

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
SUALTI HEKİMLİĞİ VE HİPERBARİK TIP
ANABİLİM DALI**

**Hiperbarik Oksijen Uygulamasının
Meme Kanseri Hücre Kültürü Üzerine Etkileri**

Dr. Aslıcan ÇAKKALKURT

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Akın Savaş TOKLU

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2012

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
SUALTI HEKİMLİĞİ VE HİPERBARİK TIP
ANABİLİM DALI**

**Hiperbarik Oksijen Uygulamasının
Meme Kanseri Hücre Kültürü Üzerine Etkileri**

Dr. Aslıcan ÇAKKALKURT

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Akın Savaş TOKLU

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında bilgisi ve deneyimini benimle paylaşıp, öneri ve eleştirileri ile beni yönlendirmesinin yanı sıra ülkemizde Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nın kurulması ve geliştirilmesi için yoğun emek veren Prof. Dr. Maide ÇİMŞİT'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve daha iyi birer hekim olmamız için çaba gösteren değerli hocam Prof. Dr. Şamil AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Eğitim sürem boyunca karşılaştığım birçok zorlukta bana yol gösteren, sabır ve desteğini asla esirgemeyen, eğitimime ve tez çalışmama bilgisi, tecrübeleri ve görüşleri ile destek olan, tez danışmanım Prof. Dr. Akın Savaş TOKLU'ya teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübelerini uzmanlık eğitimim süresince benimle paylaşan Prof. Dr. Salih AYDIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmama destek veren, bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Emin ELBÜKEN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na, tez çalışmamda büyük emekleri olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Biyolog Füsun ÖNCÜ'ye ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın diğer tüm üyelerine güler yüzleri ve anlayışları için teşekkür ederim.

Eğitimim süresince karşılaştığım birçok zorlukta bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, ve tez çalışmamın istatistikleri konusunda büyük yardımları olan Adli Tıp Anabilim

Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nadir ARICAN'a ve desteklerinden dolayı Sinirbilim Doktora öğrencisi Nurcan ORHAN'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimin büyük bölümünü birlikte geçirdiğim asistan arkadaşlarıma ve başta Ayşe KEŞŞAF ve Fatma ERDOĞAN olmak üzere hemşire arkadaşlarıma destekleri ve arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince benden yardımlarını esirgemeyen Basınç Odası Operatörü Cengiz ŞİMŞEK'e, Fizyoterapist Ali ÇELİK'e, Anabilim Dalı Sekreteri Sevgi MEYDAN'a ve Kayıt Sorumlusu Aslı AKYÜZ'e teşekkür ederim.

Ve bugüne kadar hep yanımda olan aileme her şey için teşekkür ederim.

Dr. Aslıcan Çakkalkurt

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT	2
I-GİRİŞ	3
II-GENEL BİLGİLER	5
A- HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ	5
1. Tanım	5
2. Tarihçe	6
3. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Etki Mekanizmaları	8
a. Fiziksel Temel	8
(1). İdeal Gaz Kanunu	8
(2). Boyle Gaz Kanunu	8
(3). Charles ve Gay Lussac gaz Kanunları	9
(4). Henry Gaz Kanunu	9
(5). Dalton Gaz Kanunu	9
b. Fizyolojik Etkiler	10
(1). Basıncın Mekanik Etkisi	10
(2). Yüksek Parsiyel Oksijen Basıncının Etkileri	11
4. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Endikasyonları	13
5. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Komplikasyonları, Yan Etkiler ve Kontrendikasyonları	16
a. Komplikasyonlar ve Yan Etkiler	16
b. Kontrendikasyonlar	18
B- MEME KANSERİ	18
1. Tanım ve Epidemiyoloji	18

2. Meme Kanseri Taraması	18
3. Patofizyoloji	20
4. Histopatoloji	22
5. Derecelendirme	23
6. Evreleme	24
a. Tümör boyutu	25
b. Lenf nodu metastazı	25
c. Uzak Metastazlar	25
7. Tedavi	27
8. Prognostik faktörler	28
a. Nottingham prognostik indeksi	28
b. Östrojen ve progesteron reseptörleri	28
c. HER-2/neu	29
9. Tümör Proliferasyon Hızı ve Prognostik Önemi	29
10. Tümör biyolojisi	30
11. Kanserde Hipoksi , HIF-1 aktivasyonu ve Prognoz	30
12. Kanserde Adaptasyon Mekanizmaları ve HBOT	32
III. AMAÇLAR	35
IV- GEREÇ VE YÖNTEM	36
A- MCF-7 KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANMASI	36
B- ÇALIŞMA GRUPLARI	37
C- DENEYSEL PROSEDÜR	38
1. Normobarik Hava Uygulaması	39
2. İnkübatörde Bekleme	39
3. Hiperbarik Hava Uygulaması	40

4. Normobarik Oksijen Uygulaması	41
5. Hiperbarik Oksijen Uygulaması	41
6. Hücre Sayımı	42
7. Canlılık Analizi	43
8. Proliferasyon İndeksi Analizi	43
IV- İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	45
V- BULGULAR	45
A- Hücre Sayısı	45
B- Canlılık Analizi	47
C- Proliferasyon İndeksi	50
VI- TARTIŞMA	54
VII- SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
IIIX- KAYNAKLAR	68
IX- ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Tek kişilik basınç odası
- Şekil 2.** Çok kişilik basınç odası
- Şekil 3.** Meme kanserinin oluşumuna ve ilerleyişine katılan faktörler ile olası çok aşamalı karsinogenez modeli
- Şekil 4.** Hipoksik tümörlerin adaptasyon mekanizmaları
- Şekil 5.** Neubauer sayma kamerası
- Şekil 6.** Deney basınç odası
- Şekil 7.** MCF-7 hücreleri ekili 6'lı well-plak
- Şekil 8.** Hücre sayımı
- Şekil 9.** Vitalite analizi
- Şekil 10.** Proliferasyon İndeksi Hesaplanması Amacıyla Hazırlanan Preparatlar
- Şekil 11.** BRdU ile boyama

TABLolar DİZİNİ

- Tablo 1.** UHMS tarafından belirlenmiş HBOT endikasyonları
- Tablo 2.** ECHM 2004, HBOT endikasyonları
- Tablo 3.** Sağlık Bakanlığı HBOT endikasyon listesi
- Tablo 4.** HBOT rölatif kontrendikasyonları
- Tablo 5.** Histolojik derecelendirmede kullanılan Modifiye Bloom-Richardson sistemi
- Tablo 6.** AJCC kanser evreleme sistemi
- Tablo 7.** Hücre sayısı değerleri
- Tablo 8.** Canlılık analizi sonuçları
- Tablo 9.** Proliferasyon analizi sonuçları

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Ortalama hücre sayısı değerleri

Grafik 2. Ortalama canlı hücre sayısı

Grafik 3. Ortalama ölü hücre sayısı

Grafik 4. Total hücre sayısı

Grafik 5. BRdU (+) hücre sayısı

Grafik 6. BRdU (+) / Total hücre sayısı

KISALTMALAR

AJCC	American Joint Comission on Cancer
ATA	Atmosphere Absolute “Mutlak atmosfer basıncı, 1 ATA=760 mmHg”
ATP	Adenozintrifosfat
Bcl-2	B hücreli lenfoma-2
BRdU	Bromodeoksiuridin
CMF-PBS	Calcium and magnesium free phosphate buffered saline
CO	Karbonmonoksit
CO₂	Karbondioksit
Con-A	Konkanavalin-A
DMEM	Dulbecco modifiye esansiyel medyum
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECHM	European Committee for Hyperbaric Medicine
EPO	Eritropoietin
EUBS	European Underwater and Baromedical Society
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FISH	Fluorescent in situ hybridization
HBH	Hiperbarik hava
HBO	Hiperbarik oksijen
HBOT	Hiperbarik oksijen tedavisi
Her2/neu	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
HIF-1α	Hipoksi ile indüklenen faktör-1 α
IL-8	İnterlökin 8
İNK	İnkübatörde bekletilen kontrol grubu
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MSS	Merkezi sinir sistemi
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBH	Normobarik hava
NBO	Normobarik oksijen
O₂	Oksijen

RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PEDF	Pigment epiteli kaynaklı faktör
PTEN	Fosfat ve tensin homolog
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TNM	Tümör boyutu-Lenf nodu-Uzak metastaz
UHMS	Undersea and Hyperbaric Medicine Society
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Amaçlar: Bu deneysel çalışmada, hiperbarik oksijen ortamının meme kanseri tümör hücre kültürü üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve yöntemler: Meme kanseri hücreleri olarak Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) hücreleri seçildi; hücreler inkübatörde bekletilen (İNK) kontrol grubu, normobarik hava (NBH), hiperbarik hava (HBH), normobarik oksijen (NBO) ve hiperbarik oksijen (HBO) uygulanan grup olmak üzere beş gruba ayrıldı. Deneyin birinci aşamasında, uygulamalar sonrasında çalışma grupları hücre sayısı açısından incelendi ve tripan mavisi ile boyanarak vitalite analizi yapıldı. İkinci aşamada, uygulamalar sonrasında hücreler bromodeoksiuridin ile boyanarak proliferasyon indeksi saptandı.

Bulgular: Hücre sayısı açısından incelendiğinde, İNK grubu ile HBO grubu karşılaştırıldığında HBO grubunda daha düşük, HBH grubu ile HBO grubu karşılaştırıldığında yine HBO grubunda daha düşük olmak üzere anlamlı fark ($p=0.00$) saptanmıştır. Çalışmanın vitalite analizi bölümünde ise, HBO ve HBH grupları birim alandaki canlı hücre sayıları açısından değerlendirildiğinde, HBO grubunda daha düşük olmak üzere anlamlı fark ($p=0.041$) tespit edilmiştir. Ölü hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasındaki fark anlamlı değildir. Hücre proliferasyonu bromodeoksiuridin (BRdU) boyasıyla DNA sentezi tespit edilerek araştırılmıştır. BRdU ile boyanan hücre sayısı HBO grubunda en düşük seviyede saptanmıştır.

Sonuç: Hiperbarik oksijen uygulaması MCF-7 meme kanseri hücre kültüründe hücre sayısını ve proliferasyonunu azaltmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hiperbarik oksijen, meme kanseri, tripan mavisi, bromodeoksiuridin, vitalite analizi, proliferasyon indeksi

ABSTRACT

Objective: In this experimental study, the effects of hyperbaric oxygen on the breast cancer cell culture was studied.

Materials and Methods: Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) was selected as breast cancer cells; cells were divided into five groups: control group kept in incubator (INK), normobaric air (NBH), hyperbaric air (HBH), normobaric oxygen (NBO) and hyperbaric oxygen (HBO) groups. In the first stage of the experiment, study groups were examined in terms of cell numbers after the experimental procedures and vitality analysis was made by staining with trypan blue. In the second stage, the cells were stained with bromodeoxyuridine after the procedures and proliferation index was detected.

Results: The number of the cells was smaller in HBO group when compared to INK and HBH groups and the difference was statistically significant ($p=0.00$). In the vitality analysis, the number of the alive cells was smaller in HBO group when compared to HBH group and the difference was significant ($p=0.041$). There was no significant difference by means of dead cells when the groups were compared. Cell proliferation was investigated by DNA staining with bromodeoxyuridine (BRdU). The number of stained cell in HBO group was smaller than other groups.

Conclusions: Hyperbaric oxygen on MCF-7 breast cancer cell culture decreased cell number and proliferation.

Key Words: Hyperbaric oxygen, breast cancer, trypan blue, bromodeoxyuridine, vitality analysis, proliferation index

I- GİRİŞ

Kanser, günümüzde sağkalımı ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen hastalıklardan biri olma özelliğini sürdürmektedir. Hipoksik kanser hücreleri istenmeyen durumlara adapte olarak yaşamlarını idame ettirirler ve bu nedenle tümör rekürrensi ve birçok malignite formunda tedavinin başarılı şekilde sonuçlanmasını engellemektedirler. Hipoksi, anjiyogenez, apoptoz ve glikolizde rol oynayan birçok gen ürününün ekspresyonunu direkt olarak etkilemektedir. Ayrıca, oksidatif stres altında metastazlara ve anjiyogenez aracılığı ile tümör büyümesine yol açmaktadır. Tüm bu olaylar yüksek oranda agresif bir tümörde en üst düzeyde görülmekte, hücreler destrüksiyona direnç kazanmakta ve bu da tümör rekürrensine neden olabilmektedir (37).

Kanser tedavisindeki yeni stratejiler, tümörlerde adaptif defans mekanizmalarını olasılıkla tersine çevirmek veya ortadan kaldırmak veya tümör destrüksiyonuna yol açan oksidatif stresi artırmak amacıyla oksijenizasyonu artırarak hipoksik durumu değiştirmeyi hedeflemektedir.

Tümör oksijenizasyonu HBO uygulanarak artırılabilir. Hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT), basınç odası içerisinde 1 atmosfer mutlak basınçtan (ATA) daha yüksek basınç altında %100 oksijen solunması temeline dayanan, medikal bir tedavi yöntemidir (66). HBO uygulaması ile oksijenin plazmada çözünürlüğü ve taşınması hemoglobinden bağımsız olarak artırılmaktadır. HBOT günümüzde arteriyel gaz embolisi, karbonmonoksit (CO) zehirlenmeleri, dekompresyon hastalığı, diyabetik ayak gibi iyileşmeyen problemlili yaralarda, radyasyon nekrozu, nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonları, gazlı gangren ve dirençli osteomiyelitlerde ana veya yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (76).

Oksijen artışının, hipoksik tümör hücrelerinin reoksijenizasyonu ve anjiyogenez aracılığı ile tümör büyümesini stimüle edebileceği şüphesi mevcuttur. HBO'nun yara iyileşmesinde anjiyogenezi artırması tümör büyümesini de aynı mekanizma ile indükleyeceği anlamına gelmemektedir. HBO, anjiyogeneze yol açan hipoksik uyarıyı ortadan kaldırabilmektedir. İntratümöral reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesinin eşik değerin üzerine çıkması ise tümör destrüksiyonunu indükleyebilir (24).

Teorik olarak HBO, tümör hücrelerinin hipoksik koşullardaki her adaptasyon mekanizmasını durdurma potansiyeline sahip olduğunu söylemek mümkündür. HBO,

tümörlerdeki oksijen perfüzyonunu yüksek oranda artırmakta, ve böylece hipoksik mikroçevreyi değiştirmektedir; ROS üretimi ile apoptozu artırabilir, böylece tümörün antioksidan defans mekanizmalarını ortadan kaldırabilir. Hipoksi, HIF-1 α stabilizasyonu ve takibeden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonu için de esansiyeldir (163).

HBOT'nin tümörler üzerindeki etkileri halen tartışmalıdır. HBO ile tümör stimülatör etkiyi ilk olarak Johnson and Lauchlan bildirmişler; servikal kanserli hastalarda metastazın arttığını göstermişlerdir (86). Sınırlı sayıda çalışmada olası kanser veya metastazı artırıcı etki bildirilirken, HBO'nun radyo-duyarlaştırıcı etkisinin araştırıldığı ve 3000'den daha fazla hastanın katıldığı çok sayıda kontrollü çalışmada nötral veya kanser inhibitör etki gösterilmiştir (51).

Artmış oksijenizasyon, hücreleri radyoterapi ve kemoterapiye duyarlaştırıcı olarak da rol oynayabilir. HBO'nun radyo veya kemo-duyarlaştırıcı etkisinin araştırıldığı çalışmalarda HBO adjuvan tedavi olarak uygulandığından çok sayıda çalışmada primer veya metastatik kanser açısından stimülatör bir etki saptanmamakla birlikte, HBO'nun teorik etki mekanizması ve literatürdeki kanser stimülatör etkinin gösterildiği birkaç yayın nedeniyle aktif veya remisyondaki kanser hastalarında farklı endikasyonlarla tek başına HBOT uygulamasına şüphe ile yaklaşılmaktadır.

Meme kanseri insidansının yüksek olması, meme kanseri tedavisinde uygulanan kemoterapötik ajanın ekstrasvazasyonu ve radyoterapi sonrası meme dokusu ve komşu dokularda gelişen radyonekrozun HBOT endikasyonları arasında yer alması nedeniyle, bu çalışmada HBO'nun meme kanseri hücre kültürü üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, HBO'nun MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre sayısı, vitalite ve proliferasyon indeksi üzerine etkileri araştırıldı.

II- GENEL BİLGİLER

A- HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ

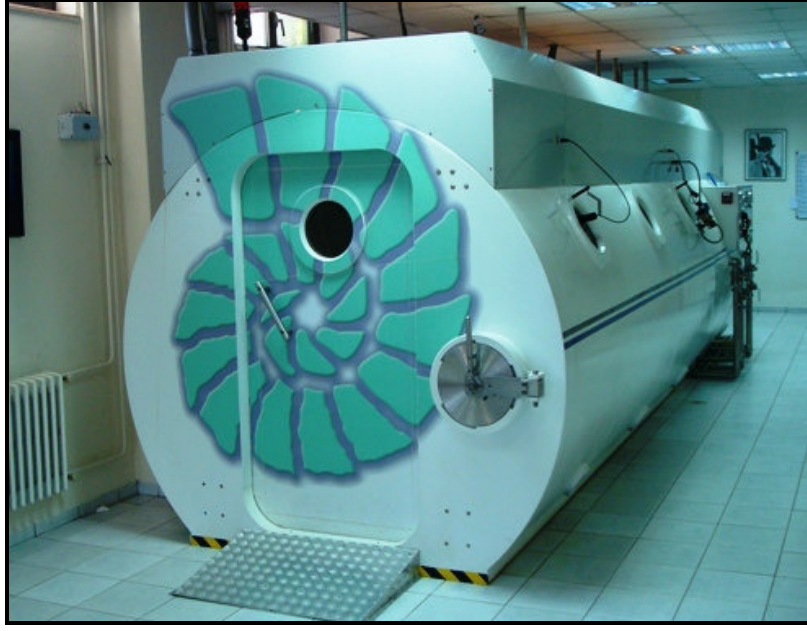
1. Tanım

HBOT (Hiperbarik oksijen tedavisi), hastalara veya deneklere 1 atmosfer mutlak basınçtan (1 ATA=760 mmHg=1 bar) daha yüksek basınçlarda, belirli sürelerle aralıklı veya sürekli %100 oksijen solutulması ile yapılan sistemik, medikal bir tedavi yöntemidir (66). 1 ATA ve altındaki basınç değerlerinde %100 oksijen uygulamaları, lokal uygulamalar HBOT olarak kabul edilmemektedir. Tedavinin uygulandığı basınç değeri 2-3 ATA arasında olup, tedavi süresi ve seans sayıları hastanın tanısına ve klinik durumuna göre belirlenmektedir.

HBOT uygulamaları için temelde tek kişilik (Şekil 1) ve çok kişilik (Şekil 2) olmak üzere iki tip basınç odası sistemi kullanılır. Tek kişilik basınç odalarında hastalar hava veya oksijen ile basınç altına alınır. Bu sistem kullanıldığında, hasta oksijen ile basınç altına alınır, ortamdaki oksijeni sürekli olarak soluyarak, hava ile basınç altına alınır, maske ile oksijen soluyarak tedavi olmaktadır. Çok kişilik basınç odalarında ise hastalar hava ile basınç altına alınmakta, daha fazla hasta aynı anda maske, başlık veya endotrakeal tüp yoluyla oksijen alabilmektedir (30).



Şekil 1. Tek kişilik basınç odası, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı



Şekil 2. Çok kişilik basınç odası, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı

2. Tarihçe

Hastaların basınç odasına alınarak tedavi edilmesi başlangıçta bilimsel temellere dayanmamıştır. İlk kez 1662 yılında İngiliz rahip Henshaw, sezgilerine dayanarak “Domicilium” adını verdiği basınç odasında akut hastalıkları yüksek, kronik hastalıkları ise düşük basınçta tedavi etmeye başlamıştır. 19.yy’da Avrupa’da birçok pnömotik enstitü kurulmuş ve hiperbarik tedaviler yapılmıştır, ancak hiçbir bilimsel sonuç elde edilememiştir. 1879 yılında Fransız bir cerrah olan Fountaine, mobil basınçlanabilir bir ameliyathane inşa etmiştir. Bu ameliyathane içerisinde nitroz oksit ile anestezi uygulayarak opere ettiği hastalarda, anestezi derinliğinin arttığını ve siyanozun olmadığını gözlemiştir. 1930’lu yılların sonuna kadar devam eden hiperbarik hava tedavileri içinde, Fountaine’nin çalışmalarının tek yarı bilimsel çalışmalar olduğu söylenebilir (80). Kansas Üniversitesi’nde anestezi profesörü olarak çalışan Orville J. Cunningham, hipoksi krizlerinin basınç odasında tedavi edilebildiğini hastalar üzerinde göstermiştir. Cunningham, bir hastasının hediyesi olarak yapılan, 64 feet (19,5 m) çapında 72 odalı dev bir küre şeklinde ve bugüne kadar inşa edilmiş en büyük basınç odası (Steel Ball Hospital) içerisinde çeşitli hastaları tedavi etmiş, o gün için hakkında fazla bilgi sahibi olunmayan bazı hastalıkların mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğu, bu

mikroorganizmaların da basınçlı ortamda yaşayamadıklarına inanmıştır. Ancak kendinden istenen bilimsel kanıtları sunmaması nedeniyle 1930 yılında Amerikan Tıp Birliği tarafından çalışmaları durdurulmuştur (93).

Oksijen birbirinden bağımsız iki kişi tarafından yaklaşık aynı dönemlerde keşfedilmiştir. Carl Wilhelm Scheele 1772 yılında oksijeni keşfetmiş ancak ilk kez 1775 yılında Joseph Priestly oksijen ile ilgili çalışmalarını yayımlamıştır. Oksijenin hiperbarik tıp alanında kullanımı için 150 yıldan fazla zaman geçmesi gerekmiştir (93).

Hiperbarik tıp alanındaki asıl gelişmeler, basınçlı tünel işçiliği ile 1845’de Fransa’da Loire nehri yatağının kazılarında, Triger’in işçilerde görülen disbarik yakınmaları tanımlaması ile başlamıştır (48). Behnke ve Shaw 1937’de dekompresyon hastalığında HBOT’ni kullanmışlardır (32) .

HBOT’nin dalış hastalıkları dışında kullanımı 1955’de başlamıştır. Churchill Davidson HBOT’yi kanserli hastalarda radyoterapinin etkisini arttırmak amacıyla kullanmıştır. 1960’da Boerema, hiperbarik oksijen ve volüm desteği ile tedavi ettiği, ölümcül derecede anemik olan domuzlarla ilgili makalesini “*Life Without Blood (kansız hayat)*” başlığıyla yayımlamış ve ardından HBOT kalp cerrahisinde kullanılmaya başlanmıştır. Aynı yıl Sharp ve Smith tarafından ilk CO zehirlenmesi vakası HBOT ile tedavi edilmiştir. 1961’de Boerema ve Brummelkamp gazlı gangren olgularını basınç odasında tedavi etmeye başlamışlardır. Kalp cerrahisinde yeni gelişmeler ile 1970 yıllarında bu tür cerrahilerde HBOT kullanımı terk edilmiştir (32, 93)

HBOT ile ilgili ilk uluslararası toplantı 1963 yılında Amsterdam’da yapılmıştır. Bu dönemde HBOT bilimsel temeli olmayan birçok hastalıkta da kullanılmıştır. Bu nedenle Amerika Birleşik Devletlerinde kurulan Sualtı ve Hiperbarik Tıp Cemiyeti (UHMS; Undersea and Hyperbaric Medical Society), 1970’lerin sonunda HBOT’nin temel kural ve prensiplerini yayımlamıştır. Daha sonraki yıllarda Avrupa’da kurulan diğer benzer örgütler (EUBS; European Underwater and Baromedical Society, ECHM; European Committee for Hyperbaric Medicine) her yıl düzenlenen toplantılarla, yeni çalışmalar ışığında HBOT ile ilgili ortak kararlar alınmasını sağlamıştır. HBOT endikasyonları ile ilgili ilk yazılı döküman ise 1994 yılında yayımlanmıştır(80).

Günümüzde HBOT uygulaması ile ilgili eğitim disiplinlerinin geliştirilmesi, bilimsel temeli olan birçok çalışmanın yapılması ve paylaşılması ile endikasyonlar ve HBOT'nin tıp alanındaki yeri net olarak belirlenmiştir.

3. HBOT Etki Mekanizmaları

a. Fiziksel Temel

HBOT kapalı bir sistem içerisinde basıncın artırılması ile oksijen solunarak yapılan bir tedavi yöntemi olduğundan, etkilerinin anlaşılabilmesi için bazı gaz kanunlarının hatırlanması gereklidir. Gaz kanunları, gazların sıcaklık, basınç ve hacim ilişkilerini açıklayan bazı kanunlardır.

(1). İdeal Gaz Kanunu

İdeal gaz kanunu; gazların hacim, termodinamik sıcaklık ve basınçları arasındaki ilişkiyi açıklayan kanundur. Boyle gaz kanunu (1662), Charles gaz kanunu (1787-1802) ve Gay-Lussac gaz kanunu (1809) birleşerek toplam gaz kanununu oluştururlar. Bu kanuna Avogadro yasası da (1811) eklenerek ideal gaz kanunu oluşturulmuştur. Avogadro yasası, eşit hacim, sıcaklık ve basınçtaki gazların aynı sayıda parçacık veya molekül içerdiğini savunur. Bu yasaya göre, ideal gaz sabitinin tüm gazlar için aynı olduğu sonucuna varılır. İdeal gaz kanunu aşağıdaki formül ile ifade edilir.

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

P: Basınç (paskal)

V: Hacim (m³)

n: Gazın mol sayısı

T: Sıcaklık (Kelvin: ⁰K)

R: Gaz sabiti (8,3145 J/mol ⁰K)

(2). Boyle Gaz Kanunu

Sabit sıcaklıkta, belli bir kütledeki gazın hacmi ile basıncı ters orantılıdır. Boyle gaz kanunu aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$P \cdot V = k \text{ (T sabit) } \quad P: \text{ Basıncı } \quad V: \text{ Hacim } \quad k: \text{ Sabit}$$

Arteriyel gaz embolisi ve dekompresyon hastalığı gibi HBOT gerektiren bazı patolojilerin tedavisi bu kanuna dayanır. Artan basınç ile gaz kabarcıklarının hacminde küçülme sağlanır. Ayrıca HBOT'nin yan etkilerinden biri olan barotravmalar Boyle gaz kanunu ile açıklanır (95).

(3). Charles ve Gay-Lussac Gaz Kanunu

Sabit hacimli bir gazın, basıncı ile sıcaklığı doğru orantılıdır (L. Gay-Lussac). Sabit basınç altında, gazların hacimleri, sıcaklıkları ile doğru orantılıdır (J. Charles). Her iki kanunda aşağıdaki gibi ifade edilmektedir.

$$P_1 / T_1 = P_2 / T_2 \text{ (V:sabit) } \quad P: \text{ Basıncı } \quad V: \text{ Hacim } \quad T: \text{ Sıcaklık}$$

Basıncı odalarında, basınç hızlı bir şekilde arttırılırsa ortam sıcaklığı artar (83). Hacmi sabit olan basınç odalarında, sıcaklık artışı da basıncın artışına sebep olur. Bu nedenle hiperbarik sistemlerde sıcaklığın kontrol altında tutulması gerekmektedir.

(4). Henry Gaz Kanunu

Sabit sıcaklıkta bir sıvı içerisinde çözünen gaz miktarı, o gazın parsiyel basıncı ile doğru orantılıdır. Her bir gazın, farklı sıvılar için çözünürlük kat sayısı farklıdır ve sıcaklıkla değişir (83).

Oksijen, normal koşullar altında, akciğerlerden %97'si hemoglobine bağlı, %3'ü ise plazmada çözünerek dokulara taşınır. Deniz seviyesinde arteriyel oksijen saturasyonu %97,5'dur. 1 gram hemoglobin 1,34 ml oksijen ile bağlanır. Hemoglobin değeri 15 gr/dl (100 ml) olan normal bir insanda, 100 ml kanda 19,5 ml oksijen taşınabilir. Kapiller seviyede oksijen saturasyonu %75'e, parsiyel oksijen basıncı 40 mmHg' ya düşer. Dolayısıyla taşınan oksijen miktarı 14,5 ml'ye düşer; 100 ml kan ile yaklaşık 5 ml oksijen dokulara transfer edilir (83). HBOT ile plazmada çözünen oksijen miktarı artar. 2,8 ATA'da %100 oksijen solunmasıyla, 100 ml kanda çözünen oksijen miktarı 6 ml olmaktadır. Bu değer, tek başına

hemoglobinden bağımsız olarak dokuların oksijen ihtiyacını karşılamaya yetecek düzeydedir. Ayrıca Henry gaz kanunu, dekompresyon hastalığı oluşum mekanizmasını da açıklamaktadır.

(5). Dalton Gaz Kanunu

Bir gaz karışımının basıncı, karışımdaki her bir gazın kısmi basınçlarının toplamına eşittir. Aşağıdaki formül ile ifade edilir.

$$P_T = P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n$$

P_T : Gaz karışımının toplam basıncı

$P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n$: Karışımdaki gazların kısmi basınçları toplamı

Soluduğumuz havanın yaklaşık %21'ini oksijen, %78'ini nitrojen, kalan %1'ini diğer gazlar oluşturur. Yerküre ve tüm canlılar, atmosfer tarafından uygulanan bir basınç altındadır. Bu basınç değeri deniz seviyesinde 1 kg/cm², 760 mmHg ve 1 ATA'ya eşittir. Dalton gaz kanununa göre havadaki oksijenin parsiyel basıncı $21/100 \times 760 \text{ mmHg} = 159,6 \text{ mmHg}$ (yaklaşık 160 mmHg) veya 0,2 ATA olmaktadır. Örneğin ortam basıncı 2 katına çıkarıldığında oksijenin parsiyel basıncı da doğru orantılı olarak artar ve 320 mmHg veya 0,4 ATA olmaktadır (83).

b. Fizyolojik Etkileri

HBOT'nin etkisi iki temel mekanizma üzerinden olmaktadır. Bunlar doğrudan basıncın mekanik etkisi ve parsiyel oksijen basıncında artış ile ortaya çıkan etkilerdir (66)

(1). Basıncın Mekanik Etkisi

Boyle gaz kanununa göre basınç arttığında gazların hacimleri küçülür. Dekompresyon hastalığı, gaz embolileri ve gazlı gangrende olduğu gibi doku içerisinde gaz kabarcıklarının olduğu patolojilerde, doğrudan basıncın etkisiyle kabarcıkların küçülmesi hedeflenir. Küçülen gaz kabarcığının yüzey gerilimi artar ve dengesizleşir, hızla kollabe olma eğilimindedir. Aynı zamanda kabarcık içerisindeki nitrojen, HBO ile sağlanan yüksek gradiyentteki oksijen ile yer değiştirerek kabarcığın daha kolay elimine olmasını sağlar. Kabarcık tamamen yok edilemese de çevre dokuya yaptığı baskı ve dolaşım bozukluğu ortadan kaldırılır. Damar içinde özellikle

silindirik yapıdaki gaz kabarcıkları, pıhtılaşma mekanizmalarını aktive etmektedir. Basıncı etkisi ile bu kabarcıklar daha küçük küresel formlara dönüşmektedir. (66)

Vücutta fizyolojik olarak gaz içeren organ ve sistemlerde de benzer etkiler görülmektedir. Basınç arttırılması ve düşürülmesi sırasında oluşabilecek bazı yan etkiler de bu şekilde açıklanır.

(2) Yüksek Parsiyel Oksijen Basıncının Etkileri

Hemoglobin normal şartlar altında oksijen ile %97 oranında satüre durumdadır. Bu nedenle normobarik ortamda oksijen solunması ile hemoglobinin oksijen ile en fazla %100 satüre olur, plazmada çözünen oksijen miktarında hafif bir artış gözlenir. HBOT yüksek parsiyel oksijen basıncı sağlayarak plazmada çözünen oksijen miktarını artırmaktadır. Örneğin 2,8 ATA' da oksijen solunması ile parsiyel oksijen basıncı 10-13 kat artmaktadır bu da yaklaşık 100 ml plazma ile 6 ml oksijen taşınmasını sağlar. CO zehirlenmesi gibi hemoglobinin oksijen taşıyamadığı durumlarda HBOT'nin bu etkisinden yararlanır (66).

HBOT esnasında venöz kandaki hemoglobin de tamamen oksijen ile satüre hale getirilebilir. Karbondioksitin (CO_2) bir kısmı kanda hemoglobine bağlanarak taşınmaktadır. Hemoglobin ile taşınamayan CO_2 plazmada çözünür, hafif bir asidoza yol açar. Ancak sağlıklı bir organizmada bu herhangi bir sorun oluşturmaz. Kronik obstrüktif akciğer hastalığında solunum merkezi hipoksiye duyarlıdır; hiperbarik ortamda bu duyarlılık azalabileceğinden ventilasyon baskılanacaktır. Bu nedenle de kronik obstrüktif akciğer hastalığı tanısı bulunan olgularda HBOT uygulandığında ciddi CO_2 retansiyonu gelişebilir (66).

Plazmada yüksek oranda çözünen oksijenin, hastaların fizyolojik ve patofizyolojik durumlarına bağlı olarak, çeşitli organ, doku ve biyokimyasal reaksiyonlar üzerinde sayısız etkisi vardır. Gazlı gangrende alfa toksin üretiminin baskılanması, lökositlerin antimikrobiyal etkinliğinde artış, kapiller duvarlarda lökosit adezyonunda azalma, hipoksik olmayan bölgelerdeki damarlarda vazokonstriksiyon, kapiller proliferasyonda artış, fibroblast çoğalması ve kollajen üretiminin uyarılması, süperoksit dismutaz stimülasyonu, adenozin trifosfat (ATP) üretiminin sağlanmasıyla doku ödeminde gerileme, CO zehirlenmesinde lipid peroksidasyonunun engellenmesi, osteoklastik aktivite artışı, oküler lenste esnekliğin azalması, sürfaktan sentezinde azalma bunlardan bazılarıdır (66).

Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri: Hiperoksi, doku ve organlarda vazokonstriksiyona, kardiyak after-load artışına neden olur. Kalp hızında yavaşlama ve kan basıncında artış tespit edilir. Kalbin dakika atım hacmi bir miktar düşer, ancak atım volümü ve kontraktilite değişmez (31).

Antiödem Etkisi: HBOT ile oluşan hiperoksida, birçok doku ve organda vazokonstriksiyon meydana gelir. Kompartman sendromunda, yanık olgularında ve serebral ödemde bu etkiden faydalanılarak ödemin azaltılması amaçlanır. Ancak bu vazokonstriktif etki kanlanmanın bozulduğu hipoksik bölgelerde gözlenmemektedir. HBOT, hipoksi ile bozulan kapiller permeabiliteyi düzenleyici etki gösterir (31).

Antihipoksik Etkisi: Plazmada çözünen oksijen miktarında artış, hemoglobinden bağımsız olarak doku ve hücrelere oksijen taşınması sağlamaktadır. Bu artış, oksijenin daha uzak mesafelere difüzyon ile ulaşmasını kolaylaştırır. Dolayısıyla HBOT periferik iskemilerde olduğu gibi doku oksijenlenmesinin bozulduğu durumlarda veya CO intoksikasyonu, derin anemide olduğu gibi, hemoglobin ile oksijen taşınamadığı durumlarda tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır (31).

Antibakteriyel ve Antitoksik Etkileri: Dokuda oksijen konsantrasyonu arttığında mikroorganizmaların metabolik fonksiyonlarını yerine getirmesi ve çoğalması zorlaşır. HBOT ve hiperoksi, antioksidan sistemleri yetersiz olan anaerobik mikroorganizmalarda, oksijen radikalleri ile DNA, RNA hasarına ve protein fonksiyonlarında bozukluğa yol açarak bakteriyostatik veya bakterisidal etki göstermektedir. Ancak deneysel çalışmalarda 1,5 ATA ve altında HBOT, aerobik mikroorganizmalarda çoğalmayı artırmaktadır (31). Bu nedenle terapötik dozun belirlenmesi önem taşır. HBOT enfekte ve hipoksik bölgede yüksek oksijen konsantrasyonu sağlayarak, nötrofiller tarafından fagosit edilen bakterilerin oksijen radikalleri ile öldürülmesinde etkili olur. Ayrıca HBOT, bakteriyel ekzotoksin üretimini baskılaması nedeniyle (*Cl. perfringens* alfa ve teta toksini) gazlı gangren tedavisinde önemli bir yere sahiptir (125).

Aminoglizozitlerin hipoksik durumlarda bakteriye penetrasyonu zayıftır. HBOT başta aminoglikozitler olmak üzere, trimetoprim-sulfometoksazol, siprofloksasin gibi antibakteriyel ajanların etkilerini de artırmaktadır (125).

Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri: Yara, doku veya organın anatomik bütünlüğünün bozulmasıdır. Organizma yaralanmayı takiben onarım faaliyetlerine başlar. Yara iyileşmesi birçok sistemin bir arada çalıştığı, iç içe geçmiş çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç içerisinde bazı aşamalar ise oksijen bağımlıdır. Yara bölgesi, başta fibroblast ve makrofajlar olmak üzere, birçok hücre ve büyüme faktörünü barındıran, hipoksik, asidotik ve ödemli bir ortamdır. (147) Yara bölgesindeki düşük oksijen basıncı, erken dönemde; büyüme faktörleri, sitokin sentezi ve salınımını, gen aktivasyonunu, anjiogenezisi ve rejenerasyonu uyarır (97). Oluşan yeni vasküler yapının olgunlaşabilmesi için doku oksijen basıncının normal olması gereklidir (153). Fibroblast ve endotel hücreleri en iyi replikasyonu, parsiyel oksijen basıncı 30-80 mmHg arasındayken gösterir, maksimum kollajen sentezi ise 20-60 mmHg parsiyel oksijen basıncında olmaktadır (121). Kollajen sentezinin ana basamağı olan prolin hidroksilasyonu ve çapraz bağ oluşumunu sağlayan lizil oksijenaz enziminin hızı, oksijen konsantrasyonu ile korelasyon göstermektedir. Epitelizasyon ise oksijen basıncına bağımlıdır ve vaskülarizasyonun yeterli olması gerekmektedir.

HBOT yara dokusunda hipoksiyi giderir, yara bölgesine substrat desteği sağlar, fibroblast proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu uyarır, kollajen sentezini artırır ve stabilizasyonuna yardımcı olur, anjiogenezisi hızlandırır, granülasyon dokusunun oluşumunu, epitelizasyonu ve yara gerimini artırır, kapiller permeabiliteyi düzenleyerek ödemi azaltır, antimikrobiyal etkiyi artırır, iskemi reperfüzyon hasarını azaltır (122).

HBOT bu etkileri nedeniyle, özellikle vasküler nedenli iyileşmenin sorun olduğu periferik arteriyel hastalıklar ve diyabetik ayak yaralarında, radyasyon hasarlarında, greft ve flep sağ kalımını arttırmada yaygın kullanım alanı bulmaktadır.

Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri: HBOT ile artan parsiyel oksijen basıncı, MSS kan akımlarında, elektriksel aktivitesinde ve metabolik süreçlerinde değişikliğe neden olur. Ancak tüm bunlar tam aydınlatılabilmemiş değildir. Bu değişikliklerden biri aynı zamanda HBOT komplikasyonu olan MSS oksijen toksisitesi olarak karşımıza çıkmaktadır (83).

4. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Endikasyonları

UHMS tarafından 2003 yılında kesinleştirilmiş HBOT endikasyonları Tablo 1’de sunulmuştur (52).

ECHM tarafından 2004 yılında belirlenen HBOT endikasyonları ise 3 sınıfta toplanmıştır. Bunlar Tip 1 (HBOT kuvvetle önerilen), Tip 2 (HBOT önerilen) ve Tip 3 (opsiyonel) olmak üzere ayrılmıştır (Tablo 2). HBOT uygulanan durumlar ile ilgili çalışmalar incelenmiş ve kanıt düzeyine göre A ile F arasında derecelendirilmiştir. Kanıt seviyesi A, birbiriyle uyumlu en az iki tane tarafsız, geniş, randomize, çift kör çalışmayı tanımlamaktadır. Kanıt seviyesi F ise var olan kanıtlarla HBOT kullanılmaması gereken durumlardır (155).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından kabul edilen HBOT endikasyonları ise Tablo 3’de özetlenmiştir (70).

1. Hava veya gaz embolisi
2. Karbonmonoksit intoksikasyonu / Siyanür intoksikasyonu
3. Gazlı gangren
4. Akut travmatik iskemiler (crush yaralanması / kompartman sendromu)
5. Dekompresyon hastalığı
6. Seçilmiş problemli yaralarda yara iyileşmesine destek
7. Aşırı kan kaybı (anemi)
8. İntrakranial abse
9. Nekrotizan yumusak doku enfeksiyonları
10. Refrakter Osteomyelit
11. Geç radyasyon hasarı (yumusak doku ve kemik nekrozu)
12. Tutması şüpheli greft ve flepler
13. Termal yanıklar

Tablo 1. UHMS tarafından belirlenmiş HBOT endikasyonları (52)

DURUMLAR	KABUL EDİLEN			KABUL EDİLMEYEN		
	Kamıt Seviyesi			Kamıt Seviyesi		
Tip 1 (Kuvvetle Önerilen)	A	B	C	D	E	F
Karbonmonoksit intoksikasyonu		X				
Crush yaralanması		X				
Diş çekimi sonrası osteoradyonekrozun önlenmesi		X				
Osteoradyonekroz (mandibula)		X				
Yumuşak doku radyonekrozu (sistit)		X				
Dekompresyon hastalığı			X			
Gaz embolisi			X			
Anaerobik veya miks bakteriyel anaerobik enfeksiyonlar			X			
Tip 2 (Önerilen)						
Diyabetik ayak lezyonları		X				
Riskli deri grefti ve muskulokutan flep			X			
Osteoradyonekroz (diğer kemikler)			X			
Radyasyona bağlı proktit/enterit			X			
Radyasyona bağlı yumuşak doku lezyonları			X			
Radyon uygulanmış dokularda cerrahi ve implantasyon (işlem öncesi)			X			
Ani işitme kaybı			X			
İskemik ülser			X			
Refrakter kronik osteomyelit			X			
Nöroblastom evre 4			X			
Tip 3 (Opsiyonel)						
Post-anoksik ensefalopati			X			
Larinks radyonekrozu			X			
Radyasyona bağlı santral sinir sistemi lezyonu			X			
Vasküler girişim sonrası reperfüzyon hasarı			X			
Uzuv reimplantasyonu			X			
Yüzey alanı %20'yi ve 2. dereceyi geçen yanıklar			X			
Akut iskemik oftalmolojik hastalıklar			X			
İnflamatuvar sürece sekonder iyileşmeyen yaralar			X			
Pnömatosis sistoides intestinalis			X			
Diğer Endikasyonlar						
Post sternotomi mediastinit				X		
İnme				X		
Orak hücreli anemi				X		
Malign otitis eksterna				X		
Akut miyokard infarktüsü				X		
Femur başı nekrozu				X		
Retinitis pigmentosa					X	
Tinnitus					X	
İnterstitiyel sistit					X	
Fasial paralizi					X	
Serebral palsy						X
Multipl skleroz						X
Fetoplasental yetmezlik						X

Tablo 2. ECHM 2004, HBOT endikasyonları (155)

1. Dekompresyon hastalığı
2. Hava veya gaz embolisi
3. Karbonmonoksit, siyanid zehirlenmesi, akut duman inhalasyonu
4. Gazlı gangren
5. Yumusak dokunun nekrotizan enfeksiyonları (deri, kas, fasya)
6. Crush yaralanması, kompartman sendromu ve diğer akut travmatik iskemiler
7. Yara iyileşmesinin geciktiği durumlar (diyabetik ve non-diyabetik)
8. Kronik refrakter osteomyelit
9. Aşırı kan kaybı
10. Radyasyon nekrozları
11. Tutması şüpheli deri flep ve greftleri
12. Termal yanıklar
13. Beyin apsesi
14. Anoksik ensefalopati
15. Ani işitme kaybı
16. Retinal ater oklüzyonu
17. Kafa kemikleri, sternum ve vertebraların akut osteomyelitleri

Tablo 3. Sağlık Bakanlığı HBOT endikasyon listesi (70)

5. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Komplikasyonları, Yan Etkileri ve Kontrendikasyonları

a. Komplikasyonlar ve Yan Etkiler

En sık karşılaşılan yan etki barotravmalardır. Barotravma vücutta hava dolu boşluklarda, basınç değişikliğine bağlı olarak oluşan hasarlardır. HBOT uygulamaları sırasında en sık orta kulak barotravması görülür. Orta kulaktaki hava hacmi basınç artışına bağlı olarak küçülür (Boyle gaz kanunu) ve negatif basınç oluşur. Oluşan negatif basınç çevre dokuyu içeri çekerek, ödem, eksüdasyon, kanama ve kulak zarında perforasyona sebep olabilir. Valsalva manevrası, yutkunma gibi bazı manevralarla östaki borusundan orta kulağa hava geçişi ile basınç eşitlenmesi sağlanarak bu durum engellenir. Hasta eğitimi, basınç artış hızının yavaşlatılması ile orta kulak barotravmasının önüne geçilebilir. Orta kulak

barotravmalarına bağılı hasarlar tedavi için kesin kontrendikasyon oluşturmaz ve endikasyona göre değerlendirilir. Acil tedavi gerektiren durumlarda ise barotravma göz ardı edilebilir veya miringotomi seçenek olarak değerlendirilebilir. Etkilenebilecek başka bir bölge ise paranasal sinüslerdir. Valsalva manevrası ile paranasal sinüslerde basınç eşitlenmesi sağlanır. Ancak hava geçişini engelleyecek kitle (mukosel vb) veya mukozal ödeme sebep olan durumlarda (alerjik rinit, üst solunum yolu enfeksiyonu) barotravma görülür. Nadiren orta kulakta aşırı negatif basınç oluşması veya güçlü valsalva manevrası yapılmasıyla iç kulak barotravması gözlenir. Dış kulak yolunda tıkalıcı lezyon veya buşon oluşumları nedeniyle ve iyi yapılmamış dental dolgular da barotravma gözlenebilmektedir. Cerrahi işlem sonrası gastrointestinal sistem ve oküler barotravmalar da bildirilmiştir (128).

En ciddi barotravma ise akciğer barotravmasıdır. Tedavi sonrası basıncın düşürülmesi sırasında, akciğerde hava hapsine neden olan lezyonlarda (kist, kavern vb), bronşiyal obstrüksiyonda veya glottisin kapalı olduğu durumlarda alveoler rüptür meydana gelebilir. Pnömotoraks, pnömomediastinum, cilt altı amfizem ve gaz embolisine neden olabilecek bu durum acil tedavi gerektirir. Bu nedenle, HBOT için hasta seçimi dikkatli yapılmalıdır (94).

HBOT'nin 3 ATA ve üzeri basınçlarda uygulanması ile MSS'de oksijen toksisitesi görülür. Standart HBOT protokolleri bu basınç değerinin altındadır. Ancak, konvülsiyona yatkın olan veya epilepsi hikayesi olanlarda, tedavi basınçlarında da toksisite gözlenebilir. Dekompresyon hastalığı tedavisinde olduğu gibi uzun süreli HBOT gerektiren durumlarda, solunum sıkıntısı, substernal ağrı ve öksürük semptomları ile karşımıza çıkan pulmoner toksisite gözlenebilir. Aralıklı oksijen solunması ile toksisitenin önüne geçilebilir (82, 94).

HBOT uygulanan 80679 hastanın katıldığı bir çalışmada sadece 2 hastada (%0,00024) konvülsiyon görülmüştür. Her iki hastaya da HBOT, çok kişilik basınç odasında 2,4 ATA'da, maske ile 3x30 dak O2 periyodları ve 5 dakika hava molaları protokolü ile uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda HBOT'nin tedavi açısından uygun kriterlere sahip olan hastalarda doğru tedavi protokolleri ile uygulandığında MSS toksisitesi riskinin çok düşük olduğu belirtilmiştir (168).

HBOT, bazı kişilerde, uzun süreli tedavi ile geri dönüşümlü miyopiye neden olmaktadır. Lens proteinlerinde oksidasyon nedeniyle olduğu öne sürülen bu durum haftalar içerisinde gerilemektedir (94, 124).

b. Kontrendikasyonlar

HBOT'nin kesin olarak kontendike olduğu durum tedavi edilmemiş pnömotorakstır. Rölatif kontrendikasyonlar tablo olarak verilmiştir (Tablo 4). Bu durumlarda hastanın kliniği ve tedavinin sağlayacağı fayda değerlendirilerek karar verilir (82, 94).

1. Üst solunum yolu enfeksiyonları
2. CO₂ retansiyonu ile birlikte olan amfizem
3. Radyografide hava hapsine yol açabilecek asemptomatik lezyonlar
4. Spontan pnömotoraks öyküsü
5. Kontrol edilemeyen yüksek ateş
6. Konvülfif bozukluklar
7. Toraks ve kulak cerrahisi sonrası, otoskleroz nedeniyle protez uygulananlar
8. Gebelik
9. Klostrofobi
10. Malign hastalık
11. Kemoterapötik ilaç uygulaması (Bleomisin, sisplatin, karboplatin, doksorubisin, disülfiram) (90)

Tablo 4. HBOT rölatif kontrendikasyonları

B- MEME KANSERİ

1. Tanım ve Epidemiyoloji

Meme kanserinin tanımlanmış ilk malign tümör olduğu düşünülmektedir (45). Milattan önce 3000-2500 yılları arasında Eski Mısır'da Imhotep tarafından yazıldığı tahmin edilen tıbbi bir papirusta meme kanseri ile ilgili ilk kayıtlara rastlanmıştır (157). Meme kanseri, sıklıkla duktusların iç tabakalarından veya lobuluslardan kaynaklanan malign bir neoplazidir (138) .

Meme kanserinin tanımlanmış ilk kanser türlerinden biri olması nedeniyle tanı ve tedavisinin tarihsel evriminin bilinmesi önemlidir. Kanserle ilgili ilk defa tanımlanan veya gerçekleştirilen pek çok yenilik, tedavi modeli veya teori, başlangıcını meme kanseri ile yapmıştır (157). Hippokrates (M. Ö. 460-370) habis hastalıkları 'Karkinos' veya 'Karkinoma' olarak adlandırmış ve meme kanserini yayılan ve ölüme neden olan hastalık diye tanımlamıştır (77).

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. Meme kanserinin dünyada yıllık insidansı, Amerikada ~200.000 olgu (kadın kanserlerinin %27) ve Avrupada ~320.000 olgu (kadın kanserlerini %31) ile yaklaşık bir milyon olgudur (14, 85). Ayrıca meme kanseri özellikle 30-59 yaşları başta olmak üzere kadınlarda ölümün en önemli nedenlerindendir (136). Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri nedeniyle oluşmakta ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır (7, 146). Bir kadının hayatı boyunca meme kanserine yakalanma riski %12.2'dir. Yani her 8 kadından biri hayatı boyunca meme kanserine yakalanacaktır. Meme kanserinden ölüm riski %3,6 olup, daha açık bir deyişle her 28 kadından birinin meme kanseri nedeniyle öleceği iddia edilebilir (116).

Globocan 2002 verilerine göre ülkemizde de kadınlarda hem en sık görülen hem de en sık ölüme neden olan kanserler meme, kolorektal ve mide kanseri olarak bildirilmiştir (69).

2. Meme Kanseri Taraması

Özellikle son iki dekatda meme kanserinin öncelikle tanısında ve bunu izleyerek tedavisinde yaşanan gelişmeler; hastaların sağkalımlarına ve hastalıksız yaşama sürelerine önemli katkılarda bulunmuşlardır (29).

Yaşam boyu meme kanseri gelişme riskini hesaplamak için birçok deneysel ve istatistiksel model geliştirilmiştir (5, 23, 58, 87, 156, 160). En sık kullanılanlar; 1989'da geliştirilen Gail (58) ve 1991'de geliştirilen Clause (23) modelleri olmasına rağmen hiçbir model, meme kanseri riskini tam olarak değerlendirememektedir (49).

Meme kanseri taraması, meme kanseri açısından sağlıklı kadınlarda erken tanı amacıyla kullanılan tanı yöntemlerini içermektedir. Bu amaçla kendi kendine meme muayenesi, klinik muayene, mammografi, genetik tarama, ultrasonografi ve manyetik rezonans görüntüleme uygulanmaktadır.

Literatürde meme kanserinin belirtileri ile ilgili olarak yer alan ifadeler incelendiğinde; memede bir kitlenin varlığı, memenin portakal kabuğu şeklinde bir görüntü alması, doğumsal nedenlere bağlı olmaksızın meme başının içe çekilmesi, meme başından kanlı ya da kansız akıntı gelmesi, meme derisinde ülser, kızarıklık ve ödem meydana gelmesi, lenf

bezlerinde şişlik, kolda şişlik ve ödem oluşması önemli bulgular olarak tanımlanmaktadır (40, 104, 111, 130).

3. Patofizyoloji

Diğer kanserler gibi meme kanseri de çevresel faktörler ile defektif genler arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır. Normal hücre çoğalması gerektiği yerde durabilirken, malignite potansiyeli kazanan hücreler ise bölünmeyi durdurabilme, diğer hücrelere bağlanma ve ait oldukları bölgede kalabilme yeteneklerini kaybetmiştir.

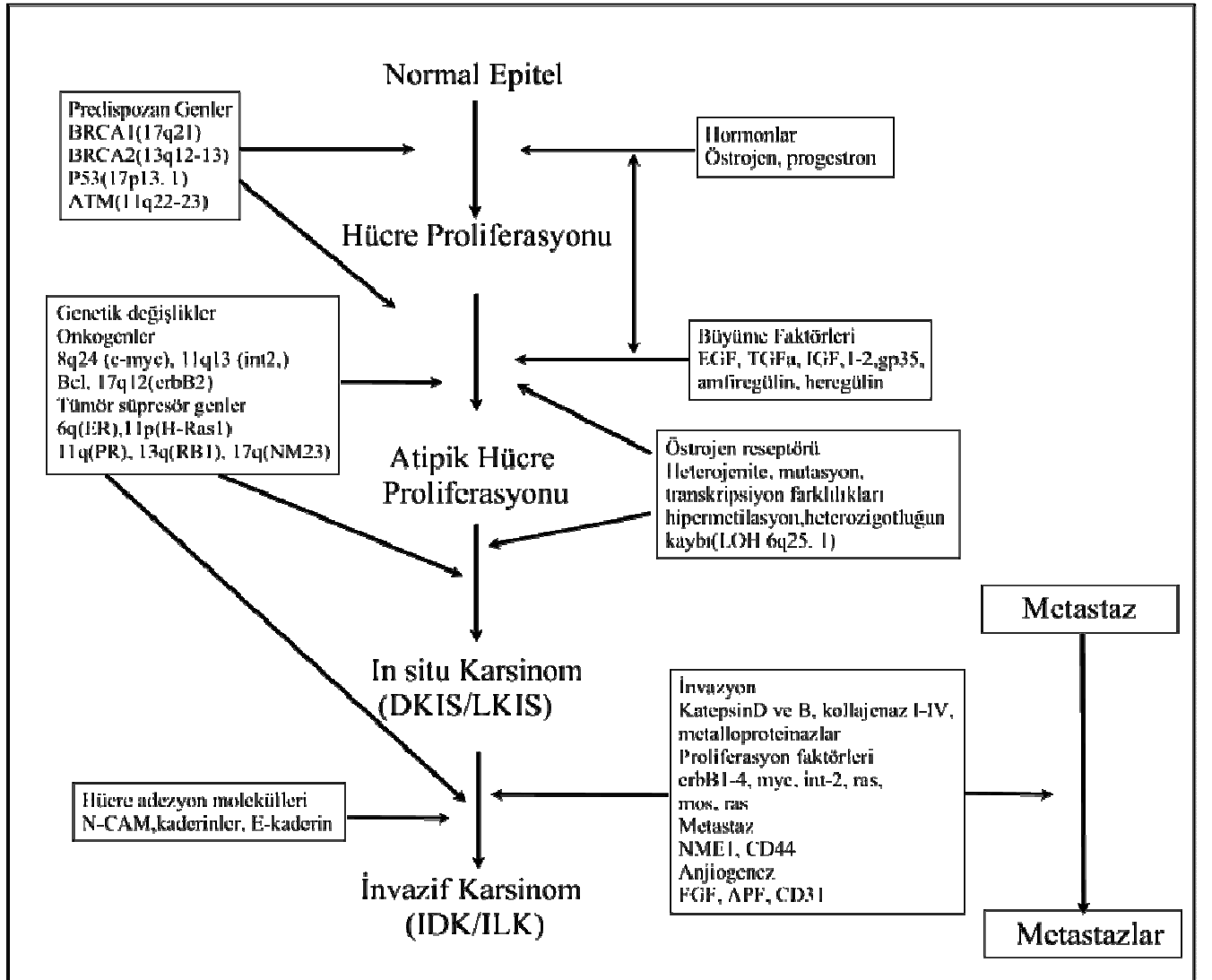
Meme kanserine yol açan mutasyonların deneysel olarak östrojen maruziyeti ile ilgili olduğu da gösterilmiştir (21). Stromal hücreler ve epitelyal hücreler arasındaki iletişimde anormal büyüme hormonu uyarısı da malign hücre çoğalmasını hızlandırabilmektedir (68, 166). Meme yağ dokusunda leptin aşırı ekspresyonu da artmış hücre proliferasyonuna ve kansere neden olmaktadır (84).

Meme kanseri ve diğer maligniteler, hücre büyümesi ve gelişimine katılan önemli hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile çok adımlı bir işlem sonucu ortaya çıkar. Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşırlar. Genomdaki bu kalıtsal veya kalıtsal olmayan genetik değişimler, belli hücresel genlerin belli özel değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler olarak isimlendirilirler ve normal işlevlere sahip bir diğer gen grubundan (proto-onkogenlerden) türevlenirler. Proto-onkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu proto-onkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin ve dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar ve malignite ortaya çıkar. Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör-baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserogenezde birbiriyle zıt etkilidir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (43, 59).

Meme kanseri oluşumunda etkili çok sayıda onkogen, tümör baskılayıcı gen, herediter meme kanseri geni ve apoptoz geni bulunmaktadır (Şekil 3). . Fakat meme kanseri olgularının

büyük bölümü sporadiktir. Meme kanseri gelişimi ne kadar erken yaşta ise, ailesel faktörlerin oranı o ölçüde artar. Örneğin 30 yaşın altında gelişen meme kanserinin % 30 kadarı genetik geçişliken, 40- 49 yaşlar arası bu oran %3' e düşer (90).

BRCA-1 gen mutasyonu taşıyan kadınların 50 yaş öncesi meme kanserine yakalanma riski %50 iken, 65 yaşında risk %85' e çıkar. BRCA-2 gen mutasyonları da BRCA-1 geni ile yaklaşık aynı oranda meme kanserine neden olmaktadır (167). BRCA-2 gen mutasyonu taşıyan erkeklerde de meme kanseri riskinde artış olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3. Meme kanserinin oluşumuna ve ilerleyişine katılan faktörler ile olası çok aşamalı karsinogenez modeli (8)

4. Histopatoloji

Meme malign tümörlerinin önemli bölümü adenokarsinomlardır ve günümüzde bunların memenin terminal duktal lobuler ünitesinden köken aldığı kabul edilmektedir. Skuamöz hücreli karsinom, phyllodes tümör, sarkom ve lenfoma gibi adenokarsinom dışı diğer malign tümörler ise %5'den az bir grubu oluşturmaktadır (78).

Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. In situ karsinomda malign epitelyal hücreler bazal membranla çevrili duktus ve asinuslar içinde sınırlı iken, invaziv (infiltratif) karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya invazyon göstermektedir. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir (78).

İnvaziv meme karsinomları morfolojik olarak birbirinden farklı fenotipik özellikler gösterebilen tümörlerdir ve bunların bazılarının klinik ve prognostik açıdan karakteristik özellikleri vardır. Histopatolojik sınıflamada, tümör hücrelerinin sitolojik özellikleri yanı sıra oluşturdıkları yapısal paternler de göz önüne alınmaktadır. İnvaziv karsinoma değişik oranlarda insitu komponent eşlik edebilmektedir. Günümüzde meme karsinomlarının histolojik sınıflamasında en çok kullanılan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflamadır (78).

Meme kanserinin histolojik sınıflaması (WHO sınıflaması)

1. In situ karsinom

- In situ duktal karsinom
- In situ lobuler karsinom

2. İnvaziv karsinom

- İnvaziv duktal karsinom
- İnvaziv lobuler karsinom
- Tubuler karsinom
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medülller karsinom
- Müsinöz karsinom

- İnvaziv papiller karsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom
- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- İnflamatuar karsinom

Meme kanseri genellikle meme üst dış kadrandan gelişir. Tümörlerin %90' inin geniş veya küçük çaplı duktal sistem epitelinden geliştiği bilinmektedir. Geri kalan %10' unu ise lobüler karsinom ve sarkomlar teşkil eder. En sık görülen patolojik tip, meme kanserlerinin yaklaşık %75' ini oluşturan invazif duktal karsinomdur (15) .

5. Derecelendirme

Derecelendirme, meme kanseri hücresinin normal meme dokusuna benzerliğini ifade etmektedir; bu benzerlik iyi diferansiye (düşük derece), orta diferansiye (orta derece) ve kötü diferansiye (yüksek dereceli) olarak ifade edilmektedir. Diferansiyasyon azaldıkça kanser hücresinin sağlıklı dokuya benzerliği de azalmakta ve prognoz kötüleşmektedir.

Günümüzde morfolojik tipine bakılmaksızın invaziv karsinomların tümünün derecelendirilmesi önerilmektedir ve en çok kullanılan derecelendirme sistemi modifiye Bloom-Richardson sistemidir. Bu sistemde tümör hücrelerinin nükleer özellikleri, oluşturdıkları tubulus yapılarının oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı skorlanarak, elde edilen toplam skora göre derece (grade) belirlenmektedir (Tablo 5). 10 yıllık sağkalım oranı grade I tümörler için %85, grade II için %60, grade III için %15'dir (78).

Histolojik Özellik	Skor (puan)
Tubulus yapımı	
Tümörün büyük kısmında (>75)	1
Orta derecede (%10-75)	2
Minimal veya hiç yok (<10)	3
Nukleus özellikleri	
Küçük, uniform hücreler	1
Orta derecede boyut ve şekil farkı, nukleol varlığı	2
Belirgin boyut ve şekil farkı, sıklıkla çok sayıda nukleol	3
Mitoz sayısı (x25, alan çap> 0. 59 mm-10 alan)	
0-9	1
10-19	2
>20	3

Toplam skor; 3-5: Grade I, 6-7: Grade II, 8-9: Grade III

Tablo 5. Histolojik derecelendirmede kullanılan Modifiye Bloom-Richardson sistemi

6. Evreleme

Meme kanserinde evreleme yalnızca hastaya hangi tedavinin seçileceği ve prognozun nasıl olacağı konusunda bilgi vermekle kalmaz, aynı zamanda farklı tedavi tiplerinin kıyaslanmasına da imkan sağlar. Hastalığın anatomik yayılımını esas alarak fizik muayene, çeşitli laboratuvar parametreleri ve görüntüleme yöntemlerine göre belirlenen klinik evreleme hastalarda prognoz hakkında her zaman en doğru bilgiyi vermemektedir. Zira klinik evreleme tümörün hormon reseptör durumu, evresi ve büyüme hızı göstergeleri gibi önemli prognoz ölçütlerini içermemektedir. Oysa cerrahi olarak çıkarılan materyalin incelenmesi ile yapılan patolojik evreleme gerçekte prognoz tayininde daha değerlidir (29).

Meme kanseri evrelendirmesinde TNM sistemi kullanılmaktadır; bu sistemde tümör boyutu (T), lenf nodu yayılımı (N) ve uzak organ metastazı (M) dikkate alınmaktadır (Tablo 6).

Tümör boyutu: Bağımsız bir prognostik parametredir. Tümör boyutu arttıkça aksiller lenf nodu metastazı artmakta ve sağkalım oranı düşmektedir. Evrelemede patolog tarafından ölçülen tümör çapı göz önüne alınmalıdır. Yaygın in situ komponent içeren tümörlerde, ayrı olarak seçilebiliyor ise, mikroskopik olarak lam üzerinde yapılacak ölçüm ile invaziv tümör alanının çapının ayrı olarak verilmesi ve evrelemenin invaziv alanın çapına göre yapılması gereklidir (78).

Lenf nodu metastazı: En önemli prognostik parametredir. Aksiller lenf nodları negatif hastalarda 10 yıllık yaşam %75 iken, nod-pozitif hastalarda bu oran %25-30'a düşmektedir. Metastatik lenf nodlarının seviyesi, sayısı ve büyüklüğü, perinodal yağ dokusuna invazyon da prognoz açısından önemlidir. Lenf nodundaki metastaz alanının boyutu 0.2-2 mm ise “mikrometastaz”, daha küçük boyutta ise “izole tümör hücreleri-submikrometastaz” olarak değerlendirilmektedir. Lenf nodundaki mikrometastazların klinik önemi tartışmalı olmakla birlikte, hastalıklı ve toplam sağkalımda az da olsa anlamlı bir azalmaya neden olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (78). Lenf nodu metastazı görülmesi de lenfovasküler invazyon varlığı kötü prognostik parametredir (78).

Memenin lenfatik drenajının büyük bölümü aksiller lenf bezleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Fizik muayenede palpe edilebilecek boyutlara ulaşmış meme tümörü bulunan olguların yaklaşık % 50'sinde aksiller lenf bezi tutulumunun da bulunduğu histolojik olarak belirlenmiştir. Aksilla metastazı olasılığı primer tümörün boyutu ile direkt olarak ilişkilidir. Primer tümör ne kadar büyükse, aksilla metastazı riski de o derece fazladır (29).

Fisher ve arkadaşları (54) dış kadrantlardaki tümörlerde aksilla metastazı oranını % 52, iç kadrantlardaki ise % 39 olarak bildirmişlerdir. Bu durum medial bölgedeki tümörlerin bir kısmının mamaria interna lenf bezlerine metastaz yaptığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Uzak Metastazlar: Meme kanseri pek çok organa metastaz yapabilmektedir. Çeşitli otopsi serilerinde bazı farklılıklar görülmekle birlikte en sık tutulan organlar kemik, akciğer ve karaciğerdir (137). Tüm metastazlı olgular bakıldığında tedaviden metastaza kadar geçen süre ortalama olarak 42 ay civarındadır. Bu süreç tümörü 8,5 cm ve daha büyük olan

hastalarda 4 ay kadar bulunmuştur. Tümör ne kadar küçükse, uzak metastaz o kadar geç ortaya çıkmaktadır (29).

Primer Tümör Boyutu (T)

Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümöre ait bulgular yok

Tis: İnsitu karsinom,intraduktal karsinom,lobuler karsinoma in situ; ya da tümörsüz meme başının Paget hastalığı

T1: Tümör 0 ila 2 cm arasında

T1mic: Mikroinvazyon tümör 0,1 cm'den küçük

T1a : Tümör 0,1-0,5 cm arasında

T1b : Tümör 0,5-1 cm arasında

T1c : Tümör 1-2 cm arasında

T2: Tümör 2-5 cm arasında

T3: Tümör 5 cm'den fazla

T4: Herhangi bir boyuttaki tümörde

T4a : Göğüs duvarına yayılım

T4b : Ödem (peau d' orange dahil), cilt ülserasyonu, ya da ipsilateral memede sınırlı satellit cilt nodülleri

T4c : 4a + 4b

T4d : İnflamatuvar meme kanseri

Bölgesel Lenf Düğümleri (N)

Nx : Bölgesel nodlar değerlendirilemiyor (Daha önce çıkartılmış olanlar da dahil)

N0 : Bölgesel nod metastazı yok

N1 : Mobil ipsilateral aksiller lenf nodlarına metastaz ; meme içi, infraklavikuler ve "Rotter" nodları dahil

N2 : Bir diğerine ya da diğer yapılara fikse "konglomere" ipsilateral aksiller lenf nodlarına metastaz

N3 : İpsilateral internal mamarian lenf nodlarına metastaz

Uzak Metastaz

M0 : Uzak metastaz yok

M1 : Uzak metastaz var (İpsilateral supraklaviküler,servikal ya da kontralateral internal mamarian lenf nodlarına yayılım

Evreler	Tümör Boyutu	Nod Durumu	Metastaz
EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1	T1	N0	M0
EVRE 2A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
EVRE 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE 3A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
EVRE 3B	T4	N (HERHANGİ)	M0
	T (HERHANGİ)	N3	M0
EVRE 4	T (HERHANGİ)	N (HERHANGİ)	M1

Tablo 6. AJCC (American Joint Comission on Cancer) kanser evreleme sistemi

7. Tedavi

Tümörün boyutu, evresi ve çoğalma hızı gibi özellikleri tedavinin tipini belirlemektedir. Tedavide cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormonoterapi ve/veya immünoterapi gibi farklı yöntemler uygulanmakta (55); multidisipliner yaklaşım tercih edilmektedir (135).

Meme kanserinin primer tedavisi cerrahidir. Evre 1 ve Evre 2 hastalarda meme koruyucu cerrahi (lumpektomi + aksiller lenf nodu disseksiyonu + postoperatif radyoterapi) yapılabilir. Hastanın ve hastalığın durumuna göre modifiye radikal mastektomi de alternatif bir yöntemdir. Aksiller nod negatif ve tümör büyüklüğü 1 cm'den az olan hastaların bir yıl içinde relaps şansı %10'dur. Bu nedenle bu hastalara cerrahi sonrası adjuvan tedavi önerilmez (114). Daha büyük tümörü olan, aksiller nod pozitif olan ya da kötü prognostik faktörlere sahip olan hastalara (östrojen reseptörü negatif veya yüksek histolojik grade)

adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır. En sık kullanılan kemoterapi Siklofosfamid + Metotreksat + 5-Florourasil veya 5-Florourasil + Adriamisin + Siklofosfamid kombinasyonlarıdır. Östrojen reseptörü pozitif olanlar hormon tedavisine (tamoksifen) östrojen reseptörü negatif olanlardan daha iyi yanıt verirler (47). Mikroskobik tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması amacıyla tümör yatağına ve reyonel lenf nodlarına radyoterapi uygulanmaktadır (9, 109).

8. Prognostik Faktörler

Meme kanserinde benzer patolojik özelliklere sahip hastalarda farklı klinik davranışların anlaşılabilmesi için değişik biyolojik işaretleyicilerin prognostik önemi araştırılmıştır. Lenf nodlarının durumu, tümör çapı, histolojik tip ve histolojik grade meme karsinomu için bilinen en önemli prognostik parametrelerdir. Bunun yanı sıra steroid hormon reseptörleri (östrojen ve progesteron reseptörü), onkogenler (HER-2/neu), tümör supresör genler (p53), proliferasyon belirleyicileri (Ki-67), angiogenez ve proteazlar da meme karsinomu prognozu üzerine etkilidir (78).

Nottingham prognostik indeksi: Tümör boyutu, lenf nodu durumu ve histolojik grade gibi önemli prognostik parametreler birarada değerlendirilerek prognostik bir indeks oluşturulmuştur. İndeks aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır:

Nottingham prognostik indeks = {tm çap} (cm)x0. 2}+{lenf nodu stage (1-3)}+{grade (1-3)}
Hesaplama sonucunda elde edilen skora göre 3 prognostik grup oluşturulmuştur (skor ; <3.4: iyi prognostik grup, 3.4-5.4: orta prognostik grup, >5.4: kötü prognostik grup). Bu gruplardaki 10 yıllık sağkalım oranı sırası ile %80, %42; %13 olarak bulunmuştur (78).

Östrojen ve progesteron reseptörleri: Günümüzde, meme karsinomlarında immunhistokimyasal yöntemle hormon reseptörlerinin araştırılması tedavinin belirlenebilmesi için yapılan rutin bir uygulamadır. Primer ve metastatik meme karsinomlarında %45-65 oranında östrojen reseptörü pozitifliği vardır. Reseptör pozitif tümörler hormonal tedaviye daha iyi cevap vermekte ve daha iyi prognoz göstermektedir. Ancak uzun süreli izlemde nüks ve metastaz açısından reseptör pozitifliğinin öneminin olmadığı gösterilmiştir. Tümörde östrojen reseptörü yanı sıra progesteron reseptörünün de pozitif olması hormonal tedaviye cevabı arttırmaktadır. Östrojen reseptörü ekspresyonu ile meme karsinomunun histolojik tipi ve grade arasında anlamlı bir ilişki vardır. Grade arttıkça ekspresyon azalmaktadır (78).

HER-2/neu: Epidermal growth faktör reseptör ailesinden bir protoonkogendir. Meme karsinomlarının %10-30'unda FISH (fluorescent in situ hybridization) ile saptanan HER-2/neu gen amplifikasyonu ve immunhistokimyasal yöntemle saptanan protein overekspresyonu vardır. HER-2/neu overekspresyonu kötü prognostik parametredir ve genellikle histolojik derecesi yüksek, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörleri negatif tümörlerde görülmektedir (78).

9. Tümör Proliferasyon Hızı ve Prognostik Önemi

Tümör profilerasyon hızı, nüks ya da metastaz riski yüksek olan ve adjuvan tedavi alması gereken (nod negatif) meme kanserli hastaların belirlenmesinde ve erken ya da ileri evre meme kanserli hastaların prognozunun tahmin edilmesinde yardımcı olabilmektedir. Tümör proliferasyon hızının prognostik değerlerini içeren bazı alt başlıkları bulunur. Bunlar mitotik indeks, immünhistokimyasal proliferasyon işaretleyicileri (Cyclin A, Ki-67), S-faz reaksiyonu, timidin işaretleme indeksi, bromodeoksiuridin (BrDu) işaretleme indeksi gibi prognostik faktörlerdir (4).

Meme kanserinin palpe edilebilir bir büyüklüğe ulaşması için (yaklaşık 10 mm) ya da mamografik olarak saptanabilmesi için (yaklaşık 3-5 mm) geçen sürede tümör 28-29 eksponensiyel bölünmeye uğramaktadır. Tümör 1mm³'lük hacime ulaştığında tümör hücrelerinin hematojen yolla yayılmaya başladığı da bildirilmektedir (149).

Tarama yöntemleriyle yakalanan tümörlerin yavaş büyüyen tümörler olduğu, prognozlarının ise tanısız gecikmelerden çok da fazla etkilenmediği düşünülmektedir. Buna karşın çok hızlı büyüyen agresif tümörler iki tarama zamanı arasındaki sürede dahi oldukça ileri evrelere ulaşabilirler. Meme kanserinde tümör boyutunun iki kat artması için geçen süre (doubling time) 50 günden kısa veya 500 günden uzun olabilmektedir. Erken olarak saptandığı düşünülen tümörlerin bile ortalama 6-10 yıllık bir geçmişe sahip olduğu bilinmektedir (148).

Kanser hücrelerinin meme içinde yayılması:

- a) Meme parankimine doğrudan infiltrasyon yoluyla
- b) Meme duktusları boyunca
- c) Meme lenfatikleri aracılığıyla gerçekleşir.

Kanserin çevre dokuya direkt infiltrasyonu sıklıkla sivri uzantılar şeklindedir. Bu durum mamografik görüntülerde veya makroskopik kesitlerde karakteristik yıldızvari görünümünü kazanmasına neden olur. Farklı duktuslardaki yayılımın tek bir kanser odağından mı geliştiği yoksa yaygın olarak bulunan in situ duktal karsinom odaklarının invaziv kanserler şekline mi dönüştüğü henüz aydınlık kazanmamıştır (29).

10. Tümör Biyolojisi

Tümörlerin büyümesi, oksijen ve besin maddelerinin tümör dokusuna ulaşması ve atık maddelerin uzaklaştırılması ile sınırlandırılmaktadır. Oksijen ve besin maddeleri başlangıçta tümör hücrelerine bu dokunun etrafındaki ‘‘mikroçevre’’den difüzyon ile ulaşırlar. Tümör büyüdükçe, hücreler beslenme yetersizliğine, asidoza maruz kalırlar ve hipoksik olurlar (37). 4-10 mm çapındaki orta büyüklükte tümörlerde geniş hipoksik bölgeler mevcuttur (98, 119). Bu alanlarda oksijen basıncı azalmakta (<20 mmHg) ve tümör merkezinde 0 mmHg’ya ulaşarak, santral nekroza yol açmaktadır (127). Tümörlerde oksijen basıncı 2.5-30 mmHg aralığında değişirken, bu değer normal doku ve tümör periferinde 30-60 mmHg’dır (96, 127). Tümörlerde normoksik (tümör periferi ve tümör kitlesi içinde yer alan hücreler), hipoksik (kan damarlarından uzak nekrotik bölgelere komşu) ve anoksik (tümör merkezi) olmak üzere 3 oksijen seviyesi mevcuttur.

Tümör hücreleri iskemik ve yetersiz besin içeren mikroçevreye üç ana mekanizma ile adapte olurlar:

- Anormal vasküler ağ oluşumuna neden olan antianjiyojenik faktörlere karşı proanjiyojenik faktörler lehine anjiyojenik dönüşüm
- Apoptozun deregülasyonu; tümör hücrelerinin apoptotik yıkımdan kaçışına izin verecek şekilde apoptotik kaskadın kritik komponentlerinde değişim
- Glikolitik değişim; tümör hücrelerinde anaerobik glikoliz tercihi

Her üç mekanizma hipoksik tümör mikroçevresi ile sağlanmaktadır (37).

Kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı metabolik aktiviteler gözlenmektedir. Tümör hücrelerinin hipoksik mikroçevre ile baş edebilmek amacıyla metabolik hızlarını artırmaları DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır (62). Fizyolojik koşullarda, hücresel tamir

enzimleri DNA hasarını düzeltemediğinde apoptotik kaskad aktive olmakta ve bu da hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Diğer taraftan, tümörler özellikle hipoksik şartlar altında DNA hasarına karşı apoptozdan kurtulmalarını sağlayan hücresel mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalar p53 tümör supresör gen gibi apoptoz ve hücre replikasyonu için kritik önemi olan deregülatör hücresel genler ve komponentler içermektedir. p53 geni insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan gendir ve ileri tümör evresi ve kötü prognoz ile korelasyon göstermektedir (6, 18).

Telomer uzunluğu hücrelerin replikasyon yeteneğini sınırlandırmakta ve hücre yaşlanmaya neden olmaktadır. Telomerler bir kez erozyona uğradığında, hücre yaşlanmakta veya p53 aktivasyonu ile apoptoza uğramaktadır. DNA hasarlandığında doğal yapıda p53, hücre dinlenme fazını indükleyebilmekte ve geri dönüşümsüz hasar oluştuğunda apoptozu indüklemektedir. Mutasyona uğramış p53 telomeraz enziminin aktivasyonu ile telomer erozyonunu azaltmaktadır. Kolorektal (22), over (123), gastrik (103) ve akciğer kanseri (71, 102) olan hastalarda tümör hücrelerinde telomeraz ekspresyonu gerçekleşmekte ve edinilmiş genomik instabilitesi olan malign hücrelerin kontrolsüz replikasyonu ile sonuçlanmaktadır (6, 11, 62). Minamino ve arkadaşları (117) telomerazın özellikle kronik hipoksik ortamda up-regüle olduğunu göstermişlerdir. Hipoksi, apoptoz ile ilişkili diğer regülasyon mekanizmalarını da engellemektedir (62, 132).

Bcl-2 (B hücreli lenfoma-2) ailesinin üyeleri apoptozda inhibitör ve promotor olarak rol oynamaktadır. Bu proteinlerin ekspresyonunun oranındaki değişiklikler antiapoptotik etkiyi artırabilmektedir. Bcl-2 özellikle hipoksi varlığında bazı tümörlerde up-regüle olan, hücre ölümünün etkin bir inhibitörüdür (100). Apoptozu artıran Bax geni ise birçok kanserde mutasyona uğramıştır. Bcl-2'nin aşırı miktarda ekspresyonu, Bax ve p53 mutasyonu veya kaybı ile birlikte hücrelerin apoptotik kapasitesinde anlamlı azalmaya neden olmaktadır (37).

HBO'nun hipoksik malign hücreler üzerindeki bir başka etki mekanizması da HIF-1 α ve VEGF aracılığı ile gerçekleşebilmektedir. Apoptozun deregülasyonu anjiyogenezi etkileyebilmektedir. Nude sıçanlarda kolorektal tümör ksenograftları ile gerçekleştirilen bir çalışmada p53 delesyonunun VEGF ekspresyonunu artıran HIF-1 seviyelerinde yükselme aracılığı ile tümörlerin neovaskülarizasyonunu sağladığı gösterilmiştir (132).

Kronik hipoksi, Bcl-2/Bax oranındaki dengesizliğe bağlı olarak KB-3-1 baş ve boyun skuamöz hücre karsinomu hücre serisinde apoptoz ve nekrozu indüklememiştir (27). Hipoksik bölgeler, yüksek seviyede malign fenotipli tümörlerin apoptotik potansiyeli ile de korelasyon göstermektedir (62, 72). Bu hücrel yanıtlar tümör hücrelerinde oksijen yetersizliği sonucunda ortaya çıkan adaptasyonlardır. Hipoksi, apoptoza dirençli sitogenetik anomalileri bulunan, yüksek oranda agresif hücre kökenlerinin klonal ekspansiyonunu artıran fizyolojik açıdan selektif bir ajan olarak etki göstermektedir (37).

Tümör hücreleri artmış enerji ihtiyaçlarını anaerobik glikoliz ile sağlamaktadır. Anaerobik glikoliz, hızlı tümör progresyonunu kolaylaştıran ve glikolitik kayma olarak bilinen önemli bir adaptasyon mekanizmasıdır. İlk kez Otto Warburg tarafından ileri sürülmüştür ve “Warburg etkisi” olarak tanımlanmaktadır (164). Hipoksik koşullarda, glikolitik enzim mRNA’larında artış olmaktadır. HIF-1, Akt kinaz yolağı gibi hücre sinyalizasyonundaki defektlerin ve mutasyona uğramış p53 ve myc onkogenlerinin (36) tümör hücrelerinin glikolitik kapasitesini artırdığı gösterilmiştir.

Glikolitik kayma, tümörlerin hipoksi altında artmış metabolik hızlarının idame ettirilmesini sağlamaktadır. Daha önemlisi, bu adaptasyon sadece glikolizin devamını değil aynı zamanda tümör progresyonunu da hızlandıran süreçleri düzenleyen HIF-1’in stabilizasyonunu indüklemektedir. Glukoz yetersizliğine yanıt olarak tümör hücrelerinde HIF-1 bağımlı mekanizmalar ile VEGF ve IL-8 transkripsiyonu up-regüle olmaktadır. Bu, bir adaptasyon mekanizmasının (glikolitik kayma), tümör büyümesini sağlayan bir başka adaptasyon mekanizmasına (anjyogenez) tetiklemesi açısından bir örnektir (37).

Reaktif oksijen türleri veya serbest radikaller ise hücre metabolizması ve aerobik solunumun bir yan ürünüdür ve tüm ökaryotik hücrelerde üretilmektedir. Mitokondrilerde düşük miktarlarda ROS üretilmektedir ve sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesi, normal hücre proliferasyonu ve fonksiyonu açısından önemlidir (10, 92). ROS; süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve singlet oksijeni içermektedir. Karsinogenezde ROS’un rol oynadığına ilişkin önemli kanıtlar bulunmaktadır (10, 79, 151). ROS, oksijen eksikliği, reoksijenizasyon veya hiperoksi sırasında oksidatif stres ile indüklenmektedir. ROS, tümörlerde paradoksik rol oynamaktadır. ROS birikimi kanserin başlamasına ve sürekli

progresyonuna yol açarken tedavi açısından da bir hedef oluşturmaktadır. Doksorubisin, bleomisin, radyoterapi ve fotodinamik tedavi tümörlerde ROS üretimine neden olmaktadır.

Tümör hücresi kompartmanı hipoksik, asidotik ve hipoglisemiktir. Kanser hücreleri hızla bölünmekte ve yetersiz vaskülarize olan bölgede hipermetabolik aktiviteleri anaerobik glikoliz ve laktik asit oluşumuna neden olmaktadır. VEGF ve bFGF gibi mitojenik büyüme faktörleri de burada oluşmaktadır; hipoksinin VEGF salınımını up-regüle ettiği bilinmektedir (51).

PDGF, IL-6 ve IGF-1 ise endotel hücrelerinden salınan büyüme faktörleridir ve tümör hücresi motilite ve proliferasyonunu stimüle etmektedirler. Hipoksi IL-8 salınımını artırırken (42), anjiyogenik bir inhibitör olan PEDF (Pigment Epithelium Derived Factor) salınımını azaltmaktadır (38).

Hipoksik tümör hücreleri istenmeyen durumlara adapte olarak yaşamlarını idame ettirirler; tümör rekürrensi ve birçok malignite formunda tedavi başarısızlığı açısından potansiyel bir kaynaktır (17, 28, 46, 72, 144). Hipoksik bölgelerdeki malign hücreler daha düşük ilaç konsantrasyonlarına maruz kalırlar, intravenöz uygulanan ilaçların avasküler bölgelere sınırlı girişinden sorumludurlar. Hipoksi, anjiyogenez, apoptoz ve glikolizde rol oynayan birçok gen ürününün ekspresyonunu da direkt olarak etkilemektedir. Yaşayan malign hücreler tercihli olarak seçilmekte, klonal ekspansiyon oluşmakta, yüksek oranda malign hücre serileri artmaktadır (37).

Tümörlerde oksijen eksikliği birkaç mekanizma ile tedavinin etkinliğini sınırlandırmaktadır. Kemoterapötik ilaçlar yetersiz şekilde perfüze olan mikroçevreye ulaşamamaktadır. Radyoterapi sadece iyi oksijenizasyon sağlanan tümör hücreleri üzerinde etkilidir. Hipoksi, hücre dinlenme fazını indüklemekte, hücrelerin G0/G1 fazında kalmalarını sağlamaktadır (60). Hipoksi, oksidatif stres altında anjiyogenez aracılı tümör büyümesi ve metastaza yola açmaktadır. Oksidatif stres altındaki tümör hücreleri ROS üretmekte ve bu da mutasyonlarla sonuçlanmaktadır. Hipoksi varlığında apoptotik kaskadın deregülasyonu malign hücre destrüksiyonunu engellemektedir. Tüm bu mekanizmalar, destrüksiyon dirençli hücrelerin bulunduğu yüksek seviyede agresif bir tümörde en yüksek seviyedir ve tümör rekürrensine neden olabilmektedir. Yeni stratejiler, tümörlerin adaptif defans mekanizmalarını ortadan kaldırabilecek veya tersine çevirebilecek veya tümör destrüksiyonunu kolaylaştıran

oksidatif stresi indükleyebilecek oksijenizasyon artışı ile hipoksik koşulların değiştirilmesini hedeflemektedir ve hiperbarik oksijen tedavisi tümör oksijenizasyonunu artıran bir tedavi yöntemidir (37).

Yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla uygulanan; fibroblast, epitel hücreleri ve kan damarlarının proliferasyonunu artıran bir tedavi yönteminin tümör dokusunda da anjiyogenez ve malign hücre proliferasyonuna yol açabileceği düşünülebilir.

Tümör ve yara iyileşmesi arasında bazı benzerlikler bulunmakla birlikte, birçok önemli farklar da yer almaktadır. Her ikisinde de anjiyojenik büyüme faktörlerinin salınımı için hipoksi gerekmektedir. Yaralarda fibroblastik proliferasyon, kollojen salınımı, hidroksilasyon, çaprazlaşmalar ve epitelizasyon (75) için oksijen gereklidir. Kansерlerde kan akımı başlangıçta çevre yapılardan ve stromadan sağlanmaktadır (25). Tümör anjiogenezi için kollojen üretimi veya salınımı gerekmemektedir. Epitelizasyon da kanserli dokunun büyümesinde majör bir komponent değildir. Hipoksik tümör hücreleri anjiyogenez faktörlerini artırmakta, daha agresif çoğalmakta, daha fazla metastatik potansiyel göstermektedir. Bu hücrelerde apoptoz azalmakta, genetik instabilite artmakta ve bu nedenle ilaç direnci de daha fazla olmaktadır (51).

Oksijen basıncını optimal aralık olan 30-40 mmHg değerlerine yükselten aralıklı HBOT uygulaması kollojen sentezi, hidroksilasyon ve çapraz bağlanmayı stimüle ederek kronik hipoksik yaraların iyileşmesinde anahtar rol oynamaktadır. Tümör stroması oluşumunda buna benzer bir mekanizma bulunmamaktadır. Aksine tümörlerin invazyon ve proliferasyonu için bazal membran ve normal dokuların parçalanması amacıyla kollojenaz salınımı gereklidir (51).

Yaraların iyileşme süresi sonlandığında geri bildirim sinyalleri ile proliferasyon sonlanırken, malign hücre çoğalması geri bildirim uyarılarına yanıt vermemekte, çoğalma kontrolsüz şekilde devam etmektedir (56).

Tümörlerde arter-arteriol-kapiller-venül-ven şeklindeki normal vasküler yapılanma görülmemekte, sıklıkla dev kapiller damarlar ve kapiller ağlar içermeyen arteriyovenöz şantlar bulunmaktadır (25) ve kan akımı sırasında damarlardaki sızıntılar peritümöral ödeme neden olmaktadır. Bir başka deyişle, tümör anjiyogenezisinde, başarılı bir yara iyileşmesi ile aynı şekilde damar yapısı integrasyon ve matürasyonu görülmemektedir (51).

11. Kanserde Hipoksi , HIF-1 aktivasyonu ve Prognoz

Oksijenin çok yüksek miktarlarının toksik etkili olması, çok düşük miktarlarının ise metabolizmayı bozması nedeniyle oksijen dengesi tüm memeli hücreleri için kritik öneme sahiptir. Eritropoietin hormonu (EPO) doku oksijenizasyonunun geribildirim döngüsünün merkezinde yer almakta; hipoksiye yanıt olarak eritrosit üretiminin artışı ile dokulara oksijen dağılımı artmaktadır. EPO seviyeleri transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir ve hipoksi ile indüklenen faktör (HIF) bu düzenlemede yer alan bir yeni bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmaktadır. p53, fos ve jun gibi birçok transkripsiyon faktörü doku oksijenizasyonundan etkilenmekte ve böylece gen regülasyonunu düzenlemekle birlikte, HIF oksijen seviyeleri ile ilişkili olarak gen ekspresyonunu etkileyen başlıca transkripsiyon faktörüdür (26).

HIF, PAS transkripsiyon faktörleri süper-ailesinin üyeleri olan gen aileleri α ve β alt ünitelerinden oluşan bir heterodimerdir. β ünitesi ksenobiyotik ajanlara transkripsiyonel yanıtta da rol oynarken, α alt ünitelerinin hipoksi ve demir şelasyonuna yönelik gen düzenleyici yanıtlarda rol oynadığı gösterilmiştir (26).

Kanserde HIF aktivasyonunun mikroçevresel tümör hipoksisine yanıtta ve genetik mekanizmalar sonucunda ortaya çıkabildiği anlaşılmıştır. Birçok onkogenin (Ha-ras, myc, src) aktivasyonu, tümör supresör fonksiyonların (p53, PTEN) kaybı ve farklı büyüme faktörlerine (insülin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve2, anjiyotensin II) maruziyetin normoksik ve hipoksik şartlarda HIF aktivasyonunu artırdığı bildirilmiştir (133). Deneysel tümörlerde farklı etkiler gösterilmiştir, HIF-1 β eksikliği gelişen sıçan hepatoma hücrelerinde mutant hücrelerde tümör çoğalması ve anjiyogenez azalmıştır (112). HIF-1 α eksikliği olan sıçan embriyonik kök hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edilirken (134); diğer çalışmalar hipoksi ile indüklenen apoptoza dirençli defektif hücrelerde çoğalmada artış göstermişlerdir (20).

Tümör hipoksisinin kötü prognoz ile korelasyon gösterdiği bilinmektedir (73). Hipoksi, tümör agresifliğinin direkt bir belirtecidir, iskemik bölgeler standart tedavilere karşı korunmakta, sistemik uygulanan kemoterapötik ajanlar bu alanlara daha düşük miktarlarda

ulaşabilmekte ve azalmış oksijen radikalleri nedeniyle radyoterapiye daha fazla direnç göstermektedir. HIF aktivitesi ve tümör prognozu arasındaki ilişkiye ait bilgiler henüz başlangıç aşamasındadır, meme kanserinde gerçekleştirilmiş bir çalışmada (12) HIF-1 α pozitif boyanmasının daha agresif tümörlerle ilişkili olduğu gösterilmekle birlikte, küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda HIF pozitif tümörlerin negatiflere göre daha uzun sürvi gösterdiği saptanmıştır (162).

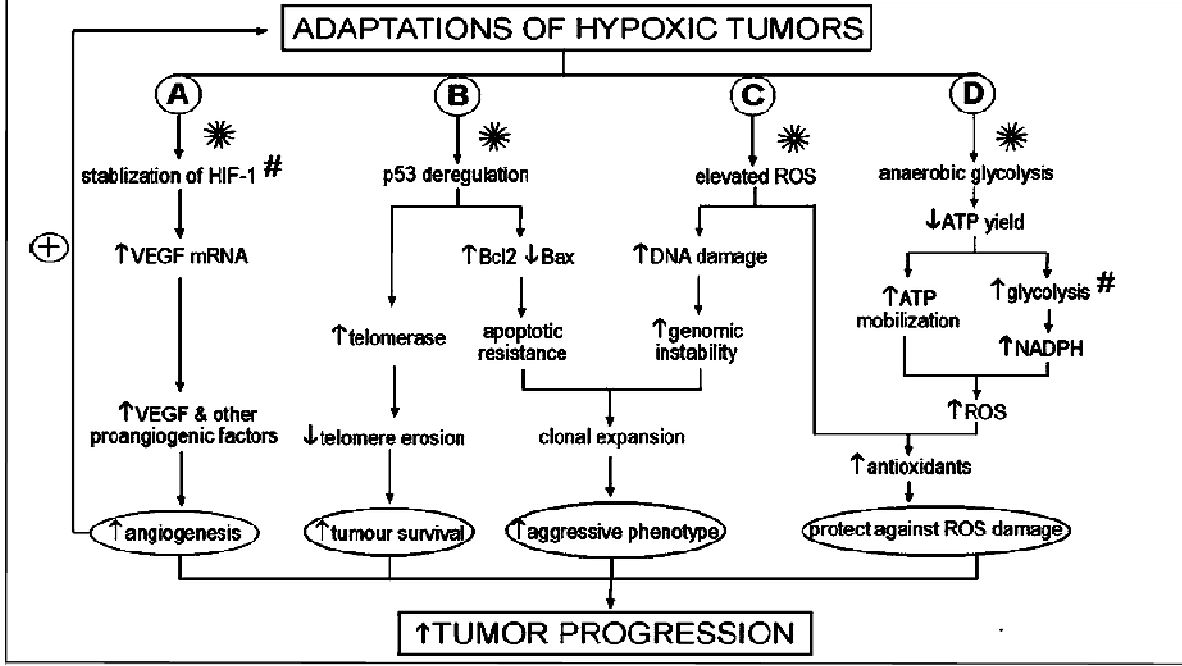
Birçok kanserde gözlemlenen HIF up-regülasyonu, HIF'nin anjiyojenik büyüme faktörlerinin up-regülasyonu üzerindeki rolü ve anjiyojenik büyüme faktörlerinin tümör çoğalmasındaki rolü, HIF sistemi down-regülasyonunun tümör tedavisinde yararlı olabileceğini öne sürmektedir. Bazı ksenograft deneyleri, belirli durumlarda HIF yanıtının bloke edilmesinin tümör anjiyogenezi ve çoğalması üzerinde yararlı etkileri olabileceğini göstermiştir (112, 129).

Sonuç olarak, HIF sistemi tümörlerde sıklıkla aktive durumdadır ve hipoksiye fizyolojik adaptasyonda ana rolü oynamaktadır. Aktivasyon basit şekilde, mikroçevresel hipoksinin beklenen bir sonucu olarak gerçekleşmekle birlikte, proliferasyonu indükleyen ve farklı tümörlerde aktif olan çeşitli genetik mekanizmaların HIF sistemini duyarlaştırdığı görülmektedir. HIF aktivasyonu tümörler arasında farklılık göstermektedir; birçok tümörde HIF sistemi modülasyonu veya up-regüle HIF aktivitesi terapötik bir avantaj olarak kullanılabilir (26).

12. Kanserde Adaptasyon Mekanizmaları ve HBOT

Tümörler hipoksik koşullarda hipoksik mikroçevre ile düzenlenen adaptasyonlarla yaşamlarını idame ettirirler. Bu adaptasyonlar sürvi ve anjiyogenezde yer alan yeniden regüle edici moleküler mekanizmalar ile tümör progresyonunu hızlandırmaktadır. Teorik olarak HBO, tümör hücrelerinin hipoksik koşullardaki her adaptasyon mekanizmasını durdurma potansiyeline sahip olduğu söylenebilir (Şekil 4). HBO, tümörlerdeki oksijen perfüzyonunu yüksek oranda artırmakta, ve böylece hipoksik mikroçevreyi değiştirmektedir. Hipoksik ortamı değiştirmek, anjiyogenez uyarısını ortadan kaldırabilir; HBO, ROS üretimi ile apoptozu artırabilir. Hipoksi, HIF-1 α stabilizasyonu ve takibeden VEGF ekspresyonu için de esansiyeldir. Hipoksik

hücrelerin reoksijenizasyonu in vitro olarak, HIF-1 α 'nın ve takiben VEGF üretimi ve anjiyogenezin hızlı degradasyonunu indüklemektedir (163).



Şekil 4. Hipoksik tümörlerin adaptasyon mekanizmaları (37)

Hipoksik mikroçevrede bulunan hücreler sadece oksijen değil, aynı zamanda besin maddeleri açısından da fakirdir. Hipoksi ve besin yetersizliğine bağlı olarak tümör hücrelerinde ortaya çıkan bir başka adaptasyon mekanizması glikolitik kaymadır. Artmış glikoliz, HIF-1 α stabilizasyonu ile HIF-1 ekspresyonununa yol açmaktadır (164).

Normal dokular ve tümör dokusunda ROS üretimi de tamamen farklıdır. Malign olmayan hücrelerde ROS seviyeleri göreceli olarak düşüktür ve antioksidanlar ile sıkı şekilde kontrol edilmektedir (10). Aksine tümörler, artmış glikoliz, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve vasküler yapıları nedeniyle devamlı bir oksidatif stres altındadırlar. Tümörlerdeki ROS seviyeleri normalde subletal dozlardayken, herhangi bir artış sitotoksiteyi indüklemektedir (67, 88, 99, 106).

HBO'nun serbest radikal oluşumu üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar göz önüne alındığında, Kaelin ve arkadaşları (89) hiperbarik oksijene maruz kalan hayvanlarda süperoksit dismutaz aktivitesinde anlamlı artış göstermiştir. Zamboni ve arkadaşları (169) reperfüzyon hasarı hayvan modelinde hiperbarik maruziyet ile serbest radikal hasarında artış ile ilgili bulgular elde edememişlerdir. Diğer taraftan Monstrey ve arkadaşları (118) adriamisin ekstrevasasyonu öncesi ve sonrasında hiperbarik oksijene maruz kalan hayvan modelinde yumuşak doku hasarında artış bildirmişler ve bu hasarı artmış serbest radikal aktivitesi ile ilişkilendirmişlerdir.

Tümör anjiyogenezi, tümörlerin büyümesi ve metastazında anahtar rol oynamaktadır ve antianjiyogenik tedaviler kanser tedavisi ve kontrol stratejileri olarak göz önünde bulundurulmalıdır (57).

Oksijen artışının, hipoksik tümör hücrelerinin reoksijenizasyonu ve anjiyogenezi aracılığı ile tümör büyümesini stimüle edebileceği şüphesi mevcuttur. HBO'nun yara iyileşmesinde anjiyogenezi artırması tümör büyümesini de aynı mekanizma ile indükleyeceği anlamına gelmemektedir (37). Shewell ve Thompson (142) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada C3H sıçanda HBOT'nin pulmoner metastazlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma, tümör hücrelerinin intravenöz inokülasyonu sonrasında eksojen akciğer metastazı olan ve spontan olarak tümörün endojen metastatik yayılım gösterdiği sıçanlar çalışmaya alınmıştır. HBO maruziyeti, Ehrlich asit tümörü hücreleri ile inokülasyon sonrasında akciğer koloni sayısını azaltırken, C3H meme tümörü hücre agregatlarının akciğer kolonizasyonu üzerinde etki göstermemiştir. HBO uygulanan spontan tümörlü sıçanlarda akciğer metastazı artmıştır; hava soluyan grupta metastaz oranı %66.6 iken bu oran HBO grubunda %88.8'dir.

Endotelial hücrelerin proliferasyonu, sürvisi ve motilitesini artıran birçok büyüme faktörü tanımlanmıştır. Endotelial hücre mitozu üzerindeki en hücre-spesifik etkiyi VEGF göstermektedir. Asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri (a FGF ve bFGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), interlökin-8 ve tümör nekroz faktörü alfa da önemli rol oynamaktadır. Alfa, beta integrin ve E-selektin gibi endotelial yüzey proteinleri endotel hücresi motilitesi ve sürvisini arttırmaktadır. Anjiyostatin, endostatin, interferon alfa-beta, platelet faktörü 4 ve trombospondin-1 ise dolaşımda yer alan, endotel hücresi mitozu ve motilitesini inhibe eden faktörlerdir.

Folkman (56) tarafından öne sürülen anjiyogenez modelinde, tümörler tümör hücresi kompartmanı ve endotelial hücre kompartmanı olmak üzere 2 kompartman şeklinde düşünülmektedir. Her iki kompartman da bağımsızdır ve terapötik uygulamalar açısından fırsat yaratmaktadır.

1966 yılında McCredie ve arkadaşları (113) tarafından C3HBA sıçan meme tümöründe ve aynı yıl Suit ve arkadaşları (150) tarafından A ve BDF sıçan meme tümöründe gerçekleştirilen iki farklı çalışmada HBO'nun primer tümör ve metastaz üzerinde herhangi bir etkisi gösterilmemiştir. Cade (161) ve arkadaşlarının çalışmasında radyo-duyarlaştırıcı amacıyla HBO uygulanan grupta akciğer kanseri metastazında artış gözlenmezken, mesane kanseri metastazı artmıştır. Bradfield ve arkadaşları (13) ileri evre baş-boyun kanseri nedeniyle uygulanan radyoterapi sonrası radyonekroz nedeniyle HBOT alan 4 olguda rekürrens gelişmiş ve hızlı progresyon gözlenmiştir.

Eltorai ve arkadaşları (41) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada kronik spinal kord hasarı olan ürotelyal kanserli 3 anektodal olguda 2.0 ATA'da 10-20 seans HBOT uygulaması sonrasında hızlı progresyon gözlenmiştir.

Shi (145) tarafından skuamöz hücreli karsinomu olan Ncr-nu/nu sıçanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada 90 dakika süre ile 2.4 ATA'da 13-28 seans HBO maruziyetinin tümörler üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir.

Radyoterapi sırasında HBOT uygulayan bazı gruplar hava uygulanan kontrol grubuna göre uzak metastaz sıklığında hafif artış bildirmişlerdir (50). Bu klinik seriler primer skuamöz kanserler, serviks, bronş ve baş-boyun (51) kanseri olan küçük hasta gruplarını içermektedir. Bu bildirilerde artmış metastaz sayısına beklenmeyen metastaz özellikleri veya hızlı çoğalma da eşlik etmektedir. Evans (50) tarafından deri kanseri nedeniyle tek doz radyoterapi uygulanan 295 sıçanda gerçekleştirilen çalışmada, 50 sıçana 2 ATA'da O₂, 245 sıçan ise hava ortamında RT uygulanmıştır. RT sonrası hava ortamındaki sıçanların %14'ünde, HBOT grubundakilerin ise %20'sinde pulmoner metastaz saptanmıştır; fakat aradaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı (p>0. 1) bildirilmiştir.

Peng'in çalışmasında (126) HBO ve 5-FU kombinasyonunun insan nazofarengeal karsinom CNE-2Z hücrelerinin metastazı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tek başına HBOT 48 ve 72 saat sonrasında insan nazofarengeal karsinom hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı

şekilde inhibe ederken, HBO ve 5-FU kombinasyonu sadece 48 saat sonrasında inhibe edebilmiştir. Tek başına HBOT kanser hücrelerindeki MMP-9 ve VEGF'nin yüksek ekspresyonunu anlamlı oranda azaltmamış; hücrelerin invazyon ve migrasyonunu inhibe edememiştir. Aynı etkiler HBO ve 5-FU kombinasyonu için de geçerlidir (126).

Son 20 yılda gerçekleştirilen faz III çalışmalarında HBO'nun baş-boyun kanserlerinin loko-rejyonel kontrolünü artırmada radyoterapi ile sinerjik etkili olduğu gösterilmiştir (44). Birçok hayvan çalışması HBO'nun kemoterapinin tümörisidal etkisini artırdığını da göstermiştir (1, 2, 39, 44, 101, 107, 120, 131, 141, 152, 154).

Hipoksinin daha agresif tümörler ve artmış metastatik potansiyel ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hoeckel ve arkadaşları (74) yüksek oranda hipoksik bölgeler içeren serviks kanserli hastalarda sürvinin daha kısa olduğunu bildirmişlerdir. Brizel ve arkadaşları (18) daha yüksek miktarda hipoksik hücre fraksiyonları içeren yumuşak doku sarkomlu hastalarda oksijen seviyesi daha yüksek olanlara göre metastazların daha sık olduğunu göstermişlerdir. Sürvi açısından kırılma noktası 10 mmHg'dır ve ortalama oksijen değerleri <7.7 mmHg olan grupta, >20 mmHg olana göre metastazlar daha sıktır.

Marx(108), radyasyon hasarı nedeniyle HBOT uygulanan 245 hasta ile kontrol grubunda yer alan 160 hastayı rekürrens açısından karşılaştırdığı çalışmasında, rekürrens oranları çalışma grubunda %28, kontrol grubunda ise %19.6 olarak saptanmıştır.

Feldmeier (51) ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen, hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar derlemesinde aralıklı HBO maruziyetinin primer veya metastatik tümörler üzerinde stimülatör bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Bir bütün olarak değerlendirildiğinde, hayvan çalışmalarında HBOT'nin indüklenmiş, transplante veya spontan tümörler ve bu tümörlerin sekonder metastazlarında çoğalma üzerinde nötr veya negatif etkili olduğu gösterilmiştir. 15 insan çalışmasında toplam 72 hastada HBOT sonrasında tümör dokusunda çoğalma ve metastazda artış görülürken, 3000'den daha fazla olguda nötr veya tümör suprese edici etki ortaya çıkmıştır.

III. AMAÇLAR

Yayınlanan mevcut çalışmalar aralıklı HBOT'nin kanserlerde primer veya metastatik çoğalmayı artırıcı bir etkisi olmadığını bildirmektedir. 72 hastanın katıldığı 3 yayında olası kanser veya metastazı artırıcı etki bildirilirken, HBO'nun radyo-duyarlaştırıcı etkisinin araştırıldığı ve 3000'den daha fazla hastanın katıldığı çok sayıda kontrollü çalışmada nötral veya kanser inhibitör etki gösterilmiştir (51).

HBO'nun radyo veya kemo-duyarlaştırıcı etkisinin araştırıldığı çalışmalarda HBO adjuvan tedavi olarak uygulandığından çok sayıda çalışmada primer veya metastatik kanser açısından stimülatör bir etki saptanmamakla birlikte, HBO'nun teorik etki mekanizması ve literatürdeki kanser stimülatör etkinin gösterildiği birkaç yayın nedeniyle aktif veya remisyonadaki kanser hastalarında farklı endikasyonlarla tek başına HBOT uygulamasına şüphe ile yaklaşılmaktadır.

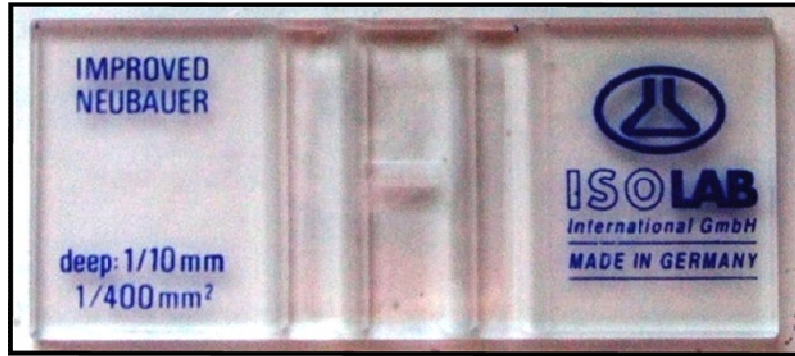
Meme kanseri insidansının yüksek olması, meme kanseri tedavisinde uygulanan kemoterapötik ajanın ekstrevasasyonu ve radyoterapi sonrası meme dokusu ve komşu dokularda gelişen radyonekrozun HBOT endikasyonları arasında yer alması nedeniyle, bu çalışmada HBOT'nin meme kanseri tümör hücre kültürü üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

IV- GEREÇ VE YÖNTEM

Meme kanseri hücreleri olarak MCF-7 hücreleri seçildi; hücreler bromodeoksiuridin ile boyanarak proliferasyon indeksi, hücre sayısı ve vitalite saptanmıştır.

A- MCF-7 KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANMASI

%40 serumlu medyum (Dulbecco Modifiye Esansiyel Medyumu-DMEM/Ham's F-12 1:1 Sigma D-8900) ve %20 dimetil sülfoksitli (DMSO- Sigma C-6164) medyum karışımında dondurulan ve -180°C 'de 1 ml'lik dondurma tüpleri içinde muhafaza edilen MCF-7 hücreleri buz içerisinde alınarak, dondurma tüpü 37°C sıcaklıktaki benmaride eritildi. Tüp içerisindeki hücreli karışım medyum içeren santrifüj tüpüne alındı. 300 g'de 3 dakika süre ile 2 kez santrifüj sonrasında 5 ml medyum ilave edilerek hücre kültür şişelerine (TPP, Kat no. 92026) ekildi ve 37°C 'de nemlendirilmiş %5 CO_2 içeren inkübatör (Sanyo, MCO20/AIC) içinde kültürü gerçekleştirildi. Hücreler günlük olarak takip edilerek 1 hafta süresince çoğaltıldı ve pasajlanarak deney için hazır hale getirildi. Bir haftanın sonunda, hücre kültür şişelerindeki hücreler kalsiyum magnezyum içermeyen Hank's tamponu (Sigma, H-9394) içinde çözölmüş %0,5'lik tripsin (Gibco, Kat. no. 27250-018) ile toplandı ve çalışmamızın hücre sayımı ve vitalite değerlendirmesi için sayma kamarasında (Şekil 5) sayılarak, 5'er adet hücre kültür kuyucuğuna (TPP, Kat no. 92006) 4 ml DMEM-F12 medyumunu içinde 100.000'er hücre olacak şekilde ekildi. Çalışma sonunda her kuyucuktan toplanan hücrelerin ml'deki sayısı ve canlılık oranı belirlendi.



Şekil 5. Neubauer sayma kamarası

Çalışmamızın diğer ölçütünü oluşturan hücre proliferasyonunu saptamak amacıyla hücreler sayma kamerasında sayılarak her kuyucukta 30000 hücre olacak şekilde 1 ml DMEM-F12 medyumunu içinde steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş kuyucukların üzerine ekildi. Deneyin sonlandırılmasından önceki 1 saat içinde medyum içine BrdU eklenerek 60 dakika sonra hücrelerin bulunduğu lameller alkol ile tespit edildi. Daha lameller fosfat tamponu ile yıkanarak, BrdU boyaması gerçekleştirildi.

B- ÇALIŞMA GRUPLARI

Çalışmada her kuyucukta 100000 MCF-7 meme kanseri hücresi olmak üzere 5 adet 6'lı well-plak kullanılmıştır.

Çalışma grupları:

- 1- İnkübatörde bekletilen grup (İNK grubu/Kontrol grubu)
 - a) İNK 1: İnkübatörde bekleme sonrasında hücre sayısı ve vitalite araştırılan grup
 - b) İNK 2: İnkübatörde bekleme sonrasında DNA proliferasyonu araştırılan grup
- 2- Normobarik hava uygulanan grup (NBH grubu)
 - a) NBH 1: Normobarik hava uygulaması sonrasında hücre sayısı ve vitalite araştırılan grup
 - b) NBH 2: Normobarik hava uygulaması sonrasında DNA proliferasyonu araştırılan grup
- 3- Hiperbarik hava uygulanan grup (HBH grubu)
 - a) HBH 1: Hiperbarik hava uygulaması sonrasında hücre sayısı ve vitalite araştırılan grup
 - b) HBH 2: Hiperbarik hava uygulaması sonrasında DNA proliferasyonu araştırılan grup

4- Normobarik oksijen uygulanan grup (NBO grubu)

- a) NBO 1: Normobarik oksijen uygulaması sonrasında hücre sayısı ve vitalite araştırılan grup
- b) NBO 2: Normobarik oksijen uygulaması sonrasında DNA proliferasyonu araştırılan grup

5- Hiperbarik oksijen uygulanan grup (HBO grubu)

- a) HBO 1: Hiperbarik oksijen uygulaması sonrasında hücre sayısı ve vitalite araştırılan grup
- b) HBO 2: Hiperbarik oksijen uygulaması sonrasında DNA proliferasyonu araştırılan grup

Her grup uygulamalar sonrasında hücre sayısı, vitalite ve DNA proliferasyonu açısından incelenmiştir. İki aşamalı olarak gerçekleştirilen deneyde, birinci aşamada kültürde çoğaltılan MCF-7 hücreleri üzerine ardışık 5 gün süresince yapılan uygulamalar sonrasında hücre sayısı ve vitalite araştırılmıştır. Birinci aşamadan üç gün sonra başlayan ikinci aşamada farklı MCF-7 hücreleri tekrar kültürde çoğaltılarak ardışık 5 gün süresince yapılan uygulamalar sonrasında DNA proliferasyonu değerlendirilmiştir. MCF-7 hücrelerinin çoğaltılması ve sayım işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İNK grubundaki hücreler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Araştırma Laboratuvarı'nda inkübatörde bekletilmiştir; NBH, HBH, NBO ve HBO uygulamaları İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

C- DENEYSEL PROSEDÜR

Hiperbarik oksijen, hiperbarik hava ve normobarik oksijen uygulamaları İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı bünyesindeki, 0,022 m³ hacmindeki deney basınç odasında (Şekil 6) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6. Deney basınç odası

1. İnkübatörde Bekleme

Deneyin kontrol grubu için MCF-7 hücreleri ekilerek hazırlanmış olan 2 farklı well-plak, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Bünyesi'ndeki inkübatörde bekletildi. Deneyin her iki aşamasında da 122. saatte kuyucuklardan toplanan hücreler, hücre sayısı, vitalite (İNK 1) ve DNA proliferasyonu (İNK 2) açısından incelendi.

2. Normobarik Hava Uygulaması

NBH uygulaması prosedüründe hücreler 25 °C sıcaklıkta oda havasına kaldı. MCF-7 hücreleri ekilmiş olan 6'lı well-plak ardışık 5 gün süresince günde 1 saat olmak üzere oda havasına maruz bırakıldı. Deneyin 122. saatinde; 5. kez oda havası uygulamasından

hemen sonra, well-plaktan toplanan hücreler (NBH 1) sayma kamerasında sayıldı ve tripan mavisi ile boyanarak canlılık analizi yapıldı.

Deneyin ikinci aşamasında 6'lı well-plaktan toplanan hücreler (NBH 2) BRdU işaretlemesi yapılarak 3 adet lam üzerinde ışık mikroskobu altında sayıldı; total hücre sayısı ve BRdU ile boyanan hücre sayısı saptandı.

3. Hiperbarik Hava Uygulaması

HBH uygulaması amacıyla deney basınç odası 37 °C'de 5 dakikada 2.0 ATA basınca kadar komprese edildi. 2.0 ATA'da 60 dakika süre ile hava uygulanmasının ardından, basınç odası 5 dakikada dekomprese edildi.

MCF-7 hücreleri ekilmiş olan bir adet 6'lı well-plak (Şekil 7) üzerine 24 saat aralıklarla toplam 5 kez HBH uygulandı. Deneyin 122. saatinde; 5. HBO uygulamasından hemen sonra, kuyucuklardan toplanan hücreler (HBH 1) sayma kamerasında sayıldı ve tripan mavisi ile boyanarak canlılık analizi yapıldı.

DNA proliferasyonunun saptanması MCF-7 hücreleri ekilmiş olan bir adet 6'lı well-4 saat aralıklarla toplam 5 kez HBH uygulandı. Deneyin 122. saatinde; 5. rısından hemen sonra, kuyucuklardan toplanan hücreler (HBH 2) BRdU apılarak 3 adet lam üzerinde ışık mikroskobu altında sayıldı; total hücre U ile boyanan hücre sayısı saptandı.



Şekil 7. MCF-7 hücreleri ekili 6'lı well-plak

4. Normobarik Oksijen Uygulaması

NBO uygulaması amacıyla deney basınç odası 37 °C’de normobarik şartlarda 5 dakika %100 oksijen ile ventile edildikten sonra, 60 dakika süre ile %100 oksijen uygulandı.

MCF-7 hücreleri ekilmiş olan bir adet 6’lı well-plak üzerine 24 saat aralıklarla toplam 5 kez NBO uygulandı.. Deneyin 122. saatinde; 5. seans NBO uygulamasından hemen sonra, kuyucuklardan toplanan hücreler (NBO 1) sayma kamerasında sayıldı ve tripan mavisi ile boyanarak canlılık analizi yapıldı.

DNA proliferasyonunun saptanması amacıyla MCF-7 hücreleri ekilmiş olan bir adet 6’lı well-plak üzerine 24 saat aralıklarla toplam 5 kez NBO uygulandı. Deneyin 122. saatinde; 5. NBO uygulamasından hemen sonra, toplanan hücreler (NBO 2) BRdU işaretlemesi yapılarak 3 adet lam üzerinde ışık mikroskobu altında sayıldı; total hücre sayısı ve BRdU ile boyanan hücre sayısı saptandı.

5. Hiperbarik Oksijen Uygulaması

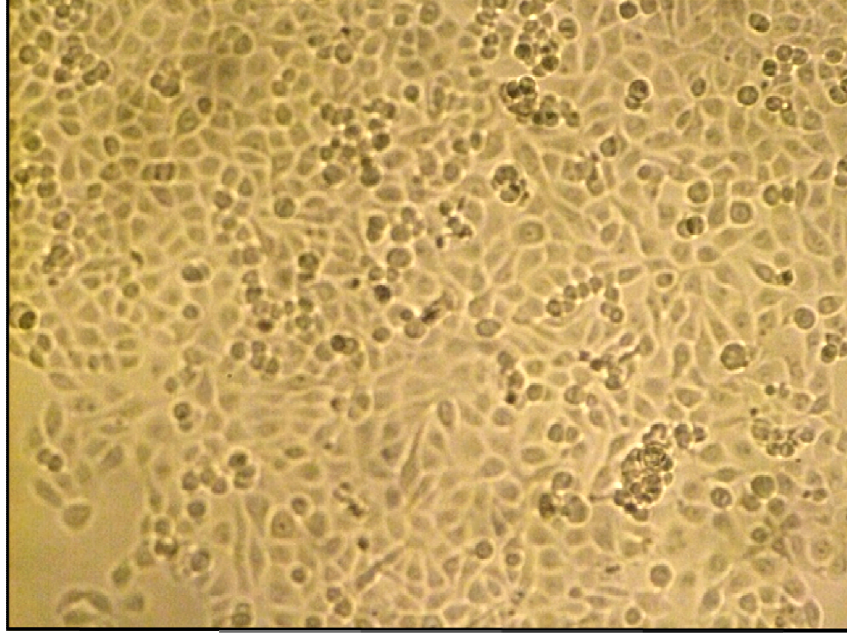
HBO uygulaması prosedüründe deney basınç odası 37 °C’de normobarik şartlarda 5 dakika %100 oksijen ile ventile edildikten sonra, yine %100 oksijen ile 5 dakikada 2.0 ATA basınca kadar komprese edildi. 2.0 ATA’da 60 dakikanın ardından, basınç odası 5 dakikada dekomprese edildi.

MCF-7 hücreleri ekilmiş olan bir adet 6’lı well-plak üzerine 24 saat aralıklarla toplam 5 seans HBO uygulandı. Deneyin 122. saatinde; 5. seans HBO uygulamasından hemen sonra, kuyucuklardan toplanan hücreler (HBO 1) sayma kamerasında sayıldı ve tripan mavisi ile boyanarak canlılık analizi yapıldı.

DNA proliferasyonunun saptanması amacıyla bir adet 6’lı well-plakta çoğaltılmış olan MCF-7 hücreleri üzerine 24 saat aralıklarla toplam 5 seans HBO uygulandı. Deneyin 122. saatinde; 5. seans HBO uygulamasından hemen sonra, kuyucuklardan toplanan hücreler (HBO 2) BRdU işaretlemesi yapılarak 3 adet lam üzerinde ışık mikroskobu altında sayıldı; total hücre sayısı ve BRdU ile boyanan hücre sayısı saptandı.

6. Hücre Sayımı

Plak kuyucuklarına 1 ml CMF-PBS(Ca-Mg free) konularak 1-2 dakika beklendi. Hücrelerin yüzey bağlantılarını koparmak amacıyla pipet yardımı ile CMF-PBS'ler alınarak, hücreler üzerine hücrelerarası Ca'u parçalayan 1'er ml tripsin uygulandı. Plaklar 1 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsinin hücreleri öldürmesinin engellenmesi amacıyla medyum ilave edildi ve ardından medyum ve tripsin pipet yardımıyla alınarak tüplere konuldu. Yüzey bağlantısı devam eden hücrelerin toplanması amacıyla bir kez daha plaklar üzerine tripsin uygulanarak işlem tekrarlandı. Tüp 300 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra pelet oluşturan hücreler alınarak hücre yoğunluğuna göre sayım için 1 ml medyum eklenerek süspanse edildi ve pastör pipeti ile aspire edildikten sonra ışık mikroskopunda Neubauer sayma kamarasında birim hacimdeki hücre sayısı belirlendi (Şekil 8).

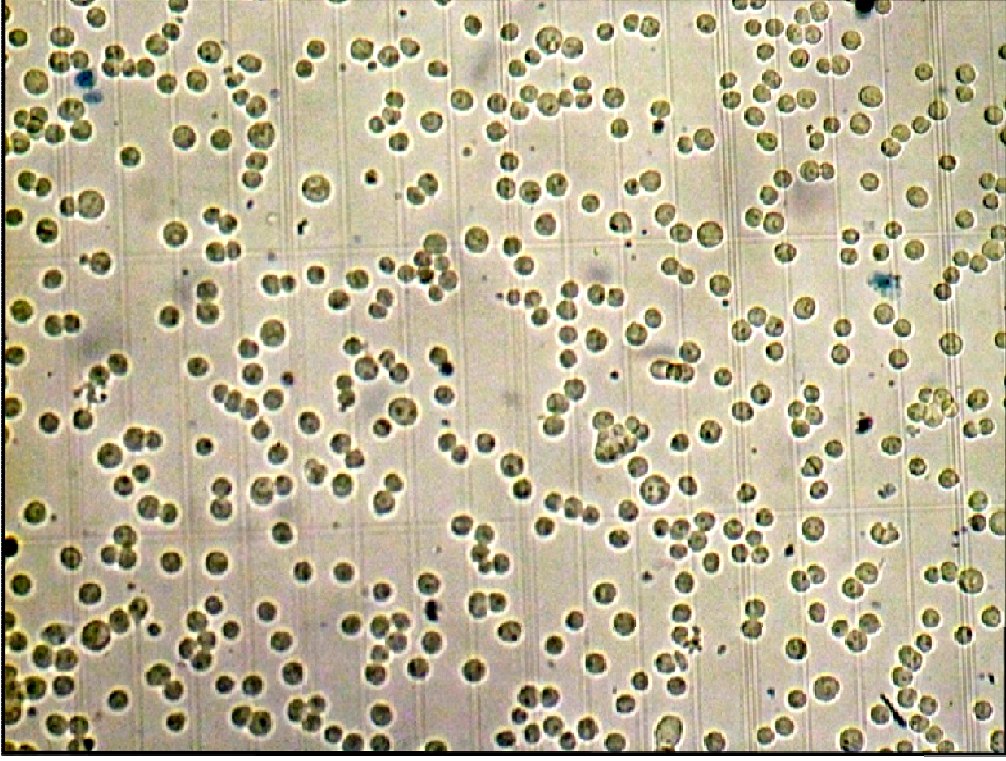


Şekil 8. Hücre sayımı

7. Canlılık Analizi

Tüm gruplara uygulamanın 5. gününde canlılık analizi yapıldı. Medyumdan ayrılan hücreler vitalite analizi için 50 µl hücre süspansiyonu 50 µl tripan mavisi ile boyanarak pastör pipeti yardımı ile sayma kamarasına konuldu. Bu boya hücre zarı geçirgenliği nedeniyle cansız hücrelerin zarlarını geçebilirken, canlı hücrelerin zarlarını geçemez. Hemositometri ile

ışık mikroskopunda birim hacimdeki canlı ve ölü hücrelerin sayısı belirlendi. Tripan mavisi ile koyu mavi renkte boyanan hücreler ölü kabul edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Vitalite analizi

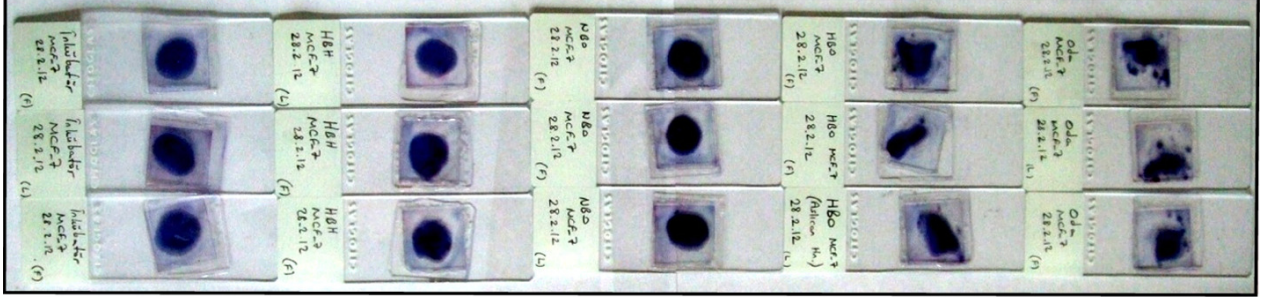
8. Proliferasyon İndeksi Analizi

Hücre siklusünün S fazındaki yani DNA sentezi yapmakta olan hücreler bromodeoksiüridin (BRdU) ile işaretlenerek saptanabilirler. NBH 2, İNK 2, HBH 2, NBO 2 ve HBO 2 grupları için 5 seans uygulama sonrasında yani tedavi başlangıcından itibaren 5. gün, bir başka deyişle uygulamaların bitiş gününde BRdU işaretlemesi yapıldı. Proliferasyon indeksi analizi için hücrelerin bulunduğu her çoklu kültür kuyucuklarına son konsantrasyon 20 µl olacak şekilde BRdU eklenerek 37 °C’de 1 saat süre ile inkübatörde bekletildi ve bu sürenin sonunda üst sıvı atıldı. Daha sonra kuyucuk içerisindeki lamel çıkarıldı, %70 etanol solüsyonuna alınarak tespit edildi.

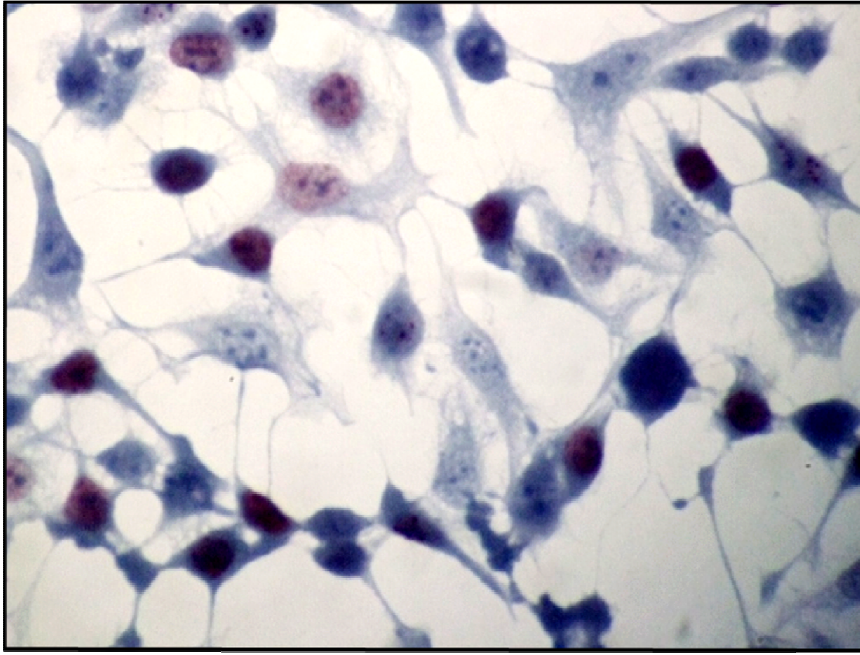
İmmünohistokimyasal boyamada birincil antikor olarak BRdU kullanıldı ve ikincil antikor ile işaretlenmiş hücreler AEC ile renklendirildi. Hücrelerin bulunduğu boyanmış lameller her grup için 3 lamel olacak şekilde (Şekil 10) lamalar üzerine yapıştırıldı.

Preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirilerek sentez fazındaki hücrelerin BRdU ile işaretlenme oranları belirlendi (Şekil 11). Çekirdek içinde parlak kırmızı granüller

şeklinde boyanan hücrelerin DNA sentez fazında olduğu kabul edildi ve her lamelde en az 500 hücre sayılarak boyanmış hücrelerin toplam hücre sayısına oranı belirlendi.



Şekil 10. Proliferasyon indeksi hesaplanması amacıyla hazırlanan preparatlar



Şekil 11. BRdU ile boyama

IV- İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for Social Sciences 15. 0 versiyonu) bilgisayar programı kullanıldı. Hücre sayımı ve vitalite analizi açısından gruplar arasındaki genel anlamlılığı değerlendirmek için başlangıçta tek yönlü varyans analizini (one way ANOVA) ardından Tukey's testi kullanıldı. $p < 0.05$ ve altındaki değerler anlamlı olarak kabul edildi. Proliferasyon indeksi değerlendirmesinde grupların ortalama değerleri karşılaştırıldı.

V- BULGULAR

Çalışma sonunda tüm gruplarda saptanan hücre sayıları Tablo 7'de, istatistik verileri Tablo 8'de gösterilmiştir.

A- Hücre Sayısı

NBH 1, İNK 1, HBH 1, NBO 1 ve HBO 1 gruplarında yer alan hücreler, uygulamalar sonrasında toplam hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde, İNK 1 grubu ile NBH 1 grubu ($p=0.008$) arasında NBH 1 grubu lehine, İNK 1 grubu ile NBO 1 grubu arasında NBO 1 grubu lehine ($p=0.005$), İNK 1 grubu ile HBO 1 grubu arasında HBO 1 grubu lehine daha düşük değerler olmak üzere anlamlı fark ($p=0.00$) saptanmıştır (Tablo 8).

NBH 1 grubu ile HBH 1 grubu arasında NBH 1 grubu lehine daha düşük olmak üzere anlamlı fark ($p=0.006$) saptanmıştır (Tablo 8).

HBH 1 grubu ile NBO 1 grubu arasında NBO 1 grubu lehine ($p=0.003$), HBH 1 grubu ile HBO 1 grubu arasında HBO 1 grubu lehine daha düşük olmak üzere anlamlı fark ($p=0.00$) saptanmıştır (Tablo 8).

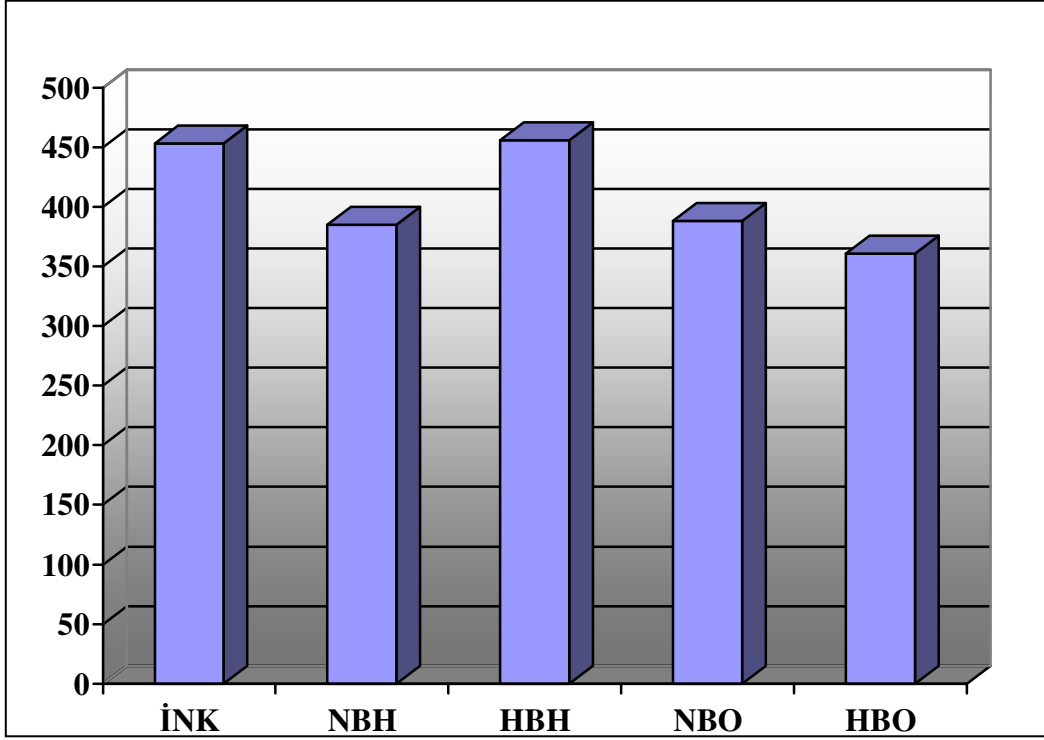
Ortalama hücre sayısı değerleri diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında HBO1 grubunda en düşüktür (Grafik 1).

Grup	Ortalama Hücre Sayısı	Standart Sapma
İNK 1	453,6 x10 ⁴	37,57 x10 ⁴
NBH 1	385 x10 ⁴	38,14 x10 ⁴
HBH 1	456,6 x10 ⁴	24,58 x10 ⁴
NBO 1	388,6 x10 ⁴	21,67 x10 ⁴
HBO 1	361,3 x10 ⁴	18,87 x10 ⁴

Tablo 7. Hücre sayısı değerleri

	İNK	NBH	HBH	NBO	HBO
İNK	Ort: 453,6 SS: 37,57	p=0.008	p=1.0	p=0.005	p=0.000
NBH	p=0.008	Ort: 385 SS: 38,14	p=0.006	p=1.0	p=0.698
HBH	p=1.0	p=0.006	Ort: 456,6 SS:24,58	p=0.003	p=0.000
NBO	p=0.005	p=1.0	p=0.003	Ort: 388,6 SS:21,67	p=0.471
HBO	p=0.000	p=0.698	p=0.000	p=0.471	Ort: 361,3 SS:18,87

Tablo 8. Hücre sayısı istatistik değerleri



Grafik 1. Ortalama hücre sayısı değerleri

B- Canlılık Analizi

Çalışma sonunda tüm gruplarda saptanan canlılık analizi sonuçları Tablo 9’da, istatistik verileri Tablo 10 ve Tablo 11’de gösterilmiştir.

Vitalite analizi açısından değerlendirilen hücre gruplarında, plaklardaki tüm kuyucuklar birim alandaki canlı ve ölü hücre sayıları açısından değerlendirildiğinde, canlı hücre sayısı NBH 1 ve HBH 1 grupları arasında NBH 1 grubu lehine ($p = 0.019$) ve HBO 1 ve HBH 1 grupları arasında HBO 1 grubu lehine daha düşük olmak üzere anlamlı fark ($p = 0.041$) saptanmıştır (Tablo 10). İNK1, HBH1 ve NBO1 grupları ile karşılaştırıldığında HBO1 grubundaki ortalama canlı hücre sayısı en düşüktür (Grafik 2).

Ölü hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde, en düşük değerler HBO grubunda saptanmıştır, ancak sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı değildir (Tablo 11).

Grup-Ky	Canlı HS	Ölü HS	Grup-Ky	Canlı HS	Ölü HS
İNK 1 – 1. Ky	134	5	HBH 1 - 4. Ky	160	2
İNK 1 – 2. Ky	146	2	HBH 1 - 5. Ky	168	5
İNK 1 – 3. Ky	158	8	HBH 1 - 6. Ky	173	5
İNK 1 – 4. Ky	160	5	NBO 1 - 1. Ky	189	5
İNK 1 – 5. Ky	142	2	NBO 1 - 2. Ky	165	3
İNK 1 – 6. Ky	156	6	NBO 1 - 3. Ky	131	5
NBH 1 – 1. Ky	130	3	NBO 1 - 4. Ky	130	2
NBH 1 – 2. Ky	132	3	NBO 1 - 5. Ky	138	2
NBH 3 – 4. Ky	145	4	NBO 1 - 6. Ky	174	2
NBH 1 – 4. Ky	128	3	HBO 1 - 1. Ky	136	1
NBH 1 – 5. Ky	127	1	HBO 1 - 2. Ky	160	3
NBH 1 – 6. Ky	156	4	HBO 1 - 3. Ky	132	1
HBH 1 - 1. Ky	185	4	HBO 1 - 4. Ky	143	3
HBH 1 - 2. Ky	159	2	HBO 1 - 5. Ky	125	2
HBH 1 - 3. Ky	146	5	HBO 1 - 6. Ky	140	3

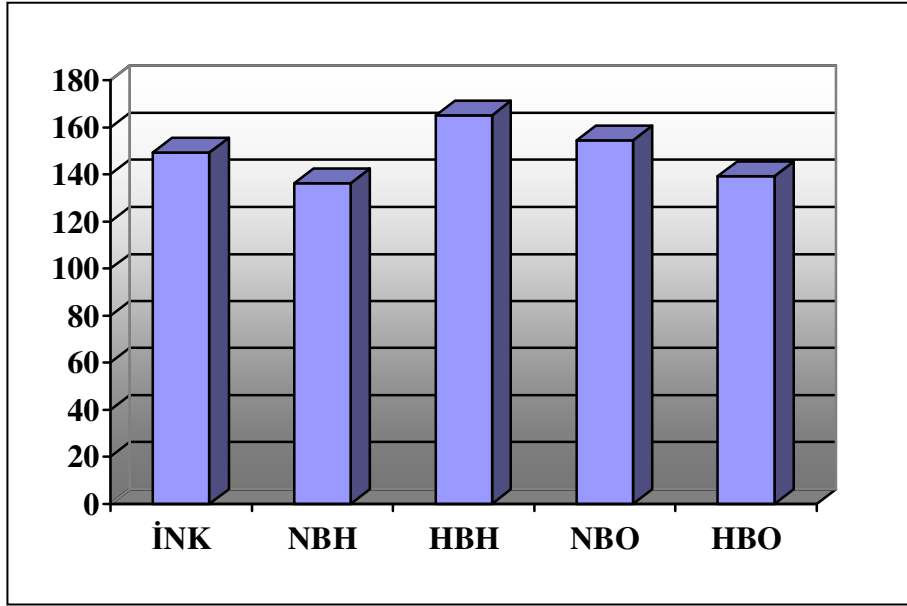
Tablo 9. Canlılık analizi sonuçları

	İNK	NBH	HBH	NBO	HBO
İNK	Ort: 149,3 SS: 10,3	p=0.559	p=0.367	p=0.999	p=0.768
NBH	p=0.559	Ort: 136,3 SS: 11,6	p=0.019	p=0.431	p=0.997
HBH	p=0.367	p=0.019	Ort: 165,1 SS:13,3	p=0.488	p=0.041
NBO	p=0.999	p=0.431	p=0.488	Ort: 154,5 SS: 24,9	p=0.643
HBO	p=0.768	p=0.997	p=0.041	p=0.643	Ort: 139,3 SS: 11,9

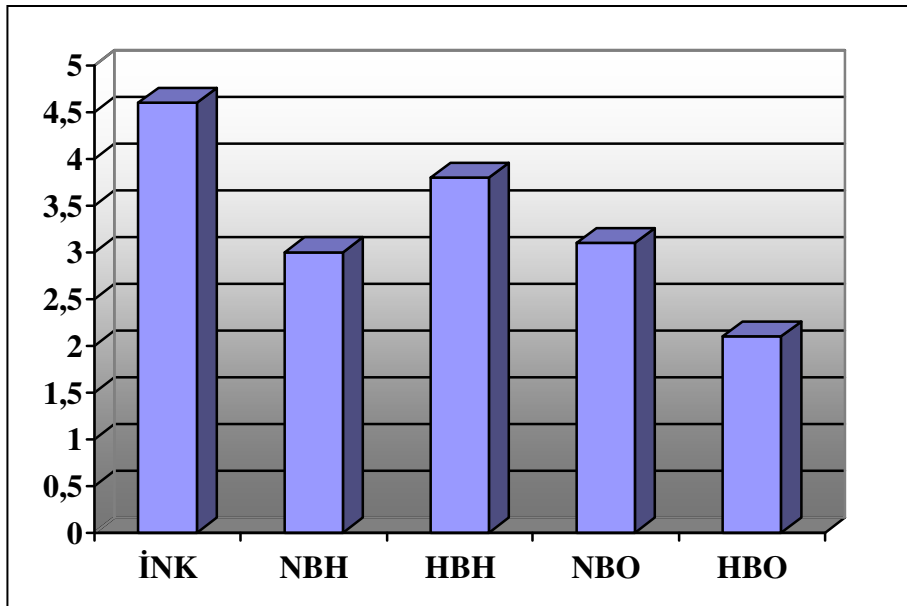
Tablo 10. Canlı hücre sayısı istatistik değerleri

	İNK	NBH	HBH	NBO	HBO
İNK	Ort: 4,6 SS: 2,3	p=0.441	p=0.909	p=0.749	p=0.105
NBH	p=0.441	Ort: 3 SS: 1,0	p=0.909	p=0.985	p=0.909
HBH	p=0.909	p=0.909	Ort: 3,8 SS: 1,4	p=0.997	p=0.441
NBO	p=0.749	p=0.985	p=0.997	Ort: 3,1 SS: 1,4	p=0.648
HBO	p=0.105	p=0.909	p=0.441	p=0.648	Ort: 2,1 SS: 0,9

Tablo 11. Ölü hücre sayısı istatistik değerleri



Grafik 2. Ortalama canlı hücre sayısı



Grafik 3. Ortalama ölü hücre sayısı

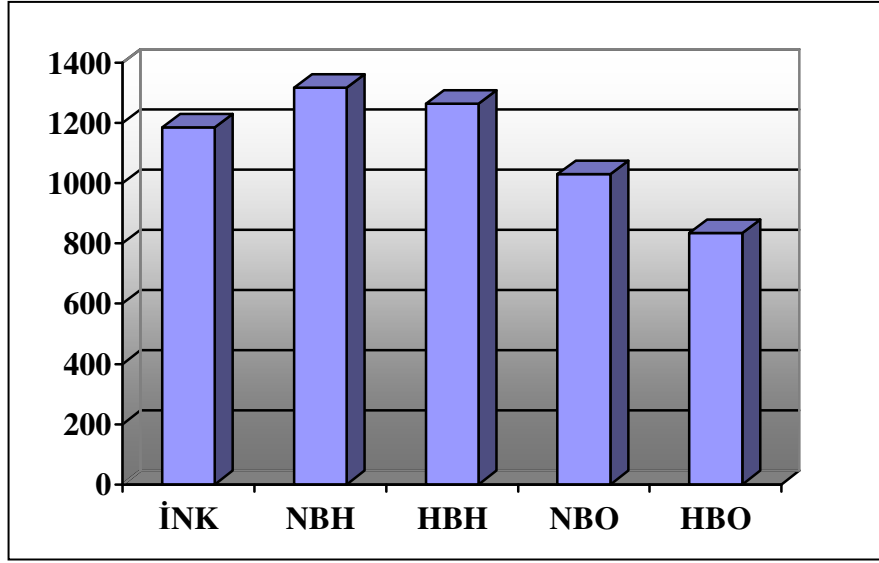
C- Proliferasyon İndeksi

NBH 2 , İNK 2, HBH 2, NBO 2 ve HBO 2 gruplarında yer alan hücreler BRdU ile boyanarak DNA sentezi açısından değerlendirildiğinde, uygulamalar sonrasında total hücre sayısı ve BRDU ile boyanan hücre sayısı HBO 2 grubunda en düşük seviyede saptanmıştır. Grup sayısının az olması nedeniyle p değeri dikkate alınmayarak, ortalama değerler hesaplanmıştır. Her grup için üç preparatın ortalama total hücre sayısı sıralaması büyükten küçüğe doğru NBH 2 grubu, HBH 2 grubu, İNK 2 grubu, NBO 2 grubu ve HBO 2 grubu şeklindedir (Tablo 11).

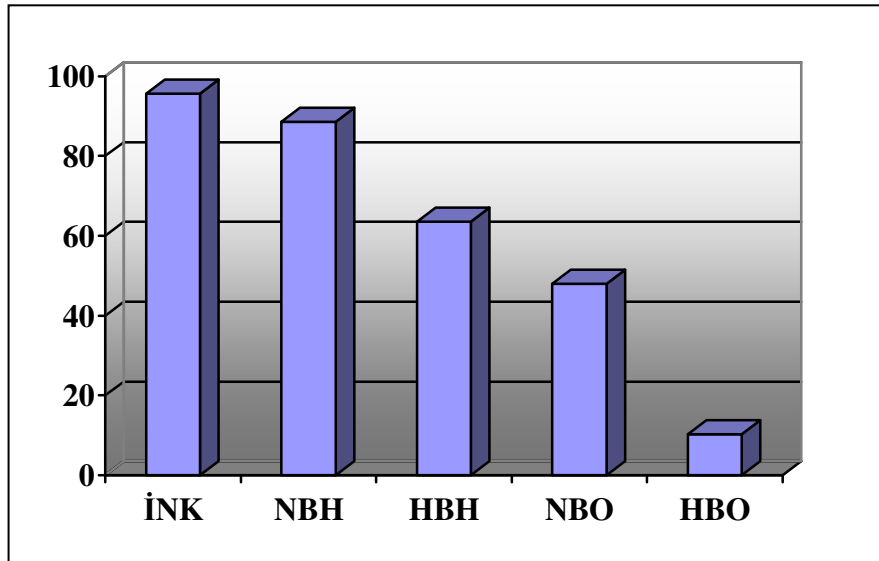
Her grup için üç preparatın ortalama BRdU ile boyanan hücre sayısı sıralaması büyükten küçüğe doğru İNK 2 grubu, NBH 2 grubu, HBH 2 grubu, NBO 2 grubu ve HBO 2 grubu şeklindedir.

Grup-Ky	Ortalama Total Hücre Sayısı	Ortalama BRDU (+) Hücre Sayısı
İNK 2	1185	95,6
NBH 2	1317	88,6
HBH 2	1264	63,6
NBO 2	1030,6	48
HBO 2	835	10,3

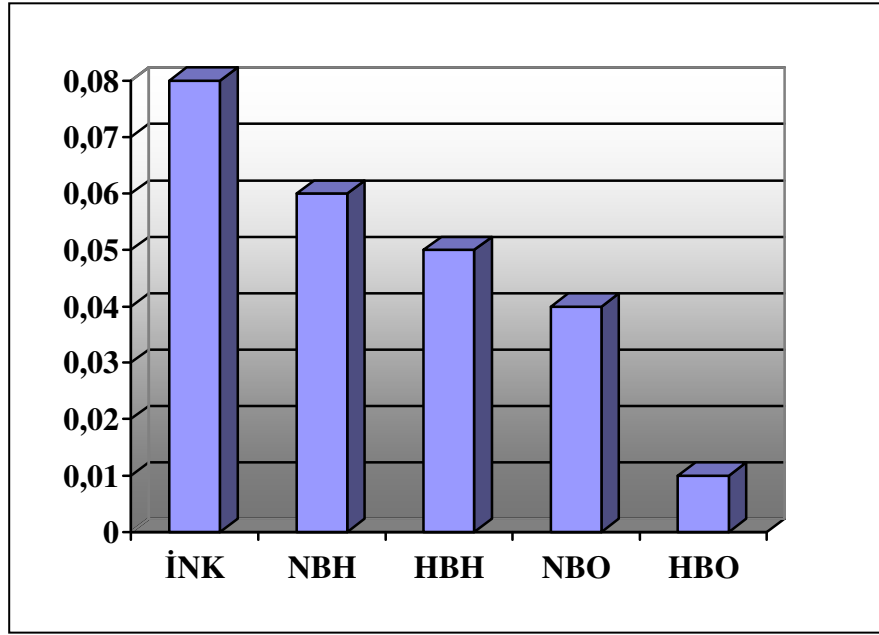
Tablo 12. Proliferasyon indeksi sonuçları



Grafik 4. Ortalama total hücre sayısı



Grafik 5. Ortalama BRdU (+) hücre sayısı



Grafik 6. BRdU (+) / Total hücre sayısı

VI- TARTIŞMA

Meme kanseri insidansının yüksek olması ve meme kanseri tedavisinde uygulanan kemoterapi ve radyoterapi ile ilişkili komplikasyonların HBOT endikasyonları arasında yer alması nedeniyle, bu çalışmada HBOT'nin meme kanseri hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla MCF-7 meme kanseri hücreleri kontrol ve çalışma grupları olmak üzere toplam beş gruba ayrılmıştır. Uygulamalar hücrelerin doubling-time ve dış ortama dayanıklılıkları göz önünde bulundurularak günde 1 saat olmak üzere ardışık 5 günde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak hücreler inkübatörde bekletilmiştir; diğer hücre gruplarında hiperbarik hava, normobarik oksijen ve hiperbarik oksijenin meme kanseri hücre sayısı, canlılığı ve proliferasyon indeksi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. NBH uygulanan grupta ise hücreler oda havasında bekletilerek, dış ortama transferin ve 5 ardışık gün süresince dış ortama 1 saat süre ile maruz kalmanın hücre kültürleri üzerine olabilecek olası etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda, gruplarda yer alan hücreler uygulamalar sonrasında toplam hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde, inkübatörde bekletilen hücrelerle karşılaştırıldığında, normobarik oksijen ve hiperbarik oksijen uygulanan gruplarda hücre sayısı anlamlı oranda daha düşüktür. Yine inkübatörde bekletilen hücrelerle karşılaştırıldığında normobarik hava uygulanan grupta da hücre sayısı daha düşük saptanmakla birlikte, değerler istatistiksel açıdan anlamlı seviyelere ulaşmamıştır. HBH ile karşılaştırıldığında NBO ve HBO gruplarındaki hücre sayısı anlamlı olarak daha düşüktür. Ortalama hücre sayısı değerleri diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında HBO grubunda en düşük değerlerde saptanmıştır.

Elde edilen bu sonuçlar, meme kanseri hücre sayısındaki artışın hiperbarik şartlarda uygulanan %100 O₂ ile en yüksek oranda kontrol altında tutulabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, uygulanan oksijenin sadece yüzdesinin artırılması da hücre çoğalmasını daha düşük oranlarda kontrol altına alabilmiştir. NBO ve HBO uygulaması ile HBH'ya oranla daha düşük değerler elde edilmesi de çözünen oksijen oranı arttıkça hücre çoğalmasının daha etkin şekilde baskılanabileceğini göstermektedir.

Hiperbarik oksijen tedavisinin kanserde çoğalmayı indükleyici etkileri ilk kez Johnson ve Lauchlan tarafından bildirilmiştir (86). Evre 3 veya 4 servikal kanser tanısı

ile takip edilen, radyo-duyarlaştırıcı amacıyla hiperbarik oksijen tedavisi uygulanmış olan 25 hastada beklenenden farklı paternde ve yüksek insidansta metastaz saptanmıştır. Bir hastada ösofagus metastazı gelişmiştir (86). Johnson'ın çalışması kontrollü bir çalışma değildir ve spesifik olarak HBO'nun primer çoğalma ve metastaz üzerindeki etkisini incelemek amacıyla dizayn edilmemiştir. Çalışmamızda HBO grubunda hücre sayısı diğer tüm gruplardan daha düşüktür. Ayrıca HBH ve NBO uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre hücre sayısının daha düşük olması çözünen O₂ miktarının artışı ile kanser hücresi proliferasyonun kontrol altına alınabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle in vitro gerçekleştirilen çalışmamızın sonuçları HBO'nun kanserde indükleyici etkilerini bildiren bu ilk çalışma ile uyumlu değildir.

Kalns (91) ve arkadaşlarının çalışmasında iki prostat kanseri hücre kültürü serisinde 90 dakika süre ile 3.0 ATA'da %100 O₂ uygulaması, normobarik kontroller ile karşılaştırıldığında çoğalmayı sırasıyla %8. 1 ve %2. 7 oranında suprese etmişlerdir. Feldmeier (53) ve arkadaşları tarafından hiperbarik oksijenin B16 amelanotik melanom hücre kültürü kolonileri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada HBO maruziyeti süresi veya uygulanan basınç arttıkça koloni sayısında azalma bildirilmiştir. HBO'ya maruz kalan hücreler fibronektine daha az yapışmaktadır ve bu da metastatik potansiyelde azalma olarak yorumlanmıştır. Her iki çalışmada da HBO'nun hücre kültürü üzerindeki direkt etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda da HBO'nun diğer çalışma grupları ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak MCF-7 meme kanseri hücre kültürü üzerindeki direkt etkileri incelenmiştir. Kanser hücre kültürü serileri, ve çalışma protokolü farklı olmakla birlikte çalışmamızda da yüksek O₂ yüzdeleri ile meme kanseri hücre sayısındaki azalma Kalns ve Feldmeier'in çalışmalarına benzer şekilde çoğalmayı suprese edici etki şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızın canlılık analizi açısından değerlendirilen hücre gruplarında, plaklardaki tüm kuyucuklar birim alandaki canlı ve ölü hücre sayıları açısından değerlendirildiğinde, HBO grubundaki canlı hücre sayısı HBH grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır. HBO grubunda ortalama canlı hücre sayısı İNK, HBH ve NBO grupları ile karşılaştırıldığında en düşüktür. Ölü hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde, en düşük değerler HBO grubunda saptanmıştır, ancak sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı değildir.

McMillan ve arkadaşlarının hiperbarik oksijen tedavisi uygulanan, antrasen ile indüklenen hamster yanak poşu modeli çalışmasında (115) daha az sayıda fakat daha büyük tümörler gelişmiştir. Çalışmamızda McMillan'ın çalışması ile uyumlu veriler elde edilmemiştir; meme kanseri hücre sayısında ve canlı hücre sayısında azalma, HBOT uygulanan malign tümörlerde daha yavaş büyüme şeklinde yorumlanabilir. McMillan'ın çalışmasında tümörlerin antrasen ile indüklenmiş olması daha kötü prognoz ile ilişkili olabilir veya çalışmanın hayvan modelinde gerçekleştirilmiş olması nedeniyle hücre kültürlerine kıyasla malign hücrelere ulaşan O_2 gradyenti daha düşük olabilir.

Çalışmamızda hücre grupları uygulamalar sonrasında DNA sentezi açısından değerlendirildiğinde, total hücre sayısı ve BRDU ile boyanan hücre sayısı HBO grubunda en düşük seviyede saptanmıştır. Ortalama total hücre sayısı sıralaması büyükten küçüğe doğru NBH, HBH, İNK, NBO ve HBO grubu şeklindedir. BRdU ile boyanan ortalama hücre sayısı sıralaması ise büyükten küçüğe doğru İNK, NBH, HBH, NBO ve HBO grubu şeklindedir.

Granowitz ve arkadaşları (63) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada aynı hastadan normal meme epiteli, primer tümör ve metastatik tümör hücreleri elde edilmiş ve HPV E6 onkogeni transfeksiyonu ile immortalize edilmiştir. HBOT'nin bu hücreler ve MCF 7 insan meme adenokarsinomu hücre serisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 2.4 ATA'da HBOT (%97.9 O_2 , %2.1 CO_2) dört hücre grubunda da proliferasyonu inhibe etmiştir ve HBO'nun antiproliferatif etkisi zamana bağlıdır (4 hücre tipi için $p < 0.01$). Tek başına hiperoksi (1 ATA'da, %95 O_2 , %5 CO_2) ve tek başına artmış atmosfer basıncı (2.4 ATA'da %8.75 O_2 , %2.1 CO_2) proliferasyonu inhibe etmiştir (her iki grup için de $p < 0.01$), fakat etkileri HBO kadar belirgin değildir (4 hücre tipi için $p < 0.01$). HBO, melfalan ($p < 0.05$), gemsitabin ($p < 0.001$) ve paklitakselin ($p < 0.001$) antiproliferatif etkilerini artırmıştır. Klonojenisite çalışmaları HBO'nun etkilerinin maruziyetten 2 hafta sonra da devam ettiğini göstermiştir (4 hücre tipi için $p < 0.01$). Hiçbir hücre grubunda nekroz ve apoptozda HBO ile indüklenen bir artış gözlenmemiştir. Çalışmanın sonucunda HBO'nun benign ve malign meme epiteli hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, fakat hücre ölümünü arttırmadığı gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları Granowitz'in çalışması ile kısmen uyumludur; çalışmamızda finansal kaynaklar ve materyal kısıtlılığı nedeniyle çalışma gruplarının sayısı sınırlı tutulmuş ve bu nedenle sonuçlar normal meme epiteli ve metastatik tümör hücreleri ile karşılaştırılamamıştır. Buna karşın, çalışmamız HBO uygulaması yanında tek başına

%100 O₂ ve hiperbarik hava uygulamalarının meme kanseri hücre çoğalması üzerine etkilerinin değerlendirilmesine olanak vermektedir. Primer meme kanseri tümör hücrelerinin in vitro şartlarda 2 ATA'da %100 O₂'ye maruz kalması proliferasyonu inhibe etmiştir. HBO grubundaki kadar belirgin olmamakla birlikte HBH uygulaması da proliferasyonu inhibe etmiştir.

Dağıstan (35) ve arkadaşları tarafından C6/LacZ sıçanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada temazolamid ile HBOT kombinasyonu gliom hücrelerinin çoğalmasını anlamlı oranda inhibe etmiştir ve bu kombinasyon glioblastom tedavisi açısından etkin bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada HBOT'nin, hipoksik tümör mikroçevresi nedeniyle etkisi sınırlı olabilecek bir tedavi yönteminin etkisini arttırdığı sonucuna varılabilir. Çalışmamızda HBOT'nin bir kemoterapötik ajanla kombinasyonu araştırılmamakla birlikte, İNK, HBH ve NBO ile karşılaştırıldığında, HBO gruplarında hücre sayısı, vitalite ve proliferasyon daha düşük saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlarla HBO uygulamasının tümörlerde hipoksik mikroçevre üzerindeki etkisi ile tümör büyümesini yavaşlatabileceği düşünülebilir.

HBO uygulaması ile meme kanseri hücrelerinin DNA sentezinde sağlanan azalma antikanser etki olarak yorumlanamaz. Fakat HBO'nun kanser progresyonunda hücre proliferasyonu hızında azalma sağlamış olması, karsinogenez üzerinde progresyonu, primer tümör büyümesini ve metastaz gelişimini azaltabileceği ve sürviyi uzatabileceği şeklinde yorumlanabilir. Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin maruz kaldığı oksijen basıncının hayvan veya insan malign tümör modellerinden çok daha yüksek olduğu unutulmamalıdır (53).

Radyoterapi sırasında HBOT uygulayan bazı gruplar hava uygulanan kontrol grubuna göre uzak metastaz sıklığında hafif artış bildirmişlerdir (50). Bu klinik seriler primer skuamöz kanserler, serviks, bronş ve baş-boyun (51) kanseri olan küçük hasta gruplarını içermektedir. Bu bildirilerde artmış metastaz sayısına beklenmeyen metastaz özellikleri veya hızlı çoğalma da eşlik etmektedir. Evans (50) tarafından deri kanseri nedeniyle tek doz radyoterapi uygulanan 295 sıçanda gerçekleştirilen çalışmada, 50 sıçana 2 ATA'da O₂, 245 sıçan ise hava ortamında RT uygulanmıştır. RT sonrası hava ortamındaki sıçanların %14'ünde, HBOT grubundakilerin ise %20'sinde pulmoner metastaz saptanmıştır; fakat aradaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı (p>0. 1) bildirilmiştir. Çalışmamızda HBO uygulaması ile tümör hücresi proliferasyon hızında azalma saptanmıştır ve bu azalma çözünen oksijen yüzdesi ile doğru orantılıdır. Dolayısı ile kanser hücrelerinin maruz kaldığı oksijen

oranlarındaki artışın kanser hücrelerinin çoğalma hızında ve dolayısı ile de metastazda azalma sağlayabileceği düşünülebilir. Bununla birlikte çalışmamız tek tabakalı hücre kültürü çalışması olduğundan, HBO'nun anjiyogenez üzerindeki etkileri incelenememiştir. HBO'nun malign hücrelerin neovaskülarizasyon ve metastaz yeteneği saptamak amacıyla deney hayvanlarında meme kanseri modeli üzerinde daha ileri in vivo araştırmalar yapılması uygun olacaktır.

Feldmeier (51) ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen, hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar derlemesinde aralıklı HBO maruziyetinin primer veya metastatik tümörler üzerinde stimülatör bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Bir bütün olarak değerlendirildiğinde, hayvan çalışmalarında HBOT'nin indüklenmiş, transplante veya spontan tümörler ve bu tümörlerin sekonder metastazlarında çoğalma üzerinde nötr veya negatif etkili olduğu gösterilmiştir. 15 insan çalışmasında toplam 72 hastada HBOT sonrasında tümör dokusunda çoğalma ve metastazda artış görülürken, 3000'den daha fazla olguda nötr veya tümör suprese edici etki ortaya çıkmıştır. Çalışmamızın sonuçları da Feldmeier'in derlemesi ile uyumludur; aralıklı olarak uygulanan HBO, NBO ve HBH, sırasıyla daha düşük oranlarda olmak üzere meme kanseri hücre çoğalmasını inhibe etmiştir.

Çimşit ve arkadaşları (33) tarafından Ehrlich solid tümörlü 48 sıçan ile gerçekleştirilen bir çalışmada 118 gün süre ile 2.5 ATA'da 3x20 dakika %100 O₂ uygulaması, NBO ve NBH ile karşılaştırılmıştır. Sıçanlara ilk 49 gün günde iki seans, ardından günde bir seans HBOT uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda üç grup arasında tümör kitlesi, sürvi ve cinsiyet açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır; HBOT'nin Ehrlich solid tümörlerinin gelişmesini baskılayabileceği, fakat tümör oluşmuş sıçanlarda NBO ile sürvide uzama gözlenirken, HBOT ile tümör çoğalmasının stimüle olabileceği ifade edilmiştir. Çalışmamızda 2 ATA'da 60 dakika süre ile 5 seans HBO uygulaması total hücre sayısı, canlı ve ölü hücre sayısı ve hücre proliferasyon hızında azalma sağlamıştır. Bu sonuçlar HBOT'nin tümör büyümesinde ve dolayısı ile de metastazda azalma ve sürvi de uzama sağlayabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu nedenle sonuçlarımız, Ehrlich tümörlü sıçanlarda gerçekleştirilen her iki çalışma ile uyumlu değildir.

Shewell ve Thompson (142) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada C3H sıçanda HBOT'nin pulmoner metastazlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma, tümör hücrelerinin intravenöz inokülasyonu sonrasında eksojen akciğer metastazı olan ve spontan olarak tümörün endojen metastatik yayılım gösterdiği sıçanlar çalışmaya alınmıştır. HBO maruziyeti,

Ehrlich asit tümörü hücreleri ile inokülasyon sonrasında akciğer koloni sayısını azaltırken, C3H meme tümörü hücre agregatlarının akciğer kolonizasyonu üzerinde etki göstermemiştir. HBO uygulanan spontan tümörlü sıçanlarda akciğer metastazı artmıştır; hava soluyan grupta metastaz oranı %66.6 iken bu oran HBO grubunda %88.8'dir. Bu verilerin, HBO'nun neden olduğu geçici akciğer hasarının değil; hücrelerin primer tümörden artmış yayılımı sonucu elde edildiği belirtilmiştir (142). Çalışmamız tek tabakalı hücre kültürü modeli olduğundan HBO'nun kanser hücrelerinde anjiyogenez, neovaskülarizasyon ve dolayısı ile metastaz üzerindeki etkilerine ilişkin direkt veri sunmamaktadır. Bununla birlikte immünohistokimyasal olarak BRdU ile boyanan hücre sayısının daha düşük saptanması basınç ve oksijenizasyon artışı ile kanser hücrelerinde çoğalma hızının yavaşlatılabileceği ve dolayısı ile de metastaz yeteneğinin sınırlandırılabilceği şeklinde yorumlanabilir. Oksijen artışının, hipoksik tümör hücrelerinin reoksijenizasyonu ve anjiyogenez aracılığı ile tümör büyümesini stimüle edebileceği şüphesi mevcuttur. HBO'nun yara iyileşmesinde anjiyogenezi artırması tümör büyümesini de aynı mekanizma ile indükleyeceği anlamına gelmemektedir (37).

Hücre kültürleri ile yapılan bazı in vitro çalışmalarda mutageniz gösterilmiştir, fakat hücre kültürlerinde erişilebilen oksijen seviyelerinin in vivo ulaşılabilen seviyelerden çok daha yüksek olduğu dikkate alınmalıdır (53). Ayrıca, kısa süreli veya tek seans HBOT uygulanan in vivo ve in vitro çalışmalarda süperoksit dismutaz gibi serbest radikal temizleyicilerinin oluşumuna da fırsat verilmemektedir (51). Bruyninckx ve arkadaşları (19) hücre kültüründeki duyarlı hücrelerde mutajenik olan oksijen seviyelerinin insanlarda fizyolojik olabileceğini belirterek, hücre kültürlerinde HBO maruziyeti nedeniyle mutageniz gösteren çalışmaların insanlarda karsinogenez açısından tartışılması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamızda HBO grubunda total, canlı ve ölü hücre sayıları ve DNA sentez hızının daha düşük saptanması HBO'nun aralıklı uygulaması ile mutagenizin engellenebileceği şeklinde yorumlanabilir, fakat çalışmamızın ana amacı kanser hücrelerinin metabolik yolları ve karsinogenez mekanizması olmadığından HBO'nun hangi mekanizma üzerinden hücre sayısında ve proliferasyon hızında azalma sağladığına ilişkin kesin veri elde edilmemiştir. Uygulamaların aralıklı yapılmış olması reaktif oksijen türlerindeki herhangi bir artışın etkisini azaltacaktır. Serbest radikal temizleyicilerinde artış sağlayan adaptif mekanizmalar da serbest radikal üretiminin neden olduğu istenmeyen etkileri azaltacaktır (51).

Schönmeier (139) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada skuamöz kanser hücreleri HBO'ya maruz bırakılmıştır. HBO ve kontrol grupları karşılaştırıldığında in vitro hücre proliferasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.534$). Benzer şekilde in vivo DNA sentezinin saptamak açısından da immünboyama gerçekleştirilmiş ve HBOT sonrasında proliferen hücre sayısında anlamlı fark saptanmamıştır. In vivo implantasyon sonrasında tümör kitlesi veya hacminde anlamlı bir fark olmamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, HBO tümör hipoksisini azaltmıştır ($p=0.057$), fakat serum VEGF seviyelerinde herhangi bir fark olmamıştır. HBO'nun skuamöz hücreli tümörlerde hipoksi seviyesini azaltabilmesine karşın, kısa dönemde çoğalmayı, hücre proliferasyonunu veya anjiyogenezisi artırmamıştır. Çalışmamızda HBO grubunda MCF-7 meme kanseri hücrelerinin DNA proliferasyonu diğer gruplarla karşılaştırıldığında belirgin olarak daha düşük saptanmıştır. Grup sayısının düşük olması nedeniyle diğer gruplarla olan farkı anlamlılık seviyesine ulaşmaktan uzaktır. Bununla birlikte, çalışmamızda HBO, NBO ve HBH'nın meme kanseri hücrelerinde hipoksiyi azalttığı fakat kısa dönemde proliferasyonu artırmadığı aksine azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar Schönmeier'in çalışması ile uyumludur.

Minamino ve arkadaşları (117) telomerazın özellikle kronik hipoksik ortamda up-regüle olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda meme kanseri hücreleri üzerine uygulanan O₂ yüzdesi arttıkça DNA proliferasyonu azalmasının telomeraz down-regülasyonu ile ilişkili olduğu şeklinde yorumlanabilir. Telomerler bir kez erozyona uğradığında, hücre yaşlanmakta veya p53 aktivasyonu ile apoptoza uğramaktadır.

Çalışmamızda oda havasına maruz bırakılan hücre gruplarında ortalama total hücre sayısı kontrol grubu, HBH ve NBO gruplarından daha düşüktür; canlı hücre sayısı ve DNA proliferasyonu ise en düşük düzeydedir. Bu sonuçlar, hücre kültürlerinin transfer sırasında ve dış ortam maruziyeti nedeniyle çoğalma yeteneklerini kaybedebilecekleri şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızın materyal ve finansal kısıtlılıkları nedeniyle tek tabakalı hücre kültüründe gerçekleştirilmiş olması, özellikle metastaz açısından anahtar rol oynayan anjiyogenez mekanizması açısından yeterli veri elde edilmesini engellemiştir. Bu nedenle HBO'nun malign hücreler üzerindeki etkisini primer tümör ve metastaz gelişimi açısından ortaya koyabilecek deneysel çalışmalarının gerçekleştirilmesi uygun olacaktır.

VII- SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Meme kanseri hücre kültürü üzerinde yapılan bu çalışmada HBO uygulaması ile tümör hücrelerinin total sayısında, canlı hücre sayısında ve DNA proliferasyonunda herhangi bir artış saptanmamıştır. Aksine kontrol grubu ve hiperbarik hava uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, HBO uygulanan hücrelerde hücre sayısı anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır. Ortalama hücre sayısı değerleri diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında HBO grubunda en düşüktür.

Canlılık analizi açısından araştırıldığında, canlı hücre sayısı HBO uygulanan hücrelerde HBH uygulananlara göre anlamlı olarak daha düşüktür. Ortalama canlı hücre sayısı kontrol grubu, HBH ve NBO grupları ile karşılaştırıldığında HBO grubunda en düşüktür. Ölü hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasındaki fark anlamlı olmamakla birlikte, en düşük değerler HBO grubunda saptanmıştır.

Hücre DNA proliferasyonu açısından araştırıldığında da total hücre sayısı ve DNA sentezi fazındaki hücre sayısı HBO uygulanan grupta en düşüktür.

Çalışmamızda elde edilen veriler in vitro HBO uygulamasının malign meme tümörü hücreleri üzerinde hücre sayısını azaltıcı ve DNA sentezini baskılayıcı etki gösterdiği yönündedir.

Çalışmamızda HBO uygulaması da dahil olmak üzere tüm uygulamalar 24 saat aralıklarla 5 kez tekrarlanmıştır. Daha uzun sürelerde uygulanan HBO, NBO ve HBH'nın etkilerini görmek, malign hücreler üzerinde hücre sayısını ve proliferasyonu artırıcı herhangi bir etkinin söz konusu olup olmadığını anlamak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Meme kanserinin yüksek insidansı ve meme kanseri hastalarına radyonekroz ve kemoterapötik ilaç ekstrevasyonu endikasyonları için HBOT uygulanması nedeniyle çalışmamızda malign meme tümörü hücreleri seçilmiştir. Yapılacak olan yeni çalışmalar da diğer kanser türleri de dikkate alınmalıdır ve öncelikle hücre kültürleri ile yapılacak deneysel çalışmalar hayvan çalışmaları ile desteklenmelidir. Tüm endikasyonlar nedeniyle HBOT uygulanmakta olan kanser hastaları HBOT tamamlandıktan sonra da tümör büyümesi, rekürrens ve uzak metastaz gelişimi açısından onkoloji klinikleri ile birlikte takip edilmesinin uygun olacağını düşünmekteyiz.

VIII- KAYNAKLAR

1. Akiya T, Nakada T, Katayama T, Ota K, Chikenji M, Matsushita T and Saito H: Hyperbaric oxygenation for experimental bladder tumor. *Eur Urol* 14: 150-155, 1988.
2. Alagoz T, Buller RE, Anderson B, Terrell KL, Squatrito RC, Niemann TH, Tatman DJ and Jebson P: Evaluation of hyperbaric oxygen as a chemosensitizer in the treatment of epithelial ovarian cancer in xenografts in mice. *Cancer* 75: 2313- 2322, 1995.
3. Allred, Ashley P et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 3628-3670; 2002.
4. Amadori D, Silverstrini R. Prognostic and predictive value of thymidine labeling index in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 51: 267-81, 1998.
5. Antoniou AC, Pharoah PP, Smith P. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 91: 1580-1590, 2004.
6. Baker SJ, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217–221.
7. Baring CC, Squires TS, Tang T. Cancer Statistics 1993. *CA. Cancer J Clin.* 43; 4-26: 1993
8. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 75(6):429-39,1997
9. Belletti B, et al. (March 2008). "Targeted intraoperative radiotherapy impairs the stimulation of breast cancer cell proliferation and invasion caused by surgical wounding". *Clin. Cancer Res.* 14 (5): 1325–32.
10. Benhar M, et al. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 2002;3:420–425.

11. Bergh J, et al. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995;1:1029–1034.
12. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000, 60:4693–4696.
13. Bradfield JJ, Kinsella JB, Mader JT, Bridges EW, Calhoun KH. Rapid progression of head and neck squamous carcinoma after hyperbaric oxygen. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;114:793-797.
14. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 38:99-166, 2002.
15. Breg JW, Hutter RWP: Breast cancer. *Cancer*, 75 (suppl 1): 257, 1995.
16. Brenner I, Shephard RJ, Shek PN. Immune function in hyperbaric environments, diving and decompression. *Undersea Hyper Med* 1999;26:27-39.
17. Brizel DM, et al. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Physics* 1997;38:285–289.
18. Brizel DM et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma, *Cancer Research*, 1996;56:941-943.
19. Bruyninckx WJ, Mason HS, Morse SA. Are physiologic oxygen concentrations mutagenic? *Nature* 1978;274:606-607.
20. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshet E: Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998, 394:485–490.
21. Cavalieri E, et al. (August 2006). "Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention". *Biochimica et Biophysica Acta* 1766 (1): 63–78.

22. Chadeneau C, et al. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:2533–2536.
23. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 48: 232-242, 1991.
24. Conconi MT, et al. Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblast 3T3/J2 cell line. *J Invest Med* 2003; 51:227–232.
25. Connolly JL, Schnitt SJ, Wang HH, Dvorak AM, Dvorak HF. Principles of cancer pathology. In: *Cancer Medicine* 4th Edition Holland, Frei, Bast, Kufe, Morton and Weichselbaum eds, Williams&Wilkins, Baltimore, 1997, 533-555.
26. Cristopher W. Pugh et al. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Hypoxia signalling pathways. *Breast Cancer Res* 2001, 3:313-317
27. Cuisnier O, et al. Chronic hypoxia protects against gamma-irradiation-induced apoptosis by inducing bcl-2 upregulation and inhibiting mitochondrial translocation and conformational change of bax protein. *Int J Oncol* 2003;23:1033–1041.
28. Cvetkovic D, et al. Increased hypoxia correlates with increased expression of the angiogenesis marker vascular endothelial growth factor in human prostate cancer. *Urology* 2001;57:821–825.
29. Çalıkapan M. Meme Kanseri Prognostik Faktörlerinin Hastanemiz Olgu Serisindeki Sağkalıma Etkisi. *Uzmanlık Tezi*. 2004; 1-61
30. Çimşit M. Basınç Odaları. In: Çimşit M (ed). *Hiperbarik Tıp 1*. Basım. Ankara, Eflatun Yayınevi, 2009; 13-22.
31. Çimşit M. Hiperbarik Oksijenin Etki Mekanizması. In: Çimşit M (ed). *Hiperbarik Tıp 1*. Basım. Ankara, Eflatun Yayınevi, 2009; 23-34.
32. Çimşit M. Hiperbarik Tedavinin Tarihçesi. In: Çimşit M (ed). *Hiperbarik Tıp 1*. Basım. Ankara, Eflatun Yayınevi, 2009; 1-12.

33. Çimşit M, Aktaş Ş, Altuğ T, Savcı N, Nogay H, Aydın S. The Effect of HBO on Ehrlich Solid Tumor in BALB/C Mice. The XIXth Annual Meeting of EUBS 1993 p215-219.
34. Dahl Iversen E. Recherches sur les metastases microscopiques des cancers du sein dans les ganglions lymphatiques parasternaux et sus-claviculaires. Mem Acad Clin 78; 651: 1952.
35. Dağıstan Y, Karaca I, Bozkurt ER, Ozar E, Yagmurlu K, Toklu A, Bilir A. Combination hyperbaric oxygen and temozolomide therapy in c6 rat glioma model. Acta Cir Bras. 2012 Jun;27(6):383-7.
36. Dang CV, et al. Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. J Bioenerg Biomembr 1997;29: 345–354.
37. Daruwalla J, Christophi C. Hyperbaric Oxygen Therapy for Malignancy: A Review. World J Surg (2006) 30: 2112–2131
38. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H-J, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor:a potent inhibitor of angiogenesis. Science 1999;285:245-248.
39. Decosse JJ and Rogers LS: Influence of high-pressure oxygen and chemotherapy on the AMel 4 hamster melanoma. Cancer Res 26: 287-292, 1966.
40. Demirtaş T. (1995) Meme Kanserinin Erken Tanısında Kendi Kendine Meme Muayenesinin Önemi ve Meme Kanseri Hakkında Üniversitemiz Medikal ve Paramedikal Son Sınıf Kız Öğrencilerinin Bilgi Düzeylerinin Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hemşirelik Ana Bilim Dalı, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
41. Denham W, Yeoh EK, Ward GG, Ahmad AS, Harvey NDM. Radiation therapy in hyperbaric oxygen for head and neck cancer at Royal Adelaide Hospital-1964-1969. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1987; 13: 201-208.

42. Desbaillets I, Diserens A, Tribolet N, Hamou M, Van Meir EG. Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene* 1999; 18: 1447-1456.
43. Dickson RB, Lipman ME, Oncogenes and Supressor Genes In: Disease of the Breast Ed.Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-NewYork 1996, p:221-235.
44. Dische S: Hyperbaric oxygen: the Medical Research Council trials and their clinical significance. *Br J Radiol* 51: 888-894, 1979.
45. Donegan WL : Introduction to history of breast cancer . In Donegan WL and Spratt JS (ed) : Cancer of the breast. In Sabiston DC (ed): Textbook of Surgery Philadelphia, Saunders, pp. 1-5, 1995.
46. Dunst J, et al. Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers. *Strahlenther Onkol* 2001;177:469–473.
47. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer: An overview of the randomised trials. *Lancet* ,351 : 1451-1467,1998 .
48. Elliot D, Kindwall EP. Decompression Sickness. In: Kindwall EP and Whealn HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 434-485.
49. Evans DGR, Howell. Breast cancer risk-assessment models. *Breast Cancer Res* 9: 213-222, 2007.
50. Evans JC. Metastasis following radiotherapy in hyperbaric oxygen. *Radiol* 1971;22:538-540.
51. Feldmeier JJ. Hyperbaric Oxygen: Does it Have a Cancer Causing or Growth Enhancing Effect? Fifth Consensus Conference of The European Committee for Hyperbaric Medicine With The European Society of Therapeutic Radiology and Oncology October, 2001; 1-15

52. Feldmeier JJ. Hyperbaric Oxygen 2003. Indications and Results. In: Feldmeier JJ (ed). The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report. UHMS. Kensington, Maryland, 2003; 87-100.
53. Feldmeier JJ, Onoda JM, Bossung DE, Court WS, Alecu R. Effect of Hyperbaric oxygen on cancer cell metastatic potential and proliferation.(abs) Undersea Hyper Med 1997;24(supl):125.
54. Fisher B, et al. Location of breast carcinoma and prognosis. Surg Gynecol Obstet 129: 705; 1969.
55. Florescu, A.; Amir, E.; Bouganim, N.; Clemons, M. (2011). "Immune therapy for breast cancer in 2010—hype or hope?". Current Oncology 18 (1): e9–e18. PMC 3031364
56. Folkman,J. Antiangiogenic Therapy In: Cancer: Principles and Practice of Oncology, Devita VT, Hellman S, Rosenberg S eds. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997:3075-3085.
57. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285: 1182-1186.
58. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Mulvihill JJ. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. J Natl Cancer Inst 81: 1879-1886, 1989.
59. Gelmann EP. Oncogenes in human breast Cancer. In:The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I. Ed:Bland KI, Copeland EM. WB saunders Company, USA, 1998, p:499-517.
60. Goda N, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. Mol Cell Biol 2003;23: 359–369.
61. Götzsche PC, Nielsen M "Screening for breast cancer with mammography". Cochrane Database Syst Rev (1) (2011).: CD001877

62. Graeber TG, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88–91.
63. Granowitz EV. et al. Hyperbaric Oxygen Inhibits Benign and Malignant Human Mammary Epithelial Cell Proliferation. *Anticancer Research* 25: 3833-3842 (2005)
64. Greenlee RT, et al. Cancer Statistics, 2000. *CA Cancer J. Clin*: 50; 7-33: 2000.
65. Haagensen C. In: Diseases of the breast. 3rd edition Philadelphia, W.B.Saunders 686: 1986.
66. Hammarlund C. The Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygenation. In Kindwall EP, Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice*, 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 37-68.
67. Harrison LB, et al. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist* 2002;7:492–508.
68. Haslam SZ, Woodward TL. "Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-cell-stromal-cell interactions and steroid hormone action in normal and cancerous mammary gland." *Breast Cancer Res.* (June 2003); 5 (4): 208–15.
69. Hatipoğlu AA. Kanser erken tanı ve tarama problemleri. Tuncer AM. Türkiye’de Kanser Kontrolü.1. Baskı. Ankara: Onur Matbaacılık, 2007: 381-388.
70. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Uygulanan Özel Sağlık Merkezleri Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete. Tarih: 01.08.2001, sayı 24480.
71. Hiyama K, et al. Telomerase activity in small-cell and nonsmall-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995;895–902.
72. Hockel M, et al. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res* 1999; 59:4525–4528.
73. Hockel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P: Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1993, 26:45–50.

74. Hoeckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Knapstein PG, Vaupel P. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. Oxygen Transport to Tissue XV. Vaupel P (ed.) Plenum Press, New York. 1994: 445-450
75. Hunt TK. The physiology of wound healing. *Annals of Emergency Medicine* 1988; 17: 1265-1273.
76. Hyperbaric Oxygen Therapy Indications, The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report. Ed: Gesell LB. Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc. Durham, USA, 2008.
77. Iglehart JD: The breast. In Sabiston DC (ed): *Textbook of Surgery*: Philadelphia, Saunders, pp. 510-550, 1995.
78. İlvan Ş. Meme Karsinomu Patolojisi. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54. Aralık 2006; s. 65 - 71
79. Jackson AL, et al. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res* 2001;477:7–21.
80. Jain KK. History Of Hyperbaric Medicine In: Jain KK (ed). *Textbook Of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 2-10.
81. Jain KK. Hyperbaric Oxygen Therapy in Infections. In: Jain KK (ed). *Textbook of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 189-192.
82. Jain KK. Indications, Contraindications, and Complications of Hyperbaric Oxygen Therapy. In: Jain KK (ed). *Textbook of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 105-108.
83. Jain KK. Physical, Physiological, and Biochemical Aspects of Hyperbaric Oxygenation. In: Jain KK (ed). *Textbook of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 11-28.

84. Jardé T, Perrier S, Vasson MP, Caldefie-Chézet F (January 2011). "Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer". *Eur. J. Cancer* 47 (1): 33–43.
85. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 52: 23-47, 2002.
86. Johnson RJR, Lauchlan SC. Epidermoid carcinoma of the cervix treated by ⁶⁰Co therapy and hyperbaric oxygen. *Proceedings of the third international congress on hyperbaric medicine*. 1966;648-652.
87. Jonker MA, Jacobi CE, Hoogendoorn WE. Modeling familial clustered breast cancer using published data. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 1479-1485, 2003.
88. Kaelin CM, et al. The effects of hyperbaric oxygen on free flaps in rats. *Arch Surg* 1990;125:607–609.
89. Kaelin CM, Im MJ, Myers RAM, Manson PN, Hoopes JE. The effects of hyperbaric oxygen on free flaps in rats. *Arch Surg* 1990;125:607-609.
90. Kaide CG, Khandelwall S. *Hyperbaric Oxygen Therapy*. 2010. Chapter e18-1.
91. Kaïns'J, Krock L, Piepmeier E. The effect of hyperbaric oxygen on growth and chemosensitivity of metastatic prostate cancer. *Anticancer Res* 1998;18:363-367.
92. Kamata H, et al. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999;11:1–14.
93. Kindwall EP. A History of Hyperbaric Medicine. In Kindwall EP (ed). *Hyperbaric Medicine Practice*. USA, Best Publishing Company 2002; 1-20.
94. Kindwall EP. Contradictions and Side Effects to Hyperbaric Oxygen Treatment. In Kindwall EP, Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 84-96.
95. Kindwall EP. The Physics of Diving and Hyperbaric Pressures. In Kindwall EP, Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 21-36.

96. Kizaka-Kondoh S, et al. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer Sci* 2003;94:1021–1028
97. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis: effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*. 1981; 90:262-270.
98. Knisely JP, et al. Importance of hypoxia in the biology and treatment of brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am* 2002;12:525–536.
99. Kong Q, et al. A threshold concept for cancer therapy. *Med Hypotheses* 2000;55:29–35.
100. Koukourakis MI, et al. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001;61:1830–1832.
101. Krementz ET and Knudson L: The effect of increased oxygen tension on the tumoricidal effect of nitrogen mustard. *Surgery* 50: 266-273, 1961.
102. Kumaki F, et al. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol* 2001;188–195
103. Kuniyasu H, et al. Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:103–107.
104. Kutluk T., Kars A. (1992) *Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları.*
105. Lacroix M (December 2006). "Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells". *Endocrine-related Cancer* 13 (4): 1033–67.
106. Laurent A, et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005;65:948–956.
107. Leather RP and Eckert C: Hyperbaric oxygenation and mechlorethamine effectiveness. *Arch Surg* 87: 160-163, 1963.

108. Marx RE. Radiation injury to tissue. In: Kindwall EP, Whelan HT (eds) *Hyperbaric Medicine Practice* (Second Edition). Flagstaff, AZ: Best Publishing Co., 1999; 720.
109. Massarut S, Baldassare G, Belletti B, Reccanello S, D'Andrea S, Ezio C, Perin T, Roncadin M, Vaidya JS (2006). "Intraoperative radiotherapy impairs breast cancer cell motility induced by surgical wound fluid". *J Clin Oncol* 24 (18S): 10611.
110. Mathieu D, Wattel F. Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygen on Microorganisms and Host Defences Against Infection, In: Mathieu M (ed). *Handbook on Hyperbaric Medicine*, Netherlands, Springer, 2006; 103–120.
111. Matsui W. "Breast Cancer". <http://www.nlm.nih.gov> (Erişim Tarihi: Mayıs 2002).
112. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ: Hypoxia inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:8104–8109.
113. McCredie JA, Inch WR, Kruen J, Watson T A. Effects of hyperbaric oxygen on growth and metastases of the C3H BA tumor in the mouse. *Cancer* 1966; 19:1537-1542.
114. McGuire WL, Clark GM: Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. *N Engl J Med*; 326: 1756, 1992
115. McMillan T, Calhoun KH, Mader JT, Stiernberg CM, Rajarman S. The effect of hyperbaric oxygen on oral mucosal carcinoma. *Laryngoscope* 1989;99:241-244.
116. Miller BA, Feuer EJ, Hankey BF: The significance of the rising incidence of breast cancer in the United States. In De Vita VT, Helhnan S, Rosenberg SA (ed) : *Important Advances in Oncology*. Philadelphia, JB Lippincott, p 193, 1994
117. Minamino T, et al. Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol Cell Biol* 2001;3336–3342.

118. Monstrey SJ, Mullick P, Narayanan K, Ramasastry SS. Hyperbaric oxygen therapy and free radical production: an experimental study in doxorubicin (Adriamycin) extravasation injuries. *Annals of Plastic Surgery* 1997;38(2):163-168.
119. Moulder JE, et al. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 1987;5:313–341.
120. Nathanson L, Brown B, Maddock C and Hall TC: Effects of antitumor agents and hyperbaric oxygen in normal and tumorbearing rodents. *Cancer* 19: 1019-1025, 1966.
121. Niinikoski J, Hunt TK, Dunphy JE. Oxygen supply in healing tissue. *Am J Surg.* 1972; 123:247-252.
122. Niinikoski J. Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygen on Wound Healing Processes. In: Mathieu D (ed). *Handbook on Hyperbaric Medicine*, Netherlands, Springer, 2006; 135-146.
123. Oishi T, et al. Alteration of telomerase activity associated with development and extension of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998;91:568–571.
124. Palmquist BM, Philipson B, Barr PO. Nuclear cataract and myopia during hyperbaric oxygen therapy. *Br Journal of Ophthalmology*, 1984; 68(2):113-117.
125. Park M. Effects of Hyperbaric Oxygen in Infectious Diseases: Basic Mechanism. In Kindwall EP and Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 205-244
126. Peng ZR, Zhong WH, Liu J, Xiao PT. Effects of the combination of hyperbaric oxygen and 5-fluorouracil on proliferation and metastasis of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells. *Undersea Hyperb Med.* 2010 May-Jun;37(3):141-50.
127. Puffer HW, et al. Preliminary observations of oxygen levels in microcirculation of tumors in C3H mice. *Adv Exp Med Biol* 1976;75:605–610.
128. Roque F, Simao A. Barotraumatism. In: Mathieu M (ed). *Handbook on Hyperbaric Medicine*, Netherlands, Springer, 2006; 715–730.

129. Ryan HE, Lo J, Johnson RS: HIF-1a is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998, 17: 3005–3015.
130. Özdemir O. ve Çalışkan D. (2002) “Meme Kanserinin Erken Tanısında Kullanılan Yöntemler”, *Sağlık ve Toplum*; 12(4): 10-14.
131. Petre PM, Baciewicz FA Jr, Tigan S and Spears JR: Hyperbaric oxygen as a chemotherapy adjuvant in the treatment of metastatic lung tumors in a rat model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125: 85-95, 2003.
132. Ravi R, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000;14:34–44.
133. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J: Non-hypoxic pathway mediates the induction of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000, 275: 26765–26771.
134. Ryan HE, Lo J, Johnson RS: HIF-1a is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998, 17: 3005–3015.
135. Saini KS, et al (2011, August). "Role of the multidisciplinary team in breast cancer management: results from a large international survey involving 39 countries". *Annals of Oncology* 23 (4): 853–9.
136. Sant M, Francisci S, Capocaccia R. Time trends of breast cancer survival in Europe in relation to incidence and mortality. *Int J Cancer* 119:2417-2422, 2006.
137. Saphir O, Parker M. Metastases of primary carcinoma of the breast with special reference to spleen, adrenal glands and ovaries.
138. Sariego, J. (2010). "Breast cancer in the young patient". *The American surgeon* 76 (12): 1397–1401
139. Schönmeyr B.H. et al. The Effect of Hyperbaric Oxygen Treatment on Squamous Cell Cancer Growth and Tumor Hypoxia. *Annals of Plastic Surgery*: January 2008 - Volume 60 - Issue 1 - pp 81-88 doi: 10.1097/SAP.0b013e31804a806a

140. Semenza GL: Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. Crit Rev Biochem Mol Biol 2000, 35:71– 103.
141. Shewell J and Davies RW: Combined therapy of the spontaneous mouse mammary tumour: methotrexate and hyperbaric oxygen irradiation. Eur J Cancer 13: 977-984, 1977.
142. Shewell J, Thompson SC. The effect of hyperbaric oxygen treatment on pulmonary metastasis in the C3H Mouse. doi:10.1016/0014-2964(80)90157-7. March 25, 2004
143. Shewell J,Thompson SC. The effect of hyperbaric oxygen treatment on pulmonary metastasis in the C3H mouse. Eur J Cancer 1980;16:253-259.
144. Shi Q, et al. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. Clin Cancer Res 1999;37113721
145. Shi Y, et al. Effects of hyperbaric oxygen exposure on experimental head and neck tumor growth, oxygenation, and vasculature. Head Neck 2005;27:362–369.
146. Silvenberg E, Lubera J: Cancer Statistics 1987, CA Cancer J Clin: 37; 19:1987.
147. Silver IA. The measurement of oxygen tension in healing tissue. Progr Resp Res. 1969; 3:124-135.
148. Skrabonek P. False premises and false promises of breast cancer screening. Lancet: 316-320; 1985.
149. Spratt JS, Spratt SW. Medical and legal implications of screening and follow-up procedures for breast cancer. Cancer 66: 1351-1362; 1990.
150. Suit HD, Smith J, Suchato C. Effect of daily exposure to high pressure oxygen on tumor growth. Am J Roentgenol 1966; 97:1019-1022.
151. Szatrowski TP, et al. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. Cancer Res 1991;51:794–798.

152. Takiguchi N, Saito N, Nunomura M, Kouda K, Oda K, Furuyama N and Nakajima N: Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors: evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. *Cancer Chemother Pharmacol* 47: 11-14, 2001.
153. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing – more than a nutrient. *World J. Surg.* 2004; 28, 294-300.
154. Teicher BA, Crawford JM, Holden SA and Cathcart KNS: Effects of various oxygenation conditions on the enhancement by fluosol-DA of melphalan antitumor activity. *Cancer Res* 47: 5036-5041, 1987.
155. The 7th European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine. In Mathieu D. (ed). Conference Report ECHM, Lille, 3th-4th Dec 2004.
156. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 23: 1111-1130, 2004.
157. Ünal H. Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54. Aralık 2006; s.9 - 13
158. Xu X, Yi H, Suzuki H, Kobayashi S, Takahashi H, Nakashima I. Differential sensitivities to hyperbaric oxygen of lymphocyte subpopulations of normal and autoimmune mice. *Immunology Letters* 1997;59:79-84.
159. Valaitis J, et al. Effect of hyperbaric oxygen and nitrogen mustard (NSC-762) on Ehrlich ascites tumor. *Cancer Chemother Rep* 1968;52(Pt 1):405–412.
160. Van Asperen CJ, Jonker MA, Jacobi CE. Risk estimation for healthy women from breast cancer families: new insights and new strategies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 87-93, 2004.
161. VandenBrenk HAS, Madigan JP, Kerr RC. An analysis of the progression and development of metastases in patients receiving x-radiation in hyperbaric oxygen. *Clin Radiol* 1967;18:54-61.

162. Volm M, Koomagi R: Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000, 20:1527–1533.
163. Wang GL, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helixloop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510–5514.
164. Warburg O, et al. On growth of cancer cells in media in which glucose is replaced by galactose. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1967;348:1686–1687.
165. Warren S, Witham E. Studies on tumor metastases: The distribution of metastases in cancer of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 57: 81; 1933.
166. Wiseman BS, Werb Z (May 2002). "Stromal effects on mammary gland development and breast cancer". *Science* 296 (5570): 1046–9. DOI:10.1126/science.1067431
167. Wooster R, et al : Localisation of a breast cancer susceptibility gene , BRCA-2 , to chromosome 13 q 12-13 . *Science* , 265 : 2088, 1994
168. Yildiz S, Aktas S, Cimsit M, Ay H, Toğrol E. Seizure incidence in 80,000 patient treatments with hyperbaric oxygen. *Aviat Space Environ Med.* 2004 Nov;75(11):992-4
169. Zamboni WA, Roth AC, Russel RC, NemiroffPM, Casas L, Smoot EC. The effects of acute hyperbaric oxygen therapy on axial pattern skin flap survival when administered during and after total ischemia.*J Reconstr Microsurg* 1989;5:343- 347.

IX- ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ

1979 yılında İstanbul’da doğdum. İlkokulu 30 Ağustos İlkokulu’nda, ortaokul ve lise eğitimimi Kartal Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 2002 yılında İstanbul Tıp Fakültesi’nden, 2009 yılında Marmara Üniversitesi İngilizce İşletme Bölümü’nden mezun oldum. Kasım 2009’da İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Öğrencisi olarak çalışmaya başladım. Halen aynı bölümde görevime devam etmekteyim.

e-posta: draslican@hotmail.com