



İyonize Radyasyonun Karaciğer ve Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi

Münevver BARAN¹, Gözde Özge ÖNDER², Özge GÖKTEPE², Esra BALCIOĞLU², Oğuz Galip YILDIZ³,
Arzu YAY²

¹Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

³Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Münevver BARAN; E-posta: b.munever@hotmail.com.tr; ORCID:0000-0003-0369-1022

Atıf yapmak için: Baran M, Önder GÖ, Göktepe Ö, Balcioğlu E, Yıldız OG, Yay A. İyonize radyasyonun karaciğer ve böbrek dokusu üzerine etkisi. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2021;18(1): 11-18

Özet: Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon uygulamalarının önemli komplikasyonları arasında radyasyona bağlı karaciğer ve böbrek toksisitesi bulunur. Doku ve/veya organlarda şekillenen radyasyon hasarı, alınan radyasyon dozuna bağlıdır. Bu çalışma ile farklı dozlarda verilen iyonize radyasyonun (IR) sıçan karaciğer ve böbrek dokusu üzerine olası toksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Çalışmada, 40 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı. Gruplar; kontrol grubu, 1Gy radyasyon grubu, 5Gy radyasyon grubu ve 10Gy radyasyon grubu şeklinde belirlendi. Radyasyon uygulamaları gama ışını kullanılarak tek doz total vücut ışınlanması şeklinde yapıldı. Gruplara ait karaciğer ve böbrek dokuları Hematoksin-Eozin (H&E), Masson trikrom ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyama ile histopatolojik olarak değerlendirildi. Ayrıca, kaspaz-3 immünboyama ile apoptotik hücre sayısı belirlendi. IR uygulanan karaciğer dokuları histolojik olarak incelendiğinde, radyasyon uygulanan karaciğer dokularında başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücrel hasarlar gözlenmiş olup hasar dereceleri radyasyon dozu ile doğru orantılıydı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında en belirgin fibrozisin 10 Gy radyasyon uygulanan grupta olduğu gözlemlendi. Ayrıca, 5 Gy ve 10 Gy gruplarında hepatositlerin glikojen içeriğinde tükenme olduğu görüldü. Uygulanan IR, böbrek tübüllerinde ve interstisyel dokuda değişikliklere ve hücrel hasara neden oldu. Özellikle 5 Gy ve 10 Gy IR uygulanan gruplarda kollajen liflerin miktarının arttığı ve proksimal tübül epitel hücrelerinde belirgin mikrovillus kaybı ile epitel bazal membranlarında kalınlaşma olduğu görüldü. Kaspaz-3 + hücre sayısı IR'nin hem karaciğer hem de böbrek dokuları üzerinde apoptozu artırıcı etkiye sahip olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, çalışma bulguları karaciğer ve böbrekte oluşan doku hasarının ve apoptotik hücre sayısının IR'da uygulanan doza bağlı olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, böbrek, iyonize radyasyon, karaciğer

The Ionizing Radiation Effect on Liver and Kidney Tissue

Summary: Radiation-induced liver and kidney toxicity are among the major complications of radiation applications used in cancer treatment. Radiation damage that occurs in tissues and/or organs depends on the radiation dose received. In this study, it was aimed to evaluate the possible toxic effects of ionizing radiation (IR) given in different doses on rat liver and kidney tissue. Investigation the possible effects of different doses of ionized radiation (IR) on liver and kidney tissues. In this study, 40 female Wistar albino rats were randomly divided into 4 groups. The groups were determined as the control group, 1 Gy radiation group, 5 Gy radiation group and 10 Gy radiation group. Radiation applications were performed as a single dose of total body irradiation using gamma rays. Liver and kidney tissues of the groups were evaluated histopathologically through Hematoxylin-Eosin (H&E), Masson trichrome and Periodic acid Schiff (PAS) staining. Furthermore, the number of apoptotic cells was determined by caspase-3 immunostaining. When liver tissues treated with IR were examined histologically, various damaged cell were observed in the irradiated liver tissues, especially vascular and interstitial hemorrhage areas, and also the degree of damage was directly proportional with the radiation dose. Compared to the control group, the most prominent fibrosis was observed in the group treated with 10 Gy radiation. Furthermore, glycogen content depletion of hepatocytes was seen in 5 Gy and 10 Gy groups. The IR applied caused changes and cellular damage in the renal tubules and interstitial tissue. Especially in the 5 Gy and 10 Gy IR applied groups, the amount of collagen fibers increased and proximal tubule epithelial cells were found to have thickening of the epithelial basement membranes with marked loss of microvilli. The caspase-3 + cell count showed that IR have an apoptosis-enhancing effect on both liver and kidney tissues. As a result, the study findings revealed that the tissue damage and apoptotic cell number in the liver and kidney are dependent on the dose administered in the IR.

Key words: Apoptosis, ionizing radiation, kidney, liver

Giriş

Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon, içinden

geçtiği dokuların hücrelerinde atomlardan ve moleküllerden elektronları çıkararak iyonlar oluşturduğu için iyonlaştırıcı radyasyon (IR) olarak adlandırılır. Bu hücreleri öldürebilir veya genleri değiştirebilir, böylece hücrelerde büyümeyi durdurur. IR'nin normal dokular-

Geliş Tarihi/Submission Date : 16.07.2020

Kabul Tarihi/Accepted Date : 02.11.2020

daki biyolojik etkileri doğrudan veya dolaylı olarak meydana gelebilir. Doğrudan etki ile radyasyon hücrenin hedef molekülü olan DNA'sını etkilerken, dolaylı etkide ise hücrelerdeki atomların iyonlaşması ve moleküler yapılarında bozulmalar görülebilir (Özgüner ve Mollaoglu, 2006). Radyasyon toksisitesi, radyasyon maruziyetinden sonra reaktif oksijen radikallerinin geniş çaplı oksidatif hasara yol açması ile ilişkilidir (Sagar, 2005). Bunun yanı sıra IR'ye maruz kalan her canlı organizmada farklı doku ve hücre tipindeki etkilenmeler, çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir (Park ve ark., 2015). IR sağlıklı biyolojik sistemlerde serbest oksijen radikallerinde artışa neden olur. Bu radikaller, hem hücrelerin DNA'sını, proteinlerini ve zar lipitlerini etkileyerek hücrede hasara neden olur, hem de antioksidan savunma mekanizmalarını olumsuz yönde etkiler. Radyasyona maruz kalma sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarını olumsuz yönde etkiler (Karbownik ve Reiter, 2000). IR'nin hücreler üzerindeki etkisi, ışınlanma dozu arttıkça hücre döngüsü bozukluğu, anormal mitoz veya hücre ölümü insidansı şeklindedir. Bu bağlamda, apoptotik hücre ölümü, hücreler IR'ye maruz kaldıktan sonraki ana hücre ölümü formlarından biri olarak kabul edilir (Verheij ve ark., 2000). Hücre ölümünü kontrol eden tüm apoptotik yollarda kritik bir role sahip olan kaspazların doğrudan aktivasyonu ile tetiklenebilir (Shinomiya, 2001). Birçok abdominal ve alt torasik tümörler için radyasyon ile tedavide karaciğer ve böbreklerin ışınlanması kaçınılmazdır (Cohen ve Robbins, 2003). Karaciğerin radyasyon toleransı oldukça sınırlıdır. Radyasyona bağlı nefropatinin histopatolojik araştırmaları, böbrek glomerüllerine, kan damarlarına, tübül epiteline ve interstisyuma zarar verdiğini göstermiştir (Cohen ve Robbins, 2003). Maruz kalınan doz ve süreye bağlı olmakla birlikte iyonlaştırıcı radyasyon verilen kemirici karaciğerinde, piknotik ve çift çekirdekli hepatosit sayısında artış olduğu görülmüştür (Sharma ve Sharma, 2005).

Hücre kültürlerinde veya laboratuvar hayvanlarında deneysel çalışmalar düşük bireysel değişkenliğe sahip populasyonlarla çalışmayı ve doğru dozdaki radyasyon dozlarını test etmeyi sağlayan radyasyonun biyolojik etkilerini değerlendirmek için bir alternatiftir. Aynı zamanda, *in vitro* sistemler, *in vivo* sistemlerle karşılaştırıldığında radyasyona farklı tepki gösterebildiğinden, laboratuvar hayvanları ile yapılan deneyler, radyasyonun etkileri ve altta yatan mekanizmaları hakkında bilgi sağlamaktadır (Duport ve ark., 2012).

Günümüzde tıp alanında IR'nin artan kullanımının bir sonucu olarak, giderek daha fazla insan, radyoterapi sırasında birkaç düzine Gy de dahil olmak üzere farklı dozlarda IR'ye maruz kalıyor. IR'ye maruziyet sonrasında alınan radyasyon dozunun organlar üzerinde nasıl bir etki oluşturduğu merak konusu olmuştur. Normal doku yaralanmalarında hem akut hem de geç toksisiteyi önlemenin yollarını bulmak büyük önem

taşımaktadır, çünkü radyasyona bağlı bu toksisiteden kaynaklanan yıkım bazen tedavi edilen ilk lezyondan çok daha kötü olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışma ile farklı dozlarda verilen IR'nin Wistar albino sıçan karaciğer ve böbrek dokusu üzerindeki etkisinin histolojik ve immunohistokimyasal metotların kullanılması ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'u tarafından 14.11.2018 tarihinde 18/140 karar no ile etik onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) yetiştirilen ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 40 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar araştırma süresince 19-21°C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık sikluslu çevre, özel hazırlanmış standart laboratuvar koşullarında ve otomatik olarak klimatize edilen odalarda plastik kafeslerde korundu. Deney süresince sıçanlar normal pelet yem ile beslendi.

Radyasyon uygulaması

Çalışmaya başlamadan önce hayvanlar her grupta 10 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Deney grupları şu şekilde belirlendi; 1) kontrol grubu; 2) tüm vücut 1 Gy radyasyona maruz kalan grup; 3) tüm vücut 5 Gy radyasyona maruz kalan grup; 4) tüm vücut 10 Gy radyasyona maruz kalan grup. Radyasyon uygulaması, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Bölümünde Cobalt-60 teleterapi (GWXJ80-Co60 Teletherapy Unit) cihazı ile oluşturulan γ -ışını kullanılarak 28.5x28.5x5 cm boyutunda ve 2.5 cm derinlikte tahtadan yapılan özel bir kutu içerisinde anestezi yapmadan, 5'erli gruplar halinde, total vücut ışınlanması şeklinde yapıldı. Işınlama sırasında sıçanların nefes almalarına izin vermek için kutunun üst kısmına delikli tray yerleştirildi. Tüm vücut ışınlanması (Villa-Genius HF-80, Çift masa, çift tüplü röntgen cihazı, 1994; Del Medical, Milan, İtalya) 15-20 miliRad16 dozunda 2 dakikalık aralıklarla uygulandı. Toplam uygulanacak doz 1 Gy, 5 Gy ve 10 Gy olacak şekilde hesaplandı.

Histolojik boyama

Radyasyon uygulamasından 24 saat sonra ketamineksilazin (75 mg/kg-10 mg/kg) ile genel anesteziye alınan kontrol ve deney gruplarındaki tüm sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından karın bölgesi V harfi şeklinde açılarak sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları hızlıca çıkarılıp %10'luk formaldehit

ile tespit edildikten sonra dereceli olarak artan alkol serilerinden geçirilip, ksilende bekletildikten sonra eriyik parafine gömülerek bloklar elde edildi. Tüm numunelerden hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler, genel histolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin (H&E), fibrozis/kollajenleri değerlendirmek için Masson trikrom ve son olarak Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama metodları kullanıldı.

Histopatolojik değerlendirme

Standart ışık mikroskop ile değerlendirme için H&E ile boyanmış preparatlar kullanıldı. Karaciğer hasarı konjesyon, nekroz ve yaygın nekroz olmak üzere skorlandı (Hwang ve ark., 2003). Böbrek hasarı ise radyasyona bağlı tübüler hasarsız (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli hasar (3) olmak üzere derecelendirildi (Inomata ve ark., 1999). Histopatolojik değerlendirmede tübüllerde dilatasyon, atrofi ve protein birikimi, glomerülde vakuolizasyon ve interstisyel alanda lenfosit infiltrasyonu değerlendirildi. Hem karaciğer hem de böbrek dokularında IR'nin interstisyel fibrozis etkisini belirlemek için, her denekten rastgele alınan masson trikrom ile boyanmış 20 mikroskobik alan (x200 büyütmede) değerlendirildi. Her alanda yarı kantitatif analiz şu şekilde yapıldı: 0=fibrozis yok; 1=alanın <%10'unda fibrozis; 2=alanın %10-25'inde fibrozis; 3=alanın %25-50'sinde fibrozis; 4=alanın>% 50'sinde fibrozis. İnterstisyel fibrozis derecesi, her grup için yüzde (%) olarak hesaplandı (Wang ve ark., 2016).

İmmünohistokimyasal boyama ve değerlendirme

Üretici firmanın tavsiyelerine göre avidin-biotin-peroksidaz yöntemi (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak immünohistokimya boyama metodu kullanıldı. Bunun için, 5 µm kalınlığında alınan kesitler ksilende deparafinize edildi ve azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi. Antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda (pH:6) mikrodalgada (750W) 10 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen kesitler PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra 5 dakika Ultra V Block solüsyonu uygulanıp ardından PBS ile yıkama yapılmadan kaspaz-3 primer antikor (1:500, Cell Signaling Technology, Leiden, Netherlands) ile 4 °C'de 1 gece nemli ortamda inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasını takiben PBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitlere 10 dakika biyotinli sekonder antikor uygulandı. PBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitler peroxidase-conjugated streptavidin ile 10 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi ve PBS içerisine alındı. İmmünohistokimyasal reaksiyonlar, kromojen

(diaminobenzidin tetrahidroklorür, DAB) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ile görselleştirildi. Mayer's hematoksilin ile zit boyama yapılan dokular distile sudan geçirilerek dereceli alkol serileri ile dehidre edilip ksilenden geçirildi ve uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyama metodu uygulanan her bir preparat ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) altında incelendi. Deney grupları arasında kaspaz-3 pozitif hücre sayısını belirlemek için, her deneğe ait kesitlerden rastgele seçilen 10 farklı mikroskobik alandaki kaspaz-3 pozitif hücre sayısı sayıldı (Yay ve ark., 2018).

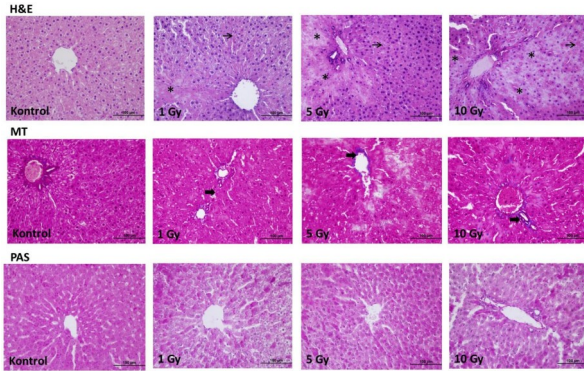
İstatistiksel analiz

Tüm istatistiksel testler TURCOSA yazılım programında yapıldı. Grupların normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerde gruplar arası karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA), gruplar arasında farklılığın önemli bulunduğu durumlarda Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Karaciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi

Çalışmada, ratlardan alınan karaciğer ve böbrek dokularına H&E, masson trikrom ve PAS boyama metodları uygulandı. Elde edilen sonuçlar şekil 1'de gösterilmiştir. Histopatolojik değerlendirmede, radyasyon uygulanmayan kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterdi. Kontrol grubuna ait karaciğer dokuları normal parankimal yapı özelliklerini sergilemişlerdir. Lobüller içerisinde vena centralis etrafında ışınal tarzda dizilmiş karaciğer hücreleri (hepatositler) yer almaktaydı. Hepatositler etrafında karaciğer sinüzoidleri düzgün gözlenmekteydi. Portal alanlarda ise, bağ dokusu içinde hepatik arter, ven ve safra kanalı üçlüsü yer almaktaydı. Radyasyon uygulanan dokularda başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücresel hasarlar gözlenmiş olup hasar dereceleri radyasyon dozu ile doğru orantılıydı. 5 Gy radyasyon uygulanan gruplara ait karaciğer kesitleri incelendiğinde kontrol grubundan farklı olarak, yoğun vasküler sinüzoidal hemoraji ile birlikte, eritrositlerin sıkışarak sinüzoidleri doldurmuş olduğu gözlemlendi. 10 Gy radyasyon uygulanan bütün deney gruplarında, yoğun nekrotik alanların bulunduğu gözlemlendi. Ayrıca vena sentralis'ten ışınal tarzda uzanan sinüslerde belirgin genişleme vardı (Şekil 1). Karaciğer dokuları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu radyasyon uygulanan gruplara göre en düşük skora sahipti. Radyasyon uygulanan tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre skor derecesi anlamlı düzeyde yüksekti (P<0.001) (Tablo 1).



Şekil 1. Kontrol grubunda ve farklı dozlarda tüm vücut γ ışınlaması uygulanan sıçanların karaciğer dokularında $\times 40$ 'lık büyütmede Hematoksilen-Eozin (HE), Masson Trikrom (MT) ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyaması ile boyanmış kesit görüntüleri. H&E, MT ve PAS boyaması. Yıldız (*) nekrotik alanları, ince ok (\rightarrow) hemorajiyi, kalın ok (\rightarrow) ise fibrozisi göstermektedir

Masson trikrom boyama ile gruplar fibrotik doku bakımından kıyaslandığında, kontrol gruplarına ait karaciğer kesitlerinde vena sentralis ve ona komşu damarların duvarında tek sıra halinde ince kollagen lifler

Tablo 1. Deneklere ait karaciğer ve böbrek dokularında histopatoloji ve fibrozis skor sonuçları

| | Kontrol | 1Gy | 5Gy | 10Gy | P |
|----------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------|
| Karaciğer histopatolojisi | 0.20±0.42 ^a | 1.00±0.781 ^b | 2.00±0.47 ^c | 2.20±0.63 ^c | .001 |
| Böbrek histopatolojisi | 0.30±0.48 ^a | 1.10±0.73 ^b | 1.80±0.63 ^{bc} | 2.40±0.69 ^c | .001 |
| Karaciğer fibrozis | 0.10±0.31 ^a | 0.50±0.52 ^{ab} | 1.00±0.81 ^b | 2.00±0.81 ^c | .001 |
| Böbrek fibrozis | 0.20±0.42 ^a | 0.90±0.73 ^{ab} | 1.70±0.82 ^{bc} | 2.10±0.87 ^c | .001 |

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. $p < 0.05$ Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

gözlendi. Radyasyon uygulanan gruplarda ise portal alan çevresinde kollagen liflerin, kontrol grubu ile kıyaslandığında radyasyon dozuna bağlı olarak artmış olduğu görüldü (Şekil 1). Fibrozis 5 Gy ve 10 Gy radyasyon uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($P < 0.001$) (Tablo 1).

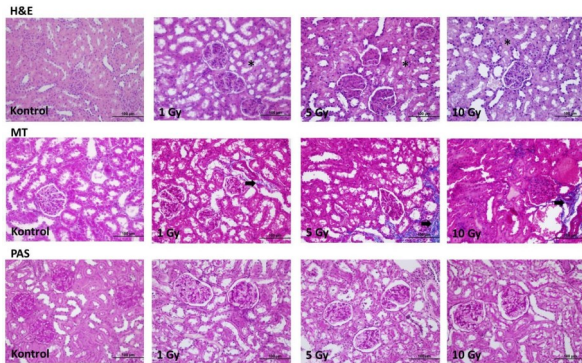
PAS ile boyanan kesitlerde kontrol grubuna ait karaciğer parankiminde yoğun glikojen içeren hepatosit kordonları gözlendi. Radyasyon uygulanan gruplarda ise, hepatositlerin glikojen içeriğinde tükenme olduğu dikkati çekti. Özellikle 5 Gy ve 10 Gy radyasyon uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre hepatositlerin glikojen içeriklerinde anlamlı bir azalma olduğu dikkati çekti (Şekil 1).

Böbrek dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ait böbrek dokuları parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpuskülleri), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapiller damarlar ve medullar ışınlar düzgün yerleşimleri ile normal görünüme sahipti. Radyasyon uygulanmayan kontrol gruplarında, glomerüller ve tübüller normal histolojik özellik gösterdi. Radyasyon uygulanan grubun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejeneratif değişiklikler sergilediği gözlemlendi. Uygulanan IR'nin tübüllerde ve interstisyel dokuda erken değişiklikleri dikkati çekti ve hücre hasarına neden olduğu görüldü. 1 Gy ve 5 Gy radyasyon grubuna ait böbrek dokularının histopatolojik incelemesinde, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji gözlemlendi. Ayrıca 10 Gy radyasyon grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu bulgulara ilaveten tübül hücrelerinde de belirgin hasar mevcuttu (Şekil 2). Deney gruplarına ait böbrek dokuları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre radyasyon uygulanan gruplarda radyasyon derecesine bağlı olarak hasarın anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($P < 0.001$) (Tablo 1).

Fibrozisi değerlendirmek için, deney gruplarına ait masson trikrom boyama metodu uygulanan böbrek kesitlerinde, kontrol grubunda belirgin bir boyanma gözlenmezken IR uygulanan deney gruplarında artmış fibrozis dikkati çekti (Şekil 2). 5 Gy ve 10 Gy IR uygulanan gruplara ait böbrek dokularında interstisyel alanlarda masson trikrom ile boyanmış kollajen liflerin miktarı anlamlı derecede artmıştı ($P < 0.001$) (Tablo 1).

Böbrek dokusunda tübüllerin mikrovillus yapıları ve bazal membrandaki hasarı görebilmek için, PAS boyama metodu uygulanmıştır. Kontrol grubuna ait sıçanlardan alınan böbrek dokularında tübül epitel hücreleri ve bazal membran yapıları oldukça düzgün görünümdeydi. IR uygulanan gruplarda, özellikle proksimal tübül epitel hücrelerinde belirgin mikrovillus kaybı ve bowman kapsülüpariyetal yaprağı ile tübül

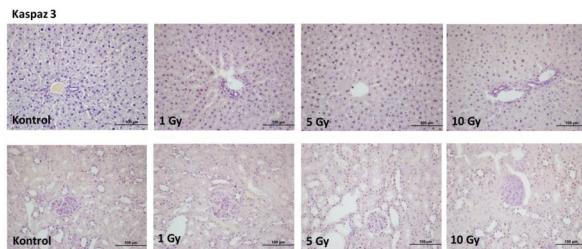


Şekil 2. Kontrol grubunda ve farklı dozlarda tüm vücut γ ışınlaması uygulanan sıçanların böbrek dokularında $\times 40$ 'lık büyütmede Hematoksilen-Eozin (HE), Masson Trikrom (MT) ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyaması ile boyanmış kesit görüntüleri. H&E, MT ve PAS boyaması. Yıldız (*) nekrotik alanları, ince ok (→) hemorajiji, kalın ok (→) ise fibrozisi göstermektedir

yapılarının bazal membranlarında kalınlaşma dikkati çekmiştir. PAS boyama metodu uyguladığımız IR gruplarında gözlenen bu bulgular özellikle 5 ve 10 Gy radyasyon uygulanan deney grubunda daha belirgindi (Şekil 2).

İmmünohistokimyasal bulgular

Çalışmada, IR'nin karaciğer ve böbrekte oluşturduğu hasarda apoptozun herhangi bir rolünün olup olmadığını belirlemek için immünohistokimya boyama metodu kullanıldı (Şekil 3).



Şekil 3. Kontrol ve farklı dozlarda tüm vücut γ ışınlaması uygulanan grupların karaciğer ve böbrek dokularının immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 ile boyanmış kesit görüntüleri ($\times 40$)

Buna göre, tüm deney gruplarına ait deneklerden alınan karaciğer ve böbrek kesitlerinde $\times 40$ 'lık büyüt-

mede her denekten 10 farklı alan olacak şekilde kaspaz-3+ hücre sayısı hesaplandı. Elde edilen istatistiksel veriler, IR'nin hem karaciğer hem de böbrek dokularında apoptozu artırıcı etkiye sahip olduğunu gösterdi. Kontrol grubu karaciğer hücrelerindeki kaspaz-3 ekspresyonu IR uygulanan gruplara göre anlamlı derecede daha azdı ($P < 0.001$) (Tablo 2).

Tartışma ve Sonuç

RT birçok malignite için önemli bir tedavi yöntemidir; bununla birlikte, tümör hücrelerine bitişik olan normal dokuların ışınlanmaya maruz kalması doku hasarına neden olabilir ve bu istenmeyen etki terapötik başarıyı sınırlayabilir (Prasanna ve ark., 2012). IR, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA zincir kırıkları gibi biyokimyasal değişikliklere ve makromolekül modifikasyonlarına yol açan hücredeki çeşitli bileşenlere saldırarak DNA hasarı, genomik kararsızlık gibi çeşitli değişiklikleri teşvik ederek doku hasarının oluşmasına neden olur (Fuchs-Tarlovsky ve ark., 2013). Karaciğer hücreleri olan hepatositler, organın metabolik fonksiyonlarının çoğunu yerine getiren ve karaciğer popülasyonunun yaklaşık %80'ini oluşturan başlıca parankimal hücrelerdir. Bununla birlikte, radyasyona maruz kalmanın ardından karaciğer dokusunda oluşan toksisite, ROS'ta ve hepatik hücrelerin işlev görememesine neden olan inflamatuvar belirteçlerin seviyesindeki artış gibi çeşitli patolojik değişikliklere neden olur (Benson ve ark., 2016).

RT'deki teknik gelişmelerin devam etmesine rağmen, sağlıklı dokudaki radyasyonun hem akut hem de gecikmiş yan etkileri kanser tedavisinin önündeki en önemli engellerden biri olmaya devam etmektedir (Okunieff ve ark., 2008). Kemirgenler, deneysel modeller olarak, insanlara anatomik, fizyolojik ve genetik benzerliklerinden dolayı birçok avantaja sahiptir. Ratlar, radyasyona bağlı karaciğer yaralanmalarında en çok kullanılan hayvanlardır. Wistar sıçanları ile yapılan bir çalışmada tek doz 6 Gy toplam vücut ışınlamasına maruz bırakıldığında, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres karaciğerde önemli ölçüde artmış ve malondialdehit seviyelerinin de arttığı görülmüştür (Taysi ve ark., 2003). Karaciğer radyasyon hasarı histolojik olarak parankimal hepatosit kaybı, lobüler yapıdaki bozulma, venöz obstrüksiyon ve yorgunluk, asit ve yüksek karaciğer enzimleri gibi klinik semptomların eşlik ettiği sinüzoidal konjesyonlar ile karakterizedir (Kim ve Jung, 2017). 6 Gy γ -ışınlarına maruz kalan sıçanlar ALT, AST, ALP ve anti-inflamatuvar belirteçlerin (TNF- α ve IL-1 β) serum aktivitelerinde

Tablo 2. Deneklere ait karaciğer ve böbrek dokularında kaspaz-3 + apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması

| Kaspaz-3 | Kontrol | 1Gy | 5Gy | 10Gy | P |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|
| Karaciğer | 1.13 \pm 1.35 ^a | 4.80 \pm 4.07 ^{ab} | 8.93 \pm 4.46 ^b | 15.80 \pm 7.86 ^c | .001 |
| Böbrek | 1.06 \pm 1.03 ^a | 13.73 \pm 5.95 ^b | 12.66 \pm 4.25 ^b | 26.53 \pm 6.70 ^c | .001 |

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. $p < 0.05$ Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

artış göstermiş ve histopatolojik inceleme ile gösterildiğinde hepatik mimarinin değişmesine neden olmuştur (Mansour ve ark., 2017). Birinci ve yedinci günlerinde 30 dakika süre ile Kobalt 60- γ (1,333 MeV) ışını ile 10 Gy dozunda radyasyona maruz bırakılan farelerin karaciğerinde proliferen olan hepatosit sayısında azalmaya ve çift çekirdekli hepatosit sayısında artışa neden olduğu görülmüştür (Karahana ve ark., 2008). Tek doz 6 Gy radyasyona maruz kalan sıçanların 48 saat sonra sakrifiye edilen karaciğer dokuları hiçbir histopatolojik değişiklik görülmeden kontrol grubu ile kıyaslandığında fokal dejenerasyon alanları, tıkalı ve genişlemiş sinüzoidler görülmüştür (Salem ve ark., 2016). 7.2 Gy'lık tek bir dozda tüm vücut ^{60}Co γ radyasyonuna maruz kalan insan dışı primatlar da 60 günlük süre içerisinde böbrek ve karaciğerde dokularında güçlü metabolik değişiklikler görülürken diğer dokularda hafif değişiklikler gözlenmiştir (Cheema ve ark., 2019). Çalışmamızda ise farklı dozlarda (1Gy, 5Gy ve 10 Gy) radyasyon uygulamasından 24 saat sonra sakrifiye edilen karaciğer dokuları kontrol grubu ile kıyaslandığında vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücre hasarları gözlenmiş olup hasar dereceleri radyasyon dozu ile doğru orantılıydı. 5 Gy radyasyon uygulanan gruplarda yoğun vasküler sinüzoidal hemoraji ile birlikte, eritrositlerin sıkışarak sinüzoidleri doldurmuş olduğu gözlenirken 10 Gy radyasyon uygulanan gruplarda ise yoğun nekrotik hücreler ve vena sentralis'ten ışınal tarzda uzanan sinüslerde belirgin genişlemeler olduğu görülmüştür. Ayrıca, IR uygulanan gruplarda, radyasyon dozuna paralel olacak şekilde fibrozis artışı ve hepatositlerde glikojen içeriğinde tükenme olduğu dikkati çekmiştir. Bu çalışmada, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak farklı dozlarda tek doz uygulanan tüm vücut ışınlanmasından 24 saat sonra bile sakrifiye edilen karaciğer ve böbrek dokularında hasar meydana geldiği gözlenmiş oldu.

Böbrek, vücudun detoksifikasyon, toksik metabolitlerin ve ilaçların atılması gibi birkaç temel işlevi yapması için gerekli olan önemli bir organdır. Karın malignitesi olan hastalarda, böbrek ışınlanması kaçınılmazdır (Ismail ve ark., 2016). Tedavi sürecinde, düşük doza rağmen radyosensitif organlarda gelişen duyarlılık da dikkate alınmalıdır. Bu organlar arasında en önemli unsur böbrek dokusudur. Bu dokudaki patolojik değişiklikler, dozaj düşük olsa bile hemen başlar (Caloglu ve ark., 2009). Radyasyon nefropatisi perfüzyon bozukluğunu, artmış damar geçirgenliğini ve inflamatuvar reaksiyonları içerir, bu durum hayatı tehdit edici olabilir (Cohen ve Robbins, 2003). Yüksek dozda 20 Gy ışınlanmanın böbrek hasarına neden olabileceğini bildirmiştir (Kucuktulu, 2012). Bir başka çalışmada düşük dozda (4-5 Gy) ışınlanmanın dahi önemli böbrek hasarına neden olabileceği gösterilmiştir (Moulder ve Cohen, 2005). Radyasyona bağlı nefropatinin histopatolojik olarak incelendiği araştırmalarda, glomerüllerde, kan damarlarında, tübül epitel hücrelerinde

ve interstisyumda hasara neden olduğu gösterilmiştir (Cohen ve Robbins, 2003). Çalışmamızda IR uygulanan böbrek dokularında hem tübüllerde ve hem de interstisyel dokuda değişikliklere neden olduğunu belirledik. Özellikle 5 ve 10 Gy radyasyona maruz kalan böbrek dokularında, belirgin hemoraji, glomerüllerde ve tübül hücrelerinde hasar mevcuttu. Çalışmamızda, farklı dozlarda IR'ye maruz kalan böbrek dokularında kontrole göre artmış fibrozis gözlemlendi. Özellikle 5 Gy ve 10 Gy IR uygulanan gruplara ait böbrek dokularında interstisyel alanlarda kollajen liflerin miktarı artmıştı. Ayrıca, PAS boyama metodu ile boyanan böbrek kesitlerinde IR uyguladığımız gruplarda proksimal tübül epitel hücrelerinde belirgin mikrovillus kaybı ve bazal membranlarında kalınlaşma dikkati çekti.

Radyasyonun, hücre ölümü ve kemirgenlerde fibrotik değişikliklerle karakterize karaciğer hasarına neden olduğu bilinmektedir (Kim ve Yung, 2017). Hücreler IR'ye maruz kaldıktan sonraki ana hücre ölümü formlarından biri olan apoptotik hücre ölümüne yol açar (Verheij ve Bartelink, 2000). Kaspazlar, substratlarını aspartat tortusunda parçalayan, hücrede apoptoz ve iltihaplanmada önemli rol oynayan bir sisten proteaz ailesidir (Martinon ve ark., 2004). İlginç bir şekilde, yüksek dozlarda (4Gy veya 8Gy) akut olarak ışınlanan fareler, inflamasyonla ilgili proteinlerin ekspresyonunda kalıcı değişiklikler gösterirken, uzun vadeli radyasyonla toplam 8Gy dozu, apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunda değişikliğine neden olduğu görülmüştür (Nakajima ve ark., 2017). 10 Gy radyasyona maruz kalan karaciğer dokusunda Western blot analizi ile kaspaz-3 ekspresyonu değerlendirildiğinde tıpkı bizim çalışmamızdaki gibi iyonize radyasyondan sonra 1. günde bile bir artış olduğu gözlenmiştir (Han ve ark., 2019). Çalışmamızda IR'ye maruz kalan hem karaciğer hem de böbrek dokularında kontrole göre kaspaz-3 pozitif hücre sayısı artışı ve en fazla kaspaz-3 pozitif hücre sayısı 10 Gy IR grubunda görülmüştür. Bu da bize radyasyon dozuna bağlı olarak radyosensitif olan karaciğer ve böbrek dokularında hücre ölümünün tetiklendiğini gösterdi.

Dokuların radyasyona karşı oluşturdukları hücre cevapları farklılık göstermektedir. Günümüzde radyasyon içeren uygulamaların sıklığı, kullanılan dozlar ve buna bağlı doku hasarları görülme olasılığı giderek artmaktadır. RT uygulanan pek çok onkolojik vakada, RT alanına karaciğer ve böbreklerin girmesi, bu organlar üzerinde olumsuz etki oluşturabilmektedir. IR'nin organizma üzerindeki etkileri birçok faktöre bağlı olup geniş bir çerçevede incelenebilir. Bu çalışmadaki amacımız farklı dozlardaki IR'nin karaciğer ve böbrek dokusunda hücreler üzerinde yaptığı etkileri değerlendirmektir. Sonuçlarımıza göre, hastaya uygulanacak radyasyon dozunun mümkün olduğunca az tutulmasına rağmen hastada radyasyon hasarı oluşuma olasılığı bulunmaktadır. Bu nedenle asıl uygulama alanı dışında bırakılması mümkün olmayan bu

organları korumaya yönelik farklı yaklaşımlara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Benson R, Madan R, Kilambi R, Chander S. Radiation induced liver disease: A clinical update. *J Egypt Natl Canc Inst* 2016; 28(1): 7-11.
- Caloglu M, Yurut-Caloglu V, Durmus-Altun G, Oz-Puyan F, Ustun F, Cosar-Alas R, Saynak M, Parlar S, Turan FN, Uzal C. Histopathological and scintigraphic comparisons of the protective effects of L-carnitine and amifostine against radiation-induced late renal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(5-6): 523-30.
- Cheema AK, Mehta KY, Rajagopal MU, Wise SY, Fatanmi OO, Singh VK. Metabolomic studies of tissue injury in nonhuman primates exposed to gamma-radiation. *Int J Mol Sci* 2019; 20(13): 3360.
- Cohen EP, Robbins ME. Radiation nephropathy. *Semin Nephrol* 2003; 23(5): 486-99.
- Duport P, Jiang H, Shilnikova NS, Krewski D, Zielinski JM. Database of radiogenic cancer in experimental animals exposed to low doses of ionizing radiation. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2012; 15(3): 186-209.
- Fuchs-Tarlovsky V. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutri* 2013; 29(1): 15-21.
- Han N-K, Jung MG, Jeong YJ, Son Y, Han SC, Park S, Lim Y-B, Lee Y-J, Kim S-H, Park SC, Lee H-J. Plasma fibrinogen-like 1 as a potential biomarker for radiation-induced liver injury. *Cells* 2019; 8(9): 1042.
- Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH, Tsai LM. Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. *J Surg Res* 2003; 109(2): 149-54.
- Inomata T, Itoh S, Kariya S, Mesaki K, Nishioka A, Ogawa Y, Yoshida S, Sonobe H, Ohtsuki Y. Late pathologic changes in guinea pig kidneys irradiated with conventional fractionation and hyperfractionation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44(1): 171-7.
- Ismail AF, Zaher NH, El-Hossary EM, El-Gazzar MG. Modulatory effects of new curcumin analogues on gamma-irradiation-induced nephrotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 2016; 260: 141-53.
- Karahan S, Çavuşoğlu K, Atmaca HT, Yalçın E. Albino farelerde iyonlaştırıcı radyasyonun hepatosit morfolojisi ve proliferasyon hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonu üzerindeki etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2008; 5(2): 61-6.
- Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225(1): 9-22.
- Kim J, Jung Y. Radiation-induced liver disease: current understanding and future perspectives. *Exp Mol Med* 2017; 49(7): e359
- Kucuktulu E. Protective effect of melatonin against radiation induced nephrotoxicity in rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(8): 4101-5.
- Mansour SZ, El-Marakby SM, Moawed FSM. Ameliorative effects of rutin on hepatic encephalopathy-induced by thioacetamide or gamma irradiation. *J Photochem Photobiol B* 2017; 172: 20-7.
- Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117(5): 561-74.
- Moulder JE, Cohen EP. Radiation-induced multi-organ involvement and failure: The contribution of radiation effects on the renal system. *Br J Radiol* 2005; 27(1): 82-8.
- Nakajima T, Wang B, Ono T, Uehara Y, Nakamura S, Ichinohe K, Braga-Tanaka I, Tanaka S, Tanaka K, Neno M. Differences in sustained alterations in protein expression between livers of mice exposed to high-dose-rate and low-dose-rate radiation. *J Radiat Res* 2017; 58(4): 421-9.
- Park HS, You GE, Yang KH, Kim JY, An S, Song JY, Lee S-J, Lim Y-K, Nam SY. Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells. *Eur J Cell Biol* 2015; 94(12): 653-60.
- Okunieff P, Chen, Maguire D, Huser AK. Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(3): 363-74
- Özgüner F, Mollaoglu H. Manyetik alanın organizma üzerindeki biyolojik etkileri. *Med J SDU* 2006; 13(1): 38-41.
- Prasanna PG, Stone HB, Wong RS, Capala J, Bernhard EJ, Vikram B, Coleman CN. Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? *Transl Cancer Res* 2012; 1(1): 35- 48.
- Salem AM, Mohammaden TF, Ali MA, Mohamed EA, Hassan HF. Ellagic and ferulic acids alleviate gamma radiation and aluminium chloride-induced oxidative damage. *Life Sci* 2016; 160: 2-11.

- Sagar SM. Should patients take or avoid antioxidant supplements during anticancer therapy? An evidence-based review. *Curr Oncol* 2005; 12(2): 44-54.
- Sharma R, Sharma J. Modification of gamma ray induced changes in the mouse hepatocytes by *Centella asiatica* extract: In vivo studies. *Phytother Res* 2005; 19(7): 605-11.
- Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis:premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis. *J Cell Mol Med* 2001; 5(3): 240-53.
- Taysi S, Koc M, Büyükokuroğlu ME, Altinkaynak K, Sahin YN. Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in the rat liver. *J Pineal Res* 2003; 34(3): 173-7.
- Verheij M, Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 133-42.
- Wang M-J, Ling W-W, Wang H, Meng L-W, Cai H, Peng B. Non-invasive evaluation of liver stiffness after splenectomy in rabbits with CCl4-induced liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2016; 22(46): 10166-79.
- Yay A, Goktepe O, Bahadir A, Ozdamar S, Oktem IS, Coruh A, Baran M. Assessment of markers expressed in human hair follicles according to different skin regions. *Adv Clin Exp Med* 2018; 27(7): 929-39.