

## RADYOTERAPİ UYGULANAN RATLARDA MELATONİNİN KARSİNO-EMBİRİYONİK ANTİJEN VE KARBONHİDRAT ANTİJENLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Recep ÖZMERDİVENLİ<sup>1</sup>, Serpil BULUT<sup>2</sup>, Nevin İLHAN<sup>3</sup>, Kürşat KARACABEY<sup>1</sup>

### EFFECT OF MELATONIN ON CARCINO-EMBRYONIC AND CARBOHYDRATE ANTIGENS IN THE RADIOTHERAPHY-EXPOSED RATS

**Summary:** Melatonin, which is released from the pineal gland is a potent endogenous free radical scavenger. It is known that evaluation of effects of radiotherapy at different doses in various tissues is impossible. Therefore, examination of effects of melatonin on tumour markers in radiotherapy-treated rats is of importance. In the present study, 100 Wistar albino female rats weighing 200-250 gr were used. Eighty rats were divided into four groups (each containing 20) and exposed to gamma light (radiotherapy) at 60, 90, 120 and 160 cGy/min, respectively, by using a Teratronief 760 cobalt 60 apparatus. Each group was further separated into two subgroups (n=10). The animals were subcutaneously injected with melatonin (4mg/kg) for 10 days commencing on the day of radiotherapy exposure. Twenty animals served as controls receiving physiological saline alone. Serum samples obtained were examined for CA 19.9, CA125, CA 15..3 and CEA values. Serum levels of these markers were determined by chemiluminescent method (ACS. 180 hormone analyser). The results were statistically evaluated by using Man-Whitney U test. An except for the rats receiving 60 cGy/min radiation+melatonin (group 1), CA 125 and in the group 4 (160 cGy/min) CA19-9 levels were found to be lower than the animals exposed to radiation alone (p<005). In conclusion, tumour markers may be an important criteria with the other supportive findings in the cancer diagnosis, although they are not the determinant factors on their own. Our results suggest that melatonin may be useful to prevent side effects of radiotherapy in humans.

**Key Words:** Melatonin, Carcino-embryonic antigens, tumour markers

**Özet:** Pineal bezden salgılanan melatonin potent ve etkili bir endojen serbest radikal gidericidir. Radyoterapinin değişik dokulardaki farklı dozlardaki etkisinin tam olarak değerlendirilmesinin mümkün olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle melatoninin, farklı dozlarda radyoterapi uygulanan sıçanlarda tümör markırları üzerine etkisinin araştırılması önemli görülmektedir. Çalışmada, 200–250 gr. ağırlığında 100 adet Wistor albino cinsi dişi rat kullanıldı. 20 adet rat, kontrol grubu olarak, 80 adet rat 20' şerli gruba ayrılarak 60, 90, 120 ve 160 c Gy/dk. 'lık doz Teratronief 760 cobalt 60 cihazı ile gama ışını verilerek radyoterapi uygulandı. Daha sonra her grup ikiye ayrıldı ve ayrılan 10'ar adetlik rat gruplarından her birine radyasyon verildiği günden başlamak üzere 4 mg/kg olmak üzere deri altı yolla 10 gün boyunca melatonin enjekte edildi. Kontrol grubuna ise serum fizyolojik uygulandı. Elde edilen serumlarda plazma CEA ile CA 19.9, CA125, CA 15..3 düzeyine bakıldı. Belirtilen markırların düzeyi kemiluminesans yöntemi ile çalışan ACS. 180 marka hormon analizörü kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar Man-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. 60 cGy/dk radyasyon+ melatonin uygulanan ratlardaki(1.Grup) CA 125 ve 160 cGy/dk uygulanan gruptaki CA19-9 değerleri hariç sadece radyasyon uygulanan gruplara göre anlamlı azalmış olduğu gözlemlendi (p<005). Sonuç olarak; tümör markırları kanser teşhisinde tek başına belirleyici olmamasına rağmen diğer destekleyici bilgilerle önemli bir kriter olarak değer kazanmaktadır. Yaptığımız çalışmada melatonin verilen sıçanlarda bazı markır değerlerinin düşük çıkması, insanlarda radyoterapinin yan etkilerine karşı melatonin kullanımının faydalı olacağı görüşünü desteklemektedir.

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksek Okulu

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı

<sup>3</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı



**Anahtar Kelimeler:** Melatonin, karsinoembriyjenik antijen, tümör markurları

## GİRİŞ

Radyasyonun en önemli somatik etkisi karsinogenezdir. Gerçek risk tam olarak bilinmemekle birlikte, radyasyon ile karşılaşmış olan kişilerde ışınlamaya bağlı neoplazinin ortaya çıkma olasılığının normal popülasyondan daha fazla olduğu ileri sürmüştür (1).

Son yıllarda serbest radikaller ve oksidatif stresle ilgili çalışmaların yaygınlaşması, güçlü antioksidan etkisi ispatlanmış olan melatonine ilgiyi artırmıştır. Melatonin vücutta primer olarak pineal bezden salgılanan, salgılanmasında gece artış gündüz azalma şeklinde sirkadyen ritim gösteren bir hormondur (2,3). Melatonin oksidatif stresle bağlantılı olarak hem direk radikallerin etkisinden koruyucu hem de indirekt olarak antioksidan etki göstererek DNA'nın oksidatif zararlar görmesine engel olur (4,5).

Radyoterapinin değişik dokularda farklı dozlardaki etkisinin tam olarak değerlendirilmesinin mümkün olmadığını bilinmektedir. Radyoterapinin oluşturduğu doku hasarı istenmeyen sonuçlar doğurmaktadır. Bu çalışmanın amacı melatoninin radyasyona bağlı gelişen doku hasarını önlemede etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, 200 – 250 gr. ağırlığında toplam 100 adet yetişkin Wistar albino cinsi dişi rat kullanıldı. 20 adet rat, kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra, 80 adet rat 20'şerli gruplara ayrılarak E. Ü. Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında radyoterapi uygulandı. Radyoterapi uygulaması 60, 90, 120 ve 160 c Gy/dk'lık doz Teratronief 760 cobalt 60 cihazı ile gama ışını verilerek gerçekleştirildi. Daha sonra her grup Radyasyonlu (R) ve Radyasyon+ Melatoninli (RM) olarak ikiye ayrıldı. Ayrılan 10'ar adetlik rat gruplarından her birine radyasyon verildiği günden başlamak üzere 4 mg/kg olmak üzere deri altı

yolla 10 gün boyunca melatonin uygulandı (RM). Kontrol grubundan 10 rat'a hiçbir şey verilmedi (K), 10 rat'a ise melatonin uygulanan rat'larla birlikte serum fizyolojik uygulandı (KSF). Deney süresi içerisinde tüm grupların aynı ortamda fakat ayrı kafeslerde kalması ve aynı şartlarda beslenmeleri sağlandı.

Serum fizyolojik uygulanan gruptan bir rat'ın diğerleri tarafından yaralanmış olması, 60 cGy/dk radyasyon uygulanan gruptan 2 ratın, 90 cGy/dk radyasyon uygulanan gruptan 1 ratın ve 160 cGy/dk radyasyon uygulanan gruptan 1 ratın deney süresini tamamlayamamaları nedeni ile denek sayıları kontrol grubunda 18, 1. grupta 16, 2. grupta 18, 3. grupta 20 ve 4. grupta 18 olarak yeniden düzenlendi.

On günlük deney süresinin tamamlanmasından 20 gün sonra tüm ratlar dekapite edilerek kanları alındı. Alınan kanlar santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serumlarda karsino embriyonik antijen (CEA: 1-6 ng/ml) ile karbonhidrat antijenler (CA<sup>125</sup>: 0-35 U/ml, CA<sup>19-9</sup>: 0-39 U/ml, CA<sup>15.3</sup>: 0-25 U/ml) düzeylerine bakıldı. Belirtilen parametrelerin düzeyleri kemiluminesans yöntemi ile çalışan ACS 180 marka hormon analizörü kullanılarak ölçüldü ve deteksiyon limitleri yukarıda gösterildiği şekildedir.

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programında yapıldı ve One Witney U testi kullanıldı. Anlamlılık katsayısı p<0.05 ve p<0.01 kabul edildi.

## BULGULAR

Kontrol ve sham grupları arasında CEA, CA<sup>19-9</sup>, CA<sup>125</sup>, CA<sup>15.3</sup> değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 1).

60 cGy/dk radyasyon uygulanarak, radyasyon verildiği günden başlamak üzere 4 mg/kg olmak üzere deri altı yolla 10 gün boyunca melatonin verilen ve verilmeyen grupların CEA, CA<sup>19-9</sup>, CA<sup>125</sup>, CA<sup>15.3</sup>

değerlerinin karşılaştırılması sonucunda CEA, CA<sup>19.9</sup> CA<sup>15.3</sup> değerleri melatonin verilen grupta anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.01) (Tablo2).

**Tablo I.** Kontrol grubun karsino-embriyonik antijen ve karbohidrat antijenlerinin karşılaştırılması

n = 18	K Grubu (n = 9)	KSF Grubu (n = 9)	P Değeri
CEA (ng/ml)	0.189 ± 01	0.233 ± 0.1	0.372
CA <sup>19.9</sup> (U/ml)	3.75 ± 1.37	3.61 ± 1.25	0.412
CA <sup>125</sup> (U/ml)	0.88 ± 0.43	1.13 ± 0.5	0.286
CA <sup>15.3</sup> (U/ml)	0.37 ± 0.22	0.56 ± 0.29	0.147

**TabloII.** 60 cGy radyasyon uygulanan ratlarda karsino-embriyonik antijen ve karbohidrat antijenlerinin karşılaştırılması

n = 16	R Grubu(n = 8)	RM Grubu (n = 8)	P Değerleri
CEA (ng/ml)	2.23 ± 0.79	0.7 ± 0.26	0.001
CA <sup>19.9</sup> (U/ml)	100.24 ± 17.25	15.51 ± 2.30	0.001
CA <sup>125</sup> (U/ml)	8.12 ± 0.93	7.33 ± 1.5	0.341
CA <sup>15.3</sup> (U/ml)	10.57 ± 0.16	2.81 ± 1.22	0.001

90 cGy radyasyon uygulanıp yarısına deri altı yolla 10 gün boyunca melatonin verilen ve verilmeyen grupların CEA, CA<sup>19.9</sup>, CA<sup>125</sup>, CA<sup>15.3</sup> değerleri karşılaştırıldığında bütün değerlerin melatonin verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunduğu görüldü (p<0.05). (Tablo3).

**TabloIII.** 90 cGy radyasyon uygulanan ratlarda karsino-embriyonik antijen ve karbohidrat antijenlerinin karşılaştırılması

n = 18	R Grubu(n = 9)	RM Grubu (n = 9)	P Değerleri
CEA (ng/ml)	2.63 ± 1.11	0.66 ± 0.37	0.001
CA <sup>19.9</sup> (U/ml)	107.35 ± 33.16	20.98 ± 17.96	0.001
CA <sup>125</sup> (U/ml)	12.44 ± 2.25	10.2 ± 2.14	0.040
CA <sup>15.3</sup> (U/ml)	13.08 ± 2.48	5.17 ± 1.29	0.001

120 cGy radyasyon uygulanan ve aynı yöntem ile 10 gün boyunca melatonin verilen ve verilmeyen grupların CEA, CA<sup>19.9</sup>, CA<sup>125</sup>, CA<sup>15.3</sup> değerleri karşılaştırıldığında tüm değerlerin melatonin verilen grupta anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi(p<0.05) (Tablo4).

Son yüksek doz olarak 160 cGy radyasyon uygulanan ve yarısına daha sonraki 10 gün boyunca melatonin verilen grupların CEA, CA<sup>19.9</sup>, CA<sup>125</sup>, CA<sup>15.3</sup> değerlerinin karşılaştırılması sonucunda CA<sup>19.9</sup> dışındaki bütün değerlerde melatonin grubunda anlamlı düşme tesbit edildi (p<0.05) (Tablo5).

## TARTIŞMA

Melatonin organizmadaki tüm organ ve hücreler için serbest radikal giderici ve oksidatif hasarı önleyici etkiye sahip bir hormondur(3.6). Melatonin bir triptofan amino asit metabolizma ürünü olup memelilerde pineal bez, retina ve gastrointestinal sistem başta olmak üzere bir çok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. Oksidatif stres giderici etkisini hem direk radikal giderici(özellikle hidroksil radikal gidericisi) olarak hem de indirek yolla sağlar(7).In vitro çalışmalarda melatoninin en etkili lipofilik antioksidan olarak bilinen Evitamininden iki kat daha etkili olduğu gösterilmiştir(8).Garcia ve arkadaşları(9) meme kanserli hastalarda yaptıkları bir çalışmada melatoninin lipid peroksidasyon oluşumunu önleyici etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Radyoterapi hücre nükleusuna direk etki ederek atomların iyonizasyonuna, indirek olarak ise su ile reaksiyona girerek serbest radikal iyonları oluşturup kromozomlarda kırılmaya ve genetik defekte sebep olur (10). Radyoterapinin organizmada oluşturduğu hasarın azaltılması veya önlenmesinde melatoninin antioksidan ve serbest radikal giderici etkilerinden yararlanmak söz konusu olabilir.

Organizmada tümör varlığını erken dönemde belirlemek amacıyla glikoprotein yapısındaki bazı antijenler kullanılmaktadır. CEA, embriyonik endodermal epitelde normal olarak bulunan ve 1960'lı yıllardan beri malign dokular tarafından üretildiği bilinen bir tümör markerıdır. Primer kolorektal kanser, gastrointestinal sistem, meme, over, prostat, karaciğer ve pankreas kanserlerinde CEA düzeyleri yükselmektedir (11,12). CA<sup>19.9</sup> kolon kanserlerinde (13) CA<sup>125</sup> over kanserlerinde (14) CA<sup>15.3</sup> ise meme kanserlerinde (15) serumda yüksek olarak tespit edilmektedir.

Çalışmamızda melatoninin radyasyon verilen gruplarda tümör belirleyici antijen düzeyleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Özellikle 120 cGY radyasyon verilen çalışma grubundaki tüm antijen değerleri



ve 60 cGy radyasyon alan ratlardaki CA <sup>125</sup> hariç diğer antijen değerleri melatonin alanlarda anlamlı derecede düşük olduğunu gördük. Diğer gruplarda da melatoninin antijen değerlerini düşürdüğü ancak gruplar arası farkın bazı markırlarda anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görüldü.

**Tablo IV.** 120cGy radyasyon uygulanan ratlarda karsino-embriyonik antijen ve karbonhidrat Antijenlerinin karşılaştırılması

n = 20	R Grubu(n=10)	RM Grubu (n =10)	P Değerleri
CEA (ng/ml)	5.72 ± 3.93	0.32 ± 0.22	0.001
CA <sup>19-9</sup> (U/ml)	15.28 ± 3.1	12.15 ± 2.04	0.018
CA <sup>125</sup> (U/ml)	14.02 ± 3.50	10.02 ± 2.51	0.01
CA <sup>15-3</sup> (U/ml)	14.42 ± 2.8	6.21 ± 1.40	0.001

**Tablo V.** 160 cGy radyasyon uygulanan ratlarda karsino-embriyonik antijen ve karbonhidrat antijenlerinin karşılaştırılması

n = 18	R Grubu (n = 9)	RM Grubu (n = 9)	P Değerleri
CEA (ng/ml)	6.1 ± 1.65	0.59 ± 0.16	0.001
CA <sup>19-9</sup> (U/ml)	15.53 ± 2.9	13.51 ± 3.08	0.174
CA <sup>125</sup> (U/ml)	16.32 ± 3.46	11.98 ± 2.43	0.008
CA <sup>15-3</sup> (U/ml)	17.52 ± 3.78	9.29 ± 4.74	0.001

Radyasyon uygulanan ratlarda deney süresince belirgin tüy dökülmesi ve bazı cilt bölgelerinde erezyon şeklinde yaralar ortaya çıktı. Ancak melatonin verilen grupta ise tüylerde dökülmenin ve cilt erozyonlarının daha az düzeyde olduğu dikkati çekti. Yine deney süresi tamamlanan ratlardan 5' inin hamile olduğu fark edildi. Bunlardan 3'ü sadece radyasyon, 2'si ise radyasyon+melatonin alan grupta idi. Bu ratlar doğum yapıncaya kadar gözlemlendi. Sadece radyasyon alan gruptaki ratlardan birisi baş ve yüz anomalisi olan canlı bir yavru rat doğurdu. Melatonin alan 2 rat ise sağlıklı yavru doğurdu. Bu veriler tamamen gözleme dayanmakta olup çalışmanın amacı dışındadır. Bu nedenle istatistiksel değerlendirme yapmak amacı ile kullanılmadı.

Literatürlerde melatoninin direk radyasyonun etkilediği dokular üzerine etkisini araştıran çalışmaya rastlanmamıştır. Kasayova ve ark. larının (16) iyon-

zan radyasyonun pineal bez ve melatonin üzerine etkisini araştırmak amacıyla yaptığı çalışmada, tüm vücudun düşük doz radyasyonun etkisinde kalmasından sonra pineal bez melatonin konsantrasyonunun değişmediğini, yüksek dozdan sonra ise zamana bağımlı değişiklik gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Radyasyondan sonraki geç dönemlerde melatonin sentezinin artmasını, melatoninin antioksidan, immün modülatör ve stress azaltıcı özelliklerine bağlı olarak organizmanın aşırı radyasyon stresine adaptasyonunun bir sonucu olarak açıklamıştır (16). Biz çalışmamızda radyasyonun akut etkilerinin söz konusu olduğu erken dönemde melatonin uygulaması yaptık ve eksojen melatoninin, radyasyonun oluşturduğu dokü hasarına bağlı ortaya çıkan artmış antijen düzeyleri üzerinde azaltıcı etkisi olduğunu gördük. Melatoninin safrole, lipopolisakkaritler, kainic asit, iyonizan radyasyon, iskemi-reperfüzyon gibi çeşitli sebeplerle ortaya çıkarak, oksidatif hasara yol açan serbest radikaller üzerine antioksidan etkisi olduğu kabul edilmektedir(2,5). Melatoninin bu etkisini hem fizyolojik hem de supra fizyolojik (farmakolojik) dozlarda gösterdiği deneysel çalışmalarla da ispatlanmıştır (5).

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen veriler radyasyonun zararlı etkisinden korunmada melatoninin etkili olabileceği düşüncesini destekler nitelikte olup, radyasyona maruz kalan insanlarda oluşan komplikasyonların önlenmesinde umut verici görülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Güleç M. (1995) Radyodiyagnostik Fiziyi. Erciyes Üniversitesi Yayınları. Yayın No: 82. ss.1-7
2. Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ. (1997) Munoz-Hoyos, A Life Sci. 60, 2255
3. Sirotkin A V, Schaeffer H J. (1997) Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. J Endocrinol, 154:1-5.
4. Janas O, O Livescu Badescu I. (1995) Melatonin involment in oxidative processes. Rom J Endocrinol, 29: 117-123.

5. Marco M, Vincenzo PP, Gilberto S And Giorgio T. (1999) Melatonin: Medicinal Chemistry Molecule, 6:501-518.
6. Reiter RJ. (1991) Pineal Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone. *news. Physiol Sci.* 6:223-227.
7. Reiter RJ. (1996) Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol.* 134: 412-420.
8. Pieri C, Marra M, Marcheselli F, Recchioni R. (1994) Melatonin: Peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 55:PI 271-276.
9. Garcia JJ, Reiter RJ, Ortiz GG, Oh CS, Tang L, Yu BP, Escames G. (1998) Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J Membr Biol.* 162; 59-65.
10. Bomford C, Kunkler I, Sherrif S. (1993) Effects of radiation on normal tissues. In: *Textbook of radiotherapy.* Churchill Livingstone, Singapore.
11. Sikorska H, Shuster J, Gold P. (1988) Clinical applications of carcinoembryonic antigen. *Cancer Detection and Prevention.* 12:321-55.
12. Statland BE, Winkel P. Neoplasia In, Kaplan LA, Pesc AJ, eds. (1989) *Clinical Chemistry; Theory, Analysis, and Correlation.* 2<sup>nd</sup> Edition, St Luis: Cv Mosby, 734-35.
13. Steinberg W. (1990) The Clinical Utility of The Ca 19-9 Tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol.* 85 : 49350-5.
14. Lavin PT, Knapp RC, Malkasian G. et al: (1987) Ca 125 for the monitoring of ovarian carcinoma during primary therapy. *Obstet Gynecol.* 69 (2): 223-7.
15. Bon GG, von Mensdorff-Pouilly S, Kenemans P, Vankamp GJ et al. (1997) Clinical and technical evaluation of Acs Br serum assay of Muc-1 Gene – derived glycoprotein in breast cancer, and comparison with Ca 15-3 assays. *Clin Chem.* 43 (4): 585-593.
16. Kassayova M, Ahlersova E, Ahlers I: (1999) Two-phase response of rat pineal melatonin to lethal whole body irradiation with gamma rays. *Physiol Res.* 48(3): 227-230.