

N-asetil-sistein'in sıçan kemik iliği hücrelerinde radyasyona bağlı DNA hasarından koruyucu etkisi ve WR-2721 ile karşılaştırması

Protective effect of N-acetyl cysteine on radiation-induced DNA damage in rat bone marrow: a comparison with WR-2721

Can DEMİREL,¹ Sevil KILÇIKSIZ,² Özlem İZCI AY,³ Serkan GÜRGÜL,⁴ M. Ertan AY,³ Nurten ERDAL⁴

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Biyofizik Anabilim Dalı, ²Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı; Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi ³Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, ⁴Biyofizik Anabilim Dalı

AMAÇ

DeneySEL çalışmamızda radyasyonun biyolojik sistemlerde neden olduğu genotoksik etkilere karşı, N-asetil-sisteinin (NAS) koruyucu etkileri konvensiyonel sitogenetik yöntemlerle (kromozom aberasyonu-CA, mitotik indeks-MI) amifostinle (WR-2721) karşılaştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Co-60 cihazı ile 6 Gy tek doz tüm vücudu ışınlanan sıçanların femur-kemik ilikleri incelendi. Kontrol (K); radyasyon (R); NAS; amifostin (WR-2721) R + NAS (R + NAS); R + WR-2721 gruplarında, eşit sayıda toplam 48 dişi sıçan kullanıldı. R grubu yalnız radyasyon, R + WR-2721 grubuna radyasyon öncesi WR-2721 (200 mg/kg, i.p.), R + NAS grubuna NAS (1000 mg/kg, i.p.) verildi; 72 saat sonra tüm grupların preperasyonu konvensiyonel sitogenetik yöntemlerle hazırlanarak incelendi.

BULGULAR

R grubunun ortalama CA değeri en yüksek, MI değeri düşük olup; kontrol grubuna göre bu fark anlamlıydı. R + NAS ve R + WR-2721 gruplarında R grubuna göre hasar göstergeleri daha düşüktü; farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

SONUÇ

Bu sonuçlara göre, iyonize radyasyonun erken dönemdeki genotoksik etkilerine karşı amifostin ve NAS'nin koruyucu etkilerinin benzer olduğunu söylenebilir.

Anahtar sözcükler: N-asetilsistein; radyasyon hasarı; WR-2721.

OBJECTIVES

To evaluate the potential radioprotective effects of N-acetylcysteine (NAC) against genocytotoxicity. As representative of a clinically used radioprotector, the effect of WR-2721 was compared with that of NAC using chromosomal aberration (CA) and mitotic index (MI) in the irradiated rat's femoral bone marrow cells.

METHODS

The rats (n=48) were divided randomly and equally into six groups as: Control (C), NAC (received 1000 mg/kg NAC), WR-2721 (200 mg/kg WR-2721), Radiation (R, received irradiation), R + NAC (received irradiation and 1000 mg/kg NAC), and R + WR-2721 (received irradiation and 200 mg/kg WR-2721). All the irradiated groups received whole-body gamma irradiation as a single dose of 6 Gy. At 72th hours, the rats were sacrificed and bone marrow cells were bilaterally collected from rats' femur. Then, cytogenetic and cytotoxicity tests were performed according to conventional methods.

RESULTS

Group R showed significantly higher CA and lower MI values when compared to C. R + NAC and R + WR-2721 groups showed significantly lower CA and higher MI averages when compared to R.

CONCLUSION

The results give clues about the beneficial effects of NAC against radiation-induced genocytotoxicity.

Key words: N-acetylcysteine; irradiation-injury; WR-2721.

İyonlaştırıcı radyasyonun canlılarda oluşturduğu iyonizasyon biyolojik reaksiyonları etkileyerek fiziko-kimyasal değişikliklere neden olur. Bu etkileşimlerin çok kısa bir süre içinde (<1 sn) gerçekleşmesine karşın, oluşan genetik mutasyonlar, kanserleşme ve hücre ölümü gibi biyolojik sonuçları; saatler, günler, aylar hatta yıllar içinde gözlemlenir.^[1-3]

İyonlaştırıcı radyasyon canlıyı oluşturan hücre ve dokular tarafından absorbe edilir. Bu etkileşim nedeniyle canlı hücrelerde serbest oksijen radikalleri (SOR) ve uyarılmış moleküller oluşur. Radyasyon enerjisi büyük oranda hücrelerin yaklaşık %70'ini oluşturan su molekülleri tarafından absorblanır. Oluşan hidroksil ve hidrojen radikalleri (genel adıyla SOR), oksidatif stresin artmasına neden olarak biyolojik açıdan önemli hedef moleküllerle (DNA, lipid, enzim, vb.) reaksiyona girer ve biyolojik hasarlara yol açar.^[1,3,4]

İyonize radyasyon mutasyon frekansında bir artışa neden olur. Kromozomal değişimlerin bir çoğu DNA zincirinde meydana gelen ani kırıklardan oluşur. İyonize radyasyonlar, DNA zinciri boyunca nükleotidlerin ayrışmasına neden olabilir. DNA'nın oluşumu esnasında, bir bazın iyonlaşması sonucu, yanlış bağlanmış çiftler (guanin-timin veya adenin-sitozin gibi) oluşabilir. Bunun sonucunda, genetik şifrede kalıtsal değişiklikler oluşur.^[5,6]

Radyasyon hasarı sonuçta, kromozomal düzeyde kırılma, birbirine yapışma, kenetlenme ve kıvrılmalara yol açabilir. Kromozom kırıkları yeniden organize olabilir, aynı kalabilir veya bir başka kromozomla birleşebilir. Tüm bu sonuçlar mutasyonla sonuçlanabilir veya daha da ileri giderek hücrenin ölümüne yol açabilir.^[5,6]

Bu çalışmada, Co-60 cihazıyla 6 Gy tüm vücut ışınlamasına maruz bırakılan sıçanlarda oluşabilecek genotoksik etkiler, sitogenetik yöntemler kullanılarak (kromozom aberasyonu-CA, mitotik indeks-MI) araştırıldı. N-asetil-L-sistein (NAS) uygulanarak radyokoruyucu etkisi incelenmiş ve ayrıca referans radyokoruyucu olarak klinik kullanımında olan amifostin (WR-2721) ile karşılaştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 200-250 g arasında yetişkin (2,5-3 aylık) rastgele seçilmiş 48 adet dişi sıçan (Wistar Albino), Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınan izinle kullanıldı. Çalışmanın başında deney ve kontrol gruplarını oluşturmak amacıyla hayvanlar rastgele altı eşit gruba bölündü (n=8). Birinci grup kontrol grubu (K) olarak belirlenerek serum fizyolojik (i.p.) enjekte edildi. İkinci (NAS) ve üçüncü (WR-2721) grupları, sırasıyla 1000 mg/kg NAS (300 mg N-asetil-L-sistein, asist ampul, Hüsnü Arsan İlaç, İstanbul) ve 200 mg/kg amifostin (500 mg amifostine, Ethyol flakon, Er-Kim İlaç, İstanbul) (i.p.) uygulanarak oluşturuldu. Dördüncü grup (R) ise serum fizyolojik (i.p.) uygulamasından 15 dk sonra 6 Gy tüm vücut radyasyon uygulamasına maruz bırakıldı. Beşinci (R+NAS) ve altıncı (R+WR2721) gruplarına radyasyon uygulamasından 15 dk önce sırasıyla 1000 mg/kg NAS ve 200 mg/kg amifostin (i.p.) uygulandı. Radyasyon Co-60 teleterapi cihazı (Shandong Xinhua SCC-8000F, China) kullanılarak 80 cm SSD ve 1,80 Gy/dk doz hızıyla verildi.

Radyasyon uygulamasından 72 saat sonra kemik ilikleri tüm grupların femurlarından izole edildi. Kromozom preparasyonlarının hazırlanması ve sitogenetik analiz için kromozom eldesi 3 ml RPMI 1640 içinde toplanan sıçan femur kemik iliği örneklerinden konvensiyonel direkt preprasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Elde edilen kemik iliği hücreleri hipotonik solüsyon (0,075 M KCl) ile işlem gördükten (37 °C'de 30 dk.) sonra 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek 5 kez metanol: glasiyal asetik asit (3:1) ile fikse edildi. Son fiksasyondan sonra elde edilen hücre pelletleri temiz lamlara damlatılarak %10'luk Giemsa (pH 6,8 Gurr tamponlu) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda kromozomal aberasyonların belirlenmesi için incelendi. Her sıçan başına en az 42±2 kromozom bulunan 1000 metafaz, kromozom ve kromatid gap ve kırıkların varlığı bakımından değerlendirildi.

Tüm verilerin istatistiksel analizlerinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasında fark olup olmadığı Tukey HSD Post-

Tablo 1

Kontrol ve deney gruplarına ait kromozom aberasyonu (CA) ve mitotik indeks (MI) bulguları

Değişkenler	K (n=8)	NAS (n=8)	WR-2721 (n=8)	R (n=8)	R + NAS (n=8)	R + WR-2721 (n=8)
CA	0,0±0,0b*d*	2,75±0,89a*b*	3,35±0,89a*b*	6,3±1,16a*c*d*	3,0±0,73a*b*	4,0±0,74a*b*c†
MI	71,5±2,16b*c+ d†	61,75±3,65a+ b*	64,75±4,62 a+ b*	21,1±3,69 a* c* d*	32,92±4,87 a*b*c*d*	36,33±3,49 a*b*c*d*

K: Kontrol grubu; R: Radyasyon grubu; NAS: NAS uygulanan grup; WR-2721: WR-2721 uygulanan grup; R+NAS: NAS uygulanarak radyasyona maruz bırakılan grup; R+WR2721: Amifostin uygulanarak radyasyona maruz bırakılan grup; a: K grubu ile yapılan karşılaştırma; b: R grubu ile yapılan karşılaştırma; c: NAS grubu ile yapılan karşılaştırma; d: WR-2721 grubu ile yapılan karşılaştırma; *p<0,0001, †p<0,05, +p<0,01. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan karşılaştırmalar tabloda gösterilmemiştir. Değerler ortalama ± s.d. olarak verilmiştir.

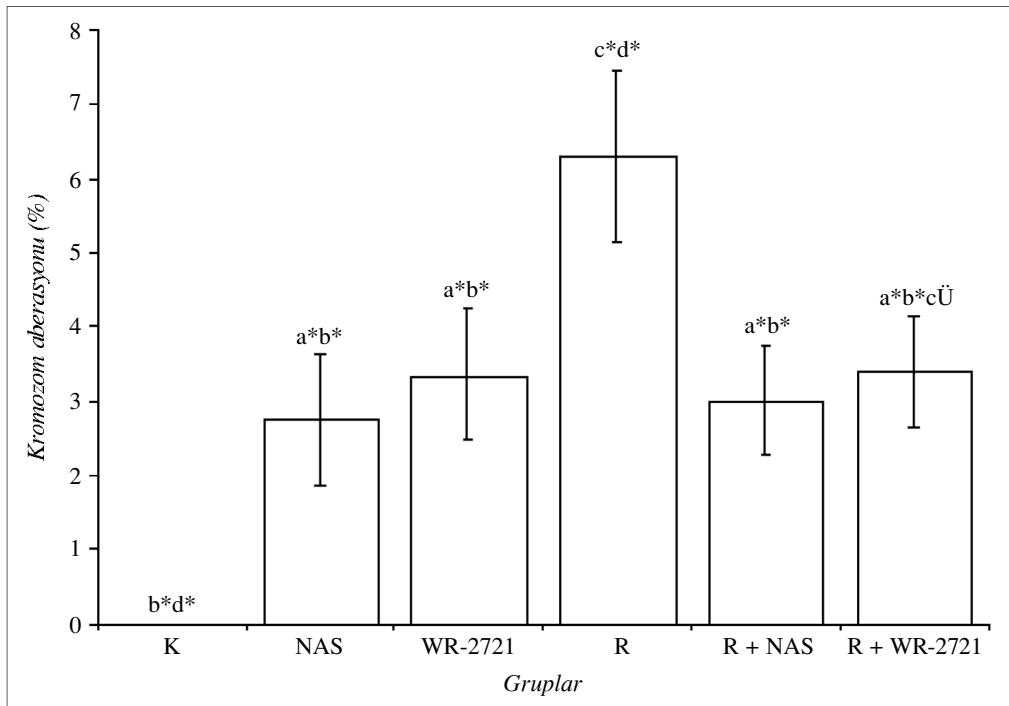
Hoc testi ile belirlendi. SPSS (v 11.5, Lead Technologies, Inc., USA) programı kullanıldı.

BULGULAR

Tüm gruplardan elde edilen CA ve MI değerleri ortalama ± standart sapma (S.D.) olarak sunulmuştur (Tablo 1).

Kromozom Aberasyonu: Elde edilen sonuçlara göre CA değerleri karşılaştırıldığında, kontrol grubu değeri diğer gruplardan istatistiksel olarak

anlamlı derecede farklıydı (p<0,0001) (Tablo 1, Şekil 1). R grubunun ortalama CA değeri ise tüm gruplardan daha yüksek olup fark anlamlıydı (p<0,0001). Ayrıca NAS grubunun ortalama CA değeri R grubuna ve R+WR-2721 grubuna göre daha düşüktü (sırasıyla p<0,0001 ve p<0,05). WR-2721 grubunun CA değeri ise R grubundan daha düşüktü (p<0,0001). R+NAS ve R+WR-2721 ve diğer gruplar arası diğer karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 1. Kromozom aberasyonu (CA). K: Kontrol; R: Radyasyon; NAS: N-asetil-sistein; WR-2721: WR-2721; R+NAS: NAS+radyasyon; R+WR2721: Amifostin+radyasyon grupları. a: K grubuyla, b: R grubuyla, c: NAS grubuyla, d: WR-2721 grubuyla yapılan karşılaştırma; *p<0,0001, †p<0,05, +p <0,01. Değerler ortalama ± s.d.

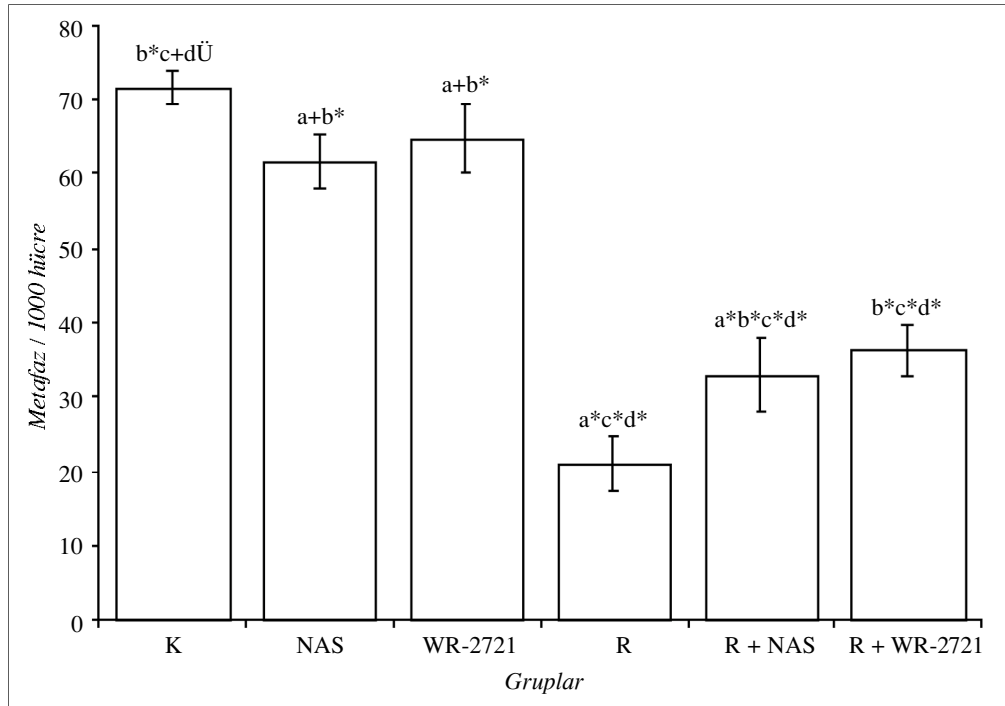
Mitotik İndeks: Hücre siklusu kinetiklerini gösteren MI sonuçları Tablo 1 ve Şekil 2'de gösterilmiştir. R, R+NAS, R+WR-2721 gruplarının kemik iliği hücresi MI değerleri K grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0,0001$). Aynı zamanda K grubunun değeri NAS ve WR-2721 gruplarından da yüksekti ($p<0,01$). R grubunun MI değeri ise tüm gruplardan daha düşük olup fark anlamlıydı ($p<0,0001$). Ayrıca NAS grubunun MI değeri radyasyon verilen R, R+NAS ve R+WR-2721 gruplarından daha yüksekti ($p<0,0001$); K grubuna göre ise daha düşmüştü ($p<0,01$). WR-2721 grubunun MI değeri R, R+NAS ve R+WR-2721 gruplarından daha yüksekti ($p<0,0001$), ama K grubuna göre ise görece daha düşmüştü ($p<0,05$). R+NAS ve R+WR-2721 ve diğer gruplar arası diğer karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlı fark bulunmadı.

TARTIŞMA

İyonize edici radyasyon kanser tedavisinde halen en etkili araçtır. Hücrenin iyonizan radyasyona

yanıtı DNA onarım yollarının aktivasyonu ve hücre döngüsü denetimi ve bunu izleyen onarım veya hücre ölümü sürecini içerir (mitotik/klonojenik ölüm ya da apoptozis).^[1] DNA çift kırıkları (Double Strand Break=DSB) bütün organizmalarda genetik değişimin yaygın mediatörü olup, mutasyon, rekombinasyon, kromozom aberasyon ve hücre ölümüne yol açar.^[1-3] DNA çift kırıklarının doğru işlenmesi/onarımındaki başarısızlık genetik bilginin delesyonu ya da insersiyonu, nokta mutasyonlarında artış, kromozomlarda kayıp, duplikasyon, translokasyon, kopmalar ve mikronukleus oluşumu şeklinde gözlenebilir.^[7-10]

Kromozomlar majör komponenti DNA olan genetik materyalin subsellüler yapılarıdır. Kromozomlar çiftler halinde bulunur ve kromozom çiftlerindeki aynı lokalizasyonu kaplayan alanlara homolog genler veya alleller denir. Alleller arası genetik materyalin (DNA) transferi bir dereceye kadar normal kabul edilir ve birçok spontan mutasyonun temelidir. Radyasyon ise çift zincir kırıkla-



Şekil 2. Kontrol ve deney gruplarına ait kromozom aberasyonu (CA) ve mitotik indeks (MI) bulguları. *K*: Kontrol; *R*: Radyasyon; *NAS*: *N*-asetil-sistein; *WR2721*: *WR*-2721; *R+NAS*: *NAS*+radyasyon, *R+WR-2721*: *Amifostin*+radyasyon grupları. *a*: *K* grubuyla, *b*: *R* grubuyla, *c*: *NAS* grubuyla, *d*: *WR*-2721 grubuyla yapılan karşılaştırma; * $p<0,0001$, † $p<0,05$, + $p<0,01$. Değerler ortalama \pm s.d.

rına neden olarak bu değişimlerin sıklığını arttırabilir. Ayrıca radyasyon kromozom kırıklarının serbest parçaları ve aberan şekildedeki formları ile yapısal aberasyonlara neden olabilir.^[11-13] Son yıllarda biyolojik hasarların saptanmasında en yaygın şekilde kullanılan iki analiz yönteminden birisi iyonize radyasyonlara has kromozom hasarlarının tayini ile biyolojik dozun hesaplanmasına imkan veren kromozom aberasyon (CA) analizidir.^[11,13,14] Bu çalışmada CA yöntemi ve yanı sıra geçerli sitogenetik yöntemlerden biri olan MI kullanılmıştır.

NAS'nin kromozom düzeyinde araştırılan hasardan koruyucu etkisi klinikte kullanılan referans radyokoruyucu olan WR-2721 ile karşılaştırılmıştır. Gama radyasyona maruz bırakılan grupta beklediği gibi hasarın göstergesi olarak CA değeri en yüksek, MI değeri en düşük olup, kontrol grubuna göre bu fark anlamlıydı. NAS ve WR-2721 uygulanarak radyasyon verilen gruplarda ise kontrole göre değerler farklı olmakla birlikte, R grubuna göre hasar göstergeleri daha düşüktü ve farklar istatistiksel olarak anlamlıydı. Aynı zamanda yalnız radyokoruyucu verilen (NAS ve WR-2721) gruplarda gözlenen kontrol grubuna göre farklılığa karşın, bu ajanların kemik iliği hücreleri üzerine koruyucu etkilerin varlığı R grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı şekilde gözlenmiştir.

Radyoterapide kullanılan radyokoruyucu mantığı büyük ölçüde radyasyonun serbest radikaller ile yaptığı hasara dayanmaktadır. Yapılan araştırmalar artmış oksidatif radikallerin baskılanması yada GSH gibi temel anti-oksidanların desteklenmesiyle, radyasyonun kalıcı veya geçici hasarlarının azalabildiğini ortaya koymuştur.^[2]

Birçok radyokoruyucu madde çalışmasında en iyi koruyucu etkinin sülfür içeren bileşiklerle olduğu belirtilmiştir. En çok çalışılan ajan aminothi-ol (sistein, sistamin, WR-2721, glutasyon) bileşikleridir. Tüm bu bilgilerle, amifostin'in insanlar için en olası radyokoruyucu olarak klinik kullanımındadır.^[12,13,15,16] Ancak gerek doz kısıtlayıcı toksisitesi, gerekse pahalı bir ilaç olması klinikte kullanımını güvenli ve düşük maliyetli ilaç arayışını arttırmaktadır.

Oksidatif strete temel koruyucu rol glutatyonundur. Glutatyon oksidatif stres enzimlerine kar-

şı deokside edici bir kofaktördür. Canlılardaki oksidatif stres temel olarak GSH'nın azalması veya onun prekürsörü olan sisteinin azalması olarak ifade edilebilir. NAS klinikte asetaminofen zehirlenmesinde oluşan hepatik yetmezlik başta olmak üzere oksidatif stresle ilişkili doku hasarının görüldüğü birçok hastalıkta güvenle kullanılan maliyeti düşük bir ajandır.^[17-20] NAS'nin hepatik nekrozu glutatyonu destekleyerek önlediği öne sürülmektedir. Meyer ve ark. oksidatif strete akciğer dokusunda glutasyon seviyesinin NAS ilavesiyle attığını ve oksidatif stres üzerine NAS'nin etkin olabileceğini göstermiştir.^[2] Ayrıca NAS'nin, bazı hayvan deneylerinde nöronal hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir.^[21] Son yıllarda prelinik hayvan çalışmalarında NAS'nin radyokoruyucu etkisi biyokimyasal ve genetik düzeyde gösterilmeye başlanmıştır.^[22-24] Bu çalışmamızda NAS'nin sıçan kemik iliğinde radyokoruyucu etkisi gözlenmiştir ve bu etki referans aldığımız WR-2721 ile araştırmamız kapsamında benzer görünmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız radyasyona maruz bırakılan sıçanların femur kemik iliğinden yapılan ölçümlerde NAS'nin sitogenetik düzeyde yararlı etkisini göstermiş olup radyokoruyucu etkisinin amifostin ile karşılaştırılabilir olduğu sonucuna ulaşılmıştır. NAS, klinikte diğer alanlarda kullanılan ekonomik ve güvenilir bir ilaçtır. Klinikte tedavi edici radyasyonun hasarından korumada kullanılabilmesi için daha geniş kapsamlı prelinik ve klinik çalışmalara geçecek bir ajan olarak görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Görpe A, Cantez S. Pratik nükleer tıp. İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Nobel Tıp Kitabevi; 1992. s. 14-7.
2. Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. FASEB J 1987;1(6):441-5.
3. Mc Clellan RO. The control of exposure of the public to ionizing radiation in the event of accident or attack. Biol effect of low-level rad 1983;288-301.
4. Macieira-Coelho A. Cancer and aging. Exp Gerontol 1986;21(6):483-95.
5. Holmes GE, Bernstein C, Bernstein H. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. Mutat Res 1992;275(3-6):305-15.

6. Bohr VA, Dianov GL. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 1999;81(1-2):155-60.
7. El-Habit OH, Saada HN, Azab KS, Abdel-Rahman M, El-Malah DF. The modifying effect of beta-carotene on gamma radiation-induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in male rats. *Mutat Res* 2000;466(2):179-86.
8. Hui Z, Naikum Z, Rang Z, Xiumin L, Huifang C. Effect of ionizing radiation on bio-oxidase activities in cytoplasm of mouse blood liver cells. *Chin J Radiol Med Prot* 1996;16:179-82.
9. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;27(3):247-54.
10. Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 2003;111(15):1843-50.
11. Lucas JN, Awa A, Straume T, Pogensee M, Kodama Y, Nakano M, et al. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1992;62(1):53-63.
12. Darroudi F, Natarajan AT, Bentvelzen AJ, Heidts PJ, Van Rotterdam A, Zoetelief J, et al. Detection of total and partial body irradiation in a mice model: a comparative study of chromosomal aberration, micronucleus and premature chromosome condensation assays. *Int J Rad Biol* 1992;74(2):207-15.
13. Sener G, Kabasakal L, Atasoy BM, Erzik C, Velioğlu-Oğünç A, Cetinel S, et al. Propylthiouracil-induced hypothyroidism protects ionizing radiation-induced multiple organ damage in rats. *J Endocrinol* 2006;189(2):257-69.
14. Russell NS, Begg AC. Editorial radiotherapy and oncology 2002: predictive assays for normal tissue damage. *Radiother Oncol* 2002;64(2):125-9.
15. Sy D, Hugot S, Savoye C, Ruiz S, Charlier M, Spothem-Maurizot M. Radioprotection of DNA by spermine: a molecular modelling approach. *Int J Radiat Biol* 1999;75(8):953-61.
16. Yuhás MJ, Philips TL. Pharmacokinetics and mechanisms of action of WR-2721 and other protective agents. *Radioprotector and Anticarcinogenesis*. New York: Academic Press; 1982. p. 639-53.
17. Sölen G. Radioprotective effect of N-acetylcysteine in vitro using the induction of DNA breaks as end-point. *Int J Radiat Biol* 1993;64(4):359-66.
18. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7(4):355-9.
19. Prescott L. Oral or intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen poisoning? *Ann Emerg Med* 2005;45(4):409-13.
20. Tirouvanziam R, Conrad CK, Bottiglieri T, Herzenberg LA, Moss RB, Herzenberg LA. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(12):4628-33.
21. Nair CK, Parida DK, Nomura T. Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)* 2001;42(1):21-37.
22. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM, Hanafi N. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Biochem Pharmacol* 2008;75(3):773-80.
24. Neal R, Matthews RH, Lutz P, Ercal N. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radic Biol Med* 2003;34(6):689-95.

KARE
YAYINCILIK

`info@kareyayincilik.com.tr`