

T1390

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

+

AKCİĞER KANSERLİ OLGULARDA
RADYOTERAPİNİN
NÖTROFİLLERDE OKSİDATİF PATLAMA
ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Ayşegül UĞUR KURTOĞLU

Uzmanlık Tezi

T1390/1-1

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Gültekin Yücel

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2002

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. T. Aslan Aksu ve tez hocam Sayın Prof. Dr. Gültekin Yücel başta olmak üzere tüm hocalarıma ve beraber çalışmaktan onur duyduğum araştırma görevlisi ve uzman arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Ayşegül UĞUR KURTOĞLU

Antalya, 2002

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| Şekiller Dizini | I |
| Tablolar Dizini | III |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Akciğer Kanseri | 3 |
| 2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyoloji | 3 |
| 2.1.2. Akciğer Kanseri Klinik Bulgular | 4 |
| 2.1.3. Akciğer Kanseri Patolojik Sınıflama | 5 |
| 2.1.4. Akciğer Kanseri Tanı Yöntemleri | 7 |
| 2.1.5. Akciğer Kanseri Evrelendirme | 8 |
| 2.1.6. Akciğer Kanseri Tedavi | 10 |
| 2.1.7. Akciğer Kanseri Radyoterapi Uygulamasına Bağlı Olarak Gelişen Yan Etkiler | 12 |
| 2.2. Radyoterapi Nedir? | 14 |
| 2.2.1. Kanseri Tedavisinde Radyasyon Onkolojisi | 14 |
| 2.2.2. Radyasyon Tedavisinin İçeriği | 14 |
| 2.2.3. Radyobiyojinin Moleküler ve Hücresel Yönleri | 16 |
| 2.2.4. Normal Dokularda Radyasyon Hasarının Patobiyo lojisi ve Kinetiği | 25 |
| 2.2.5. Bölgesel Fraksiyone External Radyoterapi Uygulamasının Periferal Kan Değerlerine Etkisi | 27 |
| 2.3. Nötrofiller | 29 |
| 2.3.1. Nötrofillerin Bakteri Öldürme Mekanizmaları | 32 |
| 2.3.2. Oksidan Metabolitler | 33 |
| 2.3.3. NADPH Oksidaz Sistemi | 35 |
| 2.3.4. Kronik Granümatöz Hastalık | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 40 |
| 3.1. Nötrofillerde Oksidatif Patlama Aktivitesinin Florometrik Yöntem ile Ölçümü | 41 |
| 3.1.1. Prensip | 41 |
| 3.1.2. Reaktifler | 43 |
| 3.1.3. Yöntem | 43 |
| 3.2 Apoptozisin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Gösterilmesi | 45 |
| 3.2.1. Prensip | 45 |
| 3.2.2. Reaktifler | 45 |
| 3.2.3. Yöntem | 45 |
| 3.3. Lökosit Sayısı ve Nötrofil Dağılımının Ölçülmesi | 47 |
| 3.4. İstatiksel Analiz | 48 |
| 4. BULGULAR | 49 |
| 5. TARTIŞMA | 61 |
| ÖZET | 69 |
| KAYNAKLAR | 70 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil | Sayfa |
|--|-------|
| 2.1. Radyasyonun zamana bağlı hücrelerde yarattığı değişiklikler | 17 |
| 2.2. Tümör süpresyonunda apoptozisin rolü | 22 |
| 2.3. Apoptozis sinyali ve hücre içi iletimi | 23 |
| 2.4. Radyoterapiye bağlı gelişen apoptozisde p53 geninin rolü | 24 |
| 2.5. Nötrofillerde inflamatuvar olaylara karşı gelişen efektör mekanizmalar | 29 |
| 2.6. Bakteriyal enfeksiyonlara karşı nötrofillerin fonksiyonel cevapları | 31 |
| 2.7. Reaktif oksijen radikallerinin hücre içindeki metabolizması | 34 |
| 2.8. Nötrofillerde NADPH oksidaz sisteminin aktivasyonu | 36 |
| 3.1. Nötrofillerde oksidatif patlama ve resazurinin resorifine dönüşümü | 42 |
| 4.1. Kontrol grubunda; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 49 |
| 4.2. Radyoterapi uygulamasından önce nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 50 |
| 4.3. Radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 51 |
| 4.4. Radyoterapi uygulanması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 52 |
| 4.5. Kontrol grubu ile radyoterapi uygulanmasının öncesi; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 53 |
| 4.6. Radyoterapi uygulanmasının öncesi ile planlanan radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 54 |
| 4.7. Radyoterapi uygulanmasının öncesi ile radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 54 |
| 4.8. Planlanan radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonrası ile radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması | 55 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.9. | Kontrol, radyoterapi öncesi, ortası ve sonrasında; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin dağılımı | 55 |
| 4.10. | Agaroz jel elektroforezinde apoptozisin gösterilmesi | 57 |
| 4.11. | Agaroz jel elektroforezinde DNA'nın smear yapmasının büyütülerek gösterilmesi | 57 |
| 4.12. | Apoptozis pozitif ile negatif olan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; radyoterapi uygulanması öncesindeki NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 59 |
| 4.13. | Apoptozis pozitif ile negatif olan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; radyoterapi uygulamasının ortası ve sonunda NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 59 |
| 4.14. | Radyoterapi uygulamasının öncesi, ortası ve sonrasındaki lökosit sayısının dağılımı | 60 |

TABLULAR DİZİNİ

| Tablo | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1 : Akciğer kanserinde histolojik sınıflama (Dünya Sağlık Örgütü) | 6 |
| 2.2 : Akciğer Kanserlerinde Uluslararası TNM Sınıflaması | 9 |
| 2.3 : Akciğer Kanserinde Evrelendirme | 10 |
| 4.1: Kontrol grubunda; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 49 |
| 4.2: Radyoterapi uygulamasından önce; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 50 |
| 4.3: Radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 51 |
| 4.4: Radyoterapi uygulanması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 52 |
| 4.5 : Apoptozis pozitif ve negatif olarak değerlendirilen hastalarda nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri | 58 |
| 4.6 : Radyoterapi uygulamasının öncesi, ortası ve sonrasındaki lökosit sayısı ve nötrofil dağılımının ortalama \pm SD değerleri | 60 |

1. GİRİŞ

Akciğer kanserinin görülme sıklığı her yıl hızla artış göstermektedir. Etiyolojisinde sigara kullanımının önemli bir faktör olduğu hastalığın tedavisinde asıl hedeflenen erken tanı ile tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve %100 sağ kalım sağlanmasıdır. Fakat çok az sayıdaki akciğer kanseri (%20-25) tanı konulduğu dönemde cerrahi olarak çıkarılmaya uygun evrede bulunur. Cerrahi olarak çıkarılamayan hastalarda medikal ve radyasyon tedavisi neoadjuvan veya adjuvan olarak akciğer kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır.

Radyasyon tedavisinin amacı; uygulanması planlanan radyasyon dozunun çevre dokulara en az düzeyde zarar vererek hedef alınan tümör dokusuna verilebilmesidir. Özellikle bu durum küratif amaçlı uygulanan radyoterapi dozlarında mümkün olmamaktadır ve istenilmeden de olsa çevre sağlıklı dokularda hasar meydana gelmektedir (1).

Radyasyon tedavisinin uygulanmasına bağlı olarak hızlı bir yaşam siklusu olan hematopoetik sistem hücreleri de tedaviden kısa bir süre sonra etkilenmektedirler. Özellikle lökosit ve trombosit sayılarında azalma gözlenmektedir (2). Lökositler vücudun savunma sisteminde oldukça önemli role sahiptirler. Nötrofiller enfeksiyöz etkenlere karşı ilk yanıtı verirler (3). Bu nedenle radyoterapinin nötrofillerin fonksiyonlarını nasıl etkilediği klinik uygulamalar da oldukça önem taşımaktadır. Radyasyon uygulanmasına bağlı olarak nötrofillerde oksidan durumun arttığı ve antioksidan kapasitenin azaldığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (4). Özellikle hücre içi ROS miktarının arttığı belirtilmektedir (5). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalarda ROS oluşumunun nedenleri arasında NADPH oksidaz sisteminin aktivasyonu ve radyoterapi sonucu oluşan apoptozis ve buna bağlı olarak meydana gelen nötrofil aktivasyonu sorumlu tutulmaktadır (6).

Biz bu çalışmamızda; Akciğer kanserli hastalarda radyoterapi uygulanmasının nötrofillerde oksidatif patlama üzerine etkilerini inceledik. Bu amaçla radyoterapi uygulamasının öncesi, planlanan tedavi dozunun yarısının alındığı dönem ve radyoterapi uygulamasının tamamlandığı dönem olmak üzere üç defa periferik kan örneklerinden elde edilen nötrofilde NADPH oksidaz aktivitesini ölçtük. Ayrıca radyoterapi tedavisi sonunda hastaların lökositlerinde

apoptosis gelişimi değerlendirildi. Radyoterapinin nötrofillerde neden olduğu oksidatif stressin NADPH oksidaz enzim sisteminin aktivasyonu ile ilgili midir? Apoptosisin bu duruma katkısı ne kadar olmaktadır? şeklinde soruları sorguladığımız çalışmamızın sonucunda bulduğumuz yanıtların yapılacak olan ileri çalışmalar için bir basamak olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Akciğer Kanserinde Epidemiyoloji

Akciğer kanseri erkeklerde prostat kanserinden, kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen kanser tipidir. Ayrıca akciğer kanseri hem erkeklerde (%32), hem de kadınlarda (%25) en sık ölüme neden olan kanser tipidir. 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 96 000 erkek, 79 800 kadın olmak üzere toplam 176 100 yeni akciğer kanseri olgusu saptanmıştır. Bu hastalarında %85'i hastalıkları nedeniyle hayatlarını kaybetmişlerdir (7).

Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanseri için erkek/kadın oranı 1950 yılında 6/1 iken, 1991 yılında 3/1, 1995 yılında ise 1.5/1 değerine kadar azalmıştır. Johnson (8) 15 yıllık bir süreç içerisinde 2580 akciğer kanserli olgu üzerinde çalışma yapmıştır. İlk beş yıl içerisinde elde edilen sonuçlara göre farklı tiplerdeki akciğer kanseri olgularının insidansı ; yassı hücreli karsinoma (%43.1), büyük hücreli differansiye olmayan karsinoma (%22.5), adenokarsinoma (%18.6), küçük hücreli differansiye olmayan karsinoma (%11.6), bronkoalveolar karsinoma (%3.5) düzeylerinde saptanırken, 2. ve 3. beş yıllık süreçlerde yassı hücreli karsinoma en sık görülen tip olma özelliğini korumasına rağmen insidansı %35.7'e gerilemiştir. Bununla birlikte adenokarsinoma %22 ile en sık görülen ikinci akciğer kanser tipi olmuştur. Ayrıca adenokarsinoma kadınlarda en sık görülen primer akciğer karsinomu olarak tanımlanmıştır (8). Galietti ve arkadaşları (9) İtalya'da 3398 akciğer kanser olgusu üzerinde çalışmışlar ve benzer bulgulara ulaşmışlardır. Her iki cinsiyette de olguların en sık görüldüğü yaş aralığı 35-75 yaş iken, pik insidansı da 55-65 yaşları arasındadır.

1964 yılından günümüze kadar yapılan birçok araştırma sigara ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi göstermektedir (10). Doll ve Hill (11) 40 000 İngiliz doktoru üzerinde yaptıkları çalışmada 36 akciğer kanseri olgusunun 25'nin sigara ile ilgisinin olduğunu bulmuşlardır. Sigara içenlerde kanser görülme riski içmeyenlere göre 20 kat daha fazladır. Hammond ve Horn (12) günde 10-20 adet sigara içen her 100 000 kişinin 54.3'ünde akciğer kanseri nedeniyle ölüm gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu oran günde 40 adet sigaradan daha fazla

içenlerde her 100 000 kişide 217.3'e kadar çıkmaktadır. Bu epidemiyolojik çalışmalara ek olarak deneysel çalışmalarda bu ilişkiyi doğrulamaktadır (13).

Endüstriyel bölgelerde bulunan asbest, nikel, krom, arsenik, kömür tozu, radyoaktif materyallerinde akciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir. Hava kirliliğinin kanser gelişme riskindeki rolü tartışmalıdır. Bununla birlikte yoğun çevre kirliliğinin bulunduğu kentlerde kırsal kesimlerde yaşayan kişilere göre akciğer kanseri gelişim riski 1.26-2.33 kat daha fazladır. Genetik faktörlerinde akciğer kanserine neden olduğu hakkında son yıllarda yapılan çalışmalar ile belirtilmektedir (1).

2.1.2. Akciğer Kanserlerinde Klinik Bulgular

Akciğer kanseri en sinsi seyir gösteren kanserler arasındadır. Hastalığın semptom ve bulguları tümörün lokal büyümesi, komşu yapılara invazyonu, bölgesel büyüme, uzak organ metastazı (hematojen yayılım) veya tümörün sekonder etkilerinden kaynaklanır (paraneoplastik sendromlar).

Öksürük olguların %75'inde başlıca semptomdur %40 olguda öksürük çok ciddi boyutlarda rahatsız edicidir. Hemoptezi olguların %57'sinde bulunur ve %4 olguda ilk semptomdur. Yaklaşık %40 olguda görülen diğer semptomlar arasında dispne ve plevra, göğüs duvarı, mediastinal yapıların invazyonu sonucu ortaya çıkan göğüs ağrısı sayılabilir. Kilo kaybı, halsizlik, yorgunluk ve iştahsızlık gibi nonspesifik semptomlar olguların %10-15'inde görülür. En az görülen semptom (%1-3) ise ateş ile birlikte seyreden solunum yolu enfeksiyonudur.

Intratorasik yapıların tümör tarafından invazyonu spesifik semptomlara yol açar. Akciğer apeksine lokalize olan tümörün büyümesi sonucunda servikal ve torasik sinirlerin invazyonu ile birlikte Pancoast veya Süperior Sulcus Tümör Sendromu adı verilen, ulnar sinir trasesi boyunca yayılan omuzdan başlayarak kola doğru uzanım gösteren ağrı ile karakterizedir. Sempatik sinirlerin invazyonu ile enoftalmus, ptosis, myozis ve ipsilateral terleme kaybı ile karakterize Horner sendromuna neden olur. Recurrent larengial lenf bezlerinin tutulumu Nervus Larengus Recurrentis'in paralizisine ve horlamaya yol açabilir. Larengial sinirin sol taraftaki intratorasik uzanımı daha fazla olduğu için bu semptom daha çok sol akciğer tümörlerinde görülür. Nervus phrenicus'un tutulumu hemidiafragmatik

paraliziye ve nefes darlığına yol açar. Disfaji tümörün özefagus üzerine uyguladığı mekanik kompresyonun bir sonucudur. Sağ akciğere lokalize primer tümörler veya sağ mediastinal lenf noduna metastaz Süperior Vena Cava Sendromu'na yol açar Üst loblardaki büyük tümörler masif üst mediastinal lenfadenopati ile birlikte torasik giriş obstrüksiyonuna ve ciddi solunum yetmezliğine neden olur. Perikardium ve kalbin tümör ile invazyonu perikard tamponandı ve konjestif kalp yetmezliğinin gelişimine yol açar. Ayrıca akciğer kanserli hastaların %2'sinde Paraneoplastik Sendrom 'lara ait bulgular gözlenir (1)

2.1.3. Akciğer Kanserlerinde Patolojik Sınıflama

Patolojik olarak akciğer kanserlerinde 4 ana grup bilinmektedir Skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom. Hücre tipi hem tedavi hem de prognoz ile çok ilgilidir. Küçük hücreli karsinomlar diğer gruplar ile karşılaştırıldığında belirgin olarak farklı davrandıkları için, klinisyenler akciğer kanserlerini küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri olarak iki grupta sınıflamaktadırlar. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan akciğerin malign epitelyal hücreli tümörlerinin sınıflaması Tablo 1'de görülmektedir (14).

Tablo 2.1 : Akciğer kanserinde histolojik sınıflama (Dünya Sağlık Örgütü) (14)

- I. Epidermoid karsinom (Skvamöz hücreli)**
 - İyi differansiye
 - Orta derecede differansiye
 - Az derecede differansiye
- II. Küçük hücreli karsinom**
 - Yulaf hücreli
 - İntermedier tip
 - Miks tip
- III. Adenokarsinom**
 - Asiner tip
 - Papiller tip
 - Bronşioalveoler tip
 - Müsinli solid karsinom
- IV. Büyük hücreli karsinom**
 - Dev hücreli (Giant Cell)
 - Berrak hücreli
- V. Miks tümörler**
- VI. Karsinoid tümörler**
- VII. Broşial bez karsinomları**
 - Adenoid kistik
 - Mukoepidermoid
- VIII. Mezoteliomalar**
 - Lokelize
 - Diffüz
- IX. Diğerleri**

2.1.4. Akciğer Kanserlerinde Tanı Yöntemleri

Akciğer kanserlerinde tanı ve evreleme amacı ile yapılabilecek birçok girişimli (invaziv) ve girişimsiz (noninvaziv) tanı yöntemi vardır. Bunlar içinde radyolojik tetkikler noninvaziv oluşları ve etkinlikleri yönünden ilk tercih edilen yöntemlerdir.

1. Girişimsiz Tanı Yöntemleri

- **Radyolojik** : Akciğer kanserlerinde radyolojik incelemeler (PA Akciğer grafisi, bilgisayarlı tomografi vs.) üç amaçla yapılır Bunlar kanser tanısı, evreleme ve tedaviye yanıtı değerlendirmedir (15,16)
- **Balgam Sitolojisi**: Akciğer kanserinin malign hücreleri bronş sekresyonlarına karışarak dışarı atılırlar. Akciğer kanseri olduğu şüphelenilen hastalardan sabah balgamının en az üç gün üst üste bekletilmeksizin sitolojik incelemesi yapılmalıdır Tanısal duyarlılığı ortalama %62.5-75 olarak belirtilmektedir (17)
- **Tümör Markırları**: Nöron spesifik enolaz küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda hem serumda, hem de plevra sıvısında yükselir. Karsino embriyjenik antijen karaciğerden metastaz gelişimi ile korelasyon gösterir.
- **Genetik Çalışmalar**: Son yıllarda özellikle küçük hücreli akciğer kanserlerinde 3.kromozonun kısa kolunda 3p (14-23) eksikliğinin saptanması , retinoblastoma geninin (RbmRNA) daha sık rastlanması akciğer kanserli olgularda genetik incelemeye olan eğilimi arttırmıştır.

2. Girişimli Tanı Yöntemleri

- **Bronkoskopi**: Akciğer kanserli veya kanser şüphesi bulunan bir hastada doku tanısı, evreleme ve tedaviyi değerlendirmede rijid veya fleksibl bronkoskopik incelemeler en yararlı tetkiklerdir. Bu tetkiklerde bronş lavaj sıvısı, mukoza veya tümöral dokudan biyopsi ve post bronkoskopik balgam elde edilir Ayrıca bronkoskopik incelemelerde operabilite tayini yapılabilir. Çalışmalarda bronkoskopi ile tümör görülüyor ise; rijid bronkoskopi biyopsileri ile %86.5, fiberoptik

bronkoskopi biyopsileri ile %86-96 oranında tanı konulabilmektedir (18).

- **Torasentez ve Torakoskopi:** Plörezi varlığında tümörün plevral metastazı yönünden veya kesin tanıda sitoloji ve biyopsinin yetersiz kaldığı durumlarda torakoskopi veya VATS yapılmalıdır .
- **Mediastinoskopi, Mediastinotomi:** Akciğer kanserli hastalarda operasyon düşünülüyor ve bilgisayarlı tomografide mediasten patolojik olarak pozitif ise rutin mediastinoskopi uygulanmalıdır Mediastinoskopi de mediastinal yapılar tümör ile invaze ise; rezeksiyon olanaksızdır. Bu yaklaşımla gereksiz torakotomi oranı düşürülebilir (19)
- **Transtorasik İnce İğne Aspirasyon Biopsisi:** Bu yöntem etkili ve güvenilir olup (%91), bronkoskopinin genellikle negatif kaldığı, çok periferik yerleşim gösteren akciğer lezyonları, selim soliter kitleler ve pancoast tümörlerinde balgam sitolojisinden sonra seçilecek ilk tanı metodu olarak kullanılabilir (20).
- **Torakotomi:** Tüm tanısal tetkikler sonrası kesin tanı yapılamayan, tümör şüphesi veya histolojik tip değerlendirilmesi gereken hastalarda tanısal amaçlı eksploratris torakotomi yapılabilmektedir.

2.1.5. Akciğer Kanserlerinde Evrelendirme

Akciğer tanısı konulduktan sonra hastaların prognozları hakkında sağlıklı bir yaklaşımda bulunmak, en etkili tedavi yöntemini belirleyebilmek ve alınan tedavi sonuçlarının bilimsel değerlendirmesinin yapılabilmesi amacı ile hastalığın evrelendirilmesi gereklidir. Bu neden ile Uluslararası Kanser Mücadele Birliği ve Amerikan Kanser Birliği tarafından 1986 yılında yeni bir evreleme sistemi gerçekleştirilmiştir (Tablo 2-3) (14)

Tablo 2.2 : Akciğer Kanserlerinde Uluslararası INM Sınıflaması (14).

Primer Tümör Büyüklüğü (T)

T_x:Radyolojik ve bronkoskopik olarak saptanamayan, fakat bronkopulmoner sekresyonlarda malign hücre bulunması.

T₀: Primer tümör saptanmaması.

T_{is}: Insitu karsinom.

T₁: En büyük çapı 3 cm veya daha az olan ve çevresindeki akciğer ve visseral plevraya yayılmış tümör, bronkoskopik olarak lob bronşlarının proksimaline erişmeyen tümör

T₂: 3 cm' den büyük tümör, herhangi büyüklükteki bir tümör fakat visseral plevraya yayılmış veya hiler bölgede genişleyerek atelektazi ve obstrüktif pnömoniye neden olmuş, bronkoskopik tetkikte lob bronşu içinde ve karinadan en az 2 cm daha uzakta olan tümör.

T₃: Herhangi büyüklükteki tümör, direkt genişleme ile göğüs duvarı, diafragma, mediastinal plevra, perikardı tutmuş fakat kalp,büyük damarlar, trakea, özefagus, vertebraya bronkoskopide karinaya 2 cm mesafede ana bronş içinde, fakat karinaya yayılmamış

T₄: Herhangi büyüklükteki tümör, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özefagus, vertebraya yayılmış, malign plevra sıvısı saptanmış, bronkoskopik olarak karina genişlemiş.

Lenf Bezi Tutulumu (N)

N₀: Bölgesel lenf bezi metastazı yok

N₁: Peribronşial veya aynı taraf hiler lenf bezlerinde metastaz veya direkt yayılım mevcut

N₂: Aynı taraf mediastinal veya trakeal, karina altındaki lenf bezlerinde metastaz mevcut

N₃: Karşı taraf hiler veya mediastinal lenf bezlerinde metastaz saptanmış, aynı veya karşı taraf skalen veya supraclavikuler lenf bezlerinde metastaz mevcut

Uzak Metastaz (M)

M₀: Uzak metastaz yok

M₁: Uzak metastaz mevcut

Tablo 2.3 : Akciğer Kanserinde Evrelendirme (14).

| | |
|-----------------|---|
| Evre 0 : | $T_xN_0M_0$, $T_{is}N_0M_0$ |
| Evre 1: | $T_1N_0M_0$, $T_2N_0M_0$ |
| Evre 2: | $T_1N_1M_0$, $T_2N_1M_0$ |
| Evre 3A: | $T_3N_0M_0$, $T_3N_1M_0$, $T_{1-3}N_2M_0$ |
| Evre 3B: | $T_{1-4}N_3M_0$, $T_4N_{0-3}M_0$ |
| EvreIV: | $T_{1-4}N_{0-3}M_1$ |

2.1.6. Akciğer Kanserlerinde Tedavi

- Akciğer kanserlerinde en büyük problem erken tanı problemidir. Asemptomatik dönemde teşhis edilmiş hastaların tedavileri hem kolay, hem de 5 yıllık yaşam şansları %60'ların üzerinde bulunmaktadır. Akciğer kanserlerinde tedavi yöntemi kanserin histolojik tipi, evresi ve hastaların genel durumuna göre biçimlendirilmektedir

1. Akciğer Kanserlerinde Cerrahi Tedavi

Akciğer kanserlerinin çok az bir kısmı tanı konulduğu dönemde operabl (%20-25) olup, büyük kısmı inoperabl'dır. Cerrahi tedavi erken dönem akciğer kanserlerinde ve opere edilebilir hastalarda esas tedavi yöntemidir. Ayrıca cerrahi tedavi tanısal veya palyatif amaçlarla da uygulanabilir. Cerrahi tedavi ile tümör hacmi azaltılarak radyoterapi ve kemoterapinin etkinliği artırılabilir.

Cerrahi tedavide başarı hastaların iyi seçilmesine, evrelendirmenin iyi yapılmasına bağlı olup, ayrıca hastaların fizyolojik durumları, performansları, solunumsal ve kardiyak fonksiyonlarının değerlendirilmesi de önemlidir. Cerrahi

tedavi, tümörün histolojik tipi ve evresi göz önüne alındığında küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde I, II ve IIIA evrelerinde, küçük hücreli akciğer kanserlerinde ise; evre I' de önerilmektedir. Cerrahi rezeksiyon sınırı için kesin karar torakotomi esnasında verilir ve tümör yayılımına göre belirlenir. Rezeksiyon sınırında tümör dokusunun bulunmamalıdır. Ayrıca en distal lenf bezlerinde tümör ve kapsül invazyonu olmamalıdır.

2. Akciğer Kanserlerinde Medikal Tedavi

Akciğer kanserlerinde medikal tedavi sitostatik ilaçlardan oluşan tedavi uygulamasıdır. Özellikle küçük hücreli akciğer kanserlerinde öncelik taşımaya rağmen; küçük hücreli olmayan ileri evredeki hastalarda da uygulanabilmektedir. Kemoterapi akciğer kanserlerinde neoadjuvant (primer tedaviden önce) veya adjuvant (primer tedaviden sonra) olarak verilebilir (A33). Kemoterapiler kombine ilaç tedavileri ile yapılmaktadır. Kemoterapinin etkileri radyoterapi ile eş zamanlı verilerek artırılabilir. Kemoterapi uygulamak için hastaların performans durumları Karnofsky' e göre %60 ve daha fazla olmalıdır. İki kür kemoterapi sonunda tümörde küçülme olmaz ise tedavi kesilmelidir. Kemoterapi 70 yaş üstünde ve ileri derecede kilo kaybı olan, performans durumu %20-40 olan hastalarda uygulanmamalıdır.

3. Akciğer Kanserlerinde Radyoterapi Uygulaması

Akciğer kanserlerinde radyoterapinin uygulanması hücre tipine göre değişir. Radyoterapiye en hassas olanlar küçük hücreliler başta olmak üzere indifferansiye kanserler ve daha sonra skuamöz hücreli kanserlerdir. Adenokanserlerin radyoterapiye hassasiyeti az, büyük hücreli kanserlerin ise çok azdır. Radyoterapi medikal inoperabl yani; evre olarak operasyona uygun olan, anormal solunum fonksiyonları, kan gazı bulguları, pulmoner hipertansiyon varlığı ve yeni myokard infarktüsü gibi solunumsal ve kardiyak nedenlerden operasyona alınamayan hastalarda, rezektabl olan evre I tümörlerinde, trakea, karina, ana bronş tutulumu olan hastalarda küratif olarak uygulanmaktadır. Radyoterapi ayrıca cerrahi sonrası adjuvan olarak, insizyon yerinde tümör nüksünü ortadan kaldırmada, cerrahi sınırdaki tümör tespit edilenlerde, mediastinal

pozitif lenf adenopati varlığında, evre II, IIIA ve IIIB' de lokal kontrolü arttırmada, palyatif olarak evre IV' te, pancoast tümörlerinde, vena cava superior sendromu, dispne, ses kısıklığı, yutma güçlüğü, hemoptezi, atelektazi gibi tümörün bası bulgularında beyin, kemik ve supraklavikular lenf bezi metastazlarında uygulanmaktadır (1).

2.1.7. Akciğer Kanserinde Radyoterapi Uygulamasına Bağlı Olarak Gelişen Yan Etkiler

Radyoterapiye bağlı olarak ortaya çıkan yan etkiler akut ve geç olmak üzere iki grupta incelenir.

1) Akut Sekeller

Akut toksisite özefajit, öksürük, cilt reaksiyonları ve yorgunluğu içerir. Bu belirtiler tedavi uygulaması sırasında veya tedavinin tamamlanmasından sonraki 1 ay içerisinde görülürler. Akut radyasyon özefajiti radyoterapinin 3 haftasında ortaya çıkar 30 Gy'lik radyoterapi bu etkinin ortaya çıkması için yeterlidir. Kombine radyoterapi ve kemoterapi uygulaması özefajial hasarı anlamlı şekilde artırır. Johnson ve arkadaşları kombine radyo ve kemoterapi (3-4 hafta boyunca 30-40 Gy radyoterapi ve doksorubisin-vinkristin-siklofosfamid içeren kemoterapi uygulanan hastalarda) alan 21 hastanın 13'ünde özefajit ve 3'ünde özefajial sitrüktür tespit etmişlerdir.

Öksürük; bronşial mukoza irritasyonuna sekonder olarak ortaya çıkar. Öksürük oldukça sık oluşur fakat ciddi bir sorun oluşturmaz. Tedavisinde kodeinli veya kodeinsiz antitüssifler kullanılır.

Radyoterapi uygulamasının neden olduğu cilt reaksiyonları oldukça hafif veya orta derecededir. Topikal nemlendiricili kremler kullanılarak tedavi edilir (1)

2) Geç Sekeller

Geç sekeller arasında pnömoni, pulmoner fibrozis, özefajial sitrüktür, kardiyak sekeller (perikardiyal efüzyon, konstrüktif perikardit, kardiyomyopati, spinal kord myelopati ve brakial pleksopati sayılabilir. Radyasyon pnömonisinin görülme eşiği 20-25 Gy'dir. Radyasyon pnömonisinin insidansı ve ciddiyeti total

doza, fraksinasyona ve irradiye edilen akciğer volümüne bağlıdır. 20 Gy'den fazla radyasyon alan total akciğer volümü %25'ten az ise; tedavi gerektirecek semptomatik komplikasyon insidansı %8'dir. Ancak volüm %37'den fazla olur ise insidans %39 olur. %25 ve %27'lik volümler için insidans orta derecededir. Azalan pulmoner kan akımı ventilasyon-perfüzyon sintigrafisi ile gösterilebilir. Radyoterapi alan hastalarda yapılan pulmoner fonksiyon testleri azalmış kompliyans, diffüzyon kapasitesi ve akciğer volümünü gösterir. Akut radyasyon pnömonisi için uygulanan tedavi kesin yatak istirahati, bronkodilatörler ve kortikosteroidlerden oluşur. Ciddi olgulara pozitif basınçlı oksijen uygulaması yapılabilir.

Uzun süre sonra ortaya çıkan stenöz, ülserasyon ve fistül formasyonu gibi özefagial yan etkiler oldukça ender görülür %5 oranında özefagial hasar oluşturabilecek radyasyon dozu 30 fraksiyonda 63 Gy'dir. Eğer uygulana radyoterapi dozu 30 fraksiyonda 66,5 Gy olur ise; özefagial hasar insidansı %50 olur Aynı zamanda hastalara eş zamanlı kemoterapi uygulanıyor ise bu hasar oranında daha fazla artma olur.

Akciğer kanserinde radyoterapi uygulamasının neden olduğu kardiyak hasar oldukça nadirdir. En sık görülen kardiyak problem radyasyon perikarditidir. Perikardite neden olan faktörler irradiye edilen kalp volümü ve radyoterapi dozudur. Stewart ve Fajordo ortalama 42 81 Gy'lik radyoterapi uygulanması sonrasında kardiyak komplikasyonu %6 6 olarak bulmuşlardır. Doksorubisin kardiyotoksik bir ajan olduğu için radyoterapi ile kombine uygulandığı hastalarda dikkat edilmesi gerekir

Kalıcı spinal kord hasarına neden olan faktörler; verilen total doz, irradiye edilen kord uzunluğu ve fraksinasyon şemasıdır. Eğer spinl kordun 10 cm veya daha azı konvansiyonel fraksinasyon ile (2 Gy/gün haftada 5 gün) irradiye edilirse toksik etki için eşik doz 45 Gy'dir (1).

2.2. Radyoterapi Nedir?

1895 yılında X ışınlarının Roentgen tarafından bulunmasından sonra Radium 1898 yılında Curi'ler tarafından bulundu. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri tanımlanmaya başlandı. 1920'li yılların başlarında klinik radyoterapi çok hızlı bir gelişim gösterdi. 1922 yılında Paris'te yapılan Uluslararası Onkoloji Kongresi'nde Coutard ilerlemiş larinks kanserini radyoterapi ile başarılı olunarak herhangi bir problem ve kalıcı sekel ortaya çıkmadan tedavi ettiklerini bildirmesinden sonra klinik radyasyon tedavisi medikal bir disiplin olarak tanımlanmaya başlandı. 1934 yılında Coutard çağdaş radyasyon tedavisinin temelini oluşturan fraksinasyon şemasını geliştirdi (21).

2.2.1. Kanser Tedavisinde Radyasyon Onkolojisi

Radyasyon Onkolojisi kanserli hastaların iyonize radyasyon ile tedavi edilmesini amaçlayan klinik bir disiplindir. Tedavi süreci içerisinde radyoterapi tek başına kullanılabileceği gibi diğer tedavi metotları ile beraber kullanılabilir. Radyasyon tedavisinin amacı; uygulanması planlanan radyasyon dozunun çevre dokulara en az düzeyde zarar vererek hedef alınan tümör dokusuna verilebilmesidir. Radyoterapinin tedavi edici etkisinin yanı sıra hastalığa ait semptomları mümkün olduğunca azaltmayı amaçlayan bir kullanım alanı da bulunmaktadır. Ağrı palyasyonu, organların lümenlerinin açık tutulması, iskelet sorunlarının giderilmesi bu palyasyon etkileri arasında sayılabilir (1).

2.2.2. Radyasyon Tedavisinin İçeriği

Radyasyonun klinik kullanımı kompleks bir olaydır. Bu nedenle bir çok meslek grubu (radyasyon onkoloğu, dozimetris, fizik mühendisi vs) ile ilişki içinde olması gerekmektedir. Radyasyon tedavisinin amacı iki başlık altında toplanabilir.

- 1) **Küratif Amaçlı:** Buradaki amaç; hastalığın öngörülen yaşam şansı çok düşük bile olsa yeterli tedaviyi vererek hastalığı iyileştirmek ve uzun süreli bir sağ kalım sağlamaktır (Örneğin; T₄ evresindeki baş boyun veya akciğer kanseri gibi).

- 2) **Palyasyon Amaçlı:** Buradaki amaç; hastanın uzun süre yaşaması için herhangi bir umut bulunmaz ancak hastalığa ait semptomlar hastanın yaşantısının kalitesini düşürmekte ise; hastanın kalan yaşam süresini mümkün olan en az semptomla geçirmesini sağlayarak hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır.

Küratif tedavi uygulamaları esnasında bazı yan etkiler ile karşılaşılması kaçınılmazdır. Fakat palyasyon amaçlı uygulamalarda hiçbir iyatrojenik durumun gelişmemesi hedeflenmektedir. Ancak bazı durumlarda primer tümör palyasyonu uygulamaları esnasında; tümörün gelişimini kontrol altına alarak semptomları ortadan kaldırmak amacıyla küratif dozun %75-80'i kadar yüksek dozlara ulaşabilmektedir. Bu nedenle de palyasyon amaçlı dahi olsa istenilmeyen yan etkiler görülebilmektedir. Küratif amaçlı tedavi uygulamalarında ki en önemli durum; hedeflenen tümör kitlesini çevreleyen sağlıklı dokulara en az zarar vermektir (1).

Radyoterapi uygulaması planlanırken aşağıdaki basamakların takip edilmesi gerekmektedir.

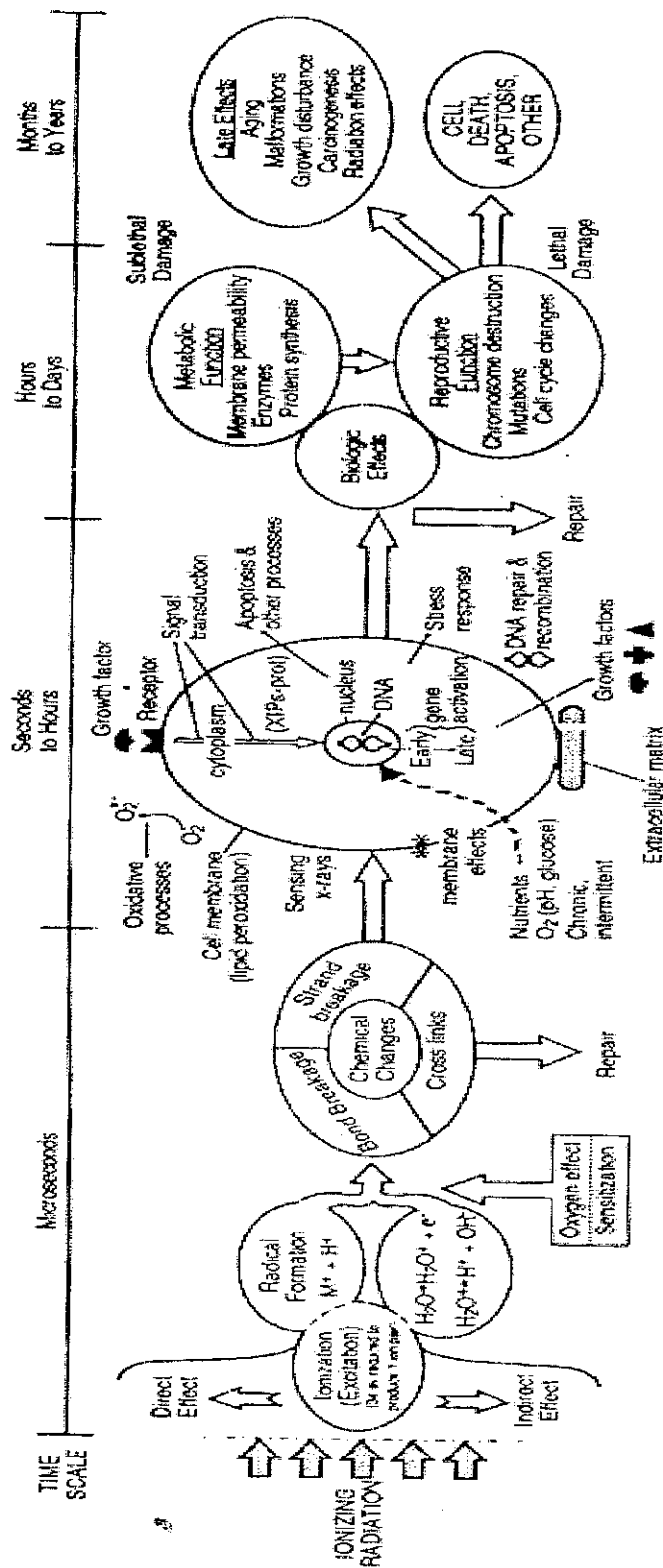
- 1) Mümkün olan her metot (radyografik, radyoizotop vs) kullanılarak tümörün evrelendirilmesi
- 2) Hastalığın patolojik karakterleri (potansiyel yayılım bölgeleri vs) ile ilgili bilgi sahibi olunması
- 3) Amaçlanan tedavinin tanımlanması (küratif veya palyasyon amaçlı)
- 4) Amaçlanan tedavi metodunun tanımlanması (tek başına radyoterapi uygulaması veya cerrahi ve kemoterapi ile kombine edilmesi).
- 5) Optimal radyasyon dozunun ve tedavisi planlanan tümör hacminin tanımlanması. Bu tanımlama tümörün anatomik yerleşimine, histolojik tipine, evresine, potansiyel çevresel lenf bezi tutulumuna, diğer karakteristik tümör özelliklerine ve tümörün bulunduğu anatomik bölgenin doku yapısına bağlıdır.
- 6) Hastanın genel durumunun, tedaviye olan toleransının, tümörün tedaviye yanıtının ve çevresel normal dokunun gözden geçirilmesi.

2.2.3. Radyobiolojinin Moleküler ve Hücresel Yönleri

1. DNA hasarı ve hücre ölümü

Radyasyonun hücelere nasıl zarar verdiği tam olarak bilinmemektedir. Kemik iliği gibi mitotik açıdan çok aktif olan organların radyasyona duyarlı olmaları radyasyonun etkilerinin DNA üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Radyasyona maruz kalma sonucunda ortaya çıkan genetik bozukluklar nükleer hasarı gösteren çalışmalar ile belirtilmektedir. Radyasyonun oluşturduğu DNA hasarının radyasyonun neden olduğu hücre ölümünün primer basamağı olduğu kabul edilmektedir. Çift sarmallı DNA kırıkları, mikronukleus oluşumu ve kromozom bozukluklarının beraber hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte DNA dışındaki hücresel komponentler de iyonize radyasyon tarafından hasara uğrar ve hücresel yanıtların ortaya çıkmasına veya hücre zarı, mikrotübül gibi komponentlere zarar verildiğinde sitotoksositeye neden olur.

X ışınları hücreyi oluşturan moleküllerden elektronların yayılmasına neden olarak uygulandıkları dokuya enerjilerini aktarırlar. Bu moleküller genellikle H_2O 'dür. X ışınları hücrelerdeki bazı ölümcül etkilerini DNA üzerine direkt etki göstererek etrafa elektron saçılması ile gösterir. Fakat asıl hücre ölümüne neden olan etkileri indirekt olarak meydana gelir. Hücre içindeki H_2O molekülünün iyonize olması sonrasında ortaya çıkan $(OH)^\cdot$ radikallerinin DNA'ya verdiği hasar ile indirekt etkiler oluşur. $(OH)^\cdot$ radikalleri yarı çapı 100 \AA olan bir alanda etkilerini gösterirler. DNA'da meydana gelen hasarın büyük bir kısmı tamir edilebilmesine rağmen iyonize radyasyonun neden olduğu hücre ölümü oldukça fazladır. Bu yüksek ölüm oranının en önemli nedeni DNA'da meydana gelen oldukça geniş hasar bölgelerinin bulunmasıdır. Üreme kapasitesinin en az hasar görmesi için en az genetik hasarın oluşması gerekmektedir. Oksijen veya nitroimidazol gibi elektronlara afinitesi olan moleküllerin varlığında serbest radikallerin biyolojik etkinliği uzayabilir. Bunun tam tersi olarak nukleus veya dimetilsülfoksit ve sistein gibi dışardan verilebilecek maddelerde bol miktarda bulunan sülfidril molekülleri serbest radikallerin etkinliğini azaltır (1,6)



Şekil 2.1. Radyasyonun zamana bağlı hücrelerde yarattığı değişiklikler (1).

Radyasyonun neden olduğu kromozom bozuklukları sadece radyasyona maruz kalan hücrelerde değil bu hücrelerin yakınlarında bulunan hücrelerde de gözlemlenmiştir. Radyasyona maruz kalan hücreler p53'e bağlı olarak *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda tümörün büyümesini inhibe edici moleküller salgılayabilirler (22). İyonize radyasyonun *bystander* etkiye neden olduğu düşünülmektedir. *Bystander* etki radyasyona maruz kalan hücrelerin, maruz kalmayan hücelere sinyal göndermesidir. Bir çok reaktif oksijen radikalinin buna neden olduğu gösterilmiş olmasına rağmen *bystander* etkinin gerçek mekanizması tam olarak netlik kazanmamıştır (23). Radyasyonun bu hedef gözetmeyen etkilerinin radyasyonun neden olduğu DNA hasarı ve malinitelerin radyasyona bağlı oluşum mekanizmalarına açıklık getirebileceği belirtilmektedir.

Malinitelerden özellikle; myeloid lösemi radyasyona maruz kalma sonucunda ortaya çıkan en önemli sağlık sorunudur. Hematopoetik kök hücre hasarlarının maliniteye neden oldukları deneysel gözlemler sonucunda ortaya koyulmuştur. Radyasyon uygulanmasından sonra radyasyona maruz kalmayan kök hücrelerin ratlara transplantasyonu sonucunda bile lösemik transformasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu bulgular radyasyon sonrasında mikro çevrenin özelliklerinin bozulduğunu göstermektedir. Radyasyona maruz kalan hematopoetik stroma hücreleri; mutajenik reaktif oksijen radikalleri, birçok değişik yapıda adezyon molekülleri ve büyüme faktörleri salgırlar. Salgılanan bu maddeler kemik iliğinde radyasyona maruz kalmamış kök hücrelerin büyümesini engeller ve fenotipik karakterlerinin bozulmasına neden olur (24).

2. Apoptozis ve hücre nekrozu

Radyasyona bağlı olarak ortaya çıkan hücrelerin ölümü mitotik hücre ölümüne bağlı olarak ortaya çıkabilirler. Burada hücreler ölmeden önce radyasyon dozunun büyüklüğüne bağlı olarak bir veya daha fazla mitotik bölünmeye uğrarlar. Bununla birlikte bazı hücreler (örneğin; lenfositler, spermatogonialar, tükrük bezi epitel hücresi, tiroid hücreleri, oligodendrositler) oldukça az miktardaki radyasyona maruz kalma sonucunda bile hücre siklusu G_0/G_1 fazlarında interfaz ölümüne gidebilir. İnterfaz ve mitotik ölüme giden hücreler apoptozis yolu ile ölürler.

Apoptozis hücre içindeki genetik programın tetiklenmesi sonucunda ortaya çıkan aktif bir ölüm olayıdır. Radyasyon dışındaki bazı ajanlarda apoptoze neden olabilir. Bunlar arasında kemoterapik ajanlar, hipertermi, oksidatif stress, hormonların ve büyüme faktörlerinin kullanımının kesilmesi veya sitotoksik sitokinler (TNF ailesinin üyeleri) bulunur (1). Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Biyolojik bilimler literatüründe apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptozis veya, daha genel anlamda söylemek gerekirse, hücre ölümü uzun süre araştırmacıların çok ilgilenmedikleri bir alan olarak kalmıştır. Fakat apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku "turnover"ında ve immün sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır. Üstelik, oto immün bozuklukların, AIDS'in, Alzheimer hastalığının da dahil olduğu bazı major nörodejeneratif bozuklukların ve hatta malignitelerin dahil olduğu daha birçok patolojik durumlarda da rol aldığı anlaşılmıştır.

Apoptozis aynı zamanda programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinir. Her hücre doğar, belli bir süre (hücre tipine göre günlerden yıllara kadar değişen bir süre) yaşar ve sonra ölür. Bu durum fizyolojik olarak her saniye yaklaşık bir milyon hücremizin ölmesiyle bir ömür boyu sürer. Buradaki ölüm mekanizması apoptozistir. Apoptozisi programlanmış hücre ölümü olarak ifade etmek üzerinde tartışılan bir konu olmasına rağmen sıkça kullanılan bir yaklaşımdır. Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Apoptozis normal hücre "turnover"ında rol alan bir hücre ölüm şekli olduğundan lenfositlerin timusdaki klonal seleksiyonunda ve inflamatuvar reaksiyon sonrasında ortamdaki uzaklaştırılmasında, embriyonik gelişim esnasında, deride keratinositlerin yüzeye doğru göç edip epidermisin en üstteki tabakası olan stratum korneum'u oluşturmalarında, barsak kriptlerindeki epitel hücrelerinin "turnover"ında, menstruasyon esnasında uterus duvarında

gerçekleşen epitel doku dökülmesinde ve gözde lensin oluşumunda gözlenebilir. Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Ve yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde katkıda bulunur. Örneğin, apoptozis bazı viral enfeksiyonlarda (Epstein-Barr, insan papillom virüsü) baskılanabildiğinden, kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Ayrıca, oto-reaktif lenfositlerin ortamdaki apoptozisle uzaklaştırılmaması veya geç uzaklaştırılmaları sonucu otoimmün bozukluklar oluşabilmektedir. Oysa, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda veya AIDS'de apoptozisin aktive olmasıyla artmış hücre kayıpları (nöron, T lenfositler) gerçekleşmektedir.

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanse olur. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cecekler oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere "apoptotik bodies" parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde hücre içeriği dış ortama salıverildiğinden inflamasyon reaksiyonu uyarılır ama apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının "ladder pattern" ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo baz çifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik

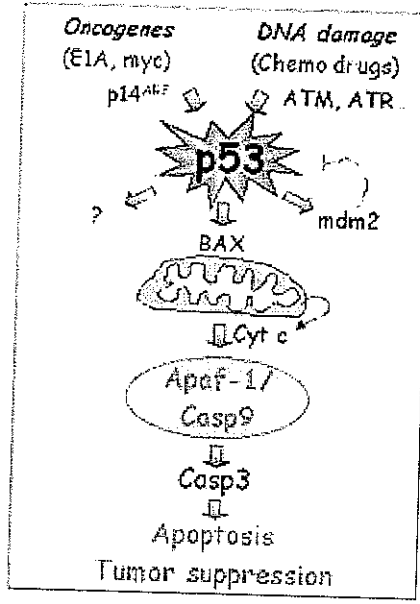
hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır "phosphatidylserine translocation". Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (25).

3. Kanser ve Apoptozis İlişkisi

Yakın zamana kadar, hücrelerin mitotik kapasitesinde artma ve diferansiyasyon bozukluğu (eksikliği) tümör gelişiminden sorumlu iki mekanizma olarak kabul görmüştür. Son yıllarda, hücrelerdeki doğal olarak gelişen apoptozisin bozulmasının da tümör gelişiminde son derece önemli olduğu anlaşılmıştır. Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında bilim dünyasına kazandırılan apoptozis programlanmış hücre ölümü olarak bilinmektedir. Ökaryotik organizmadaki her hücre doğar, belli bir süre yaşar ve ölür. Burada sözü edilen hücre ölümü apoptozis olarak adlandırılır ve klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten tamamen farklıdır. Yaşam süresi hücreden hücreye farklılık gösterir. İnce barsakta her yeni oluşan epitel hücresi 3-5 günde ölürken, derinin epidermisindeki hücrelerde bu süre 20-25 güne kadar uzayabilir. Nöronlarda ise gelişimin erken evresindeki nöron ölümleri sayılmaz ise bu süre bir insan ömrü süresine kadar uzayabilir.

Apoptozis, insan organizmasında hem fizyolojik (örn embriyogenez), hem de patolojik (örn dejeneratif hastalıklar, otoimmün bozukluklar, kanser gibi) durumlarda rol alır. Apoptozis bu hastalıkların bazılarında (örn nörodejeneratif hastalıklar) hızlanmışken, bazılarında ise (örn otoimmün hastalıklar veya kanser) yavaşlamıştır. Tümünde olmasa bile çoğu kanserlerde apoptozise yol açan çeşitli mekanizmalara karşı bir direnç gelişir. Böylece tümör hücreleri apoptozisten kurtulurlar. Bu direnç birçok yolla gerçekleşebilir. 1. Anormal olarak uzamış hücre ömrüne neden olan bozuk proto-onkogenlerin (örn bcl-2) sürekli etkisi, 2. Gerekğinde hücre ölümünü (apoptozisi) sağlayan tümör baskılayıcı proteinlerin (örn p53) inaktivasyonu sonucu direnç oluşabilir (şekil 2.2).

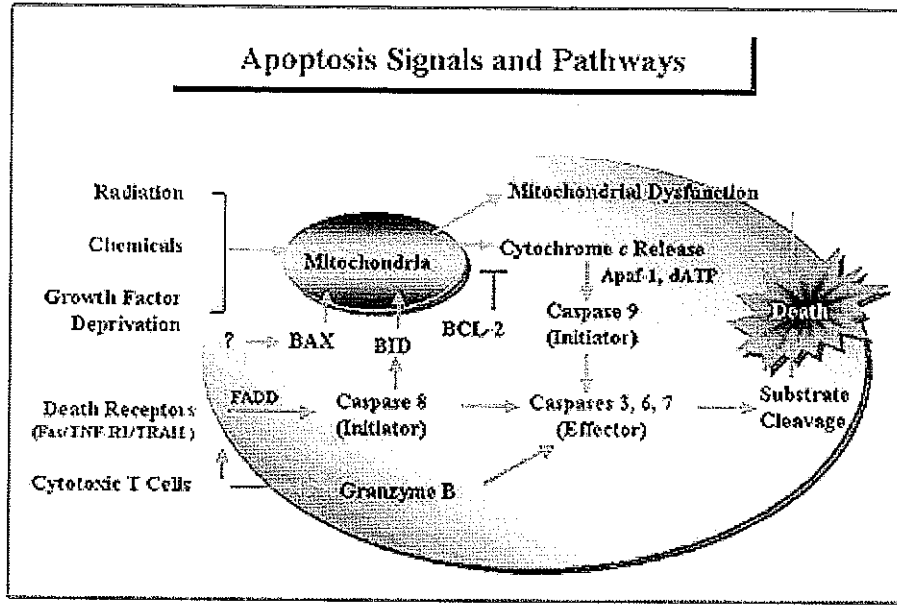
**p53/Apaf-1/casp9
pathway in
transformed cells**



Şekil 2.2. Tümör süpresyonunda apoptozisin rolü (26).

Ayrıca Fas ve Fas Ligand (Fas-L) interaksiyonları, 'Decoy' reseptörlerinin varlığı, azalmış bax ekspresyonu, FLIP aşırı ekspresyonu, kaspaz inhibitörlerinin aşırı ekspresyonları (ciAP2, Survivin), telomeraz aktivitesinin devam etmesi kanserlerde oluşan direnç mekanizmaları arasında bulunmaktadır DNA hasarı oluşan hücrelerin apoptoze gitmesi organizmayı kanser gelişiminden koruyan fizyolojik bir mekanizmadır. Apoptozisi bloke etmekle birlikte kanser hücreleri ayrıca anti-apoptotik yolları da aşırı etkin hale getirebilirler Apoptozis sinyali ve hücre içi iletimi şekil 2.3.'te gösterilmiştir.

Apoptozisin ayrıca çeşitli kemoterapötik ajanların (anti-kanser ilaçlar) sitotoksik etkilerinin mekanizmasında da rol aldığı belirtilmiştir. Bu yüzden, bu ilaçlar veya hücreye zararlı herhangi bir etki tarafından hücre ölümünün nasıl başlatıldığına anlaşılması, klinik bir problem olan ilaç direncinin nasıl kırabileceğine dair bir yaklaşım sunmaktadır (27).



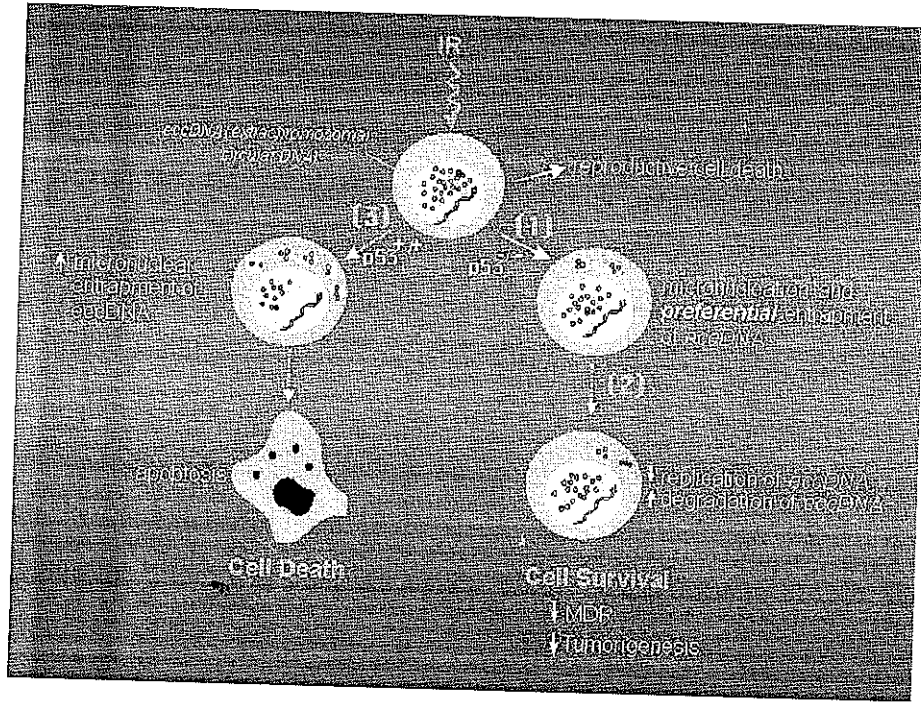
Şekil 2.3. Apoptozis sinyali ve hücre içi iletimi (26)

4. Apoptozis ve Radyoterapi

Radyasyona bağlı olarak ortaya çıkan hücre ölümünün mekanizması farklı hücre tipleri arasında değişiklik gösterir. Bu farklılığın önemli tedavi edici etkileri olabilmektedir. Deney hayvanlarında yapılan araştırmalarda bazı spontan apoptotik hücre içeren tümörlerin radyoterapi sonrası yüksek apoptozis indeksi gösterdiği saptanmıştır. Bu tür tümörler daha radyosensitif olarak tanımlanırlar. Benzer şekilde spontan apoptozis gösteren insan tümörlerinde radyoterapi ve kemoterapi ile daha kolay kontrol altına alındığı gösterilmiştir. Farklı hücrelerin radyasyon uygulanması sonrası ortaya çıkan apoptozise eğilimleri değişiktir (28). Herhangi bir dokuda pozisyonel ve hücre tipine bağlı yaşam süresi farklılıkları ortaya çıkabilir. Örneğin farelerde ince barsaklarda ortaya çıkan spontan ve radyasyona bağlı oluşan apoptozis kriptin tabanındaki hücrelerde maksimum olduğu bulunmuştur. Bu bölge kök hücrelerin bulunduğu yerdir. Bunun tam tersi olarak apoptozis kolonda belirgin olarak görülmez ve görülen apoptozisde kök hücre bölgesinde değildir. Timusdaki gelişme aşamasındaki T lenfositleri apoptozis ve eliminasyona uğrarlar. Bu aşamadaki hücreler radyasyon sonrası ortaya çıkan apoptozise maruz kalırlar. Parotid bezinin irradiasyonu sonucu 24 saat sonra ortaya çıkan parotitis seröz hücrelerin ölümünü gösterir. Mukozal

hücrelerde böyle bir ölüm bulunmadığı için ağız kuru ve tükürük çok daha viskos yapıdadır.

Apoptozisin moleküler temeli üzerine yapılan çalışmalarda apoptozisi arttıran (p53, IRF-1, bax, cmyc) veya apoptozisi baskılayan (bcl-2) genleri tanımlanmıştır. Proapoptotik ve antiapoptotik faktörler arasındaki denge dış çevreden gelen sinyaller ve hücrenin kendi programı tarafından belirlenir. Örneğin; irradiye edilen ince barsaktaki mürin hücrelerinin apoptotik pozisyonu ile p53 geni arasında bir ilişki bulunurken bcl-2 geni arasında bu ilişki bulunmamaktadır. Diğer taraftan bcl-2 kolondaki kök hücrelerin bulunduğu bölgede vardır, bu nedenle de bu bölgede radyasyona bağlı olarak apoptozis görülmez. Apoptozis ile ilgili mekanizmalarda anahtar rolü oynayan maddelerin protoonkogen ve tümör supressör genlerinin ürünleridir. Protoonkogen ve tümör supressör genlerin mutasyona uğramaları veya anormal üretilmeleri sonucu kanser meydana gelmektedir. Örneğin bcl-2 üretiminin artması veya p53 geninin üretiminin azalması apoptozisi baskılayarak tümör gelişimini hızlandırır (Şekil 2.4). Benzer mekanizmalarla onkogenler ve mutasyona uğramış tümör supressör genleri intrensik hücrel radyasyon sensitivitesini etkileyebilir (29).



Şekil 2.4. Radyoterapiye bağlı gelişen apoptozisde p53 geninin rolü (26).

2.2.4. Normal Dokularda Radyasyon Hasarının Patobiyolojisi ve Kinetiği

Radyasyonun normal dokular üzerindeki etkilerinin çoğu hücre ölümü ile ilgilidir. Ancak bazı etkileri hücre ölümüne neden olmaz (örneğin; üst abdominal bölgenin radyoterapisi sonrası birkaç saat içerisinde ortaya çıkan bulantı ve kusma). Radyasyona bağlı akut inflamasyon ve vasküler kaçağın neden olduğu akut ödem veya eritem, yüksek doz radyasyon alan hastalarda görülen yorgunluk, kranial irradyasyon sonrası birkaç saat içerisinde görülen uykuya eğilim hali bu yan etkiler arasında sayılabilir. Bunlar büyük olasılıkla radyasyona bağlı ortaya çıkan sitokinler tarafından oluşturulan etkilerdir. Ayrıca radyasyonun neden olduğu bir takım proliferatif yanıklar, gliosis ve fibrosiz gibi hücre ölümü ile ilgisi olmayan geç etkilerdir. Klinik dozdaki radyasyon verildikten sonra mitotik bölünme sırasındaki hücre ölümü bir veya birkaç uygulama sonrasında gerçekleşir (30,31) Normal doku hasarı etkilenen dokunun hücresel döngü zamanına ve kinetiğine göre değişir. Böylece ortaya akut, subakut ve geç dönem normal doku etkileri meydana gelir.

1) Akut Etkiler

Radyasyon tedavisine bağlı olarak akut yanıtlar hücresel döngünün çok hızlı olduğu gastrointestinal mukoza, kemik iliği, cilt, orofaringial ve özefagial mukozada meydana gelir. Bu tür dokulardaki hücresel popülasyon yapısal olarak bir hiyerarşi içindedir. Bu dokularda yavaş üreyen kök hücreler vardır ve bu kök hücrelerden üreme kapasitesi çok yüksek olan progenitör hücreler, matür, nonproliferatif, fonksiyonel hücreleri üretir. Radyasyon bu kök hücre ve progenitör hücre popülasyonlarını yok eder. Organ fonksiyonu ise; differansiye hücreler tam olarak yok oluncaya kadar devam eder. Radyasyonun etkilerinin azalması ile çoğalma olanağı bulan kök ve progenitör hücrelerin sayıca artışına kadar organ fonksiyonlarını yapamaz. Böylece radyasyonun hasarı verilen doza, kök ve progenitör hücrelerin gördüğü zarara bağlı olarak değişir. Proliferasyon gösteren hücre sayısı genellikle kritik değerlerin altına düşmediğinden semptomlar geçici ve düzelme tamdır. Radyoterapi uygulanmasının fraksinasyon şeklinde yapılması ile akut etkiler ciddi boyutlarda görülmez. Çünkü sağlam hücrelerin rejenerasyonu için gerekli süre sağlanmış olur (32).

Akut yanıtın gelişim hızı hücrel radyosensitivitenin güvenilir bir indikatörü değildir. Örneğin; hematopoez ele alındığında kemik iliği radyoterapisi sonrasında ilk önce hızlı turnover hızına sahip olduklarından dolayı lökosit ve trombosit sayıları azalır. Eritrositlerin yaşam turnoverı yavaş olduğu için anemi başlangıçta görülmez. Benzer şekilde testisler incelendiğinde; her spermatogonik kök hücrenin bölünmesi spermatogonia ve spermatozoid gibi evreleri tamamlayarak yaklaşık 1000 tane sperm üretimi ile sonuçlanır. Farklılaşmanın erken evresindeki spermatogonialar aşırı radyosensitifdir. Bu nedenle spermatogonialar spermatogenezin diğer evrelerindeki hücreler üzerinde çok az etkisi olan radyasyon tarafından hızlı bir şekilde öldürülürler. Böylece radyasyon ile karşılaştıktan haftalar sonrasında sperm sayıları hala normaldir. Sperm sayısı ancak radyasyona maruz kalan spermatogonialar seminal veziküllere ulaştığı zaman bir düşüş gösterir. İnce barsakların mukozasındaki mitotik aktivite kriptler de görülür. Villusları örten hücreler nonproliferatif hücrelerdir. Kript hücreleri çok hızlı bölünürler ve böylece radyasyona bağlı ölümleri de çok hızlı olur. Villuslar ise radyasyona maruz kaldıktan sonra erken evrede herhangi bir değişiklik göstermezler. Ancak villusları kaplayan farklılaşmamış hücrelerin programlı olarak kaybı sonrasında eğer arkadan yenileri oluşmuyor ise; villuslarda kısılma olur (1).

2) Subakut Etkiler

Bazı dokular radyasyondan aylar sonra bile subakut yanıtları verebilirler. Bu dokulardaki hücre popülasyonunun uzun bir turnoverı olduğunu gösterir. Semptomlar genellikle geri dönüşümlüdür. Ancak bazı durumlarda çok ciddi hasarlara hatta ölüme bile neden olabilir. Örnekler arasında; Spinal kordun radyasyonu sonrasında gelişen Lhermitte sendromu, beyin radyoterapisi sonrası görülen uykuya eğilim, akciğere radyasyon uygulanmasından sonra görülen radyasyon pnömonisidir.

3) Geç Etkiler

Radyasyonun geç etkileri yavaş çoğalan hedef hücrelerin ölmeleri sonucu meydana gelir. Bu etkilerde radyasyon bağlı olarak oluşan hücre ölümünün hızı da

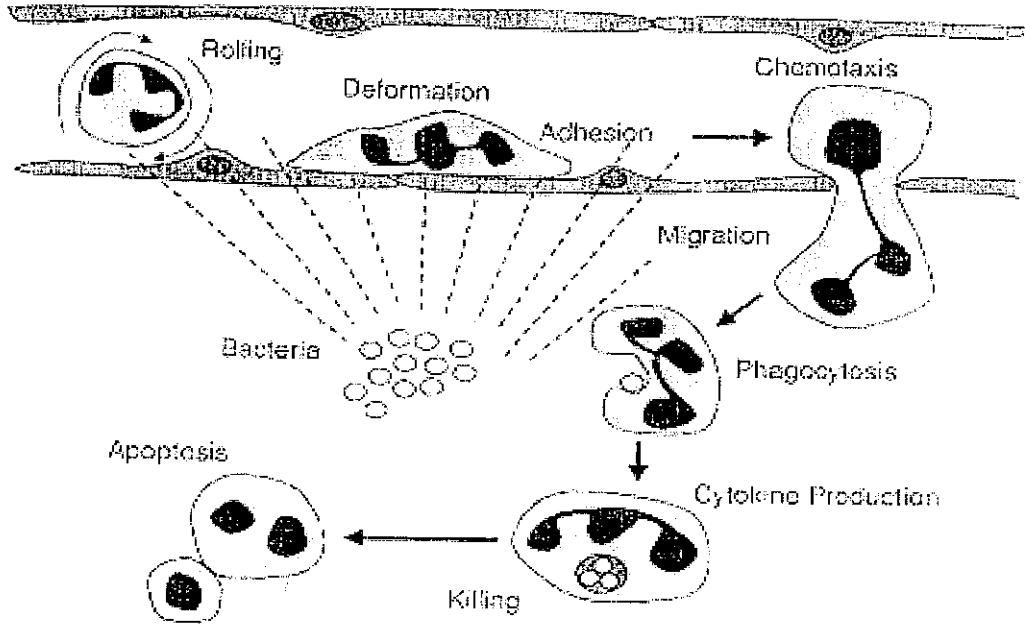
yavaştır. Örneğin; santral (oligodendroglia) veya periferal (shwann hücresi) sinir dokusu, böbrek (tübül epiteli), kan damarları (endotel epiteli), dermis (fibroblast) ve kemik (osteoblast ve kondroblast) bu etkilerin ortaya çıktığı dokular arasında sayılabilir. Beyin irradiasyonu sonrasında görülen geç myelinizasyon oligodendrositlerin ve nöronların kaybına bağlı olarak meydana gelir (33). Farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimler doku patogeneğinde ve dokunun iyileşmesinde önemli rol oynayabilirler. Geç etkilerin en önemli özelliği iyileşme sonrasında ortaya çıkmaktadır. Kalıcı hasarın büyüklüğü uygulanan radyasyon dozuna ve oluşan geç etkinin radyoterapi uygulamasından sonra geçen zamana bağlıdır. Eğer ciddi hasar erken gelişir ise; düzelme sınırlı olarak gerçekleşir. Bu tür geç etkiler erken evrede ortaya çıkan hasara bağlı olarak meydana gelen komplikasyonlardan (Örneğin; Kalın barsağın mukozal ülserasyonu sonrasında oluşan stenoz vs) ayrı tutulur (34).

2.2.5. Bölgesel Fraksiyone External Radyoterapi Uygulamasının Periferal Kan Değerlerine Etkisi

İyonize radyasyon uygulaması hematopoetik sistem üzerinde baskılayıcı etkiye sahiptir. Kemik iliğinin baskılanması radyasyon uygulamasının en önemli akut toksik etkisidir. Bundan dolayı klinikte terapötik radyoterapi uygulamalarında kemik iliği rezervi önem taşımaktadır. Bir çok deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda total vücut radyoterapi uygulamasının lökosit, eritrosit ve trombosit değerlerinde belirgin azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Radyoterapinin bu etkileri; uygulanan doza, tedavi edilen yere, tedavi uygulanan alanın yüz ölçümü, tedavi öncesi kan değerlerine, kanserin evresine ve alınan diğer ek tedavilere bağlıdır. Radyoterapi uygulanması sonrasında lökosit sayısında özellikle lenfosit sayısında azalmanın olduğu belirtilmektedir. Zachariah ve arkadaşları (2) hastalığın yerleşim yerinin başlangıç lökosit sayısına etki eden bir faktör olduğunu bildirmişlerdir. Fakat radyoterapi uygulaması başladıktan sonra hastalığın yerleşim yeri ile lökosit sayısı arasında bir ilişki olmadığı belirtilmektedir. Eş zamanlı eritrosit sayısındaki baskılanma daha azdır ayrıca devam eden eritropoez azalan sayıyı sürekli kompanse eder. Lokalize parsiyel radyoterapi uygulanmasında aneminin önemli bir sorun teşkil etmediği Yang ve

2.3. Nötrofiller

Lökositler vücudun en önemli savunma hücreleridir. Bu hücreler diapedes, kemotaksis ve fagositoz özellikleri ile organlara girerek, enfeksiyon etkenini yok ederler. Diapedes; hücrenin amip benzeri hareketlerle kapiller damarlardan dışarıya çıkabilmesidir. Kemotaksis; lökositlerin kimyasal ajanlara yönelme özelliğidir. Fagositoz olayı ise; hücrelerin yabancı yapıları bir vezikül içinde hücreye alınarak yok etmesidir (Şekil 2.5.) Vücutta enfeksiyöz etkenlere ilk olarak nötrofiller yanıt verir. Nötrofiller dolaşım sisteminde 6-12 saat yaşayabilen hücrelerdir. Kandaki sayılarının sabit tutulabilmesi için günde ortalama 100 milyon nötrofil yapımı gereklidir. Damar sisteminde endotel hücrelere adezyon yaparak kapiller duvarı geçerler. Opsoninleşmiş bir yapının nötrofiller tarafından tanınması, adezyonu ve fagositozu, membranlarında bulunan çeşitli reseptörlerle sağlanabilir (3).



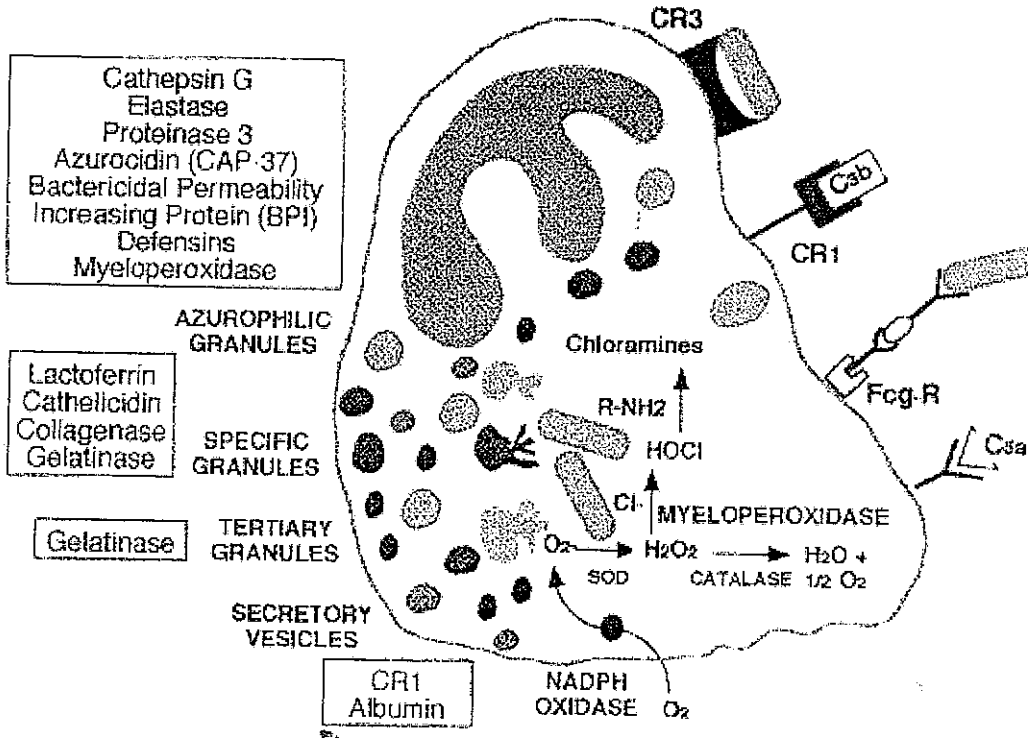
Şekil 2.5. Bakteriyal enfeksiyonlarına karşı nötrofillerin fonksiyonel cevapları (36)

Nötrofil membran reseptörleri arasında; IgG₁, IgG₃ gibi antikorlara özgü yapılar, C₃b ve C₅ komponentleri gibi kemotaksik ajanlar, lökotrienler gibi polipeptid yapılara özgü reseptör çeşitleri sayılabilir. Bunların dışında β adrenerjik reseptörler, trombositleri aktive edici yapılar, interlökin I, tümör nekroz edici faktörlere özgü farklı reseptörler bulunur. Nötrofil membranlarında bulunan insülin reseptörlerinin, hücrenin büyüme ve gelişmesinde önemli olduğu belirlenmiştir. Membranlarda ayrıca kortizol, adrenalin, tiroid hormonları gibi çeşitli hormon reseptörleri de saptanmıştır. Belirtilenler hücreyi çevresel faktörlere göre düzenleyen aracı yapılardır. Reseptörün uyarılması, hücre içinde belirgin enzim sistemlerinin aktive olmasını ve hücrenel cevabı sağlar. Nötrofil membranında saptanan başlıca enzimler Na-K ATP'az enzimi (membran potansiyellerinin korunmasında etkili), Ca-Mg ATP'az enzimi (Ca⁺²'nin hücreden çıkarılmasını ve intrasellüler konsantrasyonunun sabit tutulmasını sağlar)'dir. Membranda yer alan Ca⁺² kanalları ise hücreye Ca⁺² girişini sağlayan bölgelerdir. Bu kanalların açılması ile hücreye giren Ca⁺², kontraktıl proteinlerin kısılmasını, eksositoz ve lizozomal enzimlerin salgılanmasını kolaylaştırır. Mikrobial ajanların ortadan kaldırılmasında etkili enzimler; sitokromlar gibi oksidasyon enzimleri, peroksidazlar gibi antioksidan enzimler nötrofillerin hücre membranlarında ve spesifik granül membranlarında yer alırlar. Enfeksiyon süresince bu enzimlerin kullanımı artar. Bu nedenle membranlarda glikoproteinlerin azaldığı veya kaybolduğu gözlenir. Bu olayın nötrofile adezyon özelliği kazandırdığı ileri sürülmektedir. Membranda mevcut fosfolipid molekülleri arasında araşidonik aside sıklıkla rastlanılabilir. Araşidonik asit fagositoz ve immün yanıtta önemli görevi olan bazı yapıların oluşumunda gereklidir (37,38)

Nötrofil hücresinin sitoplazmasında çeşitli enzimleri içeren granüller bulunur. Bu yapılar; Azürofilik ve Spesifik granüller olarak sınıflandırılırlar. Azürofilik granüllerde bulunan enzimler; asid hidrolaz, lizozimler, myeloperoksidaz, bakteri öldürücü enzimler olarak gruplandırılırlar. Spesifik granüllerde ise; lizozimler, apolaktoferrin, kollegenaz, kobalamin bağlayıcı proteinler, C_{5a} komplementini yıkan enzimler, plazminojen aktivatörleri bulunur.

Demir moleküllerini bağlayan, apolaktoferrin ve kobalamin bağlayan proteinler, bakterilerin çoğalmasını engelleyebilen yapılardır. Ortamdaki serbest

demirin yüksek konsantrasyonda bulunması hücrelerde mitozu kolaylaştıran bir etkidir. Bu nedenle böyle bir ortamda bakterilerin üremesi de hızlanır. Serbest demirin proteine bağlanması ile ortamda azalması, bakterilerin üreme ortamını elverişsiz hale getirir. Apolaktoferrin molekülü, ferritin moleküllerine benzer şekilde demirle doymuş duruma geldiğinde laktoferrin adını alır. Laktoferrin salgılanması, hücrede membran negatifliğinin azalmasına neden olur ve adezyon kolaylaşır. Laktoferrin salgılanması ile ayrıca hücrede, oksijen metabolizmasının hızlandığı ve $(OH)^-$ radikallerinin arttığı gözlenir. Laktoferrin nötrofillerin fizyolojik fonksiyonlarını hızlandıran bir protein molekülüdür. Nötrofiller fizyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmek için fazla enerji harcarlar. Bu nedenle, glukoz kullanımı ve O_2 tüketimi yüksektir. Örneğin; sitoplazma granüllerinde bulunan lizozomal enzimlerin fagozoma verilmesi sırasında, hücreye O_2 girişinin hızlandığı, heksozmonofosfat şunt aktivitesinin arttığı, metabolizmanın hızlandığı, H_2O_2 ve O_2^- radikallerinin çoğaldığı saptanmıştır (şekil 2.6.) (37)



Şekil 2.6. Nötrofillerde inflamatuvar olaylara karşı gelişen efektör mekanizmalar (37)

2.3.1. Nötrofillerin Bakteri Öldürme Mekanizmaları

Nonoksidatif ve oksidatif mekanizmalar olmak üzere tanımlanır.

1. Nonoksidatif Mekanizma:

Lipaz, proteaz, glikosidaz gibi spesifik enzimler etkilidir. Katyon özelliğindeki enzim proteinleri bakteriyi etkisiz hale getirir. Fagositik aktiviteyi artırarak sindirilmesini sağlarlar. Sindirim sırasında fagozoma, azürofil granüllerdeki litik enzimler katılır. Ortamda asid ürünleri artar. Fagozom pH'sının düşmesi, bakteri sindirimini kolaylaştırır. Anaerobik ortamda etkili olabilen, yıkıcı proteaz enzimleri hücre membranlarının dış yüzünde ve granüllerde yer alırlar. Aşırı aktivasyonları çevre dokulara da zarar verebilir (37,39)

2. Oksidatif Mekanizma:

Uyarılmış bir nötrofil hücresinde, hücrenin kemotaktik faktörlere yönelmesi, bakterinin fagosite edilmesi, litik enzimlerin fagozoma bağlanması ve mikrobial ajanların sindirilmesi çok hızlı bir şekilde yapılır. Hücre çok aktiftir ve bu süreç içerisinde yüksek düzeyde O_2 tüketilir. O_2 metabolizmasının hızlanması ile hücrede ve fagozomlarda reaktif olan O_2 metabolitleri birikmeye başlar. O_2 metabolitleri; süperoksid anyon radikalleri (O_2^-), H_2O_2 , hidroksil radikalleri, hipoklorik asid ve singlet O_2 molekülleridir. Serbest O_2 metabolitlerinin hücrede birikimi veya hücreden dışarıya verilmesi toksik etkileri nedeniyle sakıncalıdır. Belirtilen ürünler, protein ve fosfolipitleri yıkıcı özelliğe sahiptir. Fagozomda bakteri öldürücü etkiyi artırırlar. Buldukları ortamda mikrobiyal yapıları etkisiz hale getirirler. Hücreden serbestleştiklerinde çevre dokuya zarar verirler. Bu nedenle hücrede, plazma ve granül membranlarına bir seri, redükta enzim molekülü yerleşmiştir. Bu enzimlerin görevleri oksijen metabolitlerini en zararsız şekle çevirmektir.

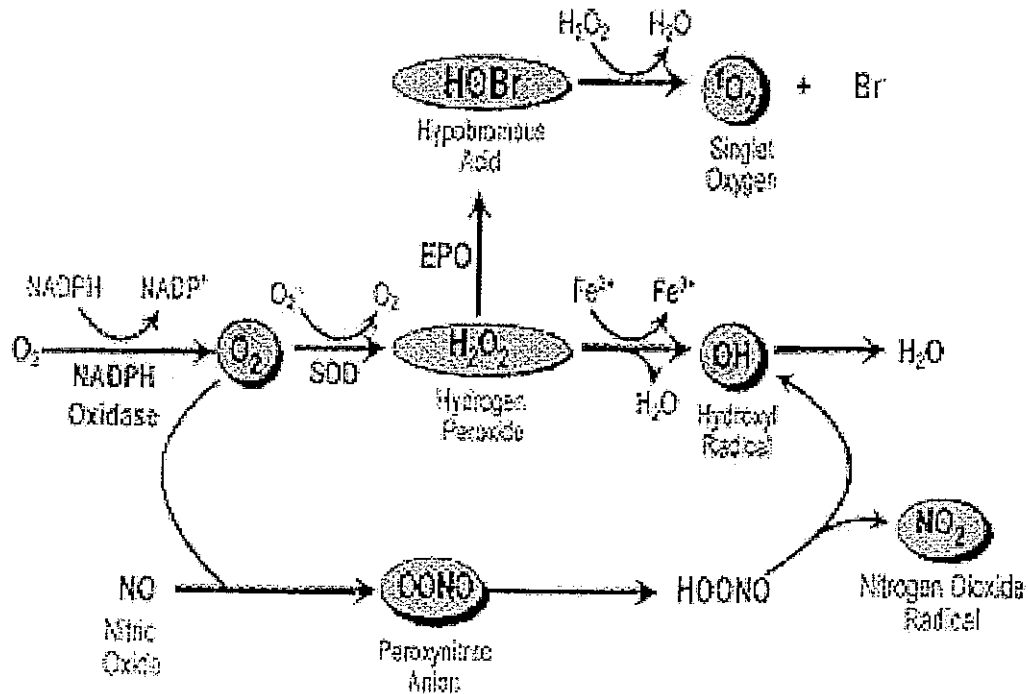
Aktive olmuş bir nötrofilde ilk oluşan O_2 metaboliti süper oksid anyon radikalidir. Molekülün oluşumu, nikotinamid adenin nükleotid fosfat (NADPH)'a bağlı oksidaz enzimlerinin aktivasyonu ile sağlanır. Sitozolde oluşan süperoksid anyonlar, hızlı hareketlilik yeteneği ile fagozom membranından içeriye girerek etkili olurlar. Fagozomdaki bakterileri öldürebilirler. Süperoksid anyonların

fagozom içinde litik etkileri, farklı yapılara dönüşüm sonucunda olabilir. (OH)⁻ radikali veya H₂O₂ moleküllerine çevildiğinde bakterilerin etkileşimi farklıdır. Fagozom içerisinde myeloperoksidaz enzimi ve halojenürler (bromür, klorür gibi) bulunuyorsa; H₂O₂ bakteriden salınan bazı proteolitik yapıları, özel bakteri öldürücü aldehidlere dönüştürerek etkili olur. Diğer yanda H₂O₂, (O₂⁻) süperoksit anyonlarla reaksiyona girerek hidroksil radikallerini oluşturabilir. Bu radikaller fagozom membranında lipid peroksidasyonuna uğrar ve bakteri öldürücü aldehidlere dönüşür. Her iki yol da , bakterinin yok edilmesinde etkilidir. Ancak fagozomda membran peroksidasyonu membrana zarar vereceği için O₂ metabolitleri hücreye yayılabilir. Fagozom çevresinde süperoksit anyonlar, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H₂O₂ 'ye dönüştürülür. Sitoplazmada artan H₂O₂ hücreye büyük zarar verebilir. Bu nedenle hızla katalize edilir. Katalaz enzimi H₂O₂'i yıkarak etkisiz hale getirir. H₂O₂'nin hücrede bir başka değişim şekli glutasyon peroksidaz enzimi ile etkileşerek H₂O molekülüne dönüşmektir. Belirtilen metabolitler arasında hidroksil radikalleri ve H₂O₂ bakterileri öldürücü etkilerinin yanısıra, hücreyi tahrip edici ve öldürücü etkileri de vardır. Nötrofillerin yıkımı sırasında açığa çıkan ürünler, oksidan ve antioksidan enzimlerin dengesine göre çevreye zarar verirler (şekil 2.7) (37,40,41)

2.3.2. Oksidan Metabolitler

NADPH oksidaz aktivitesinin hemen ortaya çıkan bir ürünü olan O₂⁻ süperoksit dismutaz tarafından hızla H₂O₂'ye dönüştürülür. Sonra H₂O₂ katalaz tarafından O₂ ve H₂O'ya çevrilir. Buna karşılık myeloperoksidaz H₂O₂'i hipoklorus aside (HOCl) dönüştürür. HOCl notrofillerin ürettiği en güçlü antioksidan maddedir. HOCl, içlerinde amino asitlerin, nükleotidlerin ve hemoproteinlerin de bulunduğu bir çok molekülü okside eder. Bakterilerin tahrip edilmesinin yanısıra HOCl sağlıklı dokularada zarar verir. HOCl α-1 antiproteinaz'ı hızla inaktive eder. α-1 antiproteinaz serin proteinazların en önemli inhibitörüdür. Ayrıca HOCl prokollegenaz ve progeletinazın da aktivasyonunda rol oynar. Çok sayıda antiinflamatuvar ilacın myeloperoksidaz'ı inhibe ettiği gösterilmiştir. İn vitro ortamda indometazin ve diğer nonsteroidal antiinflamatuvar ajanlar myeloperoksidazın klore edici etkisini inhibe ederek HOCl

üretimini baskırlar. Myeloperoksidazın görünen özelliklerinin bu kadar önemli olmasına rağmen eksikliği çok yaygın(1/2 000-4 000) ama klinik olarak benign seyirlidir. Myeloperoksidazı eksik olan nötrofillerin bakterileri öldürme hızları özellikle başlangıçta azdır. Ama birinci saatten sonra normale döner, bununla beraber invitro ortamda kandida ve aspergillusları öldürme yetenekleri azdır. Myeloperoksidaz eksikliğinin benign seyirli olmasının nedenlerinden biri ise; bakterilerin öldürmesi defektif olsa bile fagositoz sonrası oksidaza bağlı nötrofil apoptozisi normaldir ve bu durum makrofajlarca gerçekleştirilen klirensi normal hale getirir (37,38)

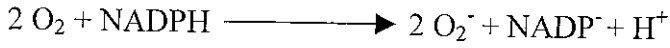


Şekil 2.7. Reaktif oksijen radikallerinin hücre içindeki metabolizması (42).

2.3.3. NADPH Oksidaz Sistemi

Oksidize halojen, okside edici radikaller ve singlet oksijen gibi bir grup yüksek derecede reaktif okside edici ajanı mikrobisidal etki amacıyla kullanmak savunma mekanizmasının belirgin özelliğidir (43) Bu reaktif oksidanların öncüsü immun sistemin profesyonel fagositler (nötrofil, eozinofil, mononükleer hücreler) ve B lenfositleri gibi hücreleri tarafından oluşturulan O_2^- 'dir (44). Bu reaktif oksidanların üretimi oksijen tüketiminde belirgin bir artışa yol açtığı için ortaya çıkan metabolik olaya solunumsal patlama, bu işlemin oluşumundan sorulu enzime de NADPH oksidaz adı verilir (40,45)

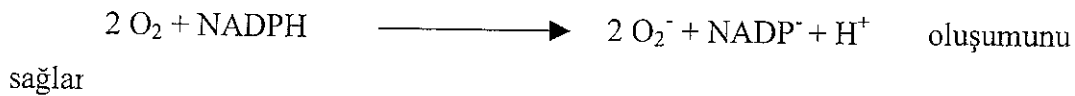
NADPH oksidaz NADPH'ı kullanarak bir elektronun indirgenmesi sonucu oksijenin O_2^- haline dönüşümünü sağlayan hücre zarında lokalize enzimdir (44).

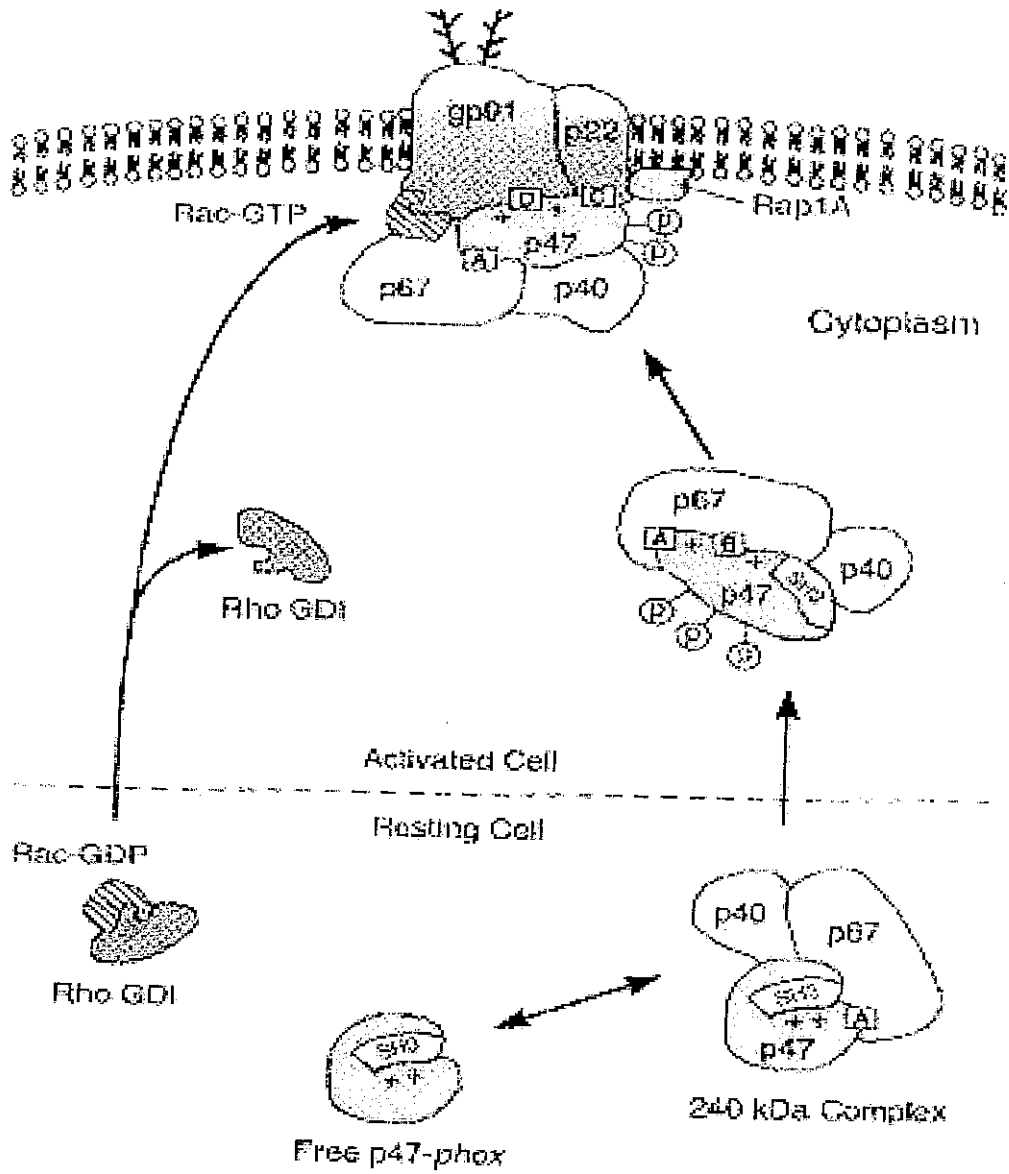


NADPH oksidaz enzimi istirahat halindeki hücrelerde aktif halde değildir. Hücre enzimi aktif hale geçirmek için gerekli olan uyarıcı ile karşılaştığı zaman enzim aktif hale geçer NADPH oksidazın altı komponenti bulunmaktadır.

- 1) p47^{phox}
- 2) p67^{phox}
- 3) p40^{phox}
- 4) rac-2
- 5) p22^{phox}
- 6) gp91^{phox}

Sitoplazmik komponentlerin membrana translokasyonu ve bunların sitokrom b₅₅₈ ile ilişkisi NADPH oksidaz kompleksini aktif hale getirir (şekil 2.8.). Sitokrom elektronları NADPH' dan O_2^- 'ye taşıyıcı ve;





Şekil 2.8. Nötrofillerde NADPH oksidaz sisteminin aktivasyonu (46).

Sitokrom b₅₅₈: Sitokrom b₅₅₈ Allison ve arkadaşları (47) tarafından NADPH oksidazın bir komponenti olarak tanımlanmıştır. Sitokrom b₅₅₈ infrared absorbansdaki piki nedeniyle bu adı almış olan membrana bağlı bir flavohemoproteindir. İstirahat halindeki nötrofillerde sitokromların %85'i plazma membranı ile birleşebilen spesifik granüller ve intrasellüler sekretuar veziküllerin membranında bulunurlar (44). Aktivasyon sonrasında bu organeller plazma membranı ile birleşirler ve sitokromu hücre yüzeyine transfer ederler. Geri kalan %15'i ise; plazma membranında lokalizedir (48). Sitokrom b₅₅₈, p22^{phox} ve

gp91^{phox}, un 1:1 kompleksidir ve sadece denaturasyon ile birbirlerinden ayrılırlar. Sitokrom iki tane hem rezidüsü ve bilinmeyen miktarda FAD⁴ içerir. Kompleksin dissosiasyonu hemleri parçalar ve aktiviteyi ortadan kaldırır.

gp91^{phox}: gp91^{phox} 570 aa, 3 adet transmembran heliks, 5 adet N-linked glikolizasyon bağlanma yeri ve oksidasyon aktivasyonu sırasında sitozolik komponentlerle reaksiyona giren C-terminali içeren bir polipeptittir (44). gp91^{phox}, un karboksi terminalinin bazı ferodoksin-NADP redüktazlar ile benzerliği olmasına rağmen diğer sitokromlar ile çok az benzerlik gösterir. gp91^{phox}, un eksikliği olan kronik granülomatöz hastalığında oldukça geniş bir yelpazeye sahip mutasyonlar gösterirler. Bu mutasyonların çoğu sitokrom kaybına yol açarken üç tanesi fonksiyonel olarak bozuk sitokrom oluşmasına yol açarlar. Bu üç mutasyondan biri olan D₅₀₀A oksidaz aktivasyonu için gerekli olan sitozolik membrana bağlı komponentler arası etkileşimi bozar. gp91^{phox}, un stabilitesi p22^{phox} 'un eş zamanlı varlığına bağlıdır. p22^{phox} eksikliği olan hücrelerde bol miktarda mRNA olmasına rağmen gp91^{phox}, un polipeptidi yoktur (49).

p22^{phox} : p22^{phox} membranın iki tarafında da komşuluk gösteren bir transmembran proteindir (44). Bu proteinin sıralanımı diğer sitokromlar ile çok az benzerlik gösterir. Sitokrom b₅₅₈'de bulunan hem'in ya 2 p22^{phox} molekülüne yada 1 p22^{phox} molekülü ve gp91^{phox} a ait bir histidin molekülüne bağlı olduğu düşünülür. p22^{phox} eksik hastalarda mutasyonların çoğu sitokrom kaybına yol açar. SH3 bağlanma bölgesine ait olan bir mutasyonda sitokrom b₅₅₈ vardır ama fonksiyon gösteremez.

P47^{phox}: p47^{phox} molekülü başka proteinlerle etkileşime yarayan iki SH3 domaini içeren 390 aa'lık bazik bir proteindir. Molekülün C-terminalini oluşturan 1/4'ü bir çok serin ve bazik aa içeren ve fosforilasyon özelliği gösteren bir yapıya sahiptir. p47^{phox} mRNA' sı ve protein ekspresyonu fagositik veya lenfositik seri hücrelerine özgüdür (50). p47^{phox} NADPH oksidazın fonksiyonu için hayati öneme sahiptir. Bu durum hem invitro hem de invivo (molekülün eksik olduğu insanlarda) gösterilmiştir. Esas rolünün p67^{phox} 'un plazma membranına

şaperasyonu olduğu düşünülmektedir. Aktivasyonu takiben ilk olarak sitoskeletonla etkileşir sonra sitokrom b₅₅₈ ile birleşeceği plazma membranına doğru hareket eder (51). Bu etkileşimlerin temelinde p47^{phox} 'a ait SH3 domaini vardır. Bu domain istirahat halindeki hücrelerde bir p47^{phox} PRR molekülü ile intramoleküler olarak etkileşir. Aktivasyon sonucu bu domain p22^{phox} ile etkileşim için hazır hale gelir (52). Clark ve arkadaşları (48) protein kinaz C'nin p47^{phox} 'u fosforile ettiğini ve protein kinaz C inhibisyonunun hem p47^{phox} 'un sitoskeleton ile ilişkisini hem de O₂⁻ üretimini engellediğini göstermişlerdir p47^{phox} 'un birçok fosforilasyon bölgesi vardır (53). Ancak sadece S379 bölgesindeki bir bölüm tam oksidaz aktivitesi için gereklidir (54).

p67^{phox} : p67^{phox} hakkında daha az şey bilinmektedir. El Benna ve arkadaşları (55) p67^{phox} 'un protein kinaz C tarafından fosforile edildiğini ve fosforilasyon sonrası p47^{phox} ile kompleks oluşturduğunu göstermişlerdir Han ve arkadaşları (56) p67^{phox} 'un NADPH oksidaz fonksiyonu için gerekli olan bir aktivasyon domaini olduğunu göstermişlerdir. p67^{phox} sitokrom b₅₅₈ içinde NADPH'dan O₂'ye elektron transferini gerçekleştirir (48).

Rac-2: NADPH oksidazın aktivasyonunda kritik bir rol oynar Koga ve arkadaşları (57) rac-2'nin p67^{phox} 'un N-terminali ile olan ilişkisinin oksidaz aktivitesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir Diğer yandan Philips ve arkadaşları (58) rac-2 translokasyonunun oksidaz aktivitesi ile korele olmadığını göstermişlerdir. Bu nedenle rac-2'nin O₂⁻ oluşumundaki etkisinin p67^{phox} ile olan etkileşimine ve stabilizasyonuna bağlı olduğu düşünülebilir. Rac-2'de gerçekleşen bir inhibitör mutasyonunda insanlarda nötrofil bozukluğu sendromuna yol açtığı yakın zamanda gösterilmiştir (59) Hastaların nötrofilleri FMLP ve opsonize zimozan ile ille stimüle olmalarına O₂⁻ üretiminin ve azurofilik granül sekresyonunun azaldığı, kemotaksis olmadığı gözlenmiştir. Bu durum rac-2'nin NADPH oksidazın regülasyonu dışında başka nötrofil fonksiyonlarını ilgilendiren görevleri olduğunu göstermektedir.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; kontrol, tedavi öncesi, tedavi ortası ve tedavi sonu olmak üzere dört grup oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol grubunu oluşturan birinci grupta; bilinen bir hastalığı ve kronik ilaç kullanımı olmayan, fizik muayenesi ve rutin biyokimyasal tetkikleri normal olan, yaşları 35 ile 55 arasında değişen, 9'u erkek, 8'i kadın olmak üzere toplam 17 sağlıklı kişi bulunmaktadır.

Grup 2: Tedavi öncesi grubunu oluşturan ikinci grupta Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda Akciğer kanseri tanısı ile palyatif veya küratif amaçlı radyoterapi uygulanmasına karar verilen (eş zamanlı kemoterapi almayan) yaşları 35 ile 55 arasında değişen, 9'u erkek, 8'i kadın olmak üzere toplam 17 Akciğer kanserli hastanın bulunmaktadır.

Grup 3: Tedavi ortasını oluşturan üçüncü grupta; tedavi öncesi grupta bulunan 17 Akciğer kanserli hastadan planlanan radyoterapi dozunun yarısı uygulanan hastalar bulunmaktadır.

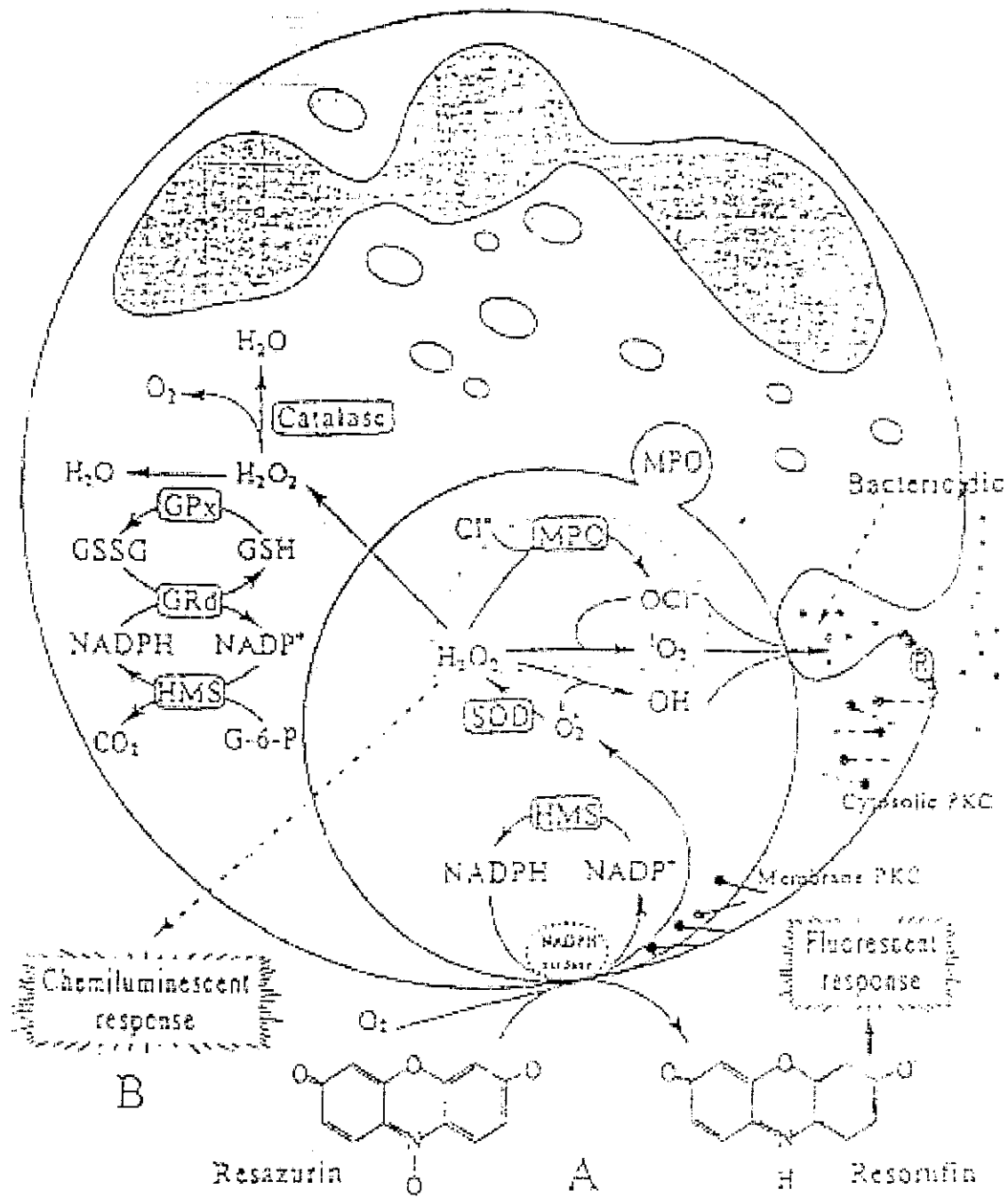
Grup 4: Tedavi sonrasını oluşturan dördüncü grupta ise; tedavi öncesi grupta bulunan 17 Akciğer kanserli hastadan planlanan radyoterapi dozunun tamamı uygulanan hastalar bulunmaktadır.

Kontrol grubu ve hasta gruplarının kan örnekleri merkez laboratuvarı kan alma biriminde alındı. Kontrol ve hastalardan; iki tane EDTA'lı tam kan tüpüne kan alındı. Kan örneklerinden bir tanesi ile tam kan sayımları hematoloji analizörü (Cell-Dyn 3500, Abbot) ile yapıldı. Diğer tam kan tüpü ise Merkezi Araştırma Laboratuvarına götürüldü. Periferik venöz kandan nötrofil ayırımı ve DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA örnekleri Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda -70°C 'de saklandı. Venöz kandan izole edilen nötrofillerden oksidatif patlama aktivitesi bekletilmeden ölçüldü.

3.1. Nötrofillerde Oksidatif Patlama Aktivitesinin Florometrik Yöntem ile Ölçümü

3.1.1. Prensip

Nötrofillerde oksidatif patlama aktivitesinin ölçümü; W. Fang ve arkadaşlarının florometrik metoduna göre yapıldı (61). Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxasin-3-one 10-oxide) okside formda mavi renklidir, indirgenince pembe ve floresan formu olan resorufine dönüşür. Fagositik hücrelerin stimülasyon sonucu önemli bir oksidatif patlama ve moleküler oksijeni kullanma özellikleri vardır. Nötrofillerin oksidatif patlama ile ilgili indirgeme özelliği başlıca indirgenmiş NADPH oksidaza bağlanabilir. Bu enzim NADPH'ı elektron vericisi olarak kullanarak moleküler oksijeni indirger Resazurin elektron alıcısı olarak davranır ve NADPH oksidaz için moleküler oksijen ile yarışır. Nötrofillerin elektronları NADPH'dan resazurine transfer edilir Resazurin'de floresans veren formuna resorufin'e dönüşür Resazurin'in indirgenmesi ile ilgili NADPH oksidaz enziminin hızı; bu enzimin aktivitesini ve bununla birlikte oksidatif patlama aktivitesini gösterir (şekil 3.1) (62,63,64).



Şekil 3.1. Nötrofillerde oksidatif patlama ve resazurinin resorufine dönüşümü (61).

3.1.2. Reaktifler

- 1) Histopaque 1119 (Sigma, 1119-1)
- 2) Zymosan A (Sigma, Z 4250)
- 3) Resazurin (Sigma, R 2127)
- 4) RPMI-1640 Medium (Sigma, R 7755)
- 5) PBS tamponu (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4):
 - 140 mM NaCl (Sigma, S 7653)
 - 18.4 mM Na₂HPO₄ (Sigma, S 7927)
 - 1.3 mM NaH₂PO₄ (Sigma, S 8282)

3.1.3. Yöntem

1. Zimozan ile Aktive Serum (ZAS) Hazırlanması

Sağlıklı AB Rh (+) üç donörden düz biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri oda ısısında 20 dakika pıhtılaşması için bekletildikten sonra, + 4 C °de 1400 devirde 15 dakika (Biofuge 17 RS Heraeus Sepatech cihazında) çevrilerek serumları ayrıldı üç serum örneğinin karıştırılması ile elde edilen serum havuzunun içerisine 10 mg/ml olacak şekilde zimozan-A ilave edildi 1 saat 37 C °de bekletildi, daha sonra tekrar + 4 C °de 1400 devirde 15 dakika çevrilerek zimozan çöktürüldü Üstteki aktive serum küçük bölümlere ayrılarak -70 C °de dondurularak saklandı. Çalışma süresince 30 gün ara ile yeni zas örnekleri hazırlandı.

2. Periferik venöz kandan nötrofil izolasyonu

- 1- Beş ml venöz kan EDTA'lı tüplere alındı
- 2- PBS ile bir kat sulandırılmış kan 3ml histopaque 1119 üzerine dikkatle katmanlandırıldı, sonra 2230 devirde 30 dakika çevrildi
- 3- Ortada oluşan nötrofil tabakası pastör pipeti ile alındı.
- 4- Üç kez daha 1200 devirde 10 dakika PBS ile yıkandı.
- 5- Son yıkamadan sonra Medium RPMI 1640 ilave edilerek hücre sayısı 2.5×10^6 nötrofil/ml olacak şekilde ayarlandı.

3. Oksidatif patlama aktivitesinin florometrik ölçümü

Deney tüpünün içerisine 300 µl nötrofil süspansiyonu (2.5×10^6 nötrofil / ml olacak şekilde RPMI Medium içinde), 100 µl ZASS (10 mg/ml), 100µl resazurin (0.3mg/ml) ilave edildi. Deney tüpü alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra PERKIN ELMER Luminescence Spectrometer LS 50B cihazında exitasyon dalga boyu 544 nm, emisyon dalga boyu 584 nm olacak şekilde 37 C° de inkübe edilerek 2 saat süresince florometrik ölçüm yapıldı. 0, 30, 60, 90 ve 120 dakikalardaki aktivite değerleri tespit edildi. Sonuçlar inkübasyon periyodu sonunda floresan yoğunluk olarak verildi.

| | KÖR | NUMUNE |
|----------------------------|-----|--------|
| Nötrofil süspansiyonu (µl) | (-) | 300 |
| RPMI- Medium (µl) | 300 | (-) |
| Resazurin (µl) | 100 | 100 |
| Zas (µl) | 100 | 100 |

3.2 Apoptozisin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Gösterilmesi

3.2.1. Prensip

Agaroz jel elektroforezinde yüklenen hastalara ait DNA örneklerinin yürütülme işlemi esnasında yapmış olduğu merdiven görünümü özelliğine göre apoptozisin varlığı değerlendirildi (65,66,67,68).

3.2.2. Reaktifler

- 1) Genomic DNA Purification Kit # KO512 (Fermentas)
- 2) Tris-Acetate-EDTA Buffer (Sigma, T-9650)
- 3) Agaroz (Sigma, A-5093)
- 4) Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma, E 8751)
- 5) % 0.05'lik Bromophenol Blue (Sigma, B 7021) ve % 40'lık sucrose (Sigma, S 7903) içeren yükleme tamponu

3.2.3. Yöntem

1. Periferal Venöz Kandan DNA İzolasyonu

- I. EDTA'lı tam kan tüplerine alınan örnekler beklenilmeden çalışıldı.
- II. 200 µl numune ve 400 µl lizis solüsyonu karıştırıldıktan sonra 60 C° de 5 dakika inkübe edildi
- III. 600 µl kloroform ilave edildikten sonra 5 dakika süresince tüp alt üst edilerek karıştırıldı 10 000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi
- IV. Başka bir tüpe 720 µl distile su ve 80 µl presipitasyon solüsyonu içeren karışım hazırlandı.
- V. Santrifüj sonrası DNA içeren sıvı kısım bu tüpün içerisine ilave edildi. Tüp yavaş yavaş alt üst edilerek sarmal şekilde DNA gözlemlendi. 10 000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı faz tüpden uzaklaştırıldı.
- VI. Tüpün içinde kalan DNA pelleti üzerine 1.2 M NaCl solüsyonu 100µl ilave edildi. Voteksleme işlemi uygulanarak DNA peletinin tamamen çözülmesi için beklenildi.

- VII 300 µl soğuk etanol (%70) ilave edildi, 10 000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Üstdeki sıvı faz tüpden uzaklaştırıldı. Alkolün ortamdan uzaklaştırılması için 2 saat beklenildi 100 µl distile su ilave edildikten sonra vortekslendi ve DNA'nın çözünür hale gelmesi sağlandı.
- VIII DNA örnekleri -70 C° 'de saklandı.

2. Agaroz Jelin Hazırlanması

- I Temiz ve kuru cam tabakanın kenarları otoklav bandı ile sarılarak bir kalıp oluşturuldu. Bu plaka yatay durumda düzgün bir yere yerleştirildi
- II 100 ml Tris-EDTA tamponu ve 15 gr toz Agar bir erlenmayer içerisinde agaroz eriyinceye kadar Schott marka fırında ısıtıldı. Agaroz tanecikleri en kısa sürede düzenli olarak karıştırılarak eritildi.
- III Çözelti 60 C° 'ye kadar soğutuldu.
- IV 10 µl etidyum bromür ilave edildi
- V DNA'nın uygulanacağı kuyucukları oluşturmak için cam plakanın yüzeyinden 1cm yukarıya (tarağın çıkarılması esnasında jelin yırtılmaması için) tarak yerleştirildi.
- VI Ilık agaroz jel çözeltisi kalıbın içerisine döküldü. Tarağın dişleri arası ve altında hava kabarcığının kalmamasına dikkat edilerek, 5mm'lik jel kalınlığı sağlandı
- VII Agaroz jel oda ısısında 45 dakika bekletilerek polimerleşmesi sağlandı. Jel polimerleştikten sonra tarak ve otoklav bandı dikkatle çıkarıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi

3. DNA Örneklerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

- I. DNA örnekleri -70 C° 'den çıkarıldı, oda ısısında eritildi.
- II. DNA örnekleri jel yükleme tamponu (%0.05 'lik Brom fenol mavisi ve %40 sükröz içeren tampon) ile toplam hacim 20 μl olacak şekilde karıştırıldı.
- III. Bu karışım bir mikropipet yardımı ile yaklaşık 1 mm derinliğindeki tampon içerisine jelin kuyucuklarına yavaşça yüklendi.
- IV. Jelin sağ (negatif) ve sol (pozitif)'undaki ilk kuyucuklara kontrol kişilerden elde edilen DNA örnekleri yerleştirilirken, ortada kalan kuyucuklara planlanan radyoterapi dozunun tamamını almış olan akciğer kanserli hastalara ait olan DNA örnekleri yüklendi.

4. DNA Örneklerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

- I. Elektroforez tankının (BIO-RAD WIDE-MIN-SUBCELL cihazı) kapağı kapatıldı. 5 V/ cm'lik voltaj uygulanarak DNA'nın anoda doğru hareket etmesi sağlandı. Agaroz jele 20 mA'lik akım 1 saat süreyle uygulandı.
- II. Elektrik akımı kesildikten sonra elektroforez tankının kapağı açıldı.

5. Fotoğraf Çekimi

Jelin fotoğrafının çekiminde Ultraviyole ışık kaynağı kullanıldı. Ultraviyole ışığın zararlı etkilerinden korunmak için koruyucu gözlük kullanılarak karanlık odada fotoğraf çekimi yapıldı.

3.3. Lökosit Sayısı ve Nötrofil Dağılımının Ölçülmesi

EDTA'lı tam kan tüplerine alınan örneklerden; lökosit (WBC) ve nötrofil dağılımları elektronik hematoloji analizörü (Cell-Dyn 3500, Abbot) kullanılarak ölçüldü.

3.4. İstatiksel Analiz

İstatiksel hesaplamalar SPSS 10,0,1 paket programı kullanılarak yapıldı. Parametrelerin kontrol ve radyoterapi uygulama grupları arası veya grup içi istatiksel anlamlılık değerlendirilmesinde uygun test öndeğerlendirme ile seçildi ve Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi, Wilcoxon-Signed Ranks test, Friedman test ve Mann-Whitney-U testleri kullanıldı.

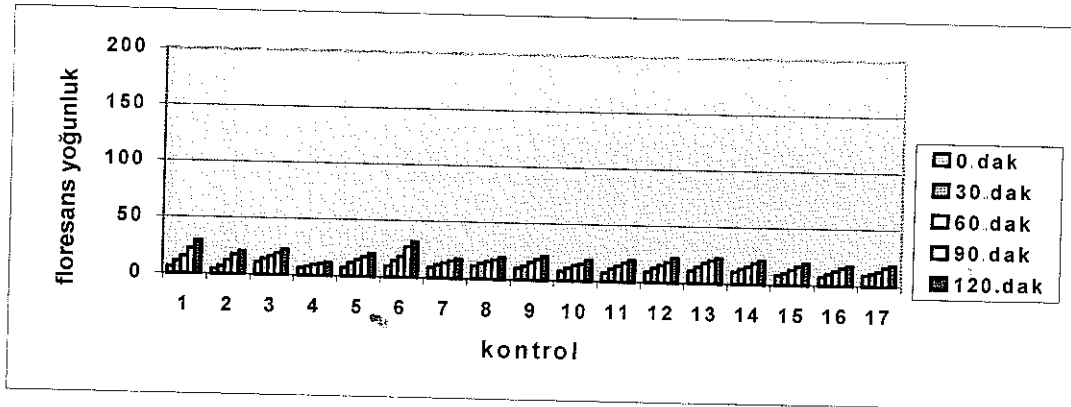
4. BULGULAR

4.1. Sağlıklı Kişilerden Oluşan Kontrol Grubunda Nötrofil NADPH Oksidaz Aktivitesi

Yaş ve cinsiyet uyumlu 17 sağlıklı kişiden oluşturulan kontrol grubunda nötrofil NADPH oksidaz aktivitesi florometrik yöntem ile 0, 30, 60, 90 ve 120 dakikalarda ölçüldü (şekil 4.1) NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak ortalama \pm SD değerleri tablo 4.1.'de gösterilmiştir Kontrol grubunda; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi Friedman istatistiksel testi kullanılarak değerlendirildi. NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak artışı anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Zamana bağlı değişimleri karşılaştırmak için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı ve en fazla 0 ve 120 dakikalar arasında artışın olduğu gösterildi ($p < 0.001$).

| Grup | n | 0 dak (ort \pm SD) | 30 dak (ort \pm SD) | 60 dak (ort \pm SD) | 90.dak (ort \pm SD) | 120 dak (ort \pm SD) |
|---------|----|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Kontrol | 17 | 9.3 \pm 2.0 | 11.6 \pm 3.0 | 14.5 \pm 2.1 | 17.4 \pm 3.4 | 20.3 \pm 4.4 |

Tablo 4.1. Kontrol grubunda; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk) ($p < 0.001$).



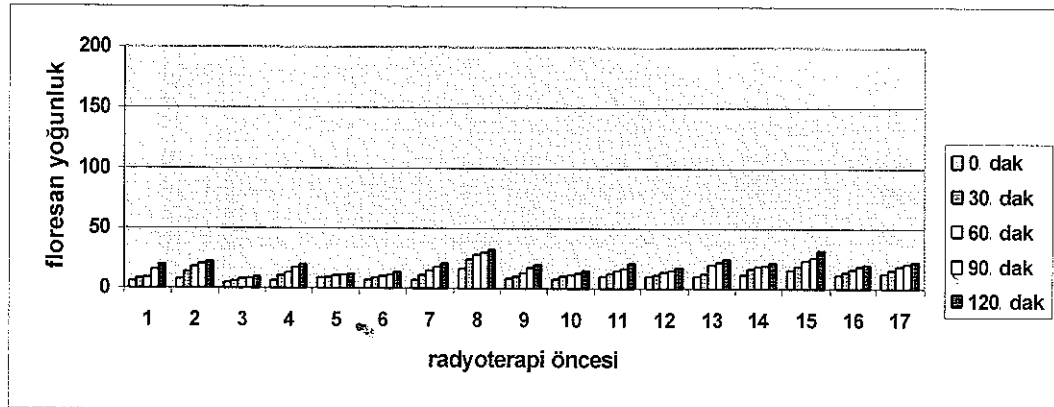
Şekil 4.1. Kontrol grubunda; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk).

4.2. Akciğer Kanserli Hastalarda Radyoterapi Uygulanmasından Önce Nötrofil NADPH Oksidaz Aktivitesi

Akciğer kanseri nedeniyle radyoterapi uygulanmasına karar verilen 17 kişiden oluşturulan grupta nötrofil NADPH oksidaz aktivitesi florometrik yöntem ile 0, 30, 60, 90 ve 120 dakikalarda ölçüldü (şekil 4.2.) NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak ortalama \pm SD değerleri tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Radyoterapi uygulamasından önce nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi kullanılarak değerlendirildi. NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak artışı anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Zamana bağlı değişimleri karşılaştırmak için Paired t-testi kullanıldı ve en fazla 0. ve 120. dakikalar arasında artışın olduğu gösterildi ($p < 0.001$)

| Grup | n | 0.dak (ort \pm SD) | 30.dak (ort \pm SD) | 60.dak (ort \pm SD) | 90.dak (ort \pm SD) | 120.dak (ort \pm SD) |
|----------|----|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| R Öncesi | 17 | 9.1 \pm 3.2 | 11.77 \pm 4.4 | 15.0 \pm 5,3 | 17.4 \pm 5.9 | 20.0 \pm 5.9 |

Tablo 4.2. Radyoterapi uygulamasından önce; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk) ($p < 0.001$)



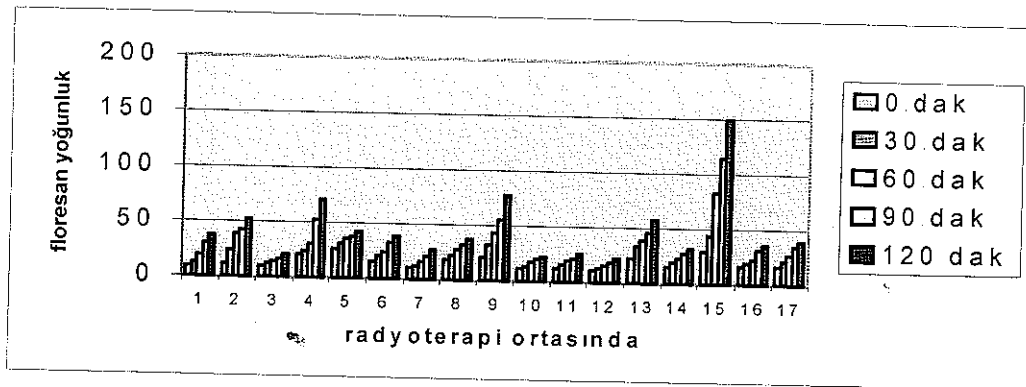
Şekil 4.2. Radyoterapi uygulamasından önce nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk).

4.3. Akciğer Kanserli Hastalarda Radyoterapi Dozunun Yarısı Uygulandıktan Sonra Nötrofil NADPH Oksidaz Aktivitesi

Radyoterapi uygulanan 17 akciğer kanserli hastada planlanan radyoterapi dozunun yarısını uygulandıktan sonra nötrofil NADPH oksidaz aktivitesi florometrik yöntem ile 0, 30, 60, 90 ve 120 dakikalarda ölçüldü (şekil 4.3.). NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak ortalama \pm SD değerleri tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Tedavi ortasındaki grubun NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi Friedman istatistiksel testi kullanılarak değerlendirildi. NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak artışı anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Zamana bağlı değişimleri karşılaştırmak için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı ve en fazla 0. ve 120 dakikalar arasında artışın olduğu gösterildi ($p < 0.001$).

| Grup | n | 0.dak (ort \pm SD) | 30 dak (ort \pm SD) | 60 dak (ort \pm SD) | 90 dak (ort \pm SD) | 120 dak (ort \pm SD) |
|-----------|----|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| R. Ortası | 17 | 15.4 \pm 5.9 | 19,6 \pm 11.0 | 24.1 \pm 16,2 | 32.7 \pm 22.9 | 37.6 \pm 31.4 |

Tablo 4.3. Radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk) ($p < 0.001$)



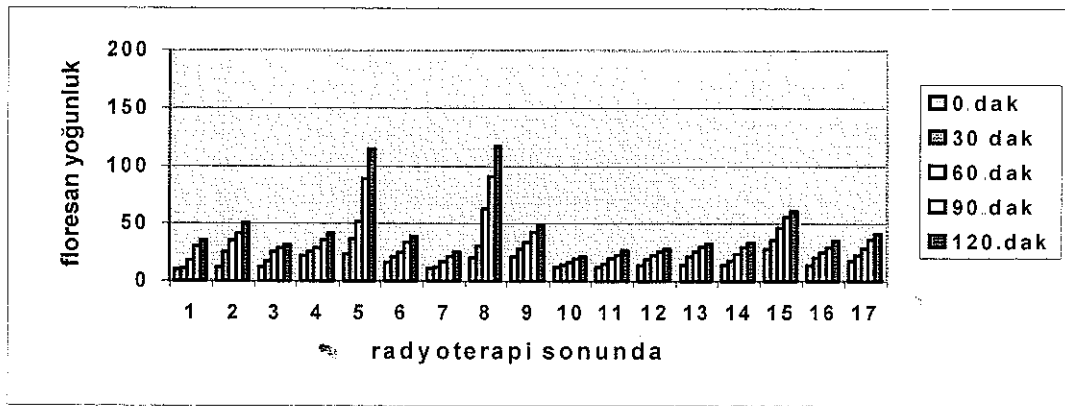
Şekil 4.3. Radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk).

4.4. Akciğer Kanserli Hastalarda Radyoterapi Uygulanması Tamamlandıktan Sonra Nötrofil NADPH Oksidaz Aktivitesi

Radyoterapi uygulanan 17 akciğer kanserli hastaya radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra oluşturulan grubun NADPH oksidaz aktivitesi florometrik yöntem ile 0, 30, 60, 90 ve 120 dakikalarda ölçüldü (şekil 4.4) NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak ortalama \pm SD değerleri tablo 4.4.'de gösterilmiştir. Radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak değişimi Friedman istatistiksel testi kullanılarak değerlendirildi. NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak artışı anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Zamana bağlı değişimleri karşılaştırmak için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı ve en fazla 0. ve 120 dakikalar arasında artışın olduğu gösterildi ($p < 0.001$).

| Grup | n | 0 dak (ort \pm SD) | 30 dak (ort \pm SD) | 60.dak (ort \pm SD) | 90.dak (ort \pm SD) | 120.dak (ort \pm SD) |
|---------|----|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| R. Sonu | 17 | 14.6 \pm 5.1 | 21.1 \pm 7.5 | 25.6 \pm 12.8 | 30.1 \pm 21.2 | 35.4 \pm 28.7 |

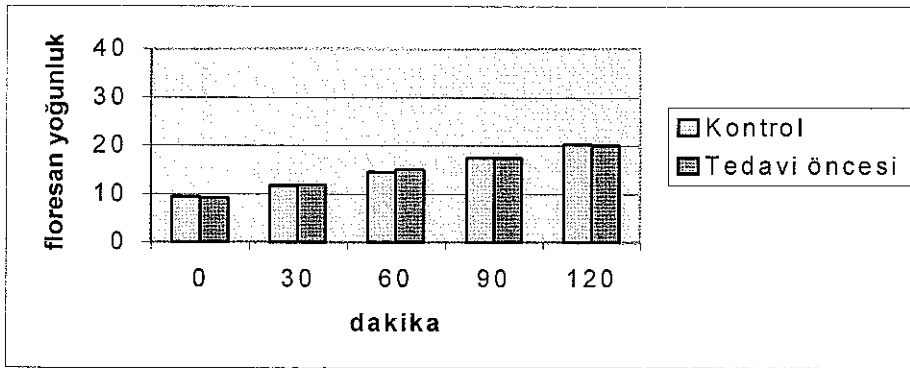
Tablo 4.4. Radyoterapi uygulanması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk) ($p < 0.001$).



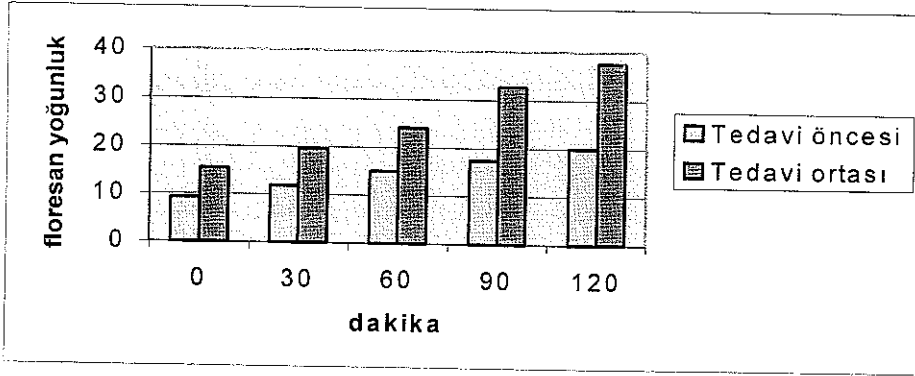
Şekil 4.4. Radyoterapi uygulanması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk).

4.5. Nötrofillerde NADPH Oksidaz Aktivite Düzeylerinin Gruplar Arasındaki İlişkisi

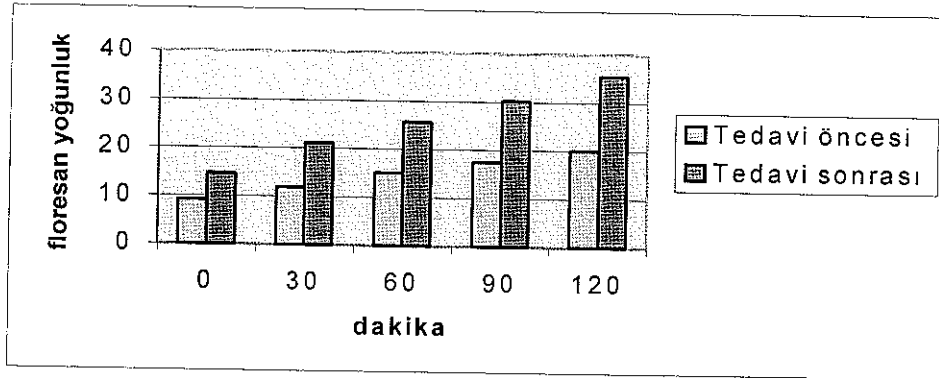
Kontrol grubu ile akciğer kanserli hastalarda radyoterapi uygulamasının öncesinde nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında Mann-Whitney U ve Student-t test'i kullanılarak yapılan karşılaştırmada anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$) (şekil 4.5) Radyoterapi uygulamasının öncesi ile planlanan radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonra nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında Friedman ve Wilcoxon Signed Ranks testleri kullanılarak yapılan karşılaştırmada anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.001$) (şekil 4.6). Radyoterapi uygulaması öncesi ile radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında Friedman ve Wilcoxon Signed Ranks testleri kullanılarak yapılan karşılaştırmada anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.001$) (şekil 4.7). Radyoterapi dozunun yarısı uygulanması ile radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında Friedman ve Wilcoxon Signed Ranks testleri kullanılarak yapılan karşılaştırmada anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$) (şekil 4.8.) Kontrol, radyoterapi öncesi, ortası ve sonrasında; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin dağılımı şekil 4.9'da gösterilmiştir.



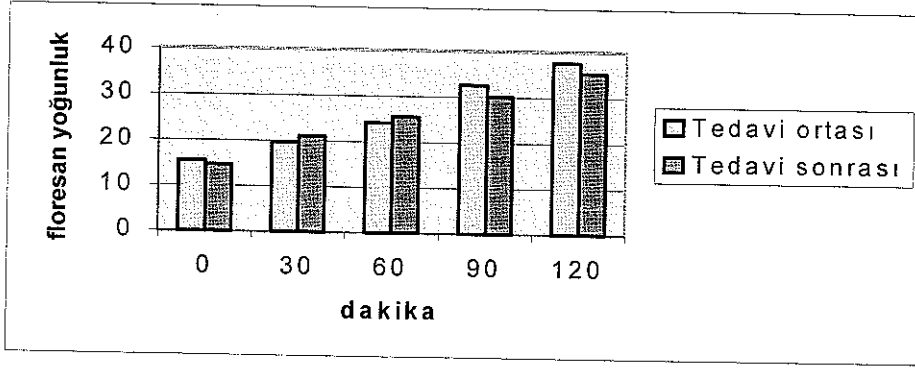
Şekil 4.5. Kontrol grubu ile radyoterapi uygulanmasının öncesi; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması ($p>0.05$)



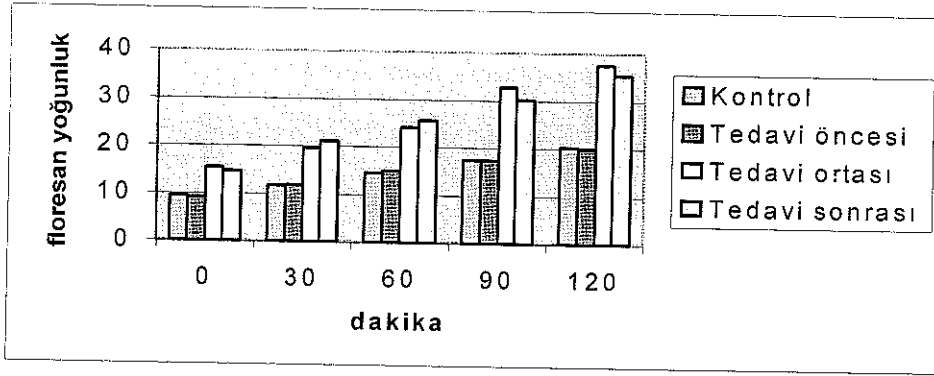
Şekil 4.6. Radyoterapi uygulanmasının öncesi ile planlanan radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması ($p < 0.001$).



Şekil 4.7. Radyoterapi uygulanmasının öncesi ile radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması ($p < 0.001$).



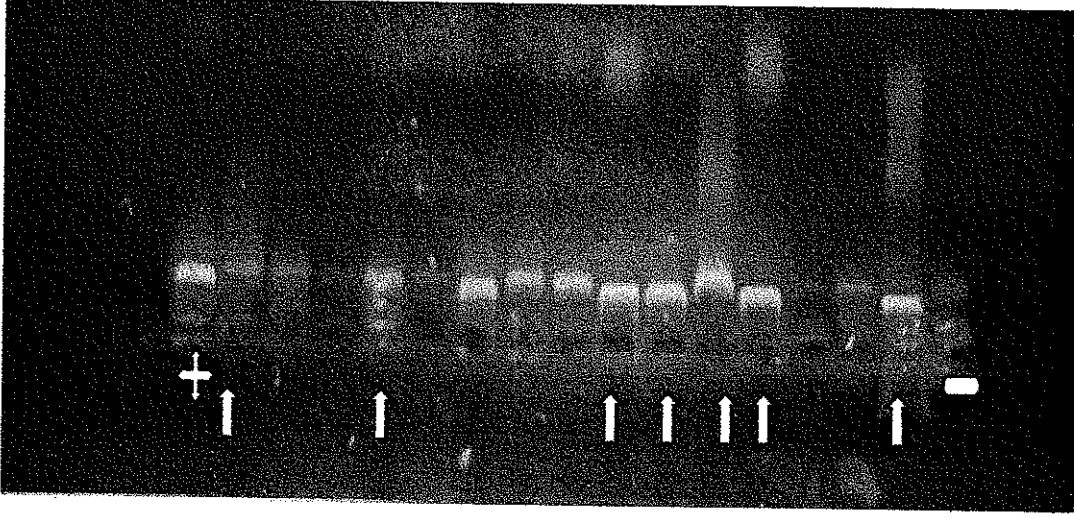
Şekil 4.8. Planlanan radyoterapi dozunun yarısı uygulandıktan sonrası ile radyoterapi uygulaması tamamlandıktan sonra; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin karşılaştırılması ($p>0.05$).



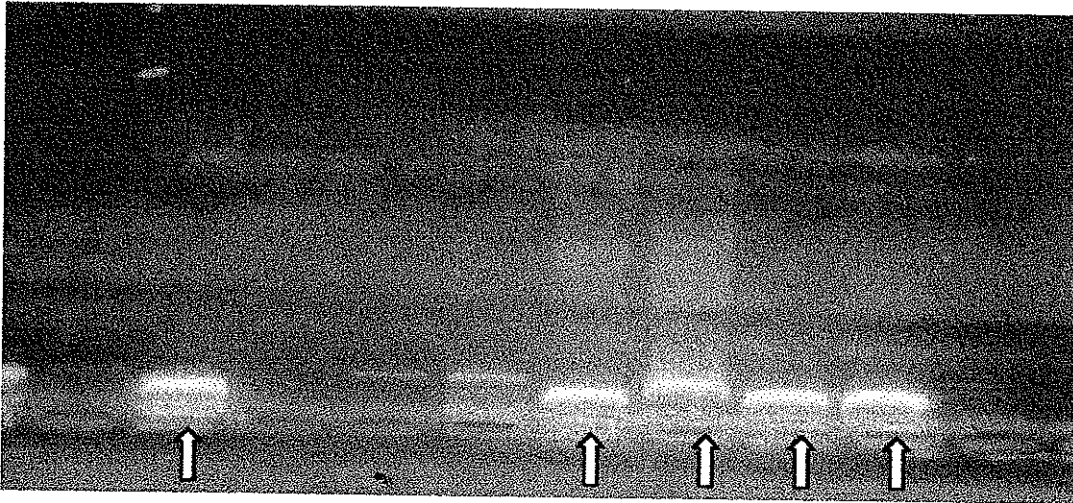
Şekil 4.9. Kontrol, radyoterapi öncesi, ortası ve sonrasında; nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin dağılımı.

4.5. Apoptozsin Agaroz Jel Elektroforezi Kullanılarak Gösterilmesi

Radyoterapi uygulanması tamamlandıktan sonra 15 hastanın periferik venöz kanlarından elde edilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezine uygulandı. Yüklenen DNA örneklerinin merdiven görünümü özelliğine göre apoptozis varlığı 7 hastada tespit edildi (şekil 4.10. ve 4.11.). Apoptozis pozitif ve negatif olarak değerlendirilen hastaların radyoterapi uygulamasının öncesi, ortası ve sonrasında nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesinin zamana bağlı olarak ortalama \pm SD değerleri tablo 4.5 'de gösterilmiştir. Apoptozis pozitif veya negatif olarak değerlendirilen hastaların radyoterapi uygulamasının öncesi, ortası ve sonrasındaki nötrofil NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırma yapıldı. Apoptozis pozitif ile negatif olan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; radyoterapi uygulanması öncesindeki NADPH oksidaz aktivite düzeylerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$) (şekil 4.12.). Radyoterapi uygulamasının ortası ve sonunda NADPH oksidaz aktivitesi düzeyleri apoptozis pozitif olan grupta anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.001$). Apoptozis pozitif olan grubun NADPH oksidaz aktivite düzeylerinin radyoterapi uygulamasının ortası ile sonu arasında yapılan karşılaştırma da anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (şekil 4.13.).



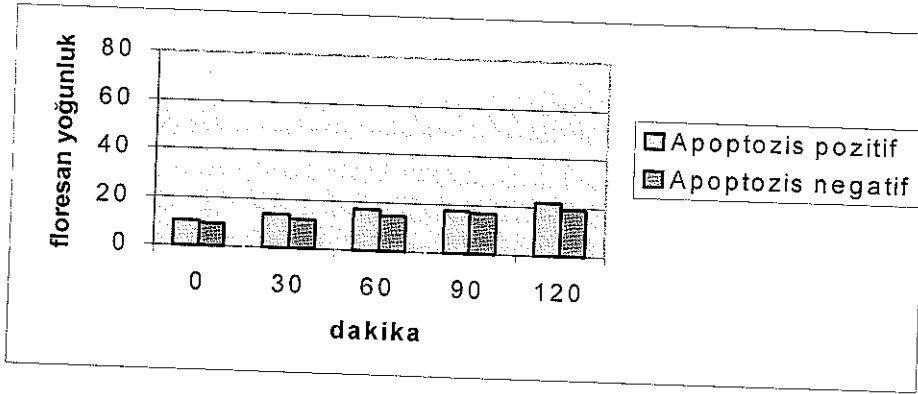
Şekil 4.10. Agaroz jel elektroforezinde apoptozisin gösterilmesi (Apoptozis pozitif olarak değerlendirilenler oklarla gösterilmiştir, soldan birinci kuyucuğa pozitif kontrol, sağdan birinci kuyucuğa negatif kontrol yüklenmiştir).



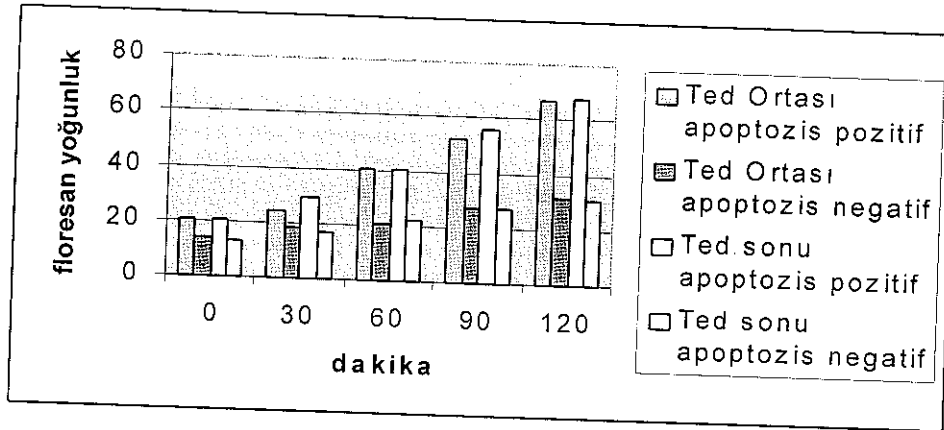
Şekil 4.11. Agaroz jel elektroforezinde DNA'nın smear yapmasının büyütülerek gösterilmesi (Apoptozis pozitif olarak değerlendirilenler oklarla gösterilmiştir).

| Gruplar | Apoptozis | n | Ortalama | SD |
|---------------------------|----------------|---|-------------|-------------|
| Tedavi Öncesi 0.dak | pozitif | 7 | 10.2 | 4.2 |
| | negatif | 8 | 9.2 | 2.6 |
| Tedavi Öncesi 30.dak | pozitif | 7 | 1.9 | 5.8 |
| | negatif | 8 | 11.9 | 3.2 |
| Tedavi Öncesi 60.dak | pozitif | 7 | 16.9 | 6.8 |
| | negatif | 8 | 14.6 | 4.1 |
| Tedavi Öncesi 90.dak | pozitif | 7 | 17.6 | 8.3 |
| | negatif | 8 | 16.8 | 4.0 |
| Tedavi Öncesi 120.dak | pozitif | 7 | 21.7 | 7.9 |
| | negatif | 8 | 19.2 | 4.2 |
| Tedavi Ortası 0.dak | pozitif | 7 | 20.3 | 6.1 |
| | negatif | 8 | 13.6 | 4.0 |
| Tedavi Ortası 30.dak | pozitif | 7 | 24.3 | 12.2 |
| | negatif | 8 | 18.4 | 10.1 |
| Tedavi Ortası 60.dak | pozitif | 7 | 40.3 | 19.6 |
| | negatif | 8 | 20.8 | 5.9 |
| Tedavi Ortası 90.dak | pozitif | 7 | 52.3 | 28.7 |
| | negatif | 8 | 27.0 | 9.4 |
| Tedavi Ortası 120.dak | pozitif | 7 | 66.6 | 39.7 |
| | negatif | 8 | 31.2 | 11.2 |
| Tedavi Sonrası 0.dak | pozitif | 7 | 20.7 | 5.1 |
| | negatif | 8 | 13.2 | 1.9 |
| Tedavi Sonrası 30.dak | pozitif | 7 | 29.1 | 5.6 |
| | negatif | 8 | 17.2 | 3.7 |
| Tedavi Sonrası 60.dak | pozitif | 7 | 40.5 | 13.5 |
| | negatif | 8 | 22.3 | 4.3 |
| Tedavi Sonrası 90.dak | pozitif | 7 | 55.6 | 24.5 |
| | negatif | 8 | 27.2 | 5.1 |
| Tedavi Sonrası 120.dak | pozitif | 7 | 67.4 | 33.8 |
| | negatif | 8 | 31.1 | 5.7 |

Tablo 4.5. Apoptozis pozitif ve negatif olarak değerlendirilen hastalarda nötrofillerde NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk).



Şekil 4.12. Apoptozis pozitif ile negatif olan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; radyoterapi uygulanması öncesindeki NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk) ($p > 0.05$).



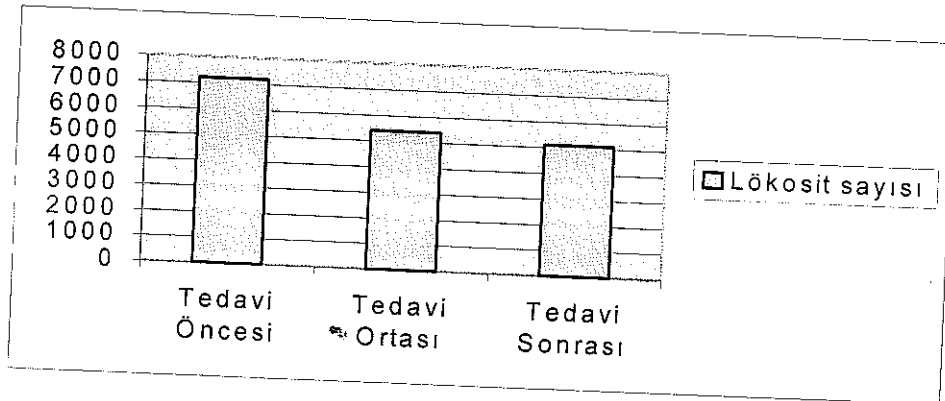
Şekil 4.13. Apoptozis pozitif ile negatif olan gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; radyoterapi uygulamasının ortası ve sonunda NADPH oksidaz aktivite düzeyleri (floresan yoğunluk)

4.6. Radyoterapinin Lökosit Sayısı Üzerine Etkileri

Radyoterapi uygulamasının öncesi, ortası ve sonrasındaki lökosit sayısı ve nötrofil dağılımının ortalama \pm SD değerleri tablo 4.6 'da gösterilmiştir Friedman testi kullanılarak yapılan karşılaştırma hem radyoterapinin ortasında hem de sonunda lökosit ve nötrofil sayılarında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0.001$). Wilcoxon Signed Ranks testi kullanılarak radyoterapi ortası ile radyoterapi sonunda lökosit ve nötrofil sayılarında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0.05$) (şekil 4.14).

| Grup | Tedavi Öncesi | Tedavi Ortası | Tedavi Sonrası |
|-------------------------|---------------|---------------|----------------|
| n | 17 | 17 | 17 |
| Ortalama Lökosit Sayısı | 7200 | 5400 | 5100 |
| SD | 2514 | 1258 | 1144 |
| Nötrofil (%) | 37 | 38 | 36 |

Tablo 4.6. Radyoterapi uygulamasının öncesi, ortası ve sonrasındaki lökosit sayısı ve nötrofil dağılımının ortalama \pm SD değerleri ($p < 0.001$)



Şekil 4.14. Radyoterapi uygulamasının öncesi, ortası ve sonrasındaki lökosit sayısının dağılımı

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri erkeklerde prostat kanserinden, kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen kanser tipidir. Ayrıca akciğer kanseri hem erkeklerde (%32), hem de kadınlarda (%25) en sık ölüme neden olan kanser türüdür. Her iki cinsiyette de olguların en sık görüldüğü yaş aralığı 35-75 yaş iken, pik insidansı da 55-65 yaşları arasındadır. Etyolojisinde en fazla sigara içimi bulunurken, endüstriyel bölgelerde bulunan asbest, nikel, krom, arsenik, kömür tozu, radyoaktif materyaller, hava kirliliği ve genetik faktörlerin de akciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir (10, 13). Akciğer kanserlerinde en büyük problem erken tanı problemidir. Asemptomatik dönemde teşhis edilmiş hastaların tedavileri hem kolay, hem de 5 yıllık yaşam şansları %60'ların üzerinde bulunmaktadır. Akciğer kanserlerinde tedavi yöntemi kanserin histolojik tipi, evresi ve hastaların genel durumuna göre biçimlendirilmektedir (1). Bu özelliklere göre; akciğer kanserli hastalarda cerrahi, medikal ve radyoterapi tek başlarına veya kombine bir şekilde uygulanmaktadır.

Akciğer kanserlerinde radyoterapinin uygulanması hücre tipine göre değişir. Radyoterapiye en hassas olanlar küçük hücreliler başta olmak üzere indifferansiye kanserler ve daha sonra skuamöz hücreli kanserlerdir. Adenokanserlerin radyoterapiye hassasiyeti az, büyük hücreli kanserlerin ise çok azdır. Radyoterapi medikal inoperabl yani; evre olarak operasyona uygun olan fakat anormal solunum fonksiyonları, kan gazı bulguları, pulmoner hipertansiyon varlığı ve yeni myokard infarktüsü gibi solunumsal ve kardiyak nedenlerden operasyona alınamayan hastalarda, rezektabl olan evre I tümörlerinde, trakea, karina, ana bronş tutulumu olan hastalarda küratif olarak uygulanmaktadır. Radyasyon tedavisinin amacı; uygulanması planlanan radyasyon dozunun çevre dokulara en az düzeyde zarar vererek hedef alınan tümör dokusuna verilebilmesidir. Fakat bu durum her zaman mümkün olamamaktadır. Radyasyon tedavisine bağlı olarak görülen akut yanıtlar hücresel döngünün çok hızlı olduğu gastrointestinal mukoza, kemik iliği, cilt, orofaringial ve özefagial mukozada meydana gelir. Örneğin; hematopoez ele alındığında kemik iliği radyoterapisi sonrasında ilk önce hızlı turnover hızına sahip olduklarından dolayı lökosit ve trombosit sayıları azalır.

Bu çalışma, eş zamanlı kombine tedavi (cerrahi ve medikal tedavi) uygulanmayan ve palyasyon veya küratif amaçlı tek başına radyoterapi alması planlanan akciğer kanserli hastalarda yapıldı. Hastalarda tedavi öncesi, planlanan radyoterapi dozunun ortası ve sonunda olmak üzere; nötrofilde oksidatif patlamanın göstergesi olan NADPH oksidaz aktivitesi, lökosit ve nötrofil sayıları ölçüldü. Ayrıca radyoterapi tedavisinin sonunda hastalarının periferel kanlarından elde edilen DNA örnekleri ile apoptozisin varlığı araştırıldı.

1986 yılında Lichtenstein spontan tümör lizisinin nötrofiller tarafından üretilen H_2O_2 ve süperoksit anyonu ile geliştiğini gösterdi. Bu reaktif radikallerin oluşumundan nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesi sorumludur. Yüksek düzeyde toksik oksijen radikallerinin salınımı bir ışık patlamasına veya kemiluminesansa neden olur. Braun ve arkadaşları (69) ileri derecede solid tümörü olan hastalarda istirahat halindeki kan mononükleer hücrelerinin anlamlı derecede artmış baseline kemiluminesans aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. Nötrofillerdeki baseline kemiluminesans aktivite artışı birçok faktöre bağlı olabilir. Bunlar arasında tümör antijenlerine bağlı olarak ortaya çıkan immunolojik reaksiyonlar ve / veya tümörden üretilen faktörlerin stimülatuar etkileri sayılabilir. İnvitro insolubl dolaşan immün komplekslerin nötrofillerde kemiluminesans aktivitesini maksimum düzeyde stimüle ettiğini Starkebaum ve arkadaşları göstermişlerdir (70). Bazı araştırmacılar da nötrofillerdeki kemiluminesans yanıtının dolaşımda bulunan solubl immün komplekslerin dozuna bağlı olarak inhibe edilebileceğini belirtmektedirler (71)

Bizim çalışmamızda; sağlıklı kişilerden oluşturulan kontrol grubu ile radyoterapi uygulamasının öncesinde akciğer kanserli hastaların nötrofil NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$)

Bu sonuçlara göre; sağlıklı kişiler ile radyoterapi öncesi kanserli hastalarda nötrofil NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında bir fark olmaması; dolaşımda bulunan immün komplekslerin dozunun (Starbekum (70) ve Chasseing (71) çalışmalarında belirttiklerinin aksine) fazlaca değişim olmamasından kaynaklanabilir. Fakat bizim çalışmamızda bu komplekslerin miktarı ölçülmemiştir. Bundan dolayı akciğer kanserli olgularımızdaki NADPH oksidaz aktivitesinin kontrol grubundan farklı olmama nedenini dolaşımdaki immün

komplekslere bağı olarak açıklamak açısından bu çalışmanın yeterli olmadığını düşünmekteyiz.

Tümörün bulunduğu bölgedeki komşu dokuların radyoterapiye olan toleransı tümör tedavisini doğrudan etkilemektedir. Antioksidan ve oksidan durum radyoterapiye karşı olan toleransı gösteren önemli faktörler arasındadır (72). Radyoterapi uygulanmasına bağı olarak oksidan metabolitlerin arttığını, antioksidan enzim miktarlarının azaldığını belirten çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sabitha ve arkadaşları; Evre III oral kanserli hastalarda radyoterapi öncesi ve tedavinin 6. haftasında radyoterapinin neden olduğu değişiklikleri göstermek amacı ile G6PD, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz düzeylerini ölçmüşlerdir. MDA seviyelerinde radyoterapi uygulaması ile birlikte yükselme izlenirken antioksidan enzimlerde azalma tespit etmişler (73). Gaitan S. ve arkadaşları; 6-12 haftalık ratlarda 5 Gy'lik total vücut irradiasyonu sonucu granülosit fonksiyonlarını araştırmışlardır. Bunun için periferik kan ve kemik iliği hücre kültürlerinde süperoksit anyon miktarını ölçmüşlerdir. İn vivo ve invitro ortamlarda süperoksit anyon miktarının arttığını bularak radyoterapinin granülosit fonksiyonunu arttırdığını belirtmişlerdir (74).

Iyer R. ve arkadaşları; radyasyonun hücre dışı ve içinde ki ROS miktarına olan etkilerini araştırmışlardır. Hücre içi H_2O_2 miktarını saptamak için membranı geçebilen 2',7' dikloroflorosein diasetat, (OH)⁻ anyonları içinde hidroetidin kullanılmıştır. 0,4-19 cGy alfa partikülleri ile irradiye edildikten sonra hücre içi süperoksit anyonlarında anlamlı bir artış olurken, H_2O_2 düzeyide bu artışa eşlik etmiştir. Hücre içi ROS yanıtının nedenini araştırmak amacı ile NADPH oksidaz inhibitörü olan difenilidonyum ortama ilave edildiğinde ROS yanıtı hızlı bir şekilde inhibe olmuştur. Ancak mitokondiyal oksidasyon blokajı için kullanılan sodyumazid ROS yanıtını etkilememiştir. Bu nedenle alfa partiküllerinin neden olduğu hücre içi ROS düzeyinin artışı NADPH oksidaz aktivitesinin artmasına bağı olduğu düşünülmüştür (75).

Bizim çalışmamızda; radyoterapi uygulanması ile birlikte hem radyoterapi dozunun ortasında, hem de radyoterapi tedavisinin sonunda nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesinin radyoterapi öncesine göre anlamlı olarak arttığını tespit ettik.

($p < 0.001$). Radyoterapi dozunun ortası ile sonundaki NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Bu sonuçlara göre; radyoterapinin nötrofillerde oksidatif patlamayı NADPH oksidaz enzimini aktive ederek arttırdığını düşünmekteyiz Iyer ve arkadaşlarının (75) çalışması da bu düşüncemizi desteklemektedir. Radyoterapi uygulamasına bağlı olarak nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesinin arttığını göstermiş olmasına rağmen bu çalışmamız NADPH oksidaz aktivasyonunun radyoterapinin O_2 molekülünü O_2^- 'ye dönüşümünü direkt olarak mı? yada NADPH oksidaz aktivasyonuna neden olduğu bilinen bir takım immun kompleksler, kemokinler ve lökotirenler gibi maddelerin dolaşımdaki konsantrasyonlarını arttırmak suretiyle indirekt olarak mı? etkilediğini gösterememektedir.

Radyoterapi dozunun ortası ile sonundaki NADPH oksidaz aktivite düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmaması, radyoterapiye bağlı olarak meydana gelen nötrofil aktivasyonunun erken dönemde oluştuğunu ve bu etkinin radyoterapi sonuna kadar devam ettiğini düşündürmektedir. Bu düşüncemizi Lorimore ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma desteklemektedir. Bu çalışmada makrofajların radyasyon öncesi ve radyasyon uygulamasından 24 saat sonraki yapıları elektron mikroskopisi ile incelendiğinde hücre membran hasarının, lizozom sayısının ve büyüklüğünün arttığı bunlara ek olarak da makrofaj aktivasyonunun neden olduğu klasik ultrastruktürel değişikliklerin izlendiği belirtilmektedir. Bu hücrelerin lizozomal komponentlerinin çoğunun fagosite edilen materyallerin yıkıldığını gösteren sekonder ve tersiyer lizozomlar olduğu görülmüştür. Dokulardaki nötrofil infiltrasyonunun artmış fagositik hücre aktivitesinin belirteçleri olan artmış lizozomal ve oksidatif patlama aktivitesinin üzerine dayandırılmaktadır (6).

Apoptozis hücre içindeki genetik programın tetiklenmesi sonucunda ortaya çıkan aktif bir ölüm olayıdır. Apoptozisin gelişiminde kanser ilaçları, radyasyon, Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler ve oksidatif stressin neden olduğu belirtilmektedir.

lizozomu olduğu ancak minimal membran bozulması gösterdiği saptanmıştır. Bu hücreler apoptotik hücre fagositozunu göstermektedirler. Aslında apoptotik hücrelerin fagositozu normal hematopoezin özelliğidir (80) *İnvivo* ortamda normalde süregelen apoptozis çok belirgin değildir. Radyasyon uygulanmasından 24 saat sonra makrofajlar çok sayıda büyük sekonder lizozomların bulunduğu ve membran hasarı gösterirler. Bu bulgular artmış doku fagositoz aktivitesini ve hematopoetik sistem içerisindeki tüm makrofajların radyasyonun neden olduğu apoptotik hücrelerin tanımlanmasında ve fagositozunda rol oynadığını göstermektedir

Bizim çalışmamızda radyoterapi uygulaması sonunda 15 hastanın 7'sinde apoptozis saptandı. Apoptozis pozitif grup ile negatif grubun radyoterapi öncesi NADPH oksidaz aktiviteleri arasında bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Radyoterapi dozunun ortası ve sonunda apoptozis pozitif olan grubun NADPH oksidaz aktivitesinin, apoptozis negatif olan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Apoptozis pozitif olan grubun tedavi ortası ve sonundaki NADPH oksidaz aktiviteleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Bu sonuçlara göre radyoterapi uygulamasına bağlı olarak meydana gelen apoptozisin Lorimore ve arkadaşlarında (6) belirttikleri gibi nötrofil ve makrofajların birikimine neden olduğu, artmış olan apoptotik hücrelerin fagositozunu sağlamak içinde nötrofillerde oksidatif patlamanın arttığı düşünüldü. Bu nedenle radyoterapinin apoptozisi indüklediğini; Necas ve arkadaşlarının belirttiği gibi normal bir hematopoez gelişiminin bir süreci olan apoptozisin makrofaj aktivasyonuna neden olduğu düşünüldü.

Hastaların sadece 7 sinde apoptozis gelişiminin nedeninin radyasyona bağlı olarak oluşan oksidan metabolitlerin miktarlarına (76 ve 77 nolu çalışmalarda oksidan metabolitlerin apoptozis gelişimine neden olduğu belirtilmişti) veya apoptozis gelişiminde önemli olan p53 geninin mutasyon farklılıklarına bağlı olabileceği düşünüldü.

Apoptozis negatif olan grupta da radyoterapiye bağlı olarak NADPH oksidaz aktivitelerinin radyoterapi öncesine göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmişti. Fakat apoptozis gelişen grubdaki NADPH oksidaz aktivitesinin daha

yüksek olmasının gelişen apoptozis nedeniyle apoptotik hücreleri fagosite etmek amacıyla oluşan makrofaj aktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünüldü

İyonize radyasyon uygulaması hematopoetik sistem üzerinde baskılayıcı etkiye sahiptir. Kemik iliğinin baskılanması radyasyon uygulamasının en önemli akut toksik etkisidir. Bundan dolayı klinikte terapötik radyoterapi uygulamalarında kemik iliği rezervi önem taşımaktadır. Bir çok deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda total vücut radyoterapi uygulamasının lökosit, ve trombosit değerlerinde belirgin azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Radyoterapinin bu etkileri; uygulanan doza, tedavi edilen yere, tedavi uygulanan alanın yüz ölçümü, tedavi öncesi kan değerlerine, kanserin evresine ve alınan diğer ek tedavilere bağlıdır. Radyoterapi uygulanması sonrasında lökosit sayısında özellikle lenfosit sayısında azalmanın olduğu belirtilmektedir. Bazı çalışmalar parsiyel vücut ışınlamasının hematopoetik sistem ve periferal kan sayımları üzerine etkisinin olduğunu göstermesine rağmen radyoterapi alan bir hastanın hangi sıklıkla kan sayımlarının yapılması gerektiği tam olarak netleşmemiştir (35)

Bizim çalışmamızda radyoterapi uygulanmasına bağlı olarak hem tedavi ortasında, hem de tedavi sonunda tedavi öncesine göre lökosit ve nötrofil sayılarında anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.001$). Radyoterapi dozunun ortası ve sonunda lökosit ve nötrofil sayıları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$).

Bu bulgulara göre; radyoterapinin lökosit ve nötrofil sayısı üzerine olan etkilerinin erken dönemde oluştuğunu literatürdeki bilgilerle orantılı bir şekilde doğrulamaktadır. Tedavi ortası ve sonunda lökosit sayıları tedavi öncesine göre azalmış olmasına rağmen hastalardaki lökosit ve nötrofil sayıları febril nötropeni düzeyin de değildi. Ayrıca tedavi ortası ve sonundaki lökosit ve nötrofil sayıları arasında anlamlı bir fark olmaması; radyoterapiye bağlı gelişen sayıdaki azalmaların erken dönemde meydana geldiğini ve sürekli bir azalma yönünde olmadığını düşündürdü. Bu neden ile klinik uygulamalarda haftalık hatta bazen günlük olarak yapılan tam kan sayımlarının gerekli olmayabileceğini düşünmekteyiz. Zachariah ve arkadaşların çalışmalarında belirttikleri gibi radyoterapinin ilk haftasında yapılan kan sayımında lökosit değeri düşük, anemi, metastaz ve aynı zamanda kemoterapi alan hastaların tam kan sayımı sık kontrol

edilmelidir (2) Bunun dışındaki diğer hastalarda klinik semptomların varlığına göre kan sayımı sıklığının kişiye özel planlanabileceğini düşünmekteyiz.

Akciğer kanseri nedeniyle radyoterapi uygulanan hastalarda yapılan bu çalışmamız radyoterapiye bağlı olarak erken dönemde nötrofillerin hem sayı hem de aktivasyon açısından etkilendiği göstermektedir. Nötrofiller sayıca azalmış olmasına rağmen, radyoterapi uygulanmasına bağlı olarak NADPH oksidaz enziminin aktivasyonunda artma meydana gelmiştir. Radyoterapi uygulaması sonunda hastaların 7'sinde apoptozis tespit edildi. Apoptozis gelişen hastalarda NADPH oksidaz aktivasyon düzeylerinin gelişmeyenlere göre hem radyoterapinin ortası hemde sonunda daha yüksek olması; apoptozisin radyoterapiye bağlı olarak gelişen nötrofillerdeki oksidatif patlama üzerine olan etkilerini arttırdığını düşündürdü.

Yaptığımız bu çalışmanın radyoterapinin nötrofillerde oksidatif patlama üzerine uyarıcı etkisinin olduğunu belirten çalışmalara destek olacağını, ayrıca artan bu oksidatif patlama sonucu oluşan hücre içi reaktif oksijen radikallerinin dokulardaki etkilerini araştırmak için yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar açısından yararlı olacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

Bu çalışmamızda; Akciğer kanserli hastalarda radyoterapi uygulanmasının nötrofillerde oksidatif patlama üzerine etkilerini inceledik

Akciğer kanseri tanısı ile radyoterapi uygulanmasına karar verilen 17 hastanın radyoterapi öncesi, planlanan radyoterapi dozunun ortasında ve sonunda nötrofil NADPH oksidaz aktivitesi florometrik yöntemle ölçüldü. Hastalardan radyoterapi öncesi, planlanan radyoterapi dozunun ortasında ve sonunda lökosit ve nötrofil sayıları ölçüldü. Radyoterapi uygulanması sonunda apoptozis gelişimi agaroz jel elektroforez yöntemi ile araştırıldı.

Lökosit ve nötrofil sayılarının tedavi ortası ve sonunda daha düşük olduğu bulundu ($p<0,001$) Nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesinin düzeylerinde kontrol grubu ile radyoterapi öncesi arasında fark bulunamadı. Radyoterapi uygulanmasına bağlı olarak tedavinin hem ortasında hem de sonunda NADPH oksidaz aktivitesinde radyoterapi öncesine göre anlamlı bir artma tespit edildi ($p<0,001$). Radyoterapi uygulanan 7 hastada apoptozis tespit edildi. Apoptozis pozitif olan hastalarda nötrofillerde oksidatif patlamanın apoptozis negatif olgulara göre hem radyoterapinin ortası hem de sonunda daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,001$).

Çalışmamızda radyoterapinin lökosit ve nötrofil sayılarının azalmasına neden olur iken; nötrofiller üzerinde oksidan patlamanın artışına yol açtığı tespit edildi. Apoptozisin radyoterapi uygulanmasına bağlı olarak oluşan oksidatif patlamayı kuvvetlendirici etkisi bulunduğu tespit edildi

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Radyoterapi, Nötrofil, NADPH oksidaz, Apoptozis.

KAYNAKLAR

- 1 Carlos A P. Principles and practice of radiation oncology , 3th, 1998
- 2 Zachariah B , Jacob S., Gwede R , Cantor A. Effect of fractionated regional external beam radiotherapy on peripheral blood cell count. *Int J. Radiation Oncology Biol Phys.*2001; 50(2):465-472.
3. Van Eden F., Klut M., Walker B., Hogg J. The use of flow cytometry to measure neutrophil functions. *Journal of Immunological Methods* 1999; 232:23-43.
- 4 Sabitta K E., Shyamaladevi C.S Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol* 1999; 35(3):273-277
5. Gaitan S., Cuenllas E, Sancho P., Bueren J A , Tejero C. Mechanisms towards compensation of long-term hemopoietic injury in mice after 5 Gy irradiation : in vivo and in vitro enhancement of superoxide anion production by granulocytes *Biosci Rep.* 1992; 12(4):281-92.
- 6 Lorimore S., Coates P, Scobie G., Milne G, Wright E Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects. *Oncogene* 2001; 20:7085-7095
7. Parker S., Tong I., Bolden S Cancer statistics-1997. *Cancer J Clin* 1997; 47(1):5-27.
8. Johnson W. Histologic and cytologic patterns of lung cancer in 2580 men and women over a 15-year period. *Acta Cytol* 1998; 32:163-68.

9. Galietti F., Giorgis G., Toffola A. Epidemiology study of 3398 cases of lung cancer histological ascertained in 1973 to 1984. *Panminevra Med.* 1988; 30:16-22.
10. Wynder E., Hoffmann D. *Tobacco and Tobacco Smoke. Studies in Experimental Carcinogenesis* New York, Academic Press 1967
11. Doll R., Hill A. A study of the etiology of carcinoma of the lung. *Br. Med. J.* 1952
12. Hammond E., Horn D. Smoking death- rates report on forty-four months on follow-up of 187,783 men *JAMA* 1958; 166:1159.
13. Feinstein A., Geilfman N., Yesner R. Observer variability in the histopathologic diagnosis of lung cancer. *Am. Rev. Respir. Dis* 1970; 101:671-684
14. Mountain C.F. A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986; 89:225-232.
15. Sagel S: *Lung, pleura, pericardium and chest wall. Computed body tomography* New York, Raven press, 1983.
16. Rubenstein J., Richter M., Moldofsky P. Prospective prediction of post-radiation therapy lung function using quantitative lung scans and pulmonary function testing *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15:83-87
17. Erozan Y., Frost J. Cytopathological diagnosis of lung cancer. *Semin Oncol* 1974; 1:191-198
18. Kvale P., Bode F., Kini S. Diagnostic accuracy in lung cancer: Comparison technigues used in association with flexible fiberoptic bronchoscopy *Chest* 1976; 69:752-757.

19. Thomas P Role of mediastinal staging of lung cancer. Chest. 1994;106:331-333.
20. Skinner W. Pulmonary neoplasms diagnosed with transthoracic needle biopsy. Cancer 1979; 43:1533-1540
21. Coutard H. Principles of x-ray therapy of malignant diseases. Lancet 1934; 2:1-8.
22. Wu L.J., Randers G , Xu A , Waldren C.A. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutation in mammalian cells. Proc Natl Acad. Sci. USA 1999; 96(9):4959-4964
23. Narayanan PK , Goodwin EH , Lehnert BE Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. Cancer Res 1997; 57(18):3963-3971.
24. Girald S.A. , Champlin R.E Leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. Blood 1994; 84(11):3603-3612.
25. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_metin.htm
26. http://www.altavista.com/sites/search/mm_imageresults?pg=q&styp=siimage&imgset=2&q=apoptosis&avkw=qtrp
27. Ulukaya E. Kanser ve apoptozis ilişkisi. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu 2002; 45-46
28. Joseph B , Lewensohn R., Zhivotovsky B Role of apoptosis in the response of lung carcinomas to anti-cancer treatment Ann N Y. Acad. Sci 2000; 926:204-216.
29. Lyng F.M , Seymour C., Mothersill C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. British Journal of Cancer 2000; 83(9):1223-1230.

- 30 Chiang C.S., McBride W.H., Withers H.R. Radiation induced astrocytic and microglial responses in mouse brain *Radiother Oncol* 1993; 29(1):60-68.
- 31 Hong J., Chiang C., Campbell I.L. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995; 33(3):619-626.
- 32 Wheldon T.E., Michalowski A.S., Kirk J. The effect of irradiation on function in self-renewing normal tissues with differing proliferative organisation *Br. J. Radiol.* 1982; 55(658):759-766.
- 33 Chiang C.S., McBride W.H., Withers H.R. Myelin associated changes in mouse brain following irradiation. *Radiother. Oncol.* 1993; 27(3):229-236.
- 34 Turesson I. The progression rate of late radiation effects in normal tissue and its impact on dose-response relationships. *Radiother. Oncol.* 1989; 15(3):217-226.
- 35 Yang F., Vaida F., Ignacio L. Analysis of weekly complete blood counts in patients receiving standard fractionated partial body radiation therapy *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 1995; 33:607-617.
- 36 Eeden V., Klut M., Walker B., Hogg J. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *Journal of Immunological Methods* 1999; 232:23-43.
- 37 Witko V., Rieu P., Descamps B., Lesavre P., Halbwachs L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects *Laboratory Investigation* 2000; 80(5):617-640.
- 38 Parkin J., Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet* 2001; 357:1777-1789.
- 39 Campbell P.A. The neutrophil, a professional killer of bacteria, may be controlled by T cells. *Clin. Exp. Immunol* 1990; 79:141-143.

- 40 Yagisava M, Yuo A, Yonemaru M, Ohmi S, Kanegasaki S. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes. *Biochemical and Biophysical Research* 1996; 228:510-516.
41. Lucchesi B R. Complement, Neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury *Drug Res* 1994; 44(1):420-432
- 42 Lindsay M, Giembycz M. Signal transduction and activation of the NADPH oksidase in eosinophils *Memorias do Instit Oswaldo Cruz*. 1997; 92:115-123.
43. Smith R.M, Woodman R. and Babior B.M. Lymphocytes and Granulocytes *Blood Cell Biochemistry* 1991; 3:215-254.
44. Babior B.M The respiratory burst oxidase. *Adv.Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 1992; 65:49-95
- 45 Lawson N., Berliner N. Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. *Experimental Hematology* 1999; 27:1355-1367.
46. De Leo FR, Ulman KV, Davis AR, Jutila KL, Quinn MI. Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67^{phox} and flavocytochrome b to a common functional domain in p47^{phox}. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:17013-17020.
47. Segal A.W., Jones O.I., Webster D., Allison A.C. Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet* 1978; 2(8087):446-449.
- 48 Nathalie B, Michael P. The Neutrophil: Function and Regulation in Innate and Humoral Immunity *Clinical Immunology* 2001; 99(1):7-17
- 49 Parkos C A., Dinauer M.C., Jesaitis A J., Orkin S H., Curnutte J T. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two

- genetic forms of chronic granulomatous disease *Blood* 1989; 73(6):1416-1420.
50. Dinauer M.C. The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1993; 30(4):329-369.
51. Nauseef W.M., Volpp B.D., McCormick S., Leidal K.G., Clark R.A. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:5911-5917.
52. Hata K., Ito I., Takeshige K., Sumimoto H. Anionic amphiphile-independent activation of the phagocyte NADPH oxidase in a cell-free system by p47phox and p67phox, both in C terminally truncated forms. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:4232-4236.
53. Frohlich D., Spertini O., Moser R. The Fc gamma receptor-mediated respiratory burst of rolling neutrophils to cytokine-activated, immune complex-bearing endothelial cells depends on L-selectin but not on E-selectin. *Blood* 1998; 91:2558-2564.
54. Faust L.R., Benna J., Babior B.M., Chanock S.J. The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J. Clin. Invest.* 1995; 96:1499-1505.
55. El Benna J., Dang P.M., Gaudry M., Fay M., Morel F., Hakim J., Goutgerot-Pocidalò M.A. Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67(phox) during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:17204-17208.

- 56 Han C H., Freeman J.L., Lee T., Motabeli S A., Lambeth J.D. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem.* 1998; 273:16663-16668.
- 57 Koga H., Terasava H., Nunoi H., Takeshige K., Inagaki F., Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol Chem.* 1999; 274:25051-25060.
- 58 Philips M.R., Feoktistov A., Pillinger M.H., Abramson S.B. Translocation of p21rac2 from cytosol to plasma membrane is neither necessary nor sufficient for neutrophil NADPH oxidase. *J Biol. Chem.* 1995; 270: 11514-11521
- 59 Ambruso D.R., Knall C., Abell A.N., Panepinto J., Kurkchubasche A. et al. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97:4654-4659
- 60 Harry L., Gallin J. Neutrophils in human diseases. *The New England Journal of Medicine* 1987; 317(11):687-694
- 61 Fang W., Myllys V., Sandholm M. Resazurin reduction as a function of respiratory burst in bovine neutrophils. *AJVR* 1997; 58(6):601-607
- 62 Jeffrey M., Dood O., Pearse B. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia - reperfusion lung injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol* 2000; 279:303-312.
- 63 Shiloh M.U., Ruan J., Nathan C. Evaluation of bacterial survival and phagocyte function with a fluorescence-based microplate assay. *Infection and Immunity* 1997; 65(8): 3193-3198

64. Lesuisse E , Casteras M, Labbe P Evidence for the *saccharomyces cerevisiae* ferriductase system being a multicomponent electron transport chain. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(23):13578-13583
65. Li Y F., Luo Z.P. Desipramine antagonized corticosterone-induced apoptosis in cultured PC12 cells. *Acta Pharmacol.Sin* 2002; 23(4):311-314
66. Walker P R , Leblanc J, Smith B , Pandey S., Sikorska M Detection of DNA fragmentation and endonucleas in apoptosis. *Methods* 1999; 17(4):329-338
67. Allen P.D , Newland A C. Electrophoretic DNA analysis for the detection of apoptosis. *Mol. Biotechnol* 1998; 9(3):247-251.
- 68 Fournel S , Genestier L , Rouault J P., Lizard G , Flacher M., Assosson O. Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS Lett* 1995; 367(2):188-192
- 69 Braun DP , Harris JE , Maximovich S and et al Chemiluminescence in peripheral blood mononuclear cells of solid tumor cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 1981; 12:31-37.
- 70 Starkebaum E , Stevens DL , Henry C. And et al. Stimulation of human neutrophil chemiluminescence by solubl immune complexes and antibodies to neutrophils *J Lab. Clin Med.* 1981; 98: 280-291
71. Chasseing A., Baranao R, Fernandez O, Bordenave H, Rumi L. Chemiluminescence production by neutrophils and immune complex levels in cancer patients. *Cancer Investigation* 1993; 11(5):517-522
- 72 Agrawal A , Chandra^{ra}D , Kale R K. Radiation induced oxidative stress: II studies in liver as a distant of tumor bearing mice. *Mol Cell Biochem.* 2001; 224(1-2):9-17.

73. Sabitha K E , Shyamaladevi C.S Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol* 1999; 35(3):273-277
74. Gaitan S., Cuenllas E , Sancho P , Bueren J.A Tejero C. Mechanisms towards compensation of long-term hematopoetic injury in mice after 5Gy irradiation: invivo and invitro enhancement of superoxide anion production by granulocytes. *Biosci Rep.* 1992;12 (4):281-292.
75. Iyer R., Lehnert B.E Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 376(1):14-25
- 76 Feng Z., Li L., Ng PY., Porter AG Neuronal differentiation and protection from nitric oxide-induced apoptosis require c-jun-dependent expression of NCAM140 *Mol Cell Biol* 2002; 22(15):5357-5366
- 77 Bonnefoy M., Drai J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.* 2002; 31(25):1174-1184
78. Frossi B , Tell G , Spessotto P , Colombatti A , Vitale G., Pucillo C H₂O₂ induced translocation of APE/Ref-1 to mitokondria in the Raji B-cell line *J Cell Physiol* 2002; 193(2):180-186
79. Stress-Induced Fas Ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18(9):5414-5424
- 80 Necas E , Sefc L , Sulc K , Barthel E , Seidel HJ Estimation of extent of cell death in different stages of normal murine hematopoiesis. *Stem cells* 1998; 16(2):107-111.