

In Vitro Evaluation of The Effect of Vitamin C on Necrosis and Autophagy Caused by Ionizing Radiation

Semiha DEDE¹, Veysel YÜKSEK², Osman YILMAZ³, Sedat ÇETİN¹, Ayşe Usta⁴, Mehtap GÜNEY⁵

¹Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

²Özalp Vocational High School, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

³Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

⁴Department of Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

⁵Department Of Animal Nutrition And Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

ABSTRACT

This study was planned to investigate the possible protective effect of Vitamin C on the ionized radiation induced necrotic and autophagic pathways as in vitro. The NRK-52E renal epithelial cells were cultured (RPMI 1640 medium (10% FBS, 1% L-Glutamine (2mM) and 1% Penicillin/Streptomycin). The proliferation-enhancing concentration of Vitamin C (100 µM) was used. In this study 5 groups were designed (Control, Ionizing Radiation, Vitamin C, Ionizing Radiation+Vitamin C, Vitamin C+Ionizing Radiation). The ionizing radiation groups were exposed 8 Gy ionizing radiation. Total RNA and cDNA were isolated from the samples collected from the incubated cells for 24 hours, and expression levels of target genes were determined by RT-PCR. According to the control gene by RT-PCR; the expression levels of necrotic (RIPK 1, RIPK3) and autophagic (ATG3, ATG5, BECN1, Map3A) target genes were determined. In the radiation group, necrotic and autophagic genes were found to be significantly increased compared to control group. The vitamin C supplementation after radiation decreased genes expression of all genes except Map3A gene. As a result, it was noted that ionizing radiation affects necrotic and autophagic cell pathways in the NRK-52E cell line, and activate cytotoxic mechanism. Vitamin C leads to down regulation for necrotic and autophagic genes, except for Map3A before and after ionized radiation administration. It was considered that the effects of vitamin C on cytotoxicity due to ionizing radiation are worth investigating.

Key words: Autophagy, In vivo, Ionizing radiation, Necrosis, Vitamin C.

İyonize Radyasyondan Kaynaklanan Nekroz ve Otofaji Üzerine Vitamin C'nin Etkisinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi

ÖZET

Bu çalışma, iyonize radyasyondan kaynaklanan nekrotik ve otofajik yollarda Vitamin C'nin olası koruyucu etkisinin in vitro olarak araştırılması amacıyla planlandı. Bu amaçla NRK-52E böbrek epitelyal hücre hattı kullanıldı. Hücreler (%10 FBS, %1 L-Glutamin (2mM) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI 1640) besi ortamında çoğaltıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen Vitamin C'nin proliferasyon artırıcı konsantrasyonu (100 µM) uygulandı. Kontrol, İyonize Radyasyon, Vitamin C, İyonize Radyasyon+Vitamin C, Vitamin C+İyonize Radyasyon olmak üzere 5 çalışma grubu oluşturuldu. İyonize Radyasyon gruplarına 8 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Bütün gruplar 24 saat inkübe edildikten sonra total RNA ve cDNA izolasyonu yapılarak, qRT-PCR ile kontrol genine göre; nekrotik (RIPK 1, RIPK3) ve otofajik (ATG3, ATG5, BECN1, Map3A) hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. Radyasyon grubunda nekrotik ve otofajik genlerin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulundu. Radyasyona maruz kaldıktan sonra verilen vitamin C'nin, Map3A hariç tüm genlerin ekspresyonunu azalttığı saptandı. Sonuç olarak, iyonize radyasyonun NRK-52E hücre hattındaki nekrotik ve otofajik hücre yollarını etkilediği, sitotoksik mekanizmayı aktive ettiği ve Vitamin C'nin iyonize radyasyon uygulamasından önce ve sonra Map3A hariç, nekrotik ve otofajik genlerin down-regülasyonuna yol açtığı belirlendi. Vitamin C'nin iyonlaştırıcı radyasyona bağlı sitotoksisite üzerindeki etkilerinin araştırılmaya değer olduğu düşünülmektedir..

Anahtar kelimeler: Hücre kültürü, İyonize radyasyon, Nekroz, Otofaji, Vitamin C,

GİRİŞ

İyonize radyasyon, gündelik hayattaki yaygın kullanımının yanı sıra pek çok hastalığın tanısı ve tedavisinde de kullanılmaktadır. Nispeten düşük dozlarda veya maruz kalma sürelerinde bile, hücreler ve dokular üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinen serbest radikallerin üretimine neden olur. Antioksidan vitaminler (E, C ve A), serbest radikal kaynaklı hücre yıkımına karşı koruyucu olarak önerilmektedirler (Halliwell 1994, Weiss 2000, Dede ve ark. 2003, Değer ve ark. 2003).

İyonize radyasyon, atomlar tarafından elektromanyetik dalgalar veya parçacıklar biçiminde salınan bir enerji türüdür. Bütün canlılar, doğal iyonlaştırıcı radyasyon kaynakları, x ışınları ve tıbbi cihaz kaynaklı radyasyona maruz kalınabilir. Tıp, sanayi, tarım ve bilimsel çalışmalar gibi faydalı yerlerde kullanılabilir. Uygun şekilde kullanılmadığında sağlık için tehlikeli olabilir. Radyasyon dozları belirli seviyeleri aştığında deri yanıkları, akut radyasyon sendromu gibi akut sağlık sorunları ortaya çıkabilir. İyonize radyasyon, DNA'da yaptığı hasara bağlı olarak hücre ölümüne neden olarak etki göstermektedir. İyonize radyasyon, apoptotik yolaktaki enzimleri de etkileyerek de etkili olmaktadır. Radyasyon, sıcaklık, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar, düşük dozlarda apoptozis, yüksek dozlarda nekrozise sebep olabilir (Karslıoğlu ve ark. 2005, Taysi ve ark. 2008, Yılmaz ve ark. 2019).

Canlı organizmanın metabolik faaliyetlerinin normal seyrinde devam edebilmesi için oldukça önemli molekül olan vitaminler, enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak da görev yaparlar. Vitamin C, enzimatik reaksiyonlarda elektron vererek, indirgeyici ajan olarak direkt etki göstermektedir (Mc Dowell 2003, Gürdöl ve Ademoğlu 2013, Ferrier 2014). Vitaminlerin, özellikle vitamin C'nin radyasyondan kaynaklanan oksidatif stresten kaynaklanan hasarlara karşı, koruyucu rolünü ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Değer ve ark. 2003, Dede ve ark. 2009).

Bu çalışma, iyonize radyasyondan kaynaklanan nekroz ve otofaji üzerine vitamin C'nin koruyucu olarak etkili olup olmadığını in vitro değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada NRK-52E rat böbrek epitelyal hücre hattı (ATCC®CRL-1571™) kullanıldı. Hücreler in vitro koşullarda RPMI 1640 medyumda; %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, %95 nem ve %5 CO₂ inkübatör ortamında haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak çoğaltıldı. Hücrelerin 25 cm²'lik kültür flasklarına sayıları 2x10⁶ olacak şekilde ekimi yapıldı.

Kontrol, İyonize Radyasyon, Vitamin C, İyonize Radyasyon+Vitamin C, Vitamin C+İyonize Radyasyon olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Vitamin C gruplarına daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen Vitamin C'nin proliferasyon artırıcı konsantrasyonu (100 µM) uygulandı (Yüksek ve ark. 2017). İyonize Radyasyon gruplarına 8 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Işınlamalar, Cobalt-60 Teleterapi cihazında, gamma radyasyonu verilerek gerçekleştirildi.

Oluşturulan deney gruplarında 24 saat inkübe edilen hücrelerden total RNA ve cDNA izolasyonu yapılarak, nekrotik (RIPK 1, RIPK3) ve otofajik (ATG3, ATG5, BECN1, Map3A) hedef genlerin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR ile ekspresyon düzeyleri tespit edildi. Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak Gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Her bir örnek için 3 tekrarlı Gerçek Zamanlı PCR yapıldı ve bir CT (cycle threshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi. Ekspresyon analizlerinde 2-ΔΔCt formülasyonu kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonunun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

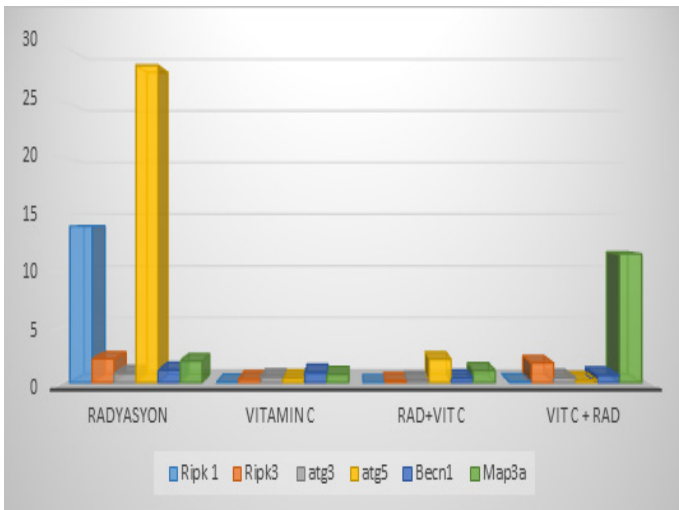
BULGULAR

Çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Radyasyon grubunda yaklaşık olarak nekrotik RIPK 1 ve RIPK 3 genleri ve otofajik ATG5, BECN1, MAP3A genlerinin kontrole göre önemli oranda arttığı, radyasyon uygulanması sonrası vitamin C'nin tüm genlerin ekspresyonunu azalttığı görüldü. Vitamin C verilen gruplara radyasyon verilmesinin de, Map3A geni hariç benzer etkiyi gösterdiği, hatta ATG5 geninin ekspresyonunu daha da azalttığı tespit edildi.

Tablo 1. Gen Ekspresyonlarının Real Time - PCR Sonuçları

Çalışma Grubu	RİPK 1	RİPK3	ATG3	ATG5	BECN1	MAP3A
Kontrol	1	1	1	1	1	1
Radyasyon	13,928	2,143	0,852	28,246	1,156	1,958
Vitamin C	0,0480	0,348	0,514	0,429	0,946	0,757
Radyasyon+Vitamin C	0,0056	0,185	0,255	2,128	0,417	1,109
Vitamin C+ Radyasyon	0,092	1,790	0,460	0,248	0,697	11,471

**Şekil 1.** Gen Ekspresyonlarının Real Time - PCR Sonuçları

TARTIŞMA VE SONUÇ

Önemli bir plazma antioksidanı olan Vitamin C, bir antioksidan olarak in vitro çalışmalarda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Kang ve ark. 1998, Chen ve ark. 2005, Serbecic ve Beutelspacher 2005). Radyasyonun yıkıcı etkilerine karşı, vitamin takviyesinin antioksidan sistemi güçlendirerek olarak etkili olmaktadır (Dede ve ark. 2009)

Canlı organizmada doku ve organellerin lokal ve ani olarak ölümüne nekroz denir. Nekroz, rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Coşkun ve Özgür 2011). Vitamin C UVB radyasyon kaynaklı hücre hasarı üzerine DNA yıkımı, ROS üretimini engelleyerek koruyucu olduğu bildirilmektedir (Kawashima ve ark. 2018).

Otofaji, hasarlı hücresel proteinleri ve organelleri ortadan kaldıran fizyolojik bir mekanizmadır. Böylece hücre içeriği parçalanarak geri dönüştürülebilir bir duruma gelmektedir.

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlaraya yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanması şeklinde seyretmektedir (Öz Arslan ve ark. 2011, Liman ve Suna 2017).

Radyasyona maruz kalınması ile ROS üretimi ve DNA yıkımı ile birlikte subsellüler organel yıkımı ve otofaji de meydana gelmektedir (Kim ve ark. 2019).

Bu çalışmada, iyonize radyasyonun NRK-52E hücre hattında nekrotik ve otofajik gen ekspresyonlarını artırarak, hücre yolaklarını etkilediği ve sitotoksik mekanizmanın aktif hale gelmesine neden olduğu belirlendi. İyonize radyasyondan kaynaklanan nekrotik ve otofajik hücre yıkımına karşı, radyasyon öncesi koruyucu olarak ve radyasyon sonrası tedavi edici olarak Vitamin C uygulamasının yararlı etkileri tespit edildi. Sonuç olarak, vitamin C'nin iyonize radyasyona bağlı gelişen sitotoksiste üzerine koruyucu ve terapötik rolünün araştırılmaya değer olduğu kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Chen L, Jia RH, Qui CJ, Ding G. (2005). Hyperglycemia inhibits the uptake of dehydroascorbate in tubular epithelial cell. *Am J Nephrol*, 25:459-65.
- Çoşkun G, Özgür H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv*, 20:145.
- Dede S, Deger Y, Kahraman T, Kılıçalp D. (2009). Effects of X-ray radiation on oxidation products of nitric oxide in rabbits treated with antioxidant compounds. *Turk J Biochem*, 34(1):15-8.
- Dede S, Değer Y, Mert N, Kahraman T, Alkan M, Keleş İ. (2003). Studies on the effects of X-ray on erythrocyte zinc and copper concentrations in rabbits after treatment with

- antioxidants. *Biol Trace Elem Res*, 92:55-60.
- Değer Y, Dede S, Belge A, Mert N, Kahraman T, Alkan M. (2003). Effects of X-ray radiation on lipid peroxidation and antioxidant systems in rabbits treated with antioxidant compounds. *Biol Trace Elem Res*, 94(2):149-56.
- Ferrier DR. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, 6nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2014.
- Gürdöl F, Ademoğlu E. *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2013.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev*, 52:253-65.
- Kang SA, Jang YJ, Park H. (1998). In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: Dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res*, 28:93-107.
- Karslıoğlu I, Ertekin MV, Taysi S, Kocer I, Sezen O, Gepdiremen A, Koc M, Bakan N. (2005). Radioprotective effects of melatonin on radiation-induced cataract. *J Radiat Res*, 46:277-82.
- Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, Saito N, Ohsawa H, Kurita K, Nagata K, Yoshida M, Ishigami A. (2018). Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Sci Re*, 8(1):16199.
- Kim W, Lee S, Seo D, Kim D, Kim K, Kim E, Kang J, Seong KM, Youn H, Youn B. Cellular stress responses in radiotherapy. *Cells*, 2019;8(9):E1105.
- Liman N, Suna DC. (2017). Hücre koruyucu bir mekanizma: Otofaji. *Erciyes Üniv Sağ Bil Derg*, 26:275-281.
- Mc Dowell LR. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. 2nd ed. Elsevier Press, Amsterdam, Philadelphia, 2003.
- Öz Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D. (2011). Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniv Sağ Bil Derg*, 2:4.
- Serbecic N, Beutelspacher SC. (2005). Vitamins inhibit oxidant induced apoptosis of corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol*, 49:355-62.
- Taysi S, Memisogullari R, Koc M, Taylan A, Aslankurt M, Gümüştekin K, Al B, Ozabacigil F, Yılmaz A, Ozder HT. (2008). Melatonin reduces oxidative stress in the rat lens due to radiation-induced oxidative injury. *Int J Radiat Biol*, 84:803-8.
- Weiss JF, Landauer MR. (2000). Radioprotection by antioxidants. *Ann NY Acad Sci*, 899:44-60.
- Yılmaz O, Çetin S, Yüksek V, Dede S, Tuğrul T. The effect of vitamin C on apoptotic pathway in ionizing radiation-induced NRK-52E cell line. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian Bio Chem 2019), June 28-29, 2019 Ankara, Turkey, OP, 1872.
- Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Çetin S. (2017). The effects of vitamins A, D, E, and C on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-treated renal and osteoblast cell lines. *Fluoride*, 50(3):300-13.