

# Wistar-Albino Sıçanlarda Işınlama Sonrası İntestinal Mukozada Oluşan Değişiklikler ve Askorbik Asidin Koruyucu Etkisi

## Structural Changes in the Intestinal Mucosa of Wistar-Albino Rats After Irradiation, and Protective Effect of Ascorbic Acid

Barbaros AYDIN,<sup>a,b</sup>  
Deniz YALMAN,<sup>a</sup>  
Başak DOĞANAVŞARGİL,<sup>c</sup>  
Serra KAMER,<sup>a</sup>  
Hülya ELLİDOKUZ<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Radyasyon Onkolojisi AD,  
<sup>b</sup>Patoloji AD,  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
<sup>b</sup>Radyasyon Onkolojisi AD,  
<sup>c</sup>Preventif Onkoloji AD,  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 28.06.2013  
Kabul Tarihi/Accepted: 22.04.2014

Bu çalışma, 53<sup>rd</sup> Annual ASTRO Meeting  
October 2-6 2011, Miami, ABD'de  
poster olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Deniz YALMAN  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Radyasyon Onkolojisi AD, İzmir,  
TÜRKİYE/TURKEY  
yalman.deniz@gmail.com

**ÖZET Amaç:** Wistar-albino sıçanların intestinal mukozasında ışınlama sonrası oluşan histopatolojik değişiklikleri ve askorbik asidin koruyucu etkisini araştırmak. **Gereç ve Yöntemler:** Otuz iki adet genç erişkin Wistar-albino sıçan; kontrol, C vitamini, radyoterapi, radyoterapi + C vitamini grubu olmak üzere randomize edilmiştir. C vitamini alacak grupların içme suyuna 10 gün boyunca 250 mg/kg/gün C vitamini eklenmiştir. Sıçanların abdominal bölgelerine çalışmanın 11. gününde tek fraksiyonda 8 Gy ışınlama uygulanmıştır. Sıçanlar 72 saat sonra sakrifiye edilerek özofagus distal uçtan anüse kadar tüm gastrointestinal traktus çıkarılmış, ileo-çekal valvin 5 cm proksimal ileumdan ve 5 cm distal kolon segmentinden 1 cm'lik segmentte kript sayısı, anormal epitel hücrelerinin varlığı, mukozal konjesyon, ödem, kriptik doku değişiklikleri, villus boyu, villus yapı değişiklikleri, villus birleşmesi ve parçalanması, subepitelial ayrılma, bazal membranda mitotik ve apoptotik figür sayısı değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Yalnız radyoterapi grubunda kript sayısı azalmış, apoptotik figür sayısı artmış, villus yapısında aşırı parçalanma, birleşme ve kısalma, lümenle lenfosit infiltrasyonu ve epitel hücrelerine rastlanmıştır. Radyoterapi + C vitamini grubunda apoptotik figür sayısının çok az olduğu, villus yapısı, kriptik ve mukozal tabakanın kısmen korunduğu belirlenmiştir. Yalnız radyoterapi grubu, radyoterapi + C vitamini grubuyla karşılaştırıldığında villus boyunun radyoterapi + C vitamini grubu lehine farklı olduğu gözlenmiş (p=0,001), ancak apoptotik figür sayısı, mitotik sayı ve kript sayısı yönünden fark saptanmamıştır (sırasıyla p=0,031, p=0,524 ve p=0,772). **Sonuç:** C vitamini intestinal mukozayı radyasyon hasarından korumaktadır. C-vitamininin radyoterapinin anti-tümör sitotoksiste üzerine olumsuz etkisinin olmayabileceği gösterilmiş olup, pelvik ışınlamalarda profilaktik kullanımı sıklıkla karşılaşılan intestinal yan etkilerin gelişimini önleyebilir. Ancak C vitamini yüksek dozlarda pro-oksidan olabileceğinden, doz kontrollü ve tümörlü dokularda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Askorbik asit; radyoterapi; barsak mukozası; sıçanlar, Wistar

**ABSTRACT Objective:** To investigate the histopathological changes and the protective effect of ascorbic acid on the intestinal mucosa of the Wistar-albino rats after irradiation. **Material and Methods:** Thirty-two young-adult, Wistar albino rats were randomized into control, vitamin C only, radiotherapy only, and radiotherapy + vitamin C groups. Vitamin C (250 mg/kg/day) was added to the drinking water of the rats in vitamin C groups for 10 days. A single dose of 8 Gy radiotherapy was applied to the abdominal region of the rats on the eleventh day. The rats were sacrificed after 72 hours, and their all gastrointestinal tract, from distal esophagus to the anus, was removed. A 1-cm segment selected from a 5-cm proximal part of ileocecal valve from the ileum and 5 cm distal part from the colon were analyzed regarding crypt count, abnormal epithelial cells, mucosal congestion, edema, cryptic tissue changes, villus height, structural changes, degradation and union of the villi, subepithelial detachment, and mitotic and apoptotic figure counts in the basement membrane. **Results:** In the radiotherapy only group; crypt count decreased, apoptotic figure count increased, the villi showed extreme degradation, union and shortening, there were lymphocyte infiltration and epithelial cells in the lumen. In the radiotherapy + vitamin C group; apoptotic figure count was very low, villus structure, cryptic and mucosal layer were preserved partially. When radiotherapy only group was compared to radiotherapy + vitamin C group, villus height differed in favor of radiotherapy + vitamin C group (p=0.001), however no differences regarding mitotic count, apoptotic figure and crypt count were found (p=0.03, p=0.524, p=0.772, respectively). **Conclusion:** Vitamin C protects intestinal mucosa from radiation damage, and ascorbic acid may not reduce the radiation-induced antitumor activity. Prophylactic use of vitamin C in pelvic irradiation can prevent the side effects. However, it could act as a pro-oxidant in higher doses, therefore dose-controlled studies are needed in tumor tissues.

**Key Words:** Ascorbic acid; radiotherapy; intestinal mucosa; rats, Wistar

doi: 10.5336/medsci.2013-35421

Copyright © 2014 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2014;34(3):298-306

**K**anser tedavisinde kullanılan iyonizan radyasyon, etkilediği bölgelerde serbest radikal oluşumuna sebep olarak istenmeyen sistemik ve lokal hasarlara yol açmaktadır. Bu hasarlar özellikle reaktif oksijen atom ve moleküllerinin aşırı üretimine, dokuların pro-oksidan/anti-oksidan dengesinin değişmesine, protein, lipid ve DNA oksidasyonuna bağlıdır. Bu tepkimeler neticesinde hastalarda ciddi yan etkiler oluşabilmektedir. Oysa tedavideki amaç hastalığı en az yan etki ile tedavi ederek yaşam kalitesini arttırmaktır. Bu bağlamda araştırılan konulardan bir tanesi de antioksidanlardır. Antioksidanların önemli rollerinden biri radyasyonun oluşturduğu hasarlar üzerindeki koruyucu etkileridir. Bir hücrenin iyonizan radyasyona maruz kalması ile hücre içinde oluşan serbest radikaller hücrenin çeşitli bileşenlerinde hasara yol açmaktadır. Antioksidanlar hücre çekirdeğinde DNA hasarının tamirine yardımcı olarak, hücre membranında lipid peroksidasyonunu azaltarak, lipid radikallerini yok ederek, mitokondrinin antioksidan kapasitesini artırarak ve apoptozu engelleyerek hücreyi radyasyon hasarına karşı korurlar.<sup>1</sup> Kanser hastalarında antioksidan savunmanın yetersiz olduğu düşünülerek antioksidan desteğiyle gerek yan etkilerin, gerekse hastalığın geriletebileceği yönünde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında C vitamininin kanserle ilişkisi ve radyasyon hasarını önlemedeki rolü araştırılmıştır.<sup>2,3</sup>

Radyasyon hasarına en fazla hücre yenilenmesi hızlı olan dokularda rastlanır. Gastrointestinal kanal, kemik iliğinden sonra radyasyonun etkilerine karşı en duyarlı sistemdir. Özellikle pelvik bölgeye radyoterapi uygulanan hastaların yaklaşık 1/4'ünde ortaya çıkan kısa dönem yan etkilerin en ciddilerinden birinin radyasyon enteriti olduğu bilinmektedir. İyonizan radyasyonun intestinal mukozadaki akut etkisi kriptlerdeki epitelyal mitozun inhibisyonuna bağlıdır.<sup>4</sup> Mitotik aktivitesi yüksek olan Lieberkühn bezi hücreleri ölür, villus duvarında düzleşme ve ülserasyonun yanı sıra septik infiltrasyon gelişir. Epitel hasarının sonucunda elektrolit, su ve protein kaybı ortaya çıkar. Yapısı bozulan epitelin geçirgenliği de değiştiğinden bağırsak içindeki bakteri ve antijenler artarak muko-

zal inflamasyona, hatta bakteriyemiye yol açarlar. Ortaya çıkan hasarların büyük oranda serbest radikal kaynaklı olduğu ve antioksidan maddeler kullanılarak olumsuz etkilerin kısmen önlenebileceği ortaya konmuştur.

Bütün bu veriler eşliğinde güçlü bir antioksidan olduğu kanıtlanmış olan C vitamininin radyoterapi sürecinde serbest radikallerin oluşturacağı normal doku hasarına karşı etkili olabileceği düşünülmüş, bu bağlamda bir hayvan deneyi modeli oluşturularak radyoterapinin oksidatif hasarına karşı C vitamininin koruyucu etkisinin özellikle radyoterapiye erken yanıt veren intestinal mukozada morfolojik incelemelerle ortaya konması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınarak "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (www.Nap.edu/catalog/5140html) prensipleri doğrultusunda Ağustos-Kasım 2009 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, genç erişkin, ortalama 4 aylık, ağırlıkları 180-220 g arasında değişen 32 adet Wistar albino erkek (n=16) ve dişi (n=16) sıçan çalışmaya dahil edilmiştir.

Sıçanlar her grupta 4 adet erkek, 4 adet dişi denek olacak şekilde kontrol grubu, C vitamini grubu, yalnız radyoterapi grubu ve radyoterapi + C vitamini gruplarına randomize edilmişlerdir.

## DENEKLERİN HAZIRLANMASI

Deney süresince tüm denekler, optimum laboratuvar koşulları altında (22±1°C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, havalandırılmalı, nem ve ışık kontrollü), günlük içme suyu ad libitum ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslenmiştir. Uygulamaya başlamadan önce ve deney boyunca her gün tartılarak, ağırlıkları kaydedilmiştir. Radyasyona maruziyet öncesi hem de maruziyet sırasında askorbik asidin doku konsantrasyonunun yüksek olması için, C vitamini ve Radyoterapi + C vitamini gruplarının içme suyuna 10 gün boyunca 250 mg/kg dozunda C vitamini (Redoxon-Roche) eklenmiştir. Kobayın kilosuna göre gerekli doz,

günlük içmesi gerekli olan sıvı miktarını tamamlayacak şekilde eklenmiştir. İçme suyunun tamamının tüketildiği ayrıca kontrol edilmiştir. Radyoterapi uygulanacak gruplara ait denekler 11. gün intraperitoneal yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer İstanbul/Türkiye) uygulanarak uyutulmuş, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında simüle edilerek batin bölgeleri işaretlenmiş, toraks ve ekstremiteleri korunarak batin bölgesine Co<sup>60</sup> teleterapi cihazı (Theratron 780 C) tek fraksiyonda 8 Gy radyoterapi uygulanmış, radyoterapiden 72 saat sonra tüm denekler anestezi altında sakrifiye edilmiştir. Median insizyonla özofagus distal uçtan anüse kadar tüm gastrointestinal traktus "en-bloc" çıkarılmış, çalışma alanı olarak ileo-çekal valvin 5 cm proksimali ile umdan ve 5 cm distali kolon segmentinden 1 cm'lik segment seçilmiştir. Seçilen segmentin her iki ucundan lümeneye dik kesilerle iki dilim çıkarılmış, kalan segment ucu topuzlu pediatrik bağırsak makasıyla antimezenterik hat boyunca açılarak lümeneye paralel, barsak pililerine dik olacak şekilde iki kesit daha alınmıştır. Luminal içerik serum fizyolojik içerisinde, abraze etmeden yıkanmıştır.

### HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Alınan örnekler zaman geçirilmeden %10'luk fosfat tamponlu nötral formalin içerisinde tespit edilmiş, doku takibi sonrası 3-4 µm kalınlığında seri kesitler alınarak Hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanmıştır. İnceleme, uzman bir patolog tarafından standart ışık mikroskopunda (Olympus BX50; x4 büyütme: 4,32 mm çap, x40 büyütme: 0,54 mm çap, Oküler: x10 büyütme), deneklerin ait olduğu grup bilinmeksizin yapılarak, fotoğrafları (Olympus C-

5060) çekilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede bir santimetrelik alandaki kript sayısı, anormal epitel hücresi varlığı, mukozal konjesyon, ödem, kriptik doku değişiklikleri, villus boyu (bağırsak mukozasına yapılan longitudinal kesitte kript tabanından villus ucuna kadar olan mesafe ölçülmüştür, 15-20 ölçüm yapılarak ortalama değer alınmıştır), villus yapı değişiklikleri (küntleşme, kısalma), villus birleşmesi, villus parçalanması, subepitelyal ayrılma, lümeneye epitel hücre varlığı, bazal tabakada (Lieberkühn bezlerinde) mitotik figür sayısı (bir büyük büyütmede sayılan kript sayısına göre), bazal tabakada (Lieberkühn bezlerinde) apoptotik figür sayısı (bir büyük büyütmede sayılan kript sayısına göre) dikkate alınmıştır. Ayrıca tüm deneklerden elde edilen preparatlar Chiu ve ark. tarafından yapılan sınıflamaya uygun şekilde ışık mikroskopunda tekrar incelenerek mukozal skorlama yapılmıştır (Tablo 1).<sup>3,5</sup>

### İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

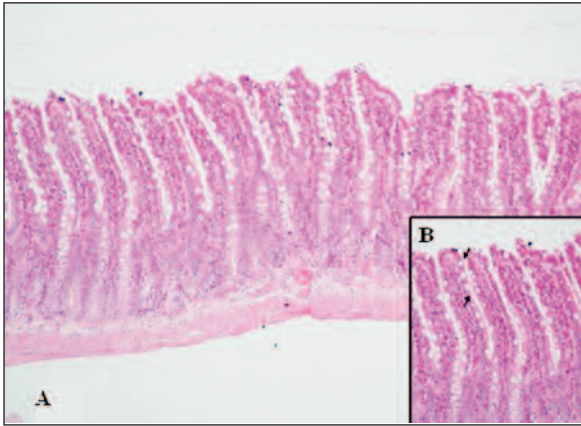
İstatistiksel değerlendirmede SPSS 13.0 paket programı (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, ABD) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiş, ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Mann-Whitney U testi sonuçları Bonferroni düzeltmesi uygulanarak tüm etkiler için anlamlılık düzeyi 0,016 olarak kabul edilmiştir.

### BULGULAR

Kontrol grubuna ait ince bağırsak segmentinden alınan kesitlerin histolojik olarak normal yapı özellikleri sergilediği görülmüştür (Resim 1). Villus intestinalisler düzenli ve birbirinden ayrı durmakta,

**TABLO 1:** Histopatolojik değerlendirme.

Evre	Bulgular
Evre 0	Normal villus
Evre 1	Subepitelyal alanın gelişmesi ve villusların tepesinde kapiller konjesyon
Evre 2	Subepitelyal alanın genişlemesi ve epitelial tabakanın lamina propriadan orta derecede ayrılması
Evre 3	Villus tabanının lamina propriadan ileri derecede ayrılması
Evre 4	Villusların soyulması, kapiler dilatasyon, lamina proprianın geçirgenliğinde artma
Evre 5	Lamina propriada parçalanma, hemoraji ve ülserasyon



**RESİM 1:** Kontrol grubuna ait normal morfolojiye sahip villus intestinalisler. **A)** Normal mukoza, villöz yapı ve kriptik tabaka korunmuş (HE, x10). **B)** Goblet hücreleri (okla işaretli) (HE, x20).

(Renkli hali için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tip-bilimleri-dergisi/1300-0292/>)

mukozal kayıp bulunmamakta, lamina propria apopitotik hücre izlenmemekte ve Lieberkühn bezlerinde az sayıda mitotik figür izlenmektedir. Konjesyon ve subepitelyal ayrılma tespit edilmiştir. Lümeninde hücrel infiltrasyon görülmemiş ve kriptik tabaka korunmuştur.

Yalnız C vitamini uygulanan grupta morfolojik değişiklikler göstermeyen villus intestinalisler izlenmiştir. Normal mukoza, villöz yapı ve kriptik tabakanın korunmuş olması nedeniyle morfolojik bulgular kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir (Resim 2).

Yalnız radyoterapi uygulanan grupta ileri düzeyde dejenere villuslar, villuslarda birleşme, villus boylarında kısalma, villuslarda şekil bozuklukları (çatallanma, dallanma), kriptik tabaka sayısında azalma, mukozal düzensizlikler ve apopitoz gözlenmiş (Resim 3), ayrıca bazı kesitlerde lümeninde epitel hücresi, lenfosit infiltrasyonuna da rastlanmıştır.

Radyoterapi + C vitamini grubundan bir denek kaybedildi. Bu grupta ince bağırsak mukozasının kontrol grubuna göre daha düzensiz olduğu, ancak sadece radyoterapi alan gruba göre villus yapılarının, kriptik tabakanın, mukozal yapının kısmen korunduğu görülmüş ve çok az apopitotik figüre rastlanmıştır (Resim 4).

Tüm bulgular eşliğinde yapılan istatistiksel değerlendirmede apopitotik hücre sayısında yalnız

radyoterapi uygulanan grupta, C vitamini grubu ( $p=0,004$ ) ve kontrol grubuna ( $p=0,004$ ) göre istatistiksel anlamlı artış tespit edilmiştir (Tablo 2).

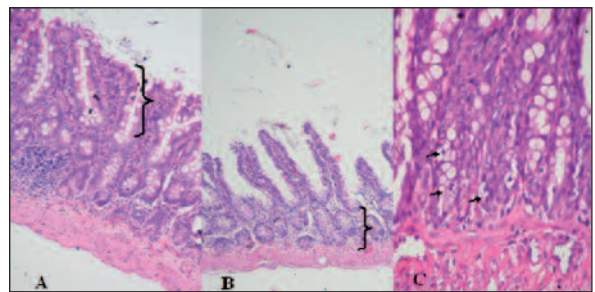
Villus boyutunun karşılaştırılmasında yalnız radyoterapi uygulanan gruptaki villus boylarında, radyoterapi + C vitamini ( $p=0,001$ ), yalnız C vitamini alan ( $p=0,001$ ) ve kontrol gruba göre ( $p=0,015$ ) istatistiksel anlamlı kısalma olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Tüm gruplar arasında radyoterapi uygulananlarda genel olarak mitoz sayısı daha yüksek bulunmasına rağmen, istatistiksel anlamlı farklılık yalnız radyoterapi grubu ile yalnız C vitamini alan grup arasında tespit edilmiştir ( $p=0,003$ ) (Tablo 2).



**RESİM 2:** Yalnız C vitamini uygulanan grupta morfolojik değişiklikler göstermeyen villus intestinalisler. Normal mukoza, villöz yapı ve kriptik tabaka korunmuş (HE, x10).

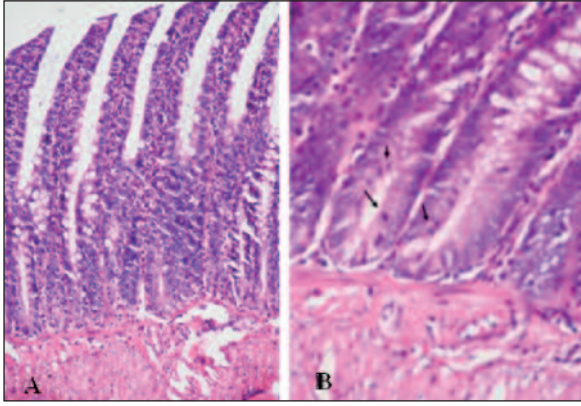
(Renkli hali için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tip-bilimleri-dergisi/1300-0292/>)



**RESİM 3:** Radyoterapi (8 Gy) uygulanan ve morfolojik değişiklikler gösteren villus intestinalisler. **A)** Villus boylarında kısalma (villöz atrofi) (HE, x10); **B)** Kriptik tabaka kalınlığında azalma (mukozal atrofi) (HE, x10); **C)** Apopitoz (HE, x40).

(Renkli hali için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tip-bilimleri-dergisi/1300-0292/>)





**RESİM 4:** Radyoterapi + C vitamini uygulanan grup. **A)** Villus yapıları korunmuş, kısmen mukoza kaybı mevcut, goblet hücre sayısında azalma ve nükleer kalabalıklaşma (HE, x10); **B)** Mitotik figürler (okla işaretli) (HE, x40) (Renkli hali için Bkz. <http://www.turkiyeklinikleri.com/journal/tip-bilimleri-dergisi/1300-0292/>)

Kript sayısında ise yalnız radyoterapi ile yalnız C vitamini uygulanan gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ( $p=0,002$ ) (Tablo 2). C vitamini uygulanan grupta kript sayısı lehine artış mevcuttur (Tablo 2). Radyoterapi + C vitamini grubunda kript sayısında artış olmasına rağmen, yalnız radyoterapi uygulanan grupla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır ( $p=0,772$ ) (Tablo 2). Çalışma gruplarının apoptoz, mitoz, kript sayısı ve villus boyunun karşılaştırılmasına ait

istatistiksel değerlendirme sonuçları ve yalnız radyoterapi grubuyla diğer grupların karşılaştırılması sırasıyla Tablo 2’de gösterilmiştir.

Ayrıca ince bağırsak mukozasının histopatolojik skorlama değerlendirmesi sonucunda, radyasyon grubunda diğer gruplara kıyasla histopatolojik skor anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo 3). İkili karşılaştırmalarda kontrol grubunda radyoterapi grubuna göre düşük histopatolojik skor, radyoterapi grubunda ise C vitamini grubu ve radyoterapi + C vitamini grubuna göre yüksek histopatolojik skor tespit edilmiştir (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Radyoterapinin neden olduğu akut yan etkiler özellikle hızlı bölünen ve çoğalan hücrelerin bulunduğu doku ve organlarda daha sık ve şiddetli olarak görülmektedir. Gastrointestinal kanal, kemik iliğinden sonra radyasyonun etkilerine karşı en duyarlı sistemdir. Karın ve pelvis bölgesine uygulanan radyoterapinin özellikle ince barsaklara zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Konvansiyonel dozların (1.8-2 Gy/fraksiyon) üzerinde uygulanan geniş alan radyoterapide; ince barsak delinmesi, akut batın ve sepsis gelişebileceği bildirilmiştir.<sup>6</sup> Yapılan çalışmalarda radyoterapi sonrası bağırsak mukozasında olu-

**TABLO 2:** Çalışma gruplarına ait değerlendirme sonuçları (Kruskal Wallis testi).

	Radyoterapi grubu	C vitamini grubu	Radyoterapi + C vitamini grubu	Kontrol grubu	p değeri	İkili Karşılaştırmalar
Ortalama apoptoz*	Medyan: 51 (0-150)	Medyan: 0 (0)	Medyan: 0 (0-14)	Medyan: 0 (0)	$p=0,001$	Radyoterapi-Kontrol grubu $p=0,004$ Radyoterapi-C vitamini grubu $p=0,004$ Radyoterapi- Radyoterapi+C vitamini grubu $p=0,031$
Ortalama mitoz*	Medyan: 82 (53-137)	Medyan: 35 (22-62)	Medyan: 72,7 (29-150)	Medyan:75 (36-125)	$p=0,010$	Radyoterapi-Kontrol grubu $p=0,598$ Radyoterapi- C vitamini grubu $p=0,003$ Radyoterapi- Radyoterapi+C vitamini grubu $p=0,524$
Ortalama kript sayısı	Medyan:64,5 (47-81)	Medyan: 84 (78-94)	Medyan: 62 (55-72)	Medyan:55 (46-71)	$p<0,001$	Radyoterapi-Kontrol grubu $p=0,189$ Radyoterapi- C vitamini grubu $p=0,002$ Radyoterapi- Radyoterapi+C vitamini grubu $p= 0,772$
Ortalama villus boyu	Medyan: 3 (1,75-3,25)	Medyan: 4,25 (4,75-3,75)	Medyan: 4 (3,75-4,25)	Medyan:3,6 (3-4,25)	$p<0,001$	Radyoterapi-Kontrol grubu $p= 0,015$ Radyoterapi- C vitamini grubu $p=0,001$ Radyoterapi- Radyoterapi+C vitamini grubu $p=0,001$

\*Apoptoz ve mitoz sayısı 100 kript sayılarak değerlendirilmiştir.

**TABLO 3:** Çalışma gruplarına ait histopatolojik skorlama (Kruskal Wallis testi).

Kontrol grubu	Radyoterapi grubu	C-vitamini grubu	Radyoterapi+C vitamini	p değeri	İkili karşılaştırmalar	P değeri
Evre 0 (0-1)	4 (3-5)	0 (0-1)	1 (1-2)	p=0,001	Radyoterapi-Kontrol grubu	p=0,007
					Radyoterapi-C vitamini grubu	p=0,008
					Radyoterapi-Radyoterapi+C vitamini grubu	p=0,008

şan biyokimyasal değişikliklere ek olarak fonksiyonu akut olarak etkileyen morfolojik değişiklikler de gözlenmiş olup, bu değişiklikler villus-kript yapısındaki değişiklikler ve radyasyonun indüklediği apoptozla ilişkili epiteliyal değişiklikler olarak iki grupta toplanabilir.<sup>2,7-10</sup>

Radyoterapinin epitel hücresinde oluşturduğu hasarın büyük kısmı serbest radikaller ve metabolitleri üzerinden gerçekleşmektedir. Oluşan serbest radikallerin ya vücudun lokal, bölgesel savunma mekanizmaları tarafından, ya da dışarıdan müdahale ile etkisizleştirilmesi söz konusu olursa, radyoterapiye bağlı yan etkilerin de azaltılması mümkün olabilir. Antioksidanlar hücre çekirdeğinde DNA hasarının tamerine yardımcı olarak, hücre membranında lipid peroksidasyonunu azaltarak, lipid radikallerini yok ederek, antioksidan kapasitesi olan mitokondrinin bu kapasitesini artırarak ve apoptozu engelleyerek hücreyi radyasyon hasarına karşı korurlar.<sup>1,11</sup> Antioksidanlar içinde en çok araştırılanlardan biri de C vitamini-dir.

Yamamoto ve ark. farelerde C vitamininin radyasyonun indüklediği gastrointestinal sendrom üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, farelere radyoterapiden önce veya sonra üç gün süreyle peroral askorbik asit (150 mg/kg) vermişler ve 6-14 Gy tüm vücut radyoterapisi (TVRT) uygulamışlardır.<sup>2</sup> Sağ kalan farelere radyoterapiden 24 saat sonra kemik iliği transplantasyonu yapılmıştır. Farelerin plazma ve ince barsak dokusunda askorbik asit düzeyleri, plazmadaki serbest radikal metabolitleri ölçülmüş ve DNA "microarray"le gen ekspresyon analizi yapılmıştır. On dört Gy TVRT öncesi askorbik asit verilen farelerde sağkalımın daha iyi olduğu, ancak radyoterapiden sonra askorbik asit uygulananların hiçbirinin kemik iliği transplantasyonuna rağmen yaşamadığı görülmüştür. Farelerin intestinal mukozasında yapılan in-

celemede, TVRT öncesi askorbik asit verilenlerde dejeneratif değişikliklerin daha az olduğu, askorbik asidin villus boylarında kısalmayı ve kript sayısında azalmayı önlediği belirlenmiştir. TVRT öncesi askorbik asit verilen farelerin ince bağırsaklarındaki askorbik asit seviyesinin daha yüksek olduğu, ilginç olarak da hem askorbik asit verilen hem de verilmeyenlerde radyoterapi uygulamasından bir saat sonra ince bağırsak dokusunda askorbik asit seviyesinin anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir. Bu bulgu, radyasyonun dokuda askorbik asit tüketimini arttırdığını göstermektedir. TVRT öncesi askorbik asit uygulaması plazmada serbest radikal metabolitlerini azaltmış, kript epitel hücrelerinde radyasyonun indüklediği DNA hasarını önlemiştir. Bu çalışmaya göre radyoterapi sonrası oluşan serbest radikallerin askorbik asit tarafından etkisizleştirilmiş olması gerekir. Aynı çalışmada bu sorunun cevabına yönelik yapılan araştırmada, askorbik asidin okside formu olan dehidroasetik asit düzeyinde de artış saptanmıştır ki, bu da C vitamininin radikal oluştuktan sonra radikal etkisizleştirmek için hidrojen donörü olarak reaksiyona girdiğini göstermektedir.<sup>2</sup> Tüm bu etkilerin radyoterapi öncesi askorbik asit verilen farelerde görülmesi, hem radyasyona maruziyet öncesi hem de maruziyet sırasında askorbik asidin doku konsantrasyonunun yüksek olmasının önemi vurgulamaktadır.

Yasutoshi ve ark.nın C vitamininin radyasyonun indüklediği letal bağırsak hasarına karşı etkisini araştırdıkları çalışmada, letal doz abdominal ışınlama öncesi ve sonrası uygulanan C vitamini, sıçanlarda sağkalımda artışa, bağırsakta serbest radikal metabolitleri ve sitokin seviyelerinde (TNF, IL1β ve IL-6) ise azalmaya yol açmıştır.<sup>11</sup> Ölçülen plazma serbest radikal metabolitleri ve sitokin değerlerinde istatistiksel anlamlı değişiklik saptanmıştır.<sup>11</sup> Ancak sadece radyoterapi öncesi veya

sonrası C vitamini uygulaması sıçanlarda en fazla %20 sağkalım sağlarken, hem radyoterapi öncesi (abdominal radyoterapi öncesi 3 gün, radyoterapi-den 8 saat önce ve radyoterapi sonrası 7 gün süreyle) hem radyoterapi sonrası C vitamini uygulaması sıçanlarda %100 sağkalım sağlamıştır. Bu çalışma göstermiştir ki, abdominal radyoterapi öncesi ve sonrası uygulanan C vitamini kan serbest radikal ve sitokin seviyelerinde değişiklik yapmadan, radyoterapinin bağırsaklar üzerine letal etkisini önlemiştir.

C vitamininin apopitoza yol açan kaspaz 3 ve kaspaz 9 yolaklarını aktive eden genlerin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu, ve bu yolakların aktive olamamasından dolayı apopitozu engellediği öne sürülmektedir.<sup>2</sup> Paris ve ark. gastrointestinal sendromun radyasyonun mikrovasküler endotelial hücrelerin apopitozunu indüklemesi nedeniyle ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir.<sup>12</sup> Ancak başka çalışmalarda apopitoza kript epiteli hücrelerinde rastlanıldığı, vasküler endotelial hücrelerde rastlanılmadığı belirtilmektedir.<sup>2,13,14</sup> Bu durumda radyoterapi öncesi verilen C vitamini doğrudan kript hücrelerindeki hasarı önleyerek veya vasküler endotelial hasara karşı koruyucu etkiyle dolaylı yoldan etki göstermektedir. Bizim çalışmamızda da ışınlanan deneklerde apopitotik hücrelerin yoğun bir şekilde görülmesi, buna karşın radyoterapi + C vitamini alan grupta apopitotik hücre sayısının düşük bulunması ve radyoterapi almayan grupta hemen hiç apopitotik hücreye rastlanılmamış olması, C vitaminin hücreleri radyoterapiye bağlı apopitoza karşı koruduğunu desteklemektedir (Tablo 2).

Akpolat ve ark.nın iyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin (Çin ve Hindistan'da yetiştirilen bir tür bitkisel antioksidan) ve C vitamininin koruyucu etkisini inceledikleri çalışmalarında, yalnız radyasyon uygulanan sıçanlarda hücre kaybına bağlı olarak villus boylarında kısalma ile birlikte şekil bozuklukları, ileri seviyede subepitelyal boşluk, lamina propriada kapiller konjesyon ve dilatasyon, Lieberkühn bezlerinde çok sayıda mitotik figür, dejenerasyona uğrayan villuslarda goblet hücre hakimiyeti görülmüş, buna karşın C vitamini verilen

sıçanlarda yer yer korunmuş olan villus intestinalislerin yanı sıra şekilleri bozulmuş villus yapıları, çok hafif subepitelyal ayrılma ve Lieberkühn bezlerinde az sayıda mitotik figürlere rastlanmıştır.<sup>3</sup> Histopatolojik değerlendirmede mukozal hasar şiddetini yansıtan histopatolojik skorun radyasyon grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunduğu ( $p<0,001$ ), buna karşın C vitamini alan grupta anlamlı düzeyde düşük olduğu ( $p<0,001$ ) tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da histopatolojik skor C vitamini uygulanan gruplarda sadece radyoterapi grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 3).

Carr ve ark. ışınlamadan birkaç saat sonra Lieberkühn bezlerinin boyun bölgesinde epitelin düzensizleştiğini, villus yüzeyinde bakterilerin sayısında ve mukus üretiminde artma meydana geldiğini, gözlenen morfolojik değişikliklerin ışınlanmanın dozuna ve özelliklerine bağlı olduğunu, hasarların çoğunun ışınlamadan sonraki 3-7 gün içinde görüldüğünü bildirmişlerdir.<sup>9</sup> Çalışmamızda da radyasyonun ince bağırsak epitelinde değişikliklere yol açtığını gösteren diğer çalışmalarla benzer şekilde radyoterapi uygulanan grupta 72 saat sonra yapılan değerlendirmede, mukozal epitel yapısında morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir.<sup>2,7,9,10,15</sup> Radyoterapi grubu ile radyoterapi + C vitamini alan grup arasında villus boyları açısından anlamlı düzeyde fark bulunmuştur ( $p=0,001$ ) (Tablo 2). Lieberkühn bezlerinin çevresinde hücre kaybına bağlı villus boyları kısalmış, yalnız radyoterapi uygulanan grupta lamina epitelialisteki bozulma nedeniyle lümen epitel hücreleri tespit edilmiş, yer yer anormal epitel hücrelerine de rastlanmıştır. Radyoterapi + C vitamini uygulanan grupta morfolojik değişikliklerin daha az gözlenmesi, C vitaminin oksidatif hasara karşı mukozal yapıyı kısmen koruduğunun bir göstergesi olabilir (Tablo 2). Radyasyon uygulanan grupta 72 saat sonra mitoz görülmesi ve radyoterapi grubu ile C vitamini alan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmesi ( $p=0,003$ ) (Tablo 2), ancak diğer gruplarla istatistiksel olarak fark bulunmaması, bu süre içinde mitotik inhibisyonunun ortadan kalktığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Radyoterapinin mast hücresi degranülasyonu ve histamin salınımına neden olduğu bilinmektedir.<sup>3,15-17</sup> Abdominal radyoterapi sonrası meydana gelebilecek inflamasyon ve medyatör salınımı, bağırsakta yan etkilerin gelişmesine katkıda bulunur. C vitamininin mast hücresi stabilatörü olarak etki edebileceği ve degranülasyona engel olarak medyatörlerin salınımını engellediği, astım hastalığı gibi alerjik hastalarda semptomlarda düzelmeye sağladığı birçok çalışmada gösterilmiştir.<sup>16-20</sup> Radyoterapi ile birlikte C vitamini uygulaması bağırsaktaki mast hücre degranülasyonunu, ve buna bağlı inflamasyonu önleyebileceğinden, radyoterapiye bağlı yan etkilerin gelişmesine engel olabilir.

Bazı çalışmalarda C vitamininin anti-kanser etki gösterebileceği söylenmiştir, ancak Majo kliniği tarafından yapılan çalışmada yüksek doz C vitamininin anti-kanser etkinliği ispatlanamamıştır.<sup>21,22</sup>

Bizim çalışmamız tümörü olmayan sıçanlar üzerinde yapılmıştır ve C vitamininin intestinal mukoza üzerine etkileri değerlendirilmiştir; ancak C vitamininin radyoterapinin antitümör sitotoksi-

sitesini azaltabileceği yönünde görüş ile ilgili Shinozaki ve ark.nın tümürlü dokuda yaptıkları çalışmada, askorbik asidin caspase-3, 8 ve 9 aktivasyonu ile tümör hücrelerinde radyoterapi sonrası apoptozu arttırdığı, ve C vitamininin radyoterapinin anti-tümör sitotoksitesine üzerine olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir.<sup>23</sup> Ancak C vitamini yüksek dozlarda pro-oksidan olabileceğinden, doz kontrollü ve tümürlü dokularda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇ

C vitamininin antioksidan özelliği nedeniyle radyasyonun oluşturduğu oksidatif hasarı engellediği birçok çalışmada tespit edilmesine rağmen, klinik kullanıma henüz girmemiştir. Çalışmamızda da sıçanlara 250 mg/kg dozunda uygulanan C vitamininin intestinal mukozayı radyasyon hasarından koruduğu gösterilmiştir. C vitamininin pelvik ışınlamalarda profilaktik kullanımı, sıklıkla karşılaşılan intestinal yan etkilerin gelişimini önleyebilir. C vitamini gerek uygulama kolaylığı gerekse maliyet açısından uygun bir radyoprotektif ajan olarak düşünülebilir.

## KAYNAKLAR

- Okunieff P, Swarts S, Keng P, Sun W, Wang W, Kim J, et al. Antioxidants reduce consequences of radiation exposure. *Adv Exp Med Biol* 2008;614:165-78.
- Yamamoto T, Kinoshita M, Shinomiya N, Hiroi S, Sugawara H, Matsushita Y, et al. Pretreatment with ascorbic acid prevents lethal gastrointestinal syndrome in mice receiving a massive amount of radiation. *J Radiat Res* 2010;51(2):145-56.
- Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Kanter M. [Protective effects of curcumin and vitamin C on ionizing radiation-induced morphological destruction of intestinal mucosa in rats]. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2008;6(2):77-85.
- Horwhat JD, Dubois A. Radiation enteritis. *Curr Treat Options Gastroenterol* 1999;2(5):371-81.
- Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970;101(4):478-83.
- Andreyev J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005;54(8):1051-4.
- González MJ, Miranda-Massari JR, Mora EM, Guzmán A, Riordan NH, Riordan HD, et al. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integr Cancer Ther* 2005;4(1):32-44.
- Rubio CA, Jalnas M. Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig Dis Sci* 1996;41(2):392-401.
- Carr KE, Hamlet R, Nias AH, Watt C. Multinucleate giant enterocytes in small intestinal villi after irradiation. *J Microsc* 1981;123(Pt 2):169-76.
- Okunieff P. Interactions between ascorbic acid and the radiation of bone marrow, skin, and tumor. *Am J Clin Nutr* 1991;54(6 Suppl):1281S-1283S.
- Ito Y, Kinoshita M, Yamamoto T, Sato T, Obara T, Saitoh D, et al. A combination of pre- and post-exposure ascorbic acid rescues mice from radiation-induced lethal gastrointestinal damage. *Int J Mol Sci* 2013;14(10):19618-35.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293(5528):293-7.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107(4):526-45.
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108(8):652-9.



15. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003;4(9):529-36.
16. Johnston CS, Martin LJ, Cai X. Antihistamine effect of supplemental ascorbic acid and neutrophil chemotaxis. *J Am Coll Nutr* 1992;11(2): 172-6.
17. Doyle TF, Strike TA. Radiation-released histamine in the rhesus monkey as modified by mast-cell depletion and antihistamine. *Experientia* 1977;33(8):1047-9.
18. Harik-Khan RI, Muller DC, Wise RA. Serum vitamin levels and the risk of asthma in children. *Am J Epidemiol* 2004;159(4):351-7.
19. Chang HH, Chen CS, Lin JY. High dose vitamin C supplementation increases the Th1/Th2 cytokine secretion ratio, but decreases eosinophilic infiltration in bronchoalveolar lavage fluid of ovalbumin-sensitized and challenged mice. *J Agric Food Chem* 2009;57(21): 10471-6.
20. Allen S, Britton JR, Leonardi-Bee JA. Association between antioxidant vitamins and asthma outcome measures: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2009;64(7):610-9.
21. Lu SH, Ohshima H, Fu HM, Tian Y, Li FM, Blettner M, et al. Urinary excretion of N-nitrosamino acids and nitrate by inhabitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in Northern China: endogenous formation of nitrosoproline and its inhibition by vitamin C. *Cancer Res* 1986;46(3):1485-91.
22. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(2):443-57.
23. Shinozaki K, Hosokawa Y, Hazawa M, Kashiwakura I, Okumura K, Kaku T, et al. Ascorbic acid enhances radiation-induced apoptosis in an HL60 human leukemia cell line. *J Radiat Res* 2011;52(2):229-37.