

Nikotin ve Askorbik Asit'in Rat Endometriumu Üzerine Apoptotik Etkileri

Bülent Özçelik, MD; İbrahim S. Serin, MD; Özlem Cangöz, MD;
Mustafa Başbuğ, MD; Mehmet Tayyar, MD.

ÖZET

Amaç: Endometrium kanseri açısından risk azalmasına neden olduğu bilinen nikotin ile endometrial düzeyde östrojenin etkilerini değiştirebildiği düşünülen askorbik asitin endometrial apoptosis üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunun araştırılması.

Materyal ve Method: Ağırlıkları 170-200 gram arasında değişen 30 adet dişi Sprague-Dawley cinsi rat eşit olarak üç gruba ayrıldı. Yirmi gün boyunca, nikotin grubuna 3 mg/kg/gün dozunda cilt altı nikotin, nikotin+askorbik asit grubuna nikotine ek 1 mg/kg/gün cilt altı askorbik asit, kontrol grubuna ise cilt altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapıldı. Çalışma sonunda ratlardan elde edilen endometrial örnekler hemotoksilen eozin ile boyanarak incelendi ve 100 hücre başına düşen apoptotik hücre sayıları belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol, nikotin ve nikotin+askorbik asit gruplarında elde edilen ortalama apoptosis yüzdeleri sırası ile 13.60±4.83, 12.40±4.50 ve 33.20±2.78 olarak bulundu. Nikotin+askorbik asit grubunun apoptosis oranı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi (p<0.001).

Sonuç: Nikotine bağlı olarak endometrial apoptosis oranında bir değişiklik görülmez iken askorbik asit ilavesi ile anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Buna göre nikotinin endometrium kanseri üzerine olan olumlu etkilerini arttırabilmek amacıyla antioksidanların tedaviye eklenmesi yararlı olabilir. Ayrıca nikotinin endometrial dokuda oksidatif sistem üzerine ne gibi etkilerinin olduğunun da araştırılması, nikotinin hangi mekanizmalar ile kanser riskini azalttığını anlayabilmek açısından faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Nikotin, askorbik asit, endometrium, apoptosis.

ABSTRACT

Objective: To determine the effects of nicotine, known to be effective on the reduction of endometrial cancer risk, and ascorbic acid which has got role in the phenomenon of switching of estrogen effects, on the endometrial apoptosis.

Materials and Methods: Thirty female Sprague-Dawley rats weighing 170-200 gram were randomly divided into three groups. The nicotine group received 3 mg/kg/day nicotine subcutaneously and nicotine +ascorbic acid group received nicotine in the same amount as the previous group and 1 mg/kg/day ascorbic acid during 20 days period. Control group received only saline. At the end of the study, endometrial samples obtained from rats were stained with hematoxylin and eosine and apoptotic cell count per 100 cells was determined by microscopy. Statistical analysis of the results was made using one way ANOVA test.

Results: Mean apoptosis ratios were 13.60±4.83, 12.40±4.50 and 33.20±2.78 in control, nicotine and nicotine+ascorbic acid groups respectively. The apoptosis ratio of nicotine+ascorbic acid group was significantly different from control group (p<0.001).

Conclusion: While the ratio of apoptosis in endometrial tissue has not been affected from nicotine, it has been significantly increased with the addition of ascorbic acid. That is why, it has been conclude that, addition of the antioxidants may be useful to increase the beneficial effects of nicotine on the endometrial cancer risk. Besides, investigation of the effects of nicotine on oxidative system in endometrial tissue may be helpful to understand by which mechanisms nicotine decrease the endometrial cancer risk.

Key Words: Nicotin, ascorbic acid, endometrium, apoptosis.

GİRİŞ

Sigaranın, bağımlılık yapan bileşeni olarak bilinen nikotinin, tümör gelişimi üzerine, hücre proliferasyonunu artırıp kontrollü hücre ölümünü (apoptosis) bozmak sureti ile direk etkileri olduğuna dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Sigara kullanımının en önemli önlenilebilir kanser sebebi olduğu ve ABD verilerine göre kansere bağlı ölümlerin yaklaşık % 30'unun bu şekilde önlenilebileceği bilinmektedir ¹. Akciğer ve baş-boyun kanserlerinin gelişimi ile nikotin tüketimi arasında güçlü bağlantılar gösterilmekle birlikte, nikotin kullanımı ile mesane, serviks, pankreas, karaciğer, böbrek, mide ve kolon kanserlerinin insidansında da bir artış olduğu üzerinde durulmaktadır ². Solunum sistemine ait organlar haricinde ortaya çıkan kanser insidansındaki bu artışa zıt olarak, sigara içimi ile endometrial kanser riskinde belirgin bir azalmanın olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar da dikkat çekmektedir ³⁻⁵. Sigara içiminin, dolaşımdaki östrojen konsantrasyonları üzerine olan anti-östrojenik etkisi, vücut ağırlığında relatif bir azalma meydana getirmesi ve erken yaşta menopoza sebep olması gibi bir takım mekanizmalar ile endometrial kanser riskini azaltmakta olduğu iddia ediliyor olsa da, altta yatan biyolojik mekanizmalar halen belirsizliğini korumaktadır ⁴⁻⁵.

Mevcut bilgilerin ışığında, planlanmış olduğumuz deneysel çalışmamızda, nikotinin endometrial dokuda apoptosis üzerine ne gibi etkileri olduğunun araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca nikotine bağlı olarak dolaşımdaki miktarında bir azalma meydana geldiği bilinen ve son yıllarda östrojene bağlı tümörlerde östrojen etkilerini tersine çevirebilme özelliği üzerinde durulan, antioksidan bir madde olan askorbik asitin, nikotin ile birlikte uygulanması neticesinde, endometrial apoptosiste ortaya çıkabilecek değişikliklerin gösterilmesi hedeflenmiştir ^{6,7}.

MATERYAL VE METOD

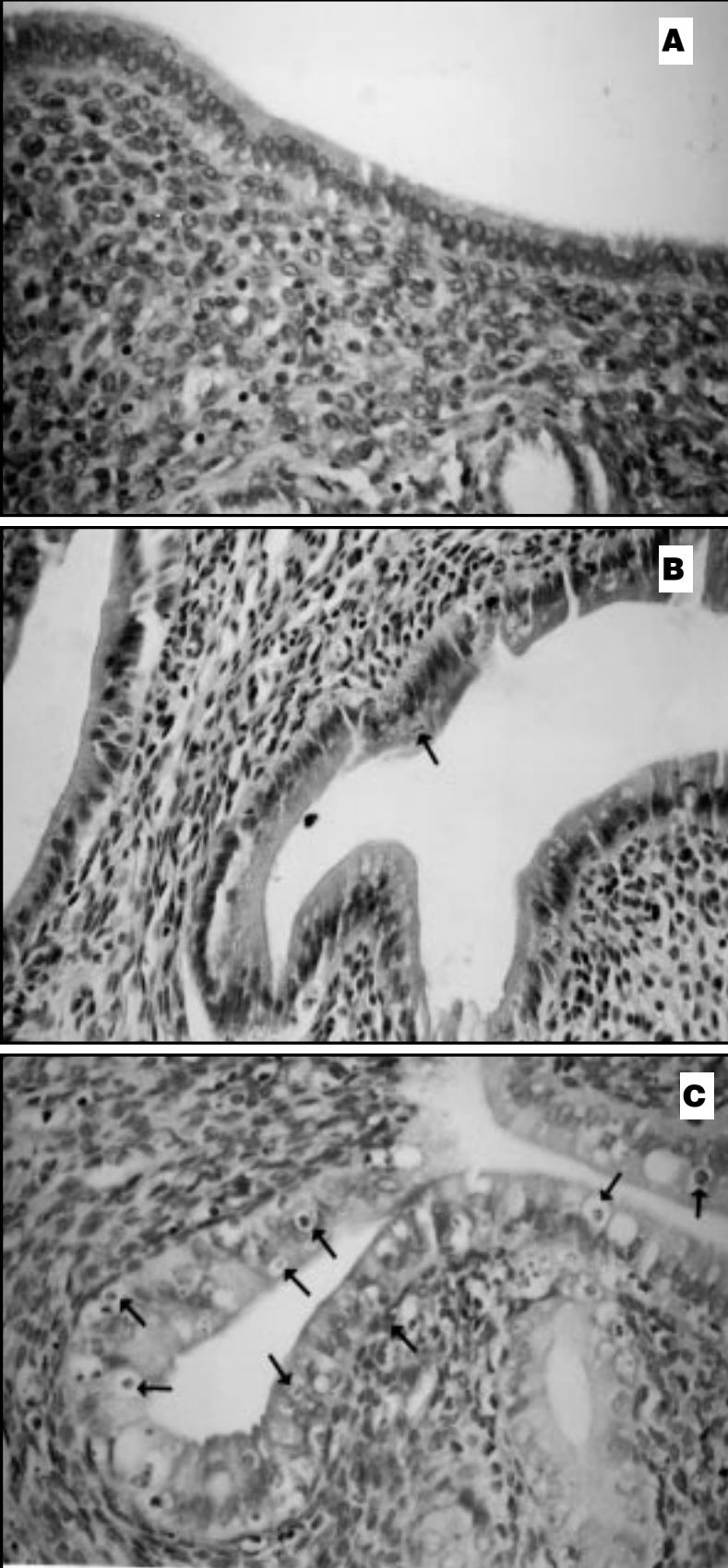
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Klinik ve Deneysel Araştırma Merkezinde yapılan bu çalışmada, ağırlıkları 170-200 gram arasında değişen 30 adet Beyaz Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı.

Tüm ratlar standart fare ve sıçan palet yemi ile (Aytekinler, Türkiye) eşit şekilde beslendi, oda sıcaklığı ve gece-gündüz siklusları bakımından eşit ortamlarda tutuldu. Ratlar randomize şekilde 3 eşit gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak alınırken, ikinci gruba (nikotin grubu) 20 gün boyunca 3 mg/kg/gün dozunda cilt altı nikotin enjeksiyonu uygulandı, üçüncü gruba (nikotin+askorbik asit grubu) ise nikotine ek olarak 1 mg/kg/gün dozunda askorbik asit uygulaması yapıldı. Kontrol grubundaki hayvanlara plesebo olarak sadece serum fizyolojik enjekte edildi. Enjeksiyonlar için 1 ml'lik tüberkülin şırıngaları kullanıldı. Çalışmanın sonunda ratlar 50 mg/kg intra-peritoneal ketamin enjeksiyonu ile uyutularak batın duvarına 2cm'lik insizyon yapıldı ve uterin hornlardan patolojik inceleme için 1cm'lik segmentler alındı. Alınan örnekler % 10'luk formaldehid içine konularak patolojik inceleme yapıncaya kadar tespit edildi. Örneklerden elde edilen endometrium kesitleri hemotoksilen eozin ile boyanarak 400 büyütmede incelendi. Endometrium yüzey epitelinde 100 hücreden kaç tanesinin apoptotik olduğu sayılarak apoptosis yüzdeleri belirlendi.

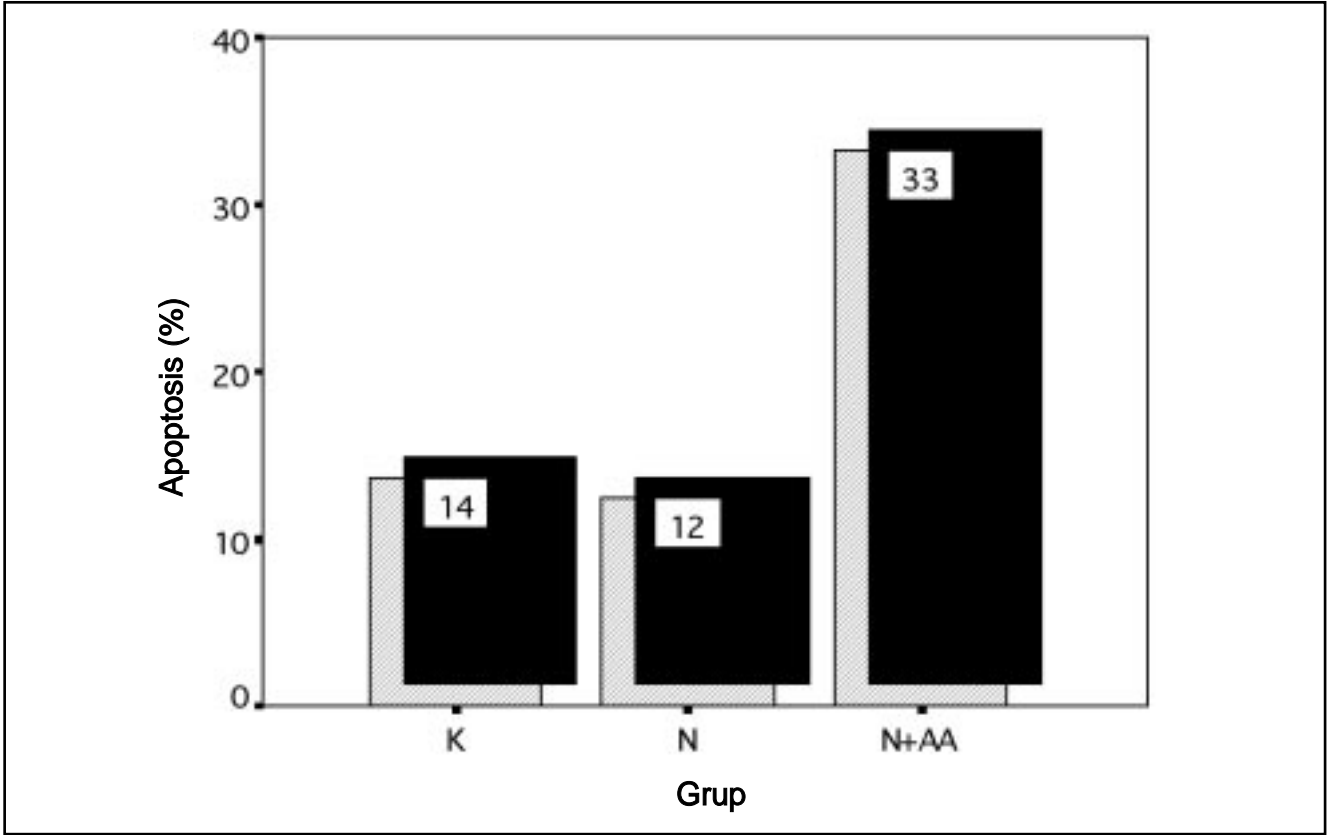
Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS programından faydalanıldı. Gruplar arasında ANOVA yöntemi kullanılarak karşılaştırmalar yapıldı. Hangi grubun farklı olduğunu ortaya koyabilmek amacı ile post-hoc test olarak Scheffe prosedürü uygulandı.

BULGULAR

Çalışma, her bir grupta onar rat olmak üzere kayıpsız tamamlanmıştır. Elde edilen örneklerin hemotoksilen eozin ile boyalı kesitlerinin (Resim 1) incelenmesi neticesinde kontrol, nikotin ve nikotin+askorbik asit gruplarında tespit edilen ortalama apoptosis yüzdeleri sırası ile 13.60 ± 4.83 , 12.40 ± 4.50 ve 33.20 ± 2.78 olarak bulunmuştur (Grafik 1). Kontrol grubu ile nikotin grubu arasında apoptosis yüzdeleri bakımından herhangi bir fark yok iken nikotin+askorbik asit grubunda elde edilen yüzdelerin diğer iki gruptan belirgin biçimde farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$) (Tablo 1).



Resim 1.- **A-** Kontrol grubunda apoptosis olmayan sahadan alınan endometrium epiteli (X400, H-E). **B-** Nikotin grubundan endometrium epiteline az sayıda apoptotik hücre görülüyor (X400, H-E). **C-** Nikotin+Askorbik Asit grubunda yüzey epiteline çok sayıda apoptotik hücre görülüyor (X400, H-E). (Oklar, apoptotik hücreleri göstermektedir.)



Grafik 1.– Kontrol (K), nikotin (N) ve nikotin+askorbik asit (N+AA) gruplarında apoptotik hücre yüzdeleri.

Tablo 1.– Gruplara göre apoptosis yüzdelerinin karşılaştırması.

	K Grubu (n=10)	N Grubu (n=10)	N+AA Grubu (n=10)
Apoptosis % (Ort ± SS)	13.60±4.83	12.40±4.50	33.20±2.78 [§]

K: kontrol; N: nikotin; AA: askorbik asit.

[§]Diğer gruplara anlamlı olarak farklı (p<0.001)

TARTIŞMA

Endometrial adenokarsinom, bütün dünyada, kadınlar arasında tespit edilen her 10 kanserden birini oluşturmaktadır. Gelişmiş olan ülkelerde kadın genital sisteminin en sık görülen kanseridir ⁸. Progesteron ile karşılanmamış endojen ve eksojen östrojenin etkisine bağlı olarak, endometrial hücrelerdeki mitotik aktivitede ve DNA replikasyon hatalarındaki artış ile somatik mutasyonlar sonucunda malign fenotipin or-

taya çıkışı bugün için en çok kabul gören hipotezdir ⁹. Endometrial kanserlerin büyük çoğunluğunu adenokarsinomların oluşturması ve östrojen hormonunun da bu gelişimde majör rol oynaması nedeniyle, dolaşımdaki hormon seviyeleri üzerine azaltıcı yönde etki eden faktörlerin hastalık riskinin azaltılmasında önemli etkileri olacağı düşünülmektedir.

Bugün için sigara kullanımı ile endometrial kanser gelişimi arasında ters bir ilişki olduğu bilinen bir ger-

çektir. Terry ve ark.'nın 4 2002 yılında yayınlamış oldukları makalelerinde bu ilişkinin araştırılması amacıyla yapılmış olan 26 epidemiyolojik çalışma gözden geçirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen bilgilere göre, post menopozal kadınlar başta olmak üzere, aktif sigara içen kadınlarda endometrial kanser riskinde belirgin bir azalma meydana gelmekte ve sigara bıraktıktan sonra geçen süre ile doğru orantılı olarak risk yeniden yükselmeye başlamaktadır. Sigara kullanım süresi fazla olan kadınlarda da kısa süreli kullanım öyküsü olan kadınlara göre daha düşük risk oranları tespit edilmiştir. Büyük çoğunluğu sigara kullanan ve hormon tedavisi almayan kadınlar üzerinde yapılan bu çalışmalar, kan östrojen konsantrasyonları yönünden incelendiğinde, önemli bir kısmında sigara kullanan ve kullanmayan kadınlar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Plesebo kontrollü östrojen tedavisi uygulanan iki çalışmadan Cassidenti ve ark.'larına ¹⁰ ait olanda, hem bazal hem de uygulamadan kısa süre sonraki serbest östradiol seviyelerinin, sigara içen kadınlarda daha düşük olduğu ancak östron ve bağlı östradiol seviyeleri yönünden fark olmadığı görülmüştür. Jensen ve ark.'larının ¹¹ çalışmasında ise bir yıllık tedavi sonrasında hem östron hem de bağlı östradiol seviyelerinin sigara içenlerde anlamlı ölçüde düşük olduğu bulunmuş, ancak bu çalışmada serbest östradiol düzeylerine bakılmamıştır. Yine bu çalışmaların bazılarında seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ve androjenlerinde seviyelerine bakılmış ancak bu maddelerin düzeylerinde de sigara kullanımına bağlı olarak belirgin değişikliklerin olduğuna dair net bir sonuca varılamamıştır.

Bu bilgiler göz önüne alındığında, sigara kullanımının, dolayısıyla da nikotinin, endometrial kanser gelişim riskini hangi mekanizmalar ile azalttığı net değildir. Bugün için, tütün kullanımı ile ilişkili kanserlerin patogeneğinde, nikotine bağlı olarak ortaya çıkan apoptosis inhibisyonu, üzerinde en fazla durulan konulardan biridir ^{1,12}. Diğer taraftan, nikotinin beyin doku-

sunda hücre proliferasyonunu azaltıcı ve apoptosis artırıcı yönde etkilerinin olduğu da bilinmektedir ¹³. Ancak nikotinin, kanser riskini azaltması bakımından olumlu etkilerinin olduğu endometriumda, apoptosis üzerine ne gibi etkilerinin olduğuna dair herhangi bir çalışma yoktur. Patil ve ark. ^{14,15} tarafından yapılmış olan deneysel çalışmalarda, bizim çalışmamızdakine eşit dozda nikotinin, uterus ve over aktivitesi üzerine olan etkilerine bakılmıştır. Araştırmalarda elde edilen sonuçlara göre nikotin uygulaması ile overlerde graf follikül ve korpus luteum sayısı ve boyutlarında azalma meydana gelirken atrezik follikül sayısında belirgin artış olduğu, uterusu ise endometrial glandüler hücreler kaybolurken endometrium ve miyometriumda doku kalınlığının dolayısıyla da uterin ağırlığın azaldığı gözlenmiştir. Uterus ve overlerde ortaya çıkan protein azalmasının bu organların gelişimindeki yavaşlamadan kaynaklanabileceği ve bu durumun da östrojen sentezindeki azalmadan dolayı olabileceği üzerinde durulmuştur. Bizim çalışmamızdan elde edilen verilere bakıldığında, tek başına nikotin kullanılması ile endometrial hücrelerde apoptosis üzerine herhangi bir etkinin olmadığı görülmektedir. Çalışmamızı önceki çalışmalar ile birlikte ele aldığımızda, nikotine bağlı olarak endometriumda meydana gelen değişikliklerin, proliferatif kapasitedeki azalmadan kaynaklanabileceği görüşü daha ağır basmaktadır.

Nikotine bağlı ortaya çıkan oksidasyon ürünleri ve serbest radikaller, vücutta direk ve indirek yollarla oksidatif hasarı başlatabilmektedir ⁶. Askorbik asit vücuttaki antioksidan savunma mekanizmasının önemli bir bileşeni olduğu için, nikotine bağlı olarak bu vitaminin düzeyinde meydana gelen değişiklikler araştırılmış ve sigara içenlerde içmeyenlere göre daha yüksek miktarda günlük vitamin alımına gerek olduğu ortaya konulmuştur (200 mg/gün'e karşılık 60 mg/gün) ^{6,16}. Bunun yanında, askorbik asitin, endometriumda, östrojen etkisini azaltma yönünde faydalarının da olduğu çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir ^{7,17}. Ancak hiçbir çalışmada askorbik asitin tek başına

yada nikotin ile birlikte endometriumda apoptosis üzerine ne gibi etkileri olduğuna dair bilgi yoktur. Yapmış olduğumuz çalışmamızda nikotin ile birlikte askorbik asit uygulaması yapılan ratlarda endometrial apoptosis de anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak nikotinin endometriumda hangi mekanizmalar ile kanser riskini azaltmakta olduğu halen araştırmaya açık bir konudur. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda nikotinin tek başına endometriumdaki apoptosis üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı ancak askorbik asit ile birlikte belirgin bir artış meydana geldiği görülmektedir. Nikotinin bilinen oksidatif özelliklerinin yanında, santral sinir sistemi gibi bazı spesifik bölgelerde antioksidan özellikleri de ön plana çıkmaktadır ¹⁸. Ancak endometrial dokuda bu özelliklerinden hangisinin ön planda olduğu bilinmemektedir. İleriye yönelik olarak nikotinin endometrial dokuda oksidatif sistem yönünden ne gibi değişiklikler yaptığının araştırılması yararlı olabilir. Ayrıca sigara kullanan kadınlarda günlük vitamin takviyeleri ile endometrial kanser gelişim riskinin daha da aşağılara çekilip çekilemeyeceğinin, geniş kontrollü çalışmalar ile araştırılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. McBride CM, Ostroff JS. Teachable moments for promoting smoking cessation: The context of cancer care and survivorship. *Cancer Control* 2003; 10: 325-33.
2. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med* 2002; 252: 206-24.
3. Baron JA. Beneficial effects of nicotine and cigarette smoking: the real, the possible and the spurious. *Br Med Bull* 1996; 52: 58-73.
4. Terry PD, Rohan TE, Franceschi S, Weiderpass E. Cigarette smoking and risk of endometrial cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 470-80.
5. Terry PD, Miller AB, Rohan TE. A prospective cohort study of cigarette smoking and the risk of endometrial cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 1430-5.
6. Kelly G. The interaction of cigarette smoking and anti-oxidants. Part III: Ascorbic Acid. *Altern Med Rev* 2003; 8: 43-54.
7. Berstein L, Tsyrlina E, Poroshina T, Bychova N, Kalinina N, Gamajunova V, Vasilyev D, Kovalenko I. Switching (overtargeting) of estrogen effects and its potential role in hormonal carcinogenesis. *Neoplasma* 2002; 49: 21-5.
8. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997; 47: 5-27.
9. Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jaquotte A, Toniolo P. Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer: review of the evidence and research perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 973: 296-315.
10. Cassidenti DL, Vijod AG, Vijod MA, et al. Short term effects of smoking on the pharmacokinetic profiles of micronized estradiol in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1953-60.
11. Jensen J, Christiansen C. Effects of smoking on serum lipoproteins and bone mineral content during postmenopausal hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 820-5.
12. Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW. Nicotine inhibition of apoptosis suggest a role in tumor promotion. *FASEB J*; 1993: 1045-51.
13. Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EH, Kim CJ. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 2002; 27: 1509-13.
14. Patil SR, Ravindra R, Patil SR, Londonkar R, Patil SB. Nicotine induced ovarian and uterine changes in albino mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 1998; 42: 503-8.
15. Patil SR, Patil SR, Bhaktaraj B, Patil SB. Effect of graded doses of nicotine on ovarian and uterine activities in albino mice. *Indian J Exp Biol* 1999; 37: 184-6.
16. Schectman G. Estimating ascorbic acid requirements for cigarette smokers. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 686: 335-46.
17. Antioxidant inhibits tamoxifen-DNA adducts in endometrial explant culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 157-64.
18. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Bickford PC, Tighe T, Sanberg PR. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci* 2002; 71: 2807-20.