

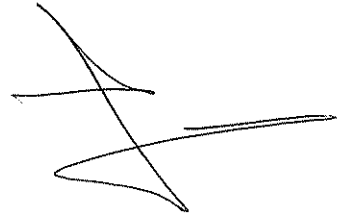
T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
SUALTI HEKİMLİĞİ VE HİPERBARİK TIP ANABİLİM DALI

**RADYOTERAPİ UYGULANMIŞ
FİBROBLAST KÜLTÜRLERİNDE
HİPERBARİK OKSİJENİN ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Deneysel çalışma)

Dr. Gamze ÖZTÜRK
UZMANLIK TEZİ



(Tez danışmanı Doç. Dr. Salih AYDIN)

İSTANBUL

2008

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2241 proje numaralı yazısı ile desteklenmektedir.

ÖNSÖZ

Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp uzmanlık eğitimi almak üzere İstanbul Tıp Fakültesi'nde bulunduğum 4 yılın sonuna gelmiş bulunmaktayım. Bu 4 yıl süresince mesleğimdeki bilgi ve becerilerimi artırdığım için çok mutluyum.

Anabilim Dalı'mızı kurarak ülkemize hiperbarik oksijen tedavisi hizmetini getiren, bu alanda pekçok önemli bilimsel çalışmaya imza atan, gayret ve özveriyle uzman hekimler yetiştirerek bu bilim dalının geleceğini yaratan değerli hocamız Prof. Dr. Maide ÇİMŞİT'e eğitimim boyunca bana gösterdiği destek için teşekkür ederim.

Mesleğimizde her zaman örnek alacağımız bir model oluşturan; bizlere bilimsel yaklaşımı öğreten, ilgi ve anlayışını her zaman hissettiğimiz değerli hocam Prof. Dr. Şamil AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgi birikimini ve desteğini benimle paylaşan, bu zorlu süreçte ve uzmanlık eğitimim boyunca bana anlayış gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Salih AYDIN'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince karşılaştığımız her güçlükte bizlere yol gösteren, hem sualtı hekimliği ve hiperbarik tıp alanında hem hekimlik pratiğinde ihtiyacımız olacak bilgilerle kendimizi yetiştirmemize destek olan hocam Doç. Dr. Akın Savaş TOKLU' ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana sonsuz bir sabır gösteren, yardıma ihtiyacım olduğunda beni hiçbir zaman geri çevirmeyen; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın kapılarını tez çalışmam için bana sonuna kadar açan değerli hocam Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm üyelerine güler yüzleri ve anlayışları için teşekkür ederim.

Çalışmanın istatistikleri konusunda bana büyük yardımı dokunan Doç. Dr. Nadir ARICAN'a teşekkür ederim.

Son 4 yılımın büyük bir kısmını beraber geçirdiğim asistan arkadaşlarımın her birine bana gösterdikleri arkadaşlık, sevgi ve yardımları için sonsuz teşekkür ederim.

Bilgisi, desteği ve arkadaşlığıyla her zaman yanımızda olan ağabeyimiz fizyoterapist Ali ÇELİK'e teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hemşirelerimize ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Her akşam huzurlu bir yuvaya dönme mutluluğunu bana yaşatan sevgili eşime teşekkür ederim.

Özverileriyle beni bugüne getiren çok değerli annem ve babama teşekkür ederim.

Dileğim; bu çalışmanın radyoterapinin olumsuz etkileriyle karşı karşıya olan hastalara yardımcı olabilmesi ve gelecekte bu alanda yapılacak diğer çalışmalar için yol açmasıdır.

Dr. Gamze ÖZTÜRK

2008

İÇİNDEKİLER

I. ÖZET	12
II. ABSTRACT	13
III. GİRİŞ	14
IV. GENEL BİLGİLER	14
IV.A HİPERBARİK OKSİJEN	14
IV.A.1Hiperbarik Oksijen Tanımı	14
IV.A.2Tarihçe	15
IV.A.3Hiperbarik Oksijen Tedavisi Etki Mekanizması	16
IV.A.3.1Gaz Kanunları	16
IV.A.3.2 Hiperbarik Oksijenin Dokulara Etkileri	18
IV.A.4Hiperbarik Oksijen Tedavisi Endikasyonları	20
IV.A.5Hiperbarik Oksijen Tedavisi Yan Etkileri ve Kontrendikasyonları	21
IV.B RADYASYON	22
IV.B.1Radyasyon Tarihçesi	22
IV.B.2Radyasyon Fiziği	23
IV.B.3Radyasyonun Dokular Üzerindeki Etkileri	23
IV.B.4Radyasyonun Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkileri	25
IV.B.5 Hiperbarik Oksijen ve Radyoterapi	26
IV.C HÜCRE KÜLTÜRÜ VE FİBROBLASTLAR	27
IV.C.1Hücre Kültürü	27
IV.C.2Fibroblast Histolojisi	27
V. GEREÇ VE YÖNTEM	28
V.A FİBROBLAST KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANMASI	28
V.B KÜLTÜRLERE RADYOTERAPİ UYGULANMASI	32
V.C KÜLTÜRLERE HİPERBARİK OKSİJEN UYGULANMASI	33
V.D CANLILIK ANALİZİ	33
V.E PROLİFERASYON İNDEKSİ ANALİZİ	34
VI. İSTATİSTİK	35
VII.BULGULAR	35
VII.A GRUP I: KONTROL GRUBU	35
VII.B GRUP II: HBO GRUBU	37
VII.C GRUP III: RADYOTERAPİ GRUBU	38
VII.D GRUP IV: RADYOTERAPİ + HBO GRUBU	40

VII.E GRAFİK VE ANALİZLER	41
VIII. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
IX. KAYNAKLAR	54
X. EKLER	61
XI. ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL	AÇIKLAMA	SAYFA NO
IV.A.1-1	Tek kişilik basınç odası	15
IV.A.1-2	Çok kişilik basınç odası	15
IV.A.3-1	Parsiyel oksijen basıncına göre kanda oksijen çözünürlüğü	18
IV.B.4-1	Meme medialinde radyonekroza bağlı iyileşmeyen yara	26
IV.C.2-1	Fibroblast hücrelerinin mikroskopik görünümü	28
V.A-1	Steril koşullarda laboratuara getirilen biyopsi materyali	30
V.A-2	Biyopsi materyalinin steril olarak parçalara ayrılması	30
V.A-3	Laminar akım cihazı	30
V.A-4	İnkübatör	30
V.A-5	Kültür flaskı içerisinde medium ile süspanse edilmiş doku	30
V.A-6	Kültür flaskının zeminine tutunma gösteren fibroblastlar	30
V.A-7	Santrifüj cihazı	31
V.A-8	Hemositometrede sayılan fibroblast hücreleri	31
V.A-9	Hücrelerin sayım sonrası eşit olarak gruplara dağıtılması	31
V.A-10	Multiwell plağa aktarılmış hücre kültürleri	31
V.B-1	Hücre kültürlerine radyoterapi uygulanması	32
V.C-1	Deney basınç odası	33
V.D-1	Hemositometrede hücre sayım tekniği	34
VII.E-1	Toplam hücre sayısının HBO tedavisi günlerine göre grafik gösterimi	42

(ŞEKİL LİSTESİ DEVAM EDİYOR)

VII.E-2	Vitalite oranının HBO tedavisi günlerine göre grafik dağılım	43
VII.E-3	C ve D grupları toplam hücre sayısı ve vitalite özelliklerinin HBO tedavisi günlerine göre karşılaştırması	43
VII.E-4	HBO tedavisinin 1. gününde deney gruplarında BrdU uygulanan hücrelerin görünümü	44
VII.E-5	HBO tedavisinin 3. gününde deney gruplarında BrdU uygulanan hücrelerin görünümü	45
VII.E-6	HBO tedavisinin 7. gününde deney gruplarında BrdU uygulanan hücrelerin görünümü	46
VII.E-7	Proliferasyon indeksinin HBO günlerine göre grafik gösterimi	46

TABLO LİSTESİ

TABLO	AÇIKLAMA	SAYFA NO
IV.A-1	UHMS tarafından belirlenen HBO tedavisi endikasyonları	21
VII.A-1	A grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki vitalite analizi sonuçları	36
VII.A-2	A grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki proliferasyon indeksi analizi sonuçları	36
VII.B-1	B grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki vitalite analizi sonuçları	37
VII.B-2	B grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki proliferasyon indeksi analizi sonuçları	38
VII.C-1	C grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki vitalite analizi sonuçları	39
VII.C-2	C grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki proliferasyon indeksi analizi sonuçları	39
VII.D-1	D grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki vitalite analizi sonuçları	40
VII.D-2	D grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki proliferasyon indeksi analizi sonuçları	41

KISALTMALAR

HBO	Hiperbarik oksijen
rad	Radiation absorbed dose
Gy	Gray
kg	Kilogram
cGy	Centigrey
ATA	Atmosphere absolute
psi	Pounds per square inch
ml	Mililitre
L	Litre
UHMS	Undersea and Hyperbaric Medicine Society
ESTRO	European Society for Therapeutic Radiology and Oncology
ECHM	European Committee for Hyperbaric Medicine
µg	Mikrogram
cm²	Santimetrekare
°C	Derece santigrat
mmHg	Milimetre civa
BrdU	Bromodeoksiuridin
ROS	Reaktif oksijen türleri

I. ÖZET:

Kanser günümüzde hasta sağkalımını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan hastalıklardan biridir. Kanser tedavisinde radyoterapi önde gelen tedavi metodlarındandır ve tedavi sırasında sağlıklı dokular da radyoaktiviteden etkilenmektedir. Radyoterapi sonrası oluşan yan etkilerin tedavisi oldukça güç olabilmektedir. Hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi atmosferik basınçtan yüksek basınçlarda % 100 oksijen solunması esasına dayanır. HBO tedavisinin yara iyileşmesi ve neovaskülarizasyon üzerindeki etkileri, bu tedavi modalitesinin radyoterapi komplikasyonlarının tedavisinde kullanılması fikrini ortaya çıkarmıştır. Bu deneysel çalışmanın amacı radyoterapi uygulanan fibroblast kültürlerinde HBO'nun hücre vitalitesi ve fibroblast çoğalma kapasitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.

Çalışmada sağlıklı donörden alınan cilt biyopsisinden elde edilen fibroblast kültürleri 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol (A), HBO (B), radyoterapi (C) ve radyoterapi+HBO (D) gruplarından C ve D grubuna 5 Gy radyoterapi uygulanmış; sonrasında B ve D gruplarına 7 gün süre ile 2.4 ATA basınçta HBO tedavisi uygulanmıştır. Kültürler 1, 3 ve 7. HBO günlerinde hücre vitalitesi ve proliferasyon indeksleri açısından değerlendirilmiş ve Radyoterapi + HBO uygulanan grupta 3. ve 7. günlerde ölçülen hücre vitalitesi ve proliferasyon indeksi parametrelerinin sadece radyoterapi uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları radyoterapi uygulanmış fibroblastlarda HBO'nun olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler HBO tedavisinin radyoterapi sonrası oluşan yan etkilerin tedavisinde kullanılmasını öneren klinik çalışmaları desteklemektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Hiperbarik, oksijen, fibroblast, radyasyon, hücre kültürü

II. ABSTRACT

Evaluation of the Effects of Hyperbaric Oxygen on Radiated Fibroblast Cultures

Cancer is one of the diseases that seriously affect patient survival and quality of life. Radiotherapy is used commonly among cancer treatment modalities and healthy tissues might be affected from radioactivity. Treatment of radiotherapy side effects are generally very difficult. Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is based on breathing 100 % oxygen in above atmospheric pressures. The positive effects of hyperbaric oxygen on neovascularisation and wound healing has rised up the idea of using HBO treatment for radiotherapy side effects. The aim of this study is to evaluate the effects of HBO on fibroblast vitality and cell proliferation capacity in radiated fibroblast cultures.

In this study, fibroblasts cultured from skin biopsy of a healthy donor are divided into 4 groups: Control (A), HBO (B), radiotherapy (C), radiotherapy+HBO (D). Groups C and D are radiated with a dose of 5 Gy. Hyperbaric oxygen is applied on groups B and D with a pressure of 2.4 ATA for 7 consecutive days. Cultures are evaluated for cell vitality and proliferation index parameters on day 1, 3 and 7. Cell vitality and proliferation index were found to be statistically higher in group D when compared to group C.

The results of this study indicates that HBO therapy has positive impacts on radiated fibroblast cultures. This study has similiar findings with the clinical studies that encourage the use of HBO therapy for radiotheraphy side effects.

KEY WORDS: Hyperbaric, oxygen, fibroblast, radiation, cell culture

III. GİRİŞ

Kanser günümüzde hasta sağkalımını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan hastalıklardan biri olma özelliğini korumaktadır. Çevresel ve genetik risk faktörlerinin oranı ve çeşitliliği hastalığın insidansını artırmaktadır.

Kanser tedavisinde genel yaklaşım cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi seçeneklerinin koordineli olarak kullanılması esasına dayanmaktadır. Deneysel ve klinik çalışmalar yeni tedavi alternatiflerini gündeme getirmekle beraber radyoterapi halen kanser tedavisinde önde gelen tedavi metodlarından biridir. Radyoterapi alanındaki ilerlemelerle beraber kanser mortalite ve morbiditesi büyük oranda azaltılmıştır. Tedavi sırasında sadece kanserli dokunun ışınlanması hedef alınmakta ancak çevre doku da radyoaktiviteden etkilenmektedir. İstenmeyen etkiler çoğu zaman kısa süreli ve geçici olsa da bazı durumlarda kronik hastalıklar gelişebilmektedir. Radyoterapi yan etkilerinin tedavisi, etkilenen dokunun özellikleri nedeniyle oldukça güç olabilmektedir. Geç dönem komplikasyonlar zaman zaman primer patolojinin kendisinden daha olumsuz sonuçlara yol açabilir. Yan etkilerin tedavisindeki yaklaşımlar çoğu zaman konservatiftir.

Hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi atmosferik basınçtan yüksek basınçlarda % 100 oksijen solunması esasına dayanan bir tedavidir. Oksijen hemoglobinden bağımsız olarak plazmada çözünür ve dokulara taşınır. HBO tedavisinin yara iyileşmesi ve neovaskülarizasyon üzerindeki etkileri, bu tedaviyi radyoterapi yan etkilerine yönelik tedavi yaklaşımlarında özel bir konuma getirmektedir.

Bu deneysel çalışmanın amacı radyoterapi uygulanan fibroblast kültürlerinde HBO tedavisinin hücre vitalitesi ve fibroblast çoğalma kapasitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Elde edilecek verilerin radyoterapinin istenmeyen etkilerinin tedavisinde HBO tedavisinin klinik kullanımına yol gösterici olması beklenmektedir.

IV. GENEL BİLGİLER

IV.A HİPERBARİK OKSİJEN

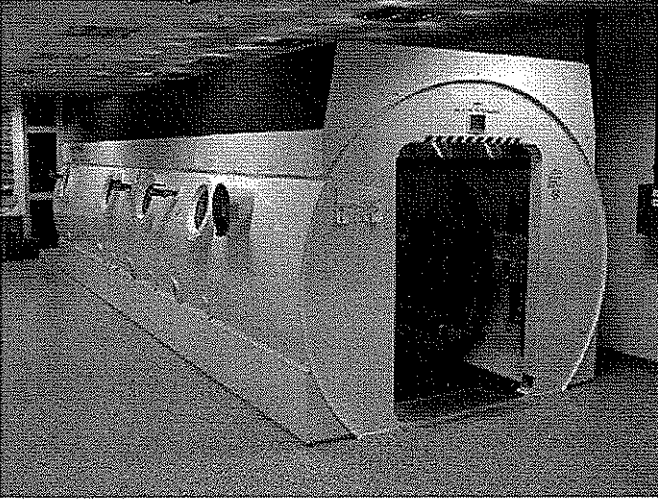
IV.A.1 Hiperbarik Oksijen Tanımı

HBO tedavisi kapalı bir sistemde tamamen basınç altına alınan hastaya 1 atmosferden (1 atmosfer absolut= 1 ATA= 1 Bar= 760 mmHg) yüksek basınç altında % 100 oksijen solutulması esasına dayanan sistemik bir tedavidir (1). 1 ATA basınç normobarik basınç seviyesi olarak kabul edilmektedir. Bu basınç seviyesinde uygulanan % 100 oksijen ve vücudun izole bölgelerine yapılan oksijen uygulamaları HBO tedavisi olarak kabul edilmez.

HBO tedavisi tek kişilik veya çok kişilik basınç odalarında uygulanabilir (ŞEKİL IV.A.1-1, ŞEKİL IV.A.1-2). Tek kişilik basınç odalarında ortam basıncı oksijen ile artırılır ve hasta oksijeni doğrudan solunum ortamından alır. Çok kişilik odalar hava ile basınç altına alınır. Bu tür basınç odalarında oksijen; maske, başlık veya endotrakeal tüp ile hastaya ulaştırılır (1, 2).



ŞEKİL IV.A.1-1 Tek kişilik basınç odası



ŞEKİL IV.A.1-2 Çok kişilik basınç odası

Tedavi süresi, seans sayısı ve uygulanan basınç hastaya göre belirlenmekle beraber maksimum güvenli basınç değeri 3 ATA'dır. Bu değerin üzerindeki basınçlarda oksijenin toksik etkileri görülebilir (3).

IV.A.2 Tarihçe

Yüksek basıncın medikal olarak kullanılması fikri ilk kez 1662 senesinde İngiliz hekim Henshaw tarafından ortaya atılmıştır. Henshaw 'Domicilium' ismini verdiği odada körük

sistemi yardımıyla basıncı artırabiliyor ve bazı akut hastalıkları tedavi edebileceğini düşündüyordu (4).

HBO tedavisi tarihinde önemli adımlardan birisi oksijen molekülünün 1775'te Priestly tarafından tanımlanması ve tedavi edici özelliklerinin bildirilmesidir (4,5).

1834'te Junod ve takiben Taberie ve Pravaz yüksek basınçta hastalarda fiziksel değişiklikler olduğunu gözlemlədiler ve farklı hastalıklarda bu tedaviyi kullandılar (6).

Nehir yatakları ve deniz kenarlarında, özellikle köprü ayağı inşasında kullanılmak üzere geliştirilen basınçlı tünel tekniği Caisson hiperbarik alanda teknolojinin hızla ilerlemesini sağladı.

İlk mobil hiperbarik ünite 1879'da Fontaine tarafından üretildi ve bu oda ameliyathane olarak kullanıldı (4).

Bugün bilinen anlamıyla HBO tedavisinin medikal kullanımı 1955 yılında Churchill Davidson'un çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Davidson HBO tedavisini kanser hastalarında radyoterapinin etkinliğini kuvvetlendirmek amacıyla kullanmıştır (4).

Modern hiperbarik tıbbın babası kabul edilen Boerema dokulardaki oksijen seviyesinin artırılmasını amaçlıyordu. Hollanda Deniz Kuvvetleri ile birlikte yaptıkları deneyler sonrası basınç odası içerisinde kalp ameliyatları gerçekleştirdi (4). 1960 senesinde Boerema'nın ses getiren çalışmasında dolaşımdaki kanı serum fizyolojikle değiştirilen domuzların basınç odası içerisinde yaşamlarını sürdürebildiği gözlemlendi (7).

Aynı yıl ilk kez bir CO zehirlenmesi vakası Sharp ve Smith tarafından tedavi edildi (8).

1961 senesinde Boerema ve Brummelkamp gazlı gangren; Smith ve arkadaşları serebral iskemi tedavisinde HBO tedavisini kullandı (4).

HBO tedavisi alanındaki hızlı gelişme bilgi alışverişinin hızla gerçekleşebileceği uluslararası bir kongre gereksinimi doğurdu. 1963'te ilk uluslararası hiperbarik tıp kongresi Amsterdam'da gerçekleşti (4). Takiben her yıl gerçekleşen toplantılarla tedavi esasları ortaya konmuş ve yeni alanlar belirlenmiştir.

IV.A.3 Hiperbarik Oksijen Tedavisi Etki Mekanizması

HBO tedavisinin etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için basınç , sıcaklık ve hacim değişikliklerinde gazların davranışlarını açıklayan bazı fizik kurallarının hatırlanması gerekir.

IV.A.3.1 Gaz Kanunları

Solunum havasının içeriğini yaklaşık % 21 oranında oksijen, % 78 oranında nitrojen ve % 1 oranında diğer gazlar oluşturmaktadır.

Deniz seviyesinde tüm canlılar atmosfer tarafından oluşturulan bir basıncın etkisi altındadır. Bu basınç 1 ATA olarak kabul edilir ve 760 mmHg'ye eşittir. Aynı basınç 14.7 psi veya 1 kg/cm^2 olarak da ifade edilebilir.

Boyle Kanunu

Gazların basınç hacim ilişkisini açıklayan kanun 'Boyle kanunu'dur. Bu kanuna göre; sıcaklık sabit tutulduğunda bir gazın basıncı ile hacmi ters orantılıdır.

$$P \times V = k \text{ (T sabit)}$$

- P= Basınç
- V= Hacim
- T= Sıcaklık
- k= Sabit

HBO tedavisini ilgilendiren patolojilerin bir kısmı ve bazı tedavi esasları bu kanuna dayanır. Örneğin dekompresyon hastalığı tedavisinde basınç artışı ile kabarcıkların küçültülmesi hedef alınmaktadır. Tedavi sırasında görülen barotravma gibi yan etkiler de Boyle kanunu ile açıklanabilir (9).

Dalton Kanunu

Dalton kanununa göre bir gaz karışımının toplam basıncı, karışımı oluşturan gazların parsiyel basınçlarının toplamına eşittir.

$$P_t = P_1 + P_2 + P_3 + P_n$$

- P = Basınç

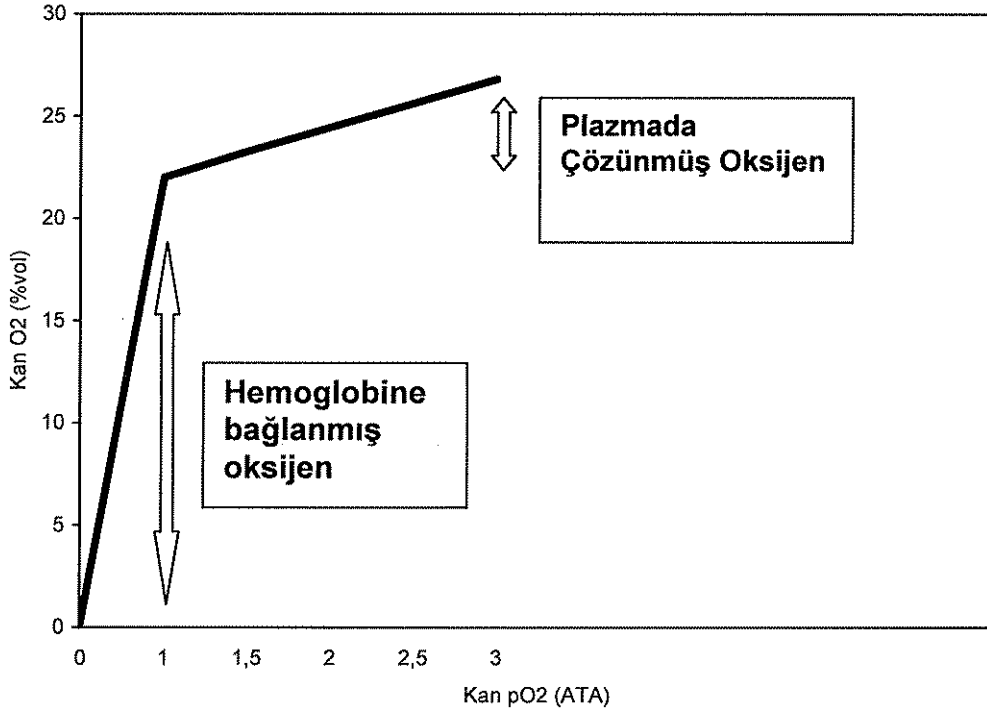
Bu kanuna göre hava toplam basıncı 1 ATA olan bir gaz karışımıdır ve deniz seviyesinde bu basıncın 0.21 ATA'sı oksijen, 0.79 ATA'sı nitrojen tarafından oluşturulmaktadır (10).

Henry Kanunu

Henry kanunu sabit sıcaklıkta bir sıvı içinde çözünen gaz miktarının o gazın parsiyel basıncıyla doğru orantılı olduğunu ifade eder. Çözünen gazın miktarı o gaza ait çözünürlük katsayısı ile de değişiklik gösterir. Bu kanun HBO tedavisi etki mekanizmasının anlaşılabilmesi açısından çok önemlidir.

Oksijen kanda büyük oranda hemoglobin molekülü ile bağlanarak, az miktarda ise plazmada çözünmüş olarak taşınır. Tamamen sature olmuş bir hemoglobin molekülünün 1 gramı 1.31 mililitre (ml) oksijen taşıyabilir. 37°C ' de, hava solunumu ile 100 ml kanda yaklaşık 19.5 ml oksijen, hemoglobine bağlanmış olarak taşınmaktadır. Aynı basınçta 1 litre (L) plazmada sadece 3 ml oksijen çözünmüş durumdadır. Doku düzeyinde oksijenin

kullanılması sonucu bu miktar venöz uca yaklaşıldıkça azalır. Her 100 ml kanda 5- 5.8 ml oksijen dokular tarafından kullanılmaktadır (10).



ŞEKİL IV.A.3-1 Parsiyel oksijen basıncına göre kanda oksijen çözünlüğü

Henry kanununa göre hiperbarik oksijen tedavisi sırasında plazmada çözünen oksijen miktarı artmaktadır. % 100 oksijen solunumu ile 100 ml kanda, 2.8 ATA 'da 6.37 ml oksijen çözümlenir (ŞEKİL IV A 3-1). Plazmada çözünen oksijen miktarındaki bu artış, hiç hemoglobin bulunmasa bile dokuların ihtiyacı olan oksijeni karşılayabilmektedir (11).

IV.A.3.2 Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Dokulara Etkisi

Basıncın Mekanik Etkisi

Boyle yasasına göre basınç altına alınan gazların hacimleri küçülür. Dekompresyon hastalığı, gaz embolisi, gazlı gangren gibi doku içerisinde gaz kabarcıklarının bulunduğu hastalıkların tedavisinde çevre basınç artırılarak kabarcıkların küçültülmesi hedeflenir.

Antihipoksik Etki

Henry kanununa göre HBO tedavisi sırasında hemoglobin oksijene tamamen doymuş olsa bile plazmada çözünen oksijen miktarı artar. Karbonmonoksit ve siyanür zehirlenmeleri, derin anemiler, periferik iskemiler gibi doku oksijenizasyonunun bozulduğu, hipoksiyle seyreden durumlarda HBO tedavisinin bu özelliği önem taşımaktadır (12).

Vazokonstriksiyon ve Antiödem Etki

HBO tedavisi sırasında meydana gelen hiperoksi vazokonstriksiyona sebep olur. Doku oksijenlenmesinin yeterli düzeyde olması ile bu vazokonstriksiyon ödemin azalmasını sağlar. Yanık, travma, kompartman sendromu, dekompresyon hastalığı gibi klinik tabloların tedavisinde HBO tedavisinin bu özelliğinden faydalanılır (12).

Antitoksik Etki

Gazlı gangren klostridial bakterilerin sebep olduğu ağır bir myonekrotik enfeksiyondur. En sık karşılaşılan etkeni Clostridium perfringens'tir. Bu bakteriye ait alfa toksin üretimi HBO tedavisi ile durdurulabilmektedir (13). Cerrahi debridman ve uygun antibiyoterapiye ek olarak uygulanan HBO tedavisinin tedavi etkinliğini artırdığı bazı deneysel çalışmalarda ve olgu sunumlarında gösterilmiştir (14, 15, 16).

Antibakteriyel Etki

HBO tedavisi sırasında doku oksijenizasyonunun artması bazı bakteriyel metabolik reaksiyonları baskılayarak bakteri çoğalmasını durdurmaktadır. Bu etki antioksidan savunma sistemleri olmayan anaerob bakteriler için doğrudan bakterisidaldir (17, 18).

Nötrofiller fagositoz sonrası bakteriyi öldürebilmek için substrat olarak oksijeni kullanır (19). Oksijen oksidatif burst sırasında serbest oksijen radikali oluşturulmasında kullanılır. Superoksit radikalleri hücre membranlarını okside ederek bakteriyi öldürür. Hipoksik durumlarda bu mekanizma çalışmaz. Normal oksidatif fonksiyonların gerçekleştirilebilmesi için en az 30 mmHg'lik bir doku oksijen düzeyi gerekmektedir (20). HBO tedavisi hipoksik dokularda oksijen düzeyini, bakterilerin nötrofiller tarafından öldürülebileceği düzeye çıkarır (21).

Antibakteriyel Ajanların Etkisinin Artırılması

Hücre duvarı geçişi oksijene bağımlı olarak gerçekleşen aminoglikozidlerin etkinliği hipoksik koşullarda çok azalmaktadır. HBO tedavisinin bazı aminoglikozidler, trimetoprim sulfametaksazol, siprofloksasin gibi antibakteriyel ajanların etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (21).

Yara İyileşmesi Üzerine Etkiler

Yara fiziksel bir etki ile cilt bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara sebebiyle cilt normal fonksiyonunu kaybeder. Organizma bütünlüğü tekrar sağlamak ve dokuya eski fonksiyonunu hızla kazandırmak amacıyla yarayı en kısa sürede kapatmayı hedefler. Yara iyileşmesi pek çok sistemin birarada çalıştığı karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Bu sürecin bazı aşamaları oksijene bağımlıdır. Öncelikle yara iyileşmesinde yer alan hücrelerin enerji metabolizması için oksijen gereklidir. Yara oluşumu sırasında meydana gelen vasküler hasar dokuda hipoksiye sebep olur. Hipoksi sonucu hücresel enerji metabolizması anaerobik olarak işlemeye başlayabilir ve bu durumda asidoz gelişir. Bu ortam yaranın sağlıklı bir şekilde kapanabilmesi için uygun değildir. Laboratuvar çalışmaları pek çok yara türünde hiperoksinin yara iyileşmesini desteklediği ve aksi olarak kronik hipoksinin onarımı yavaşlattığını göstermektedir (22).

Fibroblastların kollajen sentezi sürecinde 30-40 mmHg oksijen basıncına ihtiyaç duyulur. Kronik yaralarda ise oksijen basıncı, infeksiyon ve eşlik eden vasküler hasar nedeniyle genellikle 20 mmHg'nin altındadır (23). Kollajenin üçlü heliks halinde birarada tutulması ve fibriller halinde hücrelerden salıverilmesi için pirolin hidroksilasyonu gerçekleşir. Kollajen stabilitesi de lizin hidroksilasyonu ile gerçekleşir. Bu iki reaksiyonun her ikisinde de oksijen gerekmektedir. Gelişmekte olan bağ dokusu kollajen köprüleri üzerinde ilerleyerek yara boşluğunu dolduran granülasyonu oluşturur. Kollajen sentezi ve çapraz köprü oluşturma aktivitesinin en yüksek olduğu yara bölgesinde parsiyel oksijen basıncının 20-60 mmHg olduğu tespit edilmiştir (24). Yara iyileşmesinin son aşaması olan epitelizasyonda epitel hücrelerinin yara bölgesine göçü için de oksijen kullanılmaktadır (25).

HBO tedavisinin vazokonstriktif etkisi ile yara çevresindeki ödem azalır. Yüksek oksijen düzeyi ile lökositlerin fagositoz yetenekleri için uygun ortam sağlanır. HBO seansları arasında kalan relatif hipoksik dönemler neovaskülarizasyonu uyarır. HBO tedavisinin bu özellikleri özellikle vasküler yapının bozulduğu, infeksiyonla mücadelenin defektif olduğu, sistemik problemlerin yaraya eşlik ettiği diyabetik yaralar, yumuşak doku radyonekrozları, periferik vasküler hastalıklara bağlı yaralar gibi problemlili yaralarda önem kazanmaktadır (22).

IV.A.4 Hiperbarik Oksijen Tedavisi Endikasyonları

Undersea and Hyperbaric Medicine Society (UHMS) tarafından belirlenen tedavi endikasyonları TABLO 2.1-1'de özetlenmiştir (26).

1. Hava veya gaz embolisi
2. Karbonmonoksit intoksikasyonu / Siyanür intoksikasyonu
3. Gazlı gangren
4. Akut travmatik iskemiler (Crush yaralanma / Kompartman sendromu)
5. Dekompresyon hastalığı
6. Seçilmiş problemlili yaralarda yara iyileşmesine destek
7. Aşırı kan kaybı (Anemi)
8. İntrakranial abse
9. Nekrotizan yumuşak doku infeksiyonları
10. Osteomyelit (Dirençli)
11. Geç radyasyon hasarı (Yumuşak doku ve kemik nekrozu)
12. Tutması şüpheli flep ve greftler
13. Termal yanıklar

TABLO IV.A-1 UHMS tarafından belirlenen HBO tedavisi endikasyonları

IV.A.5 Hiperbarik Oksijen Tedavisi Yan Etkileri ve Kontrendikasyonları

Yan Etkiler

HBO tedavisinin en sık karşılaşılan yan etkisi orta kulak barotravmasıdır. Artan dış basınca rağmen orta kulak basıncının eşitlenmemesinden meydana gelen negatif basınca bağlıdır. Olguların çoğu minör olgulardır ve valsalva manevrası eğitimi, dalış hızının azaltılması, orta kulak basıncını eşitlemek üzere yapılabilecek su içme, sakız çiğneme gibi ek manevralarla kolaylıkla önlenir. Hasta orta kulak basıncını eşitleyemiyorsa tedaviye devam edilmemelidir ancak acil HBO tedavisinin endike olduğu durumlarda orta kulak barotravması riski HBO tedavisine engel olmamalıdır.

Boyle kanununa göre basınç değişikliğinden etkilenebilecek bir başka anatomik bölge paranasal sinüslerdir. Paranasal sinüsler valsalva manevrası sırasında kendiliğinden eşitlenmekle beraber eğer sinüs ostiumu mukoza ile tıkanmışsa bu eşitleme gerçekleşemez. Meydana gelen negatif basınç sinüs içerisinde mukoza hasarı ve kanamaya sebep olabilir. Her iki barotravma türünde de mukozal konjesyonun mevcut olduğu üst solunum yolu enfeksiyonları ve allerjik rinit gibi durumların varlığında tedaviye ara verilmelidir.

Doğru teknikle yapılmamış ve içerisinde hava boşluğu olan dental dolgular da basınç değişikliği sırasında ağrıya sebep olabilir.

HBO tedavisinin en ciddi yan etkisi pulmoner barotravmadır. Tedavi derinliğine ulaşıldıktan sonra çıkış sırasında kapalı bir glottis, bronşial obstruksiyon veya akciğerde hava hapsine sebep olan bir lezyon varlığında genişleyen akciğer hacmi alveoler rüptüre sebep olabilir. Acil tedavi gerektiren bir tablodur.

Oksijen 3 ATA üzerinde merkezi sinir sistemi üzerine toksik etkiye sahiptir. Standart HBO tedavisi prosedüründe, bu basınçta tedavi yapılmamakla beraber, epilepsi yatkınlığı olan hastalarda normal tedavi basınçlarında da grand mal epileptik nöbetler görülebilir. Bu durumda hastanın maskesi çıkarılarak oksijen solunumu kesilmelidir (27).

Dekompresyon hastalığı tedavisi gibi uzun süreli tedavilerde yoğun oksijen maruziyeti pulmoner toksisiteye de sebep olabilir. Substernal ağrı, öksürük ve solunum sıkıntısı semptomları pulmoner toksisiteyi düşündürmelidir (27). Bu yan etki tedavi sırasında hava molaları verilerek önlenir.

HBO tedavisi bazı hastalarda geri dönüşümlü miyopiye sebep olabilir. Mekanizması tam açıklanamamıştır ancak problemin lens proteinlerinin oksidasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (28). Tedavinin sonlandırılmasından sonra haftalar içinde gerileyen bir yan etkidir.

Kontrendikasyonlar

Tedavi edilmemiş pnömotoraks veya akciğerde hava hapsi yaratan lezyon varlığı, ağır kardiak yetmezlik, gebelik, yüksek ateş, kloströfobi, epilepsi, kondüktif tip işitme kaybına yönelik cerrahi müdahale hikayesi HBO tedavisi için kontrendikasyon yaratan klinik durumlardır.

Aktif malignite varlığı ve devam etmekte olan adriamisin tedavisi, HBO tedavisi için kontrendikasyonlar sınıfında yer alan klinik durumlar olarak gösterilse de son dönemde yapılan çalışmalarda HBO tedavisinin bu klinik durumlarda kontrendikasyon yaratabilecek olumsuz etkilerinin olmadığı (29, 30) hatta kemoterapotik ekstrevasyonu tedavisinde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır (31).

IV.B RADYASYON

IV.B.1 Radyasyon Tarihçesi

Radyasyon tarihi 1895 tarihinde x ışınlarının alman fizikçi Wilhelm Conrad Röntgen tarafından bulunması ile başlar. Röntgen x ışınlarının kanser tedavisinde kullanılabilecek etkin ve güçlü bir enerji olduğunu da farketti. Aynı yıl ilk tedavi denemesi Emil Grubbe tarafından bir meme kanseri olgusunun lokal relapsına uygulandı. 1900' lü yılların başlarında radyasyonun kanser tedavisi alanında kullanılması ile ilgili çalışmalar giderek hızlandı. 1940'ların sonlarında lineer akseleratörler; kobalt ve sezyum ünitesi geliştirildi.

Bilgisayarlı tomografinin keşfiyle 3 boyutlu radyoterapi uygulaması başladı. Bu sayede aksiyel imajlardan yapılan hesaplarla daha etkin tedavi yapılabilirdi. Yakın geçmişte MR ve PET'in klinik uygulamaya girmesiyle daha olumlu tedavi sonuçları daha az yan etkiyle elde edilebilmektedir (32).

IV.B.2 Radyasyon Fiziği

Radyasyonun bir veya daha fazla elektronu atom veya molekülden uzaklaştırmasına iyonizasyon denir. Biyolojik ortamlarda radyasyonla alınan enerji doku elektronlarını uyararak dokularda iyonizasyona sebep olabilir. Açığa çıkan yüksek enerji çevre hücrelerde lokal hasar meydana getirir. Bu etkileşim kanser hücresinde olursa tedavi edici, sağlıklı hücrede ise zararlı etki söz konusudur (33).

Radyasyon türleri iki grupta sınıflandırılabilir:

1. Elektromanyetik radyasyonlar: Elektromanyetik dalga prensipleri içinde yol alan, "foton" olarak adlandırılan enerji paketlerinden meydana gelirler. Hızlandırılmış elektronların, bir maddeye girdiklerinde ani yavaşlamaları sonucu oluşan X ışınları ve radyoaktif maddelerin çekirdeklerinin dezentegrasyonu sonucu açığa çıkan gamma ışınları bu gruba girerler.
2. Parçacık radyasyonlar: Belirlenmiş kütleleri olan, hızlandırılmış atomik partiküllerden meydana gelir. Elektron, nötron, proton, alfa partikülleri bu sınıftadır.

Klinikte X ve gamma ışınları ve elektron partikülleri kullanılır (33).

Dokularda radyasyon tarafından oluşturulan etki 'radiation absorbed dose' (rad) olarak ifade edilir. Absorbe edilen doz 'Gray' (Gy) olarak da ifade edilebilir. 1 Gy 1 kilogram (kg) dokuya 1 Joule enerji veren radyasyon dozudur. 1 Gy; 100 Centigray (cGy) ve 100 rad'a eşittir (33).

Klinikte radyasyon bölünerek uygulanır; Toplam doz fraksiyonlar halinde hastaya verilir. Radyoterapi teleterapi yoluyla, sistemik yolla veya brakiterapi şeklinde uygulanabilir. Brakiterapi radyoaktif kaynağın direk tümör içine veya üzerine konularak kullanılmasıdır. Bu yöntemin avantajı çevre normal dokuların gereksiz yüksek dozlardan korunmasıdır. Teleterapidde radyoaktif kaynak tümöre uzaktan yönlendirilir ve ışınların farklı özelliklerinden yararlanılarak tümöre özgü radyoterapi türü seçilebilir (33, 34).

IV.B.3 Radyasyonun Dokular Üzerindeki Etkileri

Işınımın enerjisi yeterince yüksek olduğunda hücre içerisindeki su ve oksijen molekülleri ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucu ortaya çıkan serbest radikaller çevresindeki organik maddelerin yapısını değiştirerek hücreyi iyonize eder. İyonizasyon sırasında açığa çıkan enerji hücreye zarar verir. Bu etkinin hedef yapısı DNA'dır. Sonuçta;

anatomik ve fonksiyonel bozukluğa yol açmayan yapısal değişikliklerden, hücre ölümüne varabilen farklılıkta hasarlanmalar görülebilir (35). Dokularda oluşan etkinin şiddeti uygulanan doza, uygulama tekniğine ve fraksiyon aralığına bağlı olarak değişim gösterir. Sistemik etkiler radyasyon hastalığı, pnömoni, hematopoetik sendrom, gastrointestinal sendrom, nörovasküler sendrom olarak görülebilir (35). Cilt dokusu üzerindeki etkiler akut ve kronik etkiler olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılır.

a. Akut etkiler:

- i. Eritem
- ii. Kuru deskuamasyon
- iii. Islak deskuamasyon

b. Kronik etkiler

Eritem

En erken görülen yan etkidir. Işınım alanına sınırlıdır. Tek doz radyasyonu takip eden 24 saat içinde belirir ve genellikle 2-3 gün içerisinde kaybolur. Düşük dozlarda pigmentasyon kalmaz ancak 8 Gy üzeri tek dozluk radyasyon uygulamalarında eritem daha geç ortaya çıkabilir ve genellikle pigmentasyon kalır (36).

Kuru deskuamasyon

Tüm bölünen hücreler gibi epiderminin bazal hücreleri de radyasyona oldukça hassastır. Orta dereceli radyasyon uygulaması sonrası canlılığını koruyan hücreler epidermisi tekrar oluşturabilirse 3-4 hafta içerisinde kuru deskuamasyon oluşur (36). Radyasyon nedeniyle melanosit aktivitesinin artmasına bağlı olarak bu deskuamasyon genellikle koyu renklidir.

Islak deskuamasyon

Yüksek dozlarda uygulanan radyoterapi sonrası bazal hücrelerin hemen hemen tamamı ölür (36). Yaklaşık 4 haftalık süre içerisinde skuamöz hücrelerin tümü stratum korneuma ulaşarak dökülmüş olduğundan dermis açığa çıkar ve yüzeyde seröz bir sızıntı meydana gelir.

Radyasyonun cilt üzerindeki geç dönem etkileri hipopigmentasyon, hiperpigmentasyon, cilt ve ciltaltı dokularda fibrozis, atrofi, telenjiektazi, ter ve yağ bezlerinin disfonksiyonu, nekroz ve tümör gelişimidir (36).

Radyoterapi melanositleri stimüle ederek cilt renginde koyulaşmaya sebep olabilir. Yüksek dozda radyasyon maruziyeti ile melanositler hasar görürse ciltte depigmentasyon gözlenir. Kronik radyasyon hasarı olan bir ciltte hipo ve hiperpigmente alanlar birarada gözlenir (36).

Bağ dokusunun radyasyona yanıtı geçtir ve genellikle düşük duyarlılık gösterir. 200 cGy üzerindeki dozlarda atrofi ve fibrozis gözlenir. Radyasyonun dermal bağ dokusunun başlıca hücresi fibroblastlar üzerinde direkt inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir (37).

Dermiste gözlenen ilk değişiklik kollajen demetlerindeki ödem ve inflamasyondur. Histopatolojik değişiklikler zamanla hyalinizasyon ve kollajen liflerinde şişmeye dönüşür. Dermis boyunca yeni kollajen oluşumu kliniğe fibrozis olarak yansır.

Erken evrede kapiller bazal membranda gelişen dejenerasyon ve konjesyon eriteme yol açar. Geç dönemde vasküler tromboz ve ilerleyen damar kaybı hipoksik, fibrotik bir doku gelişmesine sebep olur (33, 38, 39).

Kurtman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1x200 cGy/gün'den toplam 10 gün 2000 cGy ve 2x120 cGy gün'den toplam 10 gün 2400 cGy alan fare grupları, radyoterapi görmeyen kontrol grupları ile tansiyometrede doku dayanıklılığı ölçülerek karşılaştırılmıştır. Cerrahiden 7 gün sonra radyoterapi alan gruplarda radyoterapi görmeyen gruba göre belirgin olarak doku dayanıklılığında azalma saptandı. Ancak günlük tek fraksiyon yerine 2 fraksiyon uygulanan gruplar arasında doku dayanıklılığı açısından fark saptanmadı (40).

IV.B.4 Radyasyonun Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkileri

Terapotik radyasyon yara iyileşmesinin çeşitli basamaklarını etkiler. Radyasyonun yara iyileşmesi üzerinde azalmış vaskülarite, hipoksi, dokuların proliferasyon kapasitesinin azalması gibi birçok olumsuz etkisi vardır.

İyonizan radyasyonun bazal membranda yarattığı dejeneratif değişiklikler vasküler oklüzyona sebep olur. Dokunun hipoksik olması neoanjiogenez için uyarıcı bir etmen olsa da, endotelial hücrelerin proliferatif yeteneklerini kaybetmelerinden dolayı damar kaybı ve dokudaki iskemi artmaya devam eder. Ortaya çıkan hipoksi yara iyileşmesinin diğer basamaklarını da etkiler. Nötrofil aktivasyonu, kollajen sentezi, epitelizasyon basamakları durur veya çok yavaş ilerler. Radyonekrotik bir yarada yara merkezi ve çevre doku arasındaki oksijen gradienti yara iyileşmesini sağlayabilecek bir kemotaktik hareketi başlatmak için çok düşüktür (41).



ŞEKİL IV.B.4-1 Meme medialinde radyonekroza bağlı iyileşmeyen yara. Çevre dokuda hipo ve hiperpigmente sahalar dikkat çekmekte

Bağ dokusunun radyasyon duyarlılığı az olsa da dermal fibroblastların etkilenmesi derminin iyileşme kapasitesinde sınırlanmaya sebep olur. Bu kliniğe yara iyileşmesinde gecikme, atrofi ve fibrozis olarak yansır (42, 43).

IV.B.5 Hiperbarik Oksijen ve Radyoterapi

Radyasyon tedavisinin amacı normal dokuya zarar vermeden tümöral dokuyu yok etmektir. Koruma önlemleri ne kadar yoğun olursa olsun normal dokuda radyasyonun sebep olduğu kalıcı hasarlar gelişebilir. HBO tedavisinin radyasyon kaynaklı değişikliklerin yol açtığı kronik doku hipoksisini ve ilerleyici mikrovasküler yapı kaybını geri çevirdiği düşünülmektedir. Ardışık HBO tedavilerinin kademeli olarak bağ dokusu, kapiller ve epitel oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (41, 44).

Radyasyon hasarlı dokuda HBO kullanımı ilk kez 1973'te yapılan iki temel çalışmayla ortaya atılmıştır (45, 46). Bu çalışmalarda mandibula osteoradyonekrozlu olgular ele alınmıştır. Takiben osteoradyonekroz tedavisinde HBO kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar yaygınlaşmıştır. HBO tedavisinin zayıf perfüzyonu olan dokularda fibroblastik aktivite ve kollajen üretimini sağlayabilecek düzeyde yeterli oksijen parsiyel basıncı oluşturduğu böylece kapiller tomucuklanma ve neovaskülarizasyona uygun ortam hazırladığı gösterilmiştir (44). Marx ve arkadaşlarının çalışmasında HBO tarafından sağlanan anjiogenezin 8 HBO seansından itibaren ölçülebilir düzeye geldiğini göstermiştir (47). HBO tedavisi larynks kondronekrozu, pelvik radyonekrozlar, radyasyon proktiti, radyasyon sistiti, yumuşak doku radyonekrozlarının tedavisinde kullanılmıştır. Klinik tecrübelerin azlığı 2001 yılında Lizbon'da, ESTRO (European Society for Therapeutic Radiology and Oncology) ve

ECHM'yi (European Committee for Hyperbaric Medicine) bir araya getirmiş ve konferans sonucunda ortaya çıkan konsensus metni ile birlikte mandibuler osteoradyonekroz dışındaki anatomik lokalizasyonlar için de araştırma ve olgu çalışmalarına gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır (48).

IV.C HÜCRE KÜLTÜRÜ VE FİBROBLASTLAR

IV.C.1 Hücre Kültürü

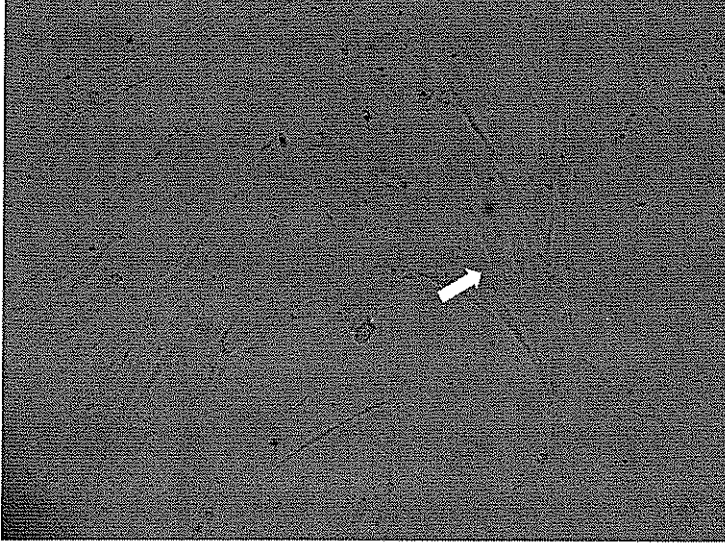
Hücre kültürü mekanik veya enzimatik parçalanma ile dokudan ayrılan hücrenin bir besiyeri içerisinde doku bağlantısı olmadan in vitro olarak üretilmesidir. Hücre kültürü ile ilgili ilk deneysel çalışmalar 20. yüzyıl başlarında yapılmıştır. Harrison 1907'de model hayvan olarak kurbağayı seçerek hücre kültürü yapmayı başarmıştır. Earle ve arkadaşları 1943'te fare tümör hücrelerini izole etmeyi başarmıştır. 1952 yılında Gey ve arkadaşları tarafından insan tümör hücrelerinin devamlı hücre hatları verebildiğinin bulunması hücre kültürlerine olan ilgiyi artırmıştır. Bu çalışmadaki tümör hücreleri serviks kanserinden yaşamını yitiren Henrietta Lack'e ait tümör hücrelerinden pasajlanarak elde edilmiş ve hücreler HeLa hücreleri olarak adlandırılmıştır. Bu hücre hattından elde edilen ölümsüz hücreler halen çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır (49).

Fibroblastların dokudan izolasyonu ve kültürlerinin elde edilmesi diğer birçok hücre türüne göre daha kolay olduğundan çok çeşitli deneylerde tercih edilmiştir. Fibroblastların yara iyileşmesi modellerinin vazgeçilmez elemanı olması sebebiyle fibroblast kültürleri bu alanda yapılan çalışmalar için de önemli bir in vitro gözlem imkanı sağlamıştır (50, 51).

IV.C.2 Fibroblast Histolojisi

Fibroblastlar bağ dokusunun en önemli hücresel bileşenidir ve yapısal bütünlüğü sağlamakta önemli bir rol oynar. Çok çeşitli ekstrasellüler proteinleri ve aynı zamanda proteinazları sentezleyip salgılayarak dokuların biyokimyasal bütünlüğünü ve remodelingi sağlar. Bu hücrede aktif ve durgun olmak üzere iki safha vardır. Yoğun sentez halinde bulunan hücre morfolojik olarak sentezlediği matriks içinde dağılmış olarak bulunur (52). Fibroblastların sitoplazmalarında hücrelerarası madde yapımı durgunlaşmış olanlarına fibrosit denir. Bu tanım farklı bir hücre olmayıp fibroblastın inaktif evresini simgeler. Fibroblastlar düzensiz hücrelerdir. Uzantıları düzensiz dallanmalar yapar (ŞEKİL IV.C.2-1). Çekirdekleri oval yapıda ve merkezi yerleşimlidir; bir veya iki nükleolus, az miktarda granüler kromatin gözlenebilir (53). Ökromatik olarak boyanırlar. Sitoplazma içinde iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi gözlenir. Fibrositlerin sitoplazmik uzantıları daha

azdır. Işık mikroskobu altında aktif fibroblastların sitoplazmalarının baz boyalarla daha koyu boyandığı gözlemlenir (54). Bunun sebebi sitoplazmadaki yoğun granüllü endoplazmik retikulum varlığıdır.



ŞEKİL IV.C.2-1 Fibroblast hücrelerinin mikroskobik görünümü. Düzensiz dallanmalar gösteren sitoplazma yapısı dikkat çekmektedir.

Fibrositler uyarı aldığı anda fibroblast durumuna geçerek sentez aktivitelerini yeniden başlatabilir. Yara iyileşmesinde bu olay gözlemlenir. Fibroblastlar kollajen, retiküler ve elastik lifler ile amorf hücrelerarası maddenin glikozaminoglikanlarını ve glikoproteinlerini sentezler. Erişkinlerde bağ dokusundaki fibroblastlar, bağ dokusu hasarı gibi ek fibroblastlara gereksinim olduğu durumlarda bölünerek çoğalabilirler (52).

V. GEREÇ VE YÖNTEM

V.A FİBROBLAST KÜLTÜRLERİNİN HAZIRLANMASI

Çalışma protokolü, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı ve Helsinki Bildirgesine uygun olarak gerçekleştirildi.

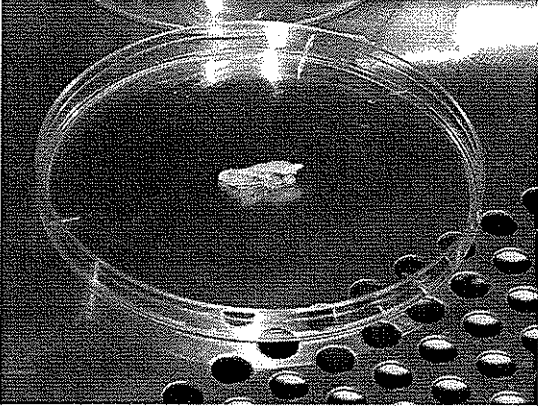
Çalışmada kullanılacak fibroblast kültürlerinin hazırlanması için bir adet donörden cilt biyopsisi alındı. Donöre çalışmayla ilgili sözlü ve yazılı bilgi verildi ve bilgilendirilmiş onam alındı.

Kültürler daha önce tanımlandığı şekilde hazırlandı (55).

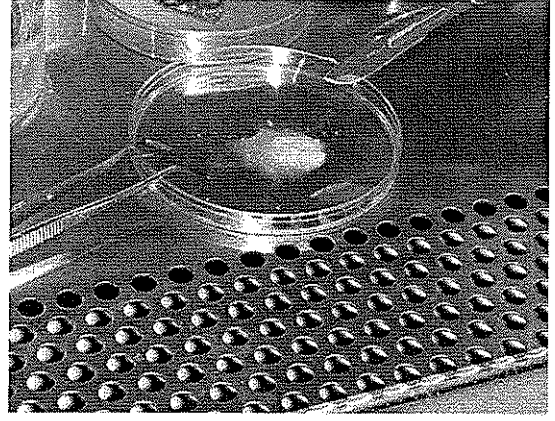
Biyopsi materyali steril koşullar sağlanarak aynı gün içerisinde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarına

getirildi (ŞEKİL V.A-1). Laminar akım cihazı (Tezsan) (ŞEKİL V.A-3) altında sağlanan steril koşullarda, biyopsi materyali uygun konsantrasyonda antibiyotik içeren serum fizyolojik ile yıkandı ve bistüri ile parçalara bölündü (ŞEKİL V.A-2). Bu parçalar, 10 ml. kültür medyumunu [% 10 Fetal dana serumu (Gibco) ve 25 µg/ml Gentamycin içeren DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)] içerisinde süspanse edilerek, 80 cm² lik kültür şişelerine ekildi (ŞEKİL V.A-5). Kültür plakları, 37 °C sıcaklıkta ve % 5 karbondioksit, % 95 oda havası içeren inkübatör (Sanyo) içerisinde saklandı (ŞEKİL V.A-4). Ekimi takiben yaklaşık 4-5. günde fibroblastların tabana yapıştığı ve plağa migrasyonu gözlemlendi (ŞEKİL V.A-6).

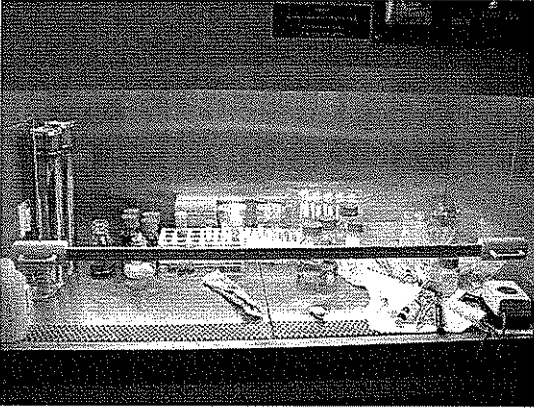
İlk medyum değişimi birinci haftada, takip eden değişimler ise her 3 günde bir gerçekleştirildi. Pasajlama işlemi için, şişe içerisindeki medyumun aspire edilmesini takiben, hücrelerin üzerine 5 ml. % 0.25 (1:250) trypsin solüsyonu (Gibco) eklendi. On dakika süreyle 37 °C sıcaklıkta inkübasyonu takiben tabandan ayrılan hücreler pipet yardımı ile 50 cc'lik steril tüpe toplandı ve üzerine 10 ml. kültür medyumunu eklendi. Bir kez bu medyum içerisinde, bir kez de aynı miktarda %10 serum içeren DMEM-F12 solüsyonu içerisinde santrifügasyonu (300 g, 15 dk.) (ŞEKİL V.A-7) takiben, hücreler 10 ml. taze kültür medyumunda süspanse edildi ve uygun sayıdaki plağa aktarıldı. Deney; literatürde önerildiği üzere 3 ve 6. pasajlar arasında yapıldı (55, 56). Hücreler son pasajdan sonra deneysel uygulama için içerlerine 0.9 cm çapındaki steril yuvarlak lameller yerleştirilmiş 24 kuyucuklu, gaz geçişine olanak tanıyan multiwell plağa aktarıldı (ŞEKİL V.A-10). Eşit dağılım için santrifüj aşamasından sonra hücreler hemositometri kamerasında sayıldı ve 5 x 10⁴ hücre/ml olacak şekilde dağılım gerçekleştirildi (ŞEKİL V.A-8, ŞEKİL V.A-9)



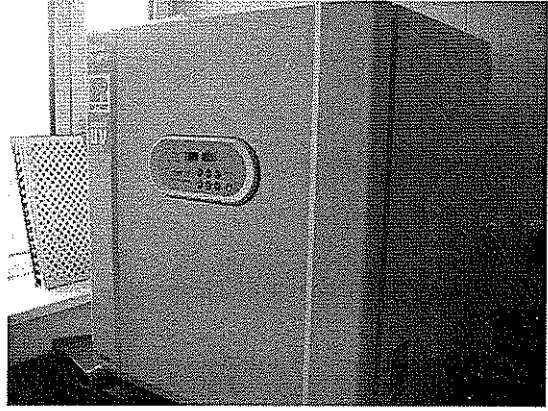
ŞEKİL V.A-1 Steril koşullarda laboratuara getirilen biyopsi materyali



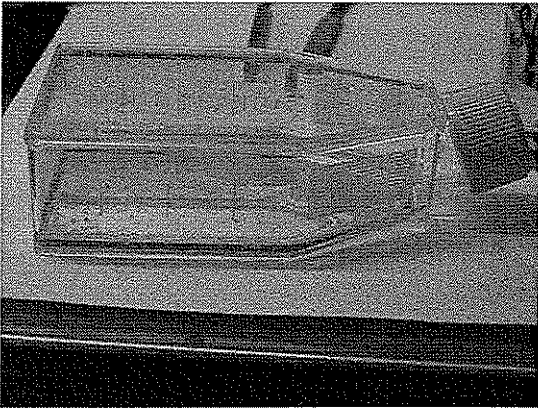
ŞEKİL V.A-2 Biyopsi materyalinin steril olarak parçalara ayrılması



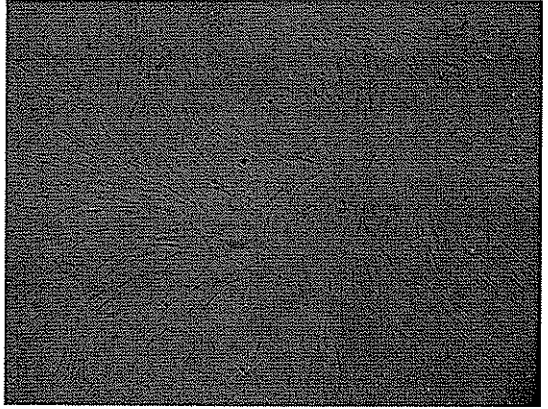
ŞEKİL V.A-3 Laminar akım cihazı (Tezsan)



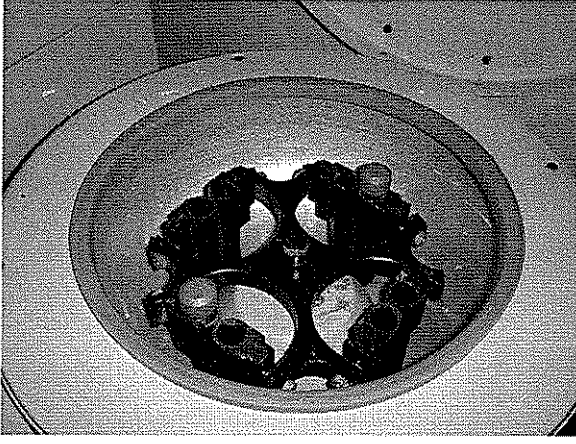
ŞEKİL V.A-4 İnkübatör (Sanyo)



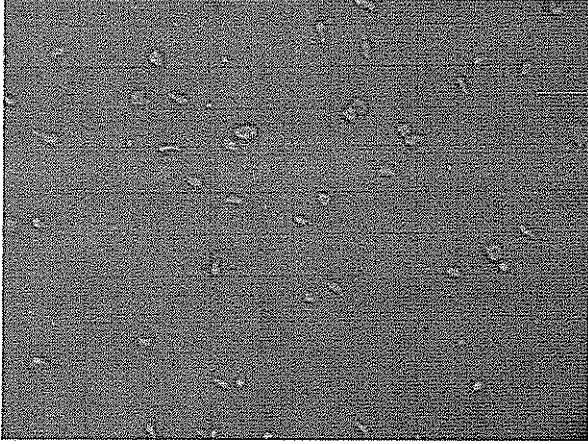
ŞEKİL V.A-5 Kültür flaskı içerisinde medium ile süspansiyon edilmiş doku



ŞEKİL V.A-6 Kültür flaskının zeminine tutunma gösteren fibroblastlar



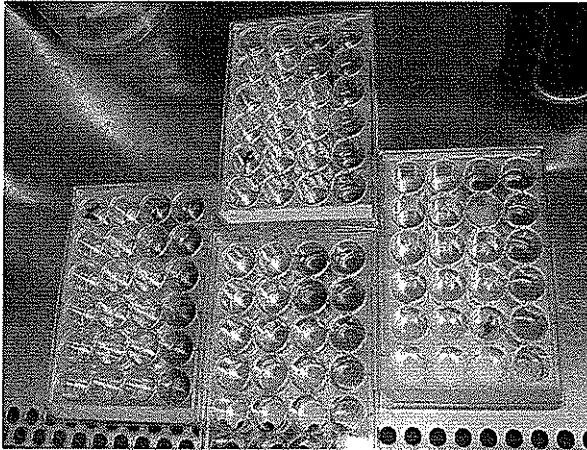
ŞEKİL V.A-7 Santrifüj cihazı (Nüve NF 815)



ŞEKİL V.A-8 Hemositometrede sayılan fibroblast hücreleri



ŞEKİL V.A-9 Hücrelerin sayım sonrası eşit olarak gruplara dağıtılması



ŞEKİL V.A-10 Multiwell plağa aktarılmış hücre kültürleri

Deney grupları :

A- Kontrol

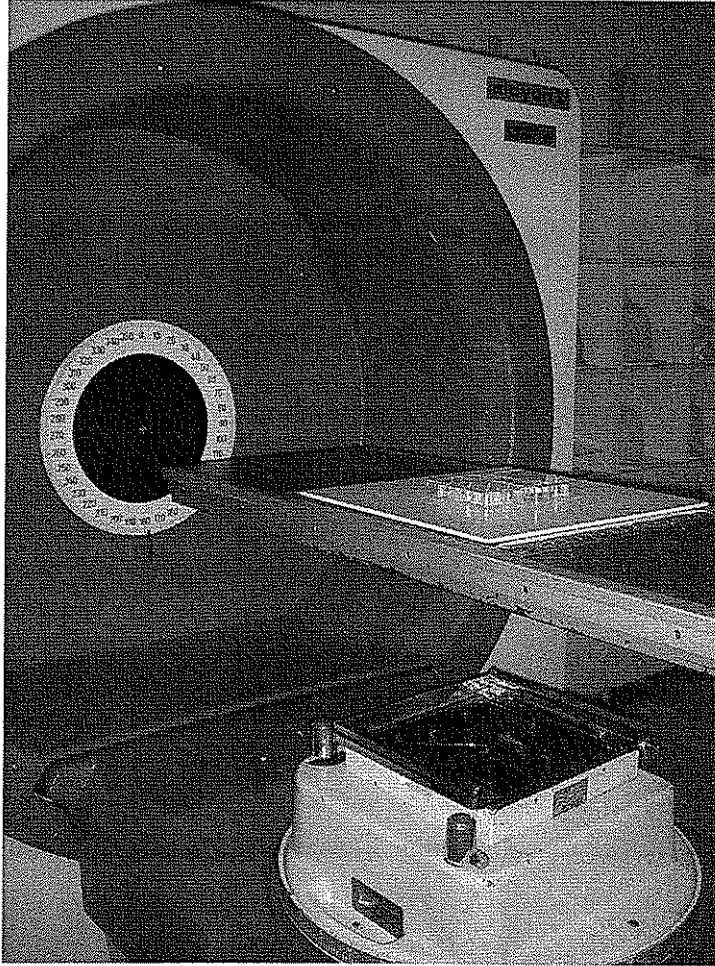
B- HBO

C- Radyoterapi

D- Radyoterapi + HBO olarak belirlendi

V.B KÜLTÜRLERE RADYOTERAPİ UYGULANMASI

Hazırlanan kültürler, hücrelerin son pasajdan sonra multiwell plağa tutunabilmesi için 48 saat inkübatörde bekletildi. Radyoterapi uygulaması İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. C ve D grubundaki kültürler Cobalt 60 cihazı ile yaklaşık 80 cm mesafeden toplam 500 cGy ışın uygulandı (ŞEKİL V.B-1). Doz hızı 49.28 cGy/dk olarak belirlendi. Kültürler ışınlamadan hemen sonra inkübatöre alınarak 18 saat bekletildi.



ŞEKİL V.B-1 Hücre kültürlerine radyoterapi uygulanması. Uygulama İTF Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

V.C KÜLTÜRLERE HİPERBARİK OKSİJEN UYGULANMASI

HBO tedavisi için Silver Elektromekanik firmasında Test basıncı 15 bar ve çalışma basıncı 10 bar olarak dizayn edilen ve üretilen 2 L hacimli deney basınç odası kullanıldı (ŞEKİL V.C-1). Tedavi derinliği olan 2.4 ATA kalibrasyonu ise % 0.25 hassasiyetli mekanik basınç geyci ile yapılmıştır.

B ve D grubundaki kültür plaklarına radyoterapi uygulamasından 18 saat sonra başlamak üzere, 7 gün süresince, 2.4 ATA'da, günde 90 dakika HBO uygulandı. Diğer gruplara ait plaklar aynı süre boyunca inkübatör dışında bırakıldı. Basınç odası, kapağı kapatıldıktan sonra, 2 dakika süreyle % 100 oksijenle ventile edildikten sonra 5 dakika sürede tedavi basıncına getirildi ve çıkış süresi de 5 dakika olarak belirlendi.

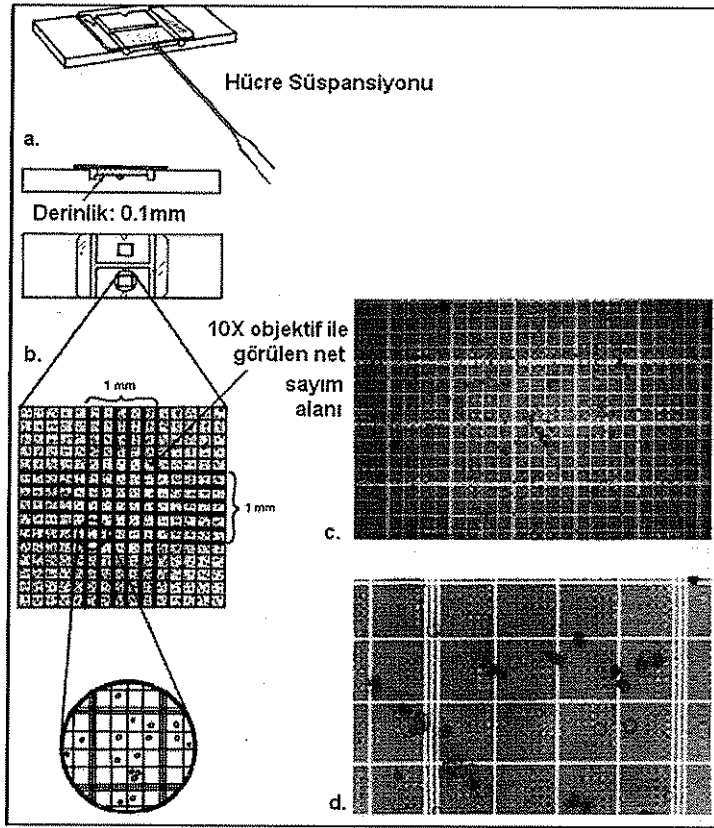


ŞEKİL V.C-1 Deney basınç odası

V.D CANLILIK ANALİZİ

Tüm gruplara HBO tedavisinin 1, 3 ve 7. günlerinde canlılık analizi yapıldı. Vitalite analizi için multiwell plak kuyucuğundaki DMEM solüsyonu aspire edildikten sonra 5 ml. % 0.25 (1:250) tripsin çözeltisi (Gibco) eklendi. On dakika süreyle 37 °C sıcaklıkta inkübasyonu takiben invert mikroskop altında incelenen hücrelerin tabandan ayrıldığı

gözlendi. Yüzeiden ayrılan hücreler steril pipet ile toplanarak santrifüj kabına alındı. Medyum içerisinde 5 dakika santrifüje edilen hücreler medyundan ayrıldıktan sonra 0.1 ml tripan mavisi solüsyonu (% 1) ile boyandı. Bu boya hücre zarı geçirgenliği nedeniyle cansız hücrelerin zarlarını geçebilirken canlı hücrelerin zarlarını geçemez. Hemositometre ile ışık mikroskobu altında birim hacimdeki hücrelerin sayımı yapıldığında (ŞEKİL V.D-1) boyanmayan hücreler bize solüsyondaki canlı hücre sayısını verecektir. Tripin mavisi ile koyu mavi boyanan hücreler ölü hücre olarak kabul edilmiştir.



ŞEKİL V.D-1 Hemositometrede hücre sayım tekniği

V.E PROLİFERASYON İNDEKSİ ANALİZİ

Hücre siklusunun S fazındaki yani DNA sentezi yapmakta olan hücreler Bromodeoksiuridin (BrdU) ile işaretlenerek saptanabilirler. Tüm gruplar için HBO

tedavisinin 1, 3 ve 7. günlerinde BrdU (Zymed, mouse monoclonal BrdU boyama kiti) işaretlemesi yapıldı. Proliferasyon indeksi analizi için hücrelerin bulunduğu her multiwell plak kuyucğuna 1 ml BrdU eklenerek 37 °C 'de 1 saat inkübatörde bekletildi. Daha sonra kuyucuk içerisindeki lam steril yöntemle çıkarıldı, % 70 etanol solüsyonuna alınarak fikse edildi ve -20 °C'de kurutuldu. İmmünohistokimyasal boyamada antikor olarak BrdU kullanıldı. Preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus CX21) değerlendirilerek sentez fazındaki hücrelerin BrdU ile işaretlenme oranları belirlendi. Parlak kırmızı boyanan hücreler DNA sentez safhasında kabul edildi.

VI. İSTATİSTİK

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS for Windows 14.0 programı kullanılmıştır. Deney grupları viabilite analizi sonuçları ve proliferatif indeksleri Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırılmış, deney grupları arası vitalite karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren deney grupları arası proliferatif indeks analizi için One way Anova ve Tukey testi kullanılmıştır. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

VII. BULGULAR

VII.A KONTROL GRUBU

A grubundaki vitalite değerlendirmesinde toplam hücre sayısında deney günleri süresince azalma gözlemlendi (TABLO VII.A-1). Toplam hücre sayısındaki azalma 1. ve 3. günler arasında ($p < 0.001$) ve 1. ve 7. günler arasında ($p < 0.001$) anlamlı farklılık oluşturdu. 3. ve 7. günler arasında toplam hücre sayısı bakımından anlamlı farklılık saptanmadı.

A grubunda 1. ve 3. günler arasında ölü hücre sayısında anlamlı fark tespit edilirken vitalite açısından anlamlı fark saptanmadı ($p = 0.287$). 1. ve 7. günler ($p < 0.001$) ve 3. ve 7. günler arasında ($p < 0.001$) ise vitalite oranında anlamlı farklılık gözlemlendi.

Proliferasyon indeksi analizlerinde analiz günleri arasında BrdU (+) hücrelerin oranında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p = 0.606$) (TABLO VII.A-2).

Analiz günü		Toplam hücre sayısı	ölü hücre sayısı	oran	vitalite
1.gün	Ortalama	63,125	3,750	0,0590	0,9410
	Minimum	40,000	1,000	,02	0,89
	Maksimum	102,000	5,000	0,11	0,98
	Aralık	62,000	4,000	0,08	0,08
	Standart Sapma	15,418	1,483	0,02284	0,02284
3.gün	Ortalama	40,937	2,062	0,0495	0,9505
	Minimum	26,000	1,000	0,02	0,91
	Maksimum	70,000	5,000	0,09	0,98
	Aralık	44,000	4,000	0,07	0,07
	Standart Sapma	11,468	1,236	0,02386	0,2386
7.gün	Ortalama	38,562	3,812	0,0994	0,9006
	Minimum	27,000	2,000	0,06	0,85
	Maksimum	50,000	6,000	0,15	0,94
	Aralık	23,000	4,000	0,09	0,09
	Standart Sapma	7,192	1,046	0,02279	0,2279
Toplam	Ortalama	47,541	3,208	0,0693	0,9307
	Minimum	26,000	1,000	0,02	0,85
	Maksimum	102,000	6,000	0,15	0,98
	Aralık	76,000	5,000	0,13	0,13
	Standart Sapma	16,103	1,486	0,03151	0,3151

TABLO VII.A-1 A grubu 1, 3 ve 7. günlerdeki vitalite analizi sonuçları.

Analiz günü		Toplam hücre	Brdü(+) hücre	Brdü (+)/ toplam hücre oranı
1. gün	Ortalama	60,344	2,724	0,0454
	Standart sapma	22,231	1,925	,03083
3. gün	Ortalama	27,862	1,344	0,0494
	Standart sapma	12,403	0,856	,03315
7. gün	Ortalama	39,034	1,896	0,0554
	Standart sapma	16,358	1,263	,04037

TABLO VII.A-2 A grubu 1, 3 ve 7. günlerde proliferasyon indeksi analizi sonuçları

VII.B HBO GRUBU

B grubundaki vitalite analizinde toplam hücre sayısında deney günleri süresince azalma gözlemlendi (TABLO VII.B-1). Toplam hücre sayısındaki azalma ve vitalite 1. ve 3. günler arasında anlamlı farklılık göstermedi ancak 1. ve 7. günler arasında toplam hücre ($p= 0.002$) ve vitalite ($p=0.024$) açısından anlamlı farklılık saptandı. 3. ve 7. günler arasında toplam hücre sayısı bakımından farklılık saptanmazken vitalitede anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0.004$).

Analiz günü		Toplam			
		hücre	ölü hücre	oran	vitalite
1.gün	Ortalama	54,812	3,312	0,0647	0,9353
	Minimum	28,000	0,00	0,00	0,82
	Maksimum	98,000	5,000	0,18	1,00
	Aralık	70,000	5,000	0,18	0,18
	Standart sapma	18,122	1,447	0,03946	0,03946
3.gün	Ortalama	42,625	2,250	0,0536	0,9464
	Minimum	19,000	0,00	0,00	0,90
	Maksimum	70,000	5,000	0,10	1,00
	Aralık	51,000	5,000	0,10	0,10
	Standart sapma	16,157	1,437	0,02759	0,02759
7.gün	Ortalama	34,562	3,437	0,1043	0,8957
	Minimum	20,000	1,000	0,04	0,76
	Maksimum	58,000	6,000	0,24	0,96
	Aralık	38,000	5,000	0,20	0,20
	Standart sapma	10,639	1,547	0,05636	0,05636
Total	Ortalama	44,000	3,000	0,0742	0,9258
	Minimum	19,000	0,00	0,00	0,76
	Maximum	98,000	6,000	0,24	1,00
	Aralık	79,000	6,000	0,24	0,24
	Standart sapma	17,176	1,543	0,04731	0,04731

TABLO VII.B-1 B grubu 1,3 ve 7. günlerdeki vitalite analizi sonuçları

Proliferasyon indeksi analizlerinde analiz günlerinde BrdU (+) hücrelerin oranında 1 ve 3. sayım günleri arasında anlamlı farklılık tespit edilirken ($p=0.003$) diğer günler arasında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı farklılık olmadığı görüldü (TABLO VII.B-2).

Analiz günü		Toplam hücre	BrdU (+) hücre	BrdU(+)/Toplam hücre oranı
1. gün	Ortalama	33,620	2,793	0,0825
	Standart. sapma	9,213	2,242	0,05953
3. gün	Ortalama	40,689	1,896	0,0397
	Standart sapma	15,727	1,397	0,02754
7. gün	Ortalama	62,724	3,241	0,0589
	Standart sapma	22,892	1,503	0,03645

TABLO VII.B-2 B grubu 1, 3 ve 7. günlerde proliferasyon indeksi analizi sonuçları

VII.C RADYOTERAPİ GRUBU

Radyoterapi uygulanan hücre kültürü grubunda vitalite analizinde toplam hücre sayısının 7. günde azalma gösterdiği gözlemlendi (TABLO VII.C-1).

Vitalite analizinde 1. ve 3. günler arasında anlamlı farklılık bulunmazken; 1. ve 7. günler arasında ($p=0.14$) ve 3. ve 7. günler arasında ($p=0.10$) toplam hücre sayısı bakımından anlamlı farklılık tespit edildi. Grup içinde tüm analiz günlerinde vitalite oranlarında anlamlı farklılık tespit edilmedi.

Proliferasyon indeksi analizinde C grubunda analiz günleri arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (TABLO VII.C-2).

Analiz günü		Toplam			
		hücre	ölü hücre	oran	vitalite
1.gün	Ortalama	36,875	6,312	0,2017	0,7983
	Minimum	18,000	4,000	0,05	0,61
	Maksimum	73,000	9,000	0,39	0,95
	Aralık	55,000	5,000	0,33	0,33
	Standart sapma	15,836	1,579	0,09216	0,09216
3.gün	Ortalama	34,250	6,562	0,2056	0,7944
	Minimum	8,000	1,000	0,11	0,70
	Maksimum	70,000	9,000	0,30	0,89
	Aralık	62,000	8,000	0,19	0,19
	Standart sapma	15,788	2,159	0,06628	0,06628
7.gün	Ortalama	23,750	5,062	0,2107	0,7893
	Minimum	18,000	1,000	0,05	0,68
	Maksimum	38,000	10,000	0,32	0,95
	Aralık	20,000	9,000	0,27	0,27
	Standart sapma	5,927	2,351	0,07368	0,07368
Total	Ortalama	31,625	5,979	0,2060	0,7940
	Minimum	8,000	1,000	0,05	0,61
	Maksimum	73,000	10,000	0,39	0,95
	Aralık	65,000	9,000	0,34	0,34
	Standart sapma	14,270	2,118	0,07655	0,07655

TABLO VII.C-1 C grubu 1, 3 ve 7. gün vitalite analizi sonuçları

Analiz günü		Toplam hücre	Brdu(+)	Brdu(+)/toplam
			hücre	hücre oranı
1. gün	Ortalama	23,655	345	0,0020
	Standart sapma	8,134	1857	0,01092
3. gün	Ortalama	36,000	1379	0,0029
	Standart sapma	15,95977	3509	0,00777
7. gün	Ortalama	24,517	2069	0,0068
	Standart sapma	8,117	4122	0,01391

TABLO VII.C-2 Radyoterapi grubu 1, 3 ve 7. günlerde proliferasyon indeksi analizi sonuçları

VII.D RADYOTERAPİ + HBO GRUBU

D grubunun vitalite analizinde analiz günleri arasında toplam hücre sayısı ve vitalite oranı açısından belirgin bir değişiklik saptanmadı (TABLO VII.D-1).

Radyoterapi + HBO uygulanan grupta proliferasyon indeksinde 1. ve 3. günler ve 1. ve 7. günler arasında ileri düzeyde anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0.001$) (TABLO VII.D-2).

Analiz günü		Toplam			
		hücre	ölü hücre	oran	vitalite
1.gün	Ortalama	44,937	6,812	0,1556	0,8444
	Minimum	17,000	2,000	0,11	0,75
	Maksimum	75,000	12,000	0,25	0,89
	Aralık	58,000	10,000	0,14	0,14
	Standart sapma	17,387	2,400	0,03541	0,03541
3.gün	Ortalama	33,812	3,625	0,1138	0,8862
	Minimum	20,000	1,000	0,03	0,78
	Maksimum	55,000	6,000	0,22	0,97
	Aralık	35,000	5,000	0,20	0,20
	Standart. sapma	10,264	1,500	0,05535	0,05535
7.gün	Ortalama	34,312	4,750	0,1344	0,8656
	Minimum	22,000	0,00	0,00	0,77
	Maksimum	50,000	9,000	0,23	1,00
	Aralık	28,000	9,000	0,23	0,23
	Standart sapma	8,300	2,594	0,06444	0,06444
Total	Ortalama	37,6875	5,062	0,1346	0,8654
	Minimum	17,000	0,00	0,00	0,75
	Maksimum	75,000	12,000	0,25	1,00
	Aralık	58,000	12,000	0,25	0,25
	Standart sapma	13,378	2,546	0,05478	0,05478

TABLO VII.D-1 D grubu 1, 3 ve 7. gün vitalite analizi sonuçları

Analiz günü	Toplam hücre	Brdu (+)	
		hücre	Brdu(+)/toplam hücre oranı
1. gün	Ortalama	22,413	0,0690
	Standart sapma	6,173	,25788
3. gün	Ortalama	43,103	0,9655
	Standart sapma	15,140	0,944
7. gün	Ortalama	31,793	1,172
	Standart. sapma	10,942	1,104

TABLO VII.D-2 D grubu 1, 3 ve 7. gün proliferasyon indeksi analizi sonuçları

VİLE GRAFİK VE ANALİZLER

HBO tedavisinin 1. günü sonunda yapılan vitalite analizinde toplam hücre sayısı ve vitalite oranı bakımından A ve B grupları arasında anlamlı fark saptanamazken A ve C grupları arasında her iki parametrede de ileri derecede anlamlı farklılık tespit edildi (Toplam hücre: $p < 0.001$, vitalite: $p < 0.001$). Benzer şekilde A ve D grupları arasında da her iki parametrede ileri derecede anlamlı farklılık belirlendi (Toplam hücre: $p = 0.008$, vitalite: $p < 0.001$).

1. gün yapılan vitalite analizinde B ve C grupları arasında toplam hücre sayısı ve vitalite oranı parametrelerinde ileri düzeyde anlamlılık tespit edildi (Toplam hücre: $p = 0.005$, vitalite: $p < 0.001$). B ve D grupları arasında toplam hücre sayısı bakımından anlamlı fark bulunmazken vitalite parametresinde ileri düzeyde anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0.001$).

1. gün yapılan vitalite analizinde C ve D grupları arasında toplam hücre sayısı ve vitalite açısından anlamlı farklılık tespit edilemedi.

HBO tedavisinin 3. günü yapılan vitalite analizinde A ve B grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. A grubu ile C grubu ve A grubu ile D grubu karşılaştırıldığında toplam hücre sayısı arasında anlamlı fark bulunmazken vitalite açısından her iki grupla arasında ileri düzeyde anlamlılık tespit edildi ($p < 0.001$). B grubu ile C grubu ve B grubu ile D grubu karşılaştırmasında da aynı farklılık tespit edildi.

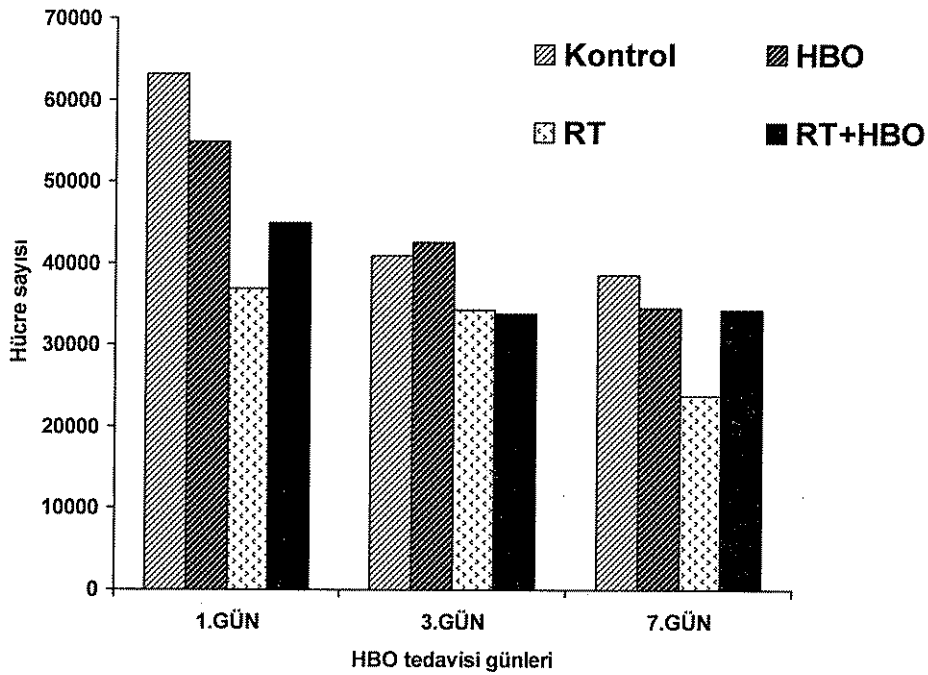
3. gün yapılan vitalite analizinde C ve D grubu karşılaştırıldığında toplam hücre sayısı bakımından fark bulunmazken vitalitenin D grubunda anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.001$).

HBO tedavisinin 7. gününde yapılan vitalite analizinde A ve B grupları arasında toplam hücre sayısı ve vitalite oranı parameterleri açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi. A ve C grubu karşılaştırıldığında her iki parametrede de ileri derecede anlamlı farklılık tespit edildi (

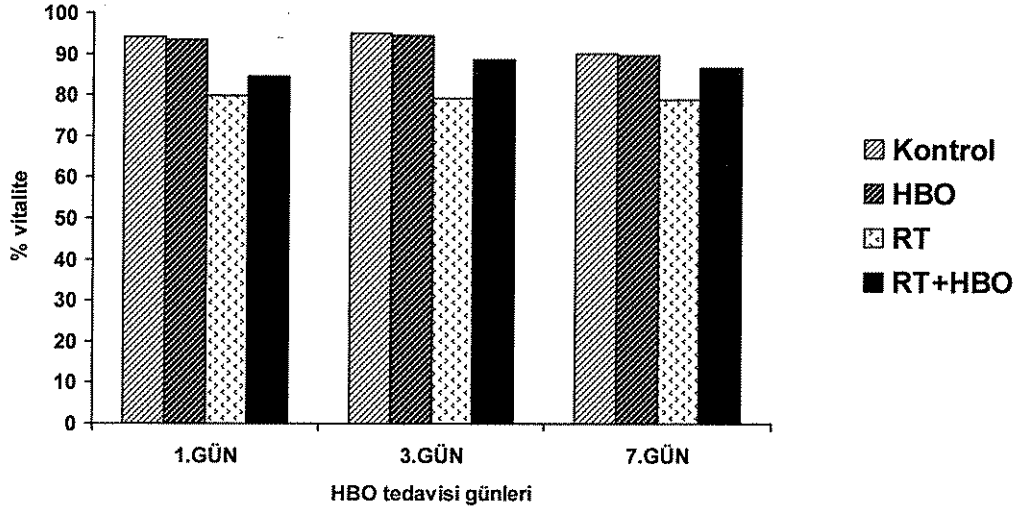
Toplam hücre: $p < 0,001$, vitalite: $p < 0,001$). A ve D grupları arasında toplam hücre sayısı ve vitalite parametreleri açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi.

7. gün vitalite analizinde B ve C grubu arasında toplam hücre sayısı ve vitalite açısından ileri düzeyde anlamlılık tespit edilirken (Toplam hücre: $p = 0.001$, vitalite: $p < 0.001$) B ve D gruplarının karşılaştırmasında bu iki parametre açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi.

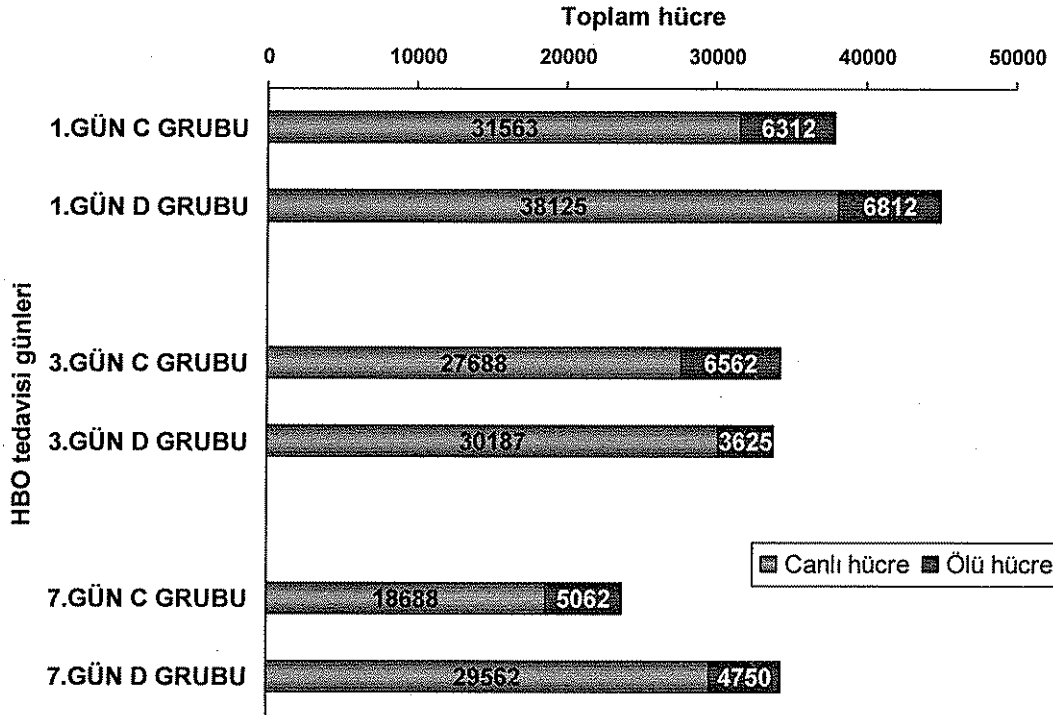
HBO tedavisinin 7. gününde yapılan vitalite analizinde C ve D grupları arasında toplam hücre sayısı ve vitalitede ileri derecede anlamlı farklılık tespit edildi (Toplam hücre: $p < 0.001$, vitalite: $p = 0.004$).



ŞEKİL VII.E-1 Toplam hücre sayısının HBO tedavisi günlerine göre grafik dağılımı

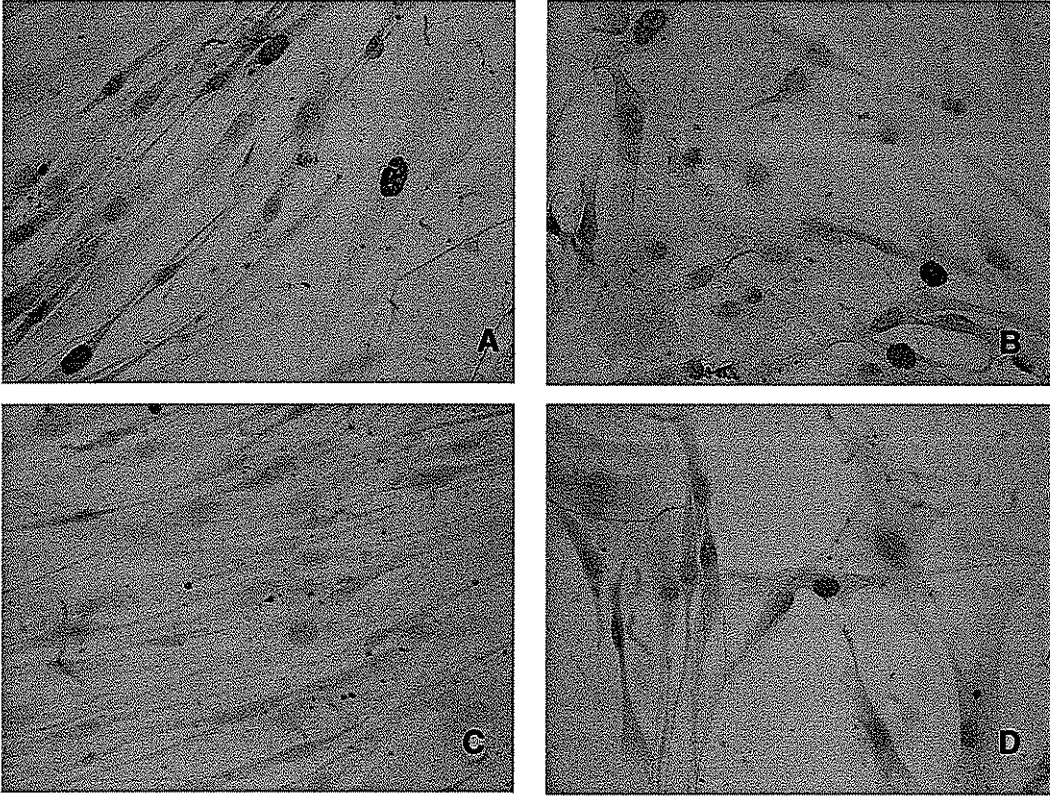


ŞEKİL VII.E-2 Vitalite oranının HBO tedavisi günlerine göre grafik dağılımı.



ŞEKİL VII.E-3 C ve D grupları toplam hücre sayısı ve vitalite özelliklerinin HBO tedavisi günlerine göre karşılaştırması. Toplam hücre sayısının radyoterapi grubunda daha çok azaldığı ve vitalitenin, radyoterapi sonrası HBO uygulanan grupla karşılaştırıldığında, daha düşük olduğu dikkat çekmektedir.

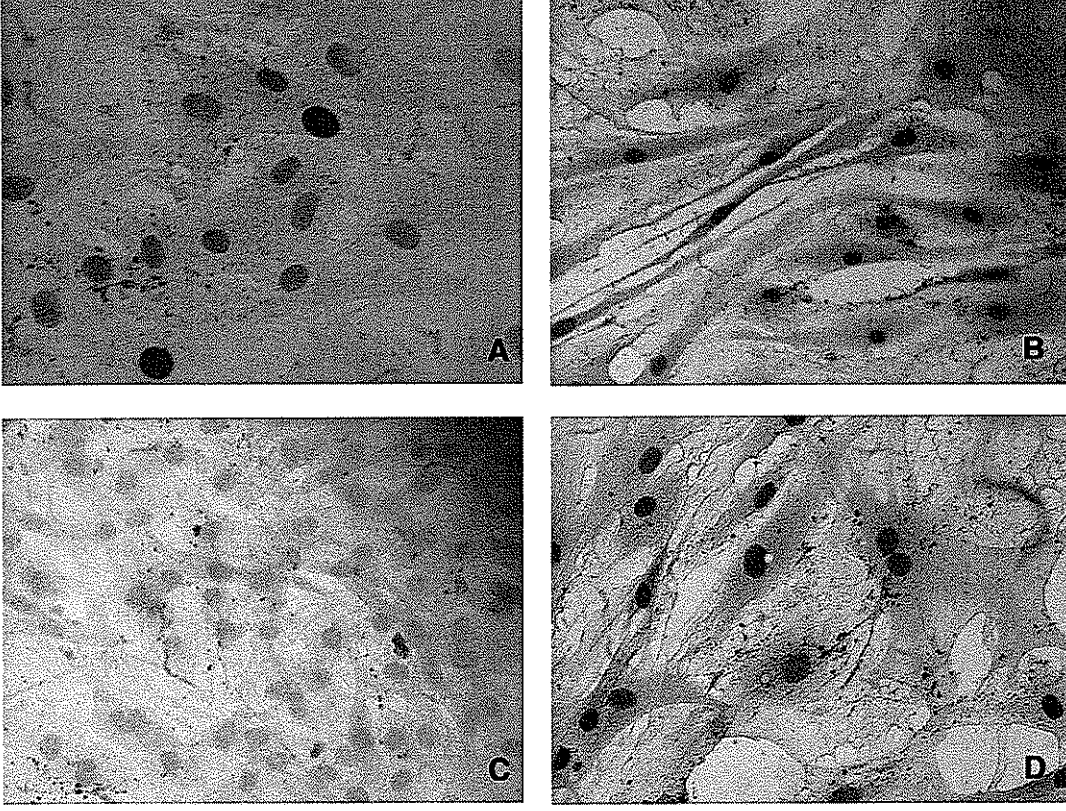
HBO tedavisinin 1. gününde yapılan proliferasyon indeksi analizinde (ŞEKİL VII.E-4) BrdU (+) boyanan hücrelerin toplam hücre sayısına oranı A ve B grupları arasında karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0.001$). A grubu C ve D grupları ile karşılaştırıldığında bu parametrede ileri derecede anlamlılık tespit edildi ($p<0.001$). B grubu ile C ve D grupları karşılaştırıldığında yine ileri düzeyde anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0.001$). HBO tedavisinin 1. gününde C ve D grupları arasında proliferasyon indeksi açısından anlamlı farklılık tespit edilmedi.



ŞEKİL VII.E-4 HBO tedavisinin 1. gününde deney gruplarında BrdU uygulanan hücrelerin görünümü. Fotoğrafların sağ alt köşesinde grup harfi belirtilmiştir.

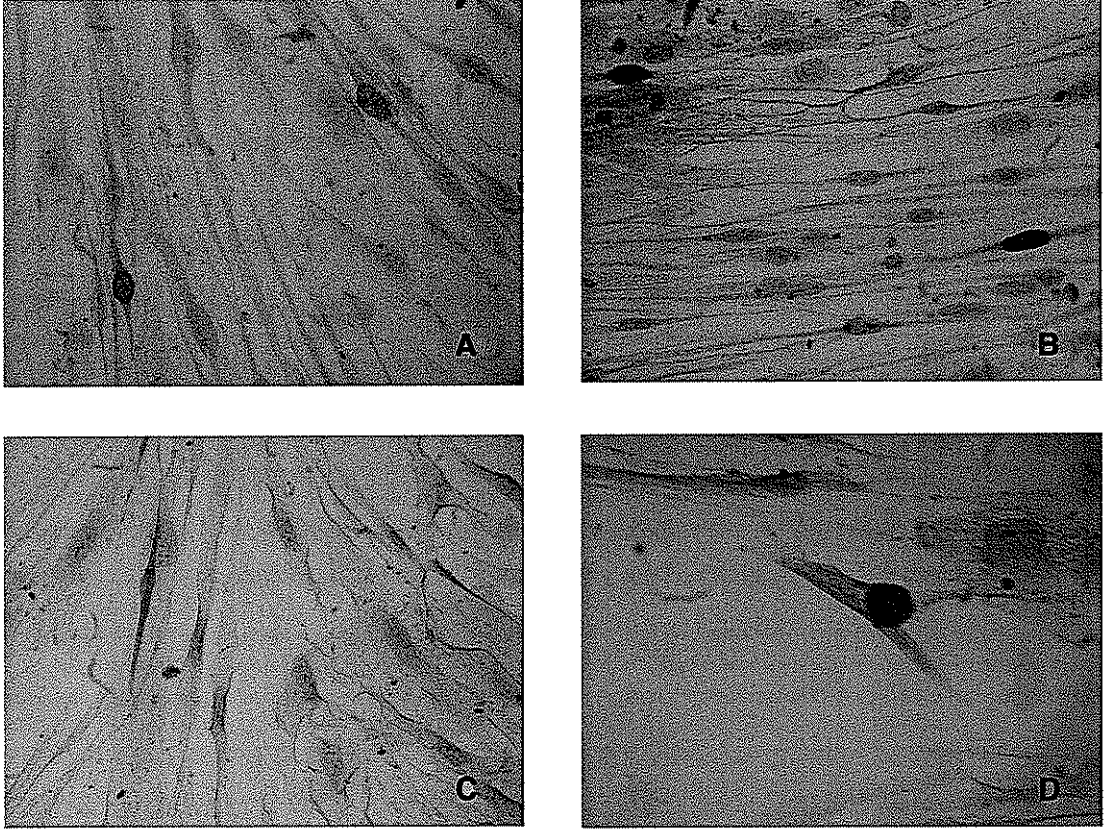
HBO tedavisinin 3. gününde yapılan proliferasyon indeksi analizinde (ŞEKİL VII.E-5) BrdU (+) boyanan hücrelerin toplam hücre sayısına oranı A ve B gruplarında arasında, A ve D grupları arasında ve B ve D grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi. Fakat A ve

B grupları C grubu ile karşılaştırıldığında ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) ve D grubu C grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0.03$).

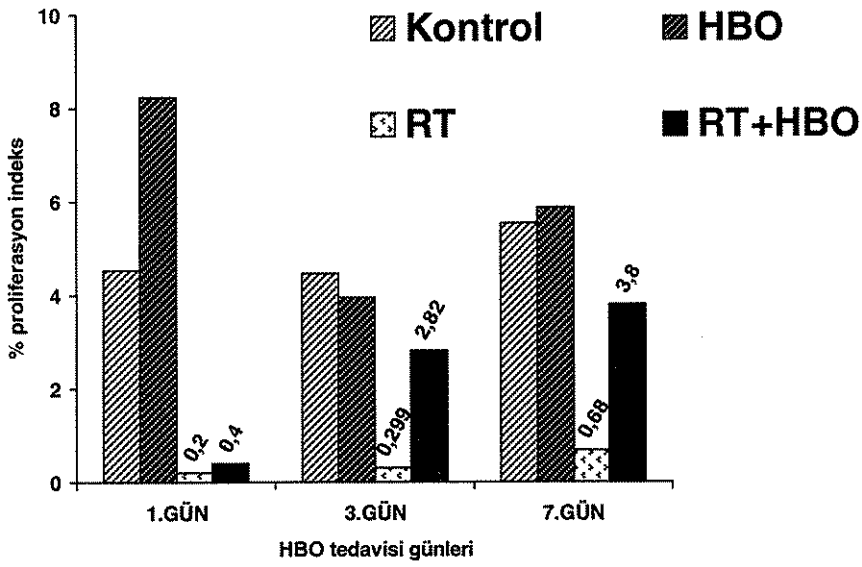


ŞEKİL VII.E-5 HBO tedavisinin 3. gününde deney gruplarında BrdU uygulanan hücrelerin görünümü. Fotoğrafların sağ alt köşesinde grup harfi belirtilmiştir.

HBO tedavisinin 7. gününde yapılan proliferasyon indeksi analizinde (ŞEKİL VII.E-6) BrdU (+) boyanan hücrelerin toplam hücre sayısına oranı A, B ve D grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi. Grupların tamamında C grubu ile yapılan karşılaştırmalarda proliferasyon indeksi bakımından ileri derecede anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0.01$).



ŞEKİL VII.E-6 HBO tedavisinin 7. gününde deney gruplarında BrdU uygulanan hücrelerin görünümü. Fotoğrafların sağ alt köşesinde grup harfi belirtilmiştir.



ŞEKİL VII.E-7 Proliferasyon indeksinin HBO günlerine göre grafik gösterimi .

VIII. TARTIŞMA VE SONUÇ

Radyoterapi günümüzde kanser tedavisinin vazgeçilmez unsurlarından biri olma özelliğini korumaktadır. Radyoterapinin kanserli hücrelerle beraber komşu dokulardaki sağlıklı hücreleri de etkilemesi kliniğe yan etkiler olarak yansır. Bu yan etkilerin tedavisinde farklı tedavi modaliteleri denenmektedir ve HBO tedavisi de bu yaklaşımlardan biridir. HBO tedavisinin klinik kullanımıyla ilgili UHMS tarafından belirlenen alanlar oldukça geniş olsa da HBO tedavisinin radyoterapi uygulanmış dokulardaki etkisi hücresel düzeyde değerlendirilmemiştir. Bu özelliğinden dolayı bu çalışma özgün değere sahiptir.

Constable ve arkadaşları çalışmalarında (57) tenon fibroblast kültürlerine tek doz 0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 20 Gy radyasyon uygulayarak hücre vitalitesindeki ve proliferasyon indeksindeki farklılıkları 0, 3, 7, 14 ve 28. günlerde incelemişlerdir. Bu çalışmada 2.5 Gy üzerinde radyasyon dozu uygulanan tüm gruplarda proliferasyon indeksinin anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Değerlendirme günlerinde, bölünebilen hücre sayısının anlamlı düzeyde azalmasına rağmen, vitalite oranının anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde radyoterapi uygulanmış grupta radyoterapi sonrası proliferasyon indeksinin kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı ve vitalite oranının ilerleyen günler içerisinde değişiklik göstermediği tespit edilmiştir.

Oksijenin hücresel düzeydeki etkilerini değerlendiren çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Farklı düzeydeki oksidatif streslerin fibroblast fenotipi üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere yapılan bir çalışmada fibroblast kültür plakları 2 hafta süreyle % 4 ve % 20 oksijen içeren inkübatörlerde bekletilmiştir (58). Hücre morfolojisi, kolonizasyonlarına göre 3 gruba ayrılarak (1- yüksek proliferasyon fenotipi gösteren hücreler 2- Orta düzeyde proliferasyon fenotipi gösteren kültür hücreleri 3- Çok düşük proliferasyon fenotipi gösteren kültür hücreleri) değerlendirme yapılmıştır. Çalışma sonuçları % 4 oksijen düzeyine sahip inkübatördeki hücrelerin diğer gruba göre daha yüksek proliferatif fenotip özelliğine sahip olduğunu göstermiştir. Fenotipteki farklılığa rağmen plaktaki canlı hücre sayısı bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bu çalışmada artan oksijen oranının fibroblast kültürleri üzerinde yarattığı oksidatif stresin fibroblast morfolojisindeki bu farklılığa sebep olduğu öne sürülmüştür. Çalışmamızda ise morfolojik inceleme yapılmamıştır ancak radyoterapi uygulanmamış hücre gruplarından daha yüksek oksijen oranına maruz kalan B grubu ile deney süresince normal atmosferik oksijene maruz kalmış A grubu karşılaştırıldığında; yüksek oksijene maruz kalan grubun proliferasyon indeksinde belirgin azalma izlenmiş, gruplar arasında vitalite açısından anlamlı farklılık tespit

edilmemiştir. Yüksek oksijene maruz kalan grubun proliferasyon indeksindeki azalma Alaluf ve arkadaşlarının çalışmasında (58) bahsedildiği gibi artan oksidatif strese bağlı olabilir.

Uyar ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada (59) benzer şekilde L-strain fibroblast kültürleri farklı parsiyel oksijen basıncı düzeylerinde hücre sayımı, vitalite ve proliferatif indeks parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada hücrelerin 47.8 ± 4.33 mmHg parsiyel oksijen basıncına maruz bırakılmasının normoksik gruba kıyasla (161 ± 3.05 mmHg) proliferasyon hızını azalttığı ve apoptoza yol açtığı; 73.6 ± 11.5 mmHg parsiyel oksijen basınca maruz bırakılmasının ise normoksik grupla karşılaştırıldığında proliferasyon hızını artırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları belirli düzeydeki hipoksisinin fibroblast proliferasyonunu artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda hipoksiye maruz bırakılan bir deney grubu olmamasına rağmen radyoterapi uygulanmamış fibroblast gruplarından rölatif olarak hipoksik olan A grubunda 1. gün proliferasyon indeksinin yüksek olması bu çalışmayla benzer bir özellik göstermektedir.

Normal mitotik hücrelerin bölünmesinin kültür ortamında geri dönüşümsüz olarak durması kavramı olarak nitelendirilen 'replikatif yaşlanma' nın incelendiği bir çalışma Poulos ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (60). Bu çalışmada fibroblastların normoksik ve hipoksik koşullarda proliferatif kapasiteleri, viabiliteyi, oksidatif koşulları ve protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır; % 1.5 ve % 3 oksijen konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin replikatif yaşlanma sürecine % 20 oksijen konsantrasyonuna maruz kalan hücrelere göre daha geç girdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, diğer çalışmalar ve çalışmamızın sonuçlarıyla benzer olarak, hücre viabilitesinde bir farklılık tespit edilememiştir. Replikatif yaşlanma sürecinin yüksek oksijen konsantrasyonunda inkübe edilen gruplarda daha erken görülmesinin sebebi oksidatif strese bağlı olabilir.

Parsiyel oksijen basıncının fibroblast fizyolojisi üzerindeki etkilerini inceleyen bir başka çalışma oksidatif stresin hücre siklusunun hangi aşamalarında etki gösterdiğini incelemiştir (61). Sitospektrofotometrik yöntemle yapılan değerlendirmede yüksek parsiyel oksijen basınçlarına maruz bırakılan hücrelerde G_2 (erken profaz) fazında en yüksek olmak üzere; G_2 , G_0 fazlarının ve DNA'da timidin tutulumunun gerçekleştiği safhaların oksidatif strese daha yüksek duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Mitotik hücrelerin radyoterapi hassasiyetinin en yüksek olduğu mitotik faz G_2 -M fazıdır. Bu çalışmaya göre oksidatif stres ve radyoterapi etkilerinin en yüksek olduğu mitotik fazlar örtüşmektedir. Bu sonuca göre çalışmamızda radyoterapi+HBO uygulanan yani oksidatif stres ve radyoterapi etkilerine aynı anda maruz kalan D grubunda proliferatif indeksin sadece radyoterapi uygulanmış C grubuna göre düşük olması beklenirdi. Ancak alınan sonuçlar D grubunda proliferasyon indeksinin HBO

tedavisinin 3. ve 7. gününde C grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sebeple çalışmamızın bulguları Balin ve arkadaşlarının çalışması (61) ile örtüşmemektedir.

Balin A. Ve Pratt L. Tarafından yapılan bir çalışmada % 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75 ve 95'lik oksijen düzeylerinde ve farklı hücre yoğunluklarında ekilmiş hücre kültürleri hücre sayısı ve vitalite açısından değerlendirilmiştir (62). Yüksek oksijen seviyesinde inkübe edilen tüm hücre kültürlerinde hücre büyümesinin yavaşladığı gösterilmiştir. Balin ve arkadaşlarının yaptığı iki çalışmada (61, 62) hücre kültürleri inkübasyon ortamında 24 saat aralıksız olarak hiperoksiye maruz bırakılırken çalışmamızda hiperoksi sürelerinin günde 90 dakika ile sınırlandırılarak; rölatif hipoksi dönemleri bırakılması bu farklı sonucun sebebi olabilir. Çalışmamızda aralıklı hiperoksi uygulanmış D grubu fibroblastlarında hücre çoğalmasında hızlanma gözlenmiştir.

Oksijen maruziyetinin süresi fibroblast vitalitesini ve proliferasyon indeksini etkileyebilir. Optimal tedavi edici etkiyi elde etmek için gereken hiperoksi düzeyiyle ilgili fazla veri bulunmamaktadır. Fibroblast kültürlerinin aralıklı hiperoksiye maruz bırakıldığı farklı çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada 2.4 ATA'lık basıncın tercih edilmesinin sebebi klinik pratikte sık olarak kullanılan bu basınç düzeyinde, radyoterapi uygulanmış hücrelere HBO tedavisinin etkilerinin hücresel düzeyde ölçülebilmesidir.

Farklı basınçlarda ve tedavi sürelerinde fibroblast proliferasyon hızı, apoptotik hız, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve klonal büyüme etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada fibroblast kültürlerine 1 ve 2.5 ATA'lık basınçlarda farklı seans sürelerinde HBO uygulanmıştır (63).. 15, 30, 60 veya 120 dakika HBO uygulanan kültürlerde, 1 ATA 'da tüm tedavi sürelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyon hızının ve klonal büyüme etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. 2.5 ATA'da 15 dakikalık tedavinin etkisiz olduğu, 30 ve 60 dakikalık tedavilerin proliferasyon hızının ve klonal büyüme etkinliğinin arttığı; 120 dakikalık tedavinin ise parametreleri anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. 120 dakikalık tedavi süresinde apoptoz oranının da arttığı izlenmiştir. Bizim çalışmamızda da 90 dakikalık HBO süresinin radyoterapi uygulanmış fibroblastlarda proliferasyonu artırdığı gözlenmiştir.

Piepmeyer HBO ve hızlı dekompresyonun fibroblast kültürlerine etkilerini incelediği çalışmasında tek seans HBO veya HBO ile beraber hızlı dekompresyon uyguladığı kültürleri 1 ve 3. günlerde kontrol grubu ile karşılaştırmıştır (64). Kuyucuk zeminindeki total hücre proteini, hücre yoğunluğu ve proliferatif indeks değerlendirmesinde total proteinin hızlı dekompresyon ile arttığı fakat HBO'dan etkilenmediği, proliferatif indeksin HBO ile artış gösterdiği ancak hızlı dekompresyon ile azaldığı ve hücre sayısının hızlı dekompresyon ve

HBO gruplarında kontrole göre daha yüksek olduğu sonuçları elde edilmiştir (64). Bu çalışmada proliferasyon indeksinin 1.günde HBO tedavisi ile artış göstermesi çalışmamız sonuçları ile paralellik göstermektedir ancak bizim çalışmamızda 3. günde proliferasyon indeksinde kontrol grubu ile anlamlı farklılık izlenmemiştir.

Hehenberger ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (65) diyabetik hasta dokusundan üretilen fibroblastların ve sağlıklı dokudan üretilen fibroblastların farklı basınç düzeylerinde hiperbarik oksijene yanıtları değerlendirilmiştir. 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 ATA'da tek seans hiperbarik oksijen tedavisi uygulanan hücelere ek olarak bir gruba 2.5 ATA basınç altında hava uygulanarak basıncın direkt etkisi de değerlendirmeye alınmıştır. Tedavi öncesi diyabetik hastadan hazırlanan kültürdeki hücre sayısı normal fibroblastlara göre anlamlı düzeyde düşük bulunurken hiperbarik oksijenin uygulamasının dozla orantılı olarak her iki fibroblast grubunda toplam hücre sayısını, normobarik ve hiperbarik hava uygulanmış hücelere göre anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Diyabetik hastadan hazırlanan fibroblast kültüründeki hücre sayısının 2 ATA'da uygulanan tek doz HBO tedavisinden sonra kontrol grubundaki hücre sayısına ulaştığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda tek doz HBO sonrası vitalite ve toplam hücre sayısında farklılık izlenmemiş ancak ilerleyen günlerde radyoterapi+HBO grubunda vitalitenin radyoterapi sonrası HBO uygulanmayan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir.

Hiperbarik oksijenin dermal cilt eşdeğerleri, fibroblastlar, melanositler ve keratinositler üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada (66) deney gruplarına 1, 2, 2.5 ve 3 ATA basınç değerlerinin her birinde, ardışık olarak 10 gün süre ile HBO uygulanmıştır. Böylece hücrelerin farklı basınç değerlerindeki HBO'ya yanıtları değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada total fibroblast sayısındaki artışın, 3 ATA hariç tüm tedavi basınçlarında, 5. HBO tedavisi gününden itibaren anlamlı düzeye ulaştığı ve giderek artarak 10. günde pik yaptığı gözlenmiştir. 3 ATA'lık tedavi basıncında ise tedavi günlerinin hiçbirinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Benzer sonuca keratinosit sayısında da ulaşılmıştır. Ancak Hollander ve arkadaşlarının HBO'nun keratinosit kültürlerine etkisini değerlendirdiği çalışmalarında (67) HBO grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücre proliferasyonu ve viabilite açısından farklılık izlenmemiştir. Bu çalışmada ilginç olarak keratinosit diferansiyasyon hızının HBO tedavisi ile arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda HBO'nun sadece fibroblast kültürleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir ve 2.4 ATA ile yapılan HBO uygulamasında radyoterapi uygulanmamış gruplarda total hücre sayısında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Kısa süre uygulanan HBO tedavisinin etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda HBO tedavisi ile fibroblast proliferasyonunda artış elde edildiği gösterilse de fibroblast

aktivasyonu için daha uzun tedavi süreleri gerekebilir. Bu çalışmanın radyoterapi uygulanmamış gruplarından elde edilen sonuçlarının Dimitrijeviç ve arkadaşlarının çalışmasından (66) farklı olmasının sebebi HBO tedavisinin 7 gün süre ile uygulanmasına bağlı olabilir.

Benzer bulgulara Kang ve arkadaşlarının çalışmasında da ulaşılmıştır (68). Çalışmada fibroblast kültürleri 1, 1.5, 2, 2.5, ve 3 ATA basınç değerlerinin her birinde ardışık 7'şer gün süre ile HBO tedavisine alınarak hücre proliferasyon indeksi; fibroblast growth faktör, vasküler endotelial growth faktör ve transforming growth faktör $\beta 1$ düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışmada 1. gün yapılan değerlendirmede kontrol grubu hücrelerinin deney süresince lineer bir çoğalma grafiği çizdiği ve HBO uygulanan gruplarda hücre sayılarının, özellikle 2 ve 2.5 ATA'da düştüğü gözlenmiştir. 3. gün değerlendirmesinde Hücre sayısı 3 ATA basınç uygulanan grupta azalmaya devam ederken diğer gruplarda kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. 7. günde ise 2 ATA basınç uygulanan grupta hücre sayısındaki artış devam ederken diğer gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu bulgular HBO tedavisine gecikmiş bir adaptasyon olabileceğini düşündürmektedir ve çalışmamızda radyoterapi uygulanmamış gruplarda HBO'nun deney süresince toplam hücre sayısında anlamlı fark yaratmamış olmasını açıklayabilir.

Fibroblastlar hızla bölünebilen hücrelerdir. Fibroblast kültürü protokollerine göre pasajlanan hücrelerin takip eden günlerde, 24-72 saat içerisinde toplam hücre sayısı 2 katına çıkacak şekilde çoğalarak yaklaşık 7. günde kararlı safhaya geçmeleri beklenmektedir. Bu çalışmada deney protokolünden önce yapılan son pasaj sonrası 50000 hücre/ml yoğunluğunda ekilen ve 48 saat inkübe edilen hücrelerin HBO tedavisinin 1. gününde yapılan değerlendirmesinde radyoterapi uygulanmamış grupların her birindeki toplam hücre sayısının 70000 hücre/ml olduğu gözlenmiştir. Diğer deney günlerinde de bu gruplarda toplam hücre sayısı ve vitalite açısından anlamlı farklılık izlenmediği gibi her iki gruptaki hücre sayısı deney günleri süresince azalmıştır. Çalışmadaki bu sonuçlar hücre kültürlerinin, alındığı dokuya ait proliferatif kapasitesine veya hücrelerin HBO tedavisi süresi boyunca inkübatör ortamından ayrılmış olmasına bağlı olabilir.

Fibroblast kültürleri farklı fiziksel etkilerin hücresel düzeyde değerlendirilmesi için uygun deneysel ortamlar yaratsa da in vivo mekanizmayı tam olarak açıklayamaz. Örneğin HBO tedavisinin vasküler endotelial growth faktör düzeyine etkisinin değerlendirildiği bir

hayvan deneyi modelinde, HBO tedavisi uygulanan grupta 5. gün yara growth faktör düzeyinin kontrol grubundan % 42 daha fazla olduğu belirlenmiştir (69). Kang ve arkadaşlarının çalışmasında (68) ise HBO uygulamasının in fibroblast kültürlerinde 1.günde growth faktör düzeyini artırırken takip eden günlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık yaratmadığı gösterilmiştir. İrradiye fibroblast kültürlerinde growth faktör düzeylerinin incelendiği bir çalışmada radyoterapi uygulaması sonrası 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde ölçülen fibroblast growth faktör ve transforming growth faktör beta düzeylerinin irradiye hücre kültürlerinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir (70). Bu çalışmaların sonuçları HBO'nun in vivo olarak değerlendirildiğinde farklı etki mekanizmalarına sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Radyasyon uygulanan dokular, vasküler ve hücresel yapının ilerleyici kaybı nedeniyle hipoksik dokulardır. İyileşme sürecinde oksijenin anjiogenez, hücre proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks üretimi açısından terapötik bir rolü vardır. Marx ve arkadaşlarının çalışmasında HBO tarafından uyarılan anjiogenezin 8 HBO seansından sonra ölçülebilir düzeye geldiği ve doku vaskülaritesinin 20 seans sonunda radyasyon uygulanmamış dokunun % 80-85'i düzeyine ulaştığı gözlenmiştir (71). Proliferasyon süreciyle ilgili benzer bir sonuç çalışmamızda da elde edilmiş ve radyoterapi ile beraber HBO uygulanan grupta sadece radyoterapi uygulanmış gruba göre daha belirgin bir çoğalma kapasitesi olduğu gözlenmiştir.

Radyasyon hasarı tedavisinde HBO tedavisinin etkilerinin değerlendirildiği klinik çalışmaların tarandığı bir yayında (72) geç radyasyon hasarı tedavisinde HBO tedavisinin kullanıldığı 6 kontrollü çalışma HBO kullanılmayan klinik çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Sonuçlar baş-boyun, anüs ve rektumda geç radyasyon sekeli izlenen hastaların tedavisine HBO eklenmesinin sonuçları anlamlı düzeyde iyileştirdiğini ve HBO tedavisinin irradiye bölgede diş çekimi gibi cerrahi müdahaleler sonrası osteoradyonekroz gelişimi riskini azalttığını göstermiştir.

Çalışmamızda temel olarak HBO tedavisinin akut radyasyon hasarı sonrası fibroblastlarda oluşan değişikliklere etkisi karşılaştırılmıştır. Radyoterapi hasarında vasküler yıkım ve doku hücre içeriğinin ilerleyici kaybı söz konusu olduğu için uzun dönem etkileri değerlendirmek amacı ile farklı deneysel modeller kullanılmalıdır. Ancak erken dönemde gözlenen değişiklikler de ilerleyici hücre kaybının azaltılabileceğini düşündürmektedir. Radyasyonun etkisini, temel olarak, güçlü serbest radikaller aracılığıyla gösterdiği düşünüldüğünde erken dönemde hiperoksinin serbest oksijen radikali yükünü artıracığı beklenebilir. Ancak organizmanın oksidatif strese antioksidan mekanizmaları aracılığıyla

gösterdiği bir adaptasyon mekanizması mevcuttur. HBO tedavisinin serbest radikal oluşumundaki etkilerini değerlendiren bazı çalışmalarda bu sonuca ulaşılmıştır (73, 74). Demmog ve arkadaşları HBO sonrası DNA hasarının ilk 24 saatte gözlemlendiğini fakat sonrasında tespit edilmediğini bildirmiştir (75). Akut radyasyon hasarının tedavisinde HBO kullanımı ile ilgili olgu sunumlarında da HBO tedavisinin olumlu etkileri bildirilmiştir (76, 77).

Sonuç olarak bu deneysel çalışmadan elde edilen veriler HBO tedavisinin radyoterapiden etkilenen fibroblastlar üzerinde canlı hücre oranı ve hücre çoğalma kapasitesi yönlerinden olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Hipoksik, hiposellüler, hipovasküler yapıyla karakterize radyonekrotik dokuda canlı ve proliferasyon yeteneğine sahip fibroblastların artmasının kliniğe katkısı olması bekleneceğinden bu bilgiler, daha önce radyonekroz tedavisinde HBO tedavisinin kullanımının yararlarını bildiren klinik çalışmaları desteklemektedir. Çalışmamızın verileri ayrıca fibroblastların hiperoksik sürece zaman içerisinde adaptasyon gösterdiğini düşündürmüştür. Bu nedenle daha fazla HBO seans sayısını, farklı seans süreleri ve farklı HBO basınç düzeylerini içeren deneysel çalışmalarla bu bilgiler desteklenmelidir.

IX. KAYNAKLAR

1. Cimşit M.(1984): Hiperbarik oksijen kullanım alanları, Tıbbi ekoloji ve hidroklimatoloji dergisi, 2 8-15
2. Nogay H.A. (1994): Santral retinal arter oklüzyonunda hiperbarik oksijen tedavisinin etkinliği, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı, 8
3. Clark James M.(1995): Oxygen toxicity, Kindwall E. (ed), Hyperbaric Medicine Practise. Best Publishing Co., pp 34-39
4. Kindwall E.P. (1995): A history of hyperbaric medicine, Kindwall E. (ed), Hyperbaric Medicine Practise. Best Publishing Co., pp 2-15
5. Jain KK (2004); History of Hyperbaric Medicine, Textbook of Hyperbaric Medicine, Hogrefe & Huber Publishers, p 7
6. Edmonds C., Lowry C., Pennefather J. (1980): Hyperbaric oxygen therapy, Diving and Subaquatic Medicine, A diving medical centre publ., Australia, 28 pp 493-505
7. Leopardi L. (2003): Ite Boerema—surgeon and engineer with a double-Dutch legacy to medical technology . Surgery , Vol. 135 , 1, 99 – 103
8. George Smith (1964): Carbon monoxide poisoning, Annals of the New York Academy of Sciences 117 (2), 684 – 687
9. Unsworth I.P. (1973): Pulmonary barotrauma in a hyperbaric chamber, Anaesthesia 28 (6) , 675–678
10. Law R., Bukwirwa H. (1999): The physiology of oxygen delivery, Update in Anaesthesia, 10-3, 1-2
11. Neumeister M.(2005): Hyperbaric oxygen therapy, eMedicine Erişim tarihi 09.06.2008 <http://www.emedicine.com/plastic/topic526.htm>
12. Mader J.T (1989): Hyperbaric oxygen therapy: A comittee report, Undersea and Hyperbaric Medical Society, Maryland USA
13. Kaye D.(1967): Effect of hyperbaric oxygen on clostridia in vitro and in vivo, Proc Soc Exp Biol med., 124, 360-366
14. Hirn M. (1993): Hyperbaric oxygen in the treatment of gas gangrene and perineal necrotizing fasciitis: A clinical and experimental study. Eur J Surg, 570, 9-36

15. Stevens DL, Bryant AE, Adams K, Mader JT.(1993): Evaluation of therapy with hyperbaric oxygen for experimental infection with *Clostridium perfringens*, *Clin Infect Dis*, 17, 231-237
16. Ferrau S., Sallusti R, Lozano Valdes A., Gonzales C., Jonsson M., Gunnlaugsson G., Gullo A. (2001): HBO and gas gangrene: A case report, *Minerva Anesthesiol* 67 (10), 745-9
17. N. Omori, K. Takeuchi, T. Tanaka, H. Narai, T. Kitagawa, K. Abe, Y. Manabe (2008): Efficacy of combined hyperbaric oxygenation therapy in a case of pyogenic spondylodiscitis accompanied by an epidural and pelvic intramuscular gaseous abscess and encephal meningitis , *European Journal of Neurology* 15 (3), 19–20
18. Knighton DR, Fiegel VD, Halverson T, Schneider S, Brown T, Wells CL.(1990): Oxygen as an antibiotic: The effect of inspired oxygen on bacterial clearance, *Arch Surg* ; 125,97-100
19. Badwey JA, Karnovsky ML. (1980): Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann Rev Biochem.*, 49,695-726
20. Forman HJ, Thomas MJ.(1986): Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes, *Ann Rev Physiol*; 48, 669-680
21. Matthew K.P, Kenneth H. M, Roy M, Louis M. (1995): Effects of hyperbaric oxygen in infectious diseases: Basic mechanisms, Kindwall E. (ed), *Hyperbaric Medicine Practise*. Best Publishing Co., pp 142-164
22. Niinikoski J(2006): Physiologic effects of hyperbaric oxygen on wound healing processes, *Handbook on hyperbaric medicine*, Mathieu D (ed), Springer, Netherlands, pp 135-145
23. Sheffield PJ (1985): Tissue oxygen measurements with respect to soft-tissue wound healing with normobaric and hyperbaric oxygen. *HBO Review*;6(1), 18-43
24. Silver I.A., (1980): Physiology of wound healing, *Wound healing and wound infection: theory and surgical practice*, Hunt T.K.(ed), Appleton-century-crofts, New York, pp 11-31
25. Tunalı G. (2007): Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların yara iyileşmesinde hiperbarik oksijen ve prp(platelet rich plasma) etkilerinin histolojik ve ince yapı araştırması, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 28
26. Indications for hyperbaric oxygen therapy, UHMS. Erişim tarihi 16.06.2008 <http://uhms.org/Default.aspx?tabid=270>

27. Kindwall E. (1995): Contradictions and side effects to hyperbaric oxygen treatment, Kindwall E. (ed), Best Publishing Co, pp 51-54
28. Palmquist BM, Philipson B, Barr PO. (1984): Nuclear cataract and myopia during hyperbaric oxygen therapy. *Br Journal of Ophthalmology*, 68(2), 113-117
29. Al Waili Noori S. , Butler G., Beale J., Hamilton R W., Lee Y., Lucas P. (2005): Hyperbaric oxygen and malignancies: a potential role in radiotherapy, chemotherapy, tumor surgery and phototherapy, *Medical science monitor* , 11 (9), 279-289
30. Karagöz B., Süleymanoğlu S, Uzun G., Bilgi O. , Aydınöz S., Hahoulu A., Turken O., Onem Y., Kandemir G.(2008): Hyperbaric Oxygen Therapy Does Not Potentiate Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats, 102(3), 287-292
31. Aktaş Ş., Toklu A.S., Olgaç V. (2000): Hyperbaric oxygen therapy in adriamycin extravasation: An experimental animal study, *Annals of plastic surgery*, 45(2), 167-171
32. Radiation therapy, erişim tarihi; 25.06.2008;
http://en.wikipedia.org/wiki/Radiation_therapy#cite_note-UAB-1
33. Bernstein EF, Sullivan FJ, Mitchell JB, Salomon GD, Glatstein E.(1993): Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing, *Clin Plast Surg.*, Jul;20(3):435-53
34. Tokarek R., Bernstein EF., Sullivan F., (1994): Effects of therapeutic radiation on wound healing, *Clinics in dermatology*, 12, 57-70
35. Yaren H., Karayılanoğlu T., (2005): Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri, *TSK koruyucu hekimlik bülteni*, 4(4), 199-208
36. Aydın Y. (2001): Akut radyasyon yaralanmaları, *Cilt hastalıkları ve yara bakımı sempozyumu*, 173-187
37. Thornton S.C., Walsh B.J., Bennett S, Robbins J.M., Foulcher E., Morgan G.W., Penny R., Breit S.N., (1996): Both in vitro and in vivo irradiation are associated with induction of macrophage derived fibroblast growth factors, *Clin Exp Immunol*, 103, 67-73
38. Raaphorst G. (2003): Skin fibroblasts in vitro radiosensitivity can predict for late complications following AVM surgery, *Radiotherapy and Oncology*, 64 (2),153
39. Herskind C., Johansen J., Bentzen S.M., Overgaard M., Overgaard J., Bamberg M., Rodemann H.M.(2000): Fibroblast differentiation in subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy, 39 (3), 383-388

40. Kurtman C., Çelebioğlu B., Çakmak A., Tuncer T., Halça M., Bora H., Yüksel S. (1994): Yara iyileşmesine radyasyonun etkisinin fare cildinde değerlendirilmesi, *Türk onkoloji dergisi*, 9(3-4), 54-57
41. Marx R. (1995): Radiation Injury to Tissue, Kindwall E. (ed), *Hyperbaric Medicine Practise*. Best Publishing Co., pp 448-501
42. Lara P.C., Russels N.S., Smolders N.J., Bartelink H., Begg A.C., Cocomartin J.M., (1996): Radiation induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen, *Int J radiation biol*, 70(6), 683-692
43. Herskind C., Johansen J., Bentzen S.M., Overgaard M., Overgaard J., Bamberg M., Rodemann H.M.,(1998): Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy, *Radiother oncol*, 47 (3), 263-269
44. Mayer et al (2005): HBO and radiotherapy, *Strahlenter onkol*, 181, 113-123
45. Greenwood T.W., Gilchrist A.G. (1973): Hyperbaric oxygen and wound healing in post-irradiation head and neck surgery, *Br J Surg.*, 5, 394-397
46. Mainous E.G., Boyne P.J., Hart G.B. (1973): Hyperbaric oxygen treatment of mandibular osteomyelitis: Report of 3 cases, *J Am Dent Assoc*, 87, 1426-1430
47. Marx R.E et al. (1990): Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue, *Am J surgery*, 169, 519-524
48. Körpınar Ş., Toklu A.S., Karaçetin D. (2006): Yumuşak doku radyonekrozunda hiperbarik oksijen tedavisi deneyimi: olgu sunumu, *Türk onkoloji dergisi*, 21, 1
49. Yaylalı C.(2007): Tendon kılıfı fibroblastlarının hücre kültüründe tenositlere farklılaşması ve tenositlerin sentezlediği kollajen tiplerinin belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi yayımları, Biyoloji Anabilim dalı, 3
50. Amadeu TP., Coulomb B., Desmouliere A., Costa AM.(2003): Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2(2):60
51. Carlson MA., Longaker MT.(2004): The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair Regen* 12(2):134
52. Junguerita C.L. et al (1998): *Temel Histoloji*, Barış Kitabevi, İstanbul, 5, pp 104
53. Leeson T., Leeson R., Paparo A.(1988): *Text/Atlas of histology*, WB Saunders Company, Tokyo, pp 139-140
54. Tekelioğlu M. (1998): *Genel Tıp Histolojisi*, Beta Yayınevi, İstanbul, pp 116
55. Takashima A.(1998): *Current protocols in cell biology*, John Wiley and sons inc, Texas, 2.1, pp 1-12

56. Han SK., Choi KJ., Kim WK.(2004): Clinical application of fresh fibroblast allografts for the treatment of diabetic foot ulcers: A pilot study. *Plas Recon Surg* 114(7):1783
57. Constable P.H, Crowston JG., Occleston NL., Corderio MF., Khaw PT., (1998): Long term groth arrest of human Tenon's fibroblast following single applications of radiation, *British Journal of Ophtalmology*, 82, 448-452
58. Alaluf A., Howie H., Hu H., Evans A., Martin R., Green R. (2000): Athmospheric oxygen accelerates the induction of a post-mitotic phenotype in human dermal fibroblast: the key protective role of glutathione, *Differentiation* 66, 147-155
59. Uyar A., Aydın Z., Doğan H., Kayserilioğlu A. (2000): L-strain fibroblast kültürlerinde düşük parsiyel oksijen basıncının dinamik ve morfolojik etkileri, *İstanbul Tabip Odası Klinik Gelişim Dergisi*, 13, 6-7
60. Poullos E., Trougakos P., Chondrogianni N., Gonos E., (2007): Exposure of human diploid fibroblasts to hypoxia extends proliferative life span, *Annals of New York Academic Sciences*, 1119, 9-19
61. Balin A., Goodman D.B, Rasmussen H., Cristofalo J (1978): Oxygen-sensitive stages of the cell cycle of human diploid cells, *Journal of Cell Biology*, 21, 390-399
62. Balin A., Pratt L. (2002): Oxygen modulates the growth of skin fibroblasts, *In Vitro Cell. Dev. Biology*, 38, 305-310
63. Conconi MT., Baiguera S., Guidolin D., Furian C., Menti AM., Vigolo S., Belloni AS., Parnigotto PP., Nussdorfer GG. (2003): Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblasts 3T3/J2 cell line, *Journal of Investi. Med.*, Jul., 51(4), 227-32
64. Piepmeier EH., Kalns JE., (1999): Fibroblast response to rapid decompression and hyperbaric oxygenation, *Aviation and Space Enviroment Medicine*, June 70(6), 589-593
65. Hehenberger K., Brismar K., Lind F., Kratz G. (1997): Dose dependent hyperbaric oxygen stimulation of human fibroblast proliferation, *Wound Repair and Regeneration*, April-June, 147-150
66. Dimitrijevič D., Paranjape S., Judy R., Gracy RW., Mills GJ. (1999): Effect of hyperbaric oxygen on human skin cells in culture and human dermal and skin equivalents, *Wound Repair and Regeneration*, January- February, 53-64
67. Hollander DA, Hakimi MY, Hartmann A., Wilhelm K., Windolf J. (2000): The influence of hyperbaric oxygenation (HBO) on proliferation and differentiation of human keratinocyte cultures in vitro, *Cell Tissue Bank*, 1(4), 261-269

68. Kang T., Gorti G., Quan S., Ho M., Koch J. (2004): Effect of hyperbaric oxygen on the growth factor profile of fibroblasts, *Archives of Facial Plastic Surgery*, 6(1), 31-35
69. Sheikh A., Gibson J., Rollins M., Hopf H., Hussain Z., Kunt T. (2000): Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model, *Archives of Surgery*, 135,1293-1297
70. Lonergan DM., Mikulec AA., Hanasono MM., Kitam M., Koch RJ. (2003): Growth factor profile of irradiated human dermal fibroblasts using a serum-free method, *Plastic and Reconstructive surgery*, 111, 1960-1968
71. Marx RE, Johnson RP., Kline SN., (1985): Prevention of osteoradionecrosis: a randomised prospective clinical trial of hyperbaric oxygen versus penicilin, *Journal of American Dental Association*, 111, 49-54
72. Bennett MH., Feldmeier J., Hampson N., Smee R., Milross C. (2008): Hyperbaric oxygen therapy for late radiation tissue injury, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 3. Art. No.: CD005005. DOI: 10.1002/14651858.CD005005.pub2.
73. Stewart RJ., Moore T., Bennett MH., Newton GW., Yamaguchi KT. (1994): Effect of free-radical scavengers and hyperbaric oxygen on random-pattern skin flaps, *Archives of Surgery*, 129, 9
74. Mink RB, Dutka AJ, (1995): Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits does not promote brain lipid peroxidation, *Critical care medicine*, 23(8),1398-1404
75. Dennog C., Hartman A., Frey G., Speit G. (1996): Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy, *Mutagenesis*, 11, 605-609
76. Yıldız S., Çimşit M., İlgezdi S., Uzun G., Gümüş T., Qyrdedi T., Dalcı D. (2006): Notes on Practice; Hyperbaric Oxygen to treat radiation injury: two case reports, *Ostomy/Wound management*, 52 (5), 14-20
77. Chuba P., Aronin P., Bhambani K., Eichenhorn M., Zamaroni L., Cianci P., Muhlbauer M., Porter A., Fontanesi J. (2000): Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced brain injury in children, *Cancer*, 80 (10), 2005-2012

X. EKLER:

Etik kurul onayı



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi : 20/02/2008

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 2

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Suaiti Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Salih AYDIN'ın, üstlendiği 2008/336 dosya no'lu "Radyoterapi uygulanmış fibroblast kütürlerinde hiperbarik oksijenin etkilerinin değerlendirilmesi" başlıklı deneysel çalışma kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU (Katılmadı)

Biokimya A.D

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (Katılmadı)

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP (Katılmadı)

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR (Katılmadı)

Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)

Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR (Katılmadı)

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek Temiz ÖZBEK

Hukukçu

XI. ÖZGEÇMİŞ

1979 Ankara doğumluyum .İlköğrenimimin ilk 3 yılını Ankara Yükseliş Koleji'nde son 2 yılını Bursa Özel İnal Ertekin İlkokulu'nda tamamladım. Ortaöğrenimimi Bursa Anadolu Lisesi'nde tamamlayarak 1997 senesinde mezun oldum. Yükseköğrenimimi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde aldım. Mezun olduğum 2003 yılından sonra 1 sene süreyle Bursa'da özel bir poliklinikte pratisyen hekimlik yaptım. 2004'te İstanbul Tıp Fakültesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım.