Protektivni uticaj N-acetil-L-cisteina na efekte stimulacije metioninom u kolonu pacova

Protective impact of N-acetyl-L-cysteine on methionine stimulatory effects in rat colon

Lara Hadži Tanović¹, Dušan Todorović¹, Marija Stojanović^{1,2}, Ljiljana Šćepanović^{1,2}, Dragan Đurić^{1,2}

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

² Institut za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan"

Kontakt: laralaki95@gmail.com

Sažetak

Uvod: Metionin je sumporsta esencijalna aminokiselina koja, prema brojnim studijama, ima ulogu da smanji zapaljenje izazvano promenama u debelom crevu i inhibira važne puteve u razvoju brojnih gastrointestinalnih poremećaja. Suphronično opterećenje ovom aminokiselinom, međutim, dovodi do oksidativnog stresa koji je potencijalni uzročnik oboljenja brojnih organa, između ostalog i digestivnog trakta. N-acetil-L-cistein je prirodni antioksidans koji utiče na neke od važnih signalnih puteva, a poseduje i potencijalnu terapijsku ulogu u lečenju promena na kolonu.

Cilj: Ispitati uticaj N-acetil-L-cisteina na histološke parametre kolona pacova nakon suphroničnog opterećenja metioninom.

Materijal i metode: Eksperimenti su izvedeni na pacovima Vistar albino (*Wistar albino*) muškog pola, telesne mase 160 g i starosti 15-20 dana. U eksperimentu su korišćene 24 životinje podeljene u 3 grupe, sa po osam životinja u svakoj grupi. Prvoj, kontrolnoj grupi (K) aplikovan je *i.p.* natrijum-hlorid (NaCl), drugoj metionin (M grupa), a trećoj metionin + N-acetil-L-cistein (N grupa). Pacovi su nakon 21. dana lečenja žrtvovani i dobijeni su uzorci tkiva kolona. U sve tri navedene grupe analizirane su histološke promene u kolonu.

Rezultati: Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma ($p < 0,01$) značajnog uvećanja dubine kripti u kolonu pacova, debljine lamine muskularis mukoze, debljine tunike mukoze, kao i gustine ćelija lamine proprije tunike mukoze u poređenju sa kontrolnom grupom, dok primena N-acetil-L-cisteina pokazuje veoma ($p < 0,01$) značajno smanjenje ovih histoloških parametara u odnosu na M grupu.

Zaključak: N-acetil-L-cistein ima značajno protektivno dejstvo na promene u kolonu pacova izazvane opterećenjem metioninom.

Ključne reči: N-acetil-L-cistein, metionin, kolon, pacov

Abstract

Introduction: Methionine is an essential sulfuric amino acid, which, according to numerous studies, has a role in the reduction of inflammation, caused by changes in colon, and inhibits important pathways in the development of numerous gastrointestinal disorders. However, subchronic methionine loading leads to oxidative stress, which is a potential cause of disease of numerous organs, digestive tract being one of them. N-acetyl-L-cysteine is a natural antioxidant, which affects some of the important signaling pathways and has a potential therapeutic role in treatment of colon disorders.

Aim: To examine the influence of N-acetyl-L-cysteine on histological parameters of rat colon, after subchronic methionine load.

Material and methods: Experiments were conducted on 15-20 days old male (*Wistar albino*) rats, weighing 160 g. There were used 24 animals in the experiment, divided into 3 groups, with eight animals per group. First, control group (K), received NaCl, second group received methionine (M group), while third group received methionine + N-acetyl-L-cysteine (N group). The rats were sacrificed after 21 day and tissue samples of colon were obtained. In all of the three groups, changes of histological parameters of rat colon were analyzed.

Results: Methionine load leads to statistically significant increase ($p < 0.01$) in crypt depth of rat colon, lamina muscularis mucosae thickness, the mucosal thickness and increase in lamina propria cell density compared to control, while N-acetyl-L-cysteine application showed statistically significant decrease ($p < 0.01$) of these histological parameters compared to M group.

Conclusion: N-acetyl-L-cysteine has a significantly protective effect on methionine load induced changes in rat colon.

Key words: N-acetyl-L-cysteine, methionine, colon, rat

Uvod

Metionin je esencijalna aminokiselina koja u reakcijama transmetilacije daje homocistein (Hcy) i cistein (Cis). Potrebna količina metionina u organizmu održava se zahvaljujući remetilaciji homocisteina (1). Homocistein je semiesencijalna aminokiselina koja sadrži sumpor i ima značajnu ulogu u metabolizmu prekursora nukleinskih kiselina (2). Metionin je važan metil donor za većinu bioloških reakcija metilacije. Ova aminokiselina je takođe prekursor za sintezu cisteina, koji igra ključnu ulogu u održavanju funkcije proteina i redukciono-oksidativnog (skr. redoks) statusa ćelije. Metionin služi i kao indirektni prekursor glutationa (GSH), taurina i neorganskog sumpora, koji su važni celularni antioksidansi (3).

Promene u metabolizmu metionina mogu da dovedu do povećanja koncentracije homocisteina (hiperhomocisteinemija), koja proizvodnjom slobodnih radikala pokreće zapaljenjske procese i oksidativni stres. Brojne studije su pokazale povezanost povišene koncentracije homocisteina sa razvojem mnogih bolesti, kao što su kardiovaskularna oboljenja, hronična bubrežna insuficijencija i cerebrovaskularni poremećaji (4, 5). Pored toga, oksidativni stres, kao značajan parametar hiperhomocisteinemije, predstavlja jedan od ključnih faktora u patogenezi gastrointestinalnih bolesti mukoze, kao što su ulcerozni kolitis i rak debelog creva povezan sa kolitisom. Zabeleženo je da su kod pacijenata sa inflamatornim oboljenjem creva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD), nivoi Hcy u plazmi i sluznici debelog creva povećani (6, 7). Pored svoje osnovne funkcije varenja i apsorpcije, crevna sluznica čini odbrambenu barijeru od otrovnih i štetnih materija, na taj način štiteći pojedinca od različitih antigena inflamatorne reakcije. Eksperimentalni dokazi iz životinjskih modela ukazuju na to da je izmenjena funkcija crevne barijere potencijalni uzrok za nastanak intestinalne i ekstraintestinalne inflamacije.

Inflamatorne bolesti creva, uključujući Kronovu bolest (engl. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC), složeni su poremećaji koje karakterišu hronična, lokalna i sistemska inflamacija, kao i spontani relapsi (8). Veliki broj dokaza pokazuje da se, kao posledica inflamirane sluznice, u većem broju proizvode oksidativni derivati i reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS), koji mogu da učestvuju u patogenezi IBD (9, 10). Imajući u vidu strukturnu i funkcionalnu sličnost između vaskularnih endotelnih i crevnih epitelnih ćelija, pretpostavili smo da je povišen nivo Hcy u plazmi i sluznici kolona uključen u patofiziološki proces IBD preko uticaja na crevnu permeabilnost.

U borbi protiv slobodnih radikala, izazvanih oksidativnim stresom, značajnu ulogu igraju dva antioksidansa:

glutation, koji predstavlja jedan od krajnjih proizvoda metionina i N-acetil-L-cistein (NAC). N-acetil-L-cistein je aminotiolna kiselina, koja predstavlja sintetički proizvod L-cisteina, a značajan je prekursor za sintezu glutationa. Dosadašnja istraživanja pokazuju protektivno, antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo NAC na eksperimentalno izazvan kolitis kod pacova (11, 12). N-acetil-L-cistein može da utiče na nekoliko signalnih puteva, uključujući apoptozu, angiogenezu, rast ćelija, redoks regulisanu gensku ekspresiju i inflamatorni odgovor (13, 14). Studija sprovedena na humanojoj populaciji pokazala je da primena NAC poboljšava oksidativni status pacijenata posle hirurških zahvata u abdomenu, što ukazuje na značaj kliničke primene ove supstance (15). Cilj ovog rada bio je da ispita uticaj NAC na histološke promene u tkivima digestivnog trakta pacova u uslovima suphronične stimulacije metioninom.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci Vistar albino (*Wistar albino*) pacova, telesne mase oko 160 g i starosti 15-20 dana na početku eksperimenta (Vivarijum Vojnomedicinske akademije u Beogradu). Pacovi su čuvani pojedinačno u transparentnim kavezima od pleksiglasa sa dnom obloženim šuškom, hranom i vodom dostupnom *ad libitum* i konstantnim ambijentalnim uslovima (temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$; vlažnost $55 \pm 5\%$; ciklus svetlo-tama na 12 h sa početkom svetlog perioda u 7:30 h).

Eksperimentalni protokol

Pacovima je 21 dan intraperitonealno aplikovan metionin. Životinje su podeljene u tri grupe (sa po 8 životinja u grupi) i tretirane su prema sledećem režimu: 1. kontrolna grupa - K (0,9% NaCl 1 mL/dan); 2. metionin - M (0,8 mmol/kg/tm/dan); 3. metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + NAC - N (50 mg/kg/tm/dan) (39). Vrednosti homocisteina su određivane pre početka i na kraju eksperimenta. Posle 21. dana tretmana životinje su žrtvovane giljotinom za pacove, a potom je hirurški izolovan kolon. Tkiva za histošku analizu su odlagana u pripremljene posude sa formalinom i čuvane su na sobnoj temperaturi.

Histološka analiza

Uzorci tkiva kolona su fiksirani u 4% puferisanom rastvoru formalina i kalupljeni u parafinu. Analiza ovih tkiva je rađena na preparatima bojenim hematoksilinom/eozinom. Za analizu je korišćen svetlosni mikroskop Olympus BX41 sa Olympus C5060-ADU "wide zoom" kamerom. Uz pomoć kompjuterskog morfometrijskog pro-

grama Fiji izvršena su merenja histoloških parametara na fotografijama histoloških preparata (16). Merene su dimenzije sledećih parametara (izražene u μm): dubina kripti, debljina lamine muskularis mukoze, debljina tunike mukoze, debljina zida kolona i gustina ćelija u lamini propriji tunike mukoze (izražena kao broj ćelija $0,1 \text{ mm}^2$).

Statistička analiza

Statistička analiza podataka izvršena je upotrebom kompjuterskog programa *GraphPad Prism 5*. Od metoda analitičke statistike za poređenje numeričkih obeležja posmatranja između dve grupe korišćen je Studentov t-test. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom, a vrednost $p < 0,01$ veoma značajnom. Vrednosti ispitivanih parametara su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška.

Rezultati

Dubina kripti u kolonu pacova

Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta dubine kripti ($M = 382,4 \pm 11,5 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 325,8 \pm 9,6 \mu\text{m}$) – povećanje za 17,4% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) smanjenja dubine kripti ($N = 313 \pm 8,6 \mu\text{m}$) – smanjenje za 18,06% u odnosu na M (Grafikon 1).

Debljina lamine muskularis mukoze kolona pacova

Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta debljine lamine muskularis mukoze u kolonu pacova ($M = 29,4 \pm 1,6 \mu\text{m}$) u odnosu na

Grafikon 1. Dubina kripti kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički visoko značajan ($p < 0,01$) porast dubine kripti u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički visoko značajan ($p < 0,01$) smanjenje dubine kripti u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t testom.

kontrolnu grupu ($K = 16,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$) – povećanje za 81,5% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine lamine muskularis mukoze kolona ($N = 19 \pm 0,5 \mu\text{m}$) – smanjenje za 34,5% u odnosu na M (Grafikon 2).

Grafikon 2. Debljina lamine muskularis mukoze pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički veoma značajan ($p < 0,01$) porast debljine lamine muskularis mukoze u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički veoma značajno ($p < 0,01$) smanjenje debljine lamine muskularis mukoze u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.

Debljina tunike mukoze kolona pacova

Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta debljine tunike mukoze kolona pacova ($M = 435,2 \pm 14,4 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 347,4 \pm 9,7 \mu\text{m}$) – povećanje za 25,6% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine tunike mukoze kolona pacova ($N = 352 \pm 9,1 \mu\text{m}$) – smanjenje za 19,08% u odnosu na M (Grafikon 3).

Ukupna debljina zida kolona pacova

Opterećenje metioninom nije dovelo do statistički značajnih promena ukupne debljine zida kolona pacova ($M = 722,7 \pm 90,8 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 705,0 \pm 69,6$) – povećanje za 2,5% u odnosu na K (Grafikon 4).

Gustina ćelija u lamini propriji tunike mukoze kolona pacova

Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajne ($p < 0,01$) promene gustine ćelija u lamini propriji tunike mukoze kolona pacova ($M = 1419 \pm 56$ ćelija/ mm^2) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1126 \pm 28$ ćelija/

Grafikon 3. Debljina tunike mukoze kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički veoma značajan ($p < 0,01$) porast debljine tunike mukoze u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički veoma značajno ($p < 0,01$) smanjenje debljina tunike mukoze u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.

Grafikon 5. Broj ćelija lamine proprije kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički veoma značajan ($p < 0,01$) porast broja ćelija lamine proprije u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje broja ćelija lamine proprije u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.

Grafikon 4. Debljina zida kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N). Opterećenje metioninom ne dovodi do statistički značajnih promena ukupne debljine zida kolona pacova u odnosu na kontrolnu grupu (K). Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.

mm²) – povećanje za 26,0% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja gustine ćelija u lamini proprije tunike mukoze kolona pacova ($N = 996,16 \pm 55$ ćelija/mm²) – smanjenje za 29,8% u odnosu na M (Grafikon 5).

Diskusija

In vitro i *in vivo* studija na pacovima pokazala je alteraciju parametara oksidativnog stresa nakon primene metionina

(17). Oksidativni stres ima važan uticaj na zapaljenje preko aktiviranja redoks osetljive transkripcije faktora poput nuklearnog faktora kB (NF - kB) i aktivatora proteina 1, koji regulišu ekspresiju ključnih gena tako što kodiraju proinflamatorne medijatore i zaštitne antioksidativne proteine (18). Rezultati našeg rada zabeležili su značajan porast vrednosti histoloških parametara u M u odnosu na K grupu kolona pacova, pa možemo pretpostaviti da je jedan od uključenih mehanizama i oksidativni stres.

Pokazano je da interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora (TNF- α) igraju važnu ulogu u patogenezi inflamatornog oboljenja creva (19). Ovi proinflamatorni citokini utiču na aktiviranje i angažovanje inflamatornih ćelija pojačavajući proizvodnju drugih proinflamatornih citokina, aktivirajući faktore nuklearne transkripcije i promovišući održavanje inflamatornog odgovora (20). Najveći uticaj metionina u našoj studiji zabeležen je u debljini zida lamine muskularis mukoze kolona pacova, gde je došlo do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta (za 81,5%) u M u odnosu na K grupu. Porast vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu primećen je i u dubini kripti kolona pacova, debljini tunike mukoze i gustini ćelija lamine proprije tunike mukoze, što potvrđuje hipotezu naše studije.

Kao što smo već pomenuli, promene u metabolizmu metionina dovode do oksidativnog stresa i zapaljenjskih procesa. N-acetil-L-cistein se koristi kao antioksidant *in vivo* i *in vitro* (21), što nas je navelo da preispitamo njegove efekte. On deluje kao direktni ROS sakupljač, a indirektno poseduje antioksidativno dejstvo. Prethodne studije su pokazale zaštitni efekat NAC protiv toksičnosti hemikalija, usled svoje dvostruke uloge kao nukleofila i -SH donora (22).

U našem eksperimentu NAC pokazuje najveće promene u okiru lamine muskularis tunike mukoze kolona pacova, koja pokazuje statistički veoma značajno smanjenje za 34,5% u grupi N u odnosu na M. Ovaj podatak ukazuje da se NAC uključuje u zaštitu protiv štetnih oksidansa, ali takođe otvara pitanje antiinflamatornog svojstva ove aminokiseline. Antioksidativni kapacitet NAC pokazan je i u modelu hroničnog oštećenja jetre kod pacova (23). Statistički značajne promene zapazili smo i u okviru dubine kripti, debljine tunike mukoze i gustine ćelija lamine proprije tunike mukoze kolona pacova. Primenom NAC dokazali smo da ova aminokiselina utiče na smanjenje povećanih histoloških parametara kolona, potencijalno izazvanih oksidativnim stresom.

Literatura

1. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *Eur J Pediatr*. 1998;157:40-44.
2. Brosnan JT, Brosnan ME. The Sulfur-Containing Amino Acids: An overview. *J Nutr*. 2006;136:1636-1640.
3. Jordao AA, Domenici FA, Lataro RC, Portari GV, Vannucchi H. Effect of methionine load on homocysteine levels, lipid peroxidation and DNA damage in rats receiving ethanol. *Braz J Pharm Sci*. 2009;45(4):709-714.
4. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr*. 1992;12:279-298.
5. Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci*. 1997;61:1205-1215.
6. Morgenstern I, Raijmakers MT, Peters WH, Hoensch H, Kirch W. Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2003;48(10):2083-2090.
7. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scalfarri F, Fedeli G et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2005;11(46):7227-7236.
8. Stadnicki A, Colman RW. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2003;51:149-155.
9. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut*. 1990;31:786-790.
10. Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut*. 1996;39:407-415.
11. Nosál'ová V, Cerná S, Bauer V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. *Gen Pharmacol*. 2000;35(2):77-81.
12. Uraz S, Tahan G, Aytekin H, Tahan V. N-acetylcysteine expresses powerful anti inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Scand J Clin Lab Invest*. 2013;73(1):61-66.
13. Sadowska AM, Manuel-y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effects. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20:9-22.
14. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases. Basic and clinical pharmacology. *Cerebellum*. 2007;6:308-314.
15. Kuyumcu A, Akyol A, Buyuktuncer Z, Ozmen MM, Besler HT. Improved oxidative status in major abdominal surgery patients after N-acetyl cysteine supplementation. *Nutr J*. 2015;14:4-8.
16. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-682.
17. Costa MZ, da Silva TM, Flores NP, Schmitz F, da Silva Scherer EB, Viau CM, et al. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell Biochem*. 2013;384(1-2):21-28.
18. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut*. 1990;31:786-790.
19. Pedespan L. Febrile seizures. *Arch Pediatr* 2007;14:394-398.
20. Steering Committee on Quality Improvement and Management. Febrile Seizures: Clinical Practice Guideline for the Long-term Management of the Child with Simple Febrile Seizures. 2008;121(6):1281-1286.
21. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134:489-492.
22. Sridharan S, Nalini R, Shyamala DCS. In vitro evaluation of the anticancer effect of N-acetylcysteine on oral carcinoma cell line. *Indian J Pharmacol*. 2001;33:343-349.
23. Demiroren K, Dogan Y, Kocamaz H, Ozercan IH, Ilhan S, Ustundag B et al. Protective effects of L-carnitine, N-acetylcysteine and genistein in an experimental model of liver fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014;38(1):63-72.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata možemo da zaključimo da NAC ima značajno protektivno dejstvo na promene u kolonu pacova izazvane opterećenjem metioninom. Ova činjenica govori u prilog eventualnoj kliničkoj primeni NAC u terapiji bolesti digestivnog trakta.

ZAHVALNOST:

Zahvalnost Ministarstvu za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Srbije, koje je podržalo ovu studiju. Projekat broj 175043