T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Zafer KOÇAK

RADYASYONA BAĞLI AKUT PULMONER TOKSİSİTEDE DİMETİL SÜLFOKSİT'İN KORUYUCU ETKİSİNİN ^{99m}Tc-DİETİLENTRİAMİNPENTAASETİK ASİT TRANSALVEOLER KLİRENS SİNTİGRAFİSİ VE HİSTOPATOLOJİ İLE ARAŞTIRILMASI

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Bengü DENİZLİ

EDİRNE–2009

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve görgümü arttırmamda büyük katkısı ve emeği geçen, değerli hocam ve tez yöneticim Radyasyon Onkolojisi AD Başkanı Doç. Dr. Zafer KOÇAK'a, anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Cem UZAL'a, Yrd. Doç.Dr. Murat Çaloğlu'na, Yrd. Doç.Dr. Vuslat Yürüt-Çaloğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Mert Saynak'a Yrd. Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAS'a, Radyofizik Uzm. Şule PARLAR'a, Nükleer Tıp AD'den Doç. Dr. Gülay DURMUŞ-ALTUN'a, Uzm. Dr. Can ÜNAL'a,. Histoloji-Embriyoloji AD'den Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, Biyolog Cevat AKTAŞ'a, Tıbbi İstatistik AD'den Doç. Dr. Necdet SÜT'e,Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan Veteriner Dr. Ziya ÇUKUR ve Veteriner Dr. Çağatay OLTULU'ya, ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, sonsuz teşekkürlerimle…

İÇİNDEKİLER

Sayfa

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

AKCİĞERİN ANATOMİSİ **3**

AKCİĞERİN SOLUNUM FONKSİYONU **8**

RADYASYONUN AKCİĞER ÜZERİNE ETKİSİ **8**

AKCİĞER EPİTEL GEÇİRGENLİĞİNİ İNCELEMEDE KULLANILAN YÖNTEMLER **14**

DİMETİL SÜLFOKSİT **17**

DİMETİL SÜLFOKSİT VE RADYOPROTEKSİYON **21**

RADYOPROTEKSİYON VE APOPTOZ **23**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **25**

BULGULAR **31**

TARTIŞMA **36**

SONUÇLAR **40**

ÖZET **42**

SUMMARY **44**

KAYNAKLAR **46**

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

AE **:** Alveoler Eksuda

AKa **:**Alveol Kanalları

AKe **:**Alveoler Keseler

AÖ **:** Alveoler Ödem

ARDS **:** Erişkin Respiratuvar Distres Sendromu

ASİ **:** Alveoler Septal İnfiltrasyon

AT **:** Ataksik Telenjiyektazi

BR **:**Bronş

BL **:**Bronşiyol

cGy **:** Santigray

cpm **:** Dakika Başına Gerçekleşen Sayım (Counts per minute)

d **:** Yarı Kalınlık

DAB **:** 3,3'-diaminobenzidine

DMS **:** Dimetil sülfit

DMSO **:** Dimetil sülfoksit

$DMSO_2$ **:** Dimetil sülfon

DNA **:** Deoksiribonükleik asit

dUTP **:** Deoksiüridil trifosfat

ERT **:** Eksternal Radyoterapi

FDA **:** Food and Drug Administration

Gy **:** Gray

ICRT **:** Intrakaviter Radyoterapi (Intracavitary Radiotherapy)

IL-1 **:** İnterlökin-1

IL-6 **:** İnterlökin-6

İF **:** İntersitisyel Fibrozis

ip **:** İntraperitoneal

iv **:** İntravenöz

K **:** Eğrinin eğimi

KL-6 **:** Akciğer Epitel Spesifik Proteini-6 (Krebs von den Lungen-6)

KT **:** Kemoterapi

MBq **:** Mega Becquerel

mCi **:** Miliküri

mmHg **:** Milimetre civa

N **:** t anındaki aktivite

N_0 **:** Başlangıçtaki akciğerlerdeki aktivite

NF-κB **:** Nükleer Faktör Kappa B

PİHİ **:** Peribronşiyal İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu

RT **:** Radyoterapi

SB : Solunumsal Bronşiyoller

SH **:** Standart Hata

$t_{½}$ **:** DTPA pulmoner yarılanma zamanı

TB : Terminal Bronşiyol

TBS **:** Tris Buffer Solüsyonu

^{99m} Tc-DTPA **:** $^{99\ m}$Teknesyum dietilentriaminpentaastik asit

TGF-ß **:** Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta (Transforming Growth Factor-Beta)

TNF-α **:** Tümör Nekroze Edici Faktör Alfa (Tumor Necrisng Factor-Alpha)

TUNEL **:** Terminal dUTP yapışkan uç işaretleme yöntemi (Terminal dUTP nick end labeling method)

GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer yapısında yaklaşık kırktan fazla hücrenin yer aldığı, yarısından fazlasının rölatif olarak radyorezistan olduğu kompleks bir organdır. Rejenerasyon kapasitesinin azlığı nedeniyle akciğer yüksek dozlarda ışını tolere edemez. Bu nedenle akciğerin radyosensitivitesi torakal yerleşimli tümörlerin radyoterapi ile tedavisinde doz kısıtlayıcı öğedir. Akciğerde ışınlamaya bağlı oluşan hasar; verilen radyasyonun dozu, ışınlanan akciğer volümü, fraksiyonasyon şeması, eşzamanlı kemoterapi uygulanması gibi tedaviye bağlı faktörler (1), önceden var olan akciğer hastalığı, kötü pulmoner fonksiyonlar, sigara kullanımı gibi hastaya bağlı faktörler (2), deoksiribonükleik asit (DNA) tamir mekanizmalarında bozukluk, büyüme faktörü genlerinde bozukluk, bilinmeyen genetik yatkınlık (3) gibi biyolojik faktörlere bağlıdır.

"Radyasyon pnömopatisi" terimi akciğere uygulanan radyoterapi sonrası tetiklenen ve birbirinden ayrı olmakla beraber, birbirine sıkıca bağlı iki kavramı kapar. Akut pnömoni fazı ışınlamadan sonraki 12 haftada görülür. Histolojik olarak alveoler hücre deplesyonu ve intersitisyel aralıkta inflamatuvar hücre birikimini içeren erken iltihabi reaksiyondur. Bulguların sayısı ve şiddeti, büyük akciğer volümlerinin ışınlanmasıyla özellikle, yüksek dozlar (>50 Gy) kullanıldığında veya ışınlama kemoterapi ile kombine edildiğinde artar. Başlangıçta subfebil ateş, hafif öksürük veya hafif dispne vardır. Kortikosteroid ve antibiyotik tedavisine cevap verir. Diğeri, fibroblast proliferasyonu, kollajen birikimi ve normal akciğer yapısının destrüksiyonu ile karakterize geç radyasyon fibrozisi fazıdır (4). Akciğerin fibrozise uğrayan parankim miktarına bağlı olarak bulgular değişik derecelerde egzersiz dispnesinden, geç evrelerde ortopne, siyanoz, solunum yetmezliği ve kor pulmonaleye kadar uzanır.

Kanserin radyasyon ile tedavisinde terapötik kazancı arttırmanın bir yolu, antitümöral etkinliği değiştirmeksizin normal dokuları radyasyon hasarından koruyan hücre koruyucu ajanların kullanılmasıdır. Literatürde radyasyona bağlı akciğer toksisitesinin önlenmesinde amifostin (5, 6, 7), pentoksifilin, alfa-tokoferol (8, 9), vitamin A (10), fullerenol (11), karnitin esterleri (12), karnozin (13) *angelica sinensis* (14) gingko biloba (15), ve melatonin (16) gibi pek çok ajan kullanılmıştır.

Dimetil sülfoksid (DMSO), radyoterapi sonrası oluşan doku hasarından sorumlu hidroksil ve oksijen serbest radikallerini "çöpçü özelliği" ile bağlayarak ortamdan uzaklaştıran, böylece radyoprotektif özellik gösteren sistemik toksisitesi düşük bir ajandır. Radyoprotektif özelliği 1960'lı yıllarda Ashwood-Smith tarafından detaylı olarak çalışılmıştır (17). Akciğer fibroblast hücre kültürlerinde radyoprotektif etkisi literatürde değişik yazarlarca bildirilmiştir (18, 19, 20). Dimetil sülfoksit radyoprotektif etkisini aynı zamanda programlanmış hücre ölümü apoptozu önleyerekten gösterir (21-23). Doku kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında en duyarlı ve hızlı metod terminal dUTP yapışkan uç işaretleme yöntemidir (TUNEL) (23).

Akciğerin fonksiyonel en küçük ünitesi alveolokapiller kompleksdir ve burası radyoterapinin etkilerine özellikle hassastır (24). ^{99m}Teknesyum- Dietilen triamin penta asetikasit (^{99m}Tc-DTPA) inhalasyon sintigrafisi ile radyasyona bağlı alveolokapiller membran permeabilitesinde erken dönemde meydana gelen hasar ortaya konulabilir. Bu yöntem basit, kolay tekrarlanabilir, hassasiyeti yüksek bir metottur (25, 26).

Bu çalışmada; akciğerde radyasyona bağlı gelişen hasarın erken döneminde dimetil sülfoksitin koruyucu etkisinin sintigrafik ve histopatolojik yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

.

GENEL BİLGİLER

Toraksda yerleşmiş malign tümörlerin pek çoğu rutin olarak radyoterapi ile tedavi edilir. Akciğer, hastaların %5-20'sinde radyoterapiye bağlı akut hasarın ortaya çıktığı, oldukça radyosensitif, hayati bir organdır (27). Komşu sağlıklı organlarda meydana gelebilecek radyasyon hasarı riskini azaltmak klinik radyoterapide önemli konuların başında gelir.

AKCİĞERLERİN ANATOMİSİ

Akciğerler visseral plevra içinde yukarıda boyun kökü ve birinci kosta seviyesinden, aşağıda diafragmaya kadar uzanırlar. Medialde bronkuslar, pulmoner arterler, venler ve nöral yapılar pulmoner ligamentin katları arasından akciğerleri beslerler. (27).

Akciğerler sağda üç loba, solda iki loba ayrılır. Her lob kendi içinde segmentlere ayrılır. Sağ akciğer üst lobu apikal segment, posterior segment ve anterior segment; orta lobu lateral ve medial segment, alt lobu superior (apikal) segment, medial segment, anterior segment, lateral segment ve posterior segmentlerden oluşur. Sol akciğer üst lobu apikoposterior segment ve anterior segment, lingulası süperior ve inferior segmentlerden; alt lobu ise süperior segment, anterior segment, lateral segment ve posterior segmentten meydana gelmiştir.

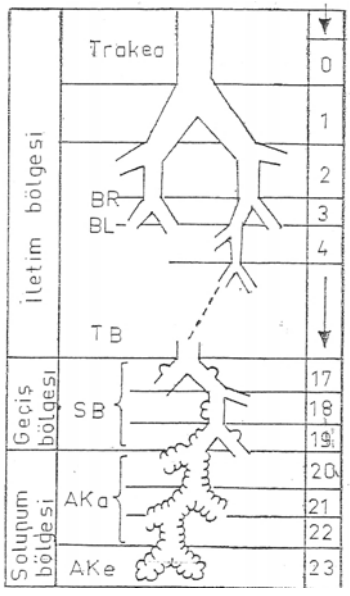
Her segmentte değişik sayıda lobül bulunur. Lobül en küçük anatomik birimdir. İnsanlarda her 5–10 asinüs bir lobülü oluşturur. Bağımsız bir bronşiyole ve arteriyole sahip olan her lobülün ortalama çapı 1 cm'dir. Lobüle giren bronşiyol dallara ayrılarak ilerler. Bronşiyoller yaklaşık 1 mm çapında, en iyi kıkırdaksız iletken hava yolları olarak tanımlanırlar. Terminal bronşiyoller, iletici hava yollarının son bölümünü oluştururlar.

Bunlardan sonra gelen hava yolları, havayı hem ilettikleri hem de duvarlarında yer alan alveoller yardımı ile gaz alışverişine katıldıkları için "solunumsal hava yolları" adını alırlar. Akciğer parankimi için en sık kullanılan temel ünite "asinüs"tür. Asinüs bir terminal bronşiyolün distalinde kalan akciğer parankim bölümüdür. Her bir asinüs yaklaşık 7 mm çapındadır (28).

Asinüste respiratuvar bronşioller, alveol kanalları ve alveol keseleri bulunur. Her bir terminal bronşiyol, respiratuvar bronşiyollere ayrılır. Respiratuvar bronşiyoller asimetrik çatallanma tarzında birbirini izleyen üç dallanma yaparlar. Bunlar respiratuvar bronşiyol I, II ve III olarak adlandırılır. Sonuncu respiratuvar bronşiyol, 2–9 alveol kanalına ayrılır (28). (Şekil 1).

Alveoller, alveol keseleri dışında respiratuvar bronşiyollerin, alveol kanallarının ve atriyumların duvarlarında da bulunurlar. Terminal bronşiyol duvarında alveol yapıları görülmez.

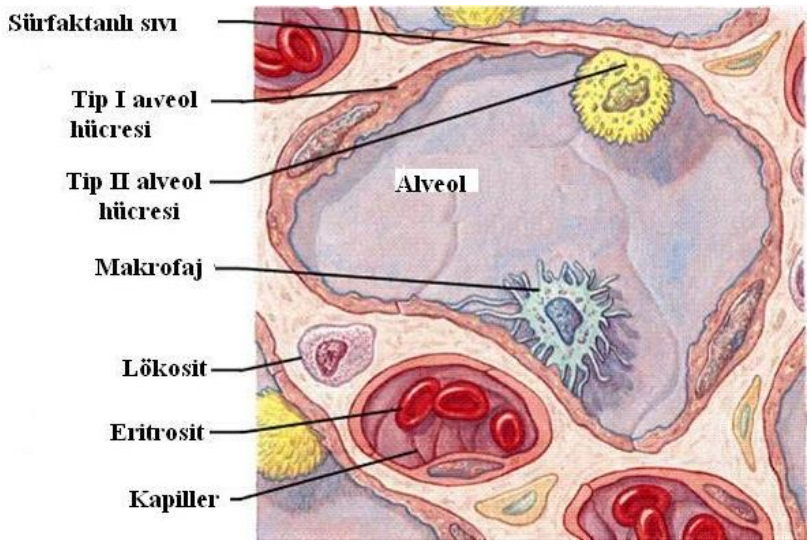
Birbirine komşu alveoller arasında septumların lümene bakan serbest uçlarında az sayıda yassı bronş epitel hücresi yer alır. Respiratuvar bronşiyol ve alveol kanallarının örten epitelin altında, düz kas liflerinden oluşan kas tabakası bu hava yollarını çepeçevre sarar. Ağ şeklindeki bu yapı, alveol ağızlarında sfinkter halini alır. Alveol kanalları, duvarlarında düz kas yapısı bulunan en periferik hava yollarıdır. Bu kanalların duvarları spiral şeklinde kollajen ve elastik bantlardan zengin yapıdadır. Bu yapı özelliği nedeniyle alveol kanallarının boyu inspiryumda uzarken, ekspiryumda kanallar kapanma eğilimi gösteririler (28).



Şekil 1. Bronş ağacının şematik görünümü

Akciğer Parankimi

Parankim akciğerde gaz alış verişinin uygulandığı kısımdır. Kapillerlerden gazın ilk kana geçtiği kısım alveollerdir. Birbirine komşu alveollere ait epitel tabakaları arasında kalan bölüme "alveoller arası septum" denilir. Elektron mikroskobu çalışmalarında alveol epitelinde iki tip hücre saptanmıştır. Tip-I alveol hücreleri alveol yüzeyinin yaklaşık %95'ini kaplayan örtücü epitel hücreleridir. Tip-II alveol hücreleri sekretuvar yetenekte hücreler olup, fosfolipidden zengin granüller içerirler. Akciğer alveol yapısını oluşturan hücreler ve pulmoner kapillerin şematik görünümü Şekil 2'de sunulnuştur (28).



Şekil 2. Akciğer alveolü ve pulmoner kapillerin şematik görünümü (28)

Birbirine komşu alveol epitel örtülerine ait bazal membranlar arasında kalan potansiyel aralığa " alveoller arası intersitisyum" adı verilir. İntersitisyel aralıkta kapiller ağ dışında elastik ve kollajen lifler, perisitler, fibroblastlar, monositler, makrofajlar ve bazen de lenfositler bulunur. Elektron mikroskopik incelemelerde alveolokapiller membranın alveol duvarı, kapiller duvar ve intersitisyum olarak 3 kısma ayrıldığı gösterilmiştir:

1-Alveol duvarı: %93-96'sı Tip–I pnömositler veya membranöz pnömositler ile örtülüdür. Tip -I hücreler tüm alveolar hücrelerin % 8'ini teşkil eder. Rejenerasyon kapasitesi olmayan özelleşmiş hücrelerdir. Komşu hücrelere sıkı bağlar ile tutunurlar. Bu sıkı bariyer iyonların ve suyun hareketini sınırlar. Sağlam bir epitelyal bariyer intraalveoler ödemin rezolüsyonu için gereklidir. Bu sıvının ortamdan uzaklaştırılmasında sıkı epitelyal bariyer boyunca olan aktif sodyum transportu rol oynar (27). Hasarlanmaya karşı rejenere olmayan

Tip-I pnömositlerin yeri, Tip-II pnömositlerin proliferasyonu ile doldurulur. Tip-II pnömositler (granüler pnömositler) alveoler yüzeyin %7'sini kaplarlar. Tüm alveoler hücrelerin %16'sını oluştururlar. Alveol duvarlarının köşelerini kaplarlar ve serbest yüzlerinde küçük mikrovilluslar taşırlar. Tip II hücrelerin fagositik özellikleri de vardır. Yapılarındaki osmiyofilik lameller cisimcikler sürfaktan yapımından sorumludur. Sürfaktan ayrıca Clara hücreleri tarafından da üretilir.

Alveol duvarının diğer bileşeni olan bazal membran ise alveol epitel hücrelerini dıştan kaplayan tabakadır. Alveol fagositleri alveol duvarında bulunur ve toz, bakteri ve pigmentleri fagosite etmekle görevlidir (28).

2- Kapiller duvar: Endotel hücrelerinden oluşan kapiller endotel ve bunu kaplayan tabaka olan kapiller bazal membrandan yapılmıştır.

3- İntersitisyum: alveol ve kapillerlerin dokusal yapıları arasında kalan potansiyel aralıktır. Bu alanda bağ dokusu bulunur. Buradaki aşırı su birikimi intersitisyel ödem, gaz birikmesi intersitisyel amfizem, fibrozisin artması intersitisyel fibrozis olarak tanımlanır. Alveolokapiller membranın kalınlığı normalde 0.6–2.5 mikrondur. Patolojik olaylarda özellikle intersitisyel fibroziste membranın kalınlaşması ile difüzyon, yani gaz alışverişi bozulur (30).

Sürfaktan

Alveollerin yüzeyi ince bir sıvı tabakası ile örtülüdür. Bu sıvı tabakasının yüzeyel bölümünde, yüzeyin küçülüp genişlemesine göre yüzey gerilimini ayarlayan fosfolipid ve protein kompleksinden oluşan sürfaktan adlı maddeler bulunur. Sürfaktan maddeler, alveolde tip-II epitel hücreleri tarafından salınırlar. Bu maddeler alveol söndükçe yüzey gerilimini azaltarak, küçük çaptaki alveollerin atelektaziye uğramalarını önlerler. Sürfaktanın yüzey gerilimini düşürücü etkisinden dipalmitoilfosfotidilkolin adı verilen fosfolipid sorumludur (30). Sürfaktanların ayrıca intersitisyumdan alveollere sıvı sızması gibi durumlarda gerekli basıncı yükselttikleri, alveollere sıvı sızması durumunda ise intersitisyuma geri dönmesini kolaylaştırdıkları saptanmıştır.

Sürfaktan sentezi doğum öncesi 26'ncı haftada başlar. Sürfaktan eksikliğindeki patolojik duruma "hyalen membran hastalığı" proteinden zengin olan bu membranın histopatolojik görüntüsü nedeniyle verilmiştir. Bundan başka, hipokside, uzun süre oksijen tedavisi uygulanan hastalarda, genel anestezi sırasında, akciğer embolisinde, akciğer

ödeminde ve buna neden olan durumlarda da sürfaktan kaybına bağlı olarak akciğer patolojileri oluşur (28).

Sürfaktan, kapillerlerdeki hidrostatik basınca karşı plazma onkotik basıncının yanında yer alır. Alveolokapiller membran boyunca etkili olarak alveoller içine sıvı toplanmasını önler (30). Pulmoner intersitisyel sıvı basıncının, herhangi bir nedenle negatif durumdan pozitif duruma geçmesi, pulmoner intersitisyel alanların aniden büyük miktarda serbest sıvı ile dolmasına neden olur (31).

Akciğerin Arteriyel Dolaşımı

Akiciğerlerin iki ayrı kan dolaşımı vardır. Birincisi, sağ ventriküldeki karışık venöz kanı akciğer kapillerlerine taşıyan pulmoner arter akımı, diğeri ise sistemik dolaşımdan kaynaklanarak akciğerlerin besleyici damar sistemini oluşturan bronşiyal arter dolaşımıdır. Akciğerlerdeki bronkopulmoner arteriyel anastomozlar sayesinde, bu dolaşımlardan herhangi birinin yetersizliği durumunda akciğer dokularının kanlanması sürebilmektedir.

Arteria pulmonalisler sağ ventrikülden çıkıp, sağ ve sol olarak ikiye ayrıldıktan sonra bronş ağacını izleyen dallar vererek akciğerlere dağılır. Alveol duvarında ise yoğun bir kapiller ağ mevcuttur. Akciğer venaları da kapiller ağdan gelişir. Arteria bronşiyalisler sistemik arteriyel kan taşırlar. Bronş ve bronşiyollerin dış tabakalarında birer arter ağı oluşturarak respiratuvar bronşiyollere kadar dağılırlar. Bu düzeyde akciğer bronş ve arterlerinin kapillerleri birbiri ile kaynaşarak akciğer venalarına dökülür (28).

Toraks Lenf Sistemi

Akciğer lenf damarları, lokalizasyonuna ve akış yönlerine göre yüzeyel ve derin lenfatikler olarak iki büyük gruba ayrılır. Yüzeysel lenf damarları, sekonder lobülleri çevreleyen poligonal bir ağ oluştururlar Derin lenf damarları, akciğer içinde bronşlar, arterler ve venalar çevresi, intersitisyel dokulardaki lenfatik dolaşımını sağlar (31).

Akciğerin Sinirleri

Akciğerler parasempatik sinirlerini n.vagustan, sempatik sinirlerini 2–4. sempatik ganglionlardan gelen dallardan alırlar. Afferent vagus lifleri öksürük refleksine, efferent vagus lifleri bezlerden sekresyon artışı ve vazodilatasyona neden olur. Afferent sempatik lifler, bronşların ve viseral plevranın temas duyusunu sağlarlar. Efferent sempatikler bronkodilatasyona neden olur (28).

AKCİĞERLERİN SOLUNUM FONKSİYONU

Solunumun amacı, dokulara oksijen sağlamak ve karbondioksiti uzaklaştırmaktır. Solunum 4 büyük fonksiyonel olaylar dizisi halinde bölümlenebilir:

1. Havanın atmosfer ve akciğer alveolleri arasında içe ve dışa akımı, akciğer ventilasyonu
2. Alveoller ve kan arasında oksijen ve karbondioksitin difüzyonu
3. Gerekli oksijeni hücrelere taşımak ve oluşan karbondioksiti hücrelerden uzaklaştırmak üzere kanda ve vücut sıvılarında oksijen ve karbondioksit taşınması
4. Solunum regülasyonu (30)

Alveol içinde oksijen parsiyel basıncı 100–105 mmHg'dır. Alveoler karbondioksit parsiyel basıncı 40 mmHg'dır (28). Karbondioksit ve oksijen parsiyel basınçlarını iki faktör belirler. Bunlar: 1) Alveoler ventilasyon hızı, 2) Oksijen ve karbondioksitin solunum membranlarından geçiş hızıdır. Bütün alveollerde ventilasyon eşittir ve alveoler kapiller boyunca kan akımı her alveol için eşit kabul edilir. Oysa pek çok akciğer hastalığında, hatta normal durumlarda bile akciğerlerin bazı alanları iyi ventile olur fakat kan akımı yoktur, diğer alanları mükemmel kan akımına iyi ventile olamaz veya çok az olur. Her iki durumda da, solunum membranlarından gaz değişimi ağır şekilde bozulur; böylece normal total ventilasyon ve normal total pulmoner kan akımına rağmen, bu ventilasyon ve kan akımları akciğerin ayrı bölgelerinde yer aldığından kişi ciddi solunum güçlüğü içinde olabilir. Bu nedenle alveoler ventilasyon ile alveoler kan akımı arasında böyle bir dengesizlik bulunduğu zaman solunum gaz değişimini anlamamıza yardım eden kavram "ventilasyon-perfüzyon oranı" dır (32).

Ventilasyon-perfüzyon oranı VA/Q şeklinde ifade edilir. Bir alveolde VA (alveoler ventilasyon) normalken, Q (kan akımı) da normalse, o alveolde ventilasyon-perfüzyon oranı da (VA/Q) normaldir. Eğer ventilasyon (VA) sıfır, fakat hala alveolde perfüzyon (Q) varsa ventilasyon-perfüzyon oranı sıfır olur. Ya da diğer uç durumda olduğu gibi, yeterli ventilasyon (VA) oluyor, fakat perfüzyon (Q) sıfır ise oran sonsuzdur. Oranın sıfır veya sonsuz olduğu her iki durumda da ilgili alveollerin solunum membranlarından gaz değişiminin olmaması bu kavramın önemini gösterir (32).

RADYASYONUN AKCİĞER ÜZERİNE ETKİLERİ

Radyasyon pnömopatisinin süreci şüphesiz ki radyobiyolojik olaylar içerisinde üzerinde en fazla çalışılan konulardan birisidir. Akciğerde normal yapının bozulmasına yol

açan, alveolde ve intersitisyumda aktive olan hücrelerin oluşturduğu hasarlanma ile üretilen proinflamatuvar ve profibrotik sitokinler bu karmaşık süreçten sorumludur (27, 29).

Patofizyoloji

Akut radyasyon pnömonisinin temelinde yüksek enerjili ışınların, ışınlanan alandaki tümörden veya çevresindeki akciğer dokusundan elektronları eksite etmesiyle başlayan olaylar zinciri bulunur. Bu elektronların ortamla etkileşmesinden meydana gelen sekonder reaktif oksijen radikalleri ve diğer serbest radikaller intrasellüler proteinlerin denaturasyonu, membranların bütünlüğünün bozulması ve DNA değişiklerine neden olurlar. Radyasyonun endotelyal hücre membranlarının yapıtaşlarını ve tip II hücrelerin sürfaktan bulunduran lameller cisimciklerini de içeren makro moleküllerdeki akut hasarı doza bağımlı toksisite olarak karşımıza çıkar. Hayvan modellerinde radyoterapi sonrası ilk hafta içinde kapiller endoteldeki bozulma gösterilmiştir. Ancak, semptomatik pulmoner hasar DNA'daki hasardan kaynaklanır. Bronş epiteli ışınlamadan hemen sonraki günlerde etkilenmeye başlar çünkü bu hücrelerin rölatif olarak yenilenmesi hızlıdır. Diğer yandan, radyasyon hasarına cevap olarak hızlı prolifere olan tip II hücreleri, normalde prolifere olmayan tip I hücrelerinin yerine geçer. Işınlamadan sonraki ilk 2-3 ay içinde görülen bu değişiklikler radyasyon pnömonisinin akut eksudasyon fazını oluşturur. Spesifik olmayan patolojik değişiklikler, endotelyal hücrelerin şişmesi, mikro trombüslere bağlı olarak değişik derecelerde kapiller oklüzyonları, intersitisyel veya alveoler boşluklarda fibrinden zengin (dejenere olmuş tip I hücreleri ve akut inflamatuvar hücreleri içeren) eksudadır. Bunlara hyalin membranöz değişiklikler ve sürfaktan düzeyinde azalma eşlik eder. Endotel hasarı aylarca devam edebilir ve ventilasyon/perfüzyon oranında bozulmaya yol açar (29).

Radyasyon pnömonisinin akut fazında inflamatuvar hücreler sonuçta fibrozis ile karakterize cevaba yol açan sitokin kaskadını başlatırlar. Sitokinlerden transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β), özellikle makrofajlara, tip II alveoler hücrelere ve kollajen üreten fibroblastlara sinyal gönderen mediyatörlerin salınışını uyararak fibrozise progresyonu sağlar (33). İnterlökin-1 makrofajlardan salınır, akut faz reaksiyonlarını başlatır ve ateş gelişiminden sorumludur. İnterlökin-6 aktive makrofajlardan, T helper lenfositlerden, fibroblastlardan ve tip II pnömositlerden salınır. Radyasyon pnömonisinin erken fazında yükselen sitokinlerdendir ve küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda radyoterapi öncesi ve sonrası yüksek değerleri radyasyon pnömonisi geliştirme riski ile yakından ilişkili bulunmuştur. Trombosit-kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve fibronektin fibroblastlar üzerinde etkili kemotaktik maddeledir. Tümör nekroz faktörü-alfa, tip

II pnömositlerden salınan yüksek moleküler ağırlıklı antijen KL-6 radyasyon pnömonisinde yer alan sitokinlerdendir (34). Radyasyon pnömonisinin geç fazı ışınlamadan sonraki 6-12 aylık dönemi kapsar. Histopatolojik bulgular septal fibrozis, kapiller kaybı, alveolerde obliterasyon ile karakterizedir. Matriks metalloproteinazlar, Fas/CD95 bu dönemde etkin sitokinlerden bazılarıdır (29). Işınlama sonrası erken ve geç dönemde akciğerde meydana gelen histopatolojik değişiklikler Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Işınlama sonrası akciğerde meydana gelen akut ve geç değişiklikler (35)

Yer	Erken ve Orta Dönem (0-2 ay)	Orta Dönem (2-9 ay)	Geç Dönem (9ay ve üstü)
Kapillerler	2 saat: Permeabilite artımına neden olan endotel değişiklikleri 2 gün: Endotelin bazal membrandan ayrılması. Hücrelerin dejenerasyonu ile kapiller lümeninde tıkanmalar meydana gelir.	Fibrin, kollajen ve trombositlere bağlı geniş obstrüksiyon. Kapiller permeabilitede azalma.	Kapillerlerin pek çoğu kaybedilmiştir. Yeni kapiller rejenerasyonu başlamıştır. Permeabilite azalmıştır
Tip I Alveoler Hücreler	Dejeneratif değişiklikler veya normal Sayılarında azalma	Hücrelerin sayısında daha da azalma	Hücrelerin sayısında belirgin azalma
Tip II Alveoler Hücreler	Normal veya erken dejeneratif değişiklikler daha belirgin hale gelir.	Hücrelerin sayısında ve boyutlarında artma Anormal görünüm	Hücrelerin sayısında ve boyutlarında normale dönüş
Bazal Membran	Şişmiş, düzensizlik başlamış	Katlanmış, kalınlaşmış	Katlanmış, kalınlaşmış
İntersitisyel Aralık	İnflamatuvar hücrelerin sayısında artış, gevşek bağ dokusunda artış	Mononükleer, mast ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu Bağ dokusunda artma	İnflamatuvar hücrelerin sayısında azalma Kollajen miktarında artış
Alveoler Aralık	Hemorajik Fibrin ve hücre debrisleri ile dolmuş. Alveoler makrofajların sayısında artış	Alveoler aralık küçülmeye başlar.	Alveoler aralık iyice küçülmüş veya yok olmuştur Yapı önemli ölçüde bozulmuştur

Radyasyon pnömonisi gelişimini etkileyen faktörler

Akciğerlere radyasyon hasarının insidansı ve şiddeti bu nedenlerle öncelikle ışınlanan akciğer volümüne, total doza, fraksiyon şemasına ve uygulanan radyasyonun niteliğine bağlıdır. Genel olarak, ışınlanan akciğer volümü arttıkça, dokuda oluşan hasarın miktarı da artar. Akciğer parankiminde hasar meydana gelebilmesi için bir eşik değer vardır. Parankimin en az %10'luk bir kısmı ışınlandığında radyasyona bağlı pulmoner toksisite gelişir (36). Hasar aynı zamanda akciğere uygulanan radyasyon dozu ile doğru orantılıdır. Tek doz tüm akciğer ışınlamasını takiben radyasyon pnömonisi gelişimi için bir eşik değer ve dik bir sigmoid doz-cevap ilişkisi vardır (37). Fraksiyone radyoterapi ile 20 Gy'den az dozlarda radyasyon pnömonisi nadiren oluşur, 60 Gy'i aşan dozlarda ise bu olasılık artar (36).

Uygulanan total dozun yanı sıra, uygulanan fraksiyon sayısı ve total dozun uygulanış süresi de radyasyon pnömonisinin gelişiminde etkilidir. Fraksiyon sayısı arttıkça, hasarlayıcı etki azalır. Uygulanan doz hızının da akciğer toleransı üzerine etkisi vardır. Doz hızını 0.5 Gy/dk'dan 0.1 Gy/dk'ya düşürmekle, aynı total doz ile oluşabilecek hasar %30–40 azaltılmış olur (36).

Klinik Özellikler

Akciğer kanseri için yüksek doz eksternal radyoterapi alan hastaların %5-20'sinde klinik radyasyon pnömonisi sendromu gelişir. Radyasyon pnömonisi sendromu gelişimine neden olan faktörler eşzamanlı kemoterapi uygulanması, daha öncesinde toraksa ışın tedavisi almış olmak ve steroidlerin kesilmesidir. Gençler ile yaşlılar arasında radyasyon pnömonisinin insidansı değişmez, ancak yaşlı kesimde pnömoni daha ciddi seyreder. Komorbid kronik obstrüktif akciğer hastalığı radyasyon pnömonisi riskini arttırmaz (38).

Akut radyasyon pnömonisinin belirtileri ışın tedavisinin bitiminden 2–3 ay sonra belirgin hale gelir. Belirti ve bulgular nadiren tedaviyi takip eden ilk ay içinde çıkabileceği gibi, tedavinin tamamlanmasından 6 ay sonraya kadar da gecikebilir. Erkenden çıkan belirti ve bulgular daha ciddi bir klinik gidişi ve uzamış hastalığı betimler. Temel semptom dispnedir. Parankimdeki hasarın yaygınlığı ve yoğunluğuna göre hafif dispneden, ciddi solunum yetmezliğine değişebilir. Hastalarda öksürük non prodüktif olabilir veya pembe renkli balgam birlikteliği görülebilir (33).

Fizik muayenede pulmoner tutuluma ait bulgular minimaldir. Işın alanına uyan bölgede bazen yaş raller, plevral sürtünme sesi ve plevral mayi varlığına ait dinleme bulguları vardır. Medikal tedavi ile hastaların akut radyasyon pnömonisine ait semptomları tamamen gerileyebileceği gibi çoğunda progresif fibrozis gelişir. Bazı hastalarda pnömoni safhası

gelişmeden, direk fibrozis gelişmiş olabilir. Bu hastalar pulmoner fibrozis ile kliniğe başvururlar. Fibrozise bağlı kalıcı değişiklikler ışın tedavisinden 6-24 ay sonra meydana gelir ve iki yılda stabilleşir. Fibrozis gelişen hastalar asemptomatik olabildikleri gibi, değişik derecelerde dispne de geliştirebilirler. Radyasyon pnömonisinin çok nadir başlıca komplikasyonları kor pulmonale ve solunum yetmezliğidir.

Direk grafide erken değişiklikler radyoterapi alanına uyan lokalizasyonda buzlu cam opasiteleri, parankimde homojen yaygın bir yoğunluk artışı şeklinde olabilir. Daha sonra alveoler infiltrasyonlar ve bazen hava bronkogramlarının da eşlik ettiği yoğun konsolidasyon bulgulara eklenir. Fibrozis geliştikçe, pnömoni alanında lineer çizgilenmeler, hilusa, perimediastinal bölgeye veya apikal alanlara yönlenen kontraksiyonlar görülür. Radyasyon pnömonisi ve fibrozisine alt en önemli karakteristik bulgu, radyolojik değişikliklerin ışın tedavisi sahasına uyan yerleşimde görülmesidir.

Toraks tomografisi ve galyum-67 sitrat görüntülemesi radyolojik değişikliklerin saptanmasında direk grafiden daha hassas yöntemlerdir (36).

Pulmoner fonksiyon testleri tüm akciğer fonksiyonlarının bir göstergesi olduğundan, radyoterapi sonrası değişiklikleri daha iyi yansıtırlar (39). Tedavinin tamamlanmasından 4–8 hafta sonrasına kadar belirgin bir fizyolojik değişiklik olmaz. Bu dönem genellikle klinik pnömoninin olduğu zamanla örtüşür. Daha sonra akciğer volümlerinde ve difüzyon kapasitesinde azalma, arteriyel hipoksemi gibi bulgular gelişir.

Son bilgiler ışınlama sonrası akciğer volümündeki azalmanın, verilen radyasyon miktarı ile doğru şekilde tahmin edilebileceğini göstermiştir. Üç ayda verilen her Gy doz başına %0,9'luk azalma, 18 ayda verilen her Gy doz başına %0,4'lük bir azalma olmaktadır (36).

Tanı

Radyasyon pnömonisi tanısı bazen ışınlama sonrası ortaya çıkan belirti ve bulguların ışığında, tipik akciğer düz grafisinin de yardımıyla klinik olarak konulur. Eşzamanlı bir malignite veya infeksiyon birlikteliği problem teşkil ettiğinden bunlardan ayrım biyopsi ile yapılır. Radyasyon pnömonisine ait değişiklikler histopatolojik olarak özgül olmadığından, akut evrelere ait elemanlar (alveollerde fibrin eksuda) daha kronik evrelere ait elemanların (alveoler fibrozis, subintimal skleroz) komşuluğunda görülüyorsa şüphe edilmek kaydıyla bu antitenin tanısı konulabilir (33, 36).

Radyasyon pnömonisinin takibi için günümüzde standart bir test olmamasına rağmen, literatürdeki son çalışmalar radyoterapi boyunca yüksek seyreden TGF-β düzeylerinin

radyoterapiye bağlı pulmoner toksisite geliştirme riski, aynı zamanda tedavide başarsızlığa uğrama şansı yüksek olan hastalar için prediktif değeri olduğu yönündedir (40).

Tedavi ve Radyoproteksiyon

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda ışınlama sırasında kortikosteroidlerin uygulanmasının fizyolojik değişiklikleri iyileştirdiği, mortaliteyi azalttığı gösterildi. İnsanlarda kortikosteroidlerin radyasyon pnömonisi üzerindeki etkisini araştıran kontrollü klinik araştırmalar yoktur. Profilaktik amaçla başlanan kortikosteroid tedavisinin radyasyon pnömonisini önlemediği, ancak pnömoni geliştikten sonra uygulanan kortikosteroid tedavisinin olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Pratikteki uygulama, pnömoniden klinik olarak şüphelenildiği anda 1 mg/kg dozunda metil prednizolon başlamaktır. Bu doz başlangıçta birkaç hafta devam ettirilir, daha sonra belirti ve bulgulara bakılarak dikkatle azaltılır (36). Pulmoner fibrozis tedavisinde kortikosteroidlerin yerinin olmadığı konusunda pek çok yazar hem fikirdir.

Işınlama sonrası akciğerde hasar gelişiminde hücresel antioksidan cevabın önemli rol oynadığı bilinmektedir. Sistein, siteamin gibi tiyol bileşikleri serbest radikallerin ortadan kaldırılmasına yönelik olarak radyasyona bağlı akciğer hasarının korunmasında kullanılmışlardır. Günümüzde klinik önemi üzerinde en fazla durulan tek tiyol bileşiği amifostindir. Amifostinin koruyucu mekanizmaları arasında serbest radikalleri çöpçü özelliği ile bağlama, DNA korunması ve tamiri hızlandırması sayılabilir. Amifostin uygulanırken optimum koruma için uygulanan radyasyonun toplam dozu ve veriliş zamanının önemli olduğu unutulmamalıdır. Vujaskovic ve ark. (7), amifostinin radyoterapiden önce uygulanmasının makrofaj birikimini azalttığını ve akciğerden TGF-β_1 salınımını azalttığını rapor etmişlerdir.

Pentoksifilin fibrozis gelişiminde TGF-β inhibisyonu ile koruma sağlar, fakat antioksidan olan vitamin E ile birlikte kullanımının radyasyona bağlı hem akut hem de kronik akciğer hasarında koruyucu oldukları bildirilmiştir (8, 29, 41). Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü kaptopril, içerdiği tiyol grubu nedeniyle radyasyon pnömonisi için koruyucu olarak çalışılmış başka bir bileşiktir. Farelerde yapılan çalışmalarda kaptoprilin hem pnömoni hem de fibrozis aşamalarında koruyucu olduğu tespit edilmiştir (29). Ancak, kaptoprilin aynı zamanda radyasyon fibrozisinin gelişimine de katkıda bulunduğu fareler üzerindeki bir çalışmada rapor edilmiştir (42).

Melatonin etkisini reaktif oksijen radikalleri üzerinden gösteren peptid yapıda bir maddedir. Son yıllarda literatürde radyasyona bağlı akut akciğer hasarından koruyucu olarak

yapılan çalışmalarda intraalveoler ödemde ve eritrositlerde azalmaya neden olduğu bulunuştur. Melatoninin de TGF-β üzerinden fibrozisi tetiklediği bildirilmiştir. (16).

Kafeik asit feniletil ester, fenolik antioksidan bileşik, radyasyona bağlı akut akciğer hasarında NF-κB aktivasyonunu inhibe ederek akut inflamatuvar cevapta rol oynayan IL-1, IL-6 ve TNFα gibi sitokinlerin sentezlenmesini sağlayan genlerin ekspresyonunu inhibe ederek ve apoptozisi azaltarak radyasyona bağlı akut akciğer hasarını önlediği bildirilmiştir (28, 43).

Literatürde etkinliği çalışılan diğer ajanlardan bazıları vitamin A, fullerenol, karnitin esterleri, karnozin, *angelica sinensis* ve gingko bilobadır (10-15).

AKCİĞER EPİTEL GEÇİRGENLİĞİNİ İNCELEMEDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Karbonmonoksit Difüzyon Kapasitesi Ölçümü

Akciğer difüzyon kapasitesini saptamak amacıyla oksijen ve karbondioksit gazları kullanılır. Ancak oksijen gazı kullanımı hem zor hem de zahmetlidir. Difüzyon kapasitesinin ölçülmesinde en sık kullanılan yöntem tek soluk yöntemidir. Normal değeri 14–25cc/dk/mmHg'dır. Daha düşük değerler difüzyon bozukluğunu veya perfüzyon/ventilasyon dengesizliğini gösterir (44).

Sintigrafik Yöntemler

^{99m}Teknesyum heksametilpropilenamin oksim, 1990'lı yıllarda akciğerde ventilasyon çalışmalarının ardından perfüzyonun değerlendirilmesi amacıyla yeni bir sintigrafik metot olarak teklif edilmiştir (45). Pertechnegas ^{99m}Tc –DTPA Akciğer İnhalasyon Sintigrafisi ise akciğer fibrozisini yakalamakta %80 sensitivite ve %60 spesifisiteye sahip olduğu, düz akciğer grafileri ile yapılacak kombine değerlendirmede sensitivitenin %100'e, spesifisitenin %90'a çıktığı bildirilen başka bir sintigrafik metottur (46, 47).

^{99m}Teknesyum dietilentriaminpentaasetik Asit İnhalasyon Sintigrafisi

^{99m}Tc –DTPA, intravenöz olarak glomerüler filtrasyon hızının ölçülmesinde son derece yaygın şekilde kullanılan ucuz bir radyofarmasötiktir. ^{99m}Tc –DTPA bileşiğinin molekül ağırlığı 490 daltondur (25). DTPA elektrik olarak nötr bir şelattır (47). Bu bileşik periferik hava yollarında, pulmoner epitelyal yüzeyde tutulduktan sonra hava boşluğundan vasküler boşluğa ve ekstrasellüler sıvıya difüze olur. Bu geçişte sürfaktan tabakası, alveoler

epitel, bazal membran ve kapiller endotel yolu kullanılır. Kana geçtikten sonra böbreklerden glomerüler filtrasyon ile atılır (25). DTPA'nın böbreklerden klirensi, akciğerlerden kana geçişinden on kat daha hızlıdır (48,26)

Normal akciğerlerde inhale edilen ^{99m}Tc-DTPA'nın bir dakika içinde akciğer lenfatiklerinde belirmesine rağmen, yalnızca inhale edilen miktarın %1-2'si lenfatik yolla klirense uğrar. Lenfatiklerle klirense uğrayan ^{99m}Tc-DTPA fraksiyonu alveolokapiller membran zedelendiği zaman artabilir. ^{99m}Tc-DTPA'nın klirens hızının ölçümünde aerosolle ventilasyon görüntülenmesi için birkaç dakika sakin olarak solumakla uygulanır. Periferal dağılımı sağlamak için aerosol submikronik olmalıdır (25). ^{99m}Tc-DTPA gibi hidrofilik aerosollerin klirensi bölgesel perfüzyona bağlıdır. İntrasellüler yol ile geçer ve klirensi difüzyonla sınırlıdır (49).

^{99m}Teknesyum dietilentriaminpentaasetik asitin akciğerlerden klirens hızı, sodyum iyodid probu veya bilgisayar bağlantılı gamma kamera ile ölçülür. Normal klirens grafiği en iyi eksponansiyel olarak tek kompartımanlı boşalmaya uygun bir şekildedir. Hem inhale hem de intravenöz injekte edilen ajanlar, pulmoner epitelyal bütünlüğündeki değişiklikleri ve inhale ^{99m}Tc-DTPA'nın artmış klirens hızını gösterebilir. Anestezi altındaki tavşanlarda trakeal olarak damlatılan HCl ve intravenöz injekte edilen oleik asitin etkileri saptanmıştır. Hava boşluğuna damlatılan HCl, monoeksponansiyel bir grafik gösteren artmış klirens hızına sahiptir. İntravenöz verilen oleik asit ilk 30 saniyesinde belirgin artmış klirens hızına sahiptir. Birkaç dakika sonra normale döner. Yine, hyalen membran hastalıklı yeni doğanlarda, ARDS'li hastalarda, kömür madeni işçilerinde özellikle sigara içenlerde bieksponansiyel klirensi bildirilmiştir. Aynı şartlarda en az iki epitelyal kompartıman vardır. Birinin ağır zedelenmesinde, artmış permeabilite ve klirensi, diğerinde ise daha normal epitel ve klirens hızı bulunur. Bu göreceli olarak normal birçok akciğer alanı ile intravenöz oleik asit ile oluşan yamalı tarzda akciğer zedelenmesinin patolojik bulguları ile uyumludur.

Aerosolün inhalasyon süresi ve sintigrafik çalışmanın süresi ^{99m}Tc-DTPA'nın klirens hızının ölçülmesi etkilidir. Uzun bir inhalasyon süresi erken dönem hızlı klirensi maskeleyebilir. Uzun bir çekim süresi içinde ise, pulmoner vasküler ve göğüs duvarı aktivite tutulumuna bağlı olarak artefaktlar oluşabilir.

Solunumun derinliği ve hızı; submikronik aerosollerle bile olsa aerosol tutulumunun yerini etkileyebilir. Bu yüzden aerosol dağılımında kullanılan inhalasyon metodu çok önemlidir. Maksimum periferal tutulum, sakin solunum sırasında oluşur. Tutulumun yeri akciğerlerden gelen ^{99m}Tc-DTPA'nın klirens hızında büyük etkiye sahiptir. Periferik olarak tutulan submikronik ^{99m}Tc-DTPA aerosol inhalasyonu klirensi, santral olarak tutulandan

belirgin olarak daha hızlıdır. Solütün molekül ağırlığı; küçük moleküllerin difüzyon hızı onların molekül ağırlıklarının karekökü ile ters orantılıdır. Yani daha küçük moleküller daha hızlı difüze olur.

Ekstrapulmoner epitelyal radyoaktivite, pulmoner epitelde biriktikten sonra, ^{99m}Tc-DTPA kana ve total ekstrasellüler sıvıya difüze olur. Hiçbir eksternal sayaç, pulmoner epitelyal yüzeyde ^{99m}Tc-DTPA akciğer kan akımı ve göğüs duvarından ayrımını yapamaz. Kan ve ekstrasellüler sıvının sayım hızındaki artış, klirens hızının ölçümünde yalancı bir azalmaya (yarılanma zamanında artış) neden olur. Bu doku ve kan "background" aktivitesini düzeltici teknikler vardır. Ayrıca her iki hemitoraks içinde karşılaştırmalı düzeltmeler yapılmıştır. Ancak klinik kullanımda düzeltmeler zorunlu değildir (25).

İnhale edilen ^{99m}Tc-DTPA aerosol akciğer klirensinin değiştiği durumlar şöyle sıralanabilir:^{99m}Tc-DTPA klirens hızının erişkin respiratuvar distres sendromu, hyalen membran hastalığı, pneumocyctis carini pnömonisi, pnömokonyozlar, sarkoidoza sekonder intersitisyel akciğer hastalıklarında, kollajen vasküler hastalıklarda, alerjik alveolitte, egzersiz durumunda, uzun süredir baz kokain kullanan kişilerde, sarkoidozlu hastalarda, yangında dumana maruz kalan hastalarda, herbisid olarak kullanılan Paraquat'ın akut zehirlenme durumlarında, sistemik sklerozda ve diyabetli hastalarda komplikasyonlu grupta arttığı gösterilmiştir (25, 48, 50-58).

Sigara içenlerde ^{99m}Tc-DTPA klirensi artmış olarak bulunmuştur (47). Alerjik astım reaksiyonlarından korunmak amacıyla kullanılan ve aslında bir diüretik olan furosemidin inhalasyonundan önce astım hastalarında hafifçe artmış olan ^{99m}Tc-DTPA klirensinin, inhalasyon sonrası anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır (60).

Asemptomatik genç sigara içicilerle, stabil astmatik hastalar ve sigara içmeyen gönüllülerin değerlendirildiği bir çalışmada sigara içenlerin diğer bir gruba göre ^{99m}Tc – DTPA klirenslerinin arttığı ancak bu artışın "Histamin'le Yapılmış Bronş Provokasyon Testi" ile korelasyon göstermediği belirtilmiştir. Bunun klinik anlamı astımlı hastalarda, bronşlarda epitelyal alandaki artmış permeabilitenin ana nedeninin bronş hiperreaktivitesinin olmamasıdır (61).

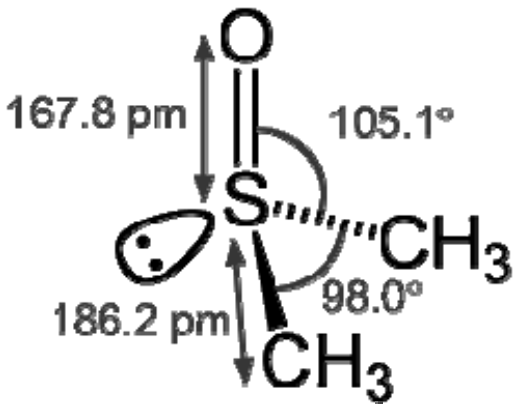
Difüz infiltratif akciğer hastalığı olan olgularda, erken dönem hastalarda $t_{1/2}$ değerlerinin daha uzun, diğer bir deyişle klirens hızının azaldığı bulunmuştur (62).

Tavşanlardan deneysel olarak akciğer lavajı ile alveoler yapıyı bozmadan sağlanan sürfaktan eksikliği, artmış ^{99m}Tc-DTPA klirensine yol açmıştır (63).

DİMETİL SÜLFOKSİT

Serbest radikaller pek çok hastalığın gidişinde, yaşlanma, karsinojenezis, kanserin kemoterapi ve radyoterapi tedavileri süresince, aynı zamanda bu tedavilere bağlı komplikasyonların oluşumunda etkilidirler. Serbest radikallere bağlı hastalıkların tedavisinde antioksidanlar önemli bir tedavi yaklaşımını oluştururlar. İyonize radyasyonlar hücrede suyun hidrolizine yol açarak hidroksil ve hidrojen peroksit molekülleri aracılığıyla membran, protein ve DNA harabiyeti yaparlar, hücre ölümüne neden olurlar. Aynı mekanizma ile kanserin cerrahi dışı diğer tedavi modaliteleri olan radyoterapi ve kemoterapide de serbest radikallerin tümörü tedavi edici etkisinden faydalanılır. Serbest radikallerin antioksidanlar ile nötralize edilmediğinde hücre için ne kadar tehlikeli olduğu gösterilmiştir (75).

Dimetil sülfoksit (DMSO), $(CH_3)_2SO$, basit moleküler yapısı terapötik uygulamaları ve toksik etkileri ile bilim dünyası ve popüler literatürde dikkat çekmiştir.



Şekil 3. Dimetil sülfoksitin $(CH_3)_2SO$, açık moleküler yapısı (64)

Saf DMSO, berrak, bazen sarıya dönen renkte, 18.5˚C'de donan bir maddedir. Dipolar, aprotik yapıda bir solventtir, yani içinde çözündüğü maddelerin atomları ile proton değişimi yapmaz, daha çok hidrojen bağlarındaki protonları kabul eder. DMSO'nun suya afinitesi oldukça yüksektir. DMSO'nun hidrojen bağları kurma yönündeki eğilimi suya olan afinitesinden büyük ölçüde sorumludur.

Saf DMSO oda şartlarında %66–67 oranında hızlıca dilüsyona uğrar. DMSO'nun hidrasyonu ekzotermik bir tepkimedir. DMSO cilde uygulandığında madde hava ve uygulandığı dokudaki su ile reaksiyona gireceğinden ısı çıkışı kolaylıkla hissedilir. DMSO pek çok madde için sudan daha iyi bir çözücüdür. Proteinlerin ve steroidlerin çoğu DMSO içinde çözünebilir. Biyolojik bariyerlerin (lipoprotein membranların) çoğu DMSO'ya karşı kolaylıkla geçirgendir ve DMSO'nun geçişi ile zarar görmezler (21).

Dimetil sülfoksitin donma noktası 18.5˚C olduğundan yüksek konsantrasyondaki veya saf olan solüsyonları soğutucuda donar. DMSO %20'lik konsantrasyonlarda antifriz özelliği gösterir.

Dimetil sülfoksit eser miktarlarda su kaynaklarında, okyanus suyu ve yağmur suyunda bulunur. DMSO ve onun metabolitleri dimetil sülfit (DMS), dimetil sülfon ($DMSO_2$) eser miktarlarda omurgalıların yiyeceklerinde, sığırların kan ve adrenallerinde bulunur, süt ve biranın yapısına girer. Amerika Birleşik Devletleri'nde DMSO ticari olarak üretilmektedir, Avrupa'da ise kömür ve petrolden elde edilmektedir.

Dimetil sülfoksit ilk kez 1867'de Rus kimyager Alexander Saytzeff tarafından bulunmuştur. DMSO'ya ilgi 1940'lar ve 1950'lerde, endüstriyel araştırmacıların onun pek çok herbisid, fungisid, antibiyotik ve bitki hormonu için etki arttırıcı gücünü fark etmesi ile patlama gösterdi. Sonraki yıllarda DMSO ile çalışan bilim insanları onun yanıkları iyileştirmek, ağrı gidermek, yaralanmalardan sonra ödem gidermek gibi olağanüstü özelliklerini keşfettiler. DMSO, 1964'te ilk kez farmakolojik bir ajan olarak hayvanlarda kullanıldı. İnsanlarda 1978'de %50'lik solüsyonu intersitisyel sistit tedavisinde kullanılmak üzere ruhsat aldı (21).

Dimetil Sülfoksitin Histolojik ve Farmakolojik Özellikleri

Dimetil sülfoksitin histolojik ve farmakolojik özelliklerinin çoğu birbirine benzer biyokimyasal ve biyomekanik mekanizmalar gösterir. Bu mekanizmalar temel olarak şöyle sınıflanabilir:

1. Absorbsiyon / penetrasyon
2. Translokasyon / penetran taşıyıcı aktivite
3. Serbest radikalleri toplayan çöpçü özelliği
4. Enzimlerin inhibisyonu veya aktivasyonu

Bu dört özellik büyük ölçüde DMSO'nun hidrojen bağları kurması ile ilgilidir: Organik moleküllerle onların organik yapısını tamamen değiştirmeden onlarla reaksiyona girebilmesi, su moleküllerine olan yüksek afinitesi, su moleküllerinin kafes şeklindeki yapısını bozması ve biyolojik sistemlerden su moleküllerinin yerine geçebilmesi bu sonuçları getirmektedir.

Absorbsiyon ve Penetrasyon

Dimetil sülfoksit ciltten kolaylıkla penetre olabilir. Radyoaktif işaretli DMSO cilde tatbikinden 5 dakika sonra kanda tespit edilebilmektedir ve metaboliti olan dimetil sülfite (DMS) bağlı ağız kokusu belirgin hale gelmektedir (59). Yirmi dakika içerisinde DMSO tüm

organlarda saptanmaktadır. DMSO aynı zamanda müköz membranları, kan- beyin bariyerini, organ ve organel membranlarını, mikrobiyal membranları, yapay lipit sferüllerini geçebilmektedir. Diğer penetran solventlerin aksine, absorbsiyon ve penetrasyonu geri dönüşümsüz membran hasarına sebep olmaz (21, 60).

Translokasyon/Penetran Taşıyıcı Aktivitesi

Noniyonize düşük ağırlıklı moleküller DMSO ile ciltten taşınır. Değişik yapıda steroidler DMSO ile sinerjistik etki yaratarak kolaylıkla ciltten penetre olabilirler (61). DMSO solüsyonları insülin, heparin, sülfadiazin ve fenilbütazon gibi farmakolojik ajanların ciltten penetrasyonunu önemli oranda arttırır (21, 62, 63). DMSO'nun antibakteriyel, antifungal, antiviral ajanlar ve kemoterapötikler için taşıyıcı ya da etki arttırıcı olarak kullanımı konusunda literatürde değişik görüşler bulunmaktadır (21, 60, 64, 65).

Serbest Radikaller İçin Çöpçülük

Dimetil sülfoksit hidroksil serbest radikallerini yakalar (21, 60, 64). DMSO'nun yıkım ürünü olan dimetil sülfit serbest oksijen radikallerini yakalar. Işınlama, patojen bakteriler veya diğer mekanizmalarla oluşan oksijen türevi serbest radikaller, bakteriyel infeksiyon ve endotoksin üretimi, iskemi, inflamasyon ve radyasyon gibi doku hasarına sebep olurlar. DMSO ve DMS'nin serbest radikaller için çöpçülük yapabilmesinin in vivo ortamda topikal veya parenteral olarak kullanıldıklarında antiinflamatuvar, kriyoprezervatif/ kriyoprotektif, radyoprotektif ve antiiskemik özellikleri sayesinde olduğuna inanılmaktadır (21).

Enzim Etkileri

Dimetil sülfoksitin vitro ve in vivo ortamlarda enzimleri inhibe veya stimüle edebilir. İn vitro değişik pH'da ve farklı DMSO konsantrasyonlarında enzim aktivitesi üzerinde karşıt etkileri vardır. DMSO enzimler etkisini protein konfigürasyonunu geri dönüşümlü olarak değiştirmekle gösterir (21, 60).

İskemiden Koruyucu Etkisi

Dokularda iskemi serbest radikallerin ortama salınmasına neden olur. İn vivo ve in vitro ortamlarda DMSO'nun hücreleri, dokuları hatta bütün bir organın tamamını iskemik hasardan koruduğu gösterilmiştir (21, 64). İskemi sırasında trombositlerden salınan vazoaktif aminleri antagonize ederek, trombosit agregasyonunu bozarak koruyucu etkisini göstermektedir (64).

Antimikrobiyal Aktivite

İn vitro %5–50 konsantrasyonlarında DMSO'nun *mycobacterium tuberculosis*, *staphylococcus* türleri, *streptococcus* türleri, *salmonella* türleri, *proteus* türleri ve *E. coli* için bakterisidal veya bakteriyostatik etki gösterir. İn vitro oral flora ve aksillar flora da bakteriyel popülasyonları azaltır. Antimikrobiyal aktivitenin mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir. İn vivo, DMSO'nun etkisi immün cevaba olan etkisi ve endotoksin kaynaklı doku hasarını önlemesi ile ilintili olabilir (21). Başka bir mekanizma da DMSO'nun protein sentezi için gerekli olan RNA'nın konformal yapısını bozmasına bağlı olabilir (64).

Antiinflamatuvar Etki

Klinikte akut kas-iskelet yaralanmalarında, santral sinir sisteminin akut, travmatik ve inflamatavuar bozukluklarında, postoperatif ciddi ağrı ve ödem gelişmesi durumunda, infeksiyon ve sepsis varlığında DMSO tedavisinden antiinflamatuvar fayda görüldüğü bildirilmiştir. Romatizmal hastalıklarda, kronik artritlerde, intersitisyel sistitte alınan klinik cevap akut dönemde alınana göre daha geridedir. DMSO'nun serbest radikallere karşı çöpçü özelliği ile mikrosirkülasyonun devamlılığı sağlanarak, inflamatuvar hücre göçünün engellenmesi, hücresel immün cevabın modülasyonu, antikor yapımının engellenmesi, kronik durumda fibroblast proliferasyonunun engellenmesi antiinflamatuvar etkiyi oluşturur (21).

Analjezik Etki

Ratlarla yapılan deneylerde DMSO ile sağlanan analjezinin morfinin yaptığı naloksan ile geri dönmeyen analjezi ile karşılaştırılabilecek kadar kuvvetli olduğu bildirilmiştir. DMSO'nun tek başına cilde topikal olarak uygulanması anlamlı bir analjezi yaratmazken, %100 DMSO'nun %9 tetrakain ile birlikte topikal uygulanması anlamlı bir lokal anestezi sağlamıştır.

Akut durumlarda DMSO'nun analjezik etkisi ortama salınan ağrı mediyatörlerini antagonize etmesine bağlıdır. Yüzde yirmi beşin üzerindeki konsantrasyonlarda DMSO sinir blokajı yapar (21, 64).

Kollajen Üzerine Etkisi

Skleroderma hastalarında uygulanan DMSO tedavisi ile kollajenin yapısında gevşeme, idrarlarında hidroksiprolin atılım miktarında artma saptandı. Keloid hastalarında DMSO

tedavisi öncesi ve sonrası alınan cilt biyopsilerinde, tedavi sonrası normal kollajen doğru kayma saptandı (21, 60).

Kriyoprezervatif / Kriyoprotektif Etki

Dimetil sülfoksitin en çok araştırılan iki özelliğinden birisi kriyoprotektif ve kriyoprezervan etkileridir. İyi bir kriyoprotektif ajanın toksisitesinin düşük olması, suda yüksek oranda çözünebilmesi, moleküler ağırlığının düşük olması, hücre membranlarına kolayca penetre olabilmesi gereklidir (66). Dimetil sülfoksit bu özelliklerin hepsine sahiptir. Bunların yanı sıra kriyoproteksiyon özelliği DMSO'nun su moleküllerinin kafes biçimindeki yapısını bozarak yeni bir moleküler yapı oluşturmasına da bağlanmaktadır (21).

Dimetilsülfoksit spermler, embriyolar, diğer kan ürünleri, tümör hücreleri, tümör kültür hücreleri için kriyoprezervan olarak kullanılmaktadır (21, 23). Bazı durumlarda DMSO'nun kriyoprezervan özelliğinin gliserole üstün olduğu düşünülmektedir. DMSO solüsyonunda aylar önce dondurulmuş trombositlerin otoimmünize olmuş hastalarda kullanıldığı bilinmektedir (67).

Dimetil sülfoksit ve gliserol herhangi bir sıcaklıkta, değişen molar konsantrasyonlarda, kalan donmamış solüsyonun içindeki ve hücrenin çevresindeki elektrolit konsantrasyonunu azaltarak kriyoproteksiyon yapar. Bu amaçla genellikle %10'luk DMSO, yalnız başına veya biyoantioksidan ajan olan katalaz, ya da membran stabilizör trehaloz gibi maddelerle birleştirilir. DMSO kendi kriyoprotektif özelliğinin yanında katalaz ve trehalozun da protektif özelliğini potansiyelize eder (68, 69).

DİMETİL SÜLFOKSİT VE RADYOPROTEKSİYON

Dimetilsülfoksit'in en önemli iki özelliğinden diğeri radyoproteksiyondur. Ellili yıllarda yapılan araştırmalarda daha önce keşfedilen radyoprotektif ajanların şu dezavantajları saptanmıştı:

1. Terapötik indeksin LD_{50}'ye oranı çok düşüktü. Efektif dozlar çoğu kez bileşiğin LD_{50}'sinin üçte biri ya da yarısı kadardı. Bu dozlarda ciddi histolojik yan etkiler ortaya çıkmaktaydı.
2. Bu ajanların ışınlamadan 30-45 dk önce uygulanması gerekiyordu. Işınlamadan sonra uygulamanın yararı yoktu.
3. X ışınları ile yapılan hayvan deneylerinde en etkili ilaçlar (sisteamin, serotonin) nötron ışınlamalarıyla oluşan hasarı gidermede ya hafif etkili ya da etkisiz kalıyorlardı.

Zamanla X ışınlarının radyobiyolojik etkilerine ait bilgiler arttıkça, ışınlamadan sonra suda oluşan serbest radikaller ve onları bağlayarak ortamdan uzaklaştıran (çöpçü özelliği) sistamin, sistein gibi ajanların bu özelliği radyasyondan koruma konusunda araştırmacıların ilgisini çekti.

Serbest radikalleri bağlayıcılık yani "radikal çöpçülüğü" teorisi, nötronlar veya yoğun iyonizan radyasyon yapan partiküllerle ışınlamada sistamin, sistein gibi ajanların radyoprotektif etkilerinin hafif kaldığına dair bir miktar açıklama getirmiştir. Nötron vb. partiküllerle yapılan ışınlamayla oluşan radyasyonun "direk" etkileri, "indirek" etkilerine göre aköz sistemlerde serbest radikal oluşması ile daha fazla ilişki göstermektedir. DMSO'nun basit olan yapısında içerdiği sülfür atomu sayesinde 1960'larda radyoprotektif aktivite gösterebileceğe inanılmıştır (66).

Yapılan çalışmalarda farelerde DMSO'nun LD_{50}'yi 825 raddan 1100 radın hemen altına yükselttiği, böylece doz redüksiyon faktörünü 1.33'e yükselttiği bulundu. Bu hayvanlara 4.5g/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanan DMSO'nun dozu arttırılırsa, koruyucu etkinin buna bağlı olarak artmayacağı da kaydedildi (70). Literatürde farelerle ve sıçanlarla yapılan radyoproteksiyon çalışmalarında 4.5g/kg'dan 10g/kg'a kadar farklı dozlar denenmiştir (71).

Farelerle yapılan deneylerden DMSO'nun radyasyon hasarından koruma mekanizmasının hücresel düzeyde olduğu, öncelikle fizyolojik değişiklikleri içermediği sonucuna ulaşıldı. DMSO %3'ün üzerindeki konsantrasyonlarda protein sentezini, lipit ve DNA sentezini inhibe ettiği görüldü.

Hayvanlara 4.5g/kg dozda intraperitoneal uygulandığında, in vitro ortamda ışınlanan hücrelerde, hücresel koruma için gerekli en az doza ulaşıldığı ve bu dozda injekte edilen DMSO'nun ışınlanmış farelerde, ışınlanmamış gruptakilere göre vücut ısısını 1 saatte 4.3˚C düşürerek hipotermi oluşturduğu tespit edildi. Radyoprotektif özellikleri bilinen etil ester, sistamin, homosistein, thioüre, 2:3-dimerkaptopropanol (BAL) gibi ajanların da uygulanmalarını takiben hipotermi geliştiği ve radyoprotektif etkinin sağlanmasında meydana gelen hipoterminin etkili olduğu daha önceden bildirilmişti. Radyoprotektif ajanın injeksiyonunda sonra oluşan orta derece hipoterminin, radyasyonun etkilerine karşı koruyucu olmadığı görüldü. Özel metotlar sayesinde vücut ısısının 1 veya 2 ˚ azaltılması anlamlı bir koruma sağlamaktadır. Bu durumda, radyoproteksiyondan sorumlu olan hipoterminin kendisi değil, hipotermiyi oluşturma metodu ile eşzamanlı ortaya çıkan anoksidir. Bu nedenle DMSO'nun oluşturduğu hipoksi ile radyoprotektif özelliği arasında direk bir ilişki olmadığı sonucuna varıldı (66, 71).

Araştırmalar ilerledikçe 1970 ve 1980'li yıllarda dimetil sülfoksitin memeli hücrelerindeki iyonizan radyasyonun öldürücü etkilerinden OH^- radikallerini bağlama mekanizmasıyla koruyucu özellik gösterdiği, böylece DNA kırıklarını önlediği ve kromatid kırıklarını önlediği yönündeki bulgular arttı (72, 73). Gamma radyasyon ile 1990'larda yapılan çalışmalarda ise DMSO'nun ışınlama sırasında absorbe ettiği gamma radyasyon ile kendi yapısından radikaller $(CH_2SOCH_3)^{\cdot}$ ürettiği, bu radikallerin ortamdaki hücrelerden aktivasyon transferiyle oluştuğu bulundu. Donma noktasının altındaki sıcaklıklarda yapılan ışınlamalarda, sıcaklık ortam ısısına doğru yükselirken ışınlanan hücrelerden oluşan OH radikalleri DMSO ile reaksiyona girerler. Ortam ısısı DMSO radikallerinin kararlı olduğu noktaya geldiğinde, ortamdaki OH radikalleri DMSO radikalleri ile reaksiyona girmek yerine birbirleri ile birleşerek bozunmaya uğrarlar.

Donma noktasının altındaki sıcaklıklarda yapılan ışınlamalarda, ortama aynı zamanda hidrojen atomları da meydana gelen reaktiflerdendir. Hidrojen atomları düşük sıcaklıklarda hücrelerin içine göç edebilirler. DMSO'nun yapısından ayrılan hidrojen atomları $CH_2SOCH_3^{\cdot}$ radikalinin oluşturur. Ortamdaki hidrojen atomları DNA ile reaksiyona girerek, DNA radikallerini de oluşturur. DMSO hidrojen atomları ile birleşerek gamma radyasyonun letal etkilerini önler. Işınlanan hücrelerin yapısında oluşan iyon delikleri ve/veya elektronlar DNA ile ilişkiye girerler. Açığa çıkan DNA iyonları hücre ölümünden sorumlu olabilir. Bu nedenle, ortamdaki DMSO ışınlanan hücrelerin yapısındaki iyon deliklerini kapatır ve/veya elektronları yakalarsa radyoproteksiyon sağlar. Sonuç olarak, düşük sıcaklıklarda hidrojen atomları, iyon delikleri ve elektronlar hücre dışına çıkabilir, ancak hidroksil radikali çıkamaz. DMSO düşük sıcaklıklarda hidroksil radikaline çöpçülük yapamaz ancak, hidrojen atomlarını veya hidrojen iyonlarını tutarak radyoprotektif etkisini gösterir (73, 74).

RADYASYON VE APOPTOZ

Radyasyona maruziyet sonrası apoptoz hücre ölümünün alternatif bir yolu sayılabilir. İlk kez 1972 yılında tanımlandıktan sonra değişik dokularda çalışılmıştır. İn vivo fare tümörü çalışmalarında radyoduyarlık ile apoptoz arasındaki bağlantı gösterilmekle birlikte klinik radyoterapi uygulamalarında hücre ölümüne apoptozun katkısı konusunda bilgiler yeterli değildir. Embriyoner ve hemopoetik hücreler radyasyonla karşılaştıktan sonra apoptoza giderler, epitelyal hücrelerde ise başlıca ölüm yolu mitotik ölümdür. Kantitatif çalışmalar nonhematopoetik hücrelerde hücre ölümüne yol açan başlıca yolun apoptozdan ziyade mitotik ölüm olduğunu göstermektedir (75).

Radyasyona bağlı apoptozdan sorumlu başlıca mekanizma DNA hasarı ve sonrasında AT (Ataksik Telenjiyektazi) ve p53 gibi çeşitli genlerin aktivasyonudur. Son zamanlarda hücre çekirdeği yanında hücre membranlarının da radyasyona bağlı apoptozda rol oynayabileceği gösterilmiştir (76). Bu ve benzeri mekanizmalar üzerine etkili olan kemoterapötik ajanlar radyasyonla eşzamanlı verildiğinde radyasyonun apoptoz üzerine etkisini arttırırlar ve hücre ölümüne aditif etkide bulunmuş olurlar.

Mitotik ölüm, embriyoner hücrelerinin ölümü hücresel düzeyde plazma membran permeabilitesinin artması, protein sentezinde azalma, mitokondri matrislerinde şişme, ribozom ve lizozomların çözünmesi ve hücrelerin şişerek otolizi ile karakterizedir (75).

Radyasyona bağlı ölümün ikinci şekli, hemopoetik hücrelerden özellikle lenfositlerde anlatılmıştır. İnterfaz ölümü, programlanmış hücre ölümü ya da apoptoz olarak terimlendirilir. Hücre volümünde azalma, stoplazmada yoğunlaşma, membran permeabilitesinde değişiklik, nükleer DNA'nın oligonükleozom fragmanlara bölünmesi karakteristik özellikleridir (75).

Radyasyona bağlı apoptozun subsellüler olayları artık daha açıktır. Daha önce radikal çöpçü olarak sisteaminin kullanıldığı çalışma doğrultusunda aynı özelliğe sahip DMSO'nun da ışınlama sırasında meydana gelecek apoptozu önleyebileceği düşünülmüştür (75, 77). Böylece, radyasyona bağlı apoptoziste en erken gerçekleşen subsellüler olayların, suyun radyolizinden kaynaklanan serbest radikal oluşumu olması beklenir. Bu radikallerin intrasellüler oksidatif hasar yaratarak apoptozisi uyardığı düşünülebilir. Hücrelerin ışınlanması süresince ortamda serbest radikalleri toplayan bir çöpçü ajanın varlığı potansiyel olarak tüm subsellüler makromoleküleri korur (75).

Doku kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında en duyarlı ve en hızlı metod TUNEL metodudur. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak apoptoza giden hücrelerin görüntülenmesi sağlanmaktadır (78).

Bizim de çalışmamızda radyoprotektif özelliğini araştırdığımız DMSO'nun, aynı zamanda apoptozisi engelleyici etkisini göstermek amacıyla ışınlanan akciğer dokusu ve normal akciğer dokusu TUNEL metodu ile değerlendirilmiş ve pozitif reaksiyon veren hücreler skorlanarak, apoptoz miktarındaki azalmanın gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma 2007–2009 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi (TÜTF) Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Nükleer Tıp Anabilim Dalı ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuarı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmamız TÜTF Etik Kurulu (TÜTFEK) tarafından TÜTFEK–2007/83 protokolü ile 17.05.2007 tarihinde onaylanmıştır. Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi tarafından 879 proje protokolü ile 11.09.2007 tarihinde desteklenme kararı alınmıştır.

DENEY PROTOKOLÜ

Çalışmada İstanbul Üniversitesi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ve Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarları'ndan temin edilen, ortalama ağırlıkları 2920±142 gr olan, 6-7 aylık, 20 adet Yeni Zelanda cinsi dişi tavşan kullanıldı. Başlangıçta 20 adet denek temin edildi. Grupların oluşturulması ve prosedür uygulamasının ardından takip sırasında 11 denek sağ kalmış, 9 tanesi kaybedilmiştir. Yeniden denek temin edilmesi suretiyle eksikler tamamlanmıştır. Planlanan deney prosedürünü tamamlayan denek sayısı toplamda 20'dir. Tüm tavşanların deneyin sonuna kadar 5'erli gruplar halinde havuzlarda, ortalama %50 nispi nem, 22±1 ˚C oda sıcaklığında, 12 saat gece ve 12 saat gündüz ışıklı periyodu olan ortamda bakım ve takipleri yapıldı. Tavşanların tümüne Yeni Zelanda Tavşan yemi ve su sağlandı.

Çalışmada 5'er tavşanlık 4 grup oluşturuldu.

Kontrol (KONT) Grubu: Yalnız gözlem yapılan deney grubu

Radyoterapi (RT) Grubu: Yalnızca ışınlama yapılan deney grubu

Dimetil sülfoksit+ Radyoterapi (DMSO+RT) Grubu:İntraperitoneal dimetil sülfoksit uygulamasını takiben 30 dk sonra ışınlama yapılan deney grubu

Dimetil Sülfoksit (DMSO) Grubu: Yalnızca intraperitoneal dimetil sülfoksit uygulaması yapılan deney grubu.

Çalışma süresince kontrol ve deney gruplarındaki tüm hayvanların genel durum takipleri yapıldı, gruplarına göre numaralandırıldı, tartımları yapıldı ve ağırlıklarının genel ortalaması tespit edildi.

Anestezi

Tüm deney boyunca genel anestezi için 5–10 mg/kg xylazin (Rompun, Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti., Türkiye) ve 35–50 mg/kg ketamin (Ketasol, Richter Pharma AG, Avusturya) kullanıldı.

Dimetil Sülfoksit

DMSO+RT ve DMSO gruplarındaki tavşanlara %99 Dimetil dülfoksit çözeltisi (Dimetyl sulfoxide, Merck KGa A, Darmstadt, Almanya) intraperitoneal yoldan 4.5 gr/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. DMSO+RT grubundaki hayvanlara intraperitoneal madde injeksiyonundan 30 dakika sonra ışınlama yapıldı (17, 21, 79).

Işınlama

RT, DMSO+RT gruplarındaki hayvanlar anestezileri sağlandıktan sonra beyaz köpük üzerine pron pozisyonda sabitlendi. Mecaserto marka Simics model simülatör kullanılarak 4x4.5 cm boyutlarında sağ akciğer alanı simüle edildi. Simüle edilen ilk tavşanın alan görüntülemesi için röntgen filmi çekildi. Tavşanların daha sonra gerçekleştirilen tüm simülasyonları bu röntgen filmi ile karşılaştırılarak kontrol edildi (Şekil 4). Tavşanların ön-arka kalınlığı cetvelle ölçülerek 2,5 cm (d=2,5 cm) yarı kalınlık saptandı. Kaynak-cilt mesafesi 80 cm olmak üzere 2.5 cm yarı kalınlığında doz hesaplanarak belirlenen alana ^{60}Co teleterapi cihazı (Cirus, *cis*-Bio Int., Gif Sur Yvette, Fransa) ile tek fraksiyonda 184.86 cGy/ dk doz hızında, 20 Gy ışın uygulandı.



Şekil 4. Pron pozisyonunda simülasyon filmi

^{99m}Tc- DTPA Transalveoler Klirens Sintigrafisinin Uygulanması

Tüm deney gruplarındaki tavşanlara ışınlama sonrası 14. günde ^{99m}Tc-DTPA (CIS, Fransa), 30 mCi (1110 MBq) sodyum $^{99m}TcO_4$ ile 2-3 ml serum fizyolojik içerisine şelate edildi. Şelate edilen ^{99m}Tc-DTPA ticari olarak temin edilebilen nebülizer bir rezervuarın (Venticis II, CIS, Fransa) içine konuldu. Akış hızı 6 lt/dk olan oksijenli ortamda ortalama yarıçapı 0,8µ olan aerosoller oluşturuldu. Denek tavşanların sayım hızı 250 cpm'i aşıncaya kadar, ortalama 3-6 dakikalık süre boyunca, bir yüz maskesi yardımıyla radyoaerosolleri solumaları sağlandı. Daha sonra denek tavşanlar bu düzenekten ayrılarak düşük enerjili, yüksek rezolüsyonlu kolimatör takılı gama kameranın (Orbiter; Siemens Corp., Iselin, NJ, ABD) altına yerleştirildiler. Akciğer alanlarının posterior projeksiyondan, 64x64 matriks, 1.55 zoom faktörü ile görüntüleri alınmaya başlandı. İnhalasyonun kesilmesinden sonra 15 sn'de bir görüntü olacak şekilde 10 dk boyunca akciğerlerden radyofarmasötik hareketi 64x64 matrikste bilgisayara kaydedildi.

İlk bir dakikalık görüntüler toplanarak akciğerlerin periferinde ve majör hava yollarının içine girmediği alveoler alana ait ilgi alanları belirlendi. Alveoler ilgi alanı olan bölgelerde daha saf bir görüntü elde etmek ve tüm bronşiyal aktiviteyi dışarıda bırakmak amacıyla, her akciğerin dış 1/3'lük kısmı periferal akciğer bölgesi olarak kullanıldı. Akciğerlerin iç 2/3'lük kısımları santral akciğer bölgesi olarak tanımlandı (Şekil 5).

Radyoaktivite önce ^{99m}Tc bozunması için düzeltildi ve zamanın logaritmik fonksiyonu olarak düzenlendi. Regresyon analizi ile en uygun eksponansiyel doğruya karar verildi. Pulmoner yarılanma zamanı ($t_{1/2}$) eğrinin eğiminden formülü kullanılarak hesaplandı.

$$N= N_0 e^{-kt}$$

N_0= Başlangıçtaki akciğerlerdeki aktivite

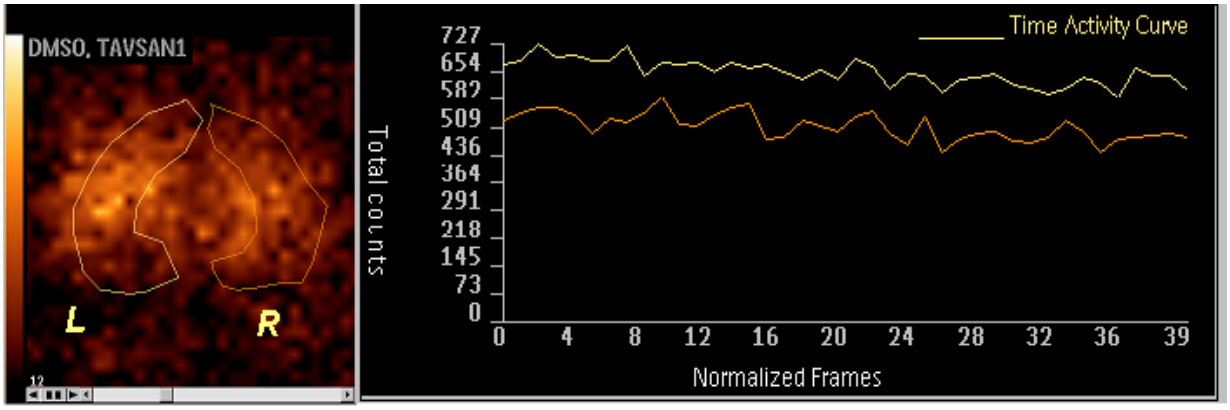
N: t anındaki aktivite

k: eğrinin eğimi

Formülden hesaplanarak elde edilen ^{99m}Tc- DTPA akciğer klirens yarılanma süresi hesaplanarak akciğerin epitelyal permeabilitesinin göstergesi olarak kullanıldı.

Sakrifikasyon

Prosedürün 15. gününde tüm gruplardaki tavşanlara 20 mg/kg dozunda intravenöz propofol (Propofol, Abbott Laboratuvarları, İstanbul, Türkiye) ile derin anestezi uygulanarak dekapitasyon ile sakrifikasyonları yapıldı.



Şekil 5. DMSO grubunda 1 no'lu tavşana ait pron pozisyonda posteriordan alınan akciğer klirens sintigrafisi görüntüsünde işaretlenmiş akciğerlere ait ilgi alanları ile zaman-aktivite eğrileri izlenmektedir

Histopatolojik doku analizi

Kontrol ve deney gruplarındaki tavşanların 15. günde sakrifikasyonlarının ardından akciğerden alınan örnekler tek tek %10 formalin içerisine konuldular, alkol ile dehidrate edildiler ve parafin içerisine gömüldüler. Mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler elde

edildikten sonra deparafinize edilerek hematoksilen eozin boyası (H&E) ile boyandılar. Akciğer dokusundan elde edilen kesitler deney prosedürüne kör bir histopatolog tarafından randomize şekilde standart ışık mikroskobu altında değerlendirildiler. Doku örnekleri peribronşiyal inflamatuvar hücre infiltrasyonu (PİHİ), alveolar septal infiltrasyon (ASİ), alveolar ödem (AÖ), alveolar eksuda (AE), intersitisyel fibrosis (İF) ve nekroz varlığına göre skorlandılar. Histopatolojik değerlendirme için Takıl ve ark tarafından geliştirilen 4 puanlı histopatolojik skorlama skalası kullanıldı (Tablo 2), (80).

Tablo 2. Histopatolojik değerlendirmede kullanılan 4 puanlı skala (80)

Parametre	0	1	2	3
Peribronşiyal inflamatuvar hücre infiltrasyonu	Yok	Germinal merkezleri belirgin lenfoid folliküller	Lenfoid folliküller arasında infiltrasyon	Sınırları belirsiz band şeklinde
Alveolar septal infiltrasyon	Yok	Minimal	Orta	Ağır, lümene doğru uzanım gösteren
Alveoler ödem	Yok	Fokal	Birden fazla alveoli içerisinde	Yaygın, lobüller oluşturan
Alveoler eksuda	Yok	Fokal	Birden fazla alveoli içerisinde	Belirgin, yaygın
İntersitisyel fibrozis	Yok	Fokal, minimal	Fokal, belirgin fibröz kalınlaşma	Yaygın, belirgin fibröz kalınlaşma
Nekroz	Yok	Fokal, birkaç nekrotik hücre	Multifokal, küçük alanlar	Geniş alanlar

Terminal dUTP yapışkan uç işaretleme yöntemi (TUNEL) kullanılarak apoptozisin in situ tanımlanması

TUNEL metodu kullanılarak, hücre çekirdeği içerisinde apoptototik hücre ölümü süresince meydana gelen DNA fragmentleri in situ olarak saptandı. Çalışma sırasında bu amaçla TdT-Fragel ^{TM} DNA Fragmentation Detection (Cat. No. QIA33, Calbiochem, USA) kiti kullanıldı. Üreticinin önerileri doğrultusunda kit hazırlandı. Beş mikron kalınlığında daha önceden hazırlanan kesitler ksilen içinde deparafinize edildi. Alkol içerisinde rehidrate

edilmelerinin ardından 20 mg/ml proteinaz K çözeltisi içerisinde 20 dakika inkübasyonları sağlandı

Uygulamanın ardından kesitler tris tampon solüsyon (TBS) ile yıkandılar. Endojen peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu için %3'lük hidrojen peroksid ile inkübe edildiler. Alınan kesitler daha sonra 10-30 saniye kadar dengeli tampon solüsyonda bekletildiler, buradan alınarak nemlendirilmiş atmosfer şartlarında 37 ^{o}C da 90 dakika TdT-enzimi ile muamele edildiler. Önceden ısıtılmış oda sıcaklığındaki tamponlu ortamda enzimin inaktivasyonu amacıyla 10 dakika inkübe edildiler, buradan bloklama tamponuna alınarak 30 dakika daha bu ortamda bekletildiler. İşlemlerin her aşaması TBS ile yıkama yapılarak sonlandırıldı ve diğer aşamaya geçildi. DNA fragmentlerinin uçları 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kullanılarak işaretlendi. Kontrast boyanma için metilen yeşili kullanıldı. Kesitler en son olarak dehidrate edildi, temizlendi ve hazır hale getirildi.

Akciğer dokusunda TUNEL pozitif olan apoptotik alveoler hücreler kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar açısından semikantitatif olarak değerlendirildi. Pozitif boyanmanın reaktivitesi; yok (0), bir kaç (1), az (2), orta (3), yüksek (4) ve çok yüksek (5) olarak değerlendirildi. Bu analiz, x400 büyütmede, her hayvan için alınan iki doku kesitinden, her akciğer kesitinde en az sekiz alanın mikroskobik değerlendirmesiyle elde edildi.

İstatistiksel Analiz

Sintigrafik bulgulara ait veriler ortalama±standart hata (SEM) şeklinde, histopatolojik bulgulara ait veriler medyan (min-max) şeklinde ifade edildi. Gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemek için Kruskal Wallis testi kullanıldı, anlamlı farklılık saptandığında farklılığın hangi grup/gruplardan kaynaklandığını belirlemede Bonferroni ve Mann Whitney-*U* testleri kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

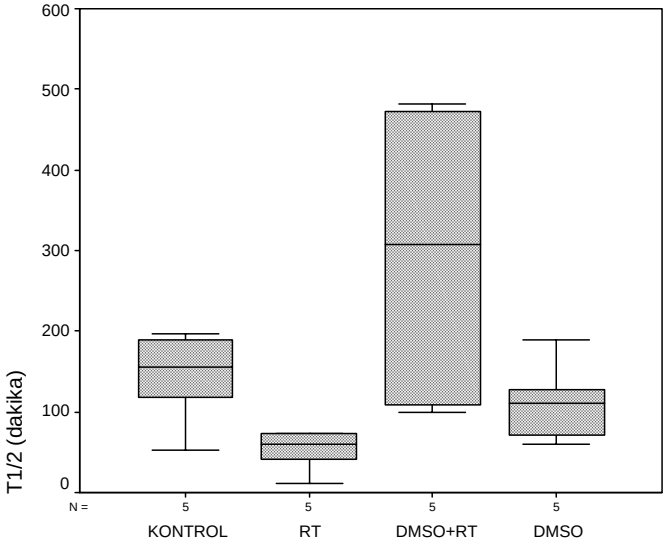
^{99m}Tc- DTPA AKCİĞER KLİRENS SİNTİGRAFİSİ BULGULARI

Tablo 3'te Şekil 6'da her grup için sintigrafik değerler ve karşılaştırma sonuçları verilmiştir. Klirens sintigrafisi $t_{½}$, yarılanma zamanının gruplar arası karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında; tüm gruplar için ortalama±SEM değeri 154.8±28.9 dk (p=0.023) olarak bulundu. DMSO+RT grubu ile RT grubu karşılaştırıldığında, klirens yarılanma zamanındaki uzama istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.026), buna rağmen KONT, RT ve DMSO gruplarında bu grupların kendi içlerinde yapılan karşılaştırmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları (p>0.05) görüldü.

Tablo 3. Gruplardaki ^{99m}Tc- Dietilentriaminpentaasetik Asit Akciğer Klirensi Dağılımı ve *p* değerleri

Sintigrafik Değerlendirme	KONT	RT	DMSO+RT	DMSO	*p*# değeri
$t_{½}$ klirensi (dk)	142.4±26.2	71.8±27.3	293.6±83.5¶	111.6±22.9	0.023

¶ p<0.05, RT grubu ile karşılaştırılınca
# Kruskal Wallis testi (Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.)
KONT: Kontrol; **RT:** Radyoterapi; **DMSO:** Dimetil sülfoksit

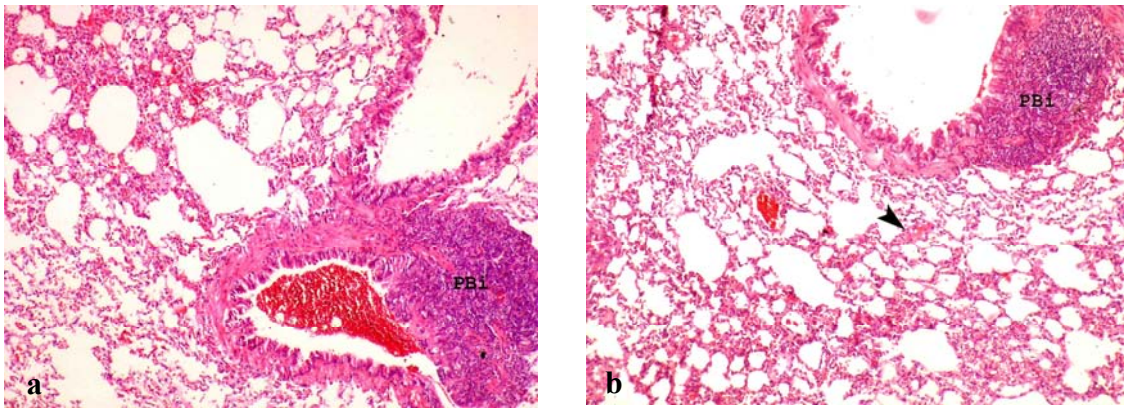


Şekil 6. Sintigrafik t ½ yarılanma zamanının gruplara göre seyri

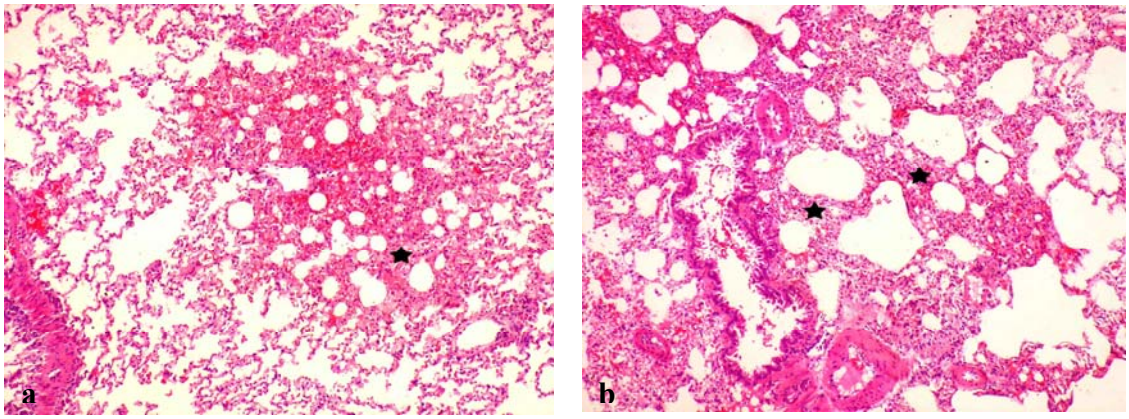
HİSTOPATOLOJİK İNCELEMENİN BULGULARI

Hematoksilen & Eozin Boyama Bulguları

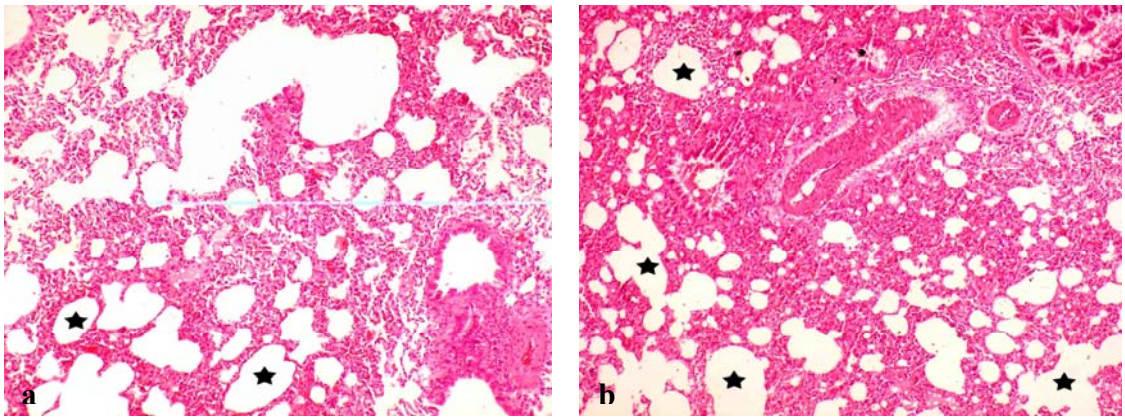
Tablo 4'te her grup için histopatolojik skorlama ve karşılaştırma sonuçları verilmiştir. DMSO+RT ve RT grupları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece alveoler eksuda da görülmüştür, peribronşiyal infiltrasyonda istatistiksel anlamlılık olmasa da eğilim mevcuttur (p=0.058) (Şekil 7). Diğer parametrelere bakıldığında, DMSO+RT grubunda radyoterapiye bağlı hasarda azalma görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır (Şekil 8-10).



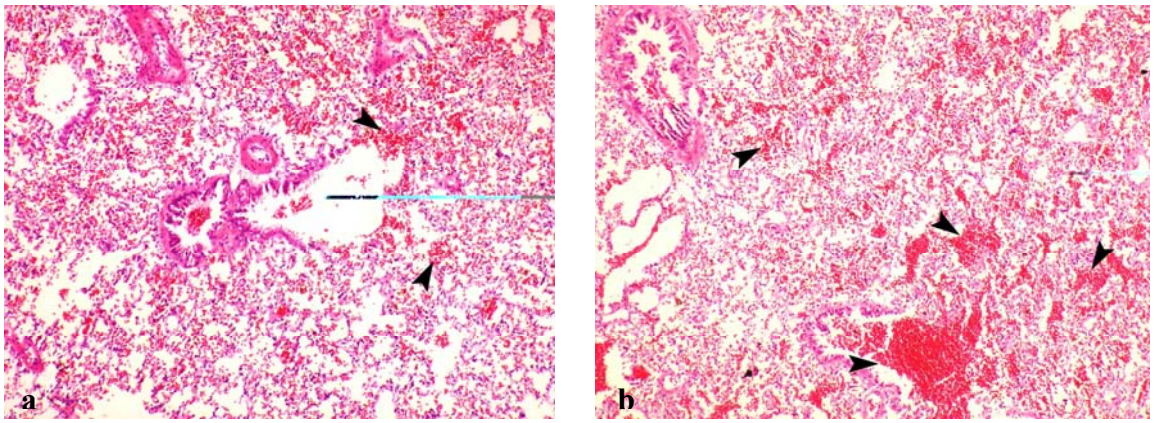
Şekil 7. Dimetil sülfoksit+ Radyoterapi grubu (a) Radyoterapi grubu (b) ile karşılaştırıldığında peribronşiyal inflamatuvar hücre infiltrasyonunda azalma ve alveoler eksudasyonda tama yakın iyileşme izlenmektedir (H&E, x200)



Şekil 8. Dimetil sülfoksit+ Radyoterapi grubu (a) Radyoterapi grubu (b) ile karşılaştırıldığında alveoler septal infiltrasyonunda azalma izlenmektedir (H&E, x200)



Şekil 9. Dimetil sülfoksit+ Radyoterapi grubu (a) Radyoterapi grubu (b) ile karşılaştırıldığında alveoler ödem miktarında azalma izlenmektedir (H&E, x200)



Şekil 10. Dimetil sülfoksit+ Radyoterapi grubu (a) Radyoterapi grubu (b) ile karşılaştırıldığında akciğer parankiminde hemorajik odaklarda azalma izlenmektedir (H&E, x200)

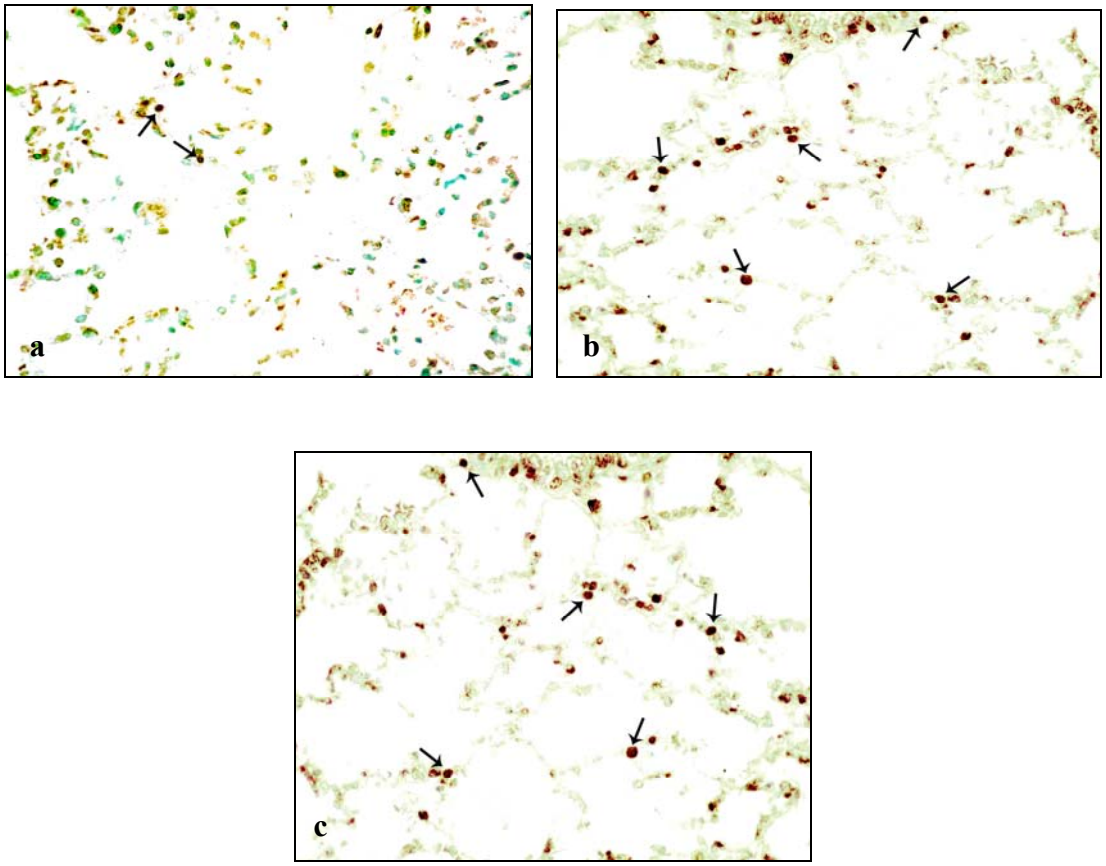
Tablo 4. Her grup için akciğer dokusunun histopatolojik skorlaması ve *p* değerleri

	KONT	RT	DMSO+RT	DMSO	*p*[#] değeri
Medyan birim skoru					
Peribronşiyal İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	0 (0-0) [§]	2 (2-3)	2 (1-2)	0 (0-0) [§]	<0.001
Alveoler Septal İnfiltrasyon	0 (0-0) [§]	2 (1-3)	1 (1-2)	0 (0-0) [§]	<0.001
Alveoler ödem	0 (0-0) [§]	2 (1-3)	1(1-2)	0 (0-0) [§]	<0.001
Alveoler Eksuda	0 (0-0) [§]	1 (1-2)	0 (0-1)[¥]	0 (0-0) [§]	0.003
İntersitisyel Fibrozis	0 (0-0) [§]	2 (1-3)	1 (0-2)	0 (0-0) [§]	0.002
Nekroz	0 (0-0) [§]	2 (1-3)	1 (1-2)	0 (0-0) [§]	<0.001
TUNEL testi	2 (1-3) [§]	5 (5-5)	3 (2-5)[¥]	2 (1-3) [§]	0.006

§ p<0.001, RT grubu ile karşılaştırılınca
¥ p<0.05, RT grubu ile karşılaştırılınca
#Kruskal Wallis testi (Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.)
Değerler ortalama (min-max) olarak ifade edildi.
KONT: Kontrol; **RT:** Radyoterapi; **DMSO:** Dimetil sülfoksit

TUNEL Testi Bulguları

Dimetil sülfoksit+Radyoterapi ile RT grubu karşılaştırıldığında, (Tablo 5) iki grup arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (p=0.018). Dimetil sülfoksit uygulaması ile TUNEL pozitif olan hücrelerin sayısında ve reaktivitesinde anlamlı bir azalma saptanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. Dimetil sülfoksit uygulanması alveoler hücrelerdeki terminal dUTP yapışkan uç işaretleme yöntemi ile boyanma pozitifliğinde belirgin azalma izlenmektedir. Dimetil sulfoksit grubu (a), Radyoterapi grubu (b), Dimetil sülfoksit+Radyoterapi grubu (c) (TUNEL boyama, x400)

TARTIŞMA

Radyasyona bağlı hasarın erken tanınması, klinikte genel populasyonun tedavi dozu yerine hastanın normal doku sensitivite profiline göre tedavi rejiminin kişiselleştirilmesine imkân verir. Akciğerde radyasyona bağlı oluşan hasarı tedavinin etkinliğini değiştirmeden, akciğerin yapısına zarar vermeden önleyebilecek protektör bir ajanın radyoterapiye eklenmesi hem tedaviden alınacak verimi arttıracak, hem de maliyeti düşürecektir (34).

Radyasyona bağlı hücre ölümü, kısmen serbest radikallerin DNA, RNA, proteinler ve hücre membranları ile reaksiyona girerek hücresel hasar oluşturmasından kaynaklanır. Bu reaksiyonlar hem normal hücrelerde, hem de tümör hücrelerinde meydana gelir. Serbest radikalleri bağlamak üzere bazı farmakolojik ajanların kullanılmasıyla, normal hücreler korunurken, biyokimyasal olarak farklılık gösteren tümör hücreleri radyasyonun etkilerine daha açık hale gelirler (6).

Literatürde radyasyona bağlı akciğerdeki akut hasarın önlenmesinde kullanılan protektör ajanların etkilerini göstermek için DTPA klirens sintigrafisi, solunum fonksiyon testleri, bronkoalveoler lavaj gibi yöntemler kullanılmıştır (5, 7, 10). Bu yöntemler içerisinde noninvaziv ve basit olduğu için DTPA klirens sintigrafisi ilgi çekici bir yöntem olabilir. ^{99m}Tc-DTPA kompleksinin alveoler yüzeyden klirensi, alveoler kapiller membran boyunca oluşan konsantrasyon farkına ve difüzyon uzaklığına yada epitel duvar kalınlığına bağlıdır (25). Erken dönemde alveollerdeki inflamatuvar değişikliklerin fazına göre DTPA klirensinin uzaması veya kısalması söz konusudur (81, 82, 83). Çalışmamızda DMSO+RT grubu ile RT grubu karşılaştırıldığında, klirens yarılanma zamanındaki uzama istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak, KONT, RT ve DMSO gruplarında, bu grupların kendi içlerinde yapılan karşılaştırmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları görülmüştür.

Günümüzde amifostin, radyoprotektör özelliği en çok çalışılan ajanlardan birisidir. Uzal ve ark. (5)., DTPA klirens sintigrafisi ile amifostinin radyasyona bağlı erken akciğer hasarında koruyucu özelliğini araştırdıkları çalışmalarından elde ettikleri sonuçlar ile akciğer epitelyal permebilitesinin amifostin uygulanmasından pozitif etkilendiğini hayvan modelinde göstermişlerdir.

Pentoksifilin, bir metilksantin derivesidir. Radyoprotektif özelliğini interlökin-1, tümör nekroze edici faktör ve trombosit agregasyonunun inhibisyonu üzerinden göstermektedir. Pentoksifilinin radyasyona bağlı akciğer hasarının hem akut, hem geç döneminde koruyucu olduğu bildirilmiştir (9). Klinikte bu etkisini Öztürk ve ark. (84) akciğer ve meme kanseri hastalarında DTPA klirens sintigrafisi ile incelemişlerdir. Pentoksifilinin akut ve kronik dönemde, akciğerin tümünde epitelyal permeabiliteyi pozitif etkilediğini rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar bize radyoterapiye bağlı akut akciğer hasarında DMSO uygulanmasının diğer protektör ajanlar amifostin ve pentoksifilin gibi epitel geçirgenliği üzerine pozitif etkisi olabileceğini düşündürtmüştür.

Radyasyona bağlı akut akciğer hasarında karakteristik olarak alveol duvarını döşeyen epitel hücrelerinde ve damar duvarlarındaki endotel hücrelerinde hasar meydana gelir (7, 85). Bu fazda hem insanlarda hem de deney hayvanlarında gözlenen temel histolojik lezyon inflamasyon ve alveoller ile intersitisyumda gözlenen ödemdir. Alveollerde inflamatuvar hücre birikimi ile proteinden ve fibrinden zengin eksuda göllenir. Fokal nekrozlar gelişebilir ve bunların organize olması sonucunda damar trombüsleri ile intraolveoler kanamalar mikroskobik incelemede görülebilir (29, 85). Çalışmamızda RT grubunda akciğerdeki hasarın göstergesi olarak peribronşiyal inflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveoler septal infiltrasyon, alveollerde ödem ve eksuda, intersitisyel fibrozis ve nekroz tespit edilmiştir. DMSO+RT ve RT grupları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece alveoler eksudada görülmüştür, peribronşiyal infiltrasyonda istatistiksel anlamlılık olmasa da eğilim mevcuttur. Akut hasarda DMSO uygulanması bronşiyollerin çevresindeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, alveollerdeki ödemi, intersitisyumdaki fibrozis ve nekrozu istatistiksel anlamlı etkilemese de hasarda azalma gözlenmiştir. Bunun nedeninin örneklem sayısında azlık ya da ilaç dozu ve uygulama şekli ile ilgili olabileceği kanısındayız.

Literatürdeki çalışmalarla DMSO'nun yapısında içerdiği sülfür ve hidrojen atomlarıyla ortamdaki suyun radyohidrolizinden gelen aköz elektronu ve hidroksil radikalini bağlayarak onları ortadan kaldırması ile radyoprotektif özellik gösterdiği bildirilmiştir (17, 21). Günümüze kadar DMSO'nun hayvan modellerindeki proteksiyon çalışmaları cilt, testis, dalak, bağırsak, göz, lenf nodları gibi organlarda ve kemik iliği, böbrek, fibroblast, üreme

hücre kültürlerinde yapılmıştır (17-21). İnsanlarda yapılan sınırlı çalışmalara böbrek, akciğer hücre kültürlerindekiler örnek verilebilir (17, 19, 20). Klinikte ise Neklasova ve ark. (86)'nın serviks kanserli hastalarda yaptığı çalışma ile DMSO'nun farklı konsantrasyonlarında rektum ve mesanede yüksek doz radyasyona bağlı hasarı önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada DMSO'in konsantrasyonu arttıkça, koruyucu etkisinin de arttığı kaydedilmiştir.

Dimetil sülfoksitin ışınlama öncesi uygulanmasının akciğerdeki akut hasar bulgularını azaltmasında protektör özelliklerinden antiiflamatuvar etkisinin de ön planda olduğu görüşündeyiz. Literatürde Brayton (21) ve Ashwood-Smith (87) yaptıkları derlemelerde DMSO'nun inflamatuvar hücre göçünü engellediğini, sitokin cevabının modülasyonunda rol oynadığını, antikor üretimini inhibe ettiğini, özellikle kronik koşullarda fibroblast proliferasyonunu önlediğini bildirmişlerdir ve bunların bulgularımızla uyumlu olduğunu görmekteyiz.

Apoptoz normal veya patolojik koşullarda yaygın olarak görülen, kromatin kondensasyonu ve DNA'nın endonükleaz aktivitesi ile 180 baz çiftlik fragmanlara ayrıldığı genlerle idare edilen programlanmış hücre ölümüdür. Radyasyon serbest radikal oluşumu yoluyla DNA hasarını tetikler, apoptozisi aktive eder. Bunun yanında aktive olan maktofajlardan salınan sitokinler apoptoz genlerini uyarırlar. Doku kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında kulanılan TUNEL yöntemi literatürde son yıllarda oldukça kabul görmektedir (78). Araştırmacılar iyonizan radyasyonla değişik hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmalarda DMSO'nun apoptozu önlemedeki mekanizmasının da ortamdaki hidroksil radikallerini temizlemesi olduğunu düşünmüşlerdir (75, 77).

Çalışmamızda TUNEL testi değerlendirmesinde DMSO grubunda elde edilen TUNEL pozitifliği değerleri, KONT grubunun değerlerine benzerdi ve aralarında istatistiksel anlamlı bir farklılık yoktu. DMSO'nun normal dokuya uygulandığında apoptozu önemli derecede engellemediği düşünüldü. Beklenilen şekilde RT grubundaki doku kesitlerine ait hücrelerde TUNEL pozitifliği belirgin derecede artmıştı. DMSO+RT ile RT grubu karşılaştırıldığında, DMSO uygulamasının apoptozu belirgin derecede azalttığı görülmüştür ve azalma istatistiksel analizde de anlamlıdır.

Burada sunduğumuz çalışmamız, son otuz yıla ait literatür taramamızda DMSO'nun radyasyona bağlı akut akciğer hasarına karşı koruyuculuğunun hayvan modelinde değerlendirildiği tek çalışmadır. Çalışmamızın en önemli kısıtlaması DMSO'nun tek bir konsantrasyonda ve az sayıda denek ile çalışılmış olmasıdır. Farklı konsantrasyonlarda DMSO ve daha fazla sayıda denek ile yapılacak çalışmalar hasara ait bulguların şiddetindeki

iyileşmeyi daha detaylı ortaya koyabilir. DMSO'nun farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin akciğer üzerindeki radyoprotektif etkisinin ve bu etkiyi hangi mekanizmalarla gerçekleştirdiğinin aydınlatılması için yeni çalışmalara gerek vardır.

SONUÇLAR

Dimetil sülfoksitin radyasyona bağlı akciğer hasarında akut dönemdeki (14.günde) koruyucu etkisinin sintigrafik ve histopatolojik yöntemlerle değerlendirilmesini amaçladığımız bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar çıkarılmıştır:

1. Dimetil sülfoksitin ışınlamadan 30 dk önce intraperitoneal yoldan uygulanması ışınlamadan sonraki 14 günde, DMSO+RT grubunda RT grubuna göre DTPA klirensinde uzamaya neden olmuştur.
2. Sintigrafik değerlendirmede KONT, RT, DMSO gruplarında, bu grupların kendi içlerinde yapılan karşılaştırmaların istatistiksel anlamlı olmadıkları görüldü.
3. Akciğer parankimine DMSO tek başına uygulandığında, KONT grubu ile karşılaştırıldığında sintigrafik ve histopatolojik değerlendirmede, klirens süreleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır. DMSO'in radyoproteksiyon görevini akciğer dokusuna hasar vermeden gerçekleştirdiği gösterilmiştir.
4. Histopatolojik değerlendirmede DMSO+RT grubu ile RT grubu karşılaştırıldığında alveoler eksuda şiddetinde istatistiksel anlamlı azalma gözlenmiştir.
5. Histopatolojik değerlendirmede DMSO+RT grubu ile RT grubu karşılaştırıldığında peribronşiyal inflamatuvar hücre infiltrasyonunda istatistiksel anlamlılık olmasa da, eğilim mevcuttur.
6. Histopatolojik değerlendirmede akciğerdeki akut hasara ait diğer bulgularda (alveoler septal infiltrasyon, alveoler ödem, intersitisyel fibrozis ve nekroz) istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da azalma gözlenmiştir.

7. Akciğerde radyasyona bağlı akut hasarda meydana gelen apoptozun değerlendirildiği TUNEL boyamasında DMSO+RT grubu ile RT grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO uygulamasının apoptozu belirgin derecede azalttığı görülmüştür ve azalma istatistiksel analizde de anlamlıdır.

ÖZET

Toraks bölgesine uygulanan radyoterapide akciğerin radyosensitvitesi doz kısıtlayıcıdır. Radyasyonun akciğerde oluşturduğu hasarın erken dönemde tanınması, hastanın normal doku sensitivite profiline göre tedavi rejiminin kişiselleştirilmesini sağlar. Radyasyona bağlı akciğer hasarının gelişiminde serbest oksijen radikalleri başrolü oynar. Bu radikalleri bağlayarak ortamdan çeken radyoprotektör özellikli farmakolojik ajanlardan dimetil sülfoksit literatürde ilgi çekici araştırma konulardandır.

Çalışmamızda tavşanlarda dimetil sülfoksitin erken dönem radyasyona bağlı akciğer hasarında koruyucu etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Denekler kontrol, radyoterapi, dimetil sülfoksit ardından radyoterapi ve yalnızca dimetil sülfoksit şeklinde gruplandırılmıştır. Radyoterapi planlanan gruplarda sağ hemitoraksa tek fraksiyonda 20 Gy radyoterapi uygulanmıştır. Dimetil sülfoksit ve dimetil sülfoksit ardından radyoterapi grubuna, ışınlamadan 30 dk önce 4.5 gr/kg %99 dimetil sülfoksit, intraperitoneal yoldan verilmiştir. Ondört günlük izlem sonunda ^{99m}Teknesyum dietilentriaminpentaasetik asit klirens sintigrafileri çekilmiş, sakrifikasyon sonrası histopatolojik inceleme yapılmıştır.

Sintigrafik incelemede ışınlama öncesi dimetil sülfoksit uygulanması, radyoterapi grubuna göre klirens yarılanma zamanında istatistiksel olarak anlamlı uzamaya neden olmuştur ($p<0.026$). Histopatolojik incelemede ışınlamadan önce dimetil sülfoksit uygulanmasıyla, radyoterapi grubuna göre radyasyona bağlı hasar bulgularında, azalma tespit edilmiş olup, alveoler eksuda da istatistiksel olarak anlamlı, peribronşiyal inflamasyonda ise eğilim gözlenmiştir. Yapılan terminal dUTP yapışkan uç işaretleme yöntemi testinde dimetil sülfksit uygulanmasının ışınlama ile aktive olan apoptozu belirgin olarak azalttığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0018$).

Radyoterapi öncesi dimetil sülfoksit uygulanmasının radyoterapiye bağlı akciğer hasarında koruyucu etkisinin olabileceği ve bu konuda yeni çalışmaların yapılması gerekliliği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Dimetil sülfoksit, radyoprotektif ajan, radyasyona bağlı akut akciğer hasarı

THE RADIOPROTECTIVE EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE IN RADIATION-INDUCED PULMONARY INJURY: DETECTION BY ^{99M}TECHNETIUM DIETHYLENEAMINEPENTAACETIC ACID TRANSALVEOLAR CLEARANCE SCINTIGRAPHY AND HISTOPATHOLOGY

SUMMARY

The radiosensitivity of the lung is a dose-limiting factor in thoracic irradiation. Early prediction of radiation-induced lung injury is important to customize treatment regimen for each individual according to patient's normal tissue sensitivity profile. Radical oxygen species have a pivotal role in radiation-induced lung injury. Radioprotective agent dimethyl sulfoxide, which scavenges these species, is an interesting issue in the literature.

The aim of this study is to evaluate the radioprotective effect of dimethyl sulfoxide in acute phase of radiation-induced lung injury on an animal model. The rabbits were grouped as control, radiation-alone, dimethyl sulfoxide plus radiation, and dimethyl sulfoxide-alone. Right hemithoraxes of radiation-alone and dimethyl sulfoxide plus radiation groups were irradiated by single dose of 20Gy gamma radiation. Thiry minutes prior to irradiation, 99% dimethyl sulfoxide was applied to dimethyl sulfoxide plus radiation and dimethyl sulfoxide-alone groups at a dose of 4.5gr/kg, ip. After 14 days follow-up, ^{99m}Technetium diethyleneaminepentaacetic acid lung clearance scintigraphy was performed. Following sacrification, tissue specimens were assessed histopathologically.

On scintigraphic assessment, dimethyl sulfoxide application prior to irradiation prolonged the diethyleneaminepentaacetic acid clearance time in dimethyl sulfoxide plus radiation group when compared to radiation-alone group at a statistically significant level ($p<0.026$). Histopathologic evaluation revealed a decrease in the severity of radiation-induced lung injury. In dimethyl sulfoxide plus radiation group, when compared to radiation-alone group. The decrease in alveolar edema was statistically significant, and there was a trend in peribronchial inflammatory cell infiltration. Terminal dUTP nick end labeling index showed a markedly decrease in dimethyl sulfoxide plus irradiation group, when compared to radiation-alone group and this decrease was found to be statistically significant ($p=0.018$).

The results of our study suggest that dimethyl sulfoxide appears to be a protective agent against radiation-induced lung injury. Additional work is needed to better identify the effectiveness of dimethyl sulfoxide as radioprotective agent in radiation associated lung injury.

Key words: Dimethyl sulfoxide, radioprotective agent, radiation-induced lung injury

KAYNAKLAR

1. Tsujino K, Hirota S, Endo M, Obayashi K, Kotani Y, Satouchi M, et al. Predictive value of dose-volume histogram parameters for predicting radiation pneumonitis after concurrent chemoradiation for lung cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003 Jan 1; 55(1): 110-5.

2. Lind PA, Marks LB, Hollis D, Fan M, Zhou SM, Munley MT, et al. Receiver operating characteristic curves to assess predictors of radiation-induced symptomatic lung injury. Int J Radiat Oncol Biol Pyhs 2002 Oct 1;54(2):340-7.

3. Kong FM, Anscher MS, Sporn TA, Washington MK, Clough R, Barcellos-Hoff MH, et al. Loss of heterozygosity at the mannose 6-phosphate insulin-like growth factor 2 receptor (M6PI/IGF2R) locus predisposes patients to radiation-induced lung injury. Int J Radiat Oncol Biol Pyhs 2001;49:35-41.

4. Morgan GW, Breit SN. Radiation and the lung: A reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. Int J Radiat Oncol Biol Pyhs 1995;31:361-9.

5. Uzal C, Durmuş-Altun G, Caloglu, Ergülen A, Altaner S, Yigitbasi NO. The protective effect of amifostine on radiation-induced acute pulmonary toxicity: Detection by ^{99m}Tc-DTPA transalveolar clearances. Int. J Radiat Oncol Biol Phys 2004;60(2):564-9.

6. Mao J, Fotunase OA, Marks LB. Cytoprotection for radiation-associated normal tissue injury. In: Bentzen, S.M.; Harari, P.M.; Tomé, W.A.; Mehta, M.P. (Eds.) Radiation Oncology Advances Springer Verlag ;2007:302-22.

7. Vujaskovic Z, Feng QF, Rabbani ZN, Samulski TV, Anscher MS, Brizel DM. Assessment of the protective effect of amifostine on radiation-induced pulmonary toxicity. Exp Lung Res 2002;157: 577-90.

8. Misirlioglu CH, Demirkasimoglu T, Kucukplakci B, Sanri E, Altundag K. Pentoxifylline and alpha-tocopherol in prevention of radiation induced lung-toxicity in patients with lung cancer Med Oncol 2007;24(3): 308-11.

9. Bese NS, Munzuroglu F, Uslu B, Arbak S, Yesiladali G, Sut N, et al. Vitamin E protects against the development of radiation-induced pulmonary fibrosis in lungs. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2007 May; 19(4): 260-64.

10. Redlich CA, Rockwell S, Chung JS, Sikora AG, Kelley M, Mayne ST. Vitamin A inhibits radiation-induced pneumonitis in rats. J Nutr 1998 Oct; 12(10): 1661-4.

11. Trajković S, Dobrić S, Jaćević V, Dragojević-Simić V, Milovanović Z, Dordević A. Tissue protective effects of fullerenol C60(OH)24 and amifostine in irradiated rat. Colloids Surf B Biointerfaces 2007 Jul 1; 58(1):39-43.

12. Mansour HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. Pharmacol Res 2006 Sep; 54(3):165-71.

13. Guney Y, Turkcu UO, Hicsonmez A, Andrieu MN, Guney HZ, Bilgihan A, et al. Carnosine may reduce lung injury caused by radiation therapy. Med Hypotheses 2006; 66(5):957-59.

14. Han G, Zhou YF, Zhang MS, Cao Z, Xie CH, Zhou FX, et al. Angelica sinensis down-regulates hydroxyproline and Tgfb1 and provides protection in mice with radiation-induced pulmonary fibrosis. Radiat Res 2006 May; 165(5): 546-52.

15. Sener G, Kabasakal L, Atasoy BM, Erzik C, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, et al. Gingko biloba extract protects against ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats. Pharmacol Res 2006 Mar; 53(3): 241-52.

16. Serin M, Gulbas H, Gurses I, Erkal HS, Yucel N. The histopathological evaluation of the effectiveness of melatonin as a protectant against acute lung injury induced by radiation therapy in a rat model. Int J Radiat Biol. 2007 Mar; 83(3): 187-93.

17. Ashwood-Smith MJ. Current concepts concerning the radioprotective and cryoprotective properties of dimethylsulfoxide in cellular systems. AnnNYAcad Sci 1967;141: 45-62.

18. Wallicka MA, Adelstein SJ, Kassis AI. Indirect mechanisms contribute to biological effects produced by decay of DNA-incorporated iodine-125 in mammalian cells in vitro: clonogenic survival. Radiat Res 1998 Feb; 14(2): 142-6.

19. Raaphorst GP, Azzam EI. Fixation of radiation induced potentially lethal damage by an isotonic treatment and its modification by DMSO or BrdUrd in V79 cells. Radiat Environ Biophys 1985; 24(3): 174-84.

20. Chen HH, Jia RF, Yu L, Zhao MJ, Shao CL, Cheng WY. Bystander effects induced by continuous low-dose-rate 125 I seeds potentiate the killing action of irradiation on human lung cancer cells in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Pyhs 2008 Dec 1;72(5): 1560-6.

21. Flagg Brayton C. Dimethyl Sulfoxide: A review. Cornell Vet 1986;76:61-90.

22. Hayashi M, Hamasu T, Turukame M,Endoh D, Okui T. Higher sensitivity in induction of apoptosis in fibroblast cell lines derived from LEC strain rats to ultraviolet B radiation. J Vet Med Sci 2001 Jul; 63(7):709-13.

23. Lin CK, Kalunta CI, Chen FS, Nguyen TT, Kaptein JS, Lad PM. Dimethyl sulfoxide suppresses apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. Exp Cell Res 1995 Feb;216(2):403-10.

24. Ghafoori P, Marks LB, Vujaskovic Z, Kelsey CR. Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention. Oncology (Williston Park) 2008 Jan;22(1): 37-47.

25. Coates G, O'Brodovich H. Measurements of pulmonary epithelial permeability with 99m Tc-DTPA aerosol. Semin Nucl Med 1986;275-84.

26. O'Doherty MJ, Peters AM. Pulmonary technetium-99m diethylene triamine penta-acetic acid aerosol clearance as an index of lung injury. Eur J Nucl Med 1997;24:81-7.

27. Marks LB, Yu X, Vujaskovic Z, Small W JR, Folz R, Anscher MS. Radiation Induced Lung Injury. Semin Radiat Oncol. 2003 July;13(3):333-45.

28. Arseven O, Tabak L. Arseven O (Editör). Akciğer Hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2002:1-19.

29. Tsoutsou P, Koukourakis MI. Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research. Int. J Radiation Oncology Biol Phys 2006;66(5):1281-93.

30. Guyton AC. (Çeviri: H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen, Z. Aydın, İ. Alican). Tıbbi Fizyoloji.10. Baskı, Yüce Yayınları, 2001:432-43.

31. Guyton AC. (Çeviri: H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen, Z. Aydın, İ. Alican). Tıbbi Fizyoloji 10. Baskı, Yüce Yayınları, 2001:444-50.

32. Guyton AC, (Çeviri: H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen, Z. Aydın, İ. Alican). Tıbbi Fizyoloji.10.Baskı, Yüce Yayınları, 2001:452-62.

33. Fuster MM. Radiation-induced lung disease. In: Bordow RA, Ries AL, Morris TA. (Eds.) Manual of Clinical Problems in Pulmonary Medicine, Lippincott-Williams&Wilkins 6th Edition, 494-5.

34. Kong FM, Ao X, Wang L, et al. The use of blood biomarkers to predict radiation lung toxicity: a potential strategy to individualize thoracic radiation therapy. Cancer Control. 2008 Apr; 15(2):140-50.

35. Coggle JE, Lambert EB, Moores SR. Radiation effects in the lung. Environ Health Perspect 1986 Dec;70:261-91.

36. Abid SH, Malhotra V, Perry M. Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. Curr Opin Oncol 2001 Jul;13(4):242-8.

37. Mah K, Dyk JV, Keane T, Poon PY. Acute radiation-induced pulmonary damage: A clinical study on response to fractionated radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1987 Feb;13(2):179-88.

38. Garipagaoglu M, Munley MT, Hollis D, Poulson JM, Bentel GC, Sibley G, et al. The effect of patient-specific factors on radiation induced regional lung injury. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999;45(2)331-8.

39. Marks LB, Fan M, Clough R, Munley M, Bentel G, Coleman RE, et al. Radiation induced pulmonary injury: symptomatic versus subclinical endpoints. Int J Radiat Biol 2000 Apr;76(4):469-75.

40. Vujaskovic Z, Groen HJM. TGF-β, radiation induced pulmonary injury and lung cancer. Int J Radiat Biol 2000 Apr;76(4):511-6.

41. Delanian S, Balla-Mekias S, Lefaix JL. Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol. J Clin Oncol 1999 Oct;17(10):3283-90.

42. Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, Ward WF, Fish BL, Taylor JM, et al. Control of radiation induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blocker. Int J Radiat Biol Phys 2000;76:523-32.

43. Chen MF, Keng PC, Lin PY,Yang CT, Liao SK, Chen WC. Caffeic acid phenethyl ester decreases acute pneumonitis after irradiation in vitro and in vivo. BMC Cancer 2005 Dec 9;5:158-66.

44. Akkaynak S. Solunum Hastalıkları, Temel Bilgiler ve Tanı İlkeleri. Ankara Taş Kitapevi, 1980:413-5.

45. Kawakami K, Tominaga S, Takagi H, Mori Y, Gotou E, Iwamura A, et al. Pulmonary clearance of 99mTc-HMPAO aerosol. Kaku İgaku 1990 May;27(5):451-7.

46. Mouratidis B, Lising J, Nogrady S, Hurwitz M. Increased pertechnegas lung clearance in interstitial lung disease. Clin Nucl Med 1999 Feb;24(2):105-8.

47. Thomeer MJ, Dehoes B, Mortelmans L, Demedts M. Pertechnegas lung clearance in different forms of intersititial lung disease. Eur Respir J 2002 Jan;19(1):31-6.

48. Meignan M, Rosso J, Leveau J, Katz A, Cinotti L, Madelaine G, et al. Exercise increase the lung clearance of inhaled Tecnetium-99m DTPA. J Nucl Med. 1986;27:274-80.

49. Kao CH, Wang RC, Lin HT, Yu SL, Wang SJ, Chiang CD. Alveolar integrity in pulmonary emphysema using Technetium-99-m-DTPA and Technetium-99-m-HMPAO radioaerosol inhalation lung scintigraphy. J Nucl Med 1995;36:68-72.

50. Rosso J, Guillon JM, Parrot A, Denis M, Akoun G, Mayaud C, et al. Technetium-99-m-DTPA aerosol and gallium-67 scanning in pulmonary complications of human immunodeficiency virus infection. J Nucl Med 1992;33:81-7.

51. Susskind H, Weber DA, Wolkov ND, et al. Increased lung permeability following long-term use of free-base cocaine (crack). Chest 1991;100:903-9.

52. Tägil K, Evander E, Wollmer P, Palmer J, Jonson B. Efficient lung scintigraphy. Clin Physiol 2000 Mar;20(2):95-100.

53. Lin WY, Kao CH, Wang SJ. Detection of acute inhalation injury in fire victims by means of technetium-99-m DTPA radioaerosol inhalation lung scintigraphy. Eur J Nucl Med 1997;24:125-9.

54. Kao CH, Hsieh JF, Ho YJ, Hung DZ, Lin TJ, Ding HJ. Acute paraquat intoxication using nuclear pulmonary studies to predict outcome. Chest 1999 Sep;116(3):709-14.

55. Fanti S, De Fabritiis A, Aloisi D, Dondi M, Marengo M, Compagnone G, et al. Early pulmonary involvement in systemic sclerosis assessed by technetium-99-m-DTPA clearance rate. J Nucl Med 1994 Dec;35(12): 1933-6.

56. Caner B, Ugur O, Bayraktar M, Ulutuncel N, Mentes T, Telatar F, et al. Impaired lung epithelial permeability in diabetics detected by Technetium-99-m DTPA aerosol scintigraphy. J Nucl Med 1994;35:204-6.

57. Erdem S, Burak Z, Ozmen B, Derebek E, Ozcan Z, Duman Y. 99mTc-DTPA aerosol scintigraphy in the evaluation of pulmomary epithelial permeability in diabetes mellitus. TJNM 1994;3(3): 118-22.

58. Yuksel M, Sailoglu YS, Ozsahin K, Tugrul A, Berkarda Ş. Pulmonary epithelial permeability in patients with type II diabetes mellitus using 99mTc-DTPA aerosol in relationship with CO diffusing capacity. TJNM 2000;9(3):128.

59. Kolb KH, Jaenecke G, Kramer M, Schulze PE. Absorption, distribution, and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in human and animals. Ann N Y Acad Sci 1967 Mar 15; 141(1):85-95.

60. Wood DC, Wood J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. Ann N Y Acad Sci 1975 Jan 27;243:7-19.

61. Berliner DL, Ruhman AG. The influence of dimethyl sulfoxide on fibroblastic proliferation. Ann N Y Acad Sci 1967;141:159-64.

62. Potts GE, Rampey JH, Benjamin F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms: Preliminary report. Ann N Y Acad Sci 1967;141:261-72.

63. Jimenez RH, Wilkens RT. Dimethyl sulfoxide: a perspective of its uses in rheumatic disease. J Lab Clin Med 1982;100:489-500.

64. Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. Cryobiology 1986 Feb;23(1):14-27.

65. Garrido JC, Lagos ER. Dimethyl sulfoxide therapy as toxicity-reducing agent and potentiator of cyclophosphamide in the treatment of different types of cancer. Ann N Y Acad Sci 1975 Jan 27;243:412-20.

66. Leake CD, Rosenbaum EE, Jacob SW. Biologic actions of dimethyl sulfoxide. Ann N Y Acad Sci 1967 Mar 15; 141(1):670-1.

67. Schiffer CA, Aisner J, Dutcher JP. Platelet cryopreservation using dimethyl sulfoxide. Ann N Y Acad Sci 1983;411:1619.

68. Limaye LS. Bone marrow cryopreservation: improved recovery due to bioantioxidant additives in the freezing solution. Stem Cells 1997;15(15):353-8.

69. Limaye LS, Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. J Hematother Stem Cell Res 2001 Oct;10(5):709-18.

70. Ashwood-Smith MJ. The radioprotective action of dimethyl sulfoxide and various other sulfoxides. Intern J Radiation Biol 1961;3:41-8.

71. Highman B, Hansell J, White D. Radioprotective effect of dimethyl sulfoxide. Radiat Res 1967;30:563-8.

72. Reuvers AP, Greenstock CL, Borsa J, Chapman JD. Studies on the mechanism of chemical radioprotection by dimethyl sulfoxide. Int J Radiat Biol 1973;24:533-6.

73. Miyazaki T, Hayakawa Y, Suzuki K, Suzuki M, Watanabe M. Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to gamma rays at 77 K. I. radical formation as studied by electron spin resonance. Radiat Res 1990;124:66-72.

74. Watanabe M, Suzuki M, Suzuki K, Hayakawa Y, Miyazaki T. Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to gamma rays at 77 K. II protection from lethal, chromosomal and DNA damage. Radiat Res 1990 Oct;124(1):73-8.

75. Warters RL. Radiation-induced apoptosis in a murine T-cell hybridoma. Cancer Res 1992 Feb 15;52(4):883-90.

76. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. YYÜ Vet Fak Derg 2008;19(1):55-63.

77. Shimmura S, Masumizu T, Nakai Y, Urayama K, Shimazaki J, Bissen-Miyajima H, et al. Excimer laser-induced radical formation and keratinocyte death in vitro. I Invest Ophthalmol Vis Sci 1999 May;40(6):1245-9.

78. Karakoyun-Çelik Ö, Aras A, Tuğan D, Hekimgil M, Yalman D, Esassolak M ve ark. Sıçan germ hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz ve amifostin ile ilişkisi. T Klin Tıp Bilimleri 2004; 24: 142-146.

79. Wood DC, Weber FS, Palmquist MA. Continued studies in the toxicology of dimethyl sulfoxide (DMSO). J Pharmacol Exp Ther 1971 Jun; 177(3): 520-752.

80. Takıl A, Umuroglu T, Gogus YF, Eti Z, Yildizeli B, Ahıskali R. Histopathologic effects of lipid content of enteral solutions after pulmonary aspiration in rats. Nutrition 2003;19:666–9.

81. Ahmed IH, el-Khatib E, Logus JW, Man GC, Jacques J, Man SF. Altered pulmonary epithelial permeability in canine radiation lung injury. J Appl Physiol 1986 Sep;61(3):971-81.

82. Susskind H, Weber DA, Lau YH, Park TL, Atkins HL, Franceschi D, et al. Impaired permeability in radiation-induced lung injury detected by technetium-99m- DTPA lung clearance. J Nucl Med 1997;38:966-71.

83. Suga K, Alderson PO, Mitra A, Domingues C, Rescigno J, Smith LG, et al. Early retardation of 99mTc-DTPA radioaerosol transalveolar clearance in irradiated canine lung. J Nucl Med 2001 Feb;42(2):292-9.

84. Ozturk B, Egehan I, Atavcı, S, Kitapci M. Pentoxifylline in prevention of radiation-induced lung toxicity in patients with breast and lung cancer: A double-blind ransomized trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004 Jan 1;58(1):213-9.

85. Gross NJ. Radiation pneumonitis in mice. Some effects of corticosterods on mortality and pulmonary physiology. J Clin Invest 1980 Sep; 66(3): 504-10.

86. Neklasova NIu, Sharinov GM, Vinokurov VL, Skrynditsa GM. Local application of dimethyl sulfoxide at different concentrations to the prevention of radiation-induced damages in patient with cancer of the cervix uteri. Vestn Rentgenol Radiol 2006 May-Jun;(3):47-51.

87. Ashwood-Smith MJ. Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethylsulfoxide in cellular systems. Ann N Y Acad Sci 1975 Jan 27; 243:246-56.

EKLER

EK 1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı:10 **Karar Tarihi:17.05.2007**

2-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 17.05.2007 tarihinde; **"Radyasyona Bağlı Akut Pulmoner Toksisitede Dimetil Sülfoksit'in (DMSO) Koruyucu Etkisinin Histopatolojik ve ^{99m}Tc-DTPA Transalveoler Klirens Sintigrafisi ile Araştırılması"**adlı TÜTFEK 2007/83 protokol no.lu çalışmayı incelemek üzere toplandı. Doç. Dr. Betül UĞUR ALTUN ve Av. Mustafa POLAT izinli olması nedeniyle katılamadı ve çalışmanın incelenmesine geçildi.

Yapılan inceleme sonunda çalışmanın Fakültemiz Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda yapılacağı Doç. Dr. Zafer KOÇAK'ın yürütücüsü olduğu ve araştırma protokolü ile ilgili Radyasyon Güvenliği Komitesinin olumlu görüş bildirdiği anlaşıldı. Araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve araştırma bütçesinin **Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP)** tarafından desteklenmesi koşuluyla yapılmasının **UYGUN** olduğuna mevcudun oybirliği ile karar verildi.

Ünvanı/Adı/Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F Farmakoloji A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yrd. Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN Başkan Yardımcısı	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr. Betül Biner ORHANER Üye	Çocuk Sağ. Ve Hst.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hst. A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Dilek MEMİŞ Üye	Anesteziyoloji	T.Ü.T.F. Anesteziyoloji A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Betül Uğur ALTUN Üye	Endokrinoloji	T.Ü.T.F. İç Hst. A.D.	K	☐ E ☐ H	☐ E ☐ H	Katılmadı
Doç. Dr. Gürcan ALTUN Üye	Adli Tıp	T.Ü.T.F. Adli Tıp A.D.	E	☐ E ☐ H	☐ E ☐ H	
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ Üye	Biyokimya	T.Ü.T.F. Biyokimya A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA Üye	Patoloji	T.Ü.T.F. Patoloji A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Ecz. Emine SAKMAN Üye	Eczacı	T.Ü.T.F. Başhekimliği	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Avukat Mustafa POLAT Üye	Ceza Hukuku	T.Ü. Rektörlüğü	E	☐ E ☐ H	☐ E ☐ H	Katılmadı

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Filiz AKATA
Dekan

Posta Adresi:
T.Ü. Tıp Fakültesi Dekanlığı
Güllapoğlu Yerleşkesi
22030 EDİRNE

Tel: (0284) 235 76 53 – 235 73 73
Faks: (0284) 235 76 52
E-posta: dekanlik@trakya.edu.tr
Elektronik Ağ: http://tipfak.trakya.edu.tr