı lamlara alındı. Kesitler bir gece 56°C'de tutulduktan sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Kesitler, 0,01 mol/L fosfat tamponu (PBS)'nda yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesi, %3 H₂O₂ (Lab vision, TA-060-HP) ile 10 dakika oda ısısında tutularak bloklandı ve sitrat tamponu (0,01 M ve pH 6,0) içerisinde mikrodalgada 700 wattta 10 dakika tutulduktan sonra, 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı.

Doku örnekleri 1/100 Ki-67 antikoru (Santa Cruz-7907-rabbit polyclonal) ve 1/100 primer anti-beta-katenin (Santa Cruz-7963-mouse monoclonal) ile oda ısısında 50 dakika bekletildi. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra, biyotinlenmiş sekonder antikor ile inkübe edildi. HRP (Horse Radish Peroxidase) Streptavidin ile oda ısısında 15 dakika bekletildi. Kesitler 5 dakika DAB (diaminobenzidine; Zymed) ile inkübe edildi. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra, Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve giserol jelatin ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlere primer antikor yerine PBS uygulandı. Kesitler değerlendirilerek Image Pro-Plus Digital Monitoring sistemi ile fotoğraflandı.

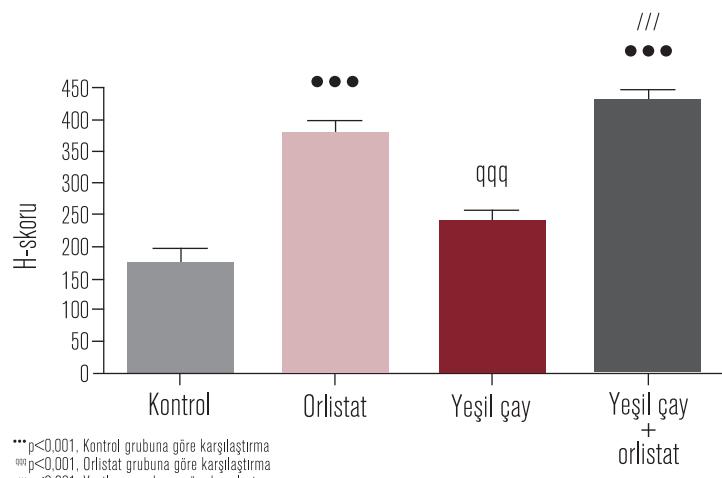
Ki-67-pozitif hücreler proliferasyon indeksi yöntemi ile değerlendirildi.⁹ beta-katenin pozitif hücrelerin değerlendirilmesinde H-skor yöntemi kullanıldı.¹⁰

Özetle bu yöntemde, farklı alanlardaki beta-katenin pozitif hücreler x 400 büyütmede (Olympus mikroskopu) 2 kişi tarafından kör olarak değerlendirildi. Pozitif hücreler reaksiyon şiddetine göre derecelendirildi; boyanmamış: 0, kontrolden farklı ama zayıf boyanmış: 1+, orta boyanmış: 2+, yoğun boyanmış: 3+. Her bir grup için H-skor ölçümleri H-skor= S_i (i+1) formülü kullanılarak belirlendi. "i" yoğunluk skoru, "Pi" alandaki boyanmış hücrelerin yüzdesini göstermektedir.

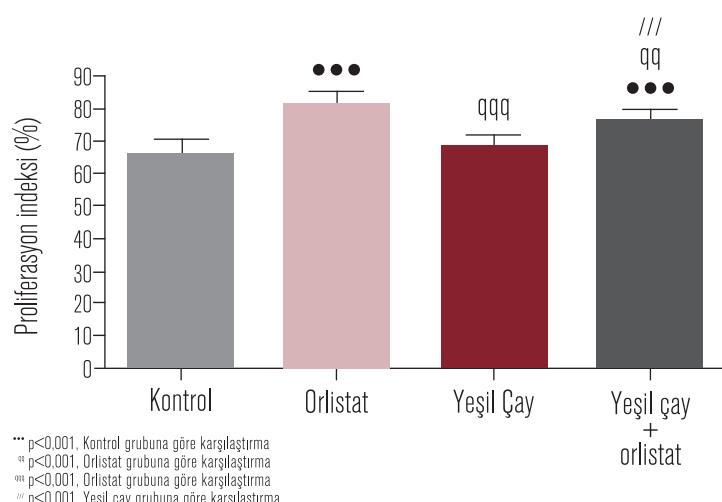
BULGULAR

Kontrol grubunda barsak epitel hücre boyları normaldi. Çizgili kenarın bütünlüğü korunmuştu. Kontrol kolon epitel hücrelerinin sitoplazmaları beta-katenin antikoruna açık kahve rengi reaksiyon verdi (\rightarrow).

Orlistat uygulanan grupta epitel hücre boyalarında



Şekil 1. Kontrol, orlistat, yeşil çay ve yeşil çay+orlistat gruplarında beta-katenin H-skoru sonuçları.

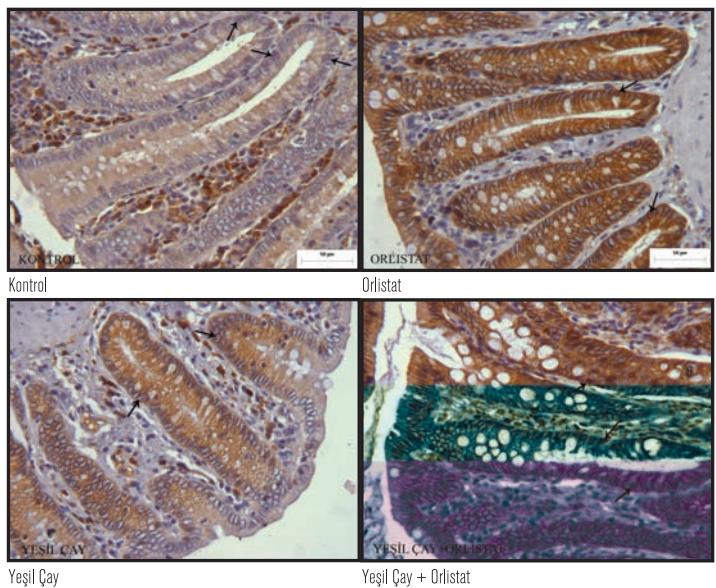


Şekil 2. Kontrol ve deney gruplarında Ki-67 proliferasyon indeksi.

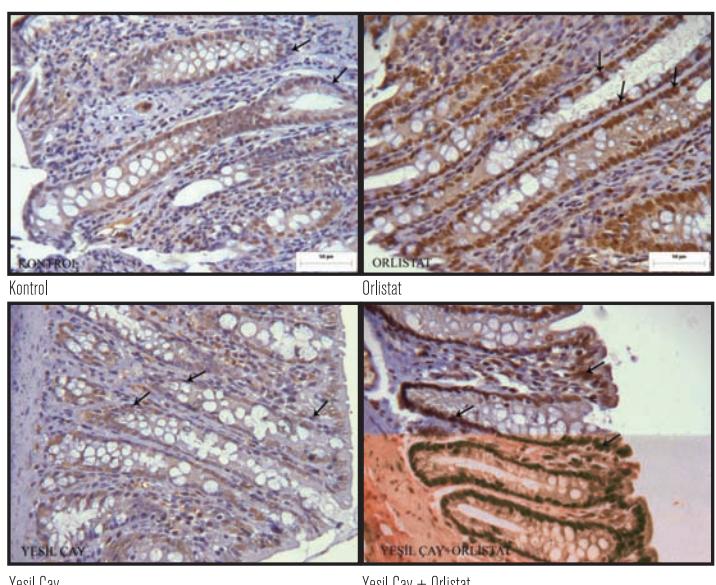
artış ile birlikte, çizgili kenarın yer yer kesintiye uğradığı, yer yer barsak epitelinin kübik epitele dönüştüğü gözlandı. Sitoplazma ve nukleusta çok koyu kahve rengi reaksiyonla beta-katenin birikimi tespit edildi ($p<0,001$) (\rightarrow). Yeşil çay uygulanan gruptaki reaksiyonlar ise kontrole yakındı fakat hücrelerin lümene bakan apikal bölgelerindeki reaksiyon kriptalardaki reaksiyonlarından daha azdı (Şekil 3, (\rightarrow)).

Yeşil çay+orlistat grubunda çizgili kenar birçok yerde izlenemedi. Kolon epitel hücrelerinin lümene bakan apikal bölgelerindeki reaksiyon oldukça yoğundu. Kriptalarda ise reaksiyon yoğundu, ancak yer yer kontrole yakın reaksiyon gösteren bölgeler de gözlandı. Ki-67, hücre proliferasyonun belirlenmesinde kullanılan bir belirteçtir. Elde edilen sonuçlara bakıldığından orlistat grubunda proliferasyon indeksi beta-katenin ile elde edilen sonuçlarda olduğu gibi orlistat kullanımına bağlı olarak artmıştı ($p<0,001$) (Şekil 1 ve 2).

SIĞAN KOLON EPİTELİ
PROLIFERASYONUNA
ORLİSTAT VE YEŞİL ÇAYIN
ETKİSİ, BETA-KATENİN İLE
OLAN İLİŞKİSİ



Şekil 3. Kontrol, orlistat, yeşil çay ve yeşil çay+orlistat gruplarında beta-katenin reaksiyonu (→).



Şekil 4. Kontrol ve deney gruplarında Ki-67 reaksiyonu (→).

Yeşil çay grubunda ise kontrole yakın bir indeks elde edildi. Yeşil çay+orlistat grubunda görülen proliferasyon artışı üzerine yeşil çayın olumlu bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 4) (→).

TARTIŞMA

Anti-obezite ilacı olan orlistat intestinal lipazın spesifik inhibitörü olarak etki göstermektedir. Klinik ve deyansel çalışmalarında, orlistatin, obez hastalarda serum lipit, kolesterol, glikoz düzeyleri ve kilo kaybı üzerinde pozitif etkisi olduğu rapor edilmiştir.^{11, 12} Kolon epitel hücrelerinde kanser oluşumunun erken evrelerinde ilk işaretlerden biri Wnt-beta-katenin yollığının anormal aktivasyonudur.⁶ Kolorektal kanser ve melanomlarda

beta-katenin geninde mutasyonlar gözlenmiştir.¹³ Bu mutasyonlar nukleusta aşırı beta-katenin birikimine ve siklin D1, Myc, Matriks Metal-loproteinaz-7 (MMP7) gibi hedef genlerin ve kolorektal tümör gelişiminde önemli rol oynayan peroksizom proliferatör aktive edici reseptör-δ'nin uyarılmasına yol açar.^{7, 8}

Kridel ve arkadaşları, orlistatin tümör gelişimi ile bağlantılı olan yağ asit sentazın inhibitörü olması nedeniyle, tümör hücre proliferasyonunu engellediğini, tümör hücre apoptozunu uyardığını, çiplak farelerde tümör büyümescini inhibe ettiğini gözlemiştir.¹⁴

Bunun yanı sıra orlistatin normal hücrelerdeki etkisine bakmamışlardır. Aynı araştırmacılar, orlistatin kolon kanserini engellemek için bir strateji olarak değerlendirilebileceğini de ileri sürmektedirler.¹⁴ Oysa çalışmamızda, uzun süreli orlistat kullanımının, sitoplazma ve nukleusda beta-kateninin birikimine ($p<0,001$) ve proliferasyonda artışa yol açması, kolon kanserinin gelişileceğini düşündürmektedir. Garcia ve arkadaşları da çalışmalarında orlistatin kolonik mukozada proliferatif etkisi olduğunu göstermişlerdir.¹⁵ Bu da bizim bulgularımızı desteklemektedir. Zengin polifenol içeren yeşil çayın antioksidatif ve antiinflamatuar etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca, polifenol, kanserin başlangıcı, gelişme ve ilerleme evrelerinde multipl mekanizmayla etkili olmaktadır.^{16, 17} Rajesh ve arkadaşları yeşil çayın polifenollerinin ve onun bir bileşeni olan epigallokateşin gallat'in hem in vitro hücre kültür modelinde ve hem in vivo fare göğüs kanser modelinde proliferasyonu inhibe ettiğini doğaylaşıyla anti-tümör özelliğe sahip olduğunu bildirmektedirler.³

Bu çalışmada araştırmacıların aksine, tek başına yeşil çay uygulanması proliferasyonu etkilemedi. İki çalışma arasındaki bu farklılık, hayvanın türü ile yeşil çayın uygulanma biçiminin farklı olmasından kaynaklanabilir. Yeşil çay+orlistat uygulanması proliferasyon ve beta-katenin birikimini anlamlı olarak artırmıştır ($p<0,001$). Bu sonuçlarımızı karşılaştıracak bir çalışmaya rastlamadık. Ancak, elde ettiğimiz sonuçların ışığında orlistatin güçlü bir proliferatif etkisi olduğunu ve yeşil çayın orlistatin uyardığı proliferasyon üzerinde geri döndürücü bir etkisi olmadığını söyleyebiliriz.

SONUÇ

Orlistat kullanımına bağlı olarak nukleusta görülen beta-katenin birikimi ile birlikte ortaya çıkan hücre proliferasyonu, ilerde kolon dokusunda kanserleşmenin başlangıcı olabilir. Bu amaçla kullanılmış olan anti-proliferatif etkili yeşil çayın, orlistatin neden olduğu hücre proliferasyonu üzerine bir etkisi olmadığını saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- 1** Tiss A, Lengsfeld H, Hadváry P, Cagna A, Verger R. Transfer of orlistat through oil-water interfaces. *Chem Phys Lipids* 2002; 119: 41-49.
- 2** Caner M, Doğruman H, Taşkin E, Kandil A, Demirci C. Effects of orlistat and its relationship with nitric oxide in the small intestinal mucosa. *Chin J Physiol* 2005; 4: 217-222.
- 3** ThangaPazham RL, Singh AK, Sharma A, et al. Green tea polyphenols and its constituent epigallatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2007; 245: 232-241.
- 4** Cooper GM, Hausman R. Hücre moleküler yaklaşım. İzmir Tip Kitabevi, İzmir 2006, Bölüm 15, 662-663.
- 5** Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 4: 273-282.
- 6** Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to wnt signaling. *Cell* 2000; 103: 311-320.
- 7** He T-C, Chan TA, Vogelstein B and Kinzler KW. PPAR delta is an APC regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99: 335-345.
- 8** Tetsu O, McCormick F. Beta-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 39: 422-426.
- 9** Akgün-Dar K, Balcı H, Yağcı A, Kapucu A, Uyaner İ. Effects of leptin on the epithelial cell proliferation from the small intestine and nitric oxide (NO) production in rats. *Revue Med Vet* 2007; 158: 148-154.
- 10** Senturk LM, Seli E, Gutierrez LS, et al. Monocyte chemotactic protein-1 expression in human corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 697-702.
- 11** Lucas CP, Boldrin MN, Reaven GM. Effect of orlistat added to diet (30% of calories from fat) on plasma lipids, glucose, and insulin in obese patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2003; 91: 961-964.
- 12** Sjöström L, Rissanen A, Andersen T, et al. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Lancet* 1998; 352: 167-173.
- 13** Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999; 12: 1021-1030.
- 14** Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res* 2004; 64: 2070-2075.
- 15** Garcia SB, Barros LT, Turatti A, et al. The anti-obesity agent Orlistat is associated to increase in colonic preneoplastic markers in rats treated with a chemical carcinogen. *Cancer Lett* 2006; 240: 221-224.
- 16** Fassina G, Vene R, Morini M, et al. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4865-4873.
- 17** Tang FY, Nguyen N, Meydani M. Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule. *Int J Cancer* 2003; 106: 871-878.