

Gama radyasyonun indüklediği nefrotoksiteye karşılık pycnogenolün koruyucu etkisi*

Protective effect of pycnogenol against gamma radiation-induced nephrotoxicity*

Fazile Cantürk Tan¹, Arzu Hanım Yay², Güler Toprak³, Oğuz Galip Yıldız⁴

¹Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Kayseri

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

³Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri

⁴Oğuz Galip Yıldız, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Kayseri

Fazile Cantürk Tan orcid.org/ 0000-0002-0747-2209

Arzu Hanım Yay orcid.org/ 0000-0002-0541-8372

Güler Toprak orcid.org/ 0000-0001-7679-4853

Oğuz Galip Yıldız orcid.org/ 0000-0001-7033-2949

Öz

Amaç: Gama radyasyonun indüklediği nefrotoksiteye karşı pycnogenolün radyasyon koruyucu ve antioksidan etkisi tek hücre düzeyinde, doku düzeyinde ve biyokimyasal parametreler kullanarak Wistar Albino cinsi erişkin erkek sıçanda araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, kontrol grubu (n=10), antioksidan gruplar (P_{37.5}, P₇₅, P150, P₃₀₀, n= 10), sadece radyasyon grubu (γ-ışını, n=10) ve antioksidan + radyasyon gruplar (P_{37.5}+γ-ışını, P₇₅+γ-ışını, P₁₅₀+γ-ışını, P₃₀₀+γ-ışını, n= 10) olmak üzere 100 sıçanda yapıldı. Pycnogenol %5'lik DMSO'da çözdürüldü. Radyasyon Cobalt-60 teleterapi cihazıyla tek fraksiyon uygulandı. Kontrol ve radyasyon grubuna %5 DMSO, antioksidan ve antioksidan + radyasyon gruplar ışınlamadan önce 24, 48 ve 72. saatlerde pycnogenol verildi. Uygulamalardan yirmidört saat sonra, genel anesteziyle sıçanlar sakrifiye edilerek böbrekleri alındı. Böbrek dokusunda, DNA hasarı, histo-patolojik değerlendirme, CAT, SOD aktiviteleri ve MDA düzeyleri değerlendirildi.

Bulgular: Radyasyon grubunda MDA düzeyinde artma, SOD ve CAT aktivitelerinde azalma; buna karşılık antioksidan + radyasyon grubunda MDA düzeyinde azalma, SOD ve CAT aktivitelerinde artma tespit edildi. Kontrolde göre diğer gruplarda comet parametreleri artmış, bu parametreler antioksidan + radyasyon gruplarında radyasyon grubuna göre azalmıştı (p<0.001). Histopatolojik olarak, kontrol grubuna göre diğer gruplarda bozulmuş histo-patoloji, antioksidan + radyasyon gruplarda, radyasyon grubuna göre düzelmiş histo-patoloji gözlemlendi.

Sonuç: Antioksidan etkileri gösterilen pycnogenolün iyonize radyasyona bağlı böbrek hasarına karşı koruyucu olarak kullanılması, çalışmamızın verilerinden hareketle önerilebilir. Ancak, etki mekanizmasının ve moleküler temelini daha iyi anlaşılması, doz, toksisite ve tolerabilite konularının daha da açıklığı kavuşması için, preklinik ve klinik çalışmalara da gerek vardır.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, radyasyon, antioksidan, pycnogenol

Abstract

Objective: The radioprotective and antioxidant effect of pycnogenol against gamma radiation-induced nephrotoxicity was investigated at single cell level, tissue level and biochemical parameters in adult male Wistar Albino rats.

Material and Methods: The study was included control group (n=10), antioxidant groups (P_{37.5}, P₇₅, P150, P₃₀₀, n= 10), only radiation group (γ-ışını, n=10) and antioxidant + radiation groups (P_{37.5}+γ-ışını, P₇₅+γ-ışını, P₁₅₀+γ-ışını, P₃₀₀+γ-ışını, n= 10) on 100 rats. Pycnogenol was dissolved in 5 % DMSO. Radiation was applied single fraction with Cobalt-60 teletherapy device. Control and radiation groups were received 5% DMSO. Antioxidant and antioxidant + radiation groups were received pycnogenol at 24, 48 and 72 hours before the irradiation. Twenty-four hours after the administration, the rats were sacrificed with general anesthesia and their kidneys were removed. DNA damage, histopathological evaluation, CAT, SOD activities and MDA levels were evaluated in renal tissue.

Results: We were evaluated increased levels of MDA, decreased SOD and CAT activities in the radiation group; however, MDA level was decreased and increased SOD and CAT activities in the antioxidant + radiation group. Comet parameters were increased in the other groups compared to the control group and these parameters were decreased in the antioxidant + radiation groups compared to the radiation group (p <0.001). Histopathologically, impaired histopathology was observed in the other groups compared to the control group and improved histopathology was observed in the antioxidant + radiation groups compared to the radiation group.

Conclusion: Pycnogenol is which has been shown to have antioxidant effects, as a protective against kidney damage due to ionized radiation, may be suggested based on the data of our study. However, preclinical and clinical studies are also needed to better understand the mechanism of action and molecular basis and to clarify dose, toxicity and tolerability issues.

Key words: Kidney, radiation, antioxidant, pycnogenol

Giriş

İyonize radyasyonun etkisini azaltabilecek, toksik olmayan etkili bir radyasyon koruyucunun tanımlanması ve geliştirilmesinde sürekli bir ilgi bulunmaktadır. İyonize radyasyon birçok tümör çeşidinin tedavisinde etkili olup kanserli hastaların %50-60'ında tedavinin önemli bir parçasıdır (1). Radyoterapi amaç, sağlıklı dokuları olabildiğince korumak, tümöre maksimum dozu verirken normal dokuya da minimum zarar vermektir. Radyoterapi dozu artırılırken, tümör kontrolünde de bir artış elde etmek mümkündür. Ancak normal dokudaki komplikasyon riski de buna paralel artar. Bu nedenle tümör kontrolü normal dokunun radyoterapiye toleransına bağlıdır (2, 3). Radyoterapiyi sınırlayan en önemli faktörlerden biri normal çevre dokularda hasarların oluşmasıdır.

Böbrek, radyasyon kaynaklı morbidite geliştirme riskinin normal dokulardan radyoduyarlılığı en fazla olan organlardan biri olarak bilinir (4, 5). Abdominal ya da tüm vücut ışınlamadan sonra radyasyon nefropati oluşacağı tahmin edilir. Radyasyon tedavisinden sonra, büyük ölçüde toplam radyasyon dozuna bağlı böbrek fonksiyonunun geç ve sürekli ilerleyici bozulması bildirilmiştir (6). Böbrekler, gastrointestinal kanserler, jinekolojik kanserler, lenfomalar ve üst abdomen sarkomlar için radyoterapi ve tüm vücut ışınlama sırasında doz sınırlayıcı organlardır. Radyoterapi ilişkili böbrek hasar sıklığı, muhtemelen uzun gecikme nedeniyle rapor edilmemiştir, çünkü disfonksiyon olasılığı genellikle daha yaygın nedenlere bağlanır (7).

Kanser tedavisinde her geçen gün yeni gelişmelere paralel olarak hastaların sağ kalımı uzamaktadır. Bununla beraber yeni kemoterapötik ilaçların ve radyasyon tekniklerinin gelişmesine rağmen tedaviye bağlı komplikasyonlar hala yüksek orandadır. Radyoterapi alan hastalarda, tedavi alanında tümörle birlikte bir kısım sağlıklı dokular da ışımlandığından radyoterapinin çeşitli yan etkileri ortaya çıkmakta ve bu durum kanser hastasının yaşam kalitesinde bozulmaya sebep olabilmektedir (2, 3). Serbest oksijen radikallerini (SOR) inhibe eden veya temizleyici etki

gösteren antioksidanlar iyonize radyasyona bağlı normal dokulardaki hasarı azaltabilir (8). İyonize radyasyona bağlı oluşan oksidatif hasarı en aza indirmek için radyasyon koruyucuları (radyoprotektörler) üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda giderek yaygınlaşmıştır (9). Bunlardan birisi de pycnogenoldür.

Pycnogenol (French Maritime Pine Bark Extract), deniz çam ağacının kabuklarından elde edilen polifenol/biyoflavonoid yapısında bir komplekstir. Oligomerik proantosiyanidin kompleksleri (OPC) denilen doğal bileşikler içerir (10). Pycnogenolün başlıca bileşenleri polifenoldür. Özellikle kateşin, epikateşin, taksifolin, monomerik ve oligomerik birimleridir. %65-75 pycnogenol ekstresi, prosiyanidinlerin değişen zincir uzunluklarında kateşin ve epikateşinin alt birimlerinden oluşmaktadır (11). Karşılaştırmalı araştırmalar pycnogenolün lipid peroksidasyonunun önlenmesinde C, E, alfa-lipoik asit ve CoQ10 vitaminlerinden ve üzüm çekirdeği ekstresinden daha güçlü olduğunu göstermiştir (12). Laboratuvar testlerinin yanı sıra klinik çalışmalarda da pycnogenolün güçlü bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (12, 13). Pycnogenolün oksidatif stresten kaynaklanan glutatyon ve vitamin E'nin depleksiyonunu önlediği (14), insanlarda vasküler bütünlüğü, endotel fonksiyonu, antioksidan kapasiteyi artırdığı ve kayda değer bir anti-inflamatuar potense sahip olduğu bulunmuştur (15). Oligomerik prosiyanidinler, özellikle pycnogenolün başlıca biyoflavonoid bileşenleri, membranöz fosfolipidlerin polar baş gruplarına bağlanarak oksidasyonları önleyebileceği önerilmiştir (16). Pycnogenolün bileşenlerinin vitamin E'ye benzer bir hücre içi lokalizasyona sahip olabileceği düşünülmüş (17), programlanmış nöronal hücre ölümü ve glutamat ile indüklenen nörotoksiteyi önlediği gösterilmiştir (18, 19).

Çalışmada amacımız, pycnogenolün radyasyon koruyucu ve antioksidan etkisini 900 cGy tüm vücut gama ışınlaması uygulanan sıçanlarda iyonize radyasyona bağlı nefrotoksiteyi azaltıcı etkisi olup olmadığının araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

Kimyasallar

Pycnogenol, Horphag Research Ltd UK tarafından (Sertifika Numara: CA12-115) patentli olarak bağışlandı. Comassie Brilliant Blue G 250 Amresco'dan, BSA (bovine serum albümine) ve Bovine Liver Catalase Sigmadan, diğer kimyasallar Merck'ten sağlandı. Bütün kimyasalların hazırlanmasında ve biyokimyasal çalışmalarda ultrasaf su (Purelab ELGA, UK) kullanıldı. Tüm reaktif ve kimyasal maddeler analitik ya da daha yüksek saflıkta idi.

Hayvanlar

Çalışma; Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığınca alınan 11/127 etik kurul kararı esasına göre yürütüldü. Sıçanlar havalandırma şartları sağlanmış, güneş ışığı alan ve her birinde beş sıçanın bulunduğu özel kafeslerde, 12 saatlik sabit aydınlık-karanlık döngüsü altında tutularak içme suyu ve standart sıçan yemi adlibitum verildi. Suları her gün değiştirildi ve kafes temizliği gün aşırı yapıldı.

Radyasyon Uygulaması

Cobalt 60 teleterapi (GWXJ80-Co⁶⁰ TeletherapyUnit) cihazı tarafından üretilen γ -ışınıyla, özel tahtadan yapılan 2.5 cm derinlikte ve 28x24 boyutunda bir kutu içerisinde, anestezi yapmadan, beşer gruplar halinde, tek fraksiyon, tüm vücut dış ışınlaması şeklinde ışınladı. Radyasyon dozunun fizik hesabı 2.5 cm derinlikte ve 28x24' lik alanda ön ve arka karşılıklı iki alanda, total doz 900 cGy olarak hesaplandı (20). Sıçanların ışınlama sırasında rahat nefes almalarını ve sabit SSD (kaynak cilt mesafesi) sağlamak için kutunun alt ve üst kısmına delikli yoğunluğu bilinen bir tray yerleştirildi. Işınlama süresi hesaplanırken, tray faktörü dikkate alındı.

Deney Gruplarının Oluşturulması ve Antioksidan Uygulaması

Her bir grupta rastgele seçilmiş, sağlıklı 10 erkek Wistar Albino cinsi sıçan olacak şekilde on gruba bölündü (Tab-

lo 1). Pycnogenol %5' lik dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözdürüldü (10) ve gavajla sıçanlara üç gün uygulandı. Kontrol grubu antioksidan almadı ve ışınlanmadı ancak üç gün süreyle %5'lik DMSO gavajla verildi. γ -ışını grubu tek fraksiyon tüm vücut 900 cGy gama ışınıyla ışınladı. P_{37.5}, P₇₅, P₁₅₀, P₃₀₀ gruplar 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 37.5 mg/kg, 75 mg/kg, 150 mg/kg ve 300 mg/kg pycnogenol aldı. P_{37.5}+ γ -ışını, P₇₅ + γ -ışını, P₁₅₀ + γ -ışını ve P₃₀₀ + γ -ışını gruplar tek fraksiyon tüm vücut 900 cGy gama ışınıyla ışınlanmadan önce sırasıyla 37.5 mg /kg, 75 mg/ kg, 150 mg/kg ve 300 mg/ kg pycnogenolü 24, 48 ve 72. saatlerde aldı. Tüm ışınlamalar sabah 9:00-11:00 de yapıldı. Işınlamadan yirmidört saat sonra hayvanlar ketamine (0.1 mg/kg) ve xylazine (0.05 mg/kg) genel anestezi altında sakrifiye edilerek böbrekleri alındı. Böbreklerden biri histopatolojik değerlendirme için %10 formaldehitte fikse edildi. Diğer böbrek hızlı bir şekilde DNA hasarı ve antioksidan çalışmaları yapılmaya kadar -800C kaldırıldı. Böbrek dokusu, 4 hacim 5 mM fosfat tamponunda, pH 7.4 homojenize edildi. 10,000 x g 15 dakika santrifüj edildi, süpernatant protein tayininde ve antioksidan profilinin araştırılmasında kullanıldı (21).

Tablo 1. Deney grupları.

Gruplar	Pycnogenol (mg/kg)	Radyasyon (cGy)
Kontrol	—	—
P _{37.5}	37.5	—
P ₇₅	75	—
P ₁₅₀	150	—
P ₃₀₀	300	—
γ -ışını	—	900
P _{37.5} + γ -ışını	37.5	900
P ₇₅ + γ -ışını	75	900
P ₁₅₀ + γ -ışını	150	900
P ₃₀₀ + γ -ışını	300	900

Antioksidan Enzim Tayini

Katalaz (CAT) aktivitesi Aebi' ye (22), superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve ark. (23) göre ölçüldü.

Malondialdehyde (MDA) Tayini

Böbrek homejenatında MDA konsantrasyonu Ohkawa ve ark. göre tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) belirlendi (24).

Total Protein Tayini

Protein konsantrasyonu Bradford (25) göre bovine serum albumin (BSA) standardı kullanılarak belirlendi.

Comet Assay Kullanarak Dokuda DNA Hasar Tayini

Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ya da DNA comet assay, tek hücre düzeyinde DNA hasar tespitinde kullanılan, hızlı, basit ve çok hassas floresan mikroskopik yöntemdir. Dokuda DNA hasarı nötral şartlarda comet yöntemi kullanılarak araştırıldı. Hücre süspansiyonunun hazırlanması için, dokulardan yaklaşık 2 g gelecek şekilde parçalar alındı, temiz bir bisturi yardımıyla buz üzerinde parçalandı, parçalanmış dokulara 10 mL soğuk PBS (Ca²⁺ ve Mg²⁺+free) eklenerek yaklaşık 10 dakika 500 rpm manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojenat 10 dakika deney tüpünde bekletildi. Süpernatant analizler için kullanıldı (26). Kısaca, her bir mikroskop lamı distile suda hazırlanmış %0.5'lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne PBS'de hazırlanmış, 370C'da %0.8'lik düşük erime noktalı agarozun 1000 uL ile 100 uL hücre süspansiyonu karıştırıldı ve birinci katın üzerine yayıldı. Lamalar 40C'da buz aküsünün üzerinde 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lammeller lamlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lizis çözeltisinde (TBE, 25 g SDS) 7 dakika 40C'da lize edildi. Lamalar lizis çözeltisinden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (TBE: 54 g Tris, 27.5 g borik asit, 20 mL EDTA, pH 8.4) ile dolduruldu ve lamalar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 64 V-250 mA'de 2 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra lamalar iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için 5 dakika dH₂O ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 uL ethidium bromide (1 ug/mL) ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı (27, 28). Bir floresan mikroskopu (Olympus, BX51, Tokyo, Japonya) kullanılarak 200x büyütmede ölçümler yapıldı. Rasgele seçilen 100 hücrenin görüntüleri Comet Assay Software Project (CASP-1.2.2, Windows 2010) kullanılarak, kuyrukta % DNA (tail DNA) parametresi analiz edildi. Ha-

sar hücre kafasından göş etmiş "kuyruklu yıldız" desenine neden olan parçalanmış DNA tarafından tespit edilirken, kuyruklu yıldız olmayan tüm hücre kafalarının hasar görmemiş olduğu kabul edildi (29, 30).

Histo-Patolojik Değerlendirmeler

%10'luk formalin fiksasyonu sonrası rutin histolojik takip aşamalarından sonra hazırlanan ve parafin bloklara gömülen dokulardan 5µm'lik kesitler dökülmemesi için poli-Llizinle kaplı lamlara alındı. Elde edilen ve deney gruplarına ait olan böbrek dokularına hematoksilin-eozin ve massontrikrom boyama metodlarıyla birlikte, böbrek dokularında bazal membran yapılarının ve tübüllerin daha net görülebilmesi için ek olarak periyodik asit schiff (PAS) boyama metodları uygulandı. Histolojik değerlendirme için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) kullanıldı.

İstatistiksel Yöntem

Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Inc., ILL, USA) ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile, varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testleri ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar Tamhan T2, Siegel-Castellan ve Student-Newman-Keuls testleri ile değerlendirildi. Veriler ortalama ile standart sapma veya ortanca ile 25. ve 75. yüzdeler olarak ifade edildi. p<0.05 anlamlılık düzeyi kabul edildi.

Bulgular

Böbrek Dokusunda Biyokimyasal Analizler

Böbreğin oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak CAT ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. Bulgular Tablo 2'de verildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. γ-ışını grubunda diğer gruplara göre artmış MDA, azalmış SOD ve CAT aktivitesi gözlemlendi. Artan antioksidan dozuyla birlikte CAT ve SOD aktiviteleri düştü, MDA düzeyi arttı. Antioksidan + radyasyon gruplarında CAT ve SOD aktiviteleri arttı.

Tablo 2. Böbrek dokusu gruplarında doku enzim düzeyleri.

Gruplar	MDA	CAT	SOD
	nmol/mg protein Ortanca (%25-%75)	Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)	Ü/mg protein Ortanca (%25-%75)
Kontrol	0.21 (0.02-0.4)	72.63 (62-86)	0.22 (0.20-0.35)
P _{37.5}	0.28 (0.16-0.7)	34.4 (23-52)	0.13 (0.10-0.14)
P ₇₅	0.31 (0.18-0.43)	46.32 (37-57)	0.19 (0.16-0.20)
P ₁₅₀	0.63 (0.4-0.7)	49 (42-77)	0.26 (0.19-0.30)
P ₃₀₀	0.33 (0.27-0.43)	32.6 (29-40)	0.27 (0.17-0.33)
y-ışını	1.27 (0.95-1.38)	39.5 (38.9-45)	0.20 (0.20-0.26)
P _{37.5} +y-ışını	0.26 (0.17-0.38)	38.3 (25.9-44.2)	0.17 (0.17-0.20)
P ₇₅ +y-ışını	0.20 (0.13-0.33)	58.5 (45.8-68.9)	0.23 (0.16-0.27)
P ₁₅₀ +y-ışını	0.33 (0.11-0.5)	40.39 (32.8-43.8)	0.20 (0.15-0.22)
P ₃₀₀ +y-ışını	0.6 (0.35-0.78)	58.1 (42.8-72)	0.14 (0.13-0.20)
p	<0.008	<0.001	<0.010

(MDA: Malondialdehit, CAT: Katalaz, SOD: Süperoksit dismutaz, %25-%75: persentil)

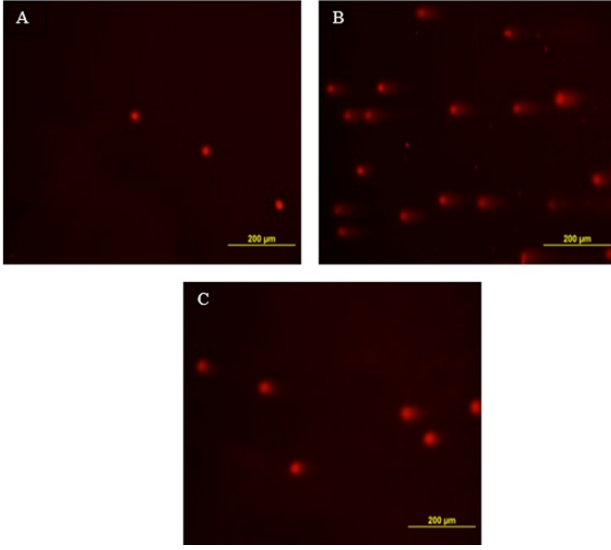
Tablo 3. Böbrek dokusu gruplar arası DNA hasar ölçüleri.

Gruplar	Değişkenler						
	L Head ±SD	L Tail ±SD	L Comet ±SD	HeadDNA ±SD	TailDNA ±SD	TM ±SD	OTM ±SD
Kontrol	123.6±23	12.5±13	136.4±32	98.4±4	1.5±1	0.3±1	0.7±1
P _{37.5}	142.3±29	50.8±41	193±58	91.5±8	8.4±8	7.1±10	6.5 ± 8
P ₇₅	117.9±29	52.2±38	169±60	90.4±7	9.5±7	7.1±10	6±7
P ₁₅₀	160.8±35	90.8±27	251.6±54	83.8±5	16±5	15±8	13.7±6
P ₃₀₀	146±21	112.3±94	258.5±42	79.2±5	20.7±5	24.4±12	17±6
y-ışını	157.6±46	205.9±93	363±125	63.8±11	36.2±10	81±52	46±24
P _{37.5} +y-ışını	148.5±27	115±43	263.6±58	78.6±8	21.2±8	26.6±20	19.2±10
P ₇₅ +y-ışını	157.4±25	111.2±45	268.6±56	80.8±6	19±6	23.4±15	17.9±9
P ₁₅₀ +y-ışını	166±23	96.9±35	263±45	82.9±5	16.9±5	17.7±11	16±8
P ₃₀₀ +y-ışını	141.3±26	68.6±29	209.9±46	85.9±5	14±5	10±6	10.5±5
p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

(L Head: Baş uzunluğu, L Tail: Kuyruk uzunluğu, L Comet: Comet uzunluğu, Head DNA: Başta %DNA, Tail DNA: Kuyruksa %DNA, TM: Kuyruk momenti, OTM: Olive tail moment, SD: Standart sapma)

Böbrek Dokusunda DNA Hasar Tayini

Böbrek dokusu gruplar arası hücresel DNA hasar değerleri Tablo 3'de verildi. Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması böbrek dokularında hücresel DNA hasarıyla sonuçlandı ve kontrol grubuna göre diğer grupların comet parametrelerinde artma gözlemlendi (Şekil 1). $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

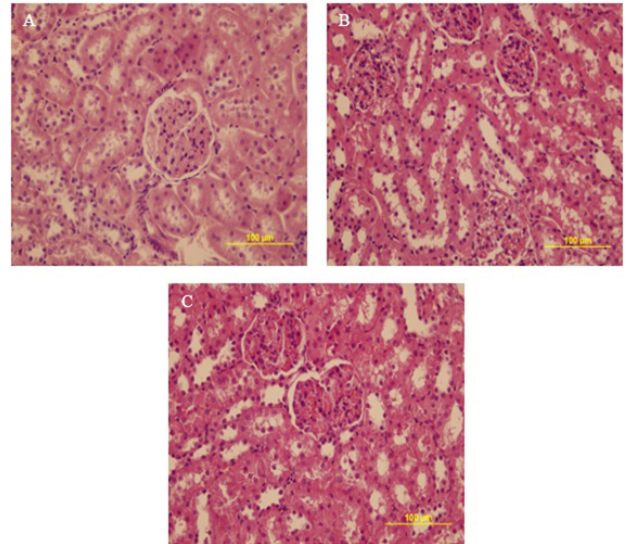


Şekil 1. Böbrek doku hücreleri comet değerleri A) Kontrol grubu tail DNA %1.5 B) γ -ışını grubu tail DNA %36.2, C) $P_{300} + \gamma$ -ışını grubu tail DNA %14 (Ethidium bromide boyama x200, Olympus, Japan)

Böbrek Dokusunda Histo-patolojik Değerlendirme

Kontrol grubuna ait böbrek dokuları parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpuskülleri), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapillerler ve medullar ışınlar düzgün yerleşimliydi. Radyasyon uygulanmayan bu grupta, glomerüller ve tübüller normal histolojik özellik gösterdiler. Sadece radyasyon uygulaması yapılan grubun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejeneratif değişiklikler gösterdiği gözlemlendi. Bu gruba ait böbrek dokularının histo-patolojik incelenmesinde, hem interstiyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül hücrelerinde

de belirgin hasar mevcuttu. Böbreğin histo-patolojik incelenmesinde tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Tübüllerde ve interstiyel dokuda erken değişiklikler dikkati çekti. Hücresel hasara neden olduğu gözlemlendi. Farklı dozlarda pycnogenol uygulanan gruplarda ($P_{37.5}$, P_{75} , P_{150} , P_{300}) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül hücrelerinde belirgin hasar mevcuttu. Böbreğin histo-patolojik incelenmesinde radyasyon grubuna benzer, tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu gözlemlendi, bu hasar verilen antioksidan miktarıyla artmaktaydı. Farklı dozlarda pycnogenol ve radyasyon ($P_{37.5} + \gamma$ -ışını, $P_{75} + \gamma$ -ışını, $P_{150} + \gamma$ -ışını ve $P_{300} + \gamma$ -ışını) uygulanan gruplardan 37,5mg/kg ve 75mg/kg pycnogenolün radyasyon üzerine herhangi bir koruyucu etkisi görülmedi. Radyasyon öncesi 150 mg/kg pycnogenol uygulanan deney grubuna ($P_{150} + \gamma$ -ışını) ait böbrek dokusunda, pycnogenolün radyasyonun zararlı etkilerine karşı olumlu bir etkiye sahip olduğu görülürken, en iyi koruyucu etkinin radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen grupta ($P_{300} + \gamma$ -ışını) olduğu gözlemlendi. Radyasyonun böbrek dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen deney grubunda azaldığı ve böbrek parankimasının normal böbrek dokusu görünümüne yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Böbrek doku kesiti A) Kontrol grubunda renal korpuskülleri, proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapillerler ve medullar ışınlar düzgün yerleşim-

li, B) γ -ışını grubu anlamlı dejereneratif değişiklikler var, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi, C) $P_{300} + \gamma$ -ışını grubu, böbrek parankimasının normal böbrek dokusu görünümüne yakın olduğu gözlemlendi. (H&E boyama x400 (Olympus, BX51, Japan).

Tartışma ve Sonuç

Terapötik abdominal ışınlama, glomerüler mesanjiyal skleroz ve tübüler dejerensasyon ile ilişkili ilerleyici böbrek hastalığının oluşumuna eşlik edebilir (31). Mevcut bulgulara göre, ışınlamadan sonra birkaç hafta içinde sıçan böbreğinde belirgin histolojik değişiklikler ortaya çıkar. Lezyonlar çoğunlukla glomerüler ve tübüler hücrelerde görülür. Işınlamadan 4 hafta sonra, minimal glomerüler değişiklikler gözlenir. 10. haftada, glomerular lezyonlar endotel hücre hasarı, mesanjiyal hücrelerin proliferasyon ve hipertrofi, epitel hücre şişme ve bazal membran kalınlaşması oluşur. Bu glomerüler değişim, domuzda 1989-1991 yıllarında Robbins ve arkadaşları ve farede 1990 yılında Down arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Benzer glomerüler değişim tüm vücut ışınlamayı takiben klinikte söz edilmiştir (32). Mesanjiyal hücrelerin sayısının arttığı ve artmış mesanjiyal matris miktarı rapor edilmiştir. Jaenke ve arkadaşları (33) ve Robbins (34), endotel hücrelerin hasarı renal radyasyon hasarında önemli birincil etkinlik gösterdiğini önermişlerdir. Önceki literatürlerde, birkaç ilaç radyasyonun indüklediği hasarı normal dokudan azaltmak ya da önlemek için kullanılmıştır, bunlar sülfidril radikali (35) içeren pentokifyline (36) ve glukokortikosteroid (37) bileşiklerdir. Bu ilaçların deneysel çalışmaları umut vericidir, ancak klinik kullanımda, bu ilaçlar toksik etkiler göstermiştir.

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA, radyasyona bağlı oksidatif hasarın göstergesidir. Bu çalışmada da radyasyona bağlı böbrek hasarını göstermek için doku MDA düzeyleri ölçüldü. Radyasyon grubunda kontrol grubu, antioksidan gruplar ve antioksidan + radyasyon gruplara göre MDA düzeyinde artma saptandı. MDA düzeylerinde artış radyasyonun böbrekte oksidatif hasara yol açtığını göstermektedir. Kontrol grubuna göre antioksidan ve antioksidan + radyasyon gruplarda MDA artmıştır. Radyasyon grubuna göre antioksidan + radyasyon gruplarda MDA düzeyinin azalması radyasyonun oksidatif hasa-

rına karşı pycnogenolün membran lipidini koruduğunu göstermektedir. Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre CAT aktivitesinde azalma saptandı. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yetersiz olduğunu göstermektedir. γ -ışını + P_{300} gruplarda radyasyon grubuna göre artma saptanması pycnogenolün SOR üretimine karşı yeterli olduğunu göstermektedir. Çalışmada radyasyon grubunda kontrol grubuna göre SOD aktivitesinde azalma saptandı. Bu durum, aşırı SOR üretimine karşı antioksidan sistemin yetersiz olduğunu göstermektedir. γ -ışını + P_{300} grubunda radyasyon grubuna göre azalma saptanması pycnogenolün SOR üretimine karşı yetersiz olduğunu göstermektedir.

Mansour tarafından yapılan çalışmada, tek doz 6 Gy verilen sıçan böbreklerinde MDA ve NO seviyesinin arttığını, SOD ve GSH-Px aktivitelerinin azaldığını gözlediler. Işınlamadan önce 7 gün ginseng verilmiş grupta SOD ve GSH-Px aktivitelerinin kayda değer arttığını ve MDA ve NO seviyesinin kayda değer azaldığını gözledi (38). Çalışmamıza benzer olarak, Ekici ve ark.'nın tek doz 800 cGy abdominopelvik bölgenin ışınlanmasından sonra sıçan böbrek ve testis dokularında kontrole göre radyasyon grubunda MDA düzeyinin arttığını, SOD, CAT, GPX ve GSH aktivitelerinin azaldığını, aminoguanidin uygulanan grupta MDA seviyelerinin azaldığını, SOD, CAT, GPX ve GSH aktivitelerinin arttığını gözlediler (39).

Böbrek dokusunda, radyasyon grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde azalma, MDA seviyesinde artma; buna karşılık antioksidan + radyasyon grubunda CAT ve SOD aktivitelerinde artma ve MDA seviyesinde azalma tespit edilmesi, pycnogenolün koruyucu etkisinin antioksidan aktivitesine bağlı olduğunu gösterebilir. Bu veriler daha önce oksidan ajanlarla yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, iyonize radyasyona bağlı gelişen böbrek hasarının SOR'ne bağlı olarak geliştiğini ve pycnogenolün etkisinin antioksidan yolla olabileceğini desteklemektedir.

Tek hücre jel elektroforez (comet assay) hücresel DNA'da iplik kırıkları, alkali bölgeleri ve çapraz bağları belirlemek için yaygın olarak kullanılır (40). Colins ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 0-8 Gy radyasyonun indüklediği DNA hasarıyla ilişkili olarak, kuyrukta yüzde DNA'nın lineer arttığını göstermişlerdir (41). Bu çalışmada da böbrek doku DNA'sında, radyasyona bağlı oluşan tek ve çift iplik kırılmalarını belirlemek için nötral comet tekniği kullanıldı.

Sıçanların tüm vücut gama radyasyonuna maruz kalması böbrek dokularında hücrel DNA hasarıyla sonuçlandı ve comet parametrelerinde (L head, L tail, L comet, Tail DNA, TM ve OTM) artma gözlemlendi. Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve antioksidan + radyasyon gruplarına göre L head, L tail ve L comet değerlerinde artma saptandı. L head, L tail ve L comet değerlerinde artış radyasyonun böbrekte hücrel hasara yol açtığını göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve antioksidan + radyasyon gruplarına göre L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma saptandı. Antioksidan gruplarda L head, L tail ve L comet değerlerinde artma saptandı. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Antioksidan + radyasyon gruplarında L head, L tail ve L comet değerlerinde azalma saptandı, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Antioksidan + radyasyon grubunun kontrol grubundan yüksek ve radyasyon grubundan daha düşük olması iyonize radyasyonun hücrel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. L head, L tail ve L comet değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptandı. Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve antioksidan + radyasyon gruplarına göre head DNA değerlerinde azalma saptandı. Bu azalma bize radyasyonun böbrekte hücrel hasara yol açtığını ve baştaki DNA miktarının kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu ve antioksidan + radyasyon gruplarına göre head DNA değerlerinde artma saptandı. Antioksidan gruplarda head DNA değerlerinde azalma saptandı. Bu azalma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Antioksidan + radyasyon gruplarında head DNA değerlerinde artma saptandı, bu artmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Antioksidan radyasyon gruplarının kontrol grubundan düşük ve radyasyon grubundan daha yüksek olması radyasyonun hücrel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. Head DNA değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptandı. Radyasyon grubunda, kontrol grubu, antioksidan gruplar ve antioksidan + radyasyon gruplarına göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma saptandı. Tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artış radyasyonun böbrekte hücrel hasara yol açtığını ve DNA'nın kuyruğa göç ettiğini göstermektedir. Kontrol grubunda, antioksidan gruplar, radyasyon grubu

ve antioksidan + radyasyon gruplarına göre tail DNA, TM ve OTM değerlerinde azalma saptandı. Antioksidan gruplarda tail DNA, TM ve OTM değerlerinde artma saptandı. Bu artma bize antioksidanın toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Antioksidan + radyasyon gruplarında tail DNA, TM ve OTM değerlerinde azalma saptandı, bu azalmış değerler antioksidanın radyo koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Antioksidan radyasyon grubunun kontrol grubundan yüksek ve radyasyon grubundan daha düşük olması radyasyonun hücrel hasarına karşı pycnogenolün hücreyi koruduğunu göstermektedir. Tail DNA, TM ve OTM değerleri tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptandı.

Ueno ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, comet yöntemini kullanarak tüm vücut X-ışını uygulamasından sonra sıçan karaciğer, böbrek, akciğer, dalak, beyin, timus ve kolon hücrelerinde, DNA hasar parametrelerinden kuyruk uzunluğunun ve kuyrukta yüzde DNA kullanarak ışınlanmış sıçanların dokularında kayda değer DNA hasarı bulunmuşlardır (42). Çalışmamızdaki comet sonuçlarına dayanarak pycnogenolün iyonize radyasyon hasarına karşı böbrek hücrelerini koruduğunu ancak sağlıklı hücre gruplarında da toksik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Benzer sonuçlar, Rohdewald, Trevithick ve ark. ve Masquelier'in yaptığı çalışmalarda da gözlenmiştir (11, 43, 44).

Yapılan çalışmada, sıçanlardan alınan böbrek dokularına hematoksilin-eozin, Masson trikrom ve periodik asit Schiff boyama metodları uygulandı. Histo-patolojik değerlendirmeler sonucunda, kontrol gruplarına ait dokular kendi normal histolojik doku özelliklerini gösterirken, radyasyon uygulanan dokularda başta vasküler ve interstisyel hemoraji alanları olmak üzere çeşitli hücrel hasarlar gözlemlendi. Kontrol grubuna ait böbrek dokuları parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpuskülleri), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapillerler ve medullar ışınlar düzgün yerleşimliydi ve glomerüller ve tübüller normal histolojik özellik gösterdiler. Radyasyon grubunun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejereneratif değişiklikler gösterdiği gözlemlendi, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi. Böbreğin histo-patolojik incelenmesinde tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Tübüllerde ve interstisyel dokuda erken değişiklikler dik-

kat çekti. Böbrek dokusunda radyasyonun hücrel hasara neden olduğu gözlemlendi. Antioksidan gruplarda, tübül hücrelerinde belirgin hasar mevcuttu. Böbreğin histo-patolojik incelenmesinde radyasyon grubuna benzer, tübüllerde ve glomerüllerde belirgin değişikliklerin olduğu gözlemlendi, bu hasar verilen antioksidan miktarıyla artmaktaydı. Bu sonuç bize, antioksidanın böbrek dokusunda toksik etkisinin olduğunu göstermektedir.

Antioksidan + radyasyon gruplardan 37,5 mg/kg ve 75 mg/kg pycnogenolün radyasyon üzerine herhangi bir koruyucu etkisi görülmedi. γ -ışını + P₁₅₀ ait böbrek dokusunda, pycnogenolün radyasyonun zararlı etkilerine karşı olumlu bir etkiye sahip olduğu görülürken, en iyi γ -ışını + P₃₀₀ grubunda olduğu gözlemlendi. Radyasyonun böbrek dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen deney grubunda azaldığı ve böbrek parankimasının normal böbrek dokusu görünümüne yakın olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, radyasyonun böbrek dokusu üzerine oluşturduğu olumsuz histo-patolojik etkinin, radyasyon öncesi 300 mg/kg pycnogenol verilen grupta azaldığı, böbrek parankimasının normal böbrek dokusu görünümüne yakın olduğu gözlemlendi ve 300 mg/kg pycnogenol enzim, hücre ve doku düzeyinde böbrek dokusunu iyonize radyasyon hasarına karşı en iyi koruduğu görüldü.

Bizim çalışmamızda da pycnogenolün antioksidan ve radyo koruyucu özelliği olup olmadığı enzim, hücre ve doku düzeyinde araştırıldı. Kontrolde göre antioksidan gruplarda da MDA düzeyinin artması, CAT ve SOD aktivitelerinin azalması, comet parametrelerinin artması, doku histopatolojilerinin bozulması, antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını ve pycnogenolün potansiyel toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu veriler daha önce oksidan ajanlarla yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, iyonize radyasyona bağlı gelişen böbrek hasarının SOR'a bağlı olarak radyasyonun indirekt etkisinden gelişebileceği gibi iyonize radyasyonun direkt etkisinden kaynaklı olabileceğini de göstermektedir. Ancak antioksidan + radyasyon gruplarda azalan MDA düzeyi, artan CAT ve SOD aktiviteleri, comet parametrelerinin azalması, doku histopatolojisinin düzelmesi radyasyon hasarına karşı böbrek dokusunu kayda değer koruduğunu göstermektedir.

Verstraeten ve ark. yaptığı çalışmada pycnogenolün başlıca biyoflavonoid bileşenlerinin membranöz fosfoli-

pidlerin polar baş gruplarına bağlanarak oksidasyonları önlediği gösterilmiştir. Çalışmamızda, antioksidan + radyasyon gruplarda azalan MDA düzeyi, artan CAT ve SOD aktiviteleri bu çalışmayı desteklemektedir (16). Çalışmamıza benzer olarak, Ramus ve ark.'nın yaptığı çalışmada sıçanlarda abdominal bölgenin x-ışınıyla ışınlanmasından sonra yapılan histo-patolojik çalışmada 300 mg/kg pycnogenolün intestinal mukozayı iyonize radyasyondan önemli ölçüde koruduğu sonucuna varılmış, bu çalışma bizim çalışmamızı desteklemektedir (45).

Sonuç olarak, SOR'u inhibe eden ve/veya temizleyici antioksidan ilaçlar iyonize radyasyona maruz kalan dokulardaki hasarı azaltarak kanserli hastalarda yararlı olabilirler. Ancak, çalışmamızda kullandığımız antioksidanın moleküler temeli hakkında yeterli bilgi olmamasından dolayı gerek prelinik ve gerekse klinik daha fazla çalışma yapılması ve özellikle etki mekanizması, toksisite ve yan etki profilinin daha net ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. Lippincott Williams&Wilkins, 438.
2. Perez CA, Brady LW. Principles and practice of radiation oncology (4nd ed). Lippincott Company, Philadelphia, 2004.
3. Cox JD, Ang KK. Radiation Oncology Rational, Technique, Results (8th ed). Mosby, 2003.
4. Bergstein J, Andreoli SP, Provisor AJ, et al. Radiation nephritis following total body irradiation and cyclophosphamide in preparation for bone marrow transplantation. Transplantation 1986; 4: 63-6.
5. Stewart FA. Radiation nephropathy after abdominal irradiation or total body irradiation. Radial Res 1995; 143: 235-7.
6. Willett CG, Tepper JE, Orlow EL, et al. Renal complications secondary to radiation treatment of upper abdominal malignances. Int. J Radiat Oncol Biol Phys 1986; 12: 1601-4.
7. Dawson LA, Kavanagh BD, Paulino AC, et al. Radiation-associated kidney injury. Int J Radiation Oncology Biol Phys 2010; 76: 108-15.
8. Şener G, Jahovic N, Tosun O, et al. Melatonin ameliorates ionizing radiation induced oxidative organ damage in rats. Life Sciences 2003; 74: 563-72.
9. Özalpan A. Temel radyobioloji (1. Basım). Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001.
10. Sime S, Reeve EV. Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in

- mice by topical pycnogenol. *Photochemistry and Photobiology* 2004; 79: 193–8.
11. Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; 40: 158–68.
 12. Chida M, Suzuki K, Nakanishi-Ueda T, et al. 1999. In vitro testing of antioxidants and biochemical end-point in bovine retinal tissue. *Ophthalmic Res* 1999; 31: 407–15.
 13. Devaraj S, Vega-López S, Kaul N, et al. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* 2002; 37: 931–4.
 14. Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 704–24.
 15. Grimm T, Chovanová Z, Muchová J, et al. Inhibition of NF- κ B activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol®). *J Inflamm* 2006; 3: 1–15.
 16. Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, et al. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 84–92.
 17. Kendra I, Marsiglio S, Shaw G, et al. Pycnogenol® and vitamin E inhibit ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Inc J Neurobiol* 2004; 59: 261–71.
 18. Kobayashi MS, Han D, Packer L. Antioxidants and herbal extracts protect HT-4 neuronal cells against glutamate-induced cytotoxicity. *Free Radical Research* 2000; 32: 115–24.
 19. Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BH. Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis. *Mol Brain Res* 2002; 104: 55–65.
 20. Neal R, Matthew H R, Lutz P, et al. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 34: 689–95.
 21. Engin K, Özyardımcı N. *Akciger Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar (1. Basım)*. Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Sti., İstanbul, 2001.
 22. Aebi H. *Methods of Enzymatic Analysis*. In: Bergmeyer HV, editor. Catalase estimation. New York: Verlag Chemic 1974; 673–84.
 23. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988; 34: 497–500.
 24. Ohkawa W, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979; 95: 351–8.
 25. Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248–54.
 26. Cerda H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA comet assay. *LWT Food and Science Technology* 1998; 31: 89–92.
 27. Türk Standardı. Gıda maddeleri-ışınlanmış gıda maddelerinin belirlenmesi için DNA comet deneyi eleme yöntemi. TS EN 13784 Aralık 2004.
 28. Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol* 1998; 444: 789–91.
 29. Singh NP, Stephens RE. X-ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis* 1998; 13: 75–9.
 30. Sariozkan S, Canturk F, Yay A, et al. The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored new zealand rabbit spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18: 475–80.
 31. Krochak RJ, Baker DG. Radiation nephritis. Clinical manifestation and pathophysiologic mechanism. *Urology* 1986; 27: 389–39.
 32. Bergstein J, Andreoli SP, Provisor AJ, et al. Radiation nephritis following total body irradiation and cyclophosphamide in preparation for bone marrow transplantation. *Transplantation* 1986; 4: 63–6.
 33. Jaenke RS, Robbins MEC, Bywaters T, et al. Capillary endothelium target site of renal radiation injury. *Lab Invest* 1993; 68: 396–405.
 34. Robbins MEC, Jaenke RS, Bywaters T, et al. Sequential evaluation of radiation induced glomerular ultrastructural changes in the pig kidney. *Radiat Res* 1993; 135: 351–64.
 35. Ward WF, Molteni A, Ts'ao CD, et al. Functional responses of the pulmonary endothelium to thoracic irradiation in rats: differential modification by D- penicillamine. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 1987; 13: 1505–9.
 36. Dion MW, Hassey DH, Osborne JW. The effect of pentoxifylin on early and late radiation injury following fractionated irradiation in C34 mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17: 101–7.
 37. Geraci JP, Mariano NS, Jackson KL. Amelioration of radiation nephropathy in rats by dexamethasone treatment after irradiation. *Radiat Res* 1993; 134: 86–93.
 38. Mansour HH. Protective effect of ginseng against gamma-irradiation-induced oxidative stress and endothelial dysfunction in rats. *EXCLI Journal* 2013; 12: 766–77.
 39. Ekici K, Temelli O, Parlakpınar H, et al. Beneficial effects of aminoguanidine on radiotherapy-induced kidney and testis injury. *Andrologia* 2016; 48: 683–92.
 40. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, et al. Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body x-irradiation using the comet assay. *Mutation Research* 2007; 634: 135–45.
 41. Collins AR, Dusinsk'a M, Gedik CM, et al. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 1996; 104: 465–9.

42. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, et al. Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mutation Research* 2007; 634: 135–45.
43. Trevithick JR, Bantseev V, Hirst M, et al. Is pycnogenol a double-edged sword? Cataractogenic in vitro, but reduces cataract risk in diabetic rats. *Curr Eye Res* 2013; 38: 751–60.
44. Masquelier J. Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenging effect and use there of. (US Patent 4, 698, 360), 1987.
45. Ramos FMM, Schönlaue F, Novaes PD, et al. Pycnogenol® protects against ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to x-rays. *Phytother Res* 2006; 20: 676– 9.