

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

**ANTIÖKSİDAN AJANLARIN DENEYSEL OLARAK  
OLUŞTURULAN RADYASYONA BAĞLI AKCİĞER FİBROZU  
ÜZERİNDE ETKİNLİĞİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DR. BİLGEHAN ŞAHİN**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF.DR. ETHEM NEZİH ORAL**

**İSTANBUL-2011**



## İTHAF

*Sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim,  
Bireyi olmaktan onur duyduğum  
aileme*

Tez danışmanım olan *Prof. Dr. Ethem Nezih Oral'a*

Tezin oluşturulmasındaki yardımları için

*Prof. Dr. Gönül Kemikler'e*

*Uzm. Fiz. Aydın Çakır, Uzm. Fiz. Murat Okutan ve tüm fizik bölümüne,*

*Prof. Dr. Nuri Tenekeci'ye*

*Doç. Dr. Vakur Olgaç ve tüm patoloji bölümüne,*

*Yrd. Doç. Dr. Hakan Çamlıca'ya,*

*Uzm. Dr. Serap Başkaya Yücel ve Uzm. Dr. Zeynep Almaç'a,*

*Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu ve histoloji ekibine,*

*Simulasyon ve mold odası çalışanlarına,*

*Tüm asistan arkadaşlarıma,*

*Değerli aileme, uyumlu ve sevimli eşime*

Eğitim hayatıma katkılarından ötürü

*Prof. Dr. Esra Kaytan Sağlam'a*

*Prof. Dr. Işık Aslay'a*

*Prof. Dr. Ahmet Karadeniz'e*

*Prof. Dr. Emin Darendeliler'e*

*Prof. Dr. Ahmet Kızır'e*

*Prof. Dr. Musa Altun'a*

*Prof. Dr. Maktav Dinçer'e*

*Prof. Dr. Rasim Meral'e*

*Doç. Dr. Fulya Yaman Ağaoğlu'na*

*Uzm. Dr. Yavuz Dizdar ve Uzm. Dr. Seden Küçüçük'e*

*Tüm asistan arkadaşlarıma,*

*Değerli aileme, sevgili eşime,*

Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

İTHAF .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	V
TABLOLAR LİSTESİ .....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	XI
ABSTRACT .....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	13
2. GENEL BİLGİLER .....	15
2.1 AKCİĞERLERİN ANATOMİSİ .....	15
2.2 AKCİĞERLERİN HİSTOLOJİSİ .....	17
2.3 SIÇAN ANATOMİSİ VE GENEL BİLGİLER .....	20
2.4 RADYOTERAPİYE BAĞLI DOKU DEĞİŞİKLİKLERİ .....	21
2.5 SERBEST RADİKALLER .....	23
2.6 RADYASYONUN AKCİĞER ÜZERİNDE ETKİLERİ .....	25
2.7 RT'YE BAĞLI ETKİLERİN PATOFİZYOLOJİSİ .....	28
2.8 RT'YE BAĞLI FİBROZİSİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI .....	34
2.9 ANTİOKSİDAN AJANLAR .....	40
2.9.1 Superoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz .....	40
2.9.2 N Asetil Sistein (NAC) .....	44
2.9.3 Rapamisin (Sirolimus) .....	45
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	47
3.1 Gereçler .....	47
3.1.1 Kimyasal Maddeler .....	47
3.1.2 Deney Hayvanları .....	47
3.2. Yöntemler .....	48
3.2.1 RT Uygulaması .....	48
3.2.2 Etken Madde Uygulamaları .....	49
3.2.2.1 PEG-SOD ve PEG-Katalaz uygulamaları .....	49
3.2.2.2 N Asetil Sistein (NAC) uygulamaları .....	49

3.2.2.3 Rapamisin Uygulamaları.....	50
3.2.2 Sıçanların Kilo Takibi.....	50
3.2.3 Sıçanların Ateş Takibi.....	50
3.2.4 Sıçanlardaki Fibrozun Bilgisayarlı Tomografi İle Takibi.....	51
3.2.5 Histopatolojik İnceleme .....	51
3.2.6 Elektron Mikroskopisi.....	52
3.2.7 İstatistiksel Analiz.....	52
3. BULGULAR.....	53
4.1 Kilo Takibi .....	53
4.2 Ateş Takibi .....	54
4.3 BT ile Fibrozis Takibi .....	57
4.4 Patolojik İnceleme.....	61
4.5 Elektron Mikroskopu ile İnceleme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
4. TARTIŞMA .....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
KAYNAKLAR .....	86

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 1 Sıçan Genel Özellikleri (17) .....	21
Tablo 2 Radyasyon Pnomoniti Toksikite Skalaları(24) .....	26
Tablo 3 Vdoz ve Pnömonit riskleri(24) .....	28
Tablo 4 RT sonrası değişiklikler (33) .....	31
Tablo 5 Sıçanların Gram/Hafta Değişimleri .....	53
Tablo 6 Ateş Ölçümleri .....	54
Tablo 7 Sıçanların Radyolojik Değerlendirmesi .....	58
Tablo 8 Radyolojik Bulgular ve Dağılımı .....	59
Tablo 9 Grupların BT Yoğunluk Ölçümleri .....	60
Tablo 10 Vücut-Akciğer Ağırlıkları, Akciğer/Vücut Ağ. Oranları	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Tablo 11 Patolojik Bulgular .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Tablo 12 Gruplar ve Patolojik Skorları .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Akciğer lobları ve lenf drenajı(1, 12) .....	16
Şekil 2 Alveol ve Hücreleri.....	19
Şekil 3 Alveol Hücreleri.....	19
Şekil 4 Terminal Bronşiol Histolojisi (15).....	20
Şekil 5 Radyasyon Direkt - İndirekt Etkisi (18).....	22
Şekil 6 Serbest Radikaller ve etki mekanizmaları (20).....	24
Şekil 7 RT doz - Pnömonit İnsidansı (28).....	27
Şekil 8 Fibroziste Rol Oynayan hücreler (35).....	33
Şekil 9 mTOR yolağı ve Rapamisin (36).....	34
Şekil 10 TGF Translasyonel - Transkripsiyonel Regülasyonu (48).....	38
Şekil 11 TGF $\beta$ 1 Oranı ve Pnömonit Bulguları(50).....	39
Şekil 12 SOD- Katalaz Dismutasyon Reaksiyonu .....	41
Şekil 13 RT sonrası gruplarda kilo alımı (59).....	43
Şekil 14 Kontrol Grubu Ateş Çizelgesi.....	55
Şekil 15 SOD Grubu Ateş Çizelgesi .....	55
Şekil 16 NAC Grubu Ateş Çizelgesi.....	55
Şekil 17 Rapamisin Grubu Ateş Çizelgesi .....	56
Şekil 18 Ateş/ Haftalar (Tüm Gruplar) .....	57
Şekil 19 Örneklerin Makroskopik Görüntüleri .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 20 Rapamisin Grubu Makroskopik Görüntüleri	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 21 Rapamisin Grubu Makroskopik Görüntüleri II	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 22 Kontrol Grubu X400 Büyütme .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 23 Kontrol Grubu X 200 Büyütme .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 24 Kontrol Grubu X400 Büyütme .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 25 NAC X 200 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 26 NAC X 200 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 27 NAC X 200 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 28 Rapamisin X 200 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 29 Rapamisin X 400 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

Şekil 30 Rapamisin X 400 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 31 Rapamisin X 400 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 32 Rapamisin X 400 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 33 Rapamisin X 400 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 34 Rapamisin X 40.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 35 SOD x 200 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 36 SOD X 400 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 37 SOD x 200 Büyütme.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 38 Kontrol Elektron Mikro. Görüntüsü .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 39 Kontrol Elektron Mikro. Görüntüsü .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 40 Rapamisin Elektron Mikro. Görüntüsü.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 41 Rapamisin Elektron Mikro. Görüntüsü.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 42 Rapamisin Elektron Mikro. Görüntüsü.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 43 NAC Elektron Mikro. Görüntüsü .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 44 NAC Elektron Mikro. Görüntüsü .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 45 NAC Elektron Mikro. Görüntüsü .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 46 NAC Elektron Mikro. Görüntüsü .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 47 SOD Elektron Mikro. Görüntüsü.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 48 SOD Elektron Mikro. Görüntüsü.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 49 SOD Elektron Mikro. Görüntüsü.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Şekil 50 SOD Elektron Mikro. Görüntüsü.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

RT	:	Radyoterapi
TÜİK	:	Türk İstatistik Kurumu
SOR	:	Serbest Oksijen Radikalleri
NAC	:	N-Acetyl Cysteine ( N-asetil sistein)
CTCAE	:	Common Toxicity Criteria for Adverse Events (Yan Etki Skalası)
LENT-SOMA	:	Late Effects Normal Tissue-Subjective Objective Management Analytic (Yan Etki Skalası)
SWOG	:	Southwest Oncology Group
EORTC	:	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
TD <sub>5/5</sub>	:	5 yılda %5 komplikasyon riski oluşturan doz
TD <sub>50/5</sub>	:	5 yılda %50 komplikasyon riski oluşturan doz
3dCRT	:	3d Conformal RT (3 boyutlu konformal RT)
DVH	:	Dose Volume Histogram (Doz Volüm Histogram)
PEG	:	Polyethylene glycol (PoliEtilenGlikol)
mTOR	:	mammalian Target Of Rapamycin
HIF	:	Hypoxia Inducible Factor
EMT	:	Endothelial Mesenchymal Transition
TEM	:	Transmission Electron Microscopy
SSD	:	Skin Source Distance (Cilt-kaynak Uzaklığı)
Gy	:	Gray
BT	:	Bilgisayarlı tomografi
DETAE	:	DEneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü

## ÖZET

**Şahin B. Antioksidan Ajanların Deneysel Olarak Oluşturulan Akciğer Fibrozu Üzerinde Etkinliğinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. İstanbul.2011.**

**Anahtar Kelimeler:** Radyoterapiye bağlı akciğer fibrozu, Polietilen Glikollü Süperoksit dismutaz (PEG-SOD), N-Asetil sistein (NAC), Rapamisin (Sirolimus), Histopatoloji

**Amaç:** Radyoterapiye (RT) bağlı fibroz nedeniyle akciğer doz kısıtlayıcı organdır. Antioksidan ajanların kullanımı ile RT'nin sık görülen yan etkilerini azaltmak olasıdır. PEG-SOD, NAC, Rapamisin gibi ajanların RT'ye bağlı fibrozda etkinliklerini klinik, radyolojik ve histopatolojik olarak değerlendirmek amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** 6 – 8 haftalık W.Albino cinsi sıçanlar PEG-SOD, NAC, rapamisin ve sadece RT alan kontrol grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı. Mortalite ve morbiditeyi azaltmak için sağ üst akciğer bölgesi, Cyberknife (Accuray) makinesinde tek fraksiyonda 13 Gy (Gray) ışınlandı. Ardışık üç hafta süren ilaç uygulamalarından sonra fibrozis oluşması için, haftalık kilo ve ateş takipleri yapılarak, 22. haftaya kadar beklendi. Bilgisayarlı tomografi görüntüleri alındı, radyolojik olarak fibrozis alanları görülmesi üzerine deney hayvanları sakrifiye edildi. Akciğerleri eksize edildikten sonra elektron mikroskopisi ve histopatolojik değerlendirme için örnekler alındı.

**Bulgular:** Kilo takiplerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ateş takiplerinde ise altıncı haftadan itibaren kontrol ve rapamisin gruplarında anlamlı artış saptandı ve deney sonuna kadar devam etti. Benzer şekilde radyolojik olarak da kontrol ve rapamisin gruplarında anlamlı bir fibroza eğilim mevcut idi. Histopatolojik olarak SOD ve NAC gruplarında RT hasarı ve fibroz bulgularında belirgin bir azalma saptanırken Rapamisin grubu hem ışık hem de elektron mikroskopisinde RT'ye bağlı hasarın ve fibrozun en yoğun izlendiği grup olarak görüldü.

**Sonuç:** RT'ye bağlı akciğer fibrozisin önlenmesinde NAC ve SOD gruplarının etkinliği anlamlı olarak gösterilmiştir. Rapamisin için ise daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## ABSTRACT

**Şahin B. Histopathological Evaluation of Antioxidants' Effectiveness on Experimentally Induced Lung Fibrosis Istanbul University, Istanbul Medical Faculty, Department of Radiation Oncology. Expertise Thesis. Istanbul.2011.**

**Key Words:** Radiotherapy induced lung fibrosis, Polyethylene Glycol, Superoxide Dismutase (PEG-SOD), N-acetyl Cysteine (NAC), Rapamycin (Sirolimus), Histopathology

**Purpose:** Lung is the dose-limiting organ due to radiotherapy (RT) induced fibrosis. With the use of anti-oxidant agents it's likely to diminish common side effects. Activities of agents such as PEG-SOD and NAC and rapamycin are aimed to be evaluated on RT induced fibrosis in a clinical, radiological and histopathological manner.

**Materials and Methods:** 6 – 8 week old W.Albino rats were divided into four groups such as PEG-SOD and NAC and rapamycin and only RT control group. In order to reduce mortality and morbidity right upper lung zone was irradiated 13 Gy in one fraction in Cyberknife (Accuray). After three consecutive weeks of drug applications, rats were followed by weight and fever measurements weekly until the 22<sup>nd</sup> week for the formation of fibrosis. Computed tomography scans were obtained. After the radiographical confirmation of fibrosis, lab animals were sacrificed. After the lungs were excised, samples were taken for electron microscopy and histopathologic evaluation.

**Results:** No significant differences were observed in the follow-up of weight. During the sixth week, in control and rapamycin groups a significant increase in fever determined and continued until the end of the experiment. Similarly, the control and the rapamycin groups, had a significant tendency to fibrosis also radiologically. The histopathological findings of RT induced injury and fibrosis in the SOD and NAC groups were significantly decreased and the rapamycin group was monitored as having the most intense RT induced injury and fibrosis on both light and electron microscopy.

**Conclusion:** The efficacy of NAC and SOD groups in RT induced lung fibrosis were displayed statistically significantly, but further studies are needed for rapamisin.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Radyoterapinin amacı hedef tümör dokusuna maksimum dozu vererek lokal kontrolü sağlamaya çalışırken, tümör etrafındaki normal dokuyu koruyarak yan etkileri en aza indirmektir. Radyoterapi total dozunu arttırmak birçok tümör tipinde lokal kontrolü artırmak için fayda sağlamasına rağmen, bu sırada normal dokuda oluşan erken ve geç yan etkiler dolayısıyla bu genellikle yapılamamaktadır. Sonuç olarak tümör kontrolü için doz arttırma, normal dokunun tolere edebildiği ölçüde yapılabilmektedir.

Radyoterapi sonrası dokularda oluşan hasar birçok faktöre bağlıdır. Verilen radyasyonun dozu, fraksiyonasyon şemaları, ışın alan dokunun volümü, eş zamanlı kemoterapi, ışınlanan dokunun oksijenasyonu ya da rejenerasyon kapasitesi gibi birçok faktör oluşan hasarın boyutunu etkiler. Akciğerler ise rejenerasyon kapasitelerinin kısıtlılığı sebebiyle, torakal yerleşimli tümörlerin radyoterapisinde doz kısıtlayıcı organlardır.

Radyasyona bağlı “Pnömoni” terimi radyoterapi sonrası oluşan birbirinden farklı kompleks mekanizmalar içeren iki farklı kavramdan oluşur. “Radyasyon Pnömoniti” denilen kavram akut dönemde gelişen alveolar boşluklarda ve intertisyumda mononükleer hücre infiltrasyonları ile karakterize inflamasyonun yoğun olarak görüldüğü durum iken fibrozis daha geç gelişen fibroblast proliferasyonu sonrası, ekstrasellüler matriks protein salgılanması ve kollajen birikmesi ile karakterize aktif süreçtir.

Pnömoni içerisinde tarif edilen olguları azaltmanın, terapötik kazancı arttırmanın başka bir yolu da antitümöral etkiyi azaltmaksızın , normal dokulardaki radyasyon hasarını azaltan hücre koruyucu anti oksidan ajanların kullanılmasıdır. Literatürde radyasyona bağlı akciğer toksisitesinin önlenmesinde pek çok ajan kullanılmıştır.

Bu çalışmada iki antioksidan ajan ( N-asetil sistein, Süperoksit dismutaz/Katalaz enzimleri kombinasyonu) ile radyasyona bağlı pnömonit ve fibrozisin başlıca mediatörü olduğu bilinen TGF  $\beta$ 'nin indüklediği protein sentezini mTOR yolağında inhibe ettiği düşünülen rapamisin (Sirolimus) kullanıldı.

Bu etken maddelerin etkinliği klinik, radyolojik ve de histopatolojik olarak değerlendirildi. Bu hayvan çalışması sonrasında elde edilecek veriler ile radyoterapi sonrası oluşan yan etkilerin en aza indirilmesi, mekanizmaların daha iyi açıklanabilmesi ve normal dokuyu koruyucu ajanların kullanımı için planlanan yeni çalışmalara temel olması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Akciğer kanseri tüm dünyada her yıl bir milyondan fazla ölüm ile kanser sebepli ölümlerin birinci sebebidir (1, 2). Nedeni bilinen ölümler sırasında kardiyovasküler ölümlerden sonra ikinci sıradadır. Tüm kanser ölümlerinin % 17.8'ini akciğer kanseri oluşturur (3). Ülkemizde de % 13 ile tüm hastalıklar arasında kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır (4) .

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2006 için, “hastanelere yatan hastaların seçilmiş 150 hastalık nedenine göre dağılımı” tablosunda hastanede ölen hastalarda 10.774 (% 11.26) hasta ile kanser ilk sırada yer almaktadır. Kanser hastalarında ise akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır (4, 5).

Akciğer kanserli hastaların tedavisi , hastalığın histopatolojik tanısı, evresi ve hastanın performans durumu değerlendirilerek yapılır. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi (RT) tek başına veya birlikte kullanılır (6, 7).

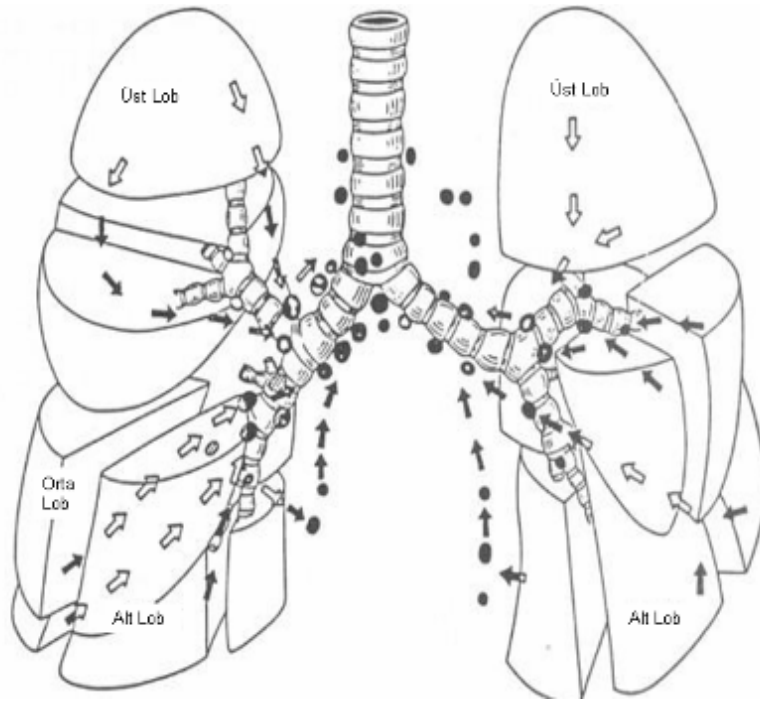
Tüm toraks malinitelerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de, RT'nin klinik kullanımı ve etkinliği, normal akciğer dokusunun radyoduyarlılığı nedeniyle kısıtlanır. İstenen dozlara RT'ye bağlı yan etkiler nedeniyle ulaşılamayabilir (8). RT alan akciğer kanserli hastaların yaklaşık % 30'nda RT'ye bağlı klinik olarak belirgin akciğer hasarı görülmektedir, uzun vadede görülebilen subklinik hasar ise daha yüksek oranlardadır (9, 10).

### 2.1 AKCİĞERLERİN ANATOMİSİ

Alt solunum sistemi akciğerler ve trakeaden oluşur. Trakea, larenksin alt ucundan (yaklaşık servikal 6. vertebra) başlayıp , torasik 4 – 5 . vertebra arasında karina olarak adlandırılan bifurkasyona kadar devam eder. Karina seviyesinde sağ ve sol ana bronşlara bölünür. Ana bronşlar , sekonder bronş denilen lobar bronş dallarını oluştururlar. Bu lobar bronşlar daha dar olan segmenter bronşlara bölünür. Segmenter bronşlar mikroskopik yapılar olan bronşiolle ve ardından akciğerlerin fonksiyonel birimi olan alveollere dönüşürler. Burada zengin kapiller damarlar bulunur. Oksijen-

karbondioksit değişimi bu düzeyde , alveolar-kapiller membrandan difüzyon yoluyla olur (11, 12).

Sağ akciğer üst, orta ve alt lob olmak üzere üç lobdan oluşur. Bu loblar, oblik veya majör fissür ve de horizontal veya minör fissür adı verilen iki fissür ile birbirinden ayrılır. Sol akciğer ise iki lobdan oluşur. Akciğer hilusları bronşlar, pulmoner arterler, venler ve pulmoner lenfatikleri içerir (şekil 1) (1, 12).



**şekil 1 Akciğer lobları ve lenf drenajı (1, 12)**

Akciğer yoğun olmayan intertisyel konnektif dokudan oluştuğundan, zengin bir lenfatik akım ağı vardır. Bu lenf damar ağı ; intrapulmoner, bronkopulmoner (hiler), mediastinel, supraklavikuler ve skalen nodlar olmak üzere beş gruba ayrılır.

İntrapulmoner lenf nodları, segmental bronş boyunca ya da pulmoner arter dalları bifurkasyonu boyunca uzanabilir.

Bronkopulmoner lenf nodları, ana bronş alt kısmında, ana bronşların lobar bronşları oluşturdukları bifurkasyon lojunda bulunurlar.

Mediastinal lenf nodları iki gruba ayrılır:

1) Üst mediastinel lenf nodları; karina üzerinde bulunan, üst paratrakeal, pretrakeal, retrotrakeal, alt paratrakeal (azigos lenf nodlar) ve aortik penceredeki lenf nodları

2) Alt mediastinel Lenf nodları; Subkarinal, paraözefageal ve pulmoner ligament lenf nodları

Sağ üst lob lenfatikleri, trakeobronşial lenf nodlarına drene olur. Sol üst lob lenfatikleri ise sadece aynı tarafa değil, ayrıca karşı üst mediastene drene olur. Sağ ve sol alt lob lenfatikleri ise subkarinal bezlere ve buradan sağ üst mediastene ve doğrudan alt mediastinel lenf nodlarına dökülür (Şekil 1) (1, 12).

## 2.2 AKCİĞERLERİN HİSTOLOJİSİ

Akciğerler trakeden itibaren bronş, bronşiol ve kan damarları ile beraber eşit oranda yaklaşık yirmi dört kez ikiye bölünerek üç yüz milyon alveolu oluştururlar.

Asinüs, terminal bronşiolun distalinde kalan akciğer ünitesine denir. Bronşiol yapısı, lenfi ve sinirleri ile fonksiyonel bir yapı oluşturur. Akciğerlerde yaklaşık otuz bin asinüs vardır.

Solunum sistemi kanaliküler bir yapıya sahip olduğundan, benzer sistemler gibi genel olarak içte mukoza, altında submukoza, dışta ise adventisya-seroza ile sınırlıdır.

Üst solunum yollarından burun, ağız boşluğu, dil, farenks yüzeyi ve epiglottisin bir bölümünde mukoza çok katlı nonkeratinize epitel ile örtülü iken nazal kaviteler, paranazal sinüsler, nazofarenks, epiglottisin bir bölümü ve bronşiolle kadar devam eden bronş mukozası tek katlı çok sıralı epitel ile örtülüdür. Bronşiol yüzeyleri tek katlı tek sıralı epitel ile örtülü iken alveol yüzeyleri tek katlı yassı epitel ile döşelidir.

Akciğerleri distal solunum bölgelerinde başlangıçta görülen kübik epitel ve klara hücreleri, yerlerini kübik epitel ve yassı hücrelere, daha proksimale doğru alveolar kanallarda döşeyici tip alveol tip I hücrelerine dönuşürler. Mukoza altında kolajen ve elastik liflerden ibaret ince bir bazal membran alveolar kanallar boyunca devam eder.

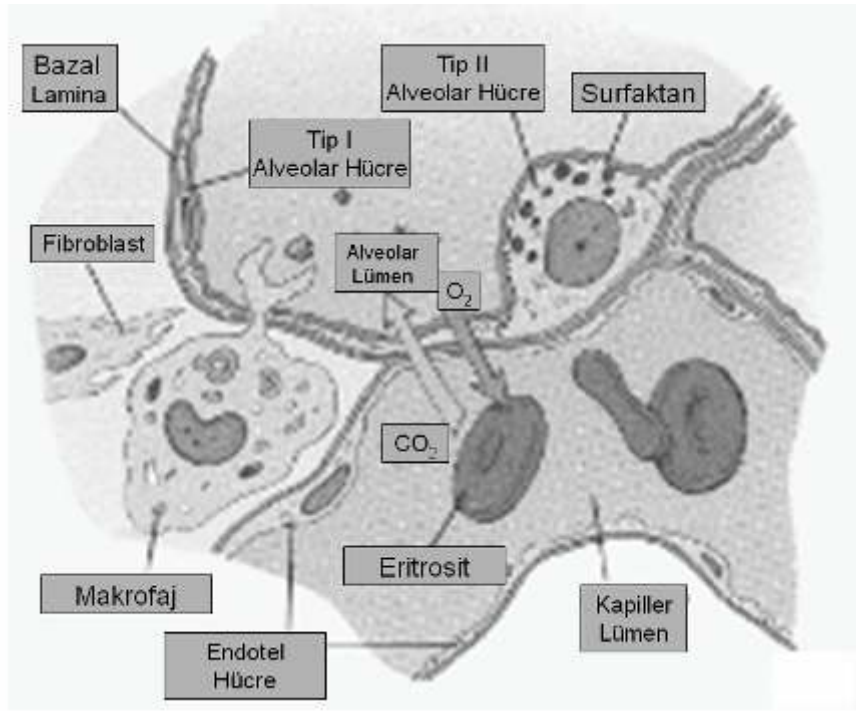
Alveolar kanallar alveol keseleri ile atriumlara açılırlar. Keseleri çevreleyen elastik ve retiküler lifler karışık bir ağ oluşturur. Elastik lifler soluk almada genişlemeyi, soluk vermede pasif olarak büzölmeyi sağlarken retiküler lifler kapiler ve alveol

septumlarını aşırı genişlemeye karşı zarar görmekten korur. Alveoller bronş ağacının son bölümüdür, ve ışık mikroskopunda arı kovanı şeklinde görünürler. Alveoller hava, kan damarları arasında  $O_2$  - $CO_2$  değişiminin gerçekleştiği yerdir. Alveol septumunda kapiller kan damarları, fibroblastlar, elastik ve retiküler lifler ile makrofajlar bulunur.

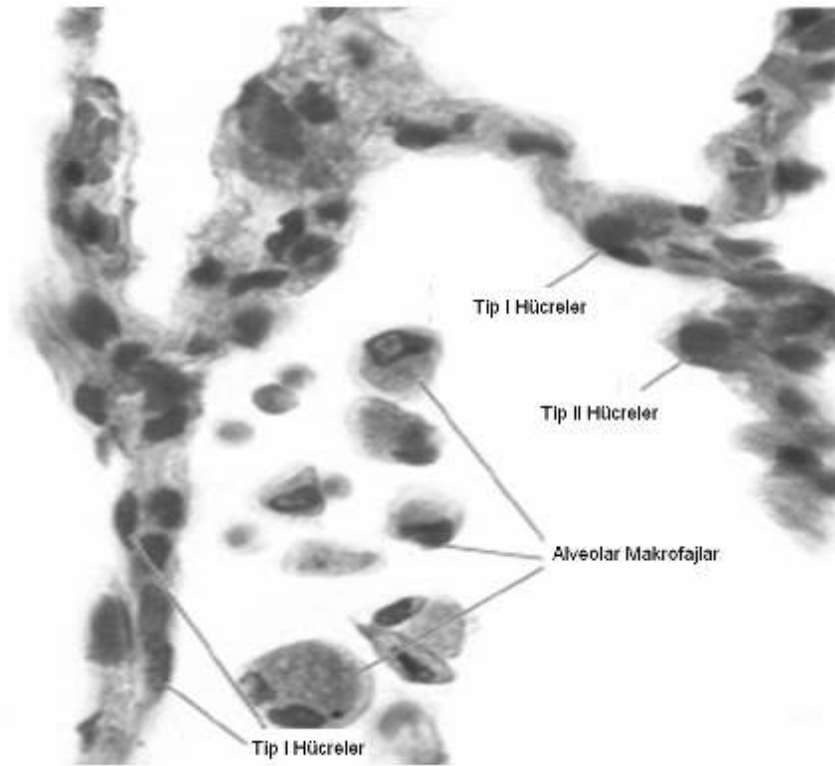
Akciğerlerde yaklaşık üç yüz milyon alveol ve yaklaşık yüz kırk metre kare yüzey alanı vardır.

İntraalveolar septumda beş çeşit hücre bulunur. Bunlar alveol tip I (%8), alveol tip II (%16), endotel hücresi (%30), intertisyel hücre (%36) ve makrofajlar (%10) bulunur.

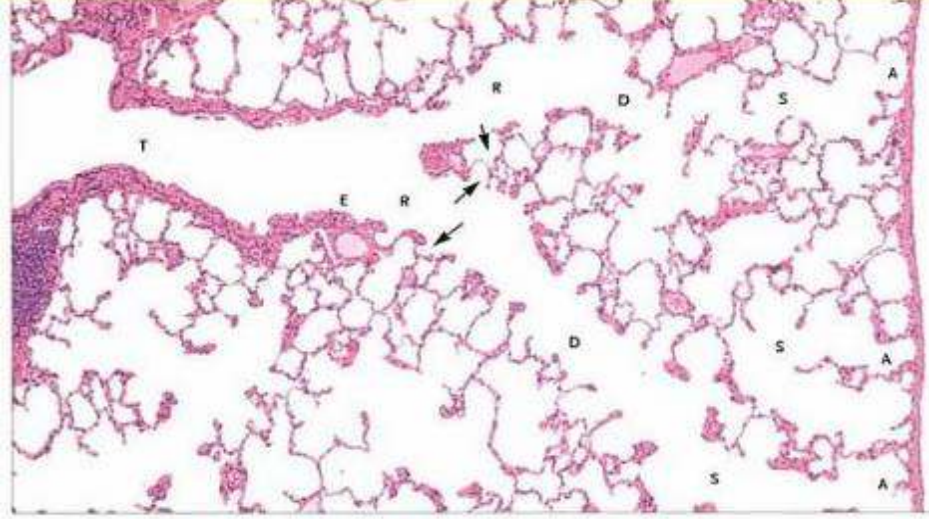
Fibroz sürecinde rol oynayan en önemli hücreler fibroblastlardır. Kollajen, elastik lif ve glikozaminoglukan sentezlerler. İntertisyumdaki parankimal kitlenin yaklaşık % 15'i kollajendir. Bu tip I ve III kollajen orijinindedir. Tip I iletici hava yolları ve plevrada , tip III ise alveolar retiküler liflerde yoğunlaşmıştır. Kollajenin artması fibrozise yol açar. Kontraktil fibroblast hücreleri alveol epitel bazal yüzeyine bağlanabilirken endotele bağlanmazlar. Antiaktin ve antimiyozin antikorumları ile reaksiyona giren bu hücreler kasılarak alveol lümeninin yüzeyini azaltırlar. Epinefrin ve histamin gibi ajanların akciğer parankim dokusunu kontraksiyonu kontraktil fibroblastlar yoluyla sağlanabilir (Şekil 2 – 4 ) (13-15).



Şekil 2 Alveol ve Hücreleri



Şekil 3 Alveol Hücreleri



**Şekil 4 Terminal Bronşiol Histolojisi (15)**

T-Terminal bronşiol R-Respiratuvar Bronşiol E- Epitel Değişim Bölgesi D-Alveolar Duktus  
S-Alveolar Kesecikler A-Alveoller

### 2.3 SIÇAN ANATOMİSİ VE GENEL BİLGİLER

Sıçanlar (*Rattus Norvegicus*) laboratuvar hayvanları arasında en eski ve en çok kullanılan hayvan türüdür. Norveç sıçanı ilk defa 1800'lerde deney hayvanı olarak üretilen ilk hayvan neslidir.

Koku alma ve işitme duyuları çok gelişmiş olmakla beraber görme duyuları iyi gelişmemiştir. Renkli görme yoktur. Diurnal ritime sadıktırlar , genellikle geceleri beslenme ve üreme, gündüzleri dinlenme şeklindedir. Beslenme geceleri olduğundan, sindirim sabahları olur, bu dönemde daha uysal olurlar, deneysel uygulamaları daha rahat tolere ederler.

Erkek sıçanlar, dişilere göre daha saldırgandırlar. Üreme olgunluğuna 8-12 hafta içinde ulaşırlar. Dişilerde 4-6 günden oluşan devamlı hormonal siklus dönemleri vardır.

Erkeklerde ortalama ömür yaklaşık 1000 gün (2.7 yıl), iken dişilerde yaklaşık 1300 gün ( 3.6 yıl) ile sınırlıdır (Tablo 1) (16, 17).

Ortalama Ömür	2 -3.5 y
---------------	----------

Ağırlık	220 – 500 mgr
Rektal temp.	37 -38 C
Solunum Hızı	80 -120
Kalp atımı	320-480 atım/dak
Kan basıncı	Diastolik: 60 – 90 mmHg Sistolik: 75 -120 mmHg
Tidal Volüm	1.6 ml

**Tablo 1 Sıçan Genel Özellikleri (17)**

## 2.4 RADYOTERAPİYE BAĞLI DOKU DEĞİŞİKLİKLERİ

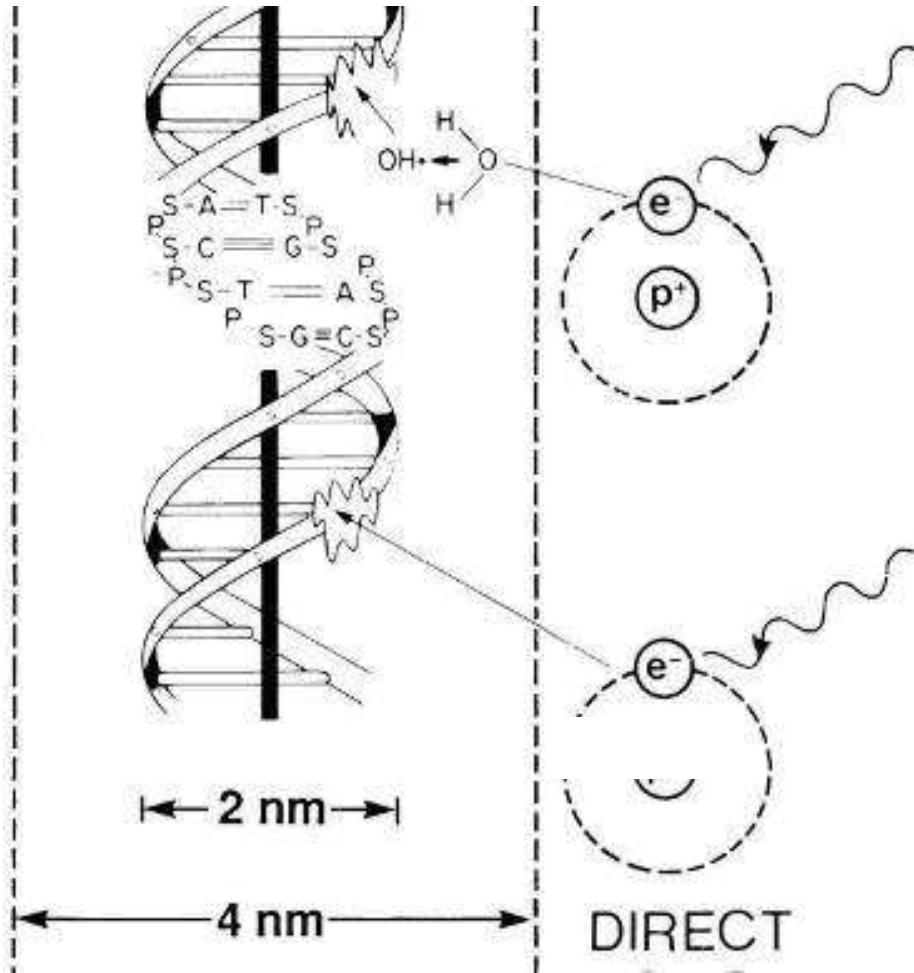
Radyasyonun , canlı dokuda oluşturduğu etkilerin incelenmesinde, radyasyon enerjisinin absorplanması ile hedef biyolojik etkinin ortaya çıkması arasında ortaya çıkan olaylar zincirini üç etki kademesine gruplamak mümkündür (18).

### 1) Fiziksel kademe:

İyonlaştırıcı radyasyonlar ile canlı dokudaki atom ve moleküller arasındaki 10 - 18 ile 10-12 saniye içerisinde olan ilk etkileşimlerdir. Bu kademede radyasyon enerjisi, doku moleküllerine aktarılır ve bu olay radyasyonu absorplayan dokunun moleküllerinde iyonlaşma ve uyarılmalara yol açar. Bu olay DNA molekülünde ya da hücredeki diğer moleküllerde hasara yol açar. DNA molekülü ya da hücredeki başka bir moleküldeki bu ilk hasara radyasyonun direkt etkisi denir. Düşük lineer enerjili ışınların kullanıldığı ışın tedavilerinde, dokularda görülen etkinin yaklaşık üçte biri bu yolla olur, fakat daha yüksek lineer enerji tranferi yapabilen nötron ya da alfa parçacıklarında , bu etki daha dominant olarak görülür. Bir Gray (Gy) radyasyon absorplayan bir hücrede , bu yolla yaklaşık  $10^5$  iyonlaşma olayı meydana gelir (Şekil 5) (18, 19).

### 2) Kimyasal Kademe:

Bu ilk reaksiyonlarda ortaya çıkan yeni ürünler kararsızdırlar ve çok kısa bir sürede ikincil reaksiyonların oluşmasına yol açarlar. Bu reaksiyonların olduğu kademeye kimyasal kademe denir. Bu kademedeki absorplanan enerji ile iyonlaşan ve kararsız hale gelen moleküller, hücrenin başka molekülleri ile zincirleme reaksiyonlara girerler. Sonuçta oluşan yüksek reaktif moleküllere serbest radikal denir. Serbest radikal reaksiyonları, radyasyon absorplanması sonrası 1 msaniye içerisinde tamamlanırlar. Doğrudan enerji transferi ile olmayan bu hasara radyasyonun indirekt hasarı denir. Konvansiyonel RT'de hedef dokuda oluşan hasarın büyük çoğunluğu bu indirekt mekanizma ile olur (Şekil 5) (19).



Şekil 5 Radyasyon Direkt - İndirekt Etkisi (18)

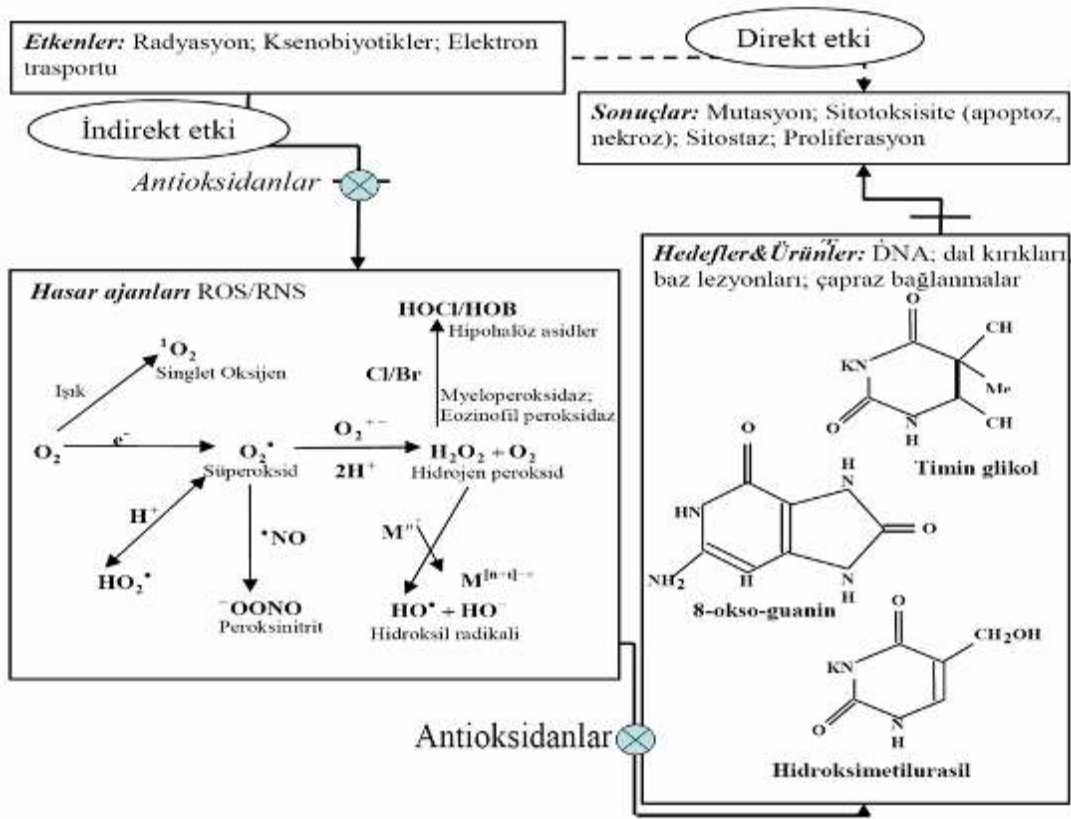
### 3) Biyolojik Kademe:

Bu kademe radyasyonun, canlıda ortaya çıkan biyolojik etkilerinin gözlemlendiği dönemdir. Hasarlara yol açan enzim reaksiyonları ile başlar. DNA moleküllerinde hasarlar olabilir. Bu hasarların bir kısmı onarılabılır bir kısmı onarılamaz ve hücre ölümüne yol açar. Eğer kök hücre populasyonunda meydana gelirse , ışınlamadan birkaç hafta sonrasında ortaya çıkan etkiler görülebilir. Bağırsaklar ve kemik iliğindeki hasarlar, bu tür geç etkilere örnek oluşturabilir. Bununla beraber radyasyon , kalıcı DNA hasarı ile genetik bozukluklar ve kanser oluşumu gibi geç biyolojik olaylara yol açabilir (18, 19).

## 2.5 SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller iyonların veya uyarılmış moleküllerin parçalanmaları sonucunda oluşur. Dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom veya moleküllerdir. Reaktiflerdir ve yaklaşık 10<sup>-5</sup> saniye ömürleri vardır. Eşleşmemiş elektronların bir başka radikalın aynı durumdaki elektronu ile eşleşmek ya da elektron transferi ile kararlı hale gelmek eğilimleri vardır. Bu kararsızlıklarından ötürü diğer moleküllerle hızlıca reaksiyona girerler. Bu reaksiyonlarda oksitleyici (elektron alıcı) ya da redükleyici (elektron verici) özellikler gösterebilirler (18, 19).

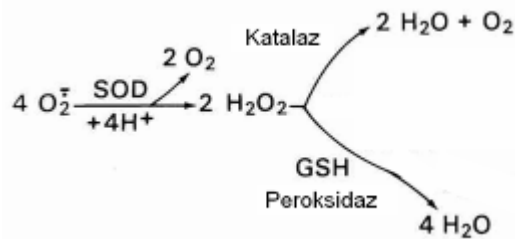
Canlılar yaklaşık % 70 -90 oranında su içerdikleri için su moleküllerinin iyonlaşması ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşması daha sıklıkla görülür. SOR içinde en önemlileri : Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroperoksit radikali (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) , hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>), singlet oksijen (O<sub>2</sub><sup>·</sup>)'dir. Diğer önemli serbest radikaller lipid hidroperoksit (ROOH<sup>·</sup>), lipid peroksit (ROO<sup>·</sup>), nitrik oksit (NO<sup>·</sup>) ve nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub><sup>·</sup>) gibi serbest radikallerdir (19).



Şekil 6 Serbest Radikaller ve etki mekanizmaları (20)

### Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ):

Moleküler oksijene fazladan bir elektron bağlanmasıyla onu redükleyerek süperoksit serbest anyonu meydana getirir. Zayıf bir oksidan olarak  $O_2^{\cdot -}$  kendi başına önemli bir hücre hasarı oluşturmaz. Zayıf bir oksidan fakat güçlü bir redüktandır.  $O_2^{\cdot -}$ , oksijen toksisitesinde önemli bir faktördür ve Super Oksit Dismutaz (SOD) enzimi ile Hidrojen Peroksite dönüştürülür (18-21).



### **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):**

Hücreye doğrudan zarar vermez, fakat yüksüz olduğundan dolayı tüm biyolojik membranlardan difüzyonla kolaylıkla geçebilir ve potansiyel bir radikal oluşturucu olarak hasarlanma yapabilir. SOD tarafından oluşturulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile inaktif H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye dönüştürülür(19).

### **Hidroksil Radikali (OH):**

En reaktif ve en toksik SOR olup her biyomolekül ile reaksiyona girebilir ve hasar oluşturabilir. Lipid peroksidasyonunu başlatarak , DNA'da kırılma veya hasarlanmalar yapabilir. Enzimlerin aktif merkezlerindeki Sulfidril (SH) ve benzeri grupların oksitlenmesi reaksiyonlarına girebilir. Ayrıca polisakkaridlerin depolarizasyonu gibi reaksiyonlarla tiyoller ve yağ asitlerinden proton kopararak yeni radikaller oluşturabilir (19, 21).

## **2.6 RADYASYONUN AKCİĞER ÜZERİNDE ETKİLERİ**

Akciğer, yapısını oluşturan 40 kadar farklı hücre çeşidinin, yarıya yakınının mitotik indeksi düşük olması sebebiyle hücre bazında relatif bir radyorezistansa sahiptir. Bu relatif radyorezistansa rağmen, düşük rejenerasyon kapasitesi ve kompleks yapısı sebebiyle toraks duvarı içerisindeki en radyoduyarlı ve doz kısıtlayıcı organdır (22).

Radyasyonun akciğer üzerindeki etkileri başlıca iki gruba ayırmak mümkündür.

#### 1. Akut Etkiler :

Enflamatuvar hücrelerin eşlik ettiği İlk RT uygulanmasından sonra 6 ay içerisinde başlayan genellikle tedaviye yanıt veren radyasyon pnömoniti dönemi olup bu dönem kendi içinde gruplara ayrılabilir;

a. Latent Dönem : RT sonrası 3 – 4 hafta kadar süren belirgin hücre hasarının olmadığı dönem.

Eksudatif Dönem: RT sonrası 3 – 8 hafta sonrası eksudatif proteinden zengin salgıların hava boşluklarını doldurması ve epitelyal ve endotelial hasarın görülmesi.

Akut Pnönonit Dönemi: RT sonrası 2 – 6 ay sonrasında hava boşluklarında ve alveolar septada belirgin ödemin görüldüğü ve mononükleer ile enflamasyon hücrelerinin alveoller boşluklarda arttığı , epitelyal ve endotelyal deskuamasyonla karakterize dönem.

Kronik Faz: RT sonrası 6 – 12 ay sonrasında alveolar hücrelerde rekonstrüksiyel proliferasyonların görüldüğü iyileşme dönemi.

#### Geç Etkiler:

RT sonrası 6 ay – yıllar arasında oluşan hücre tipi , sayısında ve organ yapısında kayıplara neden olan yaygın kolajen salgılanması ve fonksiyon kayıplarına neden olan fibroz ile karakterize etkilerdir (22, 23).

Farklı serilerde, RT sonrasında semptomatik radyasyon pnömoniti görülme sıklığı % 6 - % 34 arasında , klinikten bağımsız olarak radyolojik değişiklikler görülme sıklığı ise % 13 - % 100 arasında bildirilmektedir. (9, 10, 24). Değerlendirme için farklı skalaların bulunması ve merkezler arasındaki değerlendirme kriterlerinin farklı olması, çalışmaların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. RT'nin akut dönemde oluşturduğu radyasyon pnönonitini klinik olarak değerlendirmek için farklı skalalar tablo 2 de belirtilmiştir (24, 25).

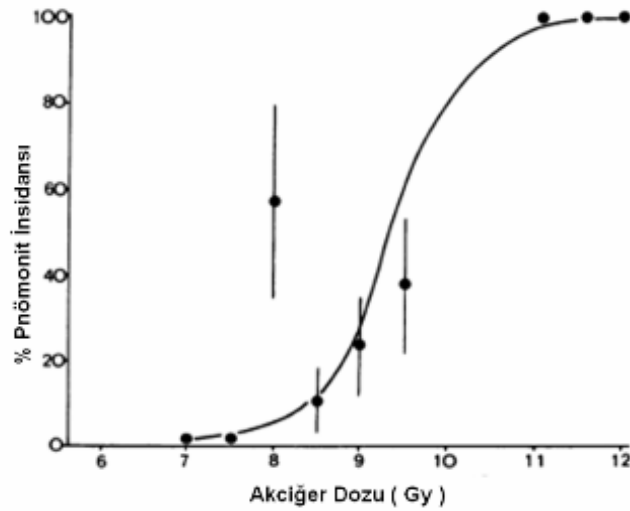
	1	2	3	4	5
CTCAE	Semptom yok, radyolojik bulgu var	Semptomlar günlük hayatı engellemez	Semptomlar günlük hayatı engeller, O2 kullanımı gerekli	Ventilatör ihtiyacı var	Ölüm
RTOG / EORTC (LENT-SOMA)	Semptom yok, hafif şiddette radyolojik bulgu var	Orta Şiddette Öksürük ve ateş var	Ağır Semptomlar	Sürekli Ventilator ihtiyacı var	Ölüm
SWOG	Steroid ihtiyacı yok, radyolojik bulgu var	Steroid ihtiyacı var	O2 kullanımı gerekli	Ventilatör ihtiyacı var	Ölüm

**Tablo 2 Radyasyon Pnömoniti Toksikite Skalaları(24)**

RT'ye bağlı gelişen akciğer hasarında hastanın yaşı, komorbid hastalıklar, eş zamanlı kemoradyoterapi, toplam radyasyon dozu, fraksiyon dozu, sayısı ve ışınlanan akciğer hacmi önemli prognostik faktörlerdir. Sigara kullanımı , başka akciğer hastalığı

ve solunum fonksiyon bozukluğu, DNA tamir mekanizmasında bozukluklar , hasar riskini arttıran başka etkenlerdir (24, 26).

Radyasyon pnömonitinin gelişiminde etkili risk faktörleri arasında en önemli yeri dozimetrik parametreler tutmaktadır. Toplam doz , fraksiyon dozu, ışın alan akciğer hacmi ve tedavi alanının yerleşimi toksisite gelişimini belirleyen önemli risk faktörleridir. RT'nin dozu, fraksiyonasyon ve akciğer tolerasyonu ile ilgili insan ve hayvan çalışmaları mevcuttur. Keane ve Fryer farelerde yaptıkları çalışmalarında tek fraksiyonda tüm akciğer için doz-yanıt eğrileri oluşturulmuş ve tek fraksiyon için yanıt sınır 7 Gy iken, TD5 8,2 Gy, TD50 9,3 Gy , TD90 11 Gy olarak bulunmuştur. McDonald'ın fare çalışmalarında TD5 9-12 Gy , TD50 10-15 Gy, TD90 12-18 Gy olarak bulunmuştur. Van Dyk'ın insanlarda tek fraksiyon geniş alan akciğer ışınlanması sonrası pnömonit gelişme riski benzer olarak bildirilmektedir (Şekil 7) (24, 27, 28).



**Şekil 7 RT doz - Pnömonit İnsidansı (28)**

Pnömonitin en çok kullanılan belirteci , 3d CRT ile daha iyi hesaplanan normal akciğer dokusunun aldığı toplam doz ve DVH'lardır.  $V_{20}$ ,  $V_{30}$ ,  $V_{40}$  (20, 30, 40 Gy ve üzeri kumulatif doz alan akciğer volümlerini belirtir.) Bir çok çalışmada yüksek Vdoz , pnömonit riskini arttıran faktör olarak bulunmuştur. Armstrong çalışmasında grade >3 pnömonit riski ;  $V_{25} > \%30$  iken % 38 ,  $V_{25} < \%30$  iken sadece %4 olarak bulunmuştur. Graham ve ark. çalışmasında ise  $V_{20} < \%22$  iken risk % 0,  $V_{20} \%22$ - $\%31$  arasında iken, risk %7,  $V_{20} \%32$ - $\%40$  arasında iken risk %13 ve  $V_{20} > \%40$  için , pnömonit riski %36

olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmadaki fatal pnömonitlerde  $V_{20} > \%35$ 'tir. Yapılan çalışmalar , Vdoz ve komplikasyon riskleri aşağıda tablo 3'de belirtilmiştir (24, 29).

Referans	Grad	Vdoz	% Risk
Armstrong 1995	$\geq 3$	$V_{25} > \%30$	38%
		$V_{25} < \%30$	4%
Graham 1999	$\geq 2$	$V_{20} < \%22$	0%
		$V_{20} \%22-\%31$	7%
		$V_{20} \%32-\%40$	13%
		$V_{20} > \%40$	36%
Hernando 2001	$\geq 1$	$V_{30} < \%22$	6%
		$V_{30} \%22-\%31$	24%
		$V_{30} \%32-\%40$	18%
		$V_{30} > \%40$	29%
Claude 2004	$\geq 1$	$V_{10} > \%33$	53%
		$V_{20} > \%18$	56%
		$V_{30} > \%13$	56%
		$V_{40} > \%10$	56%
		$V_{50} > \%5$	53%

**Tablo 3 Vdoz ve Pnömonit riskleri(24)**

Doz- fraksiyonasyon , DVH parametreleri ile beraber uygulanan kemoterapinin tipi ve dozu da pnömonit riskinin artışında rol oynar. Eş zamanlı uygulanan cisplatin, taksan grubu ajanlar, mitomisin C, gemsitabin, irinotekan, RT sonrası pnömonit riskini arttırdığı gösterilmiştir (24) .

## 2.7 RT'YE BAĞLI ETKİLERİN PATOFİZYOLOJİSİ

Radyasyona bağlı fibroz, radyasyon pnömoniti ile beraber ya da ayrı mekanizmalar sonucunda , RT sonrası alveollerde ve intertisyumda yer alan hasarlanmış , genetik ve moleküler değişimler sonrası aktive olmuş hücrelerden salgılanan birçok proenflamatuvar ve profibrotik sitokinlerin rol aldığı , normal akciğer yapısının bozulduğu ve fonksiyoner yapı yerine kollajen depositlerin biriktiği organ işlev kaybı ile giden aktif bir süreçtir.

#### Latent Dönem:

RT sonrası 1 aya yakın bir dönem tipik enflamasyon görülmediği , belirtisiz latent dönem vardır.Bu dönemde ışık mikroskopisinde belirgin değişim görülmez . Elektron mikroskopisinde ilk 3 saatten itibaren hücre yapısında fokal değişiklikler görülmeye başlanır. Plasma membranlarında harabiyet ve perinükleer boşlukta genişleme ve invajinasyon , kapiller permeabilite artışına yol açar. Altı saat sonrasında hücre yapısında belirgin değişimler olur. Bütün hücre tiplerinde mitokondrilerde , matriks dilatasyonu, krista harabiyeti ve myelin benzeri ipliksi yapılar oluşur. Tip I ve Tip II hücrelerde otofajik vakuoller görülmeye başlanır. Sitoplazmada oluşan hipertrofi ve vakuolizasyon sonrasında kapiller damarlarda şişme ve yer yer obstrüksiyonlar ortaya çıkar. Bu değişimler bir hafta sonuna kadar devam eder (30).

Kapiller ağdaki ödem ve oluşan obstrüksiyonlar, permeabilite artışına neden olur ve 14. günden itibaren belirginleşmeye başlayan luminal dilatasyon ve konjesyon, intertisyel ödeme yol açar. Bu dönemde bazal membranlarda belirgin değişiklik görülmez (30).

Tip II hücrelerde oluşan vakuolizasyon, mitokondrial şişme, internal membranların kaybı ve endoplasmik retikulum harabiyeti 3 - 4 . haftalara kadar devam eder (30).

#### Eksudatif dönem:

Kapiller permeabilite artışı sonrası kapiller sızma sonrası hyalin membran oluşumu ve alveolar boşlukta göllenen ,doza bağımlı olarak artan ve alveolar lavajda tespit edilen eksudatif yüksek protein içeren sıvı oluşumunu içeren dönemdir . Bu

eksudatif sıvı birikimi, > 15 Gy RT sonrası ilk haftadan itibaren başlar, 4 haftada zirveye ulaşır. Doza bağımlı olarak 6 haftadan sonra çözülme eğilimindedir (31).

#### Akut Radyasyon Pnömoniti:

Akut Radyasyon pnömonit dönemi intertisyum ve alveolar boşluklarda , ödem ve inflamasyon ile karakterize , yoğun olarak mononükleer inflamasyon hücrelerin , özellikle köpüksü makrofajların, infiltrasyonunun görüldüğü dönemdir. RT sonrası ilk altı ay içerisinde görülür (22, 29) .

Bakteri, mantar veya parazitlerin neden olduğu pnömonilerin aksine RT pnömonitinde polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu yoktur (32).

Tip II pnömositlerin, Rt sonrası ilk haftadan itibaren akut etki ile vakuolizasyon ve mitokondri değişiklikleri sonrası ilk iki hafta boyunca nekroza uğrarlar ve sayıları azalır. Birinci aydan itibaren ilk yanıt sonrası sayılarında yavaş bir artma görülür. İkinci aydan itibaren sayılarında kompensatuvar artış görülür. Surfaktan kaynağı ve de RT sonrası azalan Tip I hücreler için ana hücre popülasyonu oluştururlar (33).

Yer	0-2 ay	2-9 ay	> 9 ay
<b>Kılcal Damarlar</b>	2 saat: Artmış Geçirgenlik,	Yaygın kollajen, fibrin, ve trombosit obstrüksiyonları,  Azalmış Geçirgenlik,	Kılcal d. Kaybı  Damar rejenerasyonu,  Azalmış Geçirgenlik,
	2 Gün:Hücre dökülmesi, Lümen Tıkanıklığı,		
<b>Tip I Hücreler</b>	Dejeneratif değişiklikler, sayıca azalma,	Sayılar da belirgin azalma,	
<b>Tip II Hücreler</b>	Dejeneratif değişiklikler,	Hücrelerde büyüme, sayıca artma,	Normal boyut, sayı
<b>Bazal Membran</b>	Şişme, düzensizlik	Kalınlaşma, büzülme	Kalınlaşma, büzülme
<b>İntertisyel Boşluk</b>	Ödem, inflamasyon hücre infiltrasyonu,  Bağ dokuda hafif artış,	Mononükleer , inflamasyon hücre infiltrasyonu,  Bağ dokuda belirgin artış,	İnflamasyonda azalma,  Kollajende belirgin artış
<b>Alveolar Boşluk</b>	Kanama,  Fibrin ve hücre debrisı,  Alveolar makrofajlarda artış,	Küçülme,  Yapıda bozulma	Yapıda bozulma

**Tablo 4 RT sonrası değişiklikler (33)**

Alveolar Makrofajlar RT sonrası inflamasyon sürecinde Tip II hücrelerin diferansiyasyonu ve proliferasyonu ve fibroblastların proliferasyonu ve artmış protein sentezlerinde moderatör olarak rol alırlar. Başlıca TGF  $\beta$ , IL-6, TNF  $\alpha$ , PDGF gibi sitokinler salgılayarak inflamasyonun sürmesinde ve de fibroblast aktivasyonunda rol oynarlar. RT sonrası ilk iki – üç haftada alveollerde sayıları azalırken sonraki aylarda

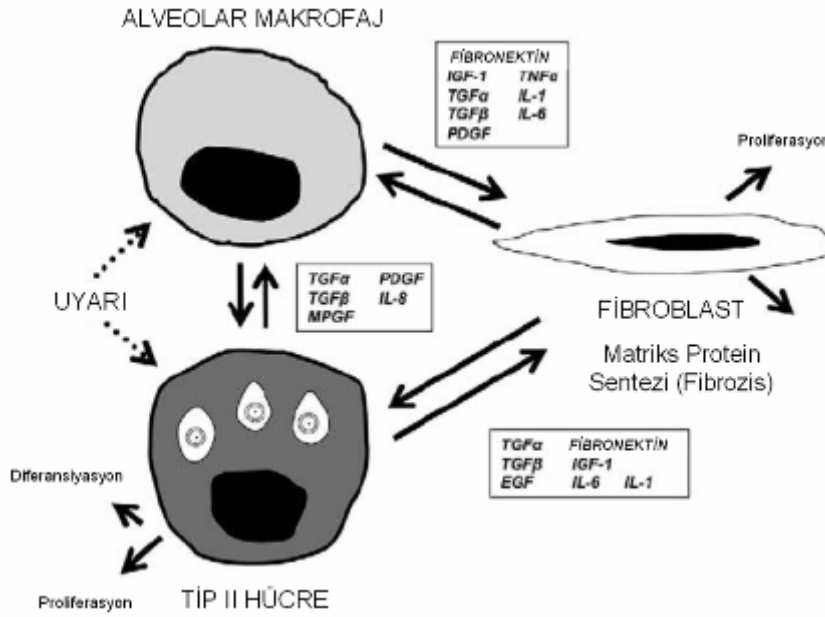
sayıları artar. RT sonrası fagositik aktivitelerinde belirgin değişim görülmemiştir (22, 32).

#### RT sonrası Geç Etkiler , Fibroz

Kronik akciğer hasarından kaynaklanan ve akciğer fonksiyon kaybı ile karakterize klinik bir hastalık tablosudur. Fibrotik değişiklikler RT'den sonraki 6 – 24 ay içerisinde gelişir ve genellikle ikinci yıldan sonra yoğunluğunda değişim görülmez. Fibrozis , kronik enflamasyon ve kronik hasarın sonrasında oluşan vücudun iyileşme reaksiyonudur. RT sonrası doza bağımlı olarak akciğer pnömonitinden sonra gelişebildiği gibi, pnömonit oluşmadan da gözlenebilir. Bu sebepten ötürü fibrozun ayrı bir mekanizması olabileceği ve pnömonit ile örtüşen yollara sahip olmakla beraber, tamamen farklı hücre aktivasyonlarını ve sitokin yollarına sahip olabileceği düşünülmektedir (24, 32).

Tam olarak bilinmeyen birçok hücrenin ve sitokinlerin rol aldığı karışık bir doku reaksiyonu olan fibrozisin karakteristik özelliği hücre popülasyonlarında azalma , hücre ölümleri ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin birikimidir. Genellikle tip I ve tip III kolajen şeklindedir (34).

Radyasyon hasarı sonrası aktive olan alveolar makrofajlar; PDGF, TGF  $\alpha$  , TGF  $\beta$ , IL-6, fibronektin gibi büyüme faktörleri ve sitokin salgırlar. Sitokinler, fibroblastların kemotaksisinde, diferansiasyonunda ve proliferasyonda rol oynarlar. Alveolar intertisyumda biriken aktive fibroblastlar otokrin , parakrin büyüme faktörleri ve sitokin salgılayarak , bu sürecin aktif olarak devamında rol oynarlar (Şekil 8) (27, 35).



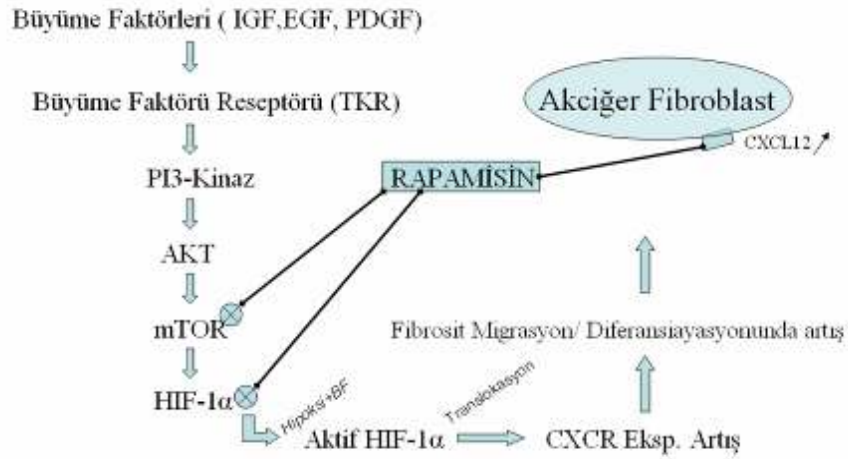
**Şekil 8 Fibroziste Rol Oynayan hücreler (35)**

İntertisyumda iki çeşit fibroblast mevcuttur , aktivasyon sonrası ekstrasellüler matrikse kollajen sentezleyen fibroblastlar ve de alveolar duvarda yer alan kasılma kabiliyeti bulunan myofibroblastlar (27, 35).

İntertisyel boşluk ve alveolar boşluklarda fibroblast ve myofibroblast infiltrasyonu ve sonrasında kollajen birikimi alveolar septumda kalınlaşmaya ve difüzyon kapasitesinde düşmeye yol açar. Gaz değişim kapasitesinde düşme sonrasında fonksiyon kaybı sonrasında “radyasyon pnömopatisi” ve solunum yetmezliği ortaya çıkar (27).

Striter ve ark.’a göre akciğer dokusunda bulunan fibroblastların yanında , kemik iliği türevli mezenkimal progenitor bir hücre olan fibrositler (Fibroblastlardan -fibro , lökositlerden –sit olarak ) de , RT’ye sekonder fibroziste rol oynayabilir. Normalde kan dolaşımında bulunan , lökosit reseptörlerine benzer reseptörleri bulunan bu hücreler, RT hasarı sonrası , hasarlı lokalizasyona ekstravaze olup burada fibroblastlara ve myofibroblastlara dönüşmekte ve salgıladıkları prokollajen ve kollajen ile fibrozise katkıda bulunurlar. Normalde Cd 34, MHC II ve Cd 45 reseptörleri bulunan bu hücreler ortamda IL-4 , IL-13 ve özellikle TGF β varlığında alfa-SMA pozitif myofibroblastlara dönüşürler (36).

RT hasarı sonrası ortamda bulunan çeşitli sitokinler (özellikle TGF  $\beta$ ) ve büyüme faktörleri (özellikle PDGF) sonrası aktive olan PI3K-Akt-mTOR yolu, zaten hipoksik olan ortamda HIF-1 $\alpha$  aktivasyonuna yol açar. Aktif HIF-1  $\alpha$ , CXCR4 nükleer transkripsiyonunu artırır, ve yüzeyde artan CXCR4 ekspresyonuna yol açar. Artan CXCR4 ekspresyonu, fibrosit migrasyonunu ve sonuçta akciğer fibrozunu artırır (Şekil 9) (36, 37).



**Şekil 9 mTOR yolu ve Rapamisin (36)**

Ortama eklenen Sirolimus (Rapamisin), PDGF , EGF ve IGF-I sonrası aktive olan mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) yolunu inhibe ederek, aktif HIF oluşmasını engeller. Fibrositlerdeki CXCR4 mRNA ekspresyonunu azaltarak Fibrosit /Fibroblast/ Myofibroblast aktivasyon ve migrasyonlarını azaltır. Ayrıca yapılan çalışmalarda CXCL12 transkripsiyonel regülasyonunun gene aktive olmuş HIF  $\alpha$  üzerinden olduğu ve ortama eklenen rapamisinin akciğer dokusundaki CXCL 12 seviyelerini %50 azalttığı göstermiştir (36, 38) (Şekil 9).

## 2.8 RT'YE BAĞLI FİBROZİSİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

### Sitokinler ve Interlökinler

Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF)

FGF endotelial ve epitelial hücrelerde DNA sentezini artırır. Protein kinaz C reseptörleri üzerinden, radyasyon hasarı sonrası hücrelerde oluşan apoptozu engeller.

FGF-7 /KGF (keratinisit Büyüme Faktörü) , mezenkimal hücreler tarafından salgılanır, ve tip II hücrelerin proliferasyonu ve diferansiasyonda rol alır. Glukokortikoidler KGF üretimini engellerler, radyasyon pnömonit için verilen kortizon türevi ilaçlar fibrozun oluşumuna katkıda bulunabilirler. TGF  $\beta$  tarafından inhibe edilir (27, 39).

#### TNF alfa

Makrofajlar tarafından salgılanır. Fibroblast proliferasyonu, ekstrasellüler matris salgılanması, ve IL-1 ve IL-6 gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında rol oynar. RT sonrası kanda artmış olan konsatrasyonu dördüncü aydan itibaren normale döner. TNF alfa rekombinant antikor ile tedavi edilen farelerde RT'ye bağımlı fibrozisin azaldığı gösterilmiştir (40).

#### Hipoksi ve VEGF

Akciğerlere uygulanan Rt sonrası 4. haftada belirgin olarak tespit edilen hipoksi, 6. aydan itibaren maksimal seviyesine ulaşır. Hipoksi kendisi bile ROS oluşumuna katkıda bulunabilir, TGF  $\beta$  upregulasyonu yaparak fibrozisi arttırabilir. Hipoksi HIF1alfa degradasyonunu yavaşlatıp, VEGF, eritropoetin, LDH 5 gibi birçok gen aktivasyonları ile glikoliz, anjiogenez veya apoptoz yollarını aktive edebilir (41).

Hipoksiden bağımsız olarak VEGF upregulasyonu, TGF  $\beta$  stimülasyonu ile Smad 3 aktivasyonu ile oluşabilir. Crohn hastalarında , artmış TGF  $\beta$  seviyelerinin VEGF aktivasyonuna , ve otokrin uyarı ile fibrozisi arttırdığı gösterilmiştir (42).

#### Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

C-met geni ile aktive olan , epitel hücrelerinden, fibroblastlardan, ve alveolar makrofajlardan salgılanan anjiogenik özellikleri bulunan ve primer görevi hasar sonrası tamir mekanizmasında rol almak olan bir büyüme faktörüdür. Devamlı ekzojen infüzyonunun farelerde , bleomisin sonrası akciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca idiyopatik akciğer fibrozunda, artmış TGF  $\beta$  sonrası , HGF bağımlı tamir mekanizmasının baskılandığı gösterilmiştir (43, 44).

#### Platelet Derive Büyüme Faktörü (PDGF)

RT sonrası , akciğer endotel hücrelerinde arttığı gösterilmiştir. Fibrozis sırasında Fibroblast/myofibroblast migrasyon ve proliferasyonunu arttıran bir faktördür. Bu stimülasyon Mtor yolağı üzerinden olup rapamisin ile inhibe edilebilir (45).

### İnterlökinler (IL)

TNF alfa ve IL-1 ilk artan sitokinlerdir ve akciğer vaskuler adhezyon moleküllerinin upregulasyonda ve fibroblast diferansiasyonda rol alırlar.

IL-8 lökositler için kuvvetli bir kemotaktik ajandır, anjiogenetik özellikleri mevcuttur.

IL-4 , IL-10, IL-13 anti inflamatuvar sitokinlerdir, TNF alfa supresyonu yaparlar.

IL-6 , aktive makrofajlar, akciğer fibroblastları ve tip II pnömositler tarafından salgılanır ve inflamasyon yoğunluğunu gösteren en önemli sitokindir. Yüksek IL-6 değerleri RT sonrası akciğer pnömonitinde en önemli belirteçdir.

IL-10, T helper tip 2 hücrelerden salınır. Ana görevi enflamasyonun downregülasyonudur. Rt sonrası doza bağımlı olarak ortamdaki miktarı artar. IL-10 RT'ye sekonder lökosit migrasyonunu azaltır. RT sonrası canlıdaki immunosupresif etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir (27, 46, 47).

### Transforming Growth Faktor Beta (TGF Beta)

RT sonrası akciğer hasarında , akciğer fibroblastları aktive myofibroblastlara fenotipik modulasyonunda , kolajen protein sentezinin stimule edilmesinde, proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında ve IL-10 ve HGF gibi anti inflamatuvar sitokinlerin baskılanmasında en önemli , ana sitokindir.

RT sonrası oluşan reaktif oksijen radikalleri latent durumdaki TGF $\beta$ 1'i aktive eder. Proinflamatuvar bir sitokin olan TGF $\beta$ 1 makrofajları aktive ederek sitokin zincirleme reaksiyonlarının başlamasına yol açar. TGF $\beta$ 1 transmembranöz serin/tireonin kinase reseptörleri TGF  $\beta$ 1 tip II reseptörüne bağlanarak , aktive eder. Aktive olmuş Tip II reseptör ile tip I reseptör heteromerik kompleks oluştururlar. Bu sebeple dışardan verilecek TGF  $\beta$ 1 Tip II reseptörleri , ortamdaki TGF $\beta$ 1 'i bağlayarak uyarılmayı engelleyebilirler (35).

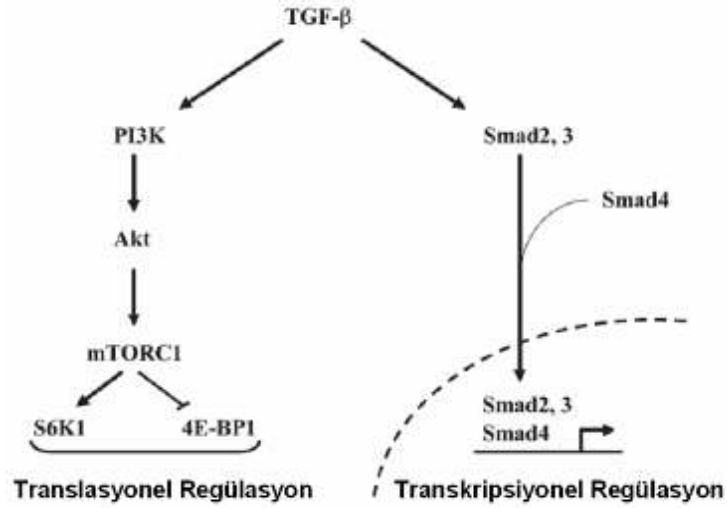
TGF transmembrane aktivasyonu sonrası , TGF  $\beta$  RT'ye sekonder fibrozis oluşumu ile ilgili iki ana yolağı uyarabilir.

### 1) PI3K-Akt-mTOR-S6k1 ve 4e-BP1:

IGF, PDGF gibi birçok büyüme faktörü , yada TGF  $\beta$  gibi sitokinler , mTOR yolunda, öncelikle fosfatidilinisitol 3 kinaz PI3K aktivasyonu görülür. Akt fosforilasyonu ardından , G proteinli RHEB aktivasyonu ardından mTor aktivasyonu görülür. Bu yolun önemi mTOR ardından oluşan S6kinaz1 ve Ökaryotik inisiasyon faktörü 4E bağlanma protein (4E-BP1) aktivasyonu ile hücre içinde translasyonel başlama komplksi oluşması ve hücre içinde protein sentezinin artmasıdır. RT sonrası hasarda ise bu yolun aktivasyonu ile ekstrasellüler matris protein ,kolajen sentezi artar, ve fibrozis indüklenir. Birçok kanser tipinde bu yolun upregülasyonu ile protein sentezi artar, hücre bölünmesi indüklenir ve apoptoz azalır, ayrıca migrasyon, adhezyon ve invazyon kabiliyetleri artar(48).

### 2) Smad 2,3 +Smad 4 – Smad Kompleks

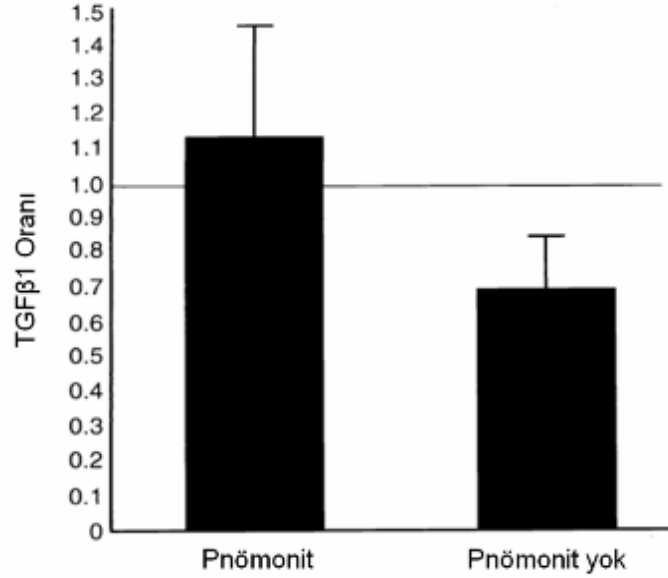
Bu yolda, aktive olan Tip II – I kompleksi , Smad 2’i ardından Smad 3’ü aktive eder. Smad 4 eklenmesi ile oluşan kompleks , nükleus içine transloke olup ilgili genleri aktive ya da deaktive eder. TGF  $\beta$  sonrası akciğerde bulunan fibroblastların epitelial fenotipten , uzun ,aktif myofibroblastlara dönüşmesi ve TGF ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin upregülasyonu bu mekanizma ile olur. Ayrıca benzer şekilde basit epitelial hücrelerin , mezenkimal değişim göstererek metastaz ve invazyon kabiliyetine sahip farklı fenotipte kanser hücrelerine dönüşmesinin (EMT- Endothelial Mesencymal Transition)) bu mekanizma ile olduğu düşünülmektedir (Şekil 10)(48).



Şekil 10 TGF Translasyonel - Transkripsiyonel Regülasyonu (48)

1997 yılında, Vujaskovic ve ark. sıçanlarda sağ hemitoraks tek fraksiyonda 18 Gy ışınlaması sonrasında plazma TGF β düzeylerini ölçtüler. Sağ hemitoraks RT sonrası, ilk onsekiz hafta belirgin bir artış olmaz iken , deney hayvanlarının akciğer hasarını gösteren nefes frekansı ölçümlerindeki belirgin artış ile orantılı bir şekilde on sekizinci haftadan sonra plazma TGF β düzeylerinde artış saptanmıştır. Akciğer fonksiyon kaybı ile aynı zamanda plazma TGF β düzeylerindeki bu artış plazmadaki TGF β'nin RT sonrası akciğer hasarı patogenezinde major bir rol üstlendiği hipotezini ortaya çıkarmıştır. İlk haftalarda artışın olmaması ise lokal TGF β'nin artmış olmasına rağmen dokudan plazmaya sızmasının az olması sebebiyle plazma düzeylerinde artışın saptanamayabileceği şeklinde açıklanabilir (49).

TGF β ile RT'ye bağlı Pnömonit arasındaki ilişki Anscher ve ark. çalışmasında da gösterilmiştir. Akciğer kanser tanılı hastaların TGF β düzeyleri ile hastaların kliniği karşılaştırılmış ve TGF β düzeylerindeki artış ile pnömonit riski ilişkili bulunmuştur (Şekil 11)(50).



**Şekil 11 TGF β1 Oranı ve Pnömonit Bulguları(50)**

Plazma düzeylerinde RT sonrası ilk haftalarda artış olmamasına rağmen , cilde verilen RT sonrası altıncı saatten itibaren 16 Gy ve daha yüksek dozlarda ,TGFβ mRNA'sında artış saptanmıştır. RT sonrası fibrozisin bütün fazlarında TGF β mRNA ekspresyonunda belirgin artış görülür.İlk ayda eritem döneminde normalin oniki katı kadar belirgin bir artış görülürken , nekrozun saptandığı dönemde dört ve de fibrozisin yerleştiği on ikinci ayda bile normalin yaklaşık 9 katı kadar artış saptanmaktadır (34).

Sadece akciğer ve cilt ile sınırlı olmayıp RT ile değişik organların fibrozisi üzerine literatürde birçok çalışma mevcuttur (34).

Rübe ve ark. çalışmasında farelere tüm toraks lojuna , tek fraksiyonda 6 Gy ve 12 Gy RT verilmiş ve TGF β ekspresyonuna PCR ile ardından deney hayvanları kurban edilerek preparatlarda immün histopatolojik TGF β boyası yapılmıştır. PCR ile saptanan TGF β ekspresyonunda verilen dozda artış ile orantılı şekilde belirgin artış saptanmıştır. 6 Gy verilen farelerde artış görülmez iken 12 Gy verilen hayvanlarda birinci haftadan itibaren belirgin artış görülmektedir (51).

TGF β immünohistokimyasal boyamada birinci saatte yapılan boyamada, dokuda belirgin tutulum görülmemektedir. Nadir tip II hücrelerde ve alveolar makrofajlarda minimal boyanma saptanmıştır (51).

RT sonrası dördüncü haftada inflamasyon hücreleri yoğun kemotaksisi ile TGF β ile boyanan fibroblast ve alveolar makrofaj sayısında belirgin artış görülmektedir (51).

RT sonrası PCR ile TGF  $\beta$  mRNA ekspresyonundaki azalmaya benzer şekilde TGF  $\beta$  boyanmasında minimal azalma görülmektedir. Bronşial epitelde boyanma daha belirgin olarak saptanmaktadır (51).

RT sonrası 24. haftada doku yapısında bozulma ve hücre sayı ve çeşidinde azalma ile beraber RT alanında yoğun miktarda TGF  $\beta$  pozitif fibroblastlar görülmektedir. 8. haftaya kontrast bir şekilde peribronşial ve perivasküler boyanmada hücre kaybına sekonder boyanmada azalma saptanmıştır (51).

Anscher ve ark. tüm toraks lojuna , 40 Gy fraksiyone RT uygulananlar ile Sham RT uygulananları ve RT beraberinde düşük ve yüksek doz TGF  $\beta$  antagonisti (1D11) verilen , sıçanları 26. hafta sonrasında TGF $\beta$  immün histokimyasal boyayarak , RT sonrası değişimleri göstermişlerdir.

26 hafta sonrasında RT uygulanan hayvanlarda , RT uygulanmayanlara göre belirgin TGF  $\beta$  boyanma artışı olup , belirgin fibroz alanları ile beraber yoğun TGF  $\beta$  tutan alveolar makrofajlar ve fibroblastlar saptanmıştır.

Düşük doz TGF  $\beta$  antagonistinde , RT uygulananlara göre fark görülmez iken, yüksek doz antagonist alanlarda RT sonrası fibrozda, TGF  $\beta$  boyanan makrofajlar ve fibroblastlarda belirgin şekilde azalma görülmektedir. TGF  $\beta$  'nin fibrozis sürecinde ana mediator olduğu ve TGF  $\beta$  üzerine yapılan tedavi stratejilerinin fibrozisi önlemede veya azaltmakta faydalı olabileceği gösterilmiştir (52).

## 2.9 ANTIÖKSİDAN AJANLAR

### 2.9.1 Superoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz

İyonizan ışınlar , hücredeki birçok molekülle özellikle hücrelerde en çok bulunan su ile reaksiyona girerek reaktif hidroksil radikalleri oluştururlar. Membran, protein ve özellikle DNA harabiyeti yaparak hücresel disfonksiyonlara, transformasyonlara veya hücre ölümüne yol açarlar(53).

SOD ve katalaz , RT sonrası oluşan süperoksit radikallerinin degradasyonu ve ortamdan uzaklaştırılması için canlılarda bilinen en önemli savunma sistemidir. Bu enzimatik sistem ilk olarak 1967 yılında Irwin Frodovich ve Joe McCord tarafından



hidrojen peroksit ile tepkimeye girer. Reaksiyon sonrasında su ve oksijen ortaya çıkar (Şekil 12) (56).

Hidrojen peroksit , enzimin aktif yüzündeki asparajine ve histidine bağlanır. Oksijen atomları arasında proton transferi sonrasında , demir (Fe) oksidasyonu sonrasında su ve oksijen açığa çıkar.

Katalaz benzer reaksiyonla hidrojen peroksit dışında formaldehit, formik asit, alkol ve fenol türevlerini oksitleyerek detoksifikasyon reaksiyonlarına katkıda bulunabilir. Siyanür , katalaz enziminin kompetitif inhibitörü olup katalazdaki heme grubu bağlayarak enzim reaksiyonlarını durdurabilir.

Katalaz genellikle hücre içinde peroksizomlarda bulunur. Bakterilerde ise antimikrobiale etkisi olan hidrojenperoksitin etkilerinden korunmak için kullanılabilirler. M. Tüberkülozis, L. Pneumophila ve C.Jejuni gibi bakterilerde savunma mekanizması olarak bulunabilirler (56).

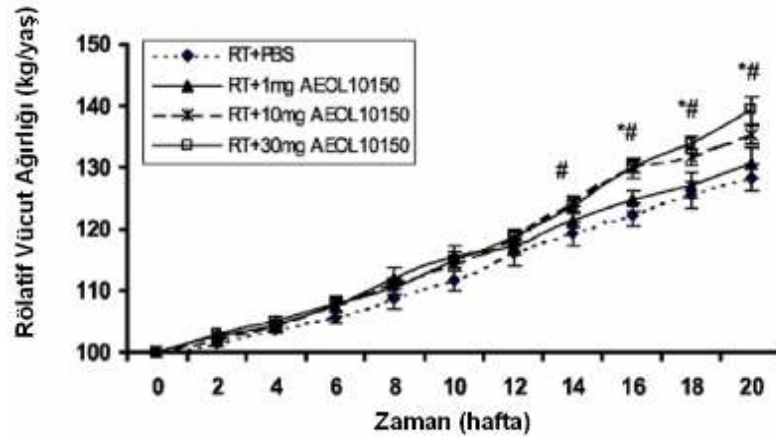
Katalaz enzim eksikliğinde Tip II diyabete yatkınlık, bağışıklık sisteminde yetersizlik sendromları ve DNA tamir mekanizmalarında yetersizlikler görülebilir. Ayrıca insan saçlarının beyazlaşmasında katalaz eksikliğinin sonucunda biriken hidrojen peroksitin rol oynayabileceğini savunan çalışmalar mevcuttur (57, 58).

RT'ye sekonder fibrozis üzerinde çalışmalar ise S. Delanian ile 1994 yılında başlar. Bu çalışmada RT sonrası fibrozisi olan hastalarda altı haftalık Cu-Zn SOD tedavisi ile cilt fibrozisinde azalma saptanmış , ve sonrasında o zamana kadar geri dönüşümsüz olan fibrozis ve SOD mekanizmaları üzerine çalışmalar hız kazanmıştır (59, 60).

Klinik çalışmalarda SOD ve benzeri etki gösteren SOD mimetiklerin RT'ye sekonder akciğer hasarı üzerinde etkinliği gösterilmiştir. Rabbani ve ark. SOD-mimetik ael 10150 ile yaptıkları çalışmalarda sıçan sağ hemitoraksa verilen 28 Gy tek fraksiyonda RT sonrası verilen SOD mimetik ajanın etkinliği birçok parametrede değerlendirilmiştir. Solunum frekans, RT sonrası akciğer hasarını gösteren en önemli parametrelerden biridir. RT sonrası fonksiyon kaybı olan deney hayvanlarında , fonksiyon kaybının tolerasyonu için diğer akciğer kısımları kompensatuvar daha fazla çalışmakta ve azalan O2 saturasyonu takipne ile kompanse edilmeye çalışılmaktadır. RT hasarı ile orantılı bir şekilde solunum sayısı / dak artmaktadır. Bu çalışmada RT sonrası, sadece RT alan sıçanlarda solunum sayısı sekizinci haftadan itibaren belirgin artarken ,

SOD mimetik alanlarda doza bağımlı olarak SOD mimetik koruyucu etkisiyle solunum sayısı artışı daha az olarak görülmüştür (59).

RT sonrasında deney gruplarının takibinde SOD mimetik alanların kilo alımları yaşlarına oranla normal seyrederken , SOD mimetik almayan grupta RT sonrası oksidatif stress ve akciğer hasarına sekonder, yaşlarına oranda daha düşük kiloda kalmışlardır ( Şekil 13) (59).



Şekil 13 RT sonrası gruplarda kilo alımı (59)

RT sonrası 20 haftada sakrifiye edilen sıçanlarda , sağ akciğer lojuna tek fraksiyonda 28 Gy RT alan sıçanlarda , patoloji preparatlarında belirgin fibrozis , hücre kaybı ve akciğer hasarı görülürken , RT + SOD mimetik alanlarda RT'ye bağımlı hasar belirgin bir şekilde daha az görülmektedir. Ayrıca dokudaki kollajen depositlerini gösteren Masson's Trichrome boyası sadece RT alan grupta yaygın kolajen depositleri gösterirken, RT+SOD Mimetik grubunda daha az kolajen tespit edilmiştir (59).

1987 yılında Beckman ve ark. Kendisi de ayrıca bir antioksidan ajan olan polietilen glikol (PEG) ile SOD'u kovalent bağ ile bağlayarak damarlarda dolaşan ekzojen enzimin renal kleransını azalttılar. Bunun sonucunda Cu/Zn SOD enziminin yarı ömrünü ortalama 6 dakikadan 40 saate kadar uzatılabildi (53).

Machtay ve ark. sıçanlarda 13.5 Gy tek doz toraks RT sonrasında PEG-SOD ve PEG-Katalaz kombinasyonunun fibroz önleyici etkisini denediler. RT öncesi bir kez 100 µgr PEG-SOD ve 100 µgr PEG-Katalaz'ı intraperitoneal yoldan uyguladılar. BAL nötrofillerinde , BAL proteinlerinde Akciğer pnomoniti açısından istatistiksel olarak

anlamalı bir etki saptanamamasına karşın dördüncü ayda histopatolojik olarak akciğer fibrozunda belirgin bir azalma saptandı. PEG-SOD ve PEG-Katalaz kombinasyonu , enzimin yarı ömrünü uzatarak tek uygulamada bile RT'ye bağlı fibrozu önlemede etkin olduğu gösterildi (61).

### 2.9.2 N Asetil Sistein (NAC)

N Asetil Sistein (NAC) ilk olarak 1960'larda üretilen , mukolitik ajan olarak ya da parasetamol zehirlenmesinde kullanılan bir ilaçtır. Asetil grubuna bağlı bir nitrojen ve bunlara bağlı bir sistein bileşiğidir. Mukolitik ajan olarak mukustaki disulfit bağlarını kırarak , mukusu sıvılaştırır ve kolay atılımını sağlar. Kistik fibroz, KOAH, Pnomoni, amfizem, bronşit ve bronşiektazi hastalarında bu sebeple kullanılır (62).

Intravenöz formu parasetamol zehirlenmesinde kullanılır. Parasetamolun bir metaboliti olan *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) birikmesi sonrasında karaciğerde azalan glutatyon seviyelerini arttırmakta kullanılır (63).

Kontrast madde sonrası nefropatiyi azaltmakta oral NAC kullanımının etkinliği gösterilmiştir. Tepel ve ark. uygulama öncesi verilen oral NAC'inin % 90'lara varan oranlarda nefropatiyi azalttığını gösterdiler (64).

Literatürde diabetes mellitus, obsessive-kompulsif hastalık, işitme kaybı, KOAH, polikistik over hastalığı, AIDS, trikotilomani gibi bir çok hastalık ile ilgili NAC çalışmaları mevcuttur (63).

İdiopatik akciğer fibrozu (IPF) uyarılmış polimorfonükleer hücreler ve alveolar makrofajların rol aldığı , uzun dönemde akciğer fonksiyon kayıpları ile seyreden bir hastalıktır. Önceki literatürlerde gösterildiği üzere IPF'nda görülen belirgin özellik, akciğer epitelial sıvısındaki major anti oksidan olan Glutatyon (GSH) 'un azalmasıdır. Glutatyon yapısındaki sistein ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>- gibi oksijen radikalleri için anti-oksidan özellik göstermekle beraber vucuttaki önemli anti oksidan enzimlerden glutatyon peroksidazın da prekürsörüdür. NAC ise yapısındaki sistein glutatyon oluşumunu artırarak IPF hastalarında , hastalık kontrolünde fibrozun önlenmesinde önemli katkı sağlamaktadır (65, 66).

Neal ve ark. farelerde tek fraksiyonda verilen 18 Gy tüm vücut RT'si sonrasında verilen intraperitoneal NAC'ın etkinliğini değerlendirmişlerdir. RT sonrası tüm vucutta

fakat belirgin olarak akciğerlerde glutatyon seviyelerinde düşme saptanmıştır. İntraperitoneal verilen NAC , sadece Glutatyon seviyelerini arttırmakla kalmayıp , akciğerde RT sonrası artan ve akciğer hasarı ile ilgili belirteçlerden olan malondialdehit (MDA) seviyelerini de anlamlı derecede düşürmüştür(62).

Nagata ve ark. hiperoksik akciğer hasarında , Hagiwara ve ark. ise Bleomisin sonrası oluşturulan akciğer hasarında , IV ya da aerosol halinde verilen NAC'ının düşmüş Glutatyon seviyelerini arttırarak inflamasyon ve de akciğer fibrozunun azaltılmasında etkinliğini göstermişlerdir. Her iki çalışmada da eksojen NAC, akciğer hücrelerinde Mn SOD ekspresyonunu ayrıca arttırmıştır (67, 68) .

### 2.9.3 Rapamisin (Sirolimus)

Rapamisin diğer bir adıyla Sirolimus, organ transplantasyonlarında , özellikle böbrek transplantasyonlarında organ reddi veya fibrozunu engellemek için kullanılan makrolid grubu bir ilaçtır. Streptomiçes Hygroscopius bakterisinden bir antifungal ajan olarak üretilmiştir. İsmi bakterinin ilk izole edildiği ada olan Rapa Nui'den gelmektedir.

İlk olarak antifungal etkilerinden dolayı üretilen ajan, potent immünoşüpresif ve antiproliferatif özellikleri saptanması üzerine başta kanser ve organ transplantasyonu olmak üzere birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (69).

Rapamisin IL-2 yanıtını baskılayarak T ve B hücrelerinin aktivasyonunu engeller. Öncelikle sitozolik bir protein olan FKBP12 (FK-bağlanan protein 12)'e bağlanır. Rapamisin-FKBP12 protein kompleksi mTOR Complex 1(mTORC1)'e direkt bağlanarak mTOR yolağını inhibe eder (70, 71).

mTORC1 yolağını inhibe eden rapamycin , serin-treonin kinaz inhibitörü etkisi göstererek özellikle T hücrelerinin G1 hücre siklusu fazında duraklamasına ve apoptozlarına yol açar. Bu etkisi sadece aktive olmuş T hücrelerde selektif olarak görüldüğünden immün sistemin diğer hücreleri rapamisinin bu blokajından etkilenmez. Diğer immün şüpresif ajanlara göre daha az yan etki profili gösterir (72).

IGF, PDGF gibi birçok büyüme faktörü , ya da RT sonrası etkinliği artan TGF  $\beta$  gibi sitokinler, mTOR yolunu aktive ederek , gene RT sonrası artan HIF-1alfa'nın fibroblastlar üzerindeki etkinliğini arttırır. Aktive HIF-1 alfa CXCR4 ekspresyonunu arttırarak fibroblast migrasyonunu , kollajen sentezini vede fibrozu arttırır (36, 38).

Ayrıca mTOR yolağının son ürünleri olan S6kinaz1 ve Ökaryotik inisiasyon faktörü 4E bağlanma protein (4E-BP1) aktivasyonu ile hücre içinde translasyonel başlama kompleksi oluşur ve sonrasında protein sentezi özellikle ekstrasellüler matriks protein sentezi artar. Birçok kanser tipinde bu yolun upregülasyonu ile hücre bölünmesi artar ve apoptoz azalır. Kanser hücrelerinin migrasyon , adhezyon ve invazyon kapasitelerindeki artışın gene bu yolun aktivasyonu ile olduğu düşünülmektedir (36, 38).

mTOR inhibisyonu ve Rapamisin kullanımı birçok kanser tipinde denenmektedir. Over, endometrium, meme, lenfoma, glioblastoma multiforme, kaposi sarkomu, akciğer kanserleri gibi birçok kanser tipinde kemoterapi ya da RT kombinasyonları ile denenmektedir (69, 71).

Rapamisin doza bağımlı olarak immünosupresif (0.25 mg/kg/g), antifibroblastik, antiproliferatif etkiler (0.5 mg/kg/g) gösterir. En yüksek plazma konsantrasyonuna oral uygulama sonrası 2.5-3.5 saat içinde ulaşır. Karaciğer metabolize edilir. Yarılanma ömrü 16-20 arasında değişir. İnsanlarda %84, sıçanlarda % 87 oranında plazma hücrelerine bağlandığı bildirilmiştir (72, 73).

Rapamisinin en sık karşılaşılan etkileri fırsatçı enfeksiyonlar, kilo kaybı, hipertansiyon, anemi, diyare, dermatit, trombositopeni, depresyon ve mTOR C2 relatif aktivasyonuna bağlı artmış lipid ve kolesterol seviyeleridir. Nefes darlığı, göğüs ağrısı, kramp şeklinde flank ağrı görülebilir (72).

Bu çalışmada ise mTOR C1 yolağının Rapamisin ile inhibisyonunun RT sonrası pnömonit ve fibroz oluşumundaki etkisi değerlendirildi.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1 Gereçler

#### 3.1.1 Kimyasal Maddeler

RT sırasında stabilizasyonu sağlamak için sıçanlara genel anestezi verildi. Ketamin Hidroklorür ve Xylazine (Ketalar 5mgr/ml; Pfizer ,Rompun 5mgr/ml; Bayer) kullanıldı. Çalışma ilacı olarak üç ayrı etken madde kullanıldı:

1. Etken Madde: Polietilen glikol ile kaplanmış superoksit dismutaz ve katalaz enzimleri (PEG-SOD 1mgr/flk ; Sigma, PEG-Katalaz 2 mgr/flk; Sigma ) intraperitoneal yoldan kullanıldı.
2. Etken Madde: N-Asetil Sistein (NAC) (Asist 300 mgr/ampül; Hüsnu Arsan) intraperitoneal yoldan kullanıldı.
3. Etken Madde: Rapamisin (Sirolimus) (Rapamune 1mgr/tb ; Wyeth) oral gavaj ile solüsyon halinde verildi.

#### 3.1.2 Deney Hayvanları

Deney Hayvanları Kullanım Kursu tamamlandıktan ve de İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan ( Sayı :124 , Karar No : 112 ) etik kurul onayı alındıktan sonra deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü'nden temin edildi , deney süresince takipleri ve kontrolleri etik kurallar ve çalışma prensiplerine uygun olarak yapıldı. Toplam 24 adet 4-6 haftalık 180 -200 gr Winstar albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Cins olarak W.albino literatürde RT sonrası fibrozise duyarlı bir cins olarak bildirildiği için seçildi (74) . üçlü gruplar halinde kafeslere konularak standart yem ve su ad libitum (isteğe bağlı miktarda) beslendiler. Yüzde 50 bağıl nem oranı,  $21 \pm 2$  °C sıcaklık koşullarında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan uygun laboratuvar koşullarında takip edildiler.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1 RT Uygulaması

Çalışma öncesinde en uygun RT şeklini ve planlamasını yapabilmek için 6 haftalık, yaklaşık 180 gr ağırlığında W. Albino cinsi sıçanla BT simulasyon yapıldı. Genel anestezi altında , sıçan uygun pertekse sabitlendikten sonra , planlanan akciğer lojunun daha iyi belirlenebilmesi ve de daha iyi stabilizasyon için silikon baş-boyun maskesi kesilerek , sıçana uygun hale getirildi, ısıtıldıktan sonra pertekse sabitlendi. Bir mm ince kesitli BT çekildikten sonra sanal ortamda volümleri oluşturuldu. Deney hayvanı morbidite ve mortalitesini azaltmak için kalp, özefagus ve karaciğer gibi organların dozunu minimumda tutmak amaçlandı. Literatüre uygun şekilde sağ akciğer üst lobları deneysel fibroz oluşturmak için en uygun RT alanı olarak seçildi(75).

Farklı tedavi makinelerinde (Co60, Saturn, Oncor , Clinac, Cyberknife) farklı planlar yapıldı. Hedef alanın küçüklüğü (<1.5cm<sup>2</sup>), doz homojenitesini bozan ve uygun plan yapılmasını zorlaştıran başlıca faktördü. Ayrıca ışınlanması planlanan deney hayvanlarının uzun süren ışınlama sırasında, anestezi altında iken, kaybedilmemesi, ışınlamanın kısa sürede yapılmasını sağlamak için doz hızı yüksek bir makine kullanılması gerekli görüldü. Küçük alanlarda homojen doz dağılımları elde edebilen , ayrıca anestezi süresini azaltan CyberKnife (Accuray) robotik kollu radyocerrahi makinesi uygun bulundu.

Genel anestezi altında sırtüstü elleri ve ayakları pertekse sabitlenen hayvanlar, uygun set-up sonrasında 1 x 1 cm<sup>2</sup>'lik RT alan merkezi sağ akciğer üst lobların üzerine getirildi. SSD 78.5 cm , yarı kalınlık 1.5 cm konus çapı 1cm olarak ayarlandı. Alan merkezi her sıçan için her setup sonrasında , lazerle kontrol edildi. RT alanı uygun görüldükten sonra tek fraksiyonda 13 Gy (toplam 1450 MU, doz hızı 800 MU/dak) verildi. Yüksek doz , mortaliteyi arttıracığından literatürde RT sonrası fibroz oluşturabildiği gösterilen en uygun doz olan 13 Gy seçilerek uygulanmıştır (61).

RT sonrasında sıçanlar, rastgele olarak her grup için altı sıçan seçildi. Üçü ilaç grubu ve bir kontrol grubu olacak şekilde dört grup oluşturuldu.

### 3.2.2 Etken Madde Uygulamaları

RT sonrası 0. gün olarak kabul edildi. RT sonrası 1. günde ilaç uygulamaları başladı. Ardışık 3 hafta boyunca devam etti.

#### 3.2.2.1 PEG-SOD ve PEG-Katalaz uygulamaları

Soğuk zincirde temin edilen polietilen glikollü Cu /Zn SOD ve katalaz enzimleri, uygulama günlerine kadar – 15 derecede saklandı. Uygulama zamanından 30 dakika kadar öncesinde saklama ünitesinden çıkartılan SOD 1mgr/ flk , steril şartlarda 3 ml serum fizyolojik ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika 34 derece küvezde uygun sıcaklığa getirildi. Katalaz 2 mgr/flk , 3ml serum fizyolojik ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika 34 derece küvezde 5 dakika bekletildikten sonra her ilaçtan 0.5 ml toplam 1 ml intraperitoneal yoldan SOD-Katalaz grubundaki sıçanlara verildi. Haftada bir olarak PEG-SOD 1 mgr/kg , PEG-Katalaz 2 mgr/kg'dan 3 kez verildi. İlaç uygulamalarının dışındaki günlerde günaşırı 1 ml serum fizyolojik verildi.

#### 3.2.2.2 N Asetil Sistein (NAC) uygulamaları

Kullanıma hazır ampulde temin edilen N asetil sistein kullanıldı. RT sonrası 1. günde 300 mgr/kg'dan günaşırı olacak şekilde 3 hafta boyunca verildi. 1 ampul NAC, 34 derecede küvezde 5 dakika bekletildikten sonra 0.5 cc'si 0.5 cc serum fizyolojik ile sulandırılarak intraperitoneal yoldan verildi. Doz literatürdeki sıçanlar üzerindeki farmakolojik çalışmalara bakılarak ayarlandı. Sprong ve ark. çalışmasında W.Albino cinsi sıçanlarda 275 mgr/kg/2 günde , 550mgr/kg/2 günde ve 950 mgr/kg/2 günde kıyaslanmış. 275 mgr/kg/ 2günde infüzyon halinde verilen NAC endotoksin ile oluşturulan oksidatif stress ve akciğer hasarında yeterli anti oksidan etki oluşturabilirken, doz arttırımı ile verilen yüksek dozlarda mortalitenin arttığı gösterilmiştir(76). Bu yüzden en optimal doz gün aşırı 300 mgr/kg olarak belirlendi.

### 3.2.2.3 Rapamisin Uygulamaları

Rapamisin (Sirolimus) 1 mgr'lık tabletler halinde temin edildi. Oral gavaj yolu ile verilebilmesi için distule suda eritmeye çalışıldı. Suda eritemeyen vedistile su ile heterojen bir karışım elde edilmesi üzerine oral solüsyon elde etmek için phosal 50pg solüsyonu (fosfatidilkolin, propilen glikol, gliserid, etanol, soya yağ asitleri) kullanıldı. 1 mgr'lık tabletler toz hale getirildikten sonra 1ml phosal solüsyonu içersinde eriyik hale getirildi. 34 derece küvezde 5 dakika bekletildikten sonra güneşirı oral gavaj ile sıçanlara verildi. Sıçanlarda 0.5 mgr/kg/gün rapamisin dozu literatürde birçok çalışmada kullanılmış, etkinliği gösterilmiş ve de tolere edilen yan etki profili ile takip edilmiştir (71, 72, 77). Oral gavaj yolu ile ilaç uygulanması , sıçanlar için mortaliteyi arttıran bir işlemdir, hayvan kaybını azaltmak için günlük doz sabitlenerek (0.5 mgr/kg/gün ) 3 hafta boyunca güneşirı gavaj uygulaması yapılmıştır.

### 3.2.2 Sıçanların Kilo Takibi

RT anında ve sonrasında haftalık kilo takipleri DETAE'dan temin edilen hassas terazi ile yapılmış ve kaydedilmiştir. RT sonrası 3. haftada exitus olan kontrol grubu 6 nolu sıçan ile RT sonrası , 2. intraperitoneal SOD-Katalaz uygulaması esnasında exitus olan SOD 6 nolu sıçanlar için kilo takip grafikleri oluşturulmamıştır.

### 3.2.3 Sıçanların Ateş Takibi

RT sonrasında haftalık ateş takipleri için DETAE'nde proje öncesinde bir sıçanda , bilinen yöntemler ile ateş ölçülmesi denenmiştir. Isı probu rektal yolla uygulandıktan sonra yaklaşık 2 dakika kadar beklenildikten sonra ölçüm yapılabilmektedir. Morbiditeyi arttırılacağı ve uzun sürmesi nedeniyle efektif ölçümler yapılamayacağı düşünülmesi üzerine , ateş ölçümleri için alternatif yöntemler değerlendirildi. İnfrared ile çalışan temassız ateş ölçer (FT60, Beurer, Almanya) kullanıldı. Bu uygulamanın güvenilirliği ile ilgili 2008 yılında alınmış bir uygunluk sertifikası (Oeko Test, Almanya) bulunmaktadır. Bu sertifikada +/- 0.3 °C ölçüm hassasıyeti bildirilmektedir. Tez dışı sıçanlarda 20'e yakın denemelerde mevcut yöntemler ile uyumlu bulunması üzerine tez çalışmasında kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen nedenlerle ex olan iki sıçan için ateş takip grafikleri oluşturulmamıştır.

### 3.2.4 Sıçanlardaki Fibrozun Bilgisayarlı Tomografi İle Takibi

RT sonrası ilaç uygulamaları yapılan gruplar fibrozis oluşması için takip edildi. Onaltıncı haftada mortaliteyi azaltmak için anestezi verilmeden sıçanlara uygun kaplar hazırlanarak BT görüntüleri alındı. Görüntü kalitesini arttırmak için FOV değeri küçültüldü ve verilen radyasyon düşük tutuldu ve 2 mm kesitli BT'ler alındı

Literatüre uygun olarak 16. haftada çekilen BT'lerde Wiegman ve ark. tarif ettiği RT sonrası değişikliklerden diyafram elevasyonu, kalbin RT lojuna doğru çekilmesi , yer yer yama tarzında yoğunluk artışları ve fibrozis , gruplar bildirilmeden bir radyolog tarafından görülmesine rağmen , verilen doz (Wiegman et al'a göre) kısmen daha düşük tutulduğundan , fibrozisin belirginleşmesi için takibe devam edilmesine karar verildi(75).

21. haftada rapamisin grubundan 6. nolu sıçanın doğal yoldan eksitus olması sebebiyle örnek akciğer dokuları eksize edilerek histopatolojik değerlendirme yapıldı. Fibrozis görülmesi üzerine 22. haftada anestezi altında 2mm ince kesitli BT görüntüleri alındı. Tekrar radyolojik olarak gruplar bildirilmeden değerlendirildi (yok-grad 0,yama tarzında-grad 1, belirgin konsolidasyon-grad 2,birden fazla alanda yaygın konsolidasyon-grad 3 olarak skorlandı) . Literatürde tarif edildiği gibi BT'lerde akciğer dokusu yoğunlukları hesaplandı (Yoğunluk için min. -1000 ile max. +1000 arasındaki matematiksel değerler olan Hounsefield değerleri oluşturuldu) (75). Daha önce belirtilen bulgulara ek olarak artık fibrozisinde belirgin olarak gözlenebilmesi sebebiyle 22. haftada deney sonlandırıldı.

### 3.2.5 Histopatolojik İnceleme

RT sonrası 3. haftada exitus olan kontrol grubu 6 nolu sıçan ile RT sonrası 2. intraperitoneal SOD-Katalaz uygulaması esnasında exitus olan SOD 6 nolu sıçanlar dışında kalan 4 gruptan 22 sıçan, RT sonrası fibrozis oluşması için geçen 22 hafta sonrasında , sakrifiye edildi. Tüm toraksa vertikal bir insizyon sonrası göğüs kafesi açıldı. Trakea lojundan başlayarak bilateral akciğerler ve kalp blok halinde eksize edildi. Akciğerler ve kalp hassas terazide tartıldıktan sonra % 10'luk tamponlanmış formalin çözeltilisinde fiksasyon için bekletildi. İki haftalık bir fiksasyon sürecinden sonra doku numunelerinden 2mm kalınlığında 3'er dilim alınarak rutin doku takibinden

geçirildi. Parçalardan hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5.7  $\mu$  kalınlığındaki kesitler hematoxilen eosin ile boyanıp ışık mikroskopisinde incelendi. Fibrosis değerlendirmesi için Ascroft skalası kullanıldı. Bu skala için Alveolar septa, akciğer yapılarındaki değişiklikler, lökosit infiltrasyonları, damarsal yapılardaki değişiklikler, akciğer ödemi değerlendirildi (78). Kollajen depositleri görüntülemek için Mason Trichrome ile boyandı. RT'ye sekonder akciğer fibrozisi patogenezinde TGF  $\beta$ 'nın rolünü değerlendirmek için preparatlar TGF  $\beta$  antikoru ile immün boyama yapıldı. Değerlendirme sırasında gerçek boyutları daha hassas bir biçimde değerlendirebilmek için 'Olympus Analysis 5' sistemi kullanıldı.

### 3.2.6 Elektron Mikroskopisi

Deney hayvanları sakrifiye edildikten sonra , akciğer dokularından alınan yaklaşık 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalar, stabilizasyon için % 2.5'lik gluteraldehit solusyonuna konulmuştur. Kırksekiz saatlik tespit süresinin ardından rutin post fiksasyon ve takip işlemlerine alınmıştır. Bloklanan materyal sonrasında ultramikrotom ile 60-80 nanometrelik kesitler alınmıştır. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandıktan sonra transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile değerlendirilmiştir.

### 3.2.7 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada amaçlanan deneysel olarak oluşturulan akciğer pnömoniti ve fibrozu üzerinde eksojen verilen üç etken maddenin etkinliğinin değerlendirilmesidir. Üç etken madde ayrı ayrı kilo değişimleri, ateş değişimleri, BT konsantrasyon takibi, akciğer doku yoğunluk ölçümleri ve patolojik fibrozis ve inflamasyon bulguları açısından değerlendirildi. SPSS (SPSS Inc, USA) programı yardımıyla, sıklık tablolarının tek yönlü ANOVA, Fisher Chi-kare testleri kullanılarak analizleri yapıldı. Anlamlılık farkı olarak p=0.05 sınır değer olarak kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 4.1 Kilo Takibi

Takip edilen sıçanların DETAE’de yapılan haftalık ölçümleri Tablo 5’te verilmiştir. RT sonrası birinci haftada sıçanların ortalama ağırlığı 171.7 gr iken, yirmi iki hafta sonrasında 218.6 gr olmuştur. Rastgele seçim sonrasında 1. haftada, SOD grubu ortalaması 172.2 gr; Kontrol grubu ortalaması 175 gr; NAC grubu ortalaması 166.7 gr; Rapamisin grubu ortalaması ise 173.6 gr’dır. RT sonrası 22. haftada grupların ağırlık ortalamaları, SOD grubu 224.8 gr (artış oranı 1.30); Kontrol grubu 220.2 gr (artış oranı 1.26); NAC grubu 213.5 gr (artış oranı 1.28); Rapamisin grubu ise 217.3 gr (artış oranı 1.26)’dır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır.

Hafta	Kontrol				SOD				NAC				Rapamisin									
	1.hf	2.hf	3.hf	4.hf	5.hf	6.hf	7.hf	8.hf	9.hf	10.hf	11.hf	12.hf	13.hf	14.hf	15.hf	16.hf	17.hf	18.hf	19.hf	20.hf	21.hf	22.hf
	164	184	176	179	172	182	163	176	172	168	161	165	167	174	170	163	168	164	181	177	179	173
	169	197	180	183	174	187	176	183	178	174	165	168	172	176	178	174	179	165	180	178	185	183
	174	205	184	185	179	195	174	182	184	178	170	174	177	182	188	176	183	171	183	185	189	185
	173	208	197	191	189	197	179	196	185	184	183	182	182	187	187	179	185	176	188	195	199	201
	185	215	204	205	196	206	184	195	197	188	187	192	194	199	188	182	187	185	189	208	210	205
	188	212	202	206	198	209	187	202	198	193	185	189	192	200	196	178	193	188	212	206	209	203
	180	209	187	197	200	212	184	206	203	199	185	190	194	196	193	185	189	191	216	211	207	204
	187	213	193	207	205	214	189	215	201	191	192	196	199	198	191	195	199	211	220	212	207	207
	193	219	196	205	203	217	201	213	200	204	201	197	198	207	201	195	198	194	213	207	217	213
	196	221	204	211	210	224	199	217	209	209	203	203	209	203	205	187	204	196	223	209	211	209
	197	220	211	215	206	218	195	211	206	205	196	199	198	207	202	186	201	197	217	212	215	208
	196	222	214	219	205	216	197	212	202	207	197	199	199	210	205	193	204	199	215	210	213	209
	197	221	215	217	208	219	199	215	206	210	195	203	204	214	206	192	205	201	217	218	216	212
	201	225	219	221	207	225	201	217	209	212	196	202	206	213	208	196	204	203	219	212	213	210
	204	229	218	227	209	229	203	224	211	211	198	206	208	217	209	201	208	204	221	213	217	214
	199	229	216	227	209	229	205	221	215	216	197	208	210	219	209	203	208	203	220	212	219	217
	201	226	213	221	210	230	211	225	216	217	207	210	212	217	210	200	211	202	221	217	220	214
	200	228	215	229	217	234	204	229	227	220	203	207	209	221	208	206	213	205	227	211	220	215
	210	229	225	223	214	238	202	234	223	225	210	211	216	229	205	204	220	207	223	209	223	216
	204	232	211	225	210	232	209	230	219	199	214	217	225	208	210	211	209	228	216	218	214	214
	205	233	223	226	211	229	209	227	223	217	201	217	216	228	213	211	213	201	226	211	223	216
	201	236	218	232	214	239	208	229	225	223	199	215	218	229	214	206	213	205	228	214	226	218

Tablo 5 Sıçanların Gram/Hafta Değişimleri

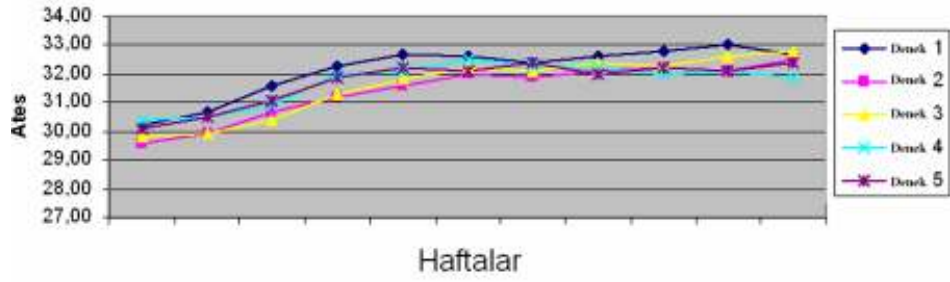
## 4.2 Ateş Takibi

RT sonrasında iki haftada bir temassız ateş ölçer ile tüm grupların ateş ölçümleri yapıldı. Tüm grupların ölçümleri tablo 6'da verilmiştir.

Haftalar	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.	18.	20.	22.
<b>Kontrol</b>	30,20	30,7	31,6	32,3	32,7	32,6	32,4	32,6	32,8	33	32,7
	29,60	29,9	30,7	31,2	31,6	32	31,9	32,1	32,2	32,1	32,5
	29,80	29,9	30,4	31,3	31,8	32,2	32,1	32,4	32,3	32,6	32,8
	30,40	30,5	30,9	32	32,1	32,5	32,3	32,2	32	32,1	31,9
	30,10	30,5	31,1	31,9	32,2	32,1	32,4	32	32,2	32,1	32,4
<b>SOD</b>	30,2	30,3	30,5	30,8	31,1	30,8	30,4	30,4	30,2	30,1	29,9
	29,6	29,8	30,2	30,5	30,3	30,6	30,7	30,4	30,6	30,5	30,3
	30,1	30,2	30	30,1	30,4	30,7	30,3	30,6	30,5	30,7	30,6
	29,2	29,5	30,3	30,5	30,7	30,5	30,1	30,1	30,8	30,3	29,9
	30,6	30,5	30,7	30,8	30,9	31	31,3	30,9	31	30,8	30,7
<b>NAC</b>	30,00	30,2	30,7	30,9	31,1	30,9	30,6	31,1	30,9	31	31,4
	30,10	30,4	30,8	31	30,8	30,9	31	31,2	31	30,6	30,5
	29,70	29,6	30,4	30,7	30,5	30,8	31,1	31,4	31,3	31,1	30,9
	29,50	29,9	30,8	31,1	31,3	31,2	30,9	30,7	30,6	30,8	30,7
	29,90	30,3	30,9	30,5	30,8	30,6	30,3	30,2	30,3	30,5	30,6
	30,20	30,6	30,6	30,9	30,8	31,2	30,9	30,6	29,9	30,7	30,3
<b>Rapamisin</b>	29,70	30,3	31	31,8	32,1	32,3	32,5	32,7	32,1	32,5	32,6
	29,80	30,1	31,3	31,7	32,3	32,2	32,3	32,1	32,3	32,7	32,5
	30,30	30,3	31,7	31,4	31,9	32,5	32,7	32,4	32,6	32,8	32,7
	30,50	30,5	31,5	31,8	32,6	32,6	32,4	32,3	32,1	32,3	32,4
	29,70	30,7	30,9	32,3	32,6	32,4	32,7	32,8	32,7	32,4	32,2
	29,80	30,3	30,7	31	31,7	32,7	32,6	32,6	32,7	32,5	32,7

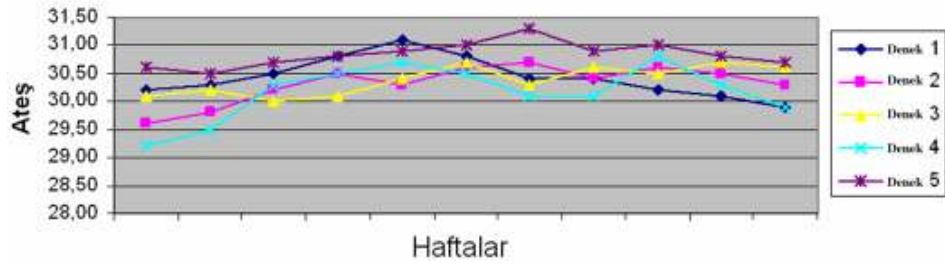
**Tablo 6 Ateş Ölçümleri**

Kontrol Grubu: Tüm deney hayvanlarında, NAC ve SOD grubuna göre 6. haftadan itibaren belirgin artışlar görüldü. En yüksek ateş 20. haftada 33 °C oldu. Ateş çizelgesi Şekil 14'da gösterilmiştir.



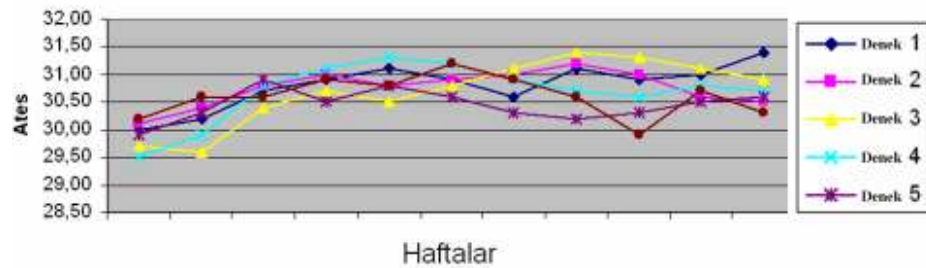
Şekil 14 Kontrol Grubu Ateş Çizelgesi

SOD Grubu: Takiplerde pnömonit düşündürecek yüksek ateşler görülmedi. En yüksek ateş 14. haftada 31,3 °C oldu. Ateş çizelgesi Şekil 15’de gösterilmiştir.



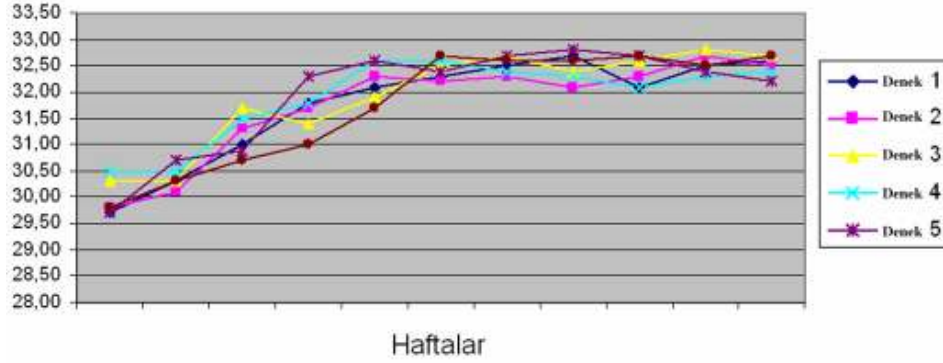
Şekil 15 SOD Grubu Ateş Çizelgesi

NAC Grubu: SOD grubuna benzer şekilde pnömonit düşündüren yüksek ateş veya ani artışlar görülmedi. En yüksek ateş 31,4 °C ile 16 ve 22. haftalarda görülmüştür (Şekil 16).



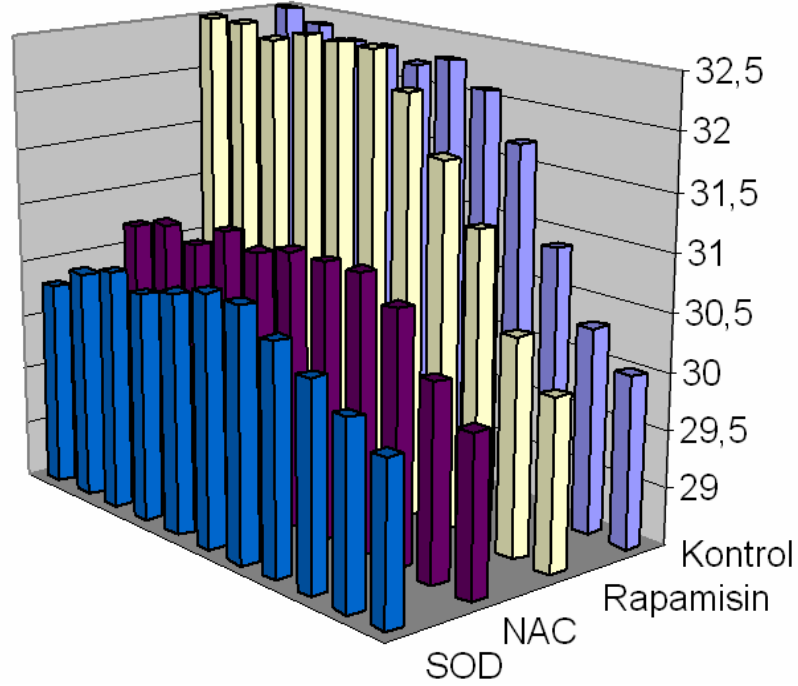
Şekil 16 NAC Grubu Ateş Çizelgesi

Rapamisin Grubu: Kontrol grubuna benzer, NAC ve SOD gruplarına göre belirgin şekilde yüksek ateşler gözlenmiştir. 6. haftadan itibaren artan, dik eğimli ateş çizelgesi gözlemlendi (Şekil 17). En yüksek ateş 16. haftada 32.8°C olarak ölçüldü.



Şekil 17 Rapamisin Grubu Ateş Çizelgesi

Tüm grupların ateş ölçümleri sütun grafiği şeklinde Şekil 18’de verilmiştir. Tüm gruplarda RT sonrası ateş ölçümlerinde yükselme görülürken, bu yükselme 6. haftadan itibaren istatistiksel açıdan anlamlı bir hale gelir ( $p=0,004$ ). Kontrol ve Rapamisin gruplarında bu artış daha belirgindir. 6. haftadan itibaren NAC ve SOD grupları ile kontrol ve rapamisin grupları arasındaki fark artar. 6. haftada SOD grubu; kontrol grubuna göre ( $p=0,001$ , %95 CI 0.420 - 1.267) ve Rapamisin grubuna göre ( $p=0,011$ , %95 CI -1.042 - -0.158 ) anlamlı şekilde daha düşük ateşlidir. Sekizinci haftadan itibaren hem NAC grubu ; kontrol grubuna ( $p=0,001$ , %95 CI -1,356- -0.424 ) ve rapamisin grubuna ( $p=0,011$ , %95 CI -1.042 - -0.158 ) göre anlamlı şekilde düşük ateş ölçümlerine sahiptir hem de SOD grubu; kontrol grubuna ( $p=0,001$ , %95 CI -1.592 - -0.661 ) ve rapamisin grubuna ( $p=0,0001$ , %95 CI -1.686 - -0.714 ) göre anlamlı şekilde daha düşük ateş ölçümlerine sahiptir.



**Şekil 18 Ateş/ Haftalar (Tüm Gruplar)**

#### 4.3 BT ile Fibrozis Takibi

Wiegman ve ark. tarif ettiği; sıçanlarda RT sonrası değişikliklerden diyafram elevasyonu, kalbin RT lojuna doğru çekilmesi , yoğunluk artışları ve fibrozis değerlendirildi (yok-grad 0, yama tarzında-grad 1, belirgin konsolidasyon-grad2, birden fazla alanda yaygın-grad 3 olarak skorlandı) (75).

Radyolojik olarak fibrozis en az NAC grubunda görüldü. Diyafram yükselmesi görülmez iken kalp çekilmesi bir sıçanda görüldü. SOD grubunda ise ortalama fibrozis skoru biraz daha yüksek iken diyafram yükselmesi ya da kalp çekilmesi gözlenmedi. Kontrol ve Rapamisin gruplarında fibrozis belirgin olarak daha fazla görülürken diyafram yükselmesi kontrol grubunda bir sıçanda, rapamisin grubunda ise iki sıçanda gözlemlendi. Kalp çekilmesi ise her iki grupta da yaygın bir şekilde dörder sıçanda gözlemlendi (Tablo 7, 8 ). Rapamisin grubu üç sıçanda buzlu cam görüntüsü ile beraber RT alanlarının dışında da özellikle periferik alanlara lokalize yama tarzında fibrozis alanları izlendi.

	No	Fibrozis	Diyafram Yükselmesi	Kalp Çekilmesi
Kontrol	1	2	-	1
	2	3	-	1
	3	2	-	-
	4	2	-	1
	5	3	1	1
SOD	1	2	-	-
	2	1	-	-
	3	2	-	-
	4	1	-	-
	5	2	-	-
NAC	1	1	-	-
	2	1	-	-
	3	1	-	-
	4	2	-	1
	5	2	-	-
	6	1	-	-
Rapamisin	1	2	-	-
	2	1	-	-
	3	3	1	1
	4	2	-	1
	5	3	1	1
	6	2	-	1

**Tablo 7 Sıçanların Radyolojik Değerlendirmesi**

Yapılan istatistiksel analiz sonrasında fibrozis ve diyafram yükselmesi bulgularında anlamlı fark saptanmaz iken kalp çekilmesi SOD grubunda; kontrol grubuna göre ( $p=0.010$ ) ve rapamisin grubuna göre ( $p=0.022$ ) anlamlı şekilde az görülmüştür.

		<b>Kontrol</b>	<b>SOD</b>	<b>NAC</b>	<b>Rapamisin</b>	<i>Toplam</i>
<b>Fibrozis</b>	<b>1</b>	0	2	4	2	7
	<b>2</b>	3	3	2	3	11
	<b>3</b>	2	0	0	2	4
<b>Diyafram Yükselmesi</b>	<b>0</b>	4	5	6	4	19
	<b>1</b>	1	0	0	2	3
<b>Kalp Çekilmesi</b>	<b>0</b>	1	5	5	2	13
	<b>1</b>	4	0	1	4	9
<i>Toplam</i>		5	5	6	6	22

**Tablo 8 Radyolojik Bulgular ve Dağılımı**

BT görüntüleri üzerinde ayrıca Wiegman ve ark. çalışmasında tarif edildiği üzere yapılan yoğunluk hesaplamaları Tablo 9’da verilmiştir. (75).

	<b>Sağ Akc.</b>	<b>Sol Akc.</b>
<b>Kontrol</b>	-226	-611
	-221	-611
	-168	-418
	-315	-469
	-326	-506
<b>SOD</b>	-481	-624
	-354	-598
	-245	-397
	-532	-649
	-489	-582
<b>NAC</b>	-449	-517
	-460	-533
	-297	-331
	-286	-613
	-227	-327
	-365	-473
<b>Rapamisin</b>	-137	-259
	-191	-214
	-224	-237
	-205	-264
	-241	-339
	-187	-234

**Tablo 9 Grupların BT Yoğunluk Ölçümleri**

Yoğunluk ortalamaları incelendiğinde RT alan sağ akciğer ile RT almayan sol akciğer arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ( $p=0.001$ ). RT alan sağ akciğer için grup analizlerinde ise kontrol ve rapamisin gruplarına göre NAC ve SOD grupları istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az yoğun (daha yüksek negatif değer) olarak ölçüldü (NAC için  $p=0.006$ , SOD için  $p<0.001$ ). RT almayan sol akciğerde ise rapamisin grubu diğer üç gruba göre anlamlı bir şekilde daha yoğun olarak ölçüldü (Rapamisin grubu karşılaştırması NAC için  $p=0.001$  % 95 CI 98.75 – 316.92, SOD için  $p<0.001$  CI 197.76 – 426.57, Kontrol grubu için  $p<0.001$  CI 150.76 – 379.57).

#### 4.4 Patolojik İnceleme

Sakrifiye edilen sıçanlarda akciğerler ve kalp eksize edildikten sonra patolojik

##### İnterlökinler (IL)

TNF alfa ve IL-1 ilk artan sitokinlerdir ve akciğer vasküler adhezyon moleküllerinin upregulasyonda ve fibroblast diferansiasyonda rol alırlar.

IL-8 lökositler için kuvvetli bir kemotaktik ajandır, anjiogenetik özellikleri mevcuttur.

IL-4 , IL-10, IL-13 anti inflamatuvar sitokinlerdir, TNF alfa supresyonu yaparlar.

IL-6 , aktive makrofajlar, akciğer fibroblastları ve tip II pnömositler tarafından salgılanır ve inflamasyon yoğunluğunu gösteren en önemli sitokindir. Yüksek IL-6 değerleri RT sonrası akciğer pnömonitinde en önemli belirteçdir.

IL-10, T helper tip 2 hücrelerden salınır. Ana görevi enflamasyonun downregülasyonudur. Rt sonrası doza bağımlı olarak ortamdaki miktarı artar. IL-10 RT'ye sekonder lökosit migrasyonunu azaltır. RT sonrası canlıdaki immunosupresif etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir (27, 46, 47).

##### Transforming Growth Faktor Beta (TGF Beta)

RT sonrası akciğer hasarında , akciğer fibroblastları aktive myofibroblastlara fenotipik modulasyonunda , kolajen protein sentezinin stimule edilmesinde, proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında ve IL-10 ve HGF gibi anti inflamatuvar sitokinlerin baskılanmasında en önemli , ana sitokindir.

RT sonrası oluşan reaktif oksijen radikalleri latent durumdaki TGF $\beta$ 1'i aktive eder. Proinflamatuvar bir sitokin olan TGF $\beta$ 1 makrofajları aktive ederek sitokin zincirleme reaksiyonlarının başlamasına yol açar. TGF $\beta$ 1 transmembranöz serin/treonin kinase reseptörleri TGF  $\beta$ 1 tip II reseptörüne bağlanarak , aktive eder. Aktive olmuş Tip II reseptör ile tip I reseptör heteromerik kompleks oluştururlar. Bu

sebeple dışardan verilecek TGF  $\beta$ 1 Tip II reseptörleri , ortamdaki TGF $\beta$ 1 'i bağlayarak uyarılmayı engelleyebilirler (35).

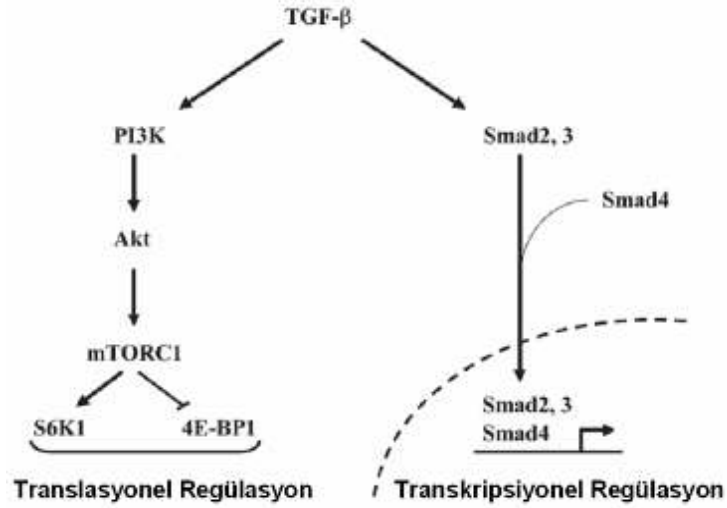
TGF transmembrane aktivasyonu sonrası , TGF  $\beta$  RT'ye sekonder fibrozis oluşumu ile ilgili iki ana yolağı uyarabilir.

### 3) PI3K-Akt-mTOR-S6k1 ve 4e-BP1:

IGF, PDGF gibi birçok büyüme faktörü , yada TGF  $\beta$  gibi sitokinler , mTOR yolunda, öncelikle fosfatidilinisitol 3 kinaz PI3K aktivasyonu görülür. Akt fosforilasyonu ardından , G proteinli RHEB aktivasyonu ardından mTor aktivasyonu görülür. Bu yolun önemi mTOR ardından oluşan S6kinaz1 ve Ökaryotik inisiasyon faktörü 4E bağlanma protein (4E-BP1) aktivasyonu ile hücre içinde translasyonel başlama kompleksi oluşması ve hücre içinde protein sentezinin artmasıdır. RT sonrası hasarda ise bu yolun aktivasyonu ile ekstrasellüler matriks protein ,kolajen sentezi artar, ve fibrozis indüklenir. Birçok kanser tipinde bu yolun upregülasyonu ile protein sentezi artar, hücre bölünmesi indüklenir ve apoptoz azalır, ayrıca migrasyon, adhezyon ve invazyon kabiliyetleri artar(48).

### 4) Smad 2,3 +Smad 4 – Smad Kompleks

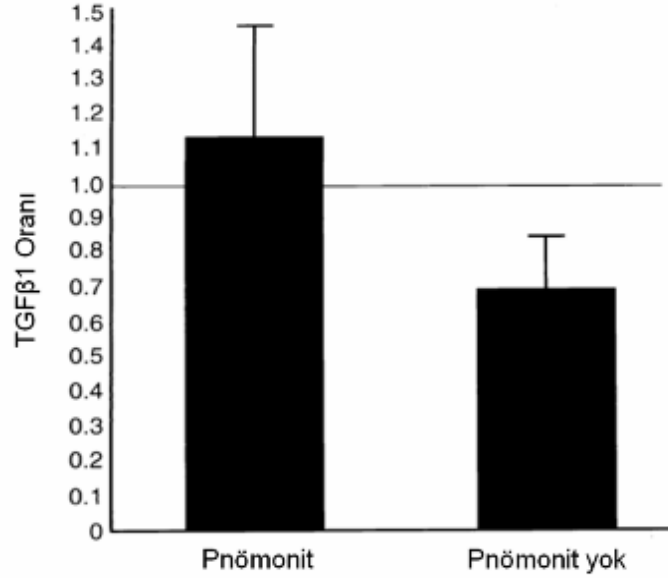
Bu yolda, aktive olan Tip II – I kompleksi , Smad 2'i ardından Smad 3'ü aktive eder. Smad 4 eklenmesi ile oluşan kompleks , nükleus içine transloke olup ilgili genleri aktive ya da deaktive eder. TGF  $\beta$  sonrası akciğerde bulunan fibroblastların epitelial fenotipten , uzun ,aktif myofibroblastlara dönüşmesi ve TGF ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin upregülasyonu bu mekanizma ile olur. Ayrıca benzer şekilde basit epitelial hücrelerin , mezenkimal değişim göstererek metastaz ve invazyon kabiliyetine sahip farklı fenotipte kanser hücrelerine dönüşmesinin (EMT- Endothelial Mesencymal Transition)) bu mekanizma ile olduğu düşünülmektedir (Şekil 10)(48).



Şekil 19 TGF Translasyonel - Transkripsiyonel Regülasyonu (48)

1997 yılında, Vujaskovic ve ark. sıçanlarda sağ hemitoraks tek fraksiyonda 18 Gy ışınlanması sonrasında plazma TGF β düzeylerini ölçtüler. Sağ hemitoraks RT sonrası, ilk onsekiz hafta belirgin bir artış olmaz iken , deney hayvanlarının akciğer hasarını gösteren nefes frekansı ölçümlerindeki belirgin artış ile orantılı bir şekilde on sekizinci haftadan sonra plazma TGF β düzeylerinde artış saptanmıştır. Akciğer fonksiyon kaybı ile aynı zamanda plazma TGF β düzeylerindeki bu artış plazmadaki TGF β'nin RT sonrası akciğer hasarı patogenezinde major bir rol üstlendiği hipotezini ortaya çıkarmıştır. İlk haftalarda artışın olmaması ise lokal TGF β'nin artmış olmasına rağmen dokudan plazmaya sızmasının az olması sebebiyle plazma düzeylerinde artışın saptanamayabileceği şeklinde açıklanabilir (49).

TGF β ile RT'ye bağlı Pnömonit arasındaki ilişki Anscher ve ark. çalışmasında da gösterilmiştir. Akciğer kanser tanılı hastaların TGF β düzeyleri ile hastaların kliniği karşılaştırılmış ve TGF β düzeylerindeki artış ile pnömonit riski ilişkili bulunmuştur (Şekil 11)(50).



**Şekil 20 TGF β1 Oranı ve Pnömonit Bulguları(50)**

Plazma düzeylerinde RT sonrası ilk haftalarda artış olmamasına rağmen , cilde verilen RT sonrası altıncı saatten itibaren 16 Gy ve daha yüksek dozlarda ,TGFβ mRNA'sında artış saptanmıştır. RT sonrası fibrozisin bütün fazlarında TGF β mRNA ekspresyonunda belirgin artış görülür.İlk ayda eritem döneminde normalin oniki katı kadar belirgin bir artış görülürken , nekrozun saptandığı dönemde dört ve de fibrozisin yerleştiği on ikinci ayda bile normalin yaklaşık 9 katı kadar artış saptanmaktadır (34).

Sadece akciğer ve cilt ile sınırlı olmayıp RT ile değişik organların fibrozisi üzerine literatürde birçok çalışma mevcuttur (34).

Rübe ve ark. çalışmasında farelere tüm toraks lojuna , tek fraksiyonda 6 Gy ve 12 Gy RT verilmiş ve TGF β ekspresyonuna PCR ile ardından deney hayvanları kurban edilerek preparatlarda immün histopatolojik TGF β boyası yapılmıştır. PCR ile saptanan TGF β ekspresyonunda verilen dozda artış ile orantılı şekilde belirgin artış saptanmıştır. 6 Gy verilen farelerde artış görülmez iken 12 Gy verilen hayvanlarda birinci haftadan itibaren belirgin artış görülmektedir (51).

TGF β immünohistokimyasal boyamada birinci saatte yapılan boyamada, dokuda belirgin tutulum görülmemektedir. Nadir tip II hücrelerde ve alveolar makrofajlarda minimal boyanma saptanmıştır (51).

RT sonrası dördüncü haftada inflamasyon hücreleri yoğun kemotaksisi ile TGF β ile boyanan fibroblast ve alveolar makrofaj sayısında belirgin artış görülmektedir (51).

RT sonrası PCR ile TGF  $\beta$  mRNA ekspresyonundaki azalmaya benzer şekilde TGF  $\beta$  boyanmasında minimal azalma görülmektedir. Bronşial epitelde boyanma daha belirgin olarak saptanmaktadır (51).

RT sonrası 24. haftada doku yapısında bozulma ve hücre sayı ve çeşidinde azalma ile beraber RT alanında yoğun miktarda TGF  $\beta$  pozitif fibroblastlar görülmektedir. 8. haftaya kontrast bir şekilde peribronşial ve perivasküler boyanmada hücre kaybına sekonder boyanmada azalma saptanmıştır (51).

Anscher ve ark. tüm toraks lojuna , 40 Gy fraksiyone RT uygulananlar ile Sham RT uygulananları ve RT beraberinde düşük ve yüksek doz TGF  $\beta$  antagonisti (1D11) verilen , sıçanları 26. hafta sonrasında TGF $\beta$  immün histokimyasal boyayarak , RT sonrası değişimleri göstermişlerdir.

26 hafta sonrasında RT uygulanan hayvanlarda , RT uygulanmayanlara göre belirgin TGF  $\beta$  boyanma artışı olup , belirgin fibroz alanları ile beraber yoğun TGF  $\beta$  tutan alveolar makrofajlar ve fibroblastlar saptanmıştır.

Düşük doz TGF  $\beta$  antagonistinde , RT uygulananlara göre fark görülmez iken, yüksek doz antagonist alanlarda RT sonrası fibrozda, TGF  $\beta$  boyanan makrofajlar ve fibroblastlarda belirgin şekilde azalma görülmektedir. TGF  $\beta$  'nin fibrozis sürecinde ana mediator olduğu ve TGF  $\beta$  üzerine yapılan tedavi stratejilerinin fibrozisi önlemede veya azaltmakta faydalı olabileceği gösterilmiştir (52).

## 2.10 ANTİOKSİDAN AJANLAR

### 2.9.1 Superoksit Dismutaz (SOD) ve Katalaz

İyonizan ışınlar , hücredeki birçok molekülle özellikle hücrelerde en çok bulunan su ile reaksiyona girerek reaktif hidroksil radikalleri oluştururlar. Membran, protein ve özellikle DNA harabiyeti yaparak hücresel disfonksiyonlara, transformasyonlara veya hücre ölümüne yol açarlar(53).

SOD ve katalaz , RT sonrası oluşan süperoksit radikallerinin degradasyonu ve ortamdan uzaklaştırılması için canlılarda bilinen en önemli savunma sistemidir. Bu enzimatik sistem ilk olarak 1967 yılında Irwin Frodovich ve Joe McCord tarafından



hidrojen peroksit ile tepkimeye girer. Reaksiyon sonrasında su ve oksijen ortaya çıkar (Şekil 12) (56).

Hidrojen peroksit , enzimin aktif yüzündeki asparajine ve histidine bağlanır. Oksijen atomları arasında proton transferi sonrasında , demir (Fe) oksidasyonu sonrasında su ve oksijen açığa çıkar.

Katalaz benzer reaksiyonla hidrojen peroksit dışında formaldehit, formik asit, alkol ve fenol türevlerini oksitleyerek detoksifikasyon reaksiyonlarına katkıda bulunabilir. Siyanür , katalaz enziminin kompetitif inhibitörü olup katalazdaki heme grubu bağlayarak enzim reaksiyonlarını durdurabilir.

Katalaz genellikle hücre içinde peroksizomlarda bulunur. Bakterilerde ise antimikrobial etkisi olan hidrojenpreoksitin etkilerinden korunmak için kullanılabilirler. M. Tüberkülozis, L. Pneumophila ve C.Jejuni gibi bakterilerde savunma mekanizması olarak bulunabilirler (56).

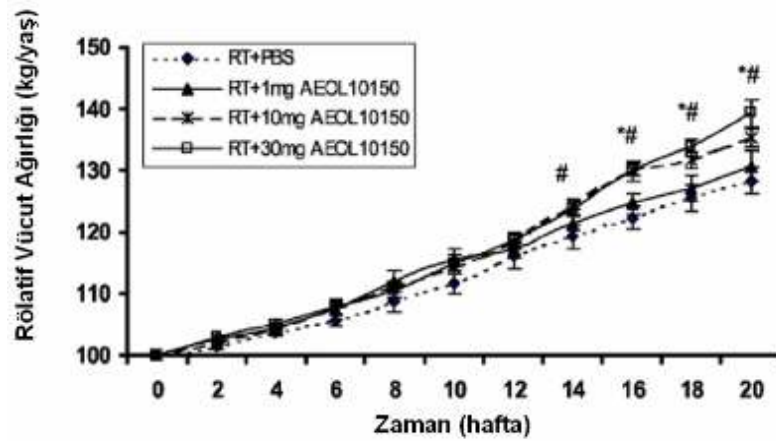
Katalaz enzim eksikliğinde Tip II diyabete yatkınlık, bağışıklık sisteminde yetersizlik sendromları ve DNA tamir mekanizmalarında yetersizlikler görülebilir. Ayrıca insan saçlarının beyazlaşmasında katalaz eksikliğinin sonucunda biriken hidrojen peroksitin rol oynayabileceğini savunan çalışmalar mevcuttur (57, 58).

RT'ye sekonder fibrozis üzerinde çalışmalar ise S. Delanian ile 1994 yılında başlar. Bu çalışmada RT sonrası fibrozisi olan hastalarda altı haftalık Cu-Zn SOD tedavisi ile cilt fibrozisinde azalma saptanmış , ve sonrasında o zamana kadar geri dönüşümsüz olan fibrozis ve SOD mekanizmaları üzerine çalışmalar hız kazanmıştır (59, 60).

Klinik çalışmalarda SOD ve benzeri etki gösteren SOD mimetiklerin RT'ye sekonder akciğer hasarı üzerinde etkinliği gösterilmiştir. Rabbani ve ark. SOD-mimetik aeor 10150 ile yaptıkları çalışmalarda sıçan sağ hemitoraksa verilen 28 Gy tek fraksiyonda RT sonrası verilen SOD mimetik ajanın etkinliği birçok parametrede değerlendirilmiştir. Solunum frekans, RT sonrası akciğer hasarını gösteren en önemli parametrelerden biridir. RT sonrası fonksiyon kaybı olan deney hayvanlarında , fonksiyon kaybının tolerasyonu için diğer akciğer kısımları kompensatuvar daha fazla çalışmakta ve azalan O2 saturasyonu takipne ile kompanse edilmeye çalışılmaktadır. RT hasarı ile orantılı bir şekilde solunum sayısı / dak artmaktadır. Bu çalışmada RT sonrası, sadece RT alan sıçanlarda solunum sayısı sekizinci haftadan itibaren belirgin artarken ,

SOD mimetik alanlarda doza bağımlı olarak SOD mimetik koruyucu etkisiyle solunum sayısı artışı daha az olarak görülmüştür (59).

RT sonrasında deney gruplarının takibinde SOD mimetik alanların kilo alımları yaşlarına oranla normal seyrederken , SOD mimetik almayan grupta RT sonrası oksidatif stress ve akciğer hasarına sekonder, yaşlarına oranda daha düşük kiloda kalmışlardır ( Şekil 13) (59).



Şekil 22 RT sonrası gruplarda kilo alımı (59)

RT sonrası 20 haftada sakrifiye edilen sıçanlarda , sağ akciğer lojuna tek fraksiyonda 28 Gy RT alan sıçanlarda , patoloji preparatlarında belirgin fibrozis , hücre kaybı ve akciğer hasarı görülürken , RT + SOD mimetik alanlarda RT'ye bağımlı hasar belirgin bir şekilde daha az görülmektedir. Ayrıca dokudaki kollajen depositlerini gösteren Masson's Trichrome boyası sadece RT alan grupta yaygın kolajen depositleri gösterirken, RT+SOD Mimetik grubunda daha az kolajen tespit edilmiştir (59).

1987 yılında Beckman ve ark. Kendisi de ayrıca bir antioksidan ajan olan polietilen glikol (PEG) ile SOD'u kovalent bağ ile bağlayarak damarlarda dolaşan ekzojen enzimin renal kleransını azalttılar. Bunun sonucunda Cu/Zn SOD enziminin yarı ömrünü ortalama 6 dakikadan 40 saate kadar uzatılabildi (53).

Machtay ve ark. sıçanlarda 13.5 Gy tek doz toraks RT sonrasında PEG-SOD ve PEG-Katalaz kombinasyonunun fibroz önleyici etkisini denediler. RT öncesi bir kez 100 µgr PEG-SOD ve 100 µgr PEG-Katalaz'ı intraperitoneal yoldan uyguladılar. BAL nötrofillerinde , BAL proteinlerinde Akciğer pnomoniti açısından istatistiksel olarak

anlamlı bir etki saptanamamasına karşın dördüncü ayda histopatolojik olarak akciğer fibrozunda belirgin bir azalma saptandı. PEG-SOD ve PEG-Katalaz kombinasyonu , enzimin yarı ömrünü uzatarak tek uygulamada bile RT'ye bağlı fibrozu önlemede etkin olduğu gösterildi (61).

### 2.9.2 N Asetil Sistein (NAC)

N Asetil Sistein (NAC) ilk olarak 1960'larda üretilen , mukolitik ajan olarak ya da parasetamol zehirlenmesinde kullanılan bir ilaçtır. Asetil grubuna bağlı bir nitrojen ve bunlara bağlı bir sistein bileşiğidir. Mukolitik ajan olarak mukustaki disulfit bağlarını kırarak , mukusu sıvılaştırır ve kolay atılımını sağlar. Kistik fibroz, KOAH, Pnomoni, amfizem, bronşit ve bronşiektazi hastalarında bu sebeple kullanılır (62).

Intravenöz formu parasetamol zehirlenmesinde kullanılır. Parasetamolun bir metaboliti olan *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) birikmesi sonrasında karaciğerde azalan glutatyon seviyelerini arttırmakta kullanılır (63).

Kontrast madde sonrası nefropatiyi azaltmakta oral NAC kullanımının etkinliği gösterilmiştir. Tepel ve ark. uygulama öncesi verilen oral NAC'inin % 90'lara varan oranlarda nefropatiyi azalttığını gösterdiler (64).

Literatürde diabetes mellitus, obsessive-kompulsif hastalık, işitme kaybı, KOAH, polikistik over hastalığı, AIDS, trikotilomani gibi bir çok hastalık ile ilgili NAC çalışmaları mevcuttur (63).

İdiopatik akciğer fibrozu (IPF) uyarılmış polimorfonükleer hücreler ve alveolar makrofajların rol aldığı , uzun dönemde akciğer fonksiyon kayıpları ile seyreden bir hastalıktır. Önceki literatürlerde gösterildiği üzere IPF'nda görülen belirgin özellik, akciğer epitelial sıvısındaki major anti oksidan olan Glutatyon (GSH) 'un azalmasıdır. Glutatyon yapısındaki sistein ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>- gibi oksijen radikalleri için anti-oksidan özellik göstermekle beraber vucuttaki önemli anti oksidan enzimlerden glutatyon peroksidazın da prekürsörüdür. NAC ise yapısındaki sistein glutatyon oluşumunu artırarak IPF hastalarında , hastalık kontrolünde fibrozun önlenmesinde önemli katkı sağlamaktadır (65, 66).

Neal ve ark. farelerde tek fraksiyonda verilen 18 Gy tüm vücut RT'si sonrasında verilen intraperitoneal NAC'ın etkinliğini değerlendirmişlerdir. RT sonrası tüm vucutta

fakat belirgin olarak akciğerlerde glutatyon seviyelerinde düşme saptanmıştır. İntraperitoneal verilen NAC , sadece Glutatyon seviyelerini arttırmakla kalmayıp , akciğerde RT sonrası artan ve akciğer hasarı ile ilgili belirteçlerden olan malondialdehit (MDA) seviyelerini de anlamlı derecede düşürmüştür(62).

Nagata ve ark. hiperoksik akciğer hasarında , Hagiwara ve ark. ise Bleomisin sonrası oluşturulan akciğer hasarında , IV ya da aerosol halinde verilen NAC'ının düşmüş Glutatyon seviyelerini arttırarak inflamasyon ve de akciğer fibrozunun azaltılmasında etkinliğini göstermişlerdir. Her iki çalışmada da eksojen NAC, akciğer hücrelerinde Mn SOD ekspresyonunu ayrıca arttırmıştır (67, 68) .

### 2.9.3 Rapamisin (Sirolimus)

Rapamisin diğer bir adıyla Sirolimus, organ transplantasyonlarında , özellikle böbrek transplantasyonlarında organ reddi veya fibrozunu engellemek için kullanılan makrolid grubu bir ilaçtır. Streptomiçes Hygroscopius bakterisinden bir antifungal ajan olarak üretilmiştir. İsmi bakterinin ilk izole edildiği ada olan Rapa Nui'den gelmektedir.

İlk olarak antifungal etkilerinden dolayı üretilen ajan, potent immünoşüpresif ve antiproliferatif özellikleri saptanması üzerine başta kanser ve organ transplantasyonu olmak üzere birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (69).

Rapamisin IL-2 yanıtını baskılayarak T ve B hücrelerinin aktivasyonunu engeller. Öncelikle sitozolik bir protein olan FKBP12 (FK-bağlanan protein 12)'e bağlanır. Rapamisin-FKBP12 protein kompleksi mTOR Complex 1(mTORC1)'e direkt bağlanarak mTOR yolağını inhibe eder (70, 71).

mTORC1 yolağını inhibe eden rapamycin , serin-treonin kinaz inhibitörü etkisi göstererek özellikle T hücrelerinin G1 hücre siklusu fazında duraklamasına ve apoptozlarına yol açar. Bu etkisi sadece aktive olmuş T hücrelerde selektif olarak görüldüğünden immün sistemin diğer hücreleri rapamisinin bu blokajından etkilenmez. Diğer immün şüpresif ajanlara göre daha az yan etki profili gösterir (72).

IGF, PDGF gibi birçok büyüme faktörü , ya da RT sonrası etkinliği artan TGF  $\beta$  gibi sitokinler, mTOR yolunu aktive ederek , gene RT sonrası artan HIF-1alfa'nın fibroblastlar üzerindeki etkinliğini arttırır. Aktive HIF-1 alfa CXCR4 ekspresyonunu arttırarak fibroblast migrasyonunu , kollajen sentezini vede fibrozu arttırır (36, 38).

Ayrıca mTOR yolağının son ürünleri olan S6kinaz1 ve Ökaryotik inisiasyon faktörü 4E bağlanma protein (4E-BP1) aktivasyonu ile hücre içinde translasyonel başlama kompleksi oluşur ve sonrasında protein sentezi özellikle ekstrasellüler matriks protein sentezi artar. Birçok kanser tipinde bu yolun upregülasyonu ile hücre bölünmesi artar ve apoptoz azalır. Kanser hücrelerinin migrasyon , adhezyon ve invazyon kapasitelerindeki artışın gene bu yolun aktivasyonu ile olduğu düşünülmektedir (36, 38).

mTOR inhibisyonu ve Rapamisin kullanımı birçok kanser tipinde denenmektedir. Over, endometrium, meme, lenfoma, glioblastoma multiforme, kaposi sarkomu, akciğer kanserleri gibi birçok kanser tipinde kemoterapi ya da RT kombinasyonları ile denenmektedir (69, 71).

Rapamisin doza bağımlı olarak immünosupresif (0.25 mg/kg/g), antifibroblastik, antiproliferatif etkiler (0.5 mg/kg/g) gösterir. En yüksek plazma konsantrasyonuna oral uygulama sonrası 2.5-3.5 saat içinde ulaşır. Karaciğer metabolize edilir. Yarılanma ömrü 16-20 arasında değişir. İnsanlarda %84, sıçanlarda % 87 oranında plazma hücrelerine bağlandığı bildirilmiştir (72, 73).

Rapamisinin en sık karşılaşılan etkileri fırsatçı enfeksiyonlar, kilo kaybı, hipertansiyon, anemi, diyare, dermatit, trombositopeni, depresyon ve mTOR C2 relatif aktivasyonuna bağlı artmış lipid ve kolesterol seviyeleridir. Nefes darlığı, göğüs ağrısı, kramp şeklinde flank ağrı görülebilir (72).

Bu çalışmada ise mTOR C1 yolağının Rapamisin ile inhibisyonunun RT sonrası pnömonit ve fibroz oluşumundaki etkisi değerlendirildi.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1 Gereçler

#### 3.1.1 Kimyasal Maddeler

RT sırasında stabilizasyonu sağlamak için sıçanlara genel anestezi verildi. Ketamin Hidroklorur ve Xylazine (Ketalar 5mgr/ml; Pfizer ,Rompun 5mgr/ml; Bayer) kullanıldı. Çalışma ilacı olarak üç ayrı etken madde kullanıldı:

4. Etken Madde: Polietilen glikol ile kaplanmış superoksit dismutaz ve katalaz enzimleri (PEG-SOD 1mgr/flk ; Sigma, PEG-Katalaz 2 mgr/flk; Sigma ) intraperitoneal yoldan kullanıldı.
5. Etken Madde: N-Asetil Sistein (NAC) (Asist 300 mgr/ampül; Hüsnu Arsan) intraperitoneal yoldan kullanıldı.
6. Etken Madde: Rapamisin (Sirolimus) (Rapamune 1mgr/tb ; Wyeth) oral gavaj ile solüsyon halinde verildi.

#### 6.1.2 Deney Hayvanları

Deney Hayvanları Kullanım Kursu tamamlandıktan ve de İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan ( Sayı :124 , Karar No : 112 ) etik kurul onayı alındıktan sonra deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü'nden temin edildi , deney süresince takipleri ve kontrolleri etik kurallar ve çalışma prensiplerine uygun olarak yapıldı. Toplam 24 adet 4-6 haftalık 180 -200 gr Winstar albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Cins olarak W.albino literatürde RT sonrası fibrozise duyarlı bir cins olarak bildirildiği için seçildi (74) . üçlü gruplar halinde kafeslere konularak standart yem ve su ad libitum (isteğe bağlı miktarda) beslendiler. Yüzde 50 bağıl nem oranı, 21± 2 °C sıcaklık koşullarında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan uygun laboratuvar koşullarında takip edildiler.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.3 RT Uygulaması

Çalışma öncesinde en uygun RT şeklini ve planlamasını yapabilmek için 6 haftalık, yaklaşık 180 gr ağırlığında W. Albino cinsi sıçanla BT simulasyon yapıldı. Genel anestezi altında , sıçan uygun pertekse sabitlendikten sonra , planlanan akciğer lojunun daha iyi belirlenebilmesi ve de daha iyi stabilizasyon için silikon baş-boyun maskesi kesilerek , sıçana uygun hale getirildi, ısıtıldıktan sonra pertekse sabitlendi. Bir mm ince kesitli BT çekildikten sonra sanal ortamda volümleri oluşturuldu. Deney hayvanı morbidite ve mortalitesini azaltmak için kalp, özefagus ve karaciğer gibi organların dozunu minimumda tutmak amaçlandı. Literatüre uygun şekilde sağ akciğer üst lobları deneysel fibroz oluşturmak için en uygun RT alanı olarak seçildi(75).

Farklı tedavi makinelerinde (Co60, Saturn, Oncor , Clinac, Cyberknife) farklı planlar yapıldı. Hedef alanın küçüklüğü (<1.5cm<sup>2</sup>), doz homojenitesini bozan ve uygun plan yapılmasını zorlaştıran başlıca faktördü. Ayrıca ışınlanması planlanan deney hayvanlarının uzun süren ışınlama sırasında, anestezi altında iken, kaybedilmemesi, ışınlamanın kısa sürede yapılmasını sağlamak için doz hızı yüksek bir makine kullanılması gerekli görüldü. Küçük alanlarda homojen doz dağılımları elde edebilen , ayrıca anestezi süresini azaltan CyberKnife (Accuray) robotik kollu radyocerrahi makinesi uygun bulundu.

Genel anestezi altında sırtüstü elleri ve ayakları pertekse sabitlenen hayvanlar, uygun set-up sonrasında 1 x 1 cm<sup>2</sup>'lik RT alan merkezi sağ akciğer üst lobların üzerine getirildi. SSD 78.5 cm , yarı kalınlık 1.5 cm konus çapı 1cm olarak ayarlandı. Alan merkezi her sıçan için her setup sonrasında , lazerle kontrol edildi. RT alanı uygun görüldükten sonra tek fraksiyonda 13 Gy (toplam 1450 MU, doz hızı 800 MU/dak) verildi. Yüksek doz , mortaliteyi arttıracığından literatürde RT sonrası fibroz oluşturabildiği gösterilen en uygun doz olan 13 Gy seçilerek uygulanmıştır (61).

RT sonrasında sıçanlar, rastgele olarak her grup için altı sıçan seçildi. Üçü ilaç grubu ve bir kontrol grubu olacak şekilde dört grup oluşturuldu.

### 3.2.2 Etken Madde Uygulamaları

RT sonrası 0. gün olarak kabul edildi. RT sonrası 1. günde ilaç uygulamaları başladı. Ardışık 3 hafta boyunca devam etti.

#### 3.2.2.1 PEG-SOD ve PEG-Katalaz uygulamaları

Soğuk zincirde temin edilen polietilen glikollü Cu /Zn SOD ve katalaz enzimleri, uygulama günlerine kadar – 15 derecede saklandı. Uygulama zamanından 30 dakika kadar öncesinde saklama ünitesinden çıkartılan SOD 1mgr/ flk , steril şartlarda 3 ml serum fizyolojik ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika 34 derece küvezde uygun sıcaklığa getirildi. Katalaz 2 mgr/flk , 3ml serum fizyolojik ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika 34 derece küvezde 5 dakika bekletildikten sonra her ilaçtan 0.5 ml toplam 1 ml intraperitoneal yoldan SOD-Katalaz grubundaki sıçanlara verildi. Haftada bir olarak PEG-SOD 1 mgr/kg , PEG-Katalaz 2 mgr/kg'dan 3 kez verildi. İlaç uygulamalarının dışındaki günlerde günaşırı 1 ml serum fizyolojik verildi.

#### 3.2.2.2 N Asetil Sistein (NAC) uygulamaları

Kullanıma hazır ampulde temin edilen N asetil sistein kullanıldı. RT sonrası 1. günde 300 mgr/kg'dan günaşırı olacak şekilde 3 hafta boyunca verildi. 1 ampul NAC, 34 derecede küvezde 5 dakika bekletildikten sonra 0.5 cc'si 0.5 cc serum fizyolojik ile sulandırılarak intraperitoneal yoldan verildi. Doz literatürdeki sıçanlar üzerindeki farmakolojik çalışmalara bakılarak ayarlandı. Sprong ve ark. çalışmasında W.Albino cinsi sıçanlarda 275 mgr/kg/2 günde , 550mgr/kg/2 günde ve 950 mgr/kg/2 günde kıyaslanmış. 275 mgr/kg/ 2günde infüzyon halinde verilen NAC endotoksin ile oluşturulan oksidatif stress ve akciğer hasarında yeterli anti oksidan etki oluşturabilirken, doz arttırımı ile verilen yüksek dozlarda mortalitenin arttığı gösterilmiştir(76). Bu yüzden en optimal doz gün aşırı 300 mgr/kg olarak belirlendi.

### 3.2.2.3 Rapamisin Uygulamaları

Rapamisin (Sirolimus) 1 mgr'lık tabletler halinde temin edildi. Oral gavaj yolu ile verilebilmesi için distule suda eritmeye çalışıldı. Suda eritilemeyen vedistile su ile heterojen bir karışım elde edilmesi üzerine oral solüsyon elde etmek için phosal 50pg solüsyonu (fosfatidilkolin, propilen glikol, gliserid, etanol, soya yağ asitleri) kullanıldı. 1 mgr'lık tabletler toz hale getirildikten sonra 1ml phosal solüsyonu içersinde eriyik hale getirildi. 34 derece küvezde 5 dakika bekletildikten sonra güneşirı oral gavaj ile sıçanlara verildi. Sıçanlarda 0.5 mgr/kg/gün rapamisin dozu literatürde birçok çalışmada kullanılmış, etkinliği gösterilmiş ve de tolere edilen yan etki profili ile takip edilmiştir (71, 72, 77). Oral gavaj yolu ile ilaç uygulanması , sıçanlar için mortaliteyi arttıran bir işlemdir, hayvan kaybını azaltmak için günlük doz sabitlenerek (0.5 mgr/kg/gün ) 3 hafta boyunca güneşirı gavaj uygulaması yapılmıştır.

### 3.2.4 Sıçanların Kilo Takibi

RT anında ve sonrasında haftalık kilo takipleri DETAE'dan temin edilen hassas terazi ile yapılmış ve kaydedilmiştir. RT sonrası 3. haftada exitus olan kontrol grubu 6 nolu sıçan ile RT sonrası , 2. intraperitoneal SOD-Katalaz uygulaması esnasında exitus olan SOD 6 nolu sıçanlar için kilo takip grafikleri oluşturulmamıştır.

### 3.2.3 Sıçanların Ateş Takibi

RT sonrasında haftalık ateş takipleri için DETAE'nde proje öncesinde bir sıçanda , bilinen yöntemler ile ateş ölçülmesi denenmiştir. Isı probu rektal yolla uygulandıktan sonra yaklaşık 2 dakika kadar beklenildikten sonra ölçüm yapılabilmektedir. Morbiditeyi arttırılacağı ve uzun sürmesi nedeniyle efektif ölçümler yapılamayacağı düşünülmesi üzerine , ateş ölçümleri için alternatif yöntemler değerlendirildi. İnfrared ile çalışan temassız ateş ölçer (FT60, Beurer, Almanya) kullanıldı. Bu uygulamanın güvenilirliği ile ilgili 2008 yılında alınmış bir uygunluk sertifikası (Oeko Test, Almanya) bulunmaktadır. Bu sertifikada +/- 0.3 °C ölçüm hassasıyeti bildirilmektedir. Tez dışı sıçanlarda 20'e yakın denemelerde mevcut yöntemler ile uyumlu bulunması üzerine tez çalışmasında kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen nedenlerle ex olan iki sıçan için ateş takip grafikleri oluşturulmamıştır.

### 3.2.8 Sıçanlardaki Fibrozun Bilgisayarlı Tomografi İle Takibi

RT sonrası ilaç uygulamaları yapılan gruplar fibrozis oluşması için takip edildi. Onaltıncı haftada mortaliteyi azaltmak için anestezi verilmeden sıçanlara uygun kaplar hazırlanarak BT görüntüleri alındı. Görüntü kalitesini arttırmak için FOV değeri küçültüldü ve verilen radyasyon düşük tutuldu ve 2 mm kesitli BT'ler alındı

Literatüre uygun olarak 16. haftada çekilen BT'lerde Wiegman ve ark. tarif ettiği RT sonrası değişikliklerden diyafram elevasyonu, kalbin RT lojuna doğru çekilmesi , yer yer yama tarzında yoğunluk artışları ve fibrozis , gruplar bildirilmeden bir radyolog tarafından görülmesine rağmen , verilen doz (Wiegman et al'a göre) kısmen daha düşük tutulduğundan , fibrozisin belirginleşmesi için takibe devam edilmesine karar verildi(75).

21. haftada rapamisin grubundan 6. nolu sıçanın doğal yoldan eksitus olması sebebiyle örnek akciğer dokuları eksize edilerek histopatolojik değerlendirme yapıldı. Fibrozis görülmesi üzerine 22. haftada anestezi altında 2mm ince kesitli BT görüntüleri alındı. Tekrar radyolojik olarak gruplar bildirilmeden değerlendirildi (yok-grad 0,yama tarzında-grad 1, belirgin konsolidasyon-grad 2,birden fazla alanda yaygın konsolidasyon-grad 3 olarak skorlandı) . Literatürde tarif edildiği gibi BT'lerde akciğer dokusu yoğunlukları hesaplandı (Yoğunluk için min. -1000 ile max. +1000 arasındaki matematiksel değerler olan Hounsefield değerleri oluşturuldu) (75). Daha önce belirtilen bulgulara ek olarak artık fibrozisinde belirgin olarak gözlenebilmesi sebebiyle 22. haftada deney sonlandırıldı.

### 3.2.9 Histopatolojik İnceleme

RT sonrası 3. haftada exitus olan kontrol grubu 6 nolu sıçan ile RT sonrası 2. intraperitoneal SOD-Katalaz uygulaması esnasında exitus olan SOD 6 nolu sıçanlar dışında kalan 4 gruptan 22 sıçan, RT sonrası fibrozis oluşması için geçen 22 hafta sonrasında , sakrifiye edildi. Tüm toraksa vertikal bir insizyon sonrası göğüs kafesi açıldı. Trakea lojundan başlayarak bilateral akciğerler ve kalp blok halinde eksize edildi. Akciğerler ve kalp hassas terazide tartıldıktan sonra % 10'luk tamponlanmış formalin çözeltilisinde fiksasyon için bekletildi. İki haftalık bir fiksasyon sürecinden sonra doku numunelerinden 2mm kalınlığında 3'er dilim alınarak rutin doku takibinden

geçirildi. Parçalardan hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5.7  $\mu$  kalınlığındaki kesitler hematoxilen eosin ile boyanıp ışık mikroskopisinde incelendi. Fibrosis değerlendirmesi için Ascroft skalası kullanıldı. Bu skala için Alveolar septa, akciğer yapılarındaki değişiklikler, lökosit infiltrasyonları, damarsal yapılardaki değişiklikler, akciğer ödemi değerlendirildi (78). Kollajen depositleri görüntülemek için Mason Trichrome ile boyandı. RT'ye sekonder akciğer fibrozisi patogenezinde TGF  $\beta$ 'nın rolünü değerlendirmek için preparatlar TGF  $\beta$  antikoru ile immün boyama yapıldı. Değerlendirme sırasında gerçek boyutları daha hassas bir biçimde değerlendirebilmek için 'Olympus Analysis 5' sistemi kullanıldı.

### 3.2.10 Elektron Mikroskopisi

Deney hayvanları sakrifiye edildikten sonra , akciğer dokularından alınan yaklaşık 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalar, stabilizasyon için % 2.5'lik gluteraldehit solusyonuna konulmuştur. Kırksekiz saatlik tespit süresinin ardından rutin post fiksasyon ve takip işlemlerine alınmıştır. Bloklanan materyal sonrasında ultramikrotom ile 60-80 nanometrelik kesitler alınmıştır. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandıktan sonra transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile değerlendirilmiştir.

### 3.2.11 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada amaçlanan deneysel olarak oluşturulan akciğer pnömoniti ve fibrozu üzerinde eksojen verilen üç etken maddenin etkinliğinin değerlendirilmesidir. Üç etken madde ayrı ayrı kilo değişimleri, ateş değişimleri, BT konsantrasyon takibi, akciğer doku yoğunluk ölçümleri ve patolojik fibrozis ve inflamasyon bulguları açısından değerlendirildi. SPSS (SPSS Inc, USA) programı yardımıyla, sıklık tablolarının tek yönlü ANOVA, Fisher Chi-kare testleri kullanılarak analizleri yapıldı. Anlamlılık farkı olarak p=0.05 sınır değer olarak kabul edilmiştir.

## 5. BULGULAR

### 4.1 Kilo Takibi

Takip edilen sıçanların DETAE’de yapılan haftalık ölçümleri Tablo 5’te verilmiştir. RT sonrası birinci haftada sıçanların ortalama ağırlığı 171.7 gr iken, yirmi iki hafta sonrasında 218.6 gr olmuştur. Rastgele seçim sonrasında 1. haftada, SOD grubu ortalaması 172.2 gr; Kontrol grubu ortalaması 175 gr; NAC grubu ortalaması 166.7 gr; Rapamisin grubu ortalaması ise 173.6 gr’dır. RT sonrası 22. haftada grupların ağırlık ortalamaları, SOD grubu 224.8 gr (artış oranı 1.30); Kontrol grubu 220.2 gr (artış oranı 1.26); NAC grubu 213.5 gr (artış oranı 1.28); Rapamisin grubu ise 217.3 gr (artış oranı 1.26)’dır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır.

Hafta	Kontrol				SOD				NAC				Rapamisin									
	1.hf	2.hf	3.hf	4.hf	5.hf	6.hf	7.hf	8.hf	9.hf	10.hf	11.hf	12.hf	13.hf	14.hf	15.hf	16.hf	17.hf	18.hf	19.hf	20.hf	21.hf	22.hf
	164	184	176	179	172	182	163	176	172	168	161	165	167	174	170	163	168	164	181	177	179	173
	169	197	180	183	174	187	176	183	178	174	165	168	172	176	178	174	179	165	180	178	185	183
	174	205	184	185	179	195	174	182	184	178	170	174	177	182	188	176	183	171	183	185	189	185
	173	208	197	191	189	197	179	196	185	184	183	182	182	187	187	179	185	176	188	195	199	201
	185	215	204	205	196	206	184	195	197	188	187	192	194	199	188	182	187	185	189	208	210	205
	188	212	202	206	198	209	187	202	198	193	185	189	192	200	196	178	193	188	212	206	209	203
	180	209	187	197	200	212	184	206	203	199	185	190	194	196	193	185	189	191	216	211	207	204
	187	213	193	207	205	214	189	215	201	191	192	196	199	198	191	195	199	211	220	212	207	207
	193	219	196	205	203	217	201	213	200	204	201	197	198	207	201	195	198	194	213	207	217	213
	196	221	204	211	210	224	199	217	209	209	203	203	209	203	205	187	204	196	223	209	211	209
	197	220	211	215	206	218	195	211	206	205	196	199	198	207	202	186	201	197	217	212	215	208
	196	222	214	219	205	216	197	212	202	207	197	199	199	210	205	193	204	199	215	210	213	209
	197	221	215	217	208	219	199	215	206	210	195	203	204	214	206	192	205	201	217	218	216	212
	201	225	219	221	207	225	201	217	209	212	196	202	206	213	208	196	204	203	219	212	213	210
	204	229	218	227	209	229	203	224	211	211	198	206	208	217	209	201	208	204	221	213	217	214
	199	229	216	227	209	229	205	221	215	216	197	208	210	219	209	203	208	203	220	212	219	217
	201	226	213	221	210	230	211	225	216	217	207	210	212	217	210	200	211	202	221	217	220	214
	200	228	215	229	217	234	204	229	227	220	203	207	209	221	208	206	213	205	227	211	220	215
	210	229	225	223	214	238	202	234	223	225	210	211	216	229	205	204	220	207	223	209	223	216
	204	232	211	225	210	232	209	230	219	199	214	217	225	208	210	211	209	228	216	218	214	214
	205	233	223	226	211	229	209	227	223	217	201	217	216	228	213	211	213	201	226	211	223	216
	201	236	218	232	214	239	208	229	225	223	199	215	218	229	214	206	213	205	228	214	226	218

Tablo 10 Sıçanların Gram/Hafta Değişimleri

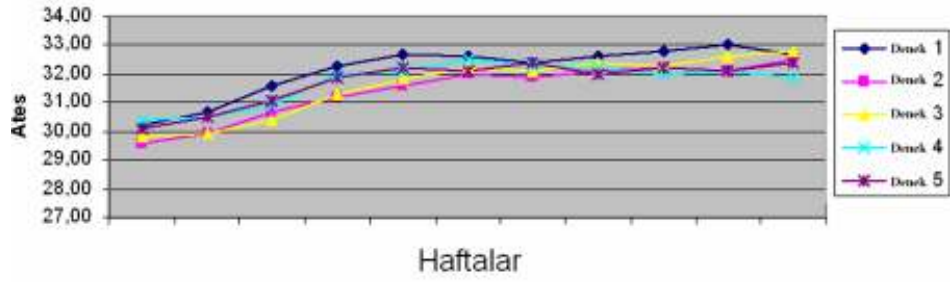
## 4.2 Ateş Takibi

RT sonrasında iki haftada bir temassız ateş ölçer ile tüm grupların ateş ölçümleri yapıldı. Tüm grupların ölçümleri tablo 6'da verilmiştir.

Haftalar	2.	4.	6.	8.	10.	12.	14.	16.	18.	20.	22.
<b>Kontrol</b>	30,20	30,7	31,6	32,3	32,7	32,6	32,4	32,6	32,8	33	32,7
	29,60	29,9	30,7	31,2	31,6	32	31,9	32,1	32,2	32,1	32,5
	29,80	29,9	30,4	31,3	31,8	32,2	32,1	32,4	32,3	32,6	32,8
	30,40	30,5	30,9	32	32,1	32,5	32,3	32,2	32	32,1	31,9
	30,10	30,5	31,1	31,9	32,2	32,1	32,4	32	32,2	32,1	32,4
<b>SOD</b>	30,2	30,3	30,5	30,8	31,1	30,8	30,4	30,4	30,2	30,1	29,9
	29,6	29,8	30,2	30,5	30,3	30,6	30,7	30,4	30,6	30,5	30,3
	30,1	30,2	30	30,1	30,4	30,7	30,3	30,6	30,5	30,7	30,6
	29,2	29,5	30,3	30,5	30,7	30,5	30,1	30,1	30,8	30,3	29,9
	30,6	30,5	30,7	30,8	30,9	31	31,3	30,9	31	30,8	30,7
<b>NAC</b>	30,00	30,2	30,7	30,9	31,1	30,9	30,6	31,1	30,9	31	31,4
	30,10	30,4	30,8	31	30,8	30,9	31	31,2	31	30,6	30,5
	29,70	29,6	30,4	30,7	30,5	30,8	31,1	31,4	31,3	31,1	30,9
	29,50	29,9	30,8	31,1	31,3	31,2	30,9	30,7	30,6	30,8	30,7
	29,90	30,3	30,9	30,5	30,8	30,6	30,3	30,2	30,3	30,5	30,6
	30,20	30,6	30,6	30,9	30,8	31,2	30,9	30,6	29,9	30,7	30,3
<b>Rapamisin</b>	29,70	30,3	31	31,8	32,1	32,3	32,5	32,7	32,1	32,5	32,6
	29,80	30,1	31,3	31,7	32,3	32,2	32,3	32,1	32,3	32,7	32,5
	30,30	30,3	31,7	31,4	31,9	32,5	32,7	32,4	32,6	32,8	32,7
	30,50	30,5	31,5	31,8	32,6	32,6	32,4	32,3	32,1	32,3	32,4
	29,70	30,7	30,9	32,3	32,6	32,4	32,7	32,8	32,7	32,4	32,2
	29,80	30,3	30,7	31	31,7	32,7	32,6	32,6	32,7	32,5	32,7

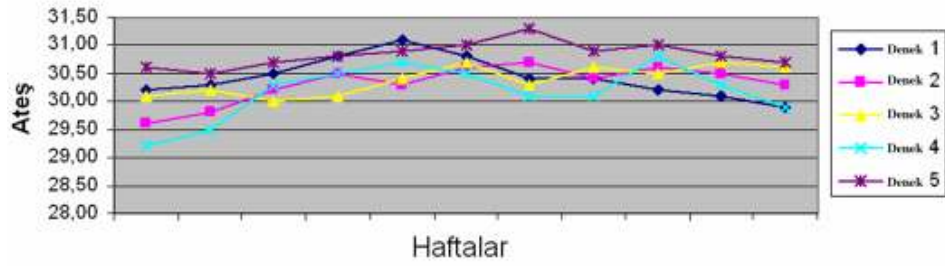
**Tablo 11 Ateş Ölçümleri**

Kontrol Grubu: Tüm deney hayvanlarında, NAC ve SOD grubuna göre 6. haftadan itibaren belirgin artışlar görüldü. En yüksek ateş 20. haftada 33 °C oldu. Ateş çizelgesi Şekil 14'da gösterilmiştir.



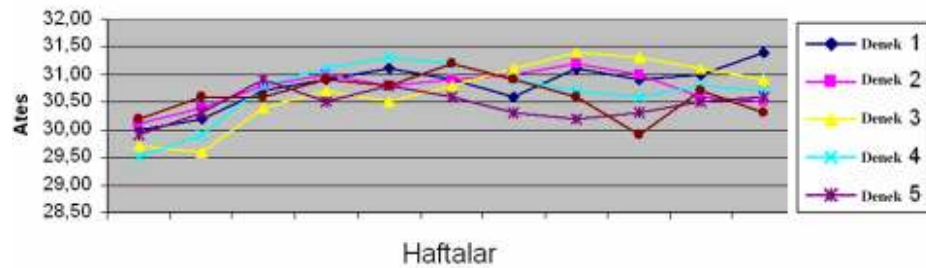
Şekil 23 Kontrol Grubu Ateş Çizelgesi

SOD Grubu: Takiplerde pnömonit düşündürecek yüksek ateşler görülmedi. En yüksek ateş 14. haftada 31,3 °C oldu. Ateş çizelgesi Şekil 15’de gösterilmiştir.



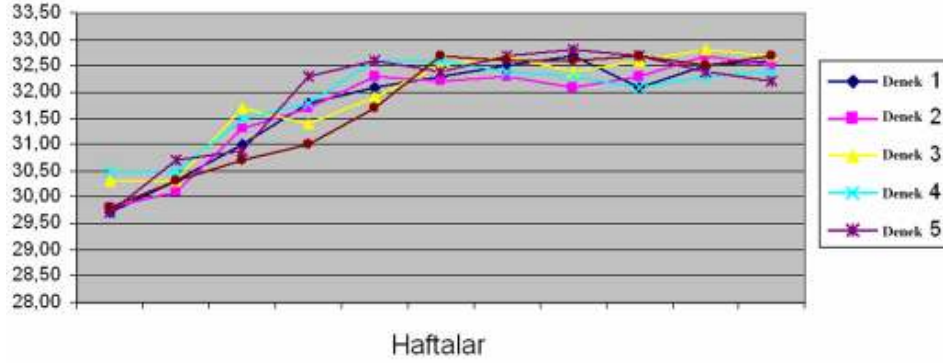
Şekil 24 SOD Grubu Ateş Çizelgesi

NAC Grubu: SOD grubuna benzer şekilde pnömonit düşündüren yüksek ateş veya ani artışlar görülmedi. En yüksek ateş 31,4 °C ile 16 ve 22. haftalarda görülmüştür (Şekil 16).



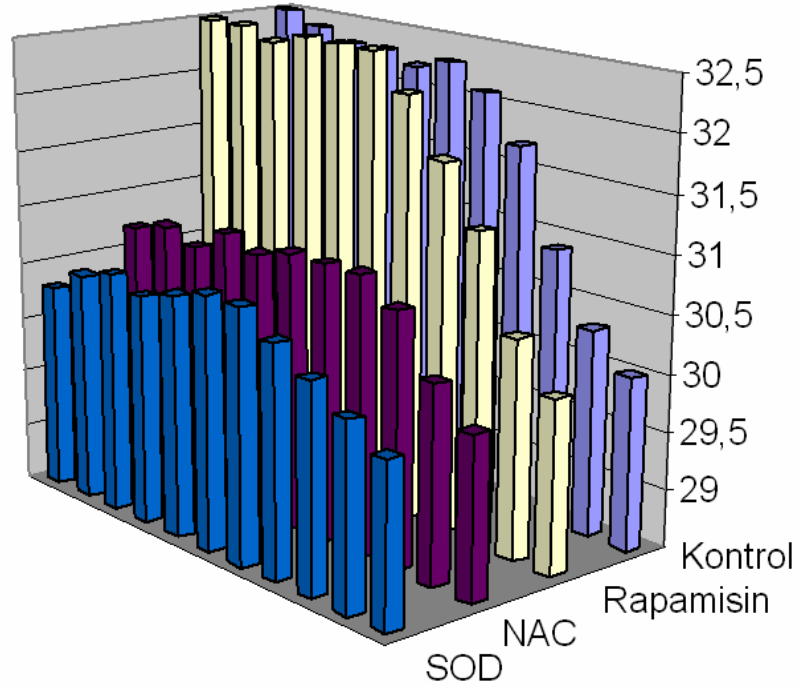
Şekil 25 NAC Grubu Ateş Çizelgesi

Rapamisin Grubu: Kontrol grubuna benzer, NAC ve SOD gruplarına göre belirgin şekilde yüksek ateşler gözlenmiştir. 6. haftadan itibaren artan, dik eğimli ateş çizelgesi gözlemlendi (Şekil 17). En yüksek ateş 16. haftada 32.8°C olarak ölçüldü.



Şekil 26 Rapamisin Grubu Ateş Çizelgesi

Tüm grupların ateş ölçümleri sütun grafiği şeklinde Şekil 18’de verilmiştir. Tüm gruplarda RT sonrası ateş ölçümlerinde yükselme görülürken, bu yükselme 6. haftadan itibaren istatistiksel açıdan anlamlı bir hale gelir ( $p=0,004$ ). Kontrol ve Rapamisin gruplarında bu artış daha belirgindir. 6. haftadan itibaren NAC ve SOD grupları ile kontrol ve rapamisin grupları arasındaki fark artar. 6. haftada SOD grubu; kontrol grubuna göre ( $p=0,001$ , %95 CI 0.420 - 1.267) ve Rapamisin grubuna göre ( $p=0,011$ , %95 CI -1.042 - -0.158 ) anlamlı şekilde daha düşük ateşlidir. Sekizinci haftadan itibaren hem NAC grubu ; kontrol grubuna ( $p=0,001$ , %95 CI -1,356- -0.424 ) ve rapamisin grubuna ( $p=0,011$ , %95 CI -1.042 - -0.158 ) göre anlamlı şekilde düşük ateş ölçümlerine sahiptir hem de SOD grubu; kontrol grubuna ( $p=0,001$ , %95 CI -1.592 - -0.661 ) ve rapamisin grubuna ( $p=0,0001$ , %95 CI -1.686 - -0.714 ) göre anlamlı şekilde daha düşük ateş ölçümlerine sahiptir.



Şekil 27 Ateş/ Haftalar (Tüm Gruplar)

#### 4.3 BT ile Fibrozis Takibi

Wiegman ve ark. tarif ettiği; sıçanlarda RT sonrası değişikliklerden diyafram elevasyonu, kalbin RT lojuna doğru çekilmesi , yoğunluk artışları ve fibrozis değerlendirildi (yok-grad 0, yama tarzında-grad 1, belirgin konsolidasyon-grad2, birden fazla alanda yaygın-grad 3 olarak skorlandı) (75).

Radyolojik olarak fibrozis en az NAC grubunda görüldü. Diyafram yükselmesi görülmez iken kalp çekilmesi bir sıçanda görüldü. SOD grubunda ise ortalama fibrozis skoru biraz daha yüksek iken diyafram yükselmesi ya da kalp çekilmesi gözlenmedi. Kontrol ve Rapamisin gruplarında fibrozis belirgin olarak daha fazla görülürken diyafram yükselmesi kontrol grubunda bir sıçanda, rapamisin grubunda ise iki sıçanda gözlemlendi. Kalp çekilmesi ise her iki grupta da yaygın bir şekilde dörder sıçanda gözlemlendi (Tablo 7, 8 ). Rapamisin grubu üç sıçanda buzlu cam görüntüsü ile beraber RT alanlarının dışında da özellikle periferik alanlara lokalize yama tarzında fibrozis alanları izlendi.

	No	Fibrozis	Diyafram Yükselmesi	Kalp Çekilmesi
Kontrol	1	2	-	1
	2	3	-	1
	3	2	-	-
	4	2	-	1
	5	3	1	1
SOD	1	2	-	-
	2	1	-	-
	3	2	-	-
	4	1	-	-
	5	2	-	-
NAC	1	1	-	-
	2	1	-	-
	3	1	-	-
	4	2	-	1
	5	2	-	-
	6	1	-	-
Rapamisin	1	2	-	-
	2	1	-	-
	3	3	1	1
	4	2	-	1
	5	3	1	1
	6	2	-	1

**Tablo 12 Sıçanların Radyolojik Değerlendirmesi**

Yapılan istatistiksel analiz sonrasında fibrozis ve diyafram yükselmesi bulgularında anlamlı fark saptanmaz iken kalp çekilmesi SOD grubunda; kontrol grubuna göre ( $p=0.010$ ) ve rapamisin grubuna göre ( $p=0.022$ ) anlamlı şekilde az görülmüştür.

		<b>Kontrol</b>	<b>SOD</b>	<b>NAC</b>	<b>Rapamisin</b>	<i>Toplam</i>
<b>Fibrozis</b>	<b>1</b>	0	2	4	2	7
	<b>2</b>	3	3	2	3	11
	<b>3</b>	2	0	0	2	4
<b>Diyafram Yükselmesi</b>	<b>0</b>	4	5	6	4	19
	<b>1</b>	1	0	0	2	3
<b>Kalp Çekilmesi</b>	<b>0</b>	1	5	5	2	13
	<b>1</b>	4	0	1	4	9
<i>Toplam</i>		5	5	6	6	22

**Tablo 13 Radyolojik Bulgular ve Dağılımı**

BT görüntüleri üzerinde ayrıca Wiegman ve ark. çalışmasında tarif edildiği üzere yapılan yoğunluk hesaplamaları Tablo 9’da verilmiştir. (75).

	<b>Sağ Akc.</b>	<b>Sol Akc.</b>
<b>Kontrol</b>	-226	-611
	-221	-611
	-168	-418
	-315	-469
	-326	-506
<b>SOD</b>	-481	-624
	-354	-598
	-245	-397
	-532	-649
	-489	-582
<b>NAC</b>	-449	-517

## KAYNAKLAR

1. Nagaishi, C. Basic Anatomy of the Lung. In: *Functional Anatomy and Histology of the Lung. 1st ed. Baltimore. University Park Press, 1972.*
2. Ginsberg, M.S., Grewal, R.K. ve Heelan, R.T., *Lung cancer. Radiol Clin North Am, 2007. 45(1): p. 21-43.*
3. Adnan Aydiner , Erkan Topuz. *Akciğer kanseri Tanı Tedavi Takip - İstanbul Konsensusu. 1st Ed. Nobel;2006, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü: İstanbul:p 11-17*
4. Gürsoy, G., *Eğitim ve Araştırma Hastaneleri ile Üniversite Hastanelerinde Kanser Nedeni ile Ölen Hastalar 2006, Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı*
5. *Hastanelere Yatan Hastaların Seçilmiş 150 Nedene Göre Dağılımı, T.İ. Kurumu, Editor. 1995-2002: Ankara.*
6. McCrory, D.C., Lewis, S.Z., Heitzer, J., Colice, G. ve Alberts, W.M., *Methodology for lung cancer evidence review and guideline development: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd Edition). Chest, 2007. 132(3 Suppl): p. 23S-28S.*
7. Hayakawa, K. ve Tsuboi, M., [*Clinical practice guideline for lung cancer*]. *Gan To Kagaku Ryoho. 37(4): p. 609-12.*
8. Wang, J.Y., Chen, K.Y., Wang, J.T., Chen, J.H., Lin, J.W., Wang, H.C., Lee, L.N. ve Yang, P.C., *Outcome and prognostic factors for patients with non-small-cell lung cancer and severe radiation pneumonitis. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002. 54(3): p. 735-41.*
9. Hughes-Davies, L., Tarbell, N.J., Coleman, C.N., Silver, B., Shulman, L.N., Linggood, R., Canellos, G.P. ve Mauch, P.M., *Stage IA-IIIB Hodgkin's disease: management and outcome of extensive thoracic involvement. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997. 39(2): p. 361-9.*
10. Marks, L.B., Fan, M., Clough, R., Munley, M., Bentel, G., Coleman, R.E., Jaszczak, R., Hollis, D. ve Anscher, M., *Radiation-induced pulmonary injury: symptomatic versus subclinical endpoints. Int J Radiat Biol, 2000. 76(4): p. 469-75.*
11. Robert J.Troyer. Section 2 Anatomy. In: D.Frohlich, E. Rypin's *Basic Sciences Review. 16th Edition. Lippincott, Raven;1993.p111-117*
12. Emami.B.Graham M. Chapter 46 In C. Perez , L.Brady, editors. *Principles and Practice of Radiation Oncology 3rd Edition. 1998: p. 1181-1184.*
13. Yılmaz N, A.F., *Epidermoid Tip Bronş Ca Hücrelerinin Ultrastrüktürel İncelenmesi. Yeni Sympusium 1989. 1993(1-2): p. 104-112.*
14. Oktar A, Y.N., *Kronik Bronşitli Hastaların Bronş Mukozalarının Ultrastrüktürel İncelenmesi. Solunum Hastalıkları Dergisi, 1992. 3(2): p. 159-165.*
15. Kerr, J.B., Chapter 11 Respiratory System In. *Atlas of functional histology. Elsevier;1999.p. 212-224.*

16. David Pass. Respiratory System In *Rat Anatomy, Histology*. Annzcart News, 1993. 6(4).
17. Suckow, M., *The laboratory rat*. Animal Resorces Centre Journal. 2006: Australia. 112-121.
18. Hall E.J. Chapter 1 Physics and Chemistry of Radiation Absorption.In: *Radiobiology for the Radiologist, 6th Edition*.Lippincott Williams&Wilkins. 2006. p 9 -14.
19. Özalpan, A. 1.Giriş: Temel tanımlar ve kavramlar. In: *Temel Radyobiyoloji , Haliç Üniversitesi*.1.Ed.İstanbul. s11-13.
20. Ufuk, M., *.Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi*. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Derg, 2004. 15(1-2): p. s 91-96.
21. Burçak Gülden, A.G., *Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma*. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi, 2004. 35(4): p. s159-169.
22. Coggle, J.E., Lambert, B.E. ve Moores, S.R., *Radiation effects in the lung*. Environ Health Perspect, 1986. 70: p. 261-91.
23. Nonn, R.A. ve Gross, N.J., *Effects of radiation on the lung*. Curr Opin Pulm Med, 1996. 2(5): p. 390-5.
24. Mehta, V., *Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: pulmonary function, prediction, and prevention*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. 63(1): p. 5-24.
25. Koh, E.S., Sun, A., Tran, T.H., Tsang, R., Pintilie, M., Hodgson, D.C., Wells, W., Heaton, R. ve Gospodarowicz, M.K., *Clinical dose-volume histogram analysis in predicting radiation pneumonitis in Hodgkin's lymphoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. 66(1): p. 223-8.
26. Roach, M., 3rd, Gandara, D.R., Yuo, H.S., Swift, P.S., Kroll, S., Shrieve, D.C., Wara, W.M., Margolis, L. ve Phillips, T.L., *Radiation pneumonitis following combined modality therapy for lung cancer: analysis of prognostic factors*. J Clin Oncol, 1995. 13(10): p. 2606-12.
27. Tsoutsou, P.G. ve Koukourakis, M.I., *Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006. 66(5): p. 1281-93.
28. Van Dyk, J., Keane, T.J., Kan, S., Rider, W.D. ve Fryer, C.J., *Radiation pneumonitis following large single dose irradiation: a re-evaluation based on absolute dose to lung*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1981. 7(4): p. 461-7.
29. Wall, R.J. ve Schnapp, L.M., *Radiation pneumonitis*. Respir Care, 2006. 51(11): p. 1255-60.
30. Maisin, J.R., *The ultrastructure of the lung of mice exposed to a supra-lethal dose of ionizing radiation on the thorax*. Radiat Res, 1970. 44(2): p. 545-64.
31. Ahier, R.G., Anderson, R.L. ve Coultas, P.G., *Responses of mouse lung to irradiation. 1. Alterations in alveolar surfactant after neutrons and X-rays*. Radiother Oncol, 1985. 3(1): p. 61-8.

32. McDonald, S., Rubin, P., Phillips, T.L. ve Marks, L.B., *Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995. 31(5): p. 1187-203.
33. Gross, N.J., *Pulmonary effects of radiation therapy*. Ann Intern Med, 1977. 86(1): p. 81-92.
34. Martin, M., Lefaix, J. ve Delanian, S., *TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. 47(2): p. 277-90.
35. Rubin, P., Johnston, C.J., Williams, J.P., McDonald, S. ve Finkelstein, J.N., *A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995. 33(1): p. 99-109.
36. Strieter, R.M., Keeley, E.C., Hughes, M.A., Burdick, M.D. ve Mehrad, B., *The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis*. J Leukoc Biol, 2009. 86(5): p. 1111-8.
37. Phillips, R.J., Burdick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, M.P. ve Strieter, R.M., *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. J Clin Invest, 2004. 114(3): p. 438-46.
38. Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P. ve Gurtner, G.C., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. 10(8): p. 858-64.
39. Sato, Y. ve Rifkin, D.B., *Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis*. J Cell Biol, 1988. 107(3): p. 1199-205.
40. Hong, J.H., Jung, S.M., Tsao, T.C., Wu, C.J., Lee, C.Y., Chen, F.H., Hsu, C.H., McBride, W.H. ve Chiang, C.S., *Bronchoalveolar lavage and interstitial cells have different roles in radiation-induced lung injury*. Int J Radiat Biol, 2003. 79(3): p. 159-67.
41. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Pharmacol, 2002. 64(5-6): p. 993-8.
42. Beddy, D., Watson, R.W., Fitzpatrick, J.M. ve O'Connell, P.R., *Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease*. Br J Surg, 2004. 91(1): p. 72-7.
43. Yaekashiwa, M., Nakayama, S., Ohnuma, K., Sakai, T., Abe, T., Satoh, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, T. ve Nukiwa, T., *Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. A morphologic study*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 156(6): p. 1937-44.
44. Marchand-Adam, S., Marchal, J., Cohen, M., Soler, P., Gerard, B., Castier, Y., Leseche, G., Valeyre, D., Mal, H., Aubier, M., Dehoux, M. ve Crestani, B., *Defect of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 168(10): p. 1156-61.

45. Yu, J., Moon, A. ve Kim, H.R., *Both platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-alpha and PDGFR-beta promote murine fibroblast cell migration.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. 282(3): p. 697-700.
46. Yoshida, M., Sakuma, J., Hayashi, S., Abe, K., Saito, I., Harada, S., Sakatani, M., Yamamoto, S., Matsumoto, N., Kaneda, Y. ve et al., *A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(21): p. 9570-4.
47. Lindner, H., Holler, E., Gerbitz, A., Johnson, J.P., Bornkamm, G.W. ve Eissner, G., *Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: interleukin-10 protects against transendothelial migration.* Transplantation, 1997. 64(9): p. 1370-3.
48. Lamouille, S. ve Derynck, R., *Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway.* J Cell Biol, 2007. 178(3): p. 437-51.
49. Vujaskovic, Z., Down, J.D., van Waarde, M.A., van Assen, A.J., Szabo, B.G. ve Konings, A.W., *Plasma TGFbeta level in rats after hemithoracic irradiation.* Radiother Oncol, 1997. 44(1): p. 41-3.
50. Anscher, M.S., Kong, F.M., Andrews, K., Clough, R., Marks, L.B., Bentel, G. ve Jirtle, R.L., *Plasma transforming growth factor beta1 as a predictor of radiation pneumonitis.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. 41(5): p. 1029-35.
51. Rube, C.E., Uthe, D., Schmid, K.W., Richter, K.D., Wessel, J., Schuck, A., Willich, N. ve Rube, C., *Dose-dependent induction of transforming growth factor beta (TGF-beta) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. 47(4): p. 1033-42.
52. Anscher, M.S., Chen, L., Rabbani, Z., Kang, S., Larrier, N., Huang, H., Samulski, T.V., Dewhirst, M.W., Brizel, D.M., Folz, R.J. ve Vujaskovic, Z., *Recent progress in defining mechanisms and potential targets for prevention of normal tissue injury after radiation therapy.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. 62(1): p. 255-9.
53. Beckman, J.S., Minor, R.L., Jr., White, C.W., Repine, J.E., Rosen, G.M. ve Freeman, B.A., *Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance.* J Biol Chem, 1988. 263(14): p. 6884-92.
54. Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S. ve Richardson, D.C., *Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase.* Nature, 1983. 306(5940): p. 284-7.
55. Grdina, D.J., Murley, J.S. ve Kataoka, Y., *Radioprotectants: current status and new directions.* Oncology, 2002. 63 Suppl 2: p. 2-10.
56. White, C.W., Jackson, J.H., Abuchowski, A., Kazo, G.M., Mimmack, R.F., Berger, E.M., Freeman, B.A., McCord, J.M. ve Repine, J.E., *Polyethylene glycol-attached antioxidant enzymes decrease pulmonary oxygen toxicity in rats.* J Appl Physiol, 1989. 66(2): p. 584-90.
57. Goth, L., Lenkey, A. ve Bigler, W.N., *Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary.* Diabetes Care, 2001. 24(10): p. 1839-40.

58. Wood, J.M., Decker, H., Hartmann, H., Chavan, B., Rokos, H., Spencer, J.D., Hasse, S., Thornton, M.J., Shalbaf, M., Paus, R. ve Schallreuter, K.U., *Senile hair graying: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair*. FASEB J, 2009. 23(7): p. 2065-75.
59. Rabbani, Z.N., Salahuddin, F.K., Yarmolenko, P., Batinic-Haberle, I., Thrasher, B.A., Gauter-Fleckenstein, B., Dewhirst, M.W., Anscher, M.S. ve Vujaskovic, Z., *Low molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant AEOL 10150 protects lungs from fractionated radiation*. Free Radic Res, 2007. 41(11): p. 1273-82.
60. Delanian, S., Baillet, F., Huart, J., Lefaix, J.L., Maulard, C. ve Housset, M., *Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial*. Radiother Oncol, 1994. 32(1): p. 12-20.
61. Machtay, M., Scherpereel, A., Santiago, J., Lee, J., McDonough, J., Kinniry, P., Arguiri, E., Shuvaev, V.V., Sun, J., Cengel, K., Solomides, C.C. ve Christofidou-Solomidou, M., *Systemic polyethylene glycol-modified (PEGylated) superoxide dismutase and catalase mixture attenuates radiation pulmonary fibrosis in the C57/bl6 mouse*. Radiother Oncol, 2006. 81(2): p. 196-205.
62. Neal, R., Matthews, R.H., Lutz, P. ve Ercal, N., *Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation*. Free Radic Biol Med, 2003. 34(6): p. 689-95.
63. Bump, E.A. ve Brown, J.M., *Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells in vitro and in vivo*. Pharmacol Ther, 1990. 47(1): p. 117-36.
64. Tepel, M., van der Giet, M., Schwarzfeld, C., Laufer, U., Liermann, D. ve Zidek, W., *Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine*. N Engl J Med, 2000. 343(3): p. 180-4.
65. Meyer, A., Buhl, R., Kampf, S. ve Magnussen, H., *Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. 152(3): p. 1055-60.
66. Gillissen, A. ve Nowak, D., *Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy*. Respir Med, 1998. 92(4): p. 609-23.
67. Nagata, K., Iwasaki, Y., Yamada, T., Yuba, T., Kono, K., Hosogi, S., Ohsugi, S., Kuwahara, H. ve Marunaka, Y., *Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury*. Respir Med, 2007. 101(4): p. 800-7.
68. Hagiwara, S.I., Ishii, Y. ve Kitamura, S., *Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(1): p. 225-31.
69. McAlpine, J.B., Swanson, S.J., Jackson, M. ve Whittern, D.N., *Revised NMR assignments for rapamycin*. J Antibiot (Tokyo), 1991. 44(6): p. 688-90.
70. Noh, W.C., Mondesire, W.H., Peng, J., Jian, W., Zhang, H., Dong, J., Mills, G.B., Hung, M.C. ve Meric-Bernstam, F., *Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells*. Clin Cancer Res, 2004. 10(3): p. 1013-23.

71. Mita, M.M., Mita, A. ve Rowinsky, E.K., *The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer*. Cancer Biol Ther, 2003. 2(4 Suppl 1): p. S169-77.
72. Pallet, N., Beaune, P., Legendre, C. ve Anglicheau, D., *[Rapamycine and mTOR inhibitors: from bench to bedside]*. Ann Biol Clin (Paris), 2006. 64(2): p. 107-15.
73. Dancey, J.E., *Therapeutic targets: MTOR and related pathways*. Cancer Biol Ther, 2006. 5(9): p. 1065-73.
74. van Eerde, M.R., Kampinga, H.H., Szabo, B.G. ve Vujaskovic, Z., *Comparison of three rat strains for development of radiation-induced lung injury after hemithoracic irradiation*. Radiother Oncol, 2001. 58(3): p. 313-6.
75. Wiegman, E.M., Meertens, H., Konings, A.W., Kampinga, H.H. ve Coppes, R.P., *Loco-regional differences in pulmonary function and density after partial rat lung irradiation*. Radiother Oncol, 2003. 69(1): p. 11-9.
76. Sprong, R.C., Winkelhuyzen-Janssen, A.M., Aarsman, C.J., van Oirschot, J.F., van der Bruggen, T. ve van Asbeck, B.S., *Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 157(4 Pt 1): p. 1283-93.
77. Neef, M., Ledermann, M., Saegesser, H., Schneider, V. ve Reichen, J., *Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis*. J Hepatol, 2006. 45(6): p. 786-96.
78. Hubner, R.H., Gitter, W., El Mokhtari, N.E., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., Freitag-Wolf, S. ve Bewig, B., *Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples*. Biotechniques, 2008. 44(4): p. 507-11, 514-7.
79. Flechsig, P., Hartenstein, B., Teurich, S., Dadrich, M., Hauser, K., Abdollahi, A., Grone, H.J., Angel, P. ve Huber, P.E., *Loss of matrix metalloproteinase-13 attenuates murine radiation-induced pulmonary fibrosis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 77(2): p. 582-90.
80. Semenenko, V.A., Molthen, R.C., Li, C., Morrow, N.V., Li, R., Ghosh, S.N., Medhora, M.M. ve Li, X.A., *Irradiation of varying volumes of rat lung to same mean lung dose: a little to a lot or a lot to a little?* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. 71(3): p. 838-47.
81. Khan, M.A., Hill, R.P. ve Van Dyk, J., *Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998. 40(2): p. 467-76.
82. Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F. ve Hall, M.N., *TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast*. Mol Biol Cell, 1996. 7(1): p. 25-42.
83. Lamb, D., *Rat lung pathology and quality of laboratory animals: the user's view*. Lab Anim, 1975. 9(1): p. 1-8.
84. Mehrad, B., Burdick, M.D. ve Strieter, R.M., *Fibrocyte CXCR4 regulation as a therapeutic target in pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. 41(8-9): p. 1708-18.

85. Lehnert, S. ve el-Khatib, E., *The use of CT densitometry in the assessment of radiation-induced damage to the rat lung: a comparison with other endpoints.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989. 16(1): p. 117-24.
86. Tamagawa, K., Taooka, Y., Maeda, A., Hiyama, K., Ishioka, S. ve Yamakido, M., *Inhibitory effects of a lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. 161(4 Pt 1): p. 1279-84.
87. Rahman, I. ve Adcock, I.M., *Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD.* Eur Respir J, 2006. 28(1): p. 219-42.
88. Gao, F., Kinnula, V.L., Myllarniemi, M. ve Oury, T.D., *Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis.* Antioxid Redox Signal, 2008. 10(2): p. 343-54.
89. Delanian, S., Martin, M., Bravard, A., Luccioni, C. ve Lefaix, J.L., *Cu/Zn superoxide dismutase modulates phenotypic changes in cultured fibroblasts from human skin with chronic radiotherapy damage.* Radiother Oncol, 2001. 58(3): p. 325-31.
90. Epperly, M.W., Wegner, R., Kanai, A.J., Kagan, V., Greenberger, E.E., Nie, S. ve Greenberger, J.S., *Effects of MnSOD-plasmid liposome gene therapy on antioxidant levels in irradiated murine oral cavity orthotopic tumors.* Radiat Res, 2007. 167(3): p. 289-97.
91. Vouldoukis, I., Conti, M., Krauss, P., Kamate, C., Blazquez, S., Tefit, M., Mazier, D., Calenda, A. ve Dugas, B., *Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress.* Phytother Res, 2004. 18(12): p. 957-62.
92. Mahalati, K. ve Kahan, B.D., *Clinical pharmacokinetics of sirolimus.* Clin Pharmacokinet, 2001. 40(8): p. 573-85.
93. Pham, P.T., Pham, P.C., Danovitch, G.M., Ross, D.J., Gritsch, H.A., Kendrick, E.A., Singer, J., Shah, T. ve Wilkinson, A.H., *Sirolimus-associated pulmonary toxicity.* Transplantation, 2004. 77(8): p. 1215-20.
94. Weiner, S.M., Sellin, L., Vonend, O., Schenker, P., Buchner, N.J., Flecken, M., Viebahn, R. ve Rump, L.C., *Pneumonitis associated with sirolimus: clinical characteristics, risk factors and outcome--a single-centre experience and review of the literature.* Nephrol Dial Transplant, 2007. 22(12): p. 3631-7.
95. Sarkaria, J.N., Schwingler, P., Schild, S.E., Grogan, P.T., Mladek, A.C., Mandrekar, S.J., Tan, A.D., Kobayashi, T., Marks, R.S., Kita, H., Miller, R.C., Limper, A.H. ve Leof, E.B., *Phase I trial of sirolimus combined with radiation and cisplatin in non-small cell lung cancer.* J Thorac Oncol, 2007. 2(8): p. 751-7.

