

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hasan Murat ÇALOĞLU

**RATLARDA RADYOTERAPİYE BAĞLI GELİŞEN
AKUT KEMİK TOKSİSİTESİNDE
AMİFOSTİN VE L-KARNİTİN ETKİNLİKLERİNİN
HİSTOPATOLOJİK OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Seda EĞRENCİ

EDİRNE – 2012

TEŞEKKÜR

Hayatımın her anında yanımda olan sevgili aileme, uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimimi arttırmamda bana destek olan değerli hocalarım; tez danışmanım Doç. Dr. Hasan Murat ÇALOĞLU'na, Radyasyon Onkolojisi AD. Başkanı Prof. Dr. M. Cem UZAL'a, Prof. Dr. Zafer KOÇAK'a, Doç. Dr. Vuslat YÜRÜT ÇALOĞLU'na, Doç. Dr. Mert SAYNAK'a, Yrd. Doç. Dr. Ruşen COŞAR'a, Yrd. Doç. Dr. Kamuran İBİŞ'e, Uzm. Dr. Dilek NURLU'ya; tezimin hazırlanmasında emeği geçen Patoloji AD. Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Fulya ÖZ PUYAN ve Yard. Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN'e ve çalışma ekibimize teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ	4
KEMİK DOKU VE FİZYOLOJİSİ	5
RADYASYONUN KEMİK DOKU ÜZERİNE ETKİLERİ	11
ANTİOKSİDANLAR.....	17
AMİFOSTİN	17
KARNİTİN	20
GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR	39
ÖZET	41
SUMMARY	43
KAYNAKLAR.....	45
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ALC	: Acetyl-L-Carnitine
ALP	: Alkalen Phosphatase
AMI	: Amifostin
ATP	: Adenozin Trifosfat
Co-60	: Cobalt-60
CoA	: Koenzim A
DNA	: Deoksiribonükleik asit
e⁻	: Elektron
e⁻_{aq}	: Hidrat Elektron
Gy	: Gray
H⁻	: Hidrojen Radikali
H⁺	: Hidrojen İyonu
H₂O	: Hidrojen Dioksit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
im	: İntramüsküler
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
KAR	: L-karnitin
KONT	: Kontrol
KT	: Kemoterapi
LD	: Letal Doz

O₂	: Oksijen Molekülü
OH[•]	: Hidroksil Radikali
OSR	: Oksijen Serbest Radikali
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Radyoterapi
sc	: Subkutanöz
SF	: Serum Fizyolojik
SR	: Serbest Radikal
TD	: Tolerans Dozu
WR	: Walter Reed
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

GİRİŞ VE AMAÇ

Radyasyon hakkında ilk bilgiler 1895 yılında Wilhelm Roentgen'in bulduğu X ışını ile başlamış, bunu Curie'nin 1898'de radyumu keşfi izlemiştir (1). Daha sonraki dönemlerde radyasyon enerjisinin biyolojik etkileri fark edilmeye başlanmış ve bu zamana kadar radyoterapideki (RT) gelişmeler sayesinde kanser tedavisinde ilerlemeler elde edilmiştir (1).

İyonizan radyasyon; meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, baş boyun kanserleri, rektal-anorektal karsinoma, lenfoma, Ewing sarkomu, yumuşak doku sarkomu gibi pek çok malignitenin tedavisinde kullanılmaktadır (2). RT'nin amacı, hedef volume istenilen dozu homojen ve tam olarak verirken, çevre normal dokuların maksimum korunmasını sağlamaktır (2). RT planlamasında normal dokular, mümkün olduğu kadar ışın alanı dışında bırakılarak korunmaya çalışılsa da kaçınılmaz olarak belirli bir miktar sağlam doku hedef volum içerisinde yer alır ya da hedef volum dışında kalsa da ışın alanlarından kayda değer miktarda doz alır. Normal dokularda RT'ye bağlı oluşan değişiklikler ışın tipine, RT parametrelerine (doz, fraksiyonasyon, toplam süre, ışınlama tekniği vb.), ışınlanan normal doku hacmine, doku ve hücre özelliklerine, radyoduyarlaştırıcı ve radyoprotektör ajanların veya kemoterapötik ilaçların RT ile beraber kullanılıp kullanılmaması gibi birçok faktöre bağlıdır (3). Modern RT teknikleri (üç boyutlu konformal RT, yoğunluk ayarlı RT vb.) normal dokuları mümkün olduğunca korumaya olanak sağlamaktadır (4). Olgun kemik ve kırık dokuları radyasyona göreceli olarak dirençlidir ve bu nedenle klinikte olgun kemik matriksinin osteoindüktif özelliğini bozmayacak RT dozları ile tedavi tercih edilir (5,6). Bununla birlikte bu dozlarla bile matriksin morfogenetik özelliklerinin denatürasyonu ve destrüksiyonu kaçınılmazdır (7). Kemiğe radyasyon hasarının primer sonucu atrofidir ve bu durum vasküler ve sellüler hasar kombinasyonunun sonucudur. Osteoblasttaki bu hasar

matriks yapımının azalması ile sonuçlanır (8). RT'ye bağı gelişebilecek bu hasarlar klinikte stres kırıkları, kemik bütünlüğünün bozulması ve eklem harabiyeti olarak karşımıza çıkan önemli bir sorundur (1,2). Çalışmalar göstermiştir ki anüs, serviks veya rektum karsinomu gibi nedenlerden ötürü pelvik RT alan kadınlarda kalça kırık riski RT almayan kadınların 3 katıdır (3). 65 yaş üstü kadınlarda kalça kırık riski %16'dır. RT sonrası sakrum kırıkları da çok yaygındır. RT sonrası gelişen bu kırıkların tedavisi, yüksek oranda kaynama gecikmesi veya kırıkların kaynamaması ile sonuçlanabilen oldukça zor bir tedavidir. İnternal fiksasyon ve konvansiyonel kemik grefti ile cerrahi tedaviler sınırlı bir başarıya sahiptir (2).

Radyoterapinin kemik dokusu üzerine hasarlayıcı etkisi birçok hayvan çalışmasında da gösterilmiştir. Damron ve ark. (9)'nın yaptığı bir çalışmada, tek doz 17.5 Gy RT'nin 5 haftalık ratların büyüme kıkırdağında hasar oluşturduğunu göstermiştir. Benzer olarak, başka bir çalışmada radyasyonun osteoblast proliferasyonunu, kollajen üretimini ve kemik nodül formasyonu oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (10). Gevorgiyan ve ark. (11) 10 -15 Gy uygulanan tek doz radyasyon ile osteoblastların sayısının ve proliferasyonunun azaldığını göstermiştir.

Radyoterapiye bağı kemik hasarını azaltmada alternatif bir strateji ise RT öncesi radyoprotektörlerin profilaktik kullanımıdır. Amifostin (S-(N-(3-aminopropil)-2-aminoetiylol) (AMI) sisteamin benzeri bir moleküldür (12,13). Hücre içinde vasküler endotelyal hücrelerin alkalen fosfatazi (ALP) ile fosforile edilerek, aktif metaboliti olan serbest tiyole dönüşen bir ön ilaçtır. Serbest tiyol, radyasyonun meydana getirdiği oksijen serbest radikallerini (OSR) bağlayarak etki eder. AMI'in RT ve kemoterapiye (KT) bağı normal doku hasarının önlenmesinde etkili olduğu ve tedavinin doz sınırlayıcı toksik etkilerini azaltarak bazı kanserlerin tedavisini daha etkin kıldığı prelinik çalışmalar ile belirlenmiştir (14,15). Tamurian ve ark. (16)'nın çalışmasında, diz çevresine verilen tek doz 12.5 ve 17.5 Gy RT öncesinde 100 mg/kg intraperitoneal (ip.) AMI uygulanmıştır. RT öncesi uygulanan AMI'in; büyümeyi istatistiksel anlamlı olarak koruduğu gösterilmiştir.

L-karnitin (3-hydroxy-4-trimethylammoniumbutyric acid) (KAR), yağ asitlerinin beta oksidasyonunda, mitokondri membranına taşınmasında, ve açıl-koenzim A ve açilkarnitin gibi toksik metabolitlerin mitokondri dışına çıkarılmasında taşıyıcı olan doğal bir maddedir (17). KAR, antioksidan ve OSR temizleyici özelliği ile hücrelerde iyonizan radyasyona bağı oluşabilecek OSR'ne karşı modölatör rol oynayabilir (18). Ancak KAR'in erişkin kemik dokusunda oluşabilecek radyasyon hasarını engellemedeki rolünü test eden bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Bu konuda yapılmış tek çalışma yine kliniğimizde yapılan ve bizim çalışmamıza benzer şekilde AMI ile KAR etkinliklerinin karşılaştırıldığı Yürüt Çaloğlu

ve ark. (19)'nın yaptığı çalışmadır. Yürüt Çaloğlu ve ark. (19)'nın yaptığı çalışmada KAR'in RT görmüş epifizyal kıkırdak üzerine etkisi AMI ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada histopatolojik incelemede RT öncesi uygulanan KAR ve AMI'in, RT grubu ile karşılaştırıldığında AMI+RT ve KAR+RT gruplarında kemik büyümesini ve epifizyal kartilajı istatistiksel anlamlı olarak benzer oranda koruduğu gösterilmiştir.

Yukarıda bahsedilen önceki çalışmalardan yola çıkarak biz bu çalışmada KAR'in erişkin kemik dokusu üzerinde radyoprotektör etkisi olabileceğini hipotezleyerek, olası bu koruyucu etkinin radyoprotektör etkisi oldukça iyi bilinen AMI ile in vivo hayvan modelinde karşılaştırılmasını yaparak, aralarında anlamlı farklılık olup olmadığının incelenmesini amaçladık (16,19). Bu bağlamda çalışmamız hem KAR'in erişkin kemik dokusu üzerine radyoprotektör etkisini araştıran ilk çalışma hem de olası bu koruyucu etkinin AMI ile karşılaştırıldığı ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

GENEL BİLGİLER

İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ

İskelet sistemi, paraksiyel mezoderm, mezodermin lateral plağı (somatik tabaka) ve nöral krestten gelişir. Paraksiyal mezoderm, nöral tübün her iki yanında segmentler halinde uzanan ve baş bölgesinde somitomer, oksipital bölgeden kaudale doğru da, somit adı verilen doku blokları oluşturur. Somitler daha sonra, sklerotom olarak adlandırılan bir ventromedial ve dermomyotom denilen bir dorsolateral bölümü oluşturmak üzere farklılaşırlar. Dördüncü haftanın sonunda, sklerotom hücreleri polimorf bir görünüme bürünerek, mezenşim veya embriyonik konnektif doku olarak adlandırılan gevşek doku örgüsünü meydana getirirler. Mezenşimal hücrelerin özelliği, migrasyon göstermeleri ve birçok değişik yönde farklılaşmalarıdır. Bu hücreler fibroblast, kondroblast ya da osteoblast (kemik oluşturucu hücreler) haline dönüşebilirler (20).

Mezenşimin kemik oluşturma kapasitesi sadece sklerotom hücreleri ile sınırlı değildir. Somatik mezoderm plağı da, pelvik halka, omuz ve uzun ekstremitte kemiklerinin oluşmasına katkıda bulunur. Baş bölgesindeki nöral krest hücrelerinin mezenşimal farklılaşma göstererek yüz kemiklerinin oluşumuna katıldıkları, buna karşın oksipital somitler ve somitomerlerin kafatası çatısı ve tabanının büyük bir kısmını oluşturdukları gösterilmiştir. Kafatasının yassı kemikleri gibi bazı kemiklerde, mezenşim direkt olarak kemik yapıya farklılaşırken, bu süreç membranöz ossifikasyon olarak adlandırılır. Ancak kemiklerin büyük çoğunluğunda mezenşimal hücrelerin öncelikle hyalin kıkırdak modelleri oluşturmaları ve bunların daha sonra endokondral ossifikasyon yolu ile kemikleşmesi söz konusudur (20).

KEMİK DOKU VE FİZYOLOJİSİ

Kemiğin Yapısı

Organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi kemik dokusu da hücreler, kollajen lifler ve amorf maddeden oluşmuş, yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur. Kemikler iskelet sisteminin en önemli yapıtaşıdır (21). Vücudu şekillendirmesinin yanında ağırlığı taşıyan, yaşamsal organları koruyan ve kasların tendonlar ile kemiklere yapışmasıyla hareketi sağlayan sistemin ana unsurudur (22-24). Bununla birlikte kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermesi ve metabolik önemi olan kalsiyum mineralinin deposu olması, kemiğin destek dokusu olmasının yanında metabolizmada da önemli bir rol oynadığını göstermektedir (21).

Gelişmiş kemik dokuda lifler paralel ve belirli aralıklarla, aralarında porlar bırakacak şekilde yerleşmiştir. Morfolojik olarak kemik dokusu yoğun (kompakt) kemik ve süngerimsi (trabeküler) kemik olmak üzere iki grupta değerlendirilir (22-24).

Yoğun kemik, kemik dokunun %80'ini oluşturur ve birçok kemiğin dış tabakası yoğun kemikten meydana gelmiştir. Yoğun kemikte, yüzeyin hacme oranı düşüktür. Bu tip kemiklerdeki kemik hücreleri olan osteositler pasiftir. Hücreler lakuna içinde uzanırlar ve besin maddelerini yoğun kemiğin içini kaplayan kanalcıklar aracılığı ile alırlar (22-24). Yoğun bir kemiğin (örneğin; femurun diafizi) mikroskobik incelemesinde, dokunun Havers Kanalları etrafında 3-7 µm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluştuğu görülür. Bir Havers Kanalı yan dallarla kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Bu yan dallara Volkmann Kanalları adı verilir. Havers Kanalları'ndaki damarlar uzunlamasına dizilmiş olup, yan dallarıyla da komşu damarlarla temastadırlar (Şekil 1). Havers Kanalı 20-100 µm çapındadır ve 1-2 adet damarsal yapı içerir. Damarlar genellikle kapiller, postkapiller venül veya seyrek olarak arteriol olabilir. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır (21).

Süngerimsi kemik ise, içinde boşluklar barındırır ve yüzeyin hacme oranı yüksektir. Yüksek metabolik etkinliğe sahip süngerimsi kemik plakaları üzerinde çok sayıda osteosit yer alır. Süngerimsi kemikte besin maddeleri kemiğin hücre dışı sıvısından trabekülaya sızar, yoğun kemikte ise besin maddeleri kan damarlarının bulunduğu Havers Kanalları ile sağlanır (22-24). Süngerimsi kemik yoğun kemiğe benzemekle beraber, trabeküller lamelden yoksundur. Dolayısıyla histolojik preparasyonlarda enine kesitte sirküler lamel dizilişi

görülmez. Buna karşılık bol boşluklu trabeküllerden oluşan, adeta petek görünümü veren bir dokusu vardır. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Özellikle uzun kemiklerin epifizindeki süngerimsi doku basıncın veya kuvvetin geldiği yönde düzenlenmiştir. Böylece yapı çok daha sağlam bir hale gelmektedir (21).

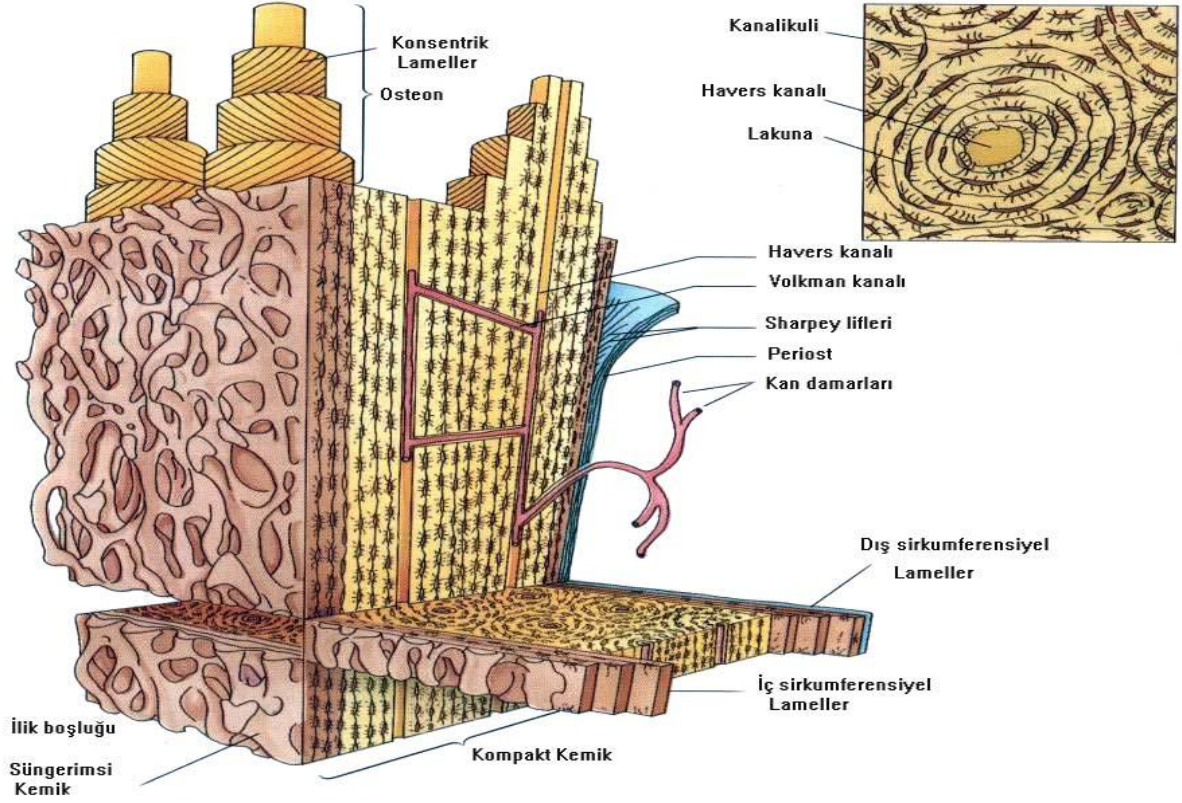
Kemikler organik ve inorganik bölümlerden oluşmuştur. Organik kısım kemik dokusunun yaklaşık olarak %30'unu oluşturur (25). Bu yapının büyük bölümü tip I kollajen lifler ile, protein ve glikozaminoglikanlardan oluşan temel amorf maddeden yapılmıştır. Kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi, dokudaki organik/inorganik elemanların ve matriksin uyumlu birlikteliğine bağlıdır (21). Kollajen ve kollajen dışı proteinler ile kemik iliği hücreleri, kemiğin organik kısmının elemanlarıdır. Organik bölümün %98'ini matriks, %2'sini hücreler oluşturur. Bu hücreler temel olarak osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. Matriksin %95'ini tendon ve derinin de temel yapısal proteini olan tip I kollajen oluşturur (26).

Kemiğin %70'ini ise inorganik kısım oluşturur. İnorganik elementlerin başında kalsiyum, fosfat, magnezyum gibi maddeler gelir. İnorganik kısmın çoğunluğunu kalsiyum hidroksiapatit kristalleri oluşturur (27,28). Kemik doku yüksek kalsiyum ve fosfat içeriği nedeniyle, kalsiyum homeostazında çok önemli bir rol oynar. Kemiğin inorganik bileşiminin yaşa ve cinsiyete bağlı olarak bazı farklılıklar gösterdiği de bilinmektedir (22,23,27,29). Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadırlar (21). Kemik yüksek inorganik içeriğine rağmen aktif bir dokudur ve çok iyi damarlanmıştır (22,23,29).

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan tabakalarla örtülüdür. Dıştakine periosteum, içtekine ise endosteum adı verilir. Temel işlevleri, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüyebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları aralıksız olarak üretmektir (30).

Uzun kemiklerin gövde bölgesine diafiz, şişkince olan uç kısımlarına da epifiz adı verilir. Epifizler ince bir yoğun kemik tabakasıyla kaplanmış süngerimsi kemikten oluşmuştur. Diafizin ise hemen hemen tamamı yoğun kemikten yapıldır ve kemik iliği boşluğuna bakan yüzeylerinde çok az süngerimsi kemik vardır (30).

Histolojik inceleme için dekalsifikasyon uygulandığında inorganik tuzların ortadan kalkmasıyla kemik demineralize olur ve yumuşar. Ancak şeklini korur ve mikroskobik yapısı bozulmaz (21).



Şekil 1. Havers sisteminin bir bölümünü gösteren çizim (30)

Kemik Doku Hücreleri

Kemik dokuda yer alan hücreler osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır (30,31).

Osteoprogenitör hücreler, mezenşimal kök hücrelerden kaynaklanır. Periosteumun iç tabakasında, endosteumda, Havers Kanallarında ve Volkmann Kanallarında bulunurlar. Osteoprogenitor hücreler mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu hücreler kemik büyümesinde, zedelenme veya kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünürler ve osteoblast hücrelerine dönüşürler (21). Histolojik olarak konumları, yassı şekilleri, çok az miktarda granüler endoplazmik retikulumları ve az gelişmiş golgi kompleksleri ile tanınırlar (30).

Osteoblastlar: Periostun kambium tabakası ve endosteumda bulunan, lokal hareketli olmayan kemik matriks oluşumundan sorumlu, kemik yapıcı farklılaşmış bağ dokusu hücresidir. Pluripotansiyel mezenkimal hücrelerden geliştiği kabul edilmektedir (24,32-34).

Aktif fazda 20-30 μ boyutlarında, küboid etrafı girintili çıkıntılı, sitoplazmadan zengin, birbirlerine sitoplazmik çıkıntılar aracılığıyla tutunan hücrelerdir. Eğer sık olarak yan yana bulunurlarsa, bu uzantıları görülmez. Hücrenin bir tarafında çekirdek, diğer tarafında endoplazmik retikulum ve golgi cihazı bulunur. Çok fazla sayıda endoplazmik retikulum

mevcuttur. İnaktif dönemde uzun yassı iğ şeklini alır. Aktivasyon döneminde boyut ve şekilleri değişerek hücresel elemanları çoğalır. Osteoblastlar bölünerek çoğalmazlar (32).

Osteoblastlar hem tip I kollajeni (prokollajen) hem de başlangıçta mineralize olmamış kemiği (osteoid) oluşturan ara maddeyi salgılar ve matriks kalsifikasyonunda rol oynarlar (32).

Osteoblastlar uzunlamasına büyümenin yanı sıra, enine büyümeyi sağlar. Yeni oluşan tabaka ile daha önce oluşmuş tabaka arasında büyüme çizgisi denilen birleştirici bir sınır gözlenir (32).

Osteositler: Erişkin kemik hücreleridir. Osteoblastların sentez edip salgıladığı kemiğin organik hücreler arası maddenin çevresinde birikmesi sonucu bu madde içerisinde hapis kalarak farklılaşmasıyla meydana gelirler (34).

Her osteosit hücrenin şeklini kalıp gibi saran bir boşluğa yani lakunaya yerleşmiştir. Osteositler matriks içerisinde düzenli olmayan 1 μ çapında kıvrımlı bir yapı gösteren kanaliküller içerisinden ince sitoplazmik uzantıları aracılığıyla komşu lakunalarda bulunan hücrelerle bağlantılar yapar (33,34).

Kemik matriksin devamlılığını ve matriks birikimini sağlar. Kan kalsiyumunun uygun seviyede kalmasına yardımcı olur (34).

Osteoklastlar: Kemik ve mineralize kıkırdak dokusunu rezorbe eden ve kemiğin yeniden şekillenmesini sağlayan çeşitli büyüklük ve sayıda çekirdek içeren dev hücrelerdir (24,33,34). Kemik rezorbsiyonunun olduğu bölgelerde aktif olarak bulunurlar. Aktivasyonları sonucu Howship Lakunası ya da Rezorbsiyon Körfezi denilen kemik yüzeyindeki çukurlar oluşur. Ameboid hareketlidirler. Mitozla çoğalmazlar (34).

Osteoklastların ya monosit ve makrofajların direkt birleşmesinden ya monosit, makrofajların oluşumunda öncü rol oynayan hücrelerden ya da onlardan bağımsız başka bir kök hücreden geliştiği düşünülmektedir (24).

Osteoklastların postmitotik mononükleer prekürsör hücrelerin birleşmesinden kaynaklandığı görüşü en çok kabul gören görüştür (24,34). Bu hücrelerin çok çekirdekli şekilleri tekrar eden DNA replikasyonları ve hücre bölünmesi olmaksızın çekirdek bölünmesiyle ya da birçok öncü hücrenin füzyonuyla oluşur (34).

Kemikle komşu olan hücrenin bölümleri iki kısma ayrılır:

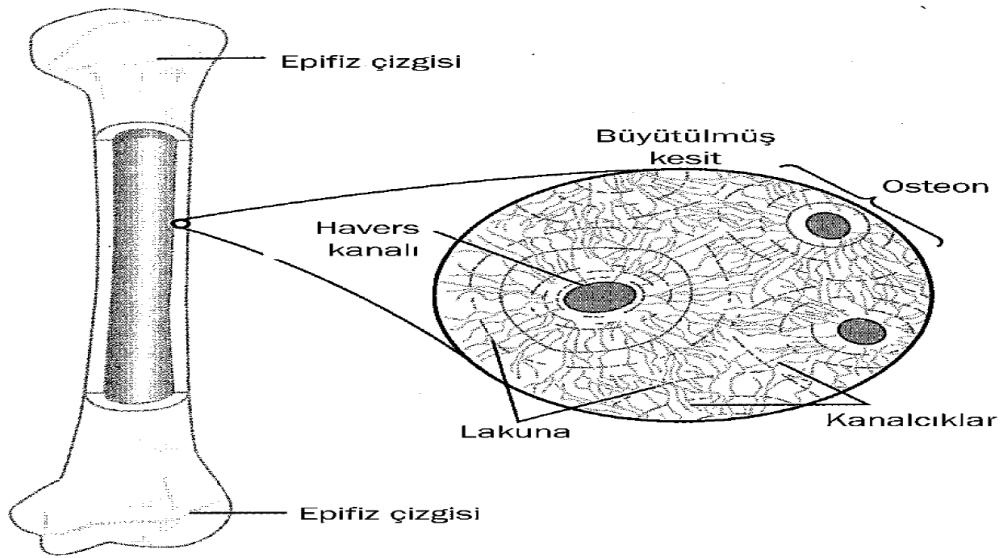
1. Fırçamsı kenar (Ruffler border): Hücrenin diğer kısımlarından daha koyu benekli olup rezorpsiyon bölümünde kemiğe bitişik parlak bant gibi görülür (33,34).

2. Berrak bölge (Clear zone): Fırçamsı kenarı kuşak gibi sarar. Sitoplazma çevresinde küçük bir halkaya benzer (33,34).

Osteoklastların görevi kemiğin mineral ve hücreler arası ara maddesini rezorbe etmektir. Kemik rezorbsiyonu fırçamsı kenarda ekzositoz ve endositoz mekanizmasıyla olur. Osteoklastlarda litik birçok enzim mevcuttur (34).

Paratiroid hormon düzeyindeki artış rezorbsiyonunu artırır ve osteoklastik aktivite üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Kalsitonin ise osteoklastik aktiviteyi azaltarak kemik yıkımını dengeleyici rol oynar (34).

Şekil 2’de kemiğin yapısı izlenmektedir (35).



Şekil 2. Kemiğin yapısı (35)

Kemik Histogenezi

Kemik dokusunun şekillenmesi karmaşık bir süreçtir. Kemik dokusu embriyoda ve ileriki hayat devresinde bağ dokusunun farklılaşması ile meydana gelir. Gerek embriyonal gerekse postnatal hayatta ilk kemikleşme merkezleri küçük sahalar şeklinde ortaya çıkmaktadır (36-38).

Bir kemiğin fetal dönemdeki gelişimi genel olarak iki tipte (intramembranöz ve endokondral kemikleşme) ortaya çıkar. Her iki yolla da oluşan ilk kemik primer kemik özelliğindedir. Ortaya çıkan primer kemik hızla yıkılarak yerine sekonder kemik dokusu konur. Daha sonra kemik dokusu periosteal ve epifizyal plak aktivitesi ile büyümeye devam eder (36,38-42).

Intramembranöz kemikleşme (Desmal kemikleşme): Embriyonal hayatta en basit kemikleşme, bağ dokularının veya mezenşim dokunun kemikleşmesidir. Bu kemikleşme sırasında bağ dokusu, kıkırdak dokuya dönüşmeden direkt olarak kemik dokuya dönüşür.

İnsanda ilk intramembranöz kemikleşme gebeliğin yaklaşık olarak 8. haftasında ortaya çıkar ve ilk olarak klavikulada görülür. Nörokranyum kemikleri, visserokranyuma ait yassı kemikler, maxilla ve mandibulanın büyük kısmı bu yolla kemikleşir (36,38,40,43,44).

Intramembranöz kemikleşme gevşek mezenşimal doku içerisindeki mezenşimal hücrelerin göç ederek belirli bölgelerde yığılmaları (mezenşimal kondensasyon) sonucunda başlar. Mezenşimal yoğunlaşmanın olduğu bölgelerde damarlanma artar ve mezenşimal hücreler hem büyürler ve hem de şekillerini değiştirerek yuvarlak görünüm kazanırlar. Bu değişikliklerin sonucunda mezenşimal hücreler osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoblastlar da kemik matriksini üretmeye başlarlar. Kemikleşmenin başladığı bu ilk bölgelere ilk kemikleşme noktası veya primer ossifikasyon merkezi adı verilir (36,37,43,44).

İlk kemikleşme noktasında oluşan küçük kemik tabakası spongiöz karakterde olup süngerimsi bir yapı gösterir. Bu yapı periosteumun periferden sürekli yeni kemik doku oluşturmasıyla büyür ve gelişir. Sonunda iki tabaka halinde kompakt kemik dokusu (lamina externa ve lamina interna) ile bunlar arasında süngerimsi kemik dokusu (diploe) bulunan yassı kafatası kemikleri meydana gelmiş olur (36,37,43,44).

Endokondral kemikleşme: Bu yolla kemikleşmede kemiğin oluşacağı alanda öncelikle bir kıkırdak model oluşur. Daha sonra bu kıkırdak model ortadan kalkarak yerini kemik dokuya bırakır (38). Ekstremité kemikleri ve aksiyal iskelet parçaları uzun kemikler, omurlar, pelvis iskeleti ve kafatası tabanını oluşturan kemikler endokondral kemikleşme ile gelişir (36,40,44,45).

Intramembranöz kemikleşmede olduğu gibi, endokondral kemikleşme sürecinde de primer kemikleşme merkezi oluşur. Primer kemikleşme merkezi diyafizin merkezinde bulunur. Fetal hayatın sonuna kadar var olan primer kemikleşme merkezinin oluşması endokondral kemikleşmenin ilk aşamasını oluştururken, ikinci aşama doğumdan sonra epifizlerde gelişen sekonder kemikleşme merkezleri ile başlar (36,40,44,45).

Endokondral kemikleşmede, öncelikle ileride kemiğin oluşacağı bölgelerde mezenşimal hücrelerde proliferasyon ve yığılma başlar. Daha sonra mezenşimal hücreler farklılaşarak kondroblastlara dönüşürler. Kondroblastlar da oluşacak kemiğin genel şekli ve görünümüne sahip bir hyalin kıkırdak oluşturur. Kıkırdak model intertisiyel büyümeyle uzunlamasına ve perikondrium aktivitesiyle enine büyüme gösterir (36,40,44,45).

Bebek doğduğunda uzun kemiklerin gövde ve diafizleri büyük oranda kemikleşmiştir, fakat epifizleri hala kıkırdak yapıdadır ve kemikleşme oldukça geç başlar. Sadece femurun distal epifizinde doğumdan az önce başlar. Sekonder kemikleşme merkezlerinin çoğu doğumdan sonraki birkaç yıl içinde epifizlerde belirir. Epifizlerde meydana gelen kemikleşme

merkezlerinin büyümesiyle kıkırdak taslak epifiz ile diafiz arasında kemiğin her iki ucunda da epifiz kıkırdağı olarak kalır. Epifiz kıkırdağı uzun kemiklerin uzunluğuna büyümesinde asıl rolü oynar ve puberteye kadar kıkırdak halinde kalır. Kemik tüm uzunluğuna ulaştığında epifiz plakları kaybolarak, epifiz bölgeleri kemik bölgesi ile birleşir. Epifiz plağı uzun kemiklerde uç kısımlarda bulunurken kısa kemiklerde tek uça bulunur. Omurlar gibi düzensiz kemiklerde ise bir veya birkaç primer kemikleşme merkezinin yanı sıra, genellikle çok sayıda sekonder merkeze de rastlanır (46).

RADYASYONUN KEMİK DOKU ÜZERİNE ETKİLERİ

Radyasyonun canlıda oluşturduğu etkileri radyasyon enerjisinin absorblanması ile biyolojik etkinin ortaya çıkışı arasındaki sürede birbirini izleyen olaylar zincirini üç etki kademesinde sıralamak mümkündür.

Radyasyon etkisinin ilk kademesi olan fiziksel kademe, iyonizan radyasyon ile canlı dokuları oluşturan atom ve moleküller arasındaki ilk etkileşimleri kapsar. Bu kademe radyasyon enerjisi maddeye transfer edilir ve bu olay radyasyonu absorblayan maddenin atom ve moleküllerinde iyonlaşma ya da uyarılmalara yol açar. Bu iyonlaşmalar sonucunda oluşan serbest elektronlar, diğer komşu atomlarda da iyonlaşmalara yol açarlar ve böylece zincirleme bir iyonlaşma olayı meydana gelir.

Bu ilk reaksiyonlarda ortaya çıkan yeni ürünler, genellikle kararsızdırlar ve çok kısa bir süre içinde (10^{-12} saniye) sekonder kimyasal reaksiyonların oluşmasına neden olurlar (47). Bu reaksiyonların meydana geldiği radyasyon etkisinin ikinci kademesi, kimyasal kademe adını alır. Bu kademe hasar görmüş atom ve moleküller diğer hücresel yapılar ile reaksiyona girerler. Bu reaksiyonlar basit ya da karmaşık zincirleme reaksiyonlar şeklinde gelişebilir ve serbest radikallerin oluşmasına yol açarlar. Serbest radikaller (SR) çok reaktif yapılardır ve hem kendileri ile hem de ortamdaki diğer moleküller ile reaksiyonlara girmeye devam ederler.

Bir organizmada radyasyon etkisi ile oluşan bu tür moleküler değişiklikler, olayın biyolojik kademe ile adlandırılan üçüncü kademesinin başlamasına yol açarlar. Bu kademe boyunca canlıda meydana gelen olaylar, radyasyonun son biyolojik etkisinin ortaya çıkmasına sebep olurlar. Çeşitli hasarlara yol açan enzim reaksiyonları başlar. Bu arada DNA molekülünde de hasarlar oluşur (5).

İyonizan radyasyonun, direkt olarak, DNA moleküllerini etkilemesiyle hedef atomda iyonizasyon meydana gelir ve biyolojik hasara sebep olan bir dizi reaksiyon başlar.

Radyasyon, geçtiği yol boyunca bağ kırılmasına neden olur. İyonizan radyasyonların etkisi ile DNA’da oluşan hasar üç tiptir;

1. Subletal hasar: Tek başına ölümcül değildir ve tamir edilebilir. Subletal hasarlar tamir edilemeyecek düzeyde olduğunda hücre ölümüne neden olabilir. Hasar DNA’ da tek zincir kırığı olarak görülür.

2. Potansiyel letal hasar: Radyasyona maruziyet sonrası hücre ortamındaki çevresel değişikliklere bağlı olarak tamir edilebilir hasarlardır. Normal koşullarda bu tip hasar mitozla gitmekte olan hücre için öldürücü olabilirken, radyasyona maruz kalmış hücrede hasar tamir edilebilmektedir. Hasar DNA’ da tek zincir kırığı olarak görülür.

3. Letal hasar: Hasar tamir edilemediği için hücrenin yaşamsal fonksiyonları etkilenir ve apoptotik hücre ölümüne yol açar. Hasar DNA’da çift sarmal kırığı olarak görülür (5).

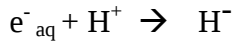
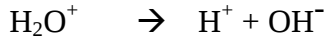
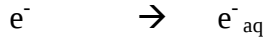
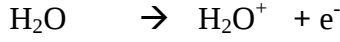
Radyasyon ve Serbest Radikal Oluşumu

Radyasyon, canlı dokuda yoğun olarak bulunan su (H_2O) molekülleriyle etkileşerek SR oluşmasına neden olur.

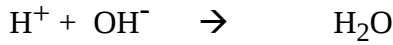
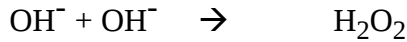
Serbest radikaller, iyonizan radyasyon neticesi meydana gelen iyonların veya uyarılmış atomların biyolojik ortamdaki diğer atom ve moleküllerle kimyasal reaksiyona girmesi sonucu oluşurlar. SR’ler dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Yaklaşık 10^{-5} saniye gibi bir ömürleri vardır. SR’ler son derece reaktiftirler, yani diğer atom ya da moleküller ile kolayca reaksiyona girerler. Eşleşmemiş elektronun bir başka radikalın aynı durumundaki elektronu ile eşleşerek ya da bir elektron transferi reaksiyonu yaparak kararlı hale gelme eğilimi vardır. Bu sebeple, SR’ler elektron alıcı (oksitleyici) ya da elektron verici (redükleyici) özelliklere sahiptirler (5). Oluşan SR’ler, hücre içindeki önemli moleküllerle reaksiyona girerek onların yapısını ve fonksiyonunu bozar, hücrenin normal fonksiyonunu yitirmesine ve ölümüne yol açar (48).

Canlılar %70-90 oranında H_2O içerdiği için ısınladıklarında, radyasyon enerjisinin büyük oranda H_2O molekülleri tarafından absorblanması olasılığı çok yüksektir. Radyasyon etkisi ile H_2O molekülleri iyonlaşır ya da uyarılırlar. İyonlaşma ile pozitif yüklü bir iyon (H_2O^+) ve hızlı bir serbest elektron (e^-) oluşur. Bu olayı izleyen çeşitli reaksiyonlar ile değişik tipte SR’ler meydana gelir. Serbest e^- birçok sekonder iyonlaşma olayına yol açarak enerjisini kaybeder ve ortamda su molekülleri ile sarılarak hidrat elektron (e^-_{aq}) haline geçer. Pozitif

yüklü iyon ise, bir hidrojen iyonu (H^+) ile bir hidroksil radikali (OH^-) oluşturacak şekilde ayrılır. Bu olaylarla birlikte bir hidrojen radikali ($H^\cdot$) de meydana gelir:



Hidroksil radikalleri sadece H_2O 'un iyonlaşması ile gerçekleşen bu reaksiyonlar sonucu oluşmazlar. Aynı zamanda H_2O moleküllerinin uyarılması ve uyarılmış molekülün ayrılması ile de meydana gelebilirler. Oluşan bu radikaller çok reaktiftirler (49):



Kanser tedavisinde eksternal RT için kullanılan X, γ ve e^- ışınları gibi düşük lineer enerji transferi yapan radyasyonların etkisi daha çok indirekt yolla, yüksek enerji transferli olan α partikülleri gibi ağır partikül radyasyonlarının etkisi ise; daha çok direkt yolla meydana gelir. İndirekt etkide, O_2 molekülünün e^- verici özelliğinden dolayı, ortamdaki hemoglobin düzeyi ve O_2 konsantrasyonu önem taşımaktadır. Bu iki parametre iyonlaşmayı ve SR oluşumunu, dolayısı ile radyasyonun biyolojik etkisini etkilemektedir. Ağır partiküller ise direkt yolla reaksiyona neden olduğundan ortamdaki O_2 konsantrasyonundan bağımsız olarak etkilerini gösterirler (5).

İyonizan radyasyon toplam doz, fraksiyon şeması (günlük doz ve toplam tedavi süresi) ve tedavi edilen volum gibi birbiriyle yakından ilişkili parametrelere bağlı olarak, dokularda farklı etkiler oluşturur (Şekil 3). Bir organın normal dokusunda belirli bir hasar meydana getirebilmek için gereken ışın dozu, organın ışınlanan hacmi küçüldükçe artmaktadır (50).



Şekil 3. RT'nin normal dokular üzerine olan etkilerini belirleyen parametreler (50)

Radyoterapi planı değerlendirilirken tümörlü dokuda maksimum doza çıkılmaya çalışılırken normal doku dozlarının minimum kalması amaçlanmaktadır. Radyasyonun etkileri kronolojik olarak 3 safhaya ayrılır:

Akut etkiler: Akut dönemdeki erken görülen belirtiler hücrelerin hızlı bölünme gibi kinetik özelliklerine ve verilen ışının dozuna bağlıdır. Hızlı bölünen hücrelerin kaybı hiperemi ve ödemle karakterizedir. Radyasyonla hasarlanmış mukoza ve parankim hücrelerinin ölmesi, öncül hücrelerin de bu hasara katılması ve açığı kapatmak için geçici sürede yeterli hücre bölünmesinin olmaması ana nedendir. RT sırasında ya da 6-8 hafta içinde görülür. Kemik iliği, gastrointestinal, orofarengeal, özofageal mukoza ve cildin bazal tabakası gibi hızlı proliferen dokularda görülür. Tolerans dozları (TD) aşılmadığı sürece geri dönüşümlü etkilerdir (51).

Subakut etkiler: Radyoterapiden 2-3 ay sonra görülür. Omurilik ışınlaması sonrası demiyelinizasyon sonucu görülen Lhermitte Sendromu, beyin ışınlaması sonrası görülen somnolans gibi geçici etkilerdir (51).

Geç etkiler: Birkaç ay ile birkaç yıl içinde görülen, yavaş gelişen, ağır seyreden ve iyileşmeyen kalıcı yan etkilerdir. Kemik, yumuşak doku, sinir sistemi gibi hücreleri yavaş proliferen dokularda görülür. Fibrozis, ülserasyon ve nekroz tipik bulgularıdır. Parankimal organlarda geç radyasyon hasarının tipik göstergesi anormal fibrozistir ve bütün organlarda oluşabilir, homojen değildir, şiddet ve yaygınlığı değişkendir. Kollajen ve fibroblastların oluşturduğu fibrinöz eksuda oluşur. Radyasyon fibroblastı denen atipik fibroblastlar geç lezyonlarda ortaya çıkar. Endotelial hücrelerin fokal sitoplazmik erozyonu ve dejenerasyonu yine geç reaksiyonlar olarak karşımıza çıkar. Geç etkilerin oluşumunda ışınlamadan hemen sonra otokrin, parakrin ve endokrin mesajların salınması, patogeneizde moleküler mekanizmaların da rolünün olduğunu düşündürür (52).

Radyasyon sonrası proinflamatuvar ve profibrotik sitokinler olan interlekin-1, tümör nekroz faktörü alfa, transforme edici büyüme faktörü beta salgılanır. Bu sitokinler kollajen I,

III, IV ve fibronektin salınımını uyarır (52). Akut reaksiyonların görülme sıklığı ve şiddeti ile geç reaksiyonların oluşumu arasında ilişki olmadığı düşünülmektedir. Bu durum akut ve geç yan etkiler için hücre sağkalım eğrilerinin farklı oluşundan kaynaklanmaktadır (53). Akut ya da geç yan etkilerin ortaya çıkış süresini ve şiddetini, hücrelerin kinetik özellikleri (proliferasyon hızları), ısınlanan sağlam doku hacmi, verilen toplam doz ve fraksiyon şeması belirler.

Radyasyona bağlı organ hasarının oluşmasında;

1.Organdaki hedef hücrelerin tipi (parankimal, vasküler vb.)

2.Fonksiyonel dağılım (homojen veya heterojen)

3.Fonksiyonel kompartmanların yapısal organizasyonu (paralel veya seri bağlantılı olmaları) önemli parametrelerdir (52).

Tedavi ile ilişkili klinik ve subklinik yan etkiler organdaki hedef hücrelerin parankimal veya vasküler oluşu, organın fonksiyonel dağılımının homojen veya heterojen oluşu ve organın fonksiyonel subünit yapısal organizasyonunun paralel veya seri olması da etkilidir (54).

Seri bağlantılı bir grupta oluşan hasar distalde fonksiyon kaybına neden olurken, paralel grupta herhangi bir bölümdeki hasar, etkilenmemiş bölüm tarafından telafi edilir (50). KT ve RT'nin etkilerini anlamak için hedef organdaki hücrelerin proliferasyon hızının yanında bu organizasyon da göz önünde bulundurulmalıdır (55). Klinik gözlemlere dayanarak çeşitli dokular için tolerans doz tabloları geliştirilmiştir. $TD_{5/5}$ (minimal TD), tedavi sonrası 5 yıl içerisinde %5'den daha az ciddi komplikasyon oranına neden olabilecek radyasyon dozu iken, $TD_{50/5}$ %50 oranında komplikasyona neden olabilecek radyasyon dozudur. (50,56). Kemik için $TD_{5/5}$ ve $TD_{50/5}$ değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Tedavi parametreleri: Tolerans dozları (56)

$TD_{5/5}$ (TEK DOZ)		$TD_{50/5}$ (FRAKSİYONE DOZ)	
Kemik	>30 Gy	Kemik	>70 Gy

TD: Tolerans dozu.

Radyoterapiye bağlı gelişen akut kemik toksisitesinde gözlenen epifizyal kırık hasarı ve kemik patolojisi 0-3 arası dereceler ile sınıflandırılmaktadır (Tablo 2,3).

Tablo 2. Epifizyal kıkırdak hasar dereceleri (19)

Derece	
0	Herhangi bir hasar mevcut değil.
1	Epifizyal kıkırdak normal kalınlıkta; kondrosit sıralarında hafif bir düzensizlik.
2	Epifizyal plakada kalınlaşma; kondrositlerde orta derecede düzensizlik ve kondrositlerde ciddi atipi ile birlikte.
3	Erken düzensiz kemik oluşumunu belirtircesine epifizin kıkırdak dokusunun düzensiz topaklanma ile birlikte kalınlaşmasının ve epifizyal plakanın bazı bölümlerinde kıkırdak doku kaybı oluşmasının görüldüğü kondrositlerin orta dereceden ciddiye doğru atipisi.

Tablo 3. Kemik patoloji dereceleri (19)

Derece	
0	Herhangi bir patoloji mevcut değil.
1	Kemik trabekülde hafif kalınlaşma.
2	Medüller fibrozis ile birlikte veya birlikte olmayan trabekül kalınlaşması ve osteoblastlarda hafif atipi.
3	Medüller fibrozis ile birlikte veya birlikte olmayan trabeküllerde belirgin kalınlaşma ve yer yer dejeneratif alanlar ve orta dereceden ciddiye doğru osteoblast atipisi.

Gelişmiş kemik dokusu yavaş proliferen olan hücrelerden oluştuğu için, radyasyona dirençli bir organdır. Radyasyon hasarının kemikte görülen primer etkisi atrofidir. Kemik hücrelerinin radyasyona cevabı yüksek dozlarda nekroz indüksiyonu, düşük dozlarda ise apoptozis indüksiyonu şeklinde olur. Nekroz ancak 60-70 Gy gibi yüksek dozlarda görülebilir ve iyileşmesi güç olan en önemli kalıcı yan etkidir. Kemikteki radyasyon sonrası atrofik değişiklikler, hücresel ve damarsal hasar kombinasyonunun sonucu olarak oluşur. Osteoblastlardaki hasar sonucu matriks yapımının azalması, primer histopatolojik olaydır. Atrofinin ilk radyografik bulgusu, lokalize osteopenidir ve çoğu kez geç görünür hale gelir. Bunun nedeni demineralizasyonun belirlenmesinde radyografinin göreceli olarak duyarsız olmasıdır (8).

Klinikte uygulanan dozlarda radyasyon, olgun kemik matriksinin osteoindüktif özelliğini bozmaz (6). Bununla birlikte matriksin morfogenetik özelliklerinin denatürasyonu ve destrüksiyonu kaçınılmazdır (7). Bunun sonucu olarak kemik yapımı ve yenilenmesi düzensizleşir. Kortikal kemiğin belirgin yüzey yapıları ise radyasyondan etkilenmez. Radyasyonun kemik doku üzerine yaptığı hasar esas olarak kapillerdeki aterosklerotik-

antianjiojenik ve kollajen dokudaki fibrojenik etkilerle gerçekleşir (57-60). Bu süreçlerin sonucunda kanlanmanın bozulması, nekroz gelişimini hızlandırır. Histopatolojik olarak osteosit sayısında azalma, osteoblastik aktivitede baskılanma ve vasküleritede azalma gözlenir (61). Bu etkiler salınan sitokinler aracılığı ile artmaktadır. Ayrıca osteoblastlardan salgılanan anjiojenik büyüme faktöründeki değişimler nedeni ile de anjiojenik yanıtın azaldığı görülmüştür (62). Yüksek dozlarda radyasyonun epifizlerde büyümeyi durdurduğu, fraktürün iyileşmesini geciktirdiği, fibröz birleşmenin insidansını artırdığı ve osteoradyonekroza neden olduğu gösterilmiştir. Kemik yapımını önleyen bu özelliği nedeniyle RT terapötik olarak heterotopik kemik formasyonunu (miyozitis ossifikans) önlemede kullanılır (61).

ANTIOKSİDANLAR

Protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek biyolojik moleküllerin oksidasyonunu önleyen maddelere antioksidan denilir. Antioksidanlar SR'lerin oluşumunu engelleyerek veya ortamdan temizlenmesini sağlayarak etki gösterirler. SR ile antioksidanlar arasındaki dengenin korunması, organizmanın canlılığını sürdürmesi açısından önemlidir (63).

Radyasyonun tümörde olduğu gibi normal hücrelerde de SR oluşturarak yaptığı hasarı, SR temizleyici ajanlar kullanarak önlemek mümkün olabilir. Aynı mekanizma sitotoksik ajanlarla yapılan KT'nin yan etkilerini azaltmak için de kullanılabilir. Kanser tedavisinde normal dokuları RT ve KT'nin yan etkilerinden korumak, ancak bunu antitümöral etkinliği azaltmadan yapabilmek çok önemlidir. Bu etkinliği sitoprotektif ajanların kullanılması ile sağlamak mümkündür (63).

AMİFOSTİN

Amifostin (S-(N-(3-aminopropil)-2-aminoetiylol) sisteamin benzeri bir moleküldür. Soğuk savaş döneminde Amerika Birleşik Devletleri ordusuna bağlı Walter Reed Ordu Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülen ve askerleri cephedeki nükleer silah kaynaklı radyasyondan korumak amacını taşıyan çalışmaların ürünüdür. Bu program tarafından geliştirilen ve tiyol içeren bileşikler Walter Reed'in kısaltılmasıyla "WR" ön eki ile tanımlanmışlardır. Öngörülen amaçla kullanıma uygun olmadığı anlaşıldıktan sonra amifostin tıbbi araştırmalar için kullanılmış, RT ve KT'ye bağlı normal doku hasarlarının önlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (12,13,64). Şekil 4'de AMI'in kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 4. Amifostinin kimyasal yapısı (65)

Suda çözünebilen beyaz kristalize toz şeklinde, molekül ağırlığı 214.22 Da olan bir moleküldür (66).

Yapısındaki fosfor, amifostini inaktif formda tutarken, sülfür SR temizleyici özellik kazandırır. AMI (inaktif formu olan WR-2721), plazma membranında ALP sayesinde defosforilasyona uğrayarak aktif formu olan WR-1065 formuna dönüşür. Aktif ve en önemli metaboliti olan WR-1065 inorganik bir fosfat olup hücre içine girdikten sonra, yine SR temizleyici özelliği olan metabolitlerine dönüşmektedir. WR-1065'in oksidasyonu ile en fazla oluşan metabolit WR-33278 (simetrik disülfid) olup, az miktarda mikst disülfidler de oluşmaktadır (65).

Amifostinin major aktif metaboliti olan WR-1065 sitoprotektif etkisini en az üç değişik mekanizmayla gerçekleştirir. Bunlardan birincisi direkt bağlanma yoluyla antineoplastik elemanların aktif derivasyonlarını detoksifiye etmesidir (66-68). İkincisi ilaç ya da radyasyon ile indüklenmiş OSR'ni aktive etmesidir (66-71). Üçüncüsü ise radyasyon ya da antineoplastik ilaç uygulaması sonrası, hasarın indüklediği apoptozisi azaltmasıdır (66,67,73,74).

Amifostin radyasyonun etkinliğini tümör dokusunda azaltmadığı halde normal dokuda azaltır bu sayede AMI kullanımı ile RT'nin tümör üzerindeki etkisi azaltılmadan istenen tümör kontrolü sağlanmış olur (75).

Hayvan deneyleri ve insan çalışmaları ALP, pH 7 üzerinde aktif olduğunu göstermiştir. ALP çeşitli doku arteriol endotel hücrelerinde, böbrek proksimal tübülüs hücrelerinde ve ince barsak mikrovilluslarında bolca miktarda bulunur. ALP aracılı aktif transport çok hızlı gerçekleşir. Bunun nedeni, AMI'in plazma proteinlerine bağlanmaması ve metabolizmasının büyük oranda ALP aracılı aktif transporta uğramasıdır (65). Tümörler göreceli olarak hipovaskülerdir ve hipoksik bir ortama ve düşük interstisyel pH'a sahiptirler. Ayrıca malign dokularda ALP ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir. Ortaya çıkan bu kombinasyon tümör hücrelerinde aktif ilaç akümüülasyonunun düşük olmasını sağlamaktadır. Bu nedenle AMI normal dokuları tümör dokularına kıyasla, hücre içi serbest tiyol konsantrasyonu farklılığı sayesinde, 100 kat kadar daha fazla koruyabilmektedir (76).

Faz II çalışmalar ile AMI'in tolerabl doz aralığı 740-910 mg/m² olarak belirlenmiştir. AMI oral kullanıldığında aktif değildir. 15 dakikalık intravenöz (iv.) infüzyon sonrası ortalama maksimum plazma konsantrasyonu 0,1-0,235 mmol/l'dir. İlacın dağılım hacmi 6,44 l, plazma klirensi 2,17 dakikadır (77).

Farmokokinetik çalışmalar, hastalarda AMI'in plazma kompartmanından hızla temizlendiğini göstermiştir. İnsanlarda iv. yoldan verilmesinin ardından ilk 6 dakikada AMI'in yaklaşık %90'ı metabolize olur. Yapılan çalışmalarda AMI'in α yarı ömrü (dağılım yarı ömrü) <1 dakika; β yarı ömrü (eliminasyon yarı ömrü) = 8.8 dakika olarak saptanmıştır. WR-1065 metaboliti enjeksiyondan 10-30 dakika sonra pik düzeyine ulaşır (65). Bu nedenle, normal dokuların sitoproteksiyonunda optimum yarar sağlanabilmesi için RT ya da KT uygulamasından 20-30 dakika önce AMI uygulanması gerektiği belirlenmiştir (78).

Amifostin tarafından korunduğu bilinen normal dokular böbrek, akciğer, yemek borusu, periferik sinirler, kemik iliği, ince barsak, kalın barsak, immün sistem, tükürük bezleri, ağız mukozası, kalp ve testisler (76). AMI'in intraperitoneal (ip.) olarak verildiği tek ya da fraksiyone dozlarda RT uygulanan 4-5 haftalık ratlarda, RT sonucu görülen büyüme durmasına karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (79). Ayrıca uzun ve kraniofasiyal kemiklerin büyümesinde RT'ye bağlı meydana gelen gecikmede AMI'in radyoprotektör etkisi gösterilmiştir. Osteoblast, endotel ve fibroblast gibi hücrelerin sayısını korumada da etkinliği gözlenmiştir (11).

Amerikan Klinik Onkoloji Derneği Rehberleri, sitoprotektif ajan olarak AMI'in günlük 200 mg/m² dozda iv. yavaş olarak en az 3 dakikada, her RT fraksiyonundan 15-30 dakika önce verilmesini önermektedir (80). Bu düşük dozda yan etkilerin görülme riski de azaltılmış olmaktadır (80).

Gevorgiyan ve ark. (11) 10-15 Gy uygulanan tek doz radyasyon ile osteoblastların sayısının ve proliferasyonunun azaldığını göstermiştir. Uzun ve kraniofasiyal kemiklerin büyümesinde RT'ye bağlı meydana gelen gecikmeyi önlemede AMI'in radyoprotektör etkisi gösterilmiştir. Ayrıca osteoblast, endotel ve fibroblast gibi hücrelerin sayısını korumada da etkinliği gözlenmiştir.

Tamurian ve ark. (16)'nın çalışmasında, diz çevresine verilen tek doz 12.5 ve 17.5 Gy RT öncesinde 100 mg/kg ip. AMI uygulanmıştır. RT öncesi uygulanan AMI'in; büyümeyi istatistiksel anlamlı olarak koruduğu gösterilmiştir.

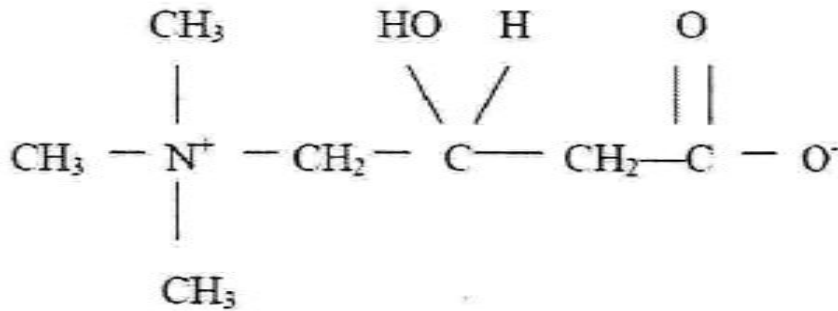
Amifostin genellikle iyi tolere edilmektedir. Bunun yanında doz ile ilişkili geçici yan etkiler (hipotansiyon, bulantı, kusma, hıçkırık, somnolans, infüzyon sırasında metalik tat hissi, döküntü, ateş ve anafilaktik şok gibi alerjik reaksiyonlar) görülmektedir (77). Klinik

olarak anlamlı yan etki çoğunlukla hipotansiyondur. Hastaların %60'ında geçici hipotansiyon oluşmaktadır, fakat tedaviye ara verilecek şiddette hipotansiyon oluşturması nadirdir (<%5). Bulantı AMI uygulanmasından önce kullanılacak güçlü bir antiemetik rejimi ile azaltılabilmektedir. Paratiroid hormon salgılanmasının inhibisyonu ile ortaya çıkan geçici hipokalsemiler de bildirilmiştir. Klinik olarak anlamlı bir hipokalsemi tek doz AMI uygulamasını takiben yaygın değildir. Ancak günlük RT ile birlikte birden çok uygulamanın yapıldığı hastalarda periyodik kalsiyum düzeyi izlenmelidir. AMI'in subkutanöz (sc.) uygulanması ile ilgili yapılan çalışmalar iv. uygulamadan daha az sıklıkta hipotansiyon, bulantı kusma olduğunu göstermiştir (81). Bununla beraber AMI'in sc. uygulanmasının iv. uygulamaya göre daha fazla oranda ateş ve cilt reaksiyonları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. AMI tiyol bileşiklerine ya da mannitole karşı hipersensitivitesi olduğu bilinen kişilerde kontrendikedir (82,83).

Amifostinin genişletilmiş klinik kullanım profilleri ise radyoproteksiyon, kemoproteksiyon, kemik iliği stimülasyonu, radyoprevensiyon ve kemoprevensiyondur (12,64).

KARNİTİN

İlk olarak 1905 yılında Frankell tarafından karnitinin biyolojik tayini için yöntem geliştirilmiş ve kas dokusundan elde edildiğinden Latince *carnis* kelimesinden yola çıkılarak karnitin adı verilmiştir. 1960'lı yıllarda biyolojik yapısı tam olarak aydınlatılmış ve 3-hydroxy-4-N-trimethyl ammonia butaonate olduğu gösterilmiştir. Karnitinin fizyolojik formu L(-) izomeri yani levokarnitindir (84). Propionyl-L-carnitin (PLC) ve acetyl-L-carnitin (ALC), Karnitinin kısa zincirli esterleridir (85). Karnitinin kimyasal yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Karnitinin kimyasal yapısı (85)

L-karnitin vitamin benzeri bir maddedir ve yapısal olarak aminoasitlere benzemektedir. KAR'in yaklaşık olarak %75'i besinlerden, %25'i endojen olarak sentezlenir (86). Diyetteki başlıca kaynakları et ve süt ürünleridir (87).

Sağlıklı bireylerdeki plazmadaki serbest KAR düzeyi 40-50 $\mu\text{mol/l}$ 'dir. Toplam vücut KAR'in %90'ından fazlası iskelet kasında tutulur. Kalan kısımları ise karaciğer, böbrek ve kalp gibi organlardadır. %1'den azı da plazma ve eritrositlerde bulunur (87). Normal plazma konsantrasyonunda, filtre edilen KAR'in %90'dan fazlası böbrek tarafından reabsorbe edilir. Anlamlı metabolik yıkıma uğramaz (86).

Intrasellüler önemli fonksiyonları şunlardır:

1.Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri membranından içeri transferini gerçekleştirerek mitokondrial yağ asidi oksidasyonunda kofaktör olarak yer alır.

2.Dallı-zincirli α -keto asit oksidasyonunu kolaylaştırır.

3.Karaciğerde, β -oksidasyon ile kısa zincirli hale gelmiş açıl kısmının peroksizomların dışına çıkarılmasını sağlar.

4.Memeli hücrelerinde, açıl-CoA/CoA sülfidril oranını ayarlar.

5.Akut metabolik kriz sırasındaki esterifikasyon nedeniyle büyük miktarda artabilen ve potansiyel toksik olan açıl-CoA metabolitlerini yakalar (86).

L-karnitin karbonhidrat, glukoz ve lipid metabolizmasında rol alan bir amin bileşiğidir. Uzun zincirli yağ asitlerinin dokularda enerji substratı olarak kullanılabilmesi için gereklidir. Yağ asidi, iskelet ve kalp adalesi gibi bir çok sistem için primer enerji kaynağıdır ve KAR yağ asitlerinin mitokondrial membran içine girişini kolaylaştırarak enerji temininde önemli rol oynar. Enerji üretiminde çok etkili metabolik yol olan β oksidasyonda rol alan KAR, özellikle yüksek enerji ihtiyacı olan dokular için önemlidir. Hücre membran stabilizasyonunda, kas kontraktibilitesinde ve kalp fonksiyonlarında etkilidir (88,89). Ayrıca OSR'lerin temizlenmesinde görev alır (85). SR'leri yakalama özelliğinden dolayı aynı zamanda antioksidan olarak etki eden KAR'in vejeteryan tarzı beslenme ile eksikliği görülebilir (18). KAR seviyesi yaş ile azalır ve eksikliğinde örneğin kardiyomiyopati ve iskelet kas zayıflığı görülebilir (90,91). KAR ve esterleri doğal maddelerdir ve oral uygulama ile de iyi tolere edilebilirler. KAR'in ilaç formunda oral olarak 1-6 gr'lık dozlarda alınmasından sonra biyoyararlanımı %5-18'dir. Buna karşın besinlerle alınan düşük miktarlardaki KAR'in biyoyararlanımı %75 gibi oldukça yüksektir. İntravenöz uygulamadan sonra, ilk dağılım volumu yaklaşık olarak 0.2-0.3 l/kg'dır. KAR esas olarak renal yoldan atılır (92).

İnsanlarda yüksek dozda KAR alımına bağlı toksisite bildirilmemiştir. Hayvanlarda ise letal doz (LD50) 19.2 gr/kg'dır. Doz çalışmaları ile bir seferde 2 gr'dan fazla verilmesinin kan

konsantrasyonunu değiştirmediği gösterilmiştir. KAR ile yapılan proteksiyon amaçlı çalışmalarda, 100-300 mg/kg/gün doz aralığı kullanılmıştır (93). KAR ve esterlerinin birçok farmakolojik etkilerinin yanında terapötik yararları da gösterilmiştir. Örneğin; SR'leri temizleme özellikleri sayesinde, ATP yapımında artış ve mitokondrial fonksiyonlarda düzelme yaptıkları gözlenmiştir (94). ALC, ülser oluşumunda alkolün etkisine karşı koruyucu etkiye sahip olduğu gibi, paklitaksel ve sisplatin KT'si ile oluşan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkiye sahiptir (95,96).

Uzun süreli diyaliz uygulamalarından sonra plazma ve doku KAR düzeylerinin anlamlı ölçüde azaldığı bilinmektedir. Bunun nedeninin KAR'ın diyalizle uzaklaştırılması olduğu gösterilmiştir. Gerçekten de hemodiyalizden hemen sonra plazma KAR düzeyi %75 civarında azalmaktadır. Bu azalma öncelikle karaciğerden, az miktarda ise kaslardan geçiş ile kompanse edilir. KAR'ın kaslardan plazmaya geçişi oldukça yavaş olmasına rağmen, karaciğerden damar içine geçişi daha kolaydır. Bu nedenlerle plazma KAR seviyeleri doku düzeylerini yansıtmaktan uzaktır (97). Yapılan bir çalışmada, hemodiyalize başladıktan 1 ay sonra plazma KAR'ın normal seviyenin %30'u düzeyine indiği, 1 yıl sonra ise yine normalin %40 altına indiği gösterilmiştir (98). Hemodiyaliz hastalarında KAR'ın iv. verilmesinin diyaliz sırasında hipotansiyonu azalttığı, miyokardı koruduğu, anemi oluşumunu engellediği, kas gücü ve egzersiz kapasitesini olumlu etkilediği bildirilmektedir (99). Cavallini (100)'nin yaptığı çalışmada belirttiği gibi roloji literatüründe, özellikle sperm hareketliliğini arttırması ile ilgili olarak infertilitede kullanımı ve libidoyu arttırdığı, cinsel disfonksiyonlarda düzelme sağladığı ve testosteron düzeyini de arttırabileceği bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada KAR'ın testosteron düzeyine etkisi olmadığı görülmüştür.

Yaşa bağlı kemik kaybı osteoblast aktivitesinin azalması ile karakterizedir. Enerji retiminde azalmaya bağlı olabilir. KAR derivelerinin yaşa bağlı kemik kaybını azalttığı ve osteoblast aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. KAR türevlerinin insan osteoblast proliferasyon ve diferansiyasyonuna pozitif etkisi gösterilmiştir. Bazı alışmalar kemikte major yakıt maddesinin glukoz olduğunu gösterse de, yeni çalışmalar osteoblastik hücrelerde yağ asidi oksidasyonu sayesinde enerji ihtiyacının %40-80'inin sağlandığını göstermiştir (101).

Radyasyon sırasında vücutta ortaya çıkan OSR'leri; lipitler, proteinler ve nükleik asitler üzerinde hasarlara neden olur. Hücre membrandaki lipid komponentin peroksidasyonunun, özellikle radyasyon hasarına duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ek olarak membran lipit peroksidasyonu, radyasyona bağlı hücre ölümü ile ilişkilidir. Bu etki membran transportu akıcılığındaki ve bazı membran enzimlerinin aktivitelerindeki değişime bağlıdır. KAR'ın, radyasyonun sebep olduğu SR'ler ile oluşan hücresel hasarda modlatr bir rol

oynadığı düşünülmektedir (18). Hamsterlerde tüm vücut ışınlaması sonuçlarını inceleyen bir çalışmada, anlamlı olarak karaciğer ve plazma malondialdehit seviyeleri ile karaciğer glutatyon seviyelerinde azalma olduğu ve bu etkilerin KAR ile tersine çevrildiği gösterilmiştir. Tüm vücut RT'si uygulanan ratlarda, akciğer ve karaciğer dokularında yükselen malondialdehit, plazmada yükselen karaciğer enzimleri ile trigliserit ve kolesterol seviyelerinde KAR ile anlamlı azalma olduğu da gösterilmiştir. Bu sonuçların ALC'nin antioksidan etkileri sayesinde membran permeabilitesini koruyarak oluştuğu bildirilmiştir (85).

Ratlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada 5 fraksiyonda toplam biyolojik eşdeğer doz 60 Gy olacak şekilde tüm beyin ışınlaması yapılmış ve her fraksiyondan önce 100 mg/kg/gün ip. KAR uygulamasının RT'ye bağlı oluşan koklea hasarını önlemedeki etkisine bakılarak, bu hasarı düzeltebildiği gösterilmiştir (102).

L-karnitin linoeik asit peroksidasyonunu inhibe ederek ve SR'leri ortadan kaldırarak, radyasyonun neden olduğu oral mukoziti ve myelosupresyonu histopatolojik olarak azaltmaktadır (103).

Yürüt Çaloğlu ve ark. (19)'nın yaptığı çalışmada KAR'ın RT görmüş epifizyal kıkırdak üzerine etkisi AMI ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada histopatolojik incelemede RT öncesi uygulanan KAR ve AMI'in, RT grubu ile karşılaştırıldığında AMI+RT ve KAR+RT gruplarında kemik büyümesini ve epifizyal kartilajı istatistiksel anlamlı olarak benzer oranda koruduğu gösterilmiştir.

Hooshmand ve ark. (104) L-karnitin (-) diyet ile beslenen sıçanlara kıyasla KAR (+) diyet ile beslenenlerde tibia kemik mineral dansitesinde anlamlı derecede artış gösterdiler.

Yapılan çalışmalarda KAR'ın böbrekte, retinada, spinal kordda, kalpte, iskemi ve reperfüzyon sonrası oluşan oksidatif hasarlara karşı organları koruduğu gösterilmiştir (102).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi (TÜTF) Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmamız Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (TÜHDYEK)-2012/51 protokolü ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Ek 1).

ÇALIŞMA GRUPLARI VE DENEY

Çalışmada ortalama ağırlıkları 170-200 gr olan, 3 aylık, Wistar Albino cinsi 30 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Tüm ratlar, deneyin sonuna kadar 8'er ratlık kafeslerde, %50-60 nem oranı, 22 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat gece ve 12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda saklandı. Ratların günlük temizlikleri yapıldı. Ratların tümüne %20 protein içeren yem ve su verildi. Çalışma süresince günlük takibi yapıldı. Çalışmada 4 grup oluşturuldu:

1. Grup I: Yalnız serum fizyolojik (SF) (200 mg/kg ip.) verilen (KONT) grup (6 rat)
2. Grup II: Yalnız RT uygulanan grup (8 rat) (RT'den 30 dakika önce 200 mg/kg SF'nin ip. olarak uygulanması ile birlikte)
3. Grup III: Amifostin+RT (AMI+RT) (radyoterapiden 30 dakika önce 200 mg/kg ip.) uygulanan grup (8 rat)
4. Grup IV: L-karnitin+RT (KAR+RT) (radyoterapiden 30 dakika önce 300 mg/kg ip.) uygulanan grup (8 rat)

Çalışmada kontrol ve deney grubundaki tüm hayvanlar gruplarına göre numaralandırıldı. Çalışmanın başında, aynı stresi oluşturmak amacı ile tüm gruplara aynı

yöntemle anestezi uygulandı ve aynı yöntemle AMI, KAR veya SF uygulaması yapıldı. RT, AMI+RT ve KAR+RT gruplarının femur bölgesine eksternal RT uygulandı. RT grubundaki hayvanlara RT öncesi intraperitoneal (ip.) SF uygulandı. AMI+RT grubundaki hayvanlara RT'den 30 dakika önce ip. olarak 200 mg/kg AMI, KAR+RT grubundaki hayvanlara RT'den 30 dakika önce ip. olarak 300 mg/kg KAR uygulandı. RT'nin tamamlanmasından sonra hayvanlar genel durum takibi ardından 5. gün sakrifiye edildi. Tüm gruplardaki ratlara anestezi uygulandıktan sonra sol femur çıkartıldı ve histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehitin içine kondu.

ANESTEZİ YÖNTEMİ

Deneklere 50-60 mg/kg ketamin (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) ile intramüsküler (im.) olarak anestezi uygulandı.

RADYOTERAPİ UYGULAMASI

Her bir rat anestezi sağlandıktan sonra pron pozisyonunda mavi köpük (Styrofoam, Med-Tec, Orange City, IA) üzerine sabitlendi. Simülatör (Simics 2, Mecaserto SA, Fransa) kullanılarak sol femuru içeren 4x3 cm boyutlarında bir alan simüle edildi. Kaynak-cilt mesafesi 80 cm olmak üzere 1 cm yarı kalınlığında doz hesaplanarak 0,5 cm bolus kullanılarak belirlenen alana Co- 60 (Cis-Bio marka Cirrus) cihazı ile γ ışını kullanılarak tek fraksiyonda 129,13 cGy/dk doz hızında 20 Gy eksternal RT uygulandı.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Dokular 24 saatlik formaldehit tespitinden sonra diseke edildi ve 24 saat için %10'luk formik asit içine kondu. Dokular alkol içinde işleme alındıktan sonra parafine gömülerek 5 μ kalınlığında kesitler alındı. Kesitler hematoksilen-eozin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda (Nikon E400, Japan) incelendi.

Proksimal femur örnekleri proksimal diafiz, epifiz ve metafiz içermekte idi.

Epifizyal kırıkda hasarı; 0, herhangi bir hasar mevcut değil; 1, epifizyal kırıkda normal kalınlıkta, kondrosit sıralarında hafif bir düzensizlik; 2, epifizyal plakada kalınlaşma, kondrositlerde orta derecede düzensizlik ve kondrositlerde ciddi atipi ile birlikte; 3, erken düzensiz kemik oluşumunu belirtircesine epifizin kırıkda dokusunun düzensiz topaklanma ile birlikte kalınlaşmasının ve epifizyal plakanın bazı bölümlerinde kırıkda doku kaybı oluşmasının görüldüğü kondrositlerin orta dereceden ciddiye doğru atipisi şeklinde

derecelendirildi. Kemik patolojisi; 0, herhangi bir patoloji mevcut değil; 1, kemik trabekülde hafif kalınlaşma; 2, medüller fibrozis ile birlikte veya birlikte olmayan trabekül kalınlaşması ve osteoblastlarda hafif atipi; 3, medüller fibrozis ile birlikte veya birlikte olmayan trabeküllerde belirgin kalınlaşma ve yer yer dejeneratif alanlar ve orta dereceden ciddiye doğru osteoblast atipisi şeklinde derecelendirildi (19).

İstatistiksel değerlendirme, AXA507C775506FAN3 seri numaralı STATISTICA AXA 7.1 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel önemlilik derecesini belirlemek için Kruskal-Wallis varyans analizi ve anlamlı çıkanlara ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p<0.05$ alındı.

BULGULAR

Çalışma; KONT grubunda 6 hayvan, yalnız RT yapılan grupta 8 hayvan, AMI+RT grubunda 8 hayvan, KAR+RT grubunda 8 hayvanın sakrifiye edilmesi ile tamamlanmıştır. Histopatolojik verileri değerlendirilmiştir.

Akut kemik hasarı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda farklı idi ($p<0.0001$). Radyoterapiye bağlı gelişen derece 3 hasar sadece RT alan grupta görüldü. Derece 3 hasar AMI+RT grubu ve KAR+RT gruplarında görülmedi. AMI+RT grubundaki 3 hayvanda herhangi bir hasar yoktu ve 3 hayvanda sadece derece 1 hasar vardı. KAR+RT grubundaki 4 hayvanda herhangi bir hasar yoktu ve 3 hayvanda derece 1 hasar vardı. Bu grupta derece 2 hasar sadece 1 hayvanda görüldü. RT grubunda KONT grubu ile karşılaştırıldığında ışınlanan femurda anlamlı derecede yüksek kemik hasarı vardı ($p=0.001$). RT grubu ile karşılaştırıldığında RT tedavi öncesi AMI ve KAR uygulaması ile RT'ye bağlı gelişen kemik hasarı azalmıştır ($p=0.003$ ve $p=0.001$). AMI+RT ve KAR+RT gruplarındaki kemik hasarı KONT grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). KAR'ın kemik üzerinde koruyucu etkisi AMI ile benzer idi ($p>0.05$) (Tablo 4).

Akut epifizyal kırık hasarı gruplar arasında anlamlı derecede farklı idi ($p<0.0001$). RT grubundaki 5 hayvanda derece 3, 2 hayvanda derece 2 ve 1 hayvanda derece 1 akut epifizyal kırık hasarı vardı. Derece 3 epifizyal kırık hasarı AMI+RT grubu ve KAR+RT gruplarında görülmedi. AMI+RT grubundaki 3 hayvanda herhangi bir hasar yoktu ve 3 hayvanda derece 1 hasar vardı. KAR+RT grubundaki 4 hayvanda herhangi bir hasar yoktu ve 3 hayvanda derece 1 hasar vardı. Derece 2 hasar AMI+RT grubunda 2 hayvanda ve KAR+RT grubunda sadece 1 hayvanda görüldü. RT grubunda KONT grubu ile karşılaştırıldığında ışınlanan femurda anlamlı derecede yüksek epifizyal kırık hasarı vardı

($p=0.001$). RT grubu ile karşılaştırıldığında RT tedavi öncesi AMI ve KAR uygulaması ile RT'ye bağlı gelişen epifizyal kırık hasarı azalmıştır ($p=0.003$ ve $p=0.001$). AMI+RT ve KAR+RT gruplarındaki epifizyal kırık hasarı KONT grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). KAR'ın epifizyal kırık üzerinde koruyucu etkisi AMI ile benzer idi ($p>0.05$) (Tablo 4).

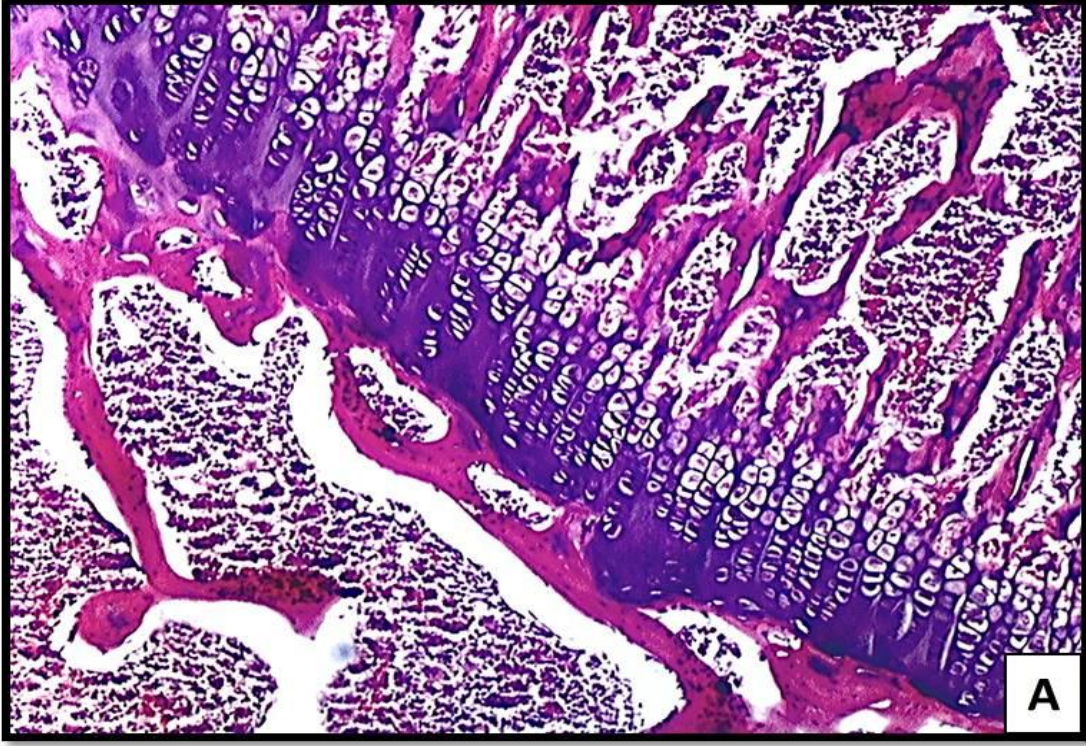
Tablo 4. Hasar derecesine göre her bir grubun patolojik hasar sıklığı

	KONT (n=6)	RT (n=8)	KAR+RT (n=8)	AMI+ RT (n=8)	p değeri
Kemik hasarı					
Derece 0	6	-	4	3	<0.0001
Derece 1	-	1	3	3	
Derece 2	-	2	1	2	
Derece 3	-	5	-	-	
Epifizial kırık hasarı					
Derece 0	6	-	4	3	<0.0001
Derece 1	-	1	3	3	
Derece 2	-	2	1	2	
Derece 3	-	5	-	-	

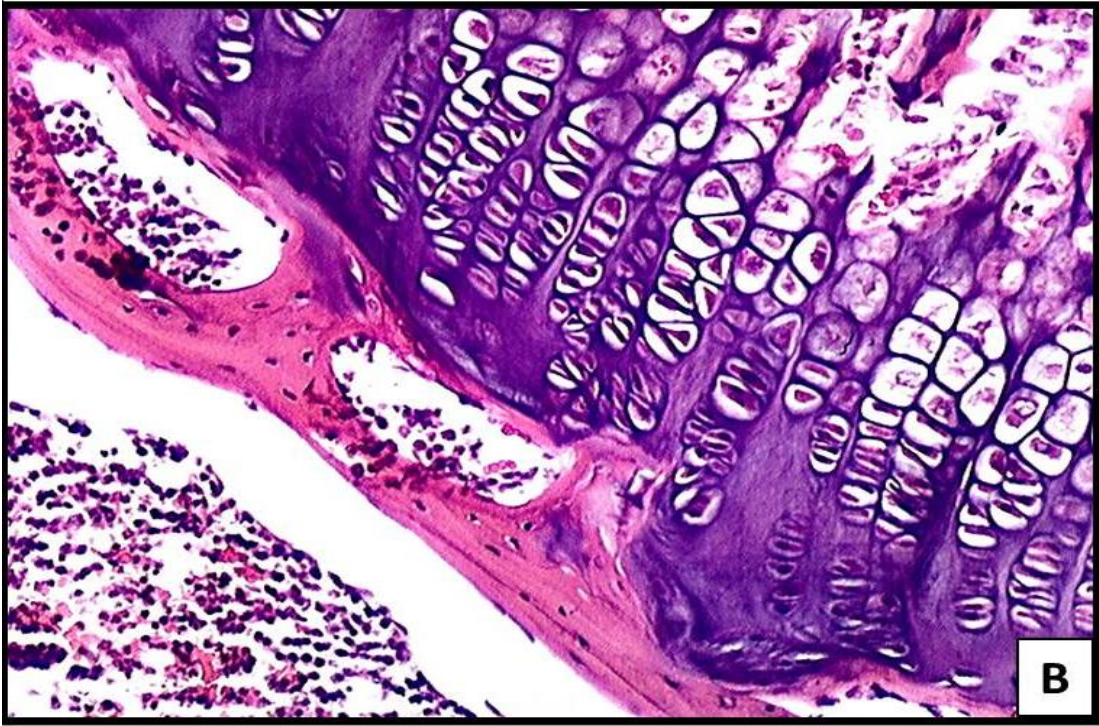
KONT: Kontrol; RT: Radyoterapi; KAR: Karnitin; AMI: Amifostin.

İstatistiksel değerlendirme, AXA507C775506FAN3 seri numaralı STATISTICA AXA 7.1 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel önemlilik derecesini belirlemek için Kruskal-Wallis varyans analizi ve anlamlı çıkanlara ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p<0.05$ alındı.

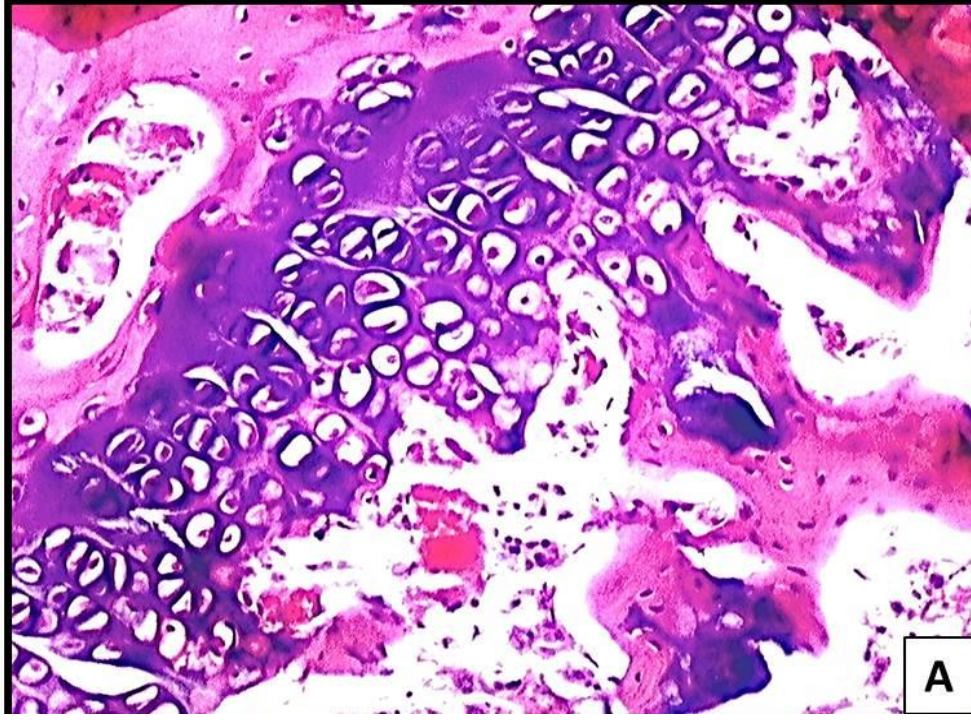
Histopatolojik bulgulara örnekler, Şekil 6-10'da verilmiştir.



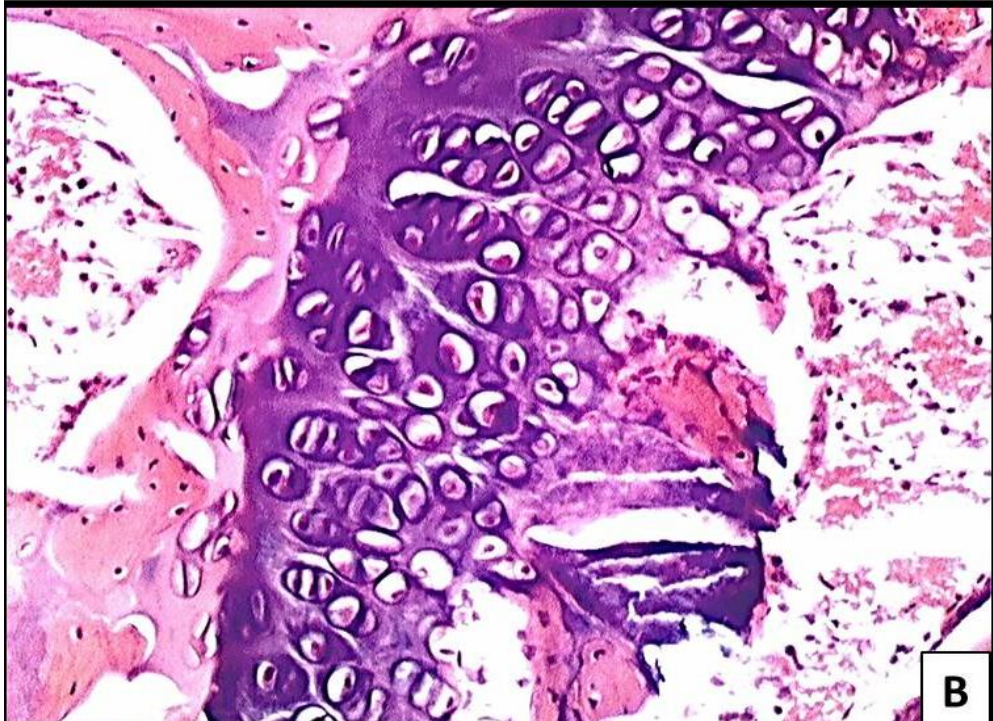
Şekil 6. Epifizyal plakanın normal kalınlığı ve düzenli kondrosit sıraları dikkati çekmektedir (Hematoksilen-eosin, X100).



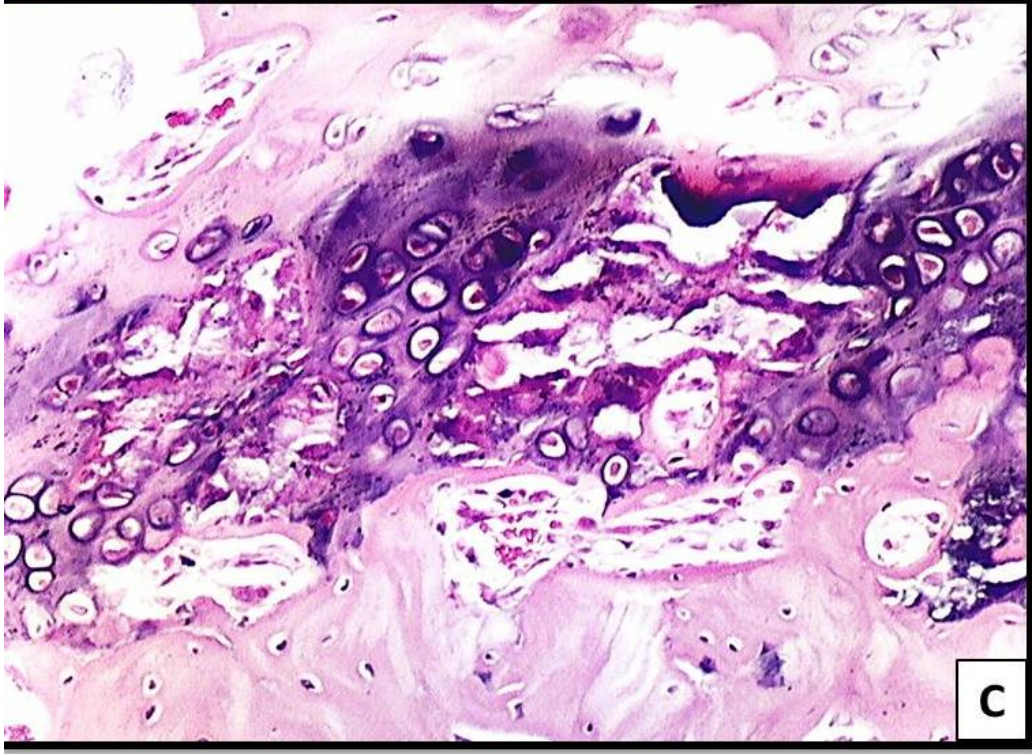
Şekil 7. Epifizyal plakanın normal kalınlığı ve düzenli kondrosit sıraları dikkati çekmektedir (Hematoksilen-eosin, X200).



Şekil 8. L-karnitin+Radyoterapi grubundaki hafif-orta derece hasar dikkati çekmektedir (Hematoksilen-eosin, X200).



Şekil 9. Amifostin+Radyoterapi grubundaki hafif-orta derece hasar dikkati çekmektedir (Hematoksilen-eosin, X200).



Şekil 10. Yalnız radyoterapi grubundaki ciddi hasar dikkati çekmektedir (Hematoksilen-eosin,X200).

TARTIŞMA

İyonizan radyasyon; meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, baş boyun kanserleri, rektal-anorektal karsinoma, lenfoma, Ewing sarkomu, yumuşak doku sarkomu gibi pek çok malignitenin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (2). RT'nin amacı, hedef volume istenilen dozu homojen ve tam olarak verirken, çevre normal dokuların maksimum korunmasını sağlamaktır (2). RT planlamasında normal dokular, mümkün olduğu kadar ışın alanı dışında bırakılarak korunmaya çalışılsa da kaçınılmaz olarak belirli bir miktar sağlam doku hedef volum içerisinde yer alır ya da hedef volum dışında kalsa da ışın alanlarından kayda değer miktarda doz alır. Kemiğe radyasyon hasarının primer sonucu atrofidir ve bu durum vasküler ve sellüler hasar kombinasyonunun sonucudur. Osteoblasttaki bu hasar matriks yapımının azalması ile sonuçlanır (8). RT'ye bağlı gelişebilecek bu hasarlar klinikte stres kırıkları, kemik bütünlüğünün bozulması ve eklem harabiyeti olarak karşımıza çıkan önemli bir sorundur (1,2). Çalışmalar göstermiştir ki anüs, serviks veya rektum karsinomu gibi nedenlerden ötürü pelvik RT alan kadınlarda kalça kırık riski RT almayan kadınların 3 katıdır (3). RT sonrası gelişen bu kırıklarının tedavisi, yüksek oranda kaynama gecikmesi veya kırıkların kaynamaması ile sonuçlanabilen oldukça zor bir tedavidir. İnternal fiksasyon ve konvansiyonel kemik grefti ile cerrahi tedaviler sınırlı bir başarıya sahiptir. Bütün teknolojik gelişmelere rağmen RT'ye bağlı oluşan gerek akut gerekse geç yan etkileri tümüyle ortadan kaldırmak mümkün olmamaktadır. RT öncesi radyoprotektörlerin profilaktik kullanımı, kemik hasarını azaltmada alternatif bir stratejidir.

Öte yandan küratif olarak uygulanan yüksek doz RT'nin bir diğer önemli ve iyileşmesi güç kronik yan etkisi de osteonekrozdur (105). Ekstremiteler koruyucu olarak opere edilemeyen ve amputasyonun reddedildiği durumlarda veya kafa ve gövde kemiklerindeki yerleşimleri

nedeni ile tam olarak çıkartılamayan kemik tümörlerinin tedavisinde, rezeksiyon öncesi veya sonrasında KT'nin yanında RT'nin de uygulanması gerekli olmaktadır. Ancak osteosarkom ve kondrosarkom gibi başlıca kemik tümörleri radyodirençlidir ve kür elde etmek için yüksek dozlarda RT'ye ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca çocukluk çağı kanserlerinde RT'nin düşük dozlarda uygulanmasına rağmen, eğer ışın alanı gelişmesini tamamlamamış uzun kemikler, vertebra, klavikula ve mandibula gibi bölgeleri içeriyorsa önemli deformitelere yol açabilmektedir. Klinik deneyimler göstermektedir ki RT'ye bağlı osteonekrozun, büyüme geriliğinin ve deformitelerin tedavisi güçtür. Osteonekroz tedavisinde kullanılan pentoksifilin, misoprostol gibi ajanlar lezyon meydana geldikten sonra iyileşme sağlayamamaktadır. Literatürde hiperbarik oksijenle geçici de olsa, düşük düzeyde bir iyileşme bildirilmektedir (106).

Bu çalışmada RT'ye bağlı gelişen akut kemik toksisitesini önlemede KAR ve AMI'in potansiyel koruyucu etkilerini inceledik. Çalışmamızda, 3 aylık gelişimini tamamlamış yetişkin fareler kullanılmıştır. Literatüre uygun olarak 200 mg/kg amifostin ve 300 mg/kg karnitin RT'den 30 dakika önce uygulanmıştır (107) . Deney, ışınlama günü '0' kabul edilerek, işlem sonrası 5. günde sonlandırılmıştır. 20 Gy eksternal RT ile kemik dokuda ve epifizyal kıkırdak yapısında histopatolojik olarak hasar meydana getirilmiştir. RT'ye bağlı gelişen akut hasarlar histopatolojik olarak incelenmiştir. Çalışmamızda KAR RT'ye bağlı gelişen akut kemik hasarını AMI'in etkisine benzer düzeyde azaltmıştır. AMI+RT ve KAR+RT gruplarındaki oluşan hasarı KONT grubu ile karşılaştırdığımızda gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Radyasyona bağlı başlıca patolojik etkiler osteoblast ölümü, matriks oluşumunda azalma ve olgun iskelet yapısının osteoklastlar tarafından rezorbsiyonudur (108,109). Etkilenen osteoblastlar ya hemen ya da hücre bölünmesinde latent periottan sonra ölebilir. RT'ye bağlı hasarın şiddeti ve insidansı absorbe doz ve fraksiyonasyon, ışınlama tipi gibi faktörlerden etkilenir. Kemik hasarı için eşik doz hafif osteopeni ile 30 Gy'de tanımlanan osteonekroz arasında, önceki çalışmalarda 50 Gy'de hücre ölümünün gerçekleşmesi ile birlikte değişen bir yelpazede kabul edilmektedir. RT önceki çalışmalarda gösterildiği gibi osteoklastik ve osteoblastik aktivitede dengesiz bir durum şeklinde zararlı bir süreç oluşturur. Radyasyona maruz kaldıktan sonra osteoblast ve osteosit hücre sayılarında azalma ve kollajen sentezi ve ALP aktivitesinde düşüş olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak, kemik matriks oluşumu ve mineralizasyon süreci bozulur (110). Bizim çalışmamızda 20 Gy'lik tek doz ışınlama sonrası tek başına RT alan gruptaki tüm sıçanlarda trabeküllerde belirgin kalınlaşmanın ve medüller fibrozis olsun veya olmasın yer yer dejeneratif alanların ve orta

dereceden ciddi dereceye değişen osteoblastik atipinin olduğunu göstermiştir. İlginç olarak, derece 3 hasar KAR+RT ve AMI+RT gruplarında görölmemiştir.

Kemik dokusu üzerinde birçok radyoprotektör çalışılmış olmasına rağmen, bu konudaki araştırmalar AMI üzerine yoğunlaşmıştır. Amifostin (S-(N-(3-aminopropil)-2-aminoetiyol) sisteamin benzeri bir moleküldür (12,13). Hücre içinde vasküler endotelial hücrelerin ALP'ı ile fosforile edilerek, aktif metaboliti olan serbest tiyole dönüşen bir ön ilaçtır. Serbest tiyol, radyasyonun meydana getirdiği OSR'ni bağlayıp ortamdan uzaklaştırarak etki gösteren bir radyoprotektördür (14,15). AMI radyasyonun etkinliğini tümör dokusunda azaltmadığı halde normal dokuda azaltır bu sayede AMI kullanımı ile RT'nin tümör üzerindeki etkisi azaltılmadan istenen tümör kontrolü sağlanmış olur (75). Radyasyondan kısa bir süre önce uygulandığında seçici olarak normal dokuyu koruduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. AMI, tükrük bezleri üzerine korucu etkisinden dolayı klinikte baş-boyun kanserli hastaların ışın tedavisinde geç etki olarak gelişen kserostomiye karşı yaygın olarak kullanılan bir radyoprotektördür. Pelvis, üst batın, toraks, baş-boyun, yumuşak doku veya santral sinir sistemine lokalize tümörlü 177 hasta üzerinde yapılan randomize olmayan bir çalışmada, RT öncesi verilen AMI'in mukozit, dermatit ve alopesi gibi radyasyona bağlı hasarları önlemedeki etkisi gösterilmiştir (111).

Margulies ve ark. (112) 20 Gy radyoterapiye maruz kaldıktan sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kondrosit ve osteoblast hücre sayılarında sırası ile %47.3 ve % 31.9 azalma bildirmişlerdir ($p<0.004$). Tedavi öncesi AMI uygulaması istatistiksel olarak anlamlı olmasa da osteoblast ve kondrosit hücre sayılarında sırası ile %24 ve %30.2 kurtulma sağlamıştır. Damron ve ark. (9) tek doz 17.5 Gy RT'nin 5 haftalık ratların büyüme kıkırdağında hasar oluşturduğunu göstermiştir. Bu etki proliferatif aktivitenin belirgin olarak düşmesi, büyümenin durması ve sellülaritenin azalması ile karakterizedir. RT ile hücre sayılarında azalma olduğu, monositlerin radyasyona çok duyarlı olduğu, osteoblastların ise radyasyona çok az duyarlı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada AMI ve sodyum selenit gibi radyoprotektörlerin osteoblastları ve kondrositleri radyasyonun olumsuz etkisinden koruduğu belirlenmiştir. Benzer olarak, başka bir çalışmada radyasyonun osteoblast proliferasyonunu, kollajen üretimini ve kemik nodül formasyonu oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (10). Damron ve ark. (113) yaptığı bir diğer çalışmada AMI'in osteoklast sayısı üzerine çok az etkisi olduğunu göstermiştir; ancak, sadece RT uygulanan kol ile karşılaştırıldığında tedavi öncesi AMI uygulanan kolda kondro-osseoz birleşim noktasında kondroklast sayıları, büyüme plağı yüksekliği ve büyüme hızı daha yüksektir. Gevorgyan ve ark. (114) radyasyon ile klojenik sağkalımda, osteoblast fonksiyonunda ve osteoblast benzeri fenotipte (ALP, kollajen

tip-1, osteokalsin ve osteopontin) anlamlı derecede bozulma gözlemlemişlerdir. AMI'in aktif metaboliti olan WR-1065 normal osteoblast benzeri hücre kültürlerini radyasyonun etkilerinden korumuştur.

Bir grup çalışmada ise radyoterapinin büyüyen kemikler üzerine olan olumsuz etkilerinin AMI uygulaması ile engellenip engellenemeyeceği araştırılmıştır (19). Gevorgiyan ve ark. (11) yaptığı bir diğer çalışmada 10 -15 Gy uygulanan tek doz radyasyon ile osteoblastların sayısının ve proliferasyonunun ve mineralizasyonun azaldığını göstermiştir. Uzun ve kraniofasial kemiklerin büyümesinde RT'ye bağlı meydana gelen gecikmeyi önlemede AMI'in radyoprotektör etkisi gösterilmiştir. Ayrıca osteoblast, endotel ve fibroblast gibi hücrelerin sayısını korumada da etkinliği gözlenmiştir. Tamurian ve ark. (16)'nın çalışmasında, diz çevresine verilen tek doz 12.5 ve 17.5 Gy RT öncesinde 100 mg/kg ip. AMI uygulanmıştır. Femur boyu büyümesinde 12.5 Gy RT ile ortalama %23, 17.5 Gy RT ile ise ortalama %59 azalma olduğu gösterilmiştir. RT öncesi uygulanan AMI'in; 12.5 Gy RT kolunda femurda %48.9, tibia da %13.1 ve toplamda %27.6 oranında büyümeyi koruduğu, 17.5 Gy RT kolunda ise femurda %30.8, tibia da %20.3 ve toplamda %25.7 oranında büyümeyi istatistiksel anlamlı olarak koruduğu gösterilmiştir. Spadaro ve ark. (115)'nin 3 haftalık ratların sol dizlerinin kontrol olarak kullanıldığı başka bir çalışmada, sağ diz bölgesine 3 ya da tek fraksiyonda toplam 25 Gy RT uygulaması ile 3 radyoprotektör ajanın etkisine bakılmıştır. Fraksiyone RT öncesi bir gruba sadece AMI, bir gruba AMI ile birlikte pentoksifilin, bir gruba AMI ile birlikte misoprostol, bir gruba sadece pentoksifilin ve bir gruba da sadece misoprostol uygulanmıştır. Radyoprotektörsüz tek fraksiyon 25 Gy RT, ortalama %24.4 oranı ile en ileri tibia boy kısalığına neden olmuştur. Fraksiyonasyon ise bu kısalığı %18.8'e azaltmıştır. Tek fraksiyona nazaran aynı RT dozunun 3 fraksiyonda verilmesinin getirdiği avantajın ötesinde, radyoprotektörlerin tek ya da kombine kullanımı ile ortalama femur boy kısalma oranı anlamlı olarak azalmıştır. RT sonrası görülen en uzun femur boyu, normale göre %11 büyüme geriliği ile fraksiyone RT ve AMI ile kombine edilen misoprostol kolunda bulunmuştur. Radyoprotektörlerin yalnız ya da kombine olarak büyüme üzerine yararlı etkileri gösterilmiştir. La Scala ve ark. (116) 7 haftalık tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, sağ orbitozigomatik bölgeye ortavoltaj radyasyon ile 6 fraksiyonda toplam 35 Gy RT ve test grubuna her fraksiyon öncesinde 200 mg/kg iv. AMI uygulamışlardır. Kemik büyümesi seri radyografi ve bilgisayarlı tomografi ile değerlendirilmiştir. AMI'in, RT'nin kranyofasiyal kemik büyümesi üzerine olan olumsuz etkisini yüksek oranda anlamlı olarak önlediğini göstermişlerdir. Ancak bizim çalışmamız erişkin ratlarda büyümesini tamamlamış kemik dokusu üzerindeki RT hasarını engelleme

amacını taşıdığından, yöntem olarak histopatolojik hasar değerlendirilmesi esas alınmıştır ve önceki çalışmalarla uyumlu olarak AMI'in kemik doku üzerine koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Bazı çalışmalar kemik için en önemli yakıt maddesinin glukoz olduğunu öne sürse de, daha güncel çalışmalar osteoblastik kök hücrelerin %40-80 oranında enerji ihtiyacının yağ asidi oksidasyonundan geliştiğini işaret etmektedirler (117,118). Bu durum çok sayıda faktör içeren yağ asidi oksidasyonunun, osteoblastlardaki protein sentezi için uygun enerji miktarını düzenlediğini akla getirmektedir. KAR yağ asidi metabolizması için gerekli bir kofaktördür. KAR, yağ asitlerinin β -oksidasyonunda, mitokondri membranına taşınmasında, ve açıl-CoA ve açilkarnitin gibi toksik metabolitlerin mitokondri dışına çıkarılmasında taşıyıcı olan doğal bir maddedir (17). KAR, uzun zincirli yağ asitlerinin transformasyonunda gerekli bazı enzimlerin asıl faktörüdür ve OSR'lerini temizleyici görev görür (119). KAR, antioksidan ve OSR temizleyici özelliği ile hücrelerde iyonizan radyasyona bağlı oluşabilecek OSR'ne karşı modulator rol oynayabilir (18). SR'leri temizleme özellikleri sayesinde, ATP yapımında artış ve mitokondriyal fonksiyonlarda düzelme yaptıkları gözlenmiştir (94). Enerji üretiminde çok etkili metabolik yol olan β oksidasyonda rol alan KAR, özellikle yüksek enerji ihtiyacı olan dokular için önemlidir. Hücre membran stabilizasyonunda, kas kontraktibilitesinde ve kalp fonksiyonlarında etkilidir (88,89).

L-karnitin sinir sistemi, kalp, karaciğer ve kemik dokusunda iyi dağıldığı gösterilmiş bir ajandır ve kemik metabolizması üzerine pozitif etkisi vardır. KAR'ın potansiyel kemik koruması için aday olduğu düşünülse de bu konuda çalışma çok azdır. Sınırlı sayıdaki çalışmalar KAR'ın kemik üzerine yararlı etkilerini belirtmişlerdir (120,121). Chiu ve ark. (122) invitro koşullarda osteoblast benzeri hücrelerde protein üretiminin, palmitik asit oksidasyonunun ve metabolik aktivitenin KAR ile arttırıldığını göstermişlerdir. Benvenga ve ark. (121)'nin çalışmasında hipertiroidi olan hastalarda kemik mineral yoğunluğu üzerinde KAR'ın yararlı etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, bir diğer çalışmada osteoblast ve ekstrasellüler matrikste insulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3'de (IGFBP-3) artış ile KAR'ın anabolik etkisi gösterilmiştir (123). Hooshmand ve ark. (104) KAR (-) diyet ile beslenen sıçanlara kıyasla KAR (+) diyet ile beslenenlerde tibia kemik mineral dansitesinde anlamlı derecede artış gösterdiler. Diyetteki KAR kemik erimesinin göstergesi olan tartarat dirençli asit fosfatazın mRNA seviyesini %72.8, ALP'nin mRNA seviyesini %63.6 ve kollajen tip-1'i %61.2 olarak anlamlı derecede düşürmüştür. Bu sonuçlar KAR eklemenin kemik kaybını yavaşlattığını ve kemik döngüsünü azaltarak kemik mikroyapısal özelliklerini geliştirdiğini göstermektedir. Ancak KAR'ın erişkin kemik

dokusunda oluşabilecek radyasyon hasarını engellemedeki rolünü test eden bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Bu konuda yapılmış tek çalışma yine kliniğimizde yapılan ve bizim çalışmamıza benzer şekilde AMI ile KAR'ın etkinliklerinin karşılaştırıldığı Yürüt Çaloğlu ve ark. (19)'nın yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak her iki ajanın radyoprotektif etkileri büyümekte olan kemik dokusu üzerinde araştırılmıştır.

Literatürde KAR ve AMI'in karşılaştırıldığı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmalar böbrek, kalp ve büyüyen kemik dokusu üzerine olan çalışmalardır. Çaloğlu ve ark. (107) ratlarda böbreğe tek doz 9 Gy RT öncesi, KAR (300 mg/kg) ve AMI (200 mg/kg) ip. uygulamış ve oluşan hasarı Tc-99m MDP (metilen difosfonat) kemik sintigrafisi ve histopatolojik inceleme kullanarak değerlendirmiştir. Her iki ajanın da böbreği gerek fonksiyonel gerekse histopatolojik olarak istatistiksel olarak anlamlı şekilde ve eşit oranda koruduğunu saptamışlardır.

İbiş (124) ise KAR'ın olası radyoprotektif etkisini AMI ile karşılaştırmıştır. 3 aylık ratlarda, kalbi 20 Gy ışınlanmışlar ve hayvanları 6 ay takip etmişlerdir. RT öncesi kullanılan AMI'in atriyal fibrozis, miyokardiyal dejenerasyon ve ventriküler fibrozis açısından kalbi koruduğu saptanmıştır. Bununla birlikte RT'ye KAR eklenmesi ise yalnızca miyokardiyal dejenerasyon ve ventriküler fibrozis açısından kalbi korurken, atriyal fibrozisi etkilemediği saptanmıştır. Her iki ajanında vasküler hasar üzerine koruyucu etkisi saptanmamıştır. Çalışmacılar, RT'ye bağlı gelişen kardiyak toksisiteyi önlemede AMI'in, KAR'den üstün olduğunu belirtmektedir.

L-karnitin'in RT'ye bağlı gelişen epifizyal kıkırdak hasarı üzerine etkisi nadiren incelenmiştir. Bizim çalışmamız ile benzer bir çalışma olan büyüyen kemik ve kıkırdak üzerinde KAR ve AMI'in radyoprotektif etkilerini araştıran Yürüt Çaloğlu ve ark. (19) yaptığı çalışmada KAR'ın RT görmüş kemik ve kıkırdak üzerine etkisi AMI ile karşılaştırılmıştır. Gelişimini tamamlamamış bebek ratların femoral epifiz bölgelerine, tek fraksiyonda 20 Gy RT'den 30 dakika önce 300 mg/kg KAR ve 200 mg/kg AMI ip. uygulanmıştır. RT öncesi ve sonrası 6. ayda tüm ratlara Tc-99m MDP kemik sintigrafisi ve Dual Enerji X-ray Absorbsiometri (DEXA) ile kemik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Bu çalışmada histopatolojik incelemede RT tedavi öncesi AMI ve KAR uygulaması ile RT'ye bağlı gelişen kemik hasarı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.04$ ve $p=0.007$) ve epifizial kıkırdak hasarı istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.015$ ve $p=0.002$). KAR'nin hem kemik hem de epifizyal kıkırdak üzerinde koruyucu etkisi AMI ile benzer idi. Bizim çalışmamızda ise derece 3 epifizyal kıkırdak hasarı AMI+RT grubu ve KAR+RT gruplarında görülmedi. AMI+RT grubunda 3 hayvanda herhangi bir hasar yoktu ve 3 hayvanda derece 1 hasar vardı. KAR+RT

grubunda 4 hayvanda herhangi bir hasar yoktu ve 3 hayvanda derece 1 hasar vardı. AMI+RT grubunda 2 hayvanda ve KAR+RT grubunda sadece 1 hayvanda kondrositlerde orta derecede düzensizlik ve kondrositlerde ciddi atipi ile birlikte epifizyal plakada kalınlaşma olarak tanımlanan derece 2 hasar görülmüştür. Tedavi öncesi AMI ve KAR uygulaması ile RT'ye bağlı gelişen kemik hasarı azalmıştır ($p=0.003$ ve $p=0.001$) ve epifizyal kırıkta hasarı azalmıştır ($p=0.003$ ve $p=0.001$). Bu bulgular, Yürüt Çaloğlu ve ark. (19)'nın yaptığı çalışmanın bulguları ile benzerdir. KAR ve AMI'in kemik ve kırıkta hasarı üzerine koruyucu etkisi benzerdir.

Ancak bizim çalışmamızın da bazı yetersizlikleri vardır. İlk olarak, radyasyon kaynaklı kemik modeli rutin klinik uygulamadan farklı olarak tez doz RT üzerine kurulmuştur. Rutin uygulamada normal doku hasarını önlemek için RT fraksiyone olarak uygulanır. Bu nedenden dolayı fraksiyone radyasyon ve KAR uygulamasının etkisi daha sonraki çalışmalarda dikkate alınmalıdır. İkinci olarak, biz doku düzeyinde KAR'in antioksidan özelliğini değerlendirmedik. Bu nokta önemli bir sorun gibi görünüyorsa da, farklı yazarlar KAR'in antioksidan özelliğini literatürlerde daha önce bildirmişlerdir. Histopatolojik yöntemle değerlendirme bu çalışma protokolü içerisinde anlamlı sonuçlar veren güvenli bir yöntem olsa da gelecekte yapılacak çalışmalarda kemik oksidatif stres belirteçleri çalışılarak, çeşitli radyoprotektör ajanların sağladığı koruma mekanizmalarını belirlemeye çalışmanın literatüre katkısı olacağı kanısındayız.

Sonuç olarak, literatürde RT'ye bağlı kemik hasarını önlemede etkinliği gösterilmiş olan AMI'in bu etkisi, bizim çalışmamızda da ortaya konmuştur. Ayrıca, KAR'in tek fraksiyon olarak uygulanan RT'ye bağlı gelişen erişkin kemik hasarını önlemede etkin olduğu ilk defa bu çalışmada histopatolojik olarak gösterilmiştir. Daha da ötesi, bu koruyucu etkinliğin AMI ile açık olarak benzer düzeyde olduğu da çalışmamızın bir diğer sonucu olarak gözlemlenmiştir. Kanser hastaları için RT'ye bağlı gelişen kemik hasarı önemli bir klinik yan etki olduğu düşünüldüğünden bu hasarı azaltabilmek umudu ile RT ile tedavi edilen kanser hastalarında AMI ve KAR'in koruyucu etkilerinin gelecekte başka çalışmalarla da araştırılması çok büyük önem taşımaktadır.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi (TÜTF) Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Patoloji Anabilim Dalı tarafından yapılan kemik ışınlanan ratlarda, amifostin ve L-karnitin, RT'ye bağlı kemik hasarını önlemedeki olası koruyucu etkinliğinin histopatolojik olarak karşılaştırıldığı çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Radyoterapi sonrası akut dönemde (5.gün) yapılan histopatolojik değerlendirmede; RT'nin kemik yapıda trabekülde kalınlaşma ve osteoblast atipisi oluşturduğu görülmüştür.
2. Radyoterapiye AMI eklenmesi, sadece RT uygulanan gruba göre trabeküllerde kalınlaşmayı azaltmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamış olması; trabeküllerde kalınlaşma açısından, RT'ye AMI eklenmesi ile kemik yapının RT'nin toksik etkilerinden korunduğunun güçlü bir göstergesidir.
3. Radyoterapiye AMI eklenmesinin sadece RT uygulanan gruba göre osteoblast atipisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise sonucun benzer bulunmuş olması RT'ye AMI eklenmesinin RT'ye bağlı meydana gelen osteoblast atipi artışını önlediğini göstermektedir.
4. Radyoterapiye KAR eklenmesi, sadece RT uygulanan gruba göre trabeküllerde kalınlaşmayı azaltmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamış olması; trabeküllerde kalınlaşma açısından, RT'ye KAR eklenmesi ile kemik yapının RT'nin toksik etkilerinden korunduğunun güçlü bir göstergesidir.

5. Radyoterapiye KAR eklenmesinin sadece RT uygulanan gruba göre osteoblast atipisini istatistiksel olarak anlamlı oranda azalttığı gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise sonucun benzer bulunmuş olması RT'ye KAR eklenmesinin RT'ye bağlı meydana gelen osteoblast atipi artışını önlediğini göstermektedir.
6. Radyoterapiye KAR eklenmesi sonucunda elde edilen bulguların AMI eklenmesi ile benzer olması, KAR'ın kemik üzerindeki koruyucu etkisinin AMI ile benzer olduğunu göstermektedir.
7. Amifostin ve L-karnitin, kemik yapıyı radyasyon etkilerinden birbirlerine benzer oranda korumuş ve kontrol düzeyine çekmiştir.

ÖZET

Tedavi amaçlı uygulanacak yüksek doz RT'nin kemik üzerinde ciddi ve çeşitli yan etkileri olabilmektedir. Günümüzde kanser tanı ve tedavisinde sağlanan gelişmeler sonucunda kanserli hastaların uzun süre yaşamlarını sürdürmeleri, kanser tedavisinin akut ve geç etkilerini ön plana çıkarmıştır. Normal dokuları, radyasyonun olumsuz etkilerinden koruma amaçlı radyoprotektör ajanlar önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Çalışmamızda, 12 haftalık ratlarda, etkili bir radyoprotektör olduğu bilinen AMI ile KAR'ın RT'ye bağlı kemik hasarından koruyucu etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. KONT, RT, AMI ardından RT ve KAR ardından RT grubu olmak üzere dört grup oluşturulmuş, RT gruplarına pelvik alana tek fraksiyonda 20 Gy RT uygulanmıştır. Deney gruplarına RT'den 30 dakika önce AMI 200 mg/kg ve KAR 300 mg/kg dozunda ip. olarak uygulanmıştır. RT'den 5 gün sonra ratlar sakrifiye edilip, histopatolojik inceleme yapılmıştır.

Kemik dokusu histopatolojik olarak, kemik trabekülde kalınlaşma ve dejenerasyon ve osteoblast atipisi dikkate alınarak derecelendirilmiştir. Epifizyal kıkırdak yapısı da histopatolojik olarak, epifizyal kıkırdak kalınlığı, kondrosit düzensizliği, kondrositlerde atipi ve kıkırdak doku kaybı dikkate alınarak derecelendirilmiştir. KAR'ın kemik üzerinde koruyucu etkisi AMI ile benzer idi. Tedavi öncesi AMI+RT ve KAR+RT uygulaması ile RT'ye bağlı gelişen kemik hasarı azalmıştır. KONT grubundaki kemik hasarı ile AMI+RT ve KAR+RT grupları arasında anlamlı bir fark yoktu. Tedavi öncesi AMI+RT ve KAR+RT uygulaması ile RT'ye bağlı gelişen epifizyal kıkırdak hasarı azalmıştır. KONT grubundaki epifizyal kıkırdak hasarı ile AMI+RT ve KAR+RT grupları arasında anlamlı bir fark yoktu.

KAR'in epifizyal kıkırdak üzerinde koruyucu etkisi AMI ile benzer idi. KAR RT'ye bağlı gelişen akut kemik hasarını AMI'in etkisi ile benzer düzeyde azaltmıştır.

Anahtar kelimeler: Radyoterapi, kemik, amifostin, L-karnitin, rat

THE HISTOPATHOLOGIC COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF AMIFOSTINE AND L-CARNITINE AGAINST RADIATION INDUCED ACUTE BONE TOXICITY IN RATS

SUMMARY

High-dose RT may cause some serious side effects on the bone. Recent improvements in both diagnosis and treatment of cancer has increased survival rate resulting in higher acute and late adverse effects of cancer therapy. Thus the radioprotective agents has become an important research topic.

The aim of the present study was to evaluate the radioprotective efficacy of KAR and to compare its effectiveness with AMI. Twelve-week-old rats were randomly assigned to four groups: KONT, RT alone, AMI plus RT, KAR plus RT. The rats in the RT alone, AMI+RT, and KAR+RT were irradiated individually with a single dose of 20 Gy to pelvis. KAR (300 mg/kg) and AMI (200 mg/kg) were applied 30 min before RT. The rats were sacrificed 5 days after RT and the histopathological analysis was done.

The bone tissue is graded histopathologically according to the thickening of the bony trabeculae and degeneration and atypia in the osteoblasts. The epiphysial cartilage is graded histopathologically according to the thickness of the epiphysial plate, disarrangement in the chondrocyte rows, cellular atypia in chondrocytes and loss of cartilaginous tissue. The protective effect of KAR was similar to that of AMI on bone. Pre-treatment with AMI+RT as well as KAR+RT reduced the radiation-induced damage in bone. There was no significant difference between KONT, AMI+RT and KAR+RT groups for bone damage. Pre-treatment

with AMI+RT as well as KAR+RT reduced the radiation-induced damage in the epiphysial cartilage. There was no significant difference between KONT, AMI+RT and KAR+RT groups for epiphysial cartilage damage. The protective effect of KAR was similar to that of AMI on the epiphysial cartilage. Pretreatment with KAR reduced radiation-induced acute bone damage to a similar extent as did AMI.

Key words: Radiotherapy, bone, amifostine, L-carnitine, rat

KAYNAKLAR

1. Cohen EP, Robbins ME. Radiation Nephropathy. *Semin Nephrol* 2003;23(5):486-99.
2. Wingo PA, Cardinez CJ, Landis SH, Greenlee RT, Ries LA, Anderson RN. Long-Term Trends In Cancer Mortality In The United States, 1930-1998. *Cancer* 2005;103(12):2658.
3. Engin K, Erişen L. Baş-Boyun Kanserleri. Bursa: Nobel Tıp Kitabevi, 2003:754-55.
4. Wasserman TH. The Role Of Amifostine As A Radioprotector. *Oncology* 2001;15(10):1349-60.
5. Özalpan A. Temel Radyobioloji. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001:1-217.
6. Schwarz N, Redl H, Schiesser A, Schlag G, Thurnher M, Lintner F, et al. Irradiation-sterilization of rat bone matrix gelatin. *Acta Orthop Scand* 1988;59:165-7.
7. Urist MR, Hernandez A. Excitation transfer in bone. Deleterious effects of cobalt 60 radiation-sterilization of bank bone. *Arch Surg* 1974;109:586-93.
8. Ergün H, Howland WJ. Postradiation atrophy of mature bone. *CRC Crit Rev Diagn Imaging* 1980;12(3):225-43.
9. Damron TA, Spadaro JA, Baesl MT, Conta AC, Margulies BM. Effects of irradiation on the appositional and longitudinal growth of the tibia and fibula of the rat with and without radioprotectant. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 2003;23:35-40.
10. Margulies BS, Horton JA, Wang Y, Damron TA, Allen MJ. Effects of radiation therapy on chondrocytes in vitro. *Calcif Tissue Int* 2006;78(5):302-13.
11. Gevorgyan AM, La Scala GC, Sukhu B, Leung IT, Ashrafpour H, Yeung I, et al. Radiation-induced craniofacial bone growth inhibition: In vitro cytoprotection in the rabbit orbitozygomatic complex periosteum-derived cell culture. *Plast Reconstr Surg* 2008;121:763-71.

12. Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. *Oncology* 1999; 13(1):47-59.
13. Karadayı B, Akmansu M, Dirier A, Akdemir Ö. Amifostinin sitoprotektif etkinliğinin kantitatif tükürük bezi sintigrafisi ile değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi* 2005; 32(4):183-9.
14. Tokatlı F, Uzal C, Doganay L, Kocak Z, Kaya M, Ture M. The potential cardioprotective effects of amifostine in irradiated rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58(4):1228-34.
15. Uzal C, Altun G, Caloglu M, Ergulen A, Altaner S, Yigitbasi O. The protective effect of amifostine on radiation-induced acute pulmonary toxicity: Detection by Tc-99m DTPA transalveolar clearances. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60(2):564-9.
16. Tamurian RM, Damron TA, Spadora JA. Sparing radiation-induced damage to the physis by radioprotectant drugs: laboratory analysis in a rat model. *J Orthop Res* 1999;17(2):286-92.
17. Moreno FA, Macey H, Schreiber B. Carnitine levels in valproic acid-treated psychiatric patients: A cross-sectional study. *J Clin Psychiatry* 2005;66(5):555-8.
18. Dökmeci D, Akpolat M, Aydoğdu N, Uzal C, Doğanay L, Turan FN. The protective effect of L-carnitine on ionizing radiation-induced free oxygen radicals. *Scand J Lab Anim Sci* 2006;33(2):75-83.
19. Yürüt Çaloğlu V, Durmuş Altun G, Çaloğlu M, Usta U, Saynak M, Uzal C, et al. Comparison of protective effects of L-carnitine and amifostine on radiation-induced toxicity to growing bone: histopathology and scintigraphy findings. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(3):661-7.
20. Sadler T. W (Çeviri: A. C. Başaklar). *Langman's Medikal Embriyoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık; 1996:140.
21. Açık Öğretim Sistemi Sağlık Önlisans Programları Kitapları. *Histoloji*. 2006-2007 öğretim yılı: 125-36.
22. Ganong WF (Çeviri: U. Özkutlu). *Kalsiyum metabolizmasının hormonal kontrolü ve kemik fizyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;2002:369-82.
23. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 2006;86:77-91.
24. Marks SC Jr, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988;183(1):1-44.
25. Huggins C. The composition of bone and the function of the bone cell. *Physiol Rev* 1937;17: 119-43.
26. Altun G. Puberte öncesi yoğun egzersizin dişi ve erkek sıçanlarda puberte ve erişkin dönem kemik yoğunluğuna etkisinin araştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.

27. Reddi AH, Huggins CB. Citrate and alkaline phosphatase during transformation of fibroblasts by the matrix and minerals of bone. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972;140(3):807-10.
28. Posner AS. Crystal Chemistry of Bone Mineral. *Physiol Rev* 1969;49(4):760-92.
29. Kutlu M, Odabası E. Kemik Doku ve Fizyolojisi. *Türkiye Klinikleri* 2004;2:73-89.
30. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. İstanbul: Barış Kitabevi, 1998:170-92.
31. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A text and atlas. 4th ed. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2003:180-91.
32. Duthie RB, Ferguson AB. The musculo-skeletal system. In: Edward Arnold (Ed). *Mercer's Orthopedic surgery*. 8th ed. London: 1983.p.27-65.
33. Elias H, Pauly JE, Burns R. Tissu sguelletique. In: Elias H, Pauly JE, Burns ER (Eds). *Histology*. Piccin Nuova Libreria S.P.A. Padova (Italie), 1984.p.85-110.
34. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Bone histology. In: Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ (Eds). *Histology a text and atlas*. Baltimore, 1989.p.141-78.
35. Guyton and Hall (Çeviri: H. Çavuşoğlu, B. Yeğen). *Textbook of Medical Physiology*. İstanbul: Nobel Kitabevi; 2007:983.
36. Özdamar S, Yakan B, Kutlubay R. Genel histoloji. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları; 2000:47-74.
37. Cireli E. Genel histoloji. 2. baskı. İzmir: Beta basım yayım dağıtım; 1983:229-52.
38. Getty R. *The Anatomy of the Domestic Animals*. London: W.B. Saunders Company; 1975:271-96.
39. Miller E.M. *Anatomy of the dog*. London: WB. Saunders Company; 1965:1-6.
40. Çolakoğlu N, Aydın A, Özel H, Ozan E, Kükner A. Retinoik asidin prenatal dönemdeki endokondral kemikleşme üzerine etkileri. *Erciyes Tıp dergisi*, 2007;29(4):280-84.
41. Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C, Salhab I, Koyama E, Leboy P, et al. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin and enhancement of osteogenic potential. *Bone* 2005; 36:254-66.
42. Govindarajan V, Overbeek PA. FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme. *BMC Developmental Biology* 2006;6(7):1-14.
43. Düzler A. Yeni Zelanda tavşanında ön ekstremitelerin postnatal osteolojik gelişimi (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2002.
44. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara: Palme yayıncılık; 2006:132-35.

45. Koca Y.B. Genel Histoloji atlası. 1. baskı. İstanbul: Marmara iletişim basın yayın dağıtım; 2003:55-61.
46. Üveis M. Embryoloji. 4. baskı. İstanbul: Sermet matbaası; 1969:117-18.
47. Steel GG. Basic Clinical Radiobiology. 3th ed. London: Arnold Publ, 2002:3.
48. Dröge W. Free Radikals In The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002;82(1):47-95.
49. Robbins MEC, Zhao W. Chronic Oxidative Stress And Radiation Late Normal Tissue Injury: A Review. *Int J Radiat Biol* 2004;80(4):251-59.
50. Chao KSC, Perez CA, Brady LW (Çeviri: C. Gemici, A. Mayadağlı, C. Parlak). Radyasyon Onkolojisi Tedavi Kararları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2004:4-5.
51. Fajardo LF. Morphology Of Radiation Effect On Normal Tissues. In: Perez CA, Brady LW (Eds). Principles And Practice Of Radiation Oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2008.p.78-80.
52. Rubin P, Constine LS, Williams JP. Late Effect Of Cancer Treatment On Normal Tissues. In: Perez CA, Brady LW (Eds). Principles And Practice Of Radiation Oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2003.p.357-90.
53. Fowler JF. Fractionation And Therapeutic Gain. In: Steel GE, Adams GE, Peckham MT (Eds). Amsterdam: Elsevier Science; 1983.p.181-94.
54. Withers HR, Thames HD. Dose Fractionation And Volume Effects In Normal Tissues And Tumors. *Am J Clin Oncol*; 1988;11(39):313-29.
55. Mark LB. The Impact Of Organ Structure On Radiation Responce. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1996;34(5):1165-71.
56. Perez Ca, Brady LW, Halperin EC, Schmidt-Ullrich RK. Principles and practice of radiation oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003:357-60.
57. Jirtle R, Clifton KH. Effect of preirradiation of the tumor bed on the relative vascular space of mouse gastric adenomacarsinoma 328 and mammary adenocarsinoma CA755. *Cancer Res* 1973;33:764-8.
58. Jirtle R, Rankin JHG, Clifton KH. Effect of x-irradiation of tumour bed on tumour blood flow and vascular response to drugs. *Br J Cancer* 1978;37:1033-8.
59. Okunieff P, Dols S, Lee L, Singer S, Vaupel P, Neuringer LJ, et al. Angiogenesis determines blood flow, metabolism, growth rate, and ATPase kinetics of tumors growing in an irradiated bed: 31P and 2H nuclear magnetic resonance studies. *Cancer Res* 1991;51:3289-98.
60. Okunieff P, Urano M, Kallinowski F, Vaupel P, Neuringer LJ. Tumor growing in irradiated tissue: Oxygenation, metabolic state, and pH. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:667-73.

61. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2000;106(5):1049-61.
62. Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, et al. Potentiation by platelet-derived growth factor-BB of FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. *J Bone Miner Metab* 2008;26(4):335-41.
63. Kaldır M. Ratlarda karaciğer ve böbrek dokusu üzerine amifostinin radyoprotektif etkisinin sintigrafik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösterilmesi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2006.
64. Caroline M. Spencer, Karen L. Goa. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drugs* 1995;50(6):1001-19.
65. Spencer CM, Goa KL. Amifostine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drugs* 1995;50(6):1022-31.
66. Koukourakis MI. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications. *Anti-Cancer Drugs* 2002;13:181-209.
67. Marzatico F, Porta C, Moroni M, Bertorelli L, Borasio E, Finotti N, et al. In vitro antioxidant properties of amifostine (WR-2721, Ethylol). *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45:172-6.
68. Majsterek I, Gloc E, Blasiak J, Reiter RJ. A comparison of the action of amifostine and melatonin on DNA-damaging effects and apoptosis induced by idarubicin in normal and cancer cells. *J Pineal Res* 2005; 38:254-63.
69. Porta C, Maiolo A, Tua A, Grignani G. Amifostine, a reactive oxygen species scavenger with radiation- and chemo-protective properties, inhibits in vitro platelet activation induced by ADP, collagen or PAF. *Haematologica* 2000; 85:820- 5.
70. Dorr RT. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin Oncol* 1996; 23:23- 34.
71. Whiteside WM, Sears DN, Young PR, Rubin DB. Properties of selected SNitrosothiols compared to nitrosylated WR 1065. *Radiat Res* 2002; 157:578-88.
72. Tretter L, Ronai E, Szabados G, Hermann R, Ando A, Horvath I. The effect of the radioprotector WR 2721 and WR 1065 on mitochondrial lipid peroxidation. *Int J Radiat Biol Phys* 1990; 57:467-78.
73. Khodarev NN, Kataoka Y, Murley JS, Weichselbaum RR, Grdina DJ. Interaction of amifostine and ionizing radiation on transcriptional patterns of apoptotic genes expressed in human microvascular endothelial cells (HMEC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60:553-63.
74. Ramakrishnan N, Catravas GN. N-(2-Mercaptoethyl)-1,3-propanediamine (WR-1065) protects thymocytes from programmed cell death. *J Immunol* 1992; 148:1817-21.

75. Uğuzalp-Kaldır M, Yürüt-Çaloğlu V, Coşar-Alas R, Çermik TF, Altaner Ş, Eskiocak S ve ark. Radyasyona bağlı oluşan karaciğer ve böbrek toksitesini önlemede amifostinin rolü. *Türk Onkoloji Dergisi* 2007;22(3):105-17.
76. Yuhas JM. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res* 1980;40(5):1519-24.
77. Blumberg AL, Nelson DF, Gramkowski M, Glover D, Glick JH, Juhas JM et al. Clinical trials of WR-2721 with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8(3-4):561-63.
78. Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist* 2007;12(6):738-47.
79. Gevorgyan A, La Scala GC, Neligan PC, Pang CY, Forrest CR. Radioprotection of craniofacial bone growth. *The J of Craniofacial Surgery* 2007;18(5):995-1000.
80. Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, Meropol NJ, Cohen GI, Broder G et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *J Clin Oncol* 1999;17(10):3333-55.
81. Glover D, Riley L, Carmichael K, Spar B, Glick J, Kligerman MM et al. Hypocalcemia and inhibition of parathyroid hormone secretion after administration of WR-2721 (a radioprotective and chemoprotective agent). *N Engl J Med* 1983;309(19):1137-41.
82. Koukourakis MI, Kyrias G, Kakolyris S, Kouroussis C, Frangiadaki C, Giatromanolaki A et al. Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2000;18(11):2226-33.
83. Sasse AD, Clark LG, Sasse EC, Clark OA. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: Results of a metaanalysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64(3):784-91.
84. Mitchell ME. Carnitine metabolism in human subject. *Am J Clin Nutr* 1978;31(2):293-306.
85. Mansour HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res* 2006; 54(3):165-71.
86. Tein I. Carnitine transport: Pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J Inher Metab Dis* 2003;26(2-3):147-69.
87. Duranay M, Akay H, Üre M. Hemodiyaliz hastalarında L-Karnitin tedavisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2005;14(2):62-4.
88. Siliprandi N, DiLisa F, Menabo R, Ciman M, Sartorelli L. Transport and functions of carnitine in muscles. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28(5):246-54.
89. Bremer J. The role of carnitine in intracellular metabolism. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28(5):297-301.

90. Costell M, O'Connor JE, Grisolia S. Age-dependent decrease of carnitine content in muscle of mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:1135–43.
91. Costell M, Grisolia S. Effect of carnitine feeding on the levels of heart and skeletal muscle carnitine of elderly mice. *FEBS Lett* 1993;315:43-6.
92. Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinetics* 2003;42(11):941-67.
93. Sezen O, Ertekin MV, Demircan B, Karshoglu I, Erdogan F, Kocer I, et al. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced brain and retinal damages. *Neurosurg Rev* 2008;31(2):205-13.
94. Cornish J, Callon KE, Coy DH, Jiang NY, Xiao L, Cooper GJ, et al. Adrenomedullin is a potent stimulator of osteoblastic activity in vitro and in vivo. *Am J Physiol* 1997;273:E1113-20.
95. Arafa HM, Sayed-Ahmed MM. Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats. *Pharmacol Res* 2003;48:285–90.
96. Pisano C, Pratesi G, Laccabue D, Zunino F, Lo Giudice P, Bellucci A, et al. Paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. A protective role of acetyl-L-carnitine. *Clin Cancer Res* 2003;9:5756–67.
97. Evans A. Dialysis-related carnitine disorder and levocarnitine pharmacology. *Am J Kidney Dis* 2003;41(4):13-26.
98. Leschke M, Rumpf KW, Eisenhauer T, Fuchs C, Becker K, Köthe U, et al. Quantitative assessment of carnitine loss during hemodialysis and hemofiltration. *Kidney Int Suppl* 1983;16:143-6.
99. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D'Iddio S, Giordano V, Koverech A et al. Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1033:52-66.
100. Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006;8(2):143-57.
101. Colucci S, Mori G, Vaira S, Brunetti G, Greco G, Mancini L, et al. L-Carnitine and Isovaleryl L-Carnitine fumarate positively affect human osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int* 2005;76:458-65.
102. Atlas E, Ertekin MV, Gundogdu C, Demirci E. L-carnitine reduces cochlear damage induced by gamma irradiation in guinea pigs. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36(3):312-8.
103. Üçüncü H, Ertekin MV, Yörük O, Sezen O, Özkan A, Erdoğan F, et al. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation induced oral mucositis and myelosuppression: a controlled study in a rat model. *J Radiat Res* 2006; 47(1):91-102.

104. Hooshmand S, Balakrishnan A, Clark RM, Owen KQ, Koo SI, Arjmandi BH. Dietary l-carnitine supplementation improves bone mineral density by suppressing bone turnover in aged ovariectomized rats. *Phytomedicine* 2008;15:595-601.
105. Store G, Boysen M, Skjelberd P. Mandibular osteoradionecrosis: reconstructive surgery. *Clin Otolaryngol* 2002;27(3):197-203.
106. Eralp, L, Kocaoğlu M, Atalar AC, Aktaş Ş, Aydın S, Soyhan O ve ark. Hiperbarik oksijen uygulamasının sıçanlarda iradiye otojen kemik grefti üzerine etkisi: Deneysel çalışma. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2000;34:499-511.
107. Çaloğlu M, Yürüt-Çaloğlu V, Durmuş-Altun G, Öz-Puyan F, Üstün F, Çoşar-Alas R ve ark. Histopathological and scintigraphic comparisons of the protective effects of L carnitine and amifostine against radiation-induced late renal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36(5-6):523-30.
108. Damron TA, Spadaro JA, Horton JA, Margulies BS, Strauss JA, Farnum CE. Combinations of radioprotectants spare radiation-induced damage to the physis. *Clin Orthop Relat Res* 2004;110-6.
109. Spadaro JA, Baesl MT, Conta AC, Margulies BM, Damron TA. Effects of irradiation on the appositional and longitudinal growth of the tibia and fibula of the rat with and without radioprotectant. *J Pediatr Orthop* 2003;23:35-40.
110. Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. *Eur Radiol* 2006;16:619-33.
111. Kouloulis VE, Kouvaris JR, Kokakis JD, Kostakopoulos A, Mallas E, Metafa A, et al. Impact on cytoprotective efficacy of intermediate interval between amifostine administration and radiotherapy: a retrospective analysis. *Int J Oncol Biol Phys* 2004;59(4):1148-56.
112. Margulies BS, Damron TA, Allen MJ. The differential effects of the radioprotectant drugs amifostine and sodium selenite treatment in combination with radiation therapy on constituent bone cells, Ewing's sarcoma of bone tumor cells, and rhabdomyosarcoma tumor cells in vitro. *J Orthop Res* 2008;26:1512-9.
113. Damron TA, Margulies BS, Strauss JA, O'Hara K, Spadaro JA, Farnum CE. Sequential histomorphometric analysis of the growth plate following irradiation with and without radioprotection. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1302-13.
114. Gevorgyan A, Sukhu B, Alman BA, Bristow RG, Pang CY, Forrest CR. Radiation effects and radioprotection in MC3T3-E1 mouse calvarial osteoblastic cells. *Plast Reconstr Surg* 2008;122:1025-35.
115. Spadaro JA, Horton JA, Margulies BS, Luther J, Strauss JA, Farnum CE, et al. Radioprotectant combinations spare radiation-induced damage to the physis more than fractionation alone. *Int J Radiat Biol* 2005;81(10):759-65.
116. La Scala GC, O'Donovan DA, Yeung I, Darko J, Addison PD, Neligan PC, et al. Radiation-induced craniofacial bone growth inhibition: efficacy of cytoprotection following a fractionated dose regimen. *Plast Reconstr Surg* 2005;115:1973-85.

117. Paulino AC. Late effects of radiotherapy for pediatric extremity sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:265-74.
118. Robertson WW, Jr., Butler MS, D'Angio GJ, Rate WR. Leg length discrepancy following irradiation for childhood tumors. *J Pediatr Orthop* 1991;11:284-7.
119. Izgut-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2001;36(4):231-6.
120. Gibaldi M. Prevention and treatment of osteoporosis: does the future belong to hormone replacement therapy? *J Clin Pharmacol.* 1997;37(12):1087-99.
121. Benvenega S, Amato A, Calvani M, Trimarchi F. Effects of carnitine on thyroid hormone action. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1033:158-67.
122. Chiu KM, Keller ET, Crenshaw TD, Gravenstein S. Carnitine and dehydroepiandrosterone sulfate induce protein synthesis in porcine primary osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int* 1999;64:527-33.
123. Colucci S, Mori G, Vaira S, Brunetti G, Greco G, Mancini L, et al. L-carnitine and isovaleryl L-carnitine fumarate positively affect human osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int* 2005;76:458-65.
124. İbiş K. Radyoterapinin kalp üzerine oluşturduğu kardiyak hasarı önlemede amifostin ve L-karnitinin etkinliğinin amifostin ile karşılaştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi;2008.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

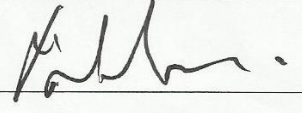
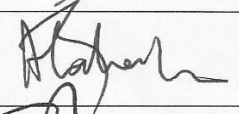
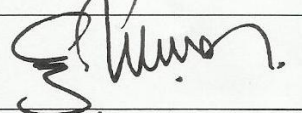
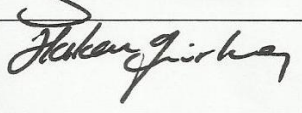
EDİRNE

Karar Tarihi: 03.07.2012

Oturum Sayısı: 05

KARAR NO: 2012.05.02

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Hasan Murat Çaloğlu'nun yaptığı Araş. Gör. Dr. Seda Eğrenci'nin Tıpta Uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDEK-2012/51 protokol nolu "Ratlarda Radyoterapiye Bağlı Gelişen Akut Kemik Toksisitesinde Amifostin ve L-karnitin Etkinliklerinin Histopatolojik Olarak Karşılaştırılması" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Yürütücülüğünü Doç.Dr.Vuslat ÇALOĞLU'nun yaptığı TÜHDEK-2011/46 Protokol nolu çalışmanın Yürütücülüğünden feragat ederek söz konulu çalışmanın Doç. Dr. Hasan Murat ÇALOĞLU Yürütücülüğünde Araş. Gör. Dr. Seda Eğrenci'nin Tıpta Uzmanlık tezi olarak verilmesi şeklindeki değişiklik önerisinin uygun olduğuna ve çalışmanın Doç. Dr. Hasan Murat ÇALOĞLU Yürütücülüğünde Araş. Gör. Dr. Seda Eğrenci'nin Tıpta Uzmanlık tezi olarak verilmesine; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	