

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**RADYOTERAPİ İLE İNDÜKLENMİŞ SPESİFİK
YARA İYİLEŞME BOZUKLUĞUNDA
GRANÜLOSİT MAKROFAJ-KOLONİ STİMÜLE
EDİCİ FAKTÖRÜN ETKİSİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. DİCLEHAN KILIÇ

ANKARA - 2000

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Normal Yara İyileşmesinin Histopatolojisi.....	3
2.2.İyonize Radyasyonun Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri.....	4
2.3.Büyüme Faktörleri ve Yara İyileşmesi.....	7
2.4.Granülosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktörü.....	11
2.4.1. Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri.....	11
2.4.2. Yara İyileşmesindeki Yeri.....	12
2.4.3. Yan Etkileri.....	13
2.4.4. Yara Onarımında Kritik Rolü Olan Hücre Tipleri Üzerinde GM-CSF'in İn Vitro Aktiviteleri.....	14
2.5.Yara Kopma Kuvveti ve Yara İyileşmesindeki Önemi.....	15
3. MATERYAL VE METOD.....	16
3.1.Araştırma Planı.....	16
3.2.Tüm Vücut Işınlaması.....	17
3.3.Düz Cerrahi Kesi Oluşturulması.....	17
3.4.Yara Kopma Kuvveti Ölçümleri.....	18
3.5.Histopatolojik İnceleme.....	18
3.6.Sonuçların Analizi.....	19
4. BULGULAR.....	19
4.1.Yara Kopma Kuvveti Sonuçları.....	19
4.2.Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	25

4.2.1.Detaylı Mikroskopik Bilgi.....	25
4.2.2.Genel Grup Özellikleri.....	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
6. ÖZET.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48



KISALTMALAR

BS: Kopma Kuvveti (Breaking Strength)

CI: Güven Aralığı (Confidence Interval)

EGF: Epidermal Büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor)

GM-CSF: Granülosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktör (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)

GSH: Redükte Glutasyon (Reduced Glutathione)

IL: İnterlökin (Interleukin)

iv: intravenöz (intravenous)

LC: Langerhans Hücresi (Langerhans Cell)

PDGF: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor)

rHuGM-CSF: Recombinant İnsan Granülosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktörü (recombinant Human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)

RT: Radyoterapi (Radiotherapy)

sc: ciltaltı (subcutaneous)

SE: Ortalamanın Standart Hatası (Standard Error of Mean)

TBI: Tüm Vücut Işınlaması (Total Body Irradiation)

TGF: Doku Büyüme Faktörü (Tissue Growth Factor)

TNF: Tümör Nekrozis Faktör (Tumour Necrosis Factor)

TS: Gerginlik Kuvveti (Tensile Strength)

WBS: Yara Kopma Kuvveti (Wound Breaking Strength)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Radyasyon Onkolojisi; iyonizan radyasyon kullanarak kanser veya kanser dışı seçilmiş belirli hastalıkların tedavisini amaçlayan, bu gaye ile radyasyonun etkilerini ve davranışlarını inceleyen, bu konuda eğitim ve araştırma yapan dahili bir tıp bilimidir. Radyoterapi (RT), değişik sistem ve kaynaklardan elde edilen iyonizan radyasyonun kanserli dokular üzerine yöneltilerek tedavi edilmesidir. Kanser RT'sinde amaç, tanımlanmış tümör dokusu çevresindeki normal dokuları yapısal ve fonksiyonel olarak tahribata uğratmadan tümörün tamamen yok edilmesidir. Normal dokularda onarımı mümkün zararlar bir noktaya kadar kabul edilmekte, ancak hayati dokuların mutlaka korunması gerekmektedir. Böylece tümörün yok edilmesi, yaşam kalitesinin yükseltilmesi ve sağkalımın uzatılması amaçlanmaktadır (13, 51).

Çoğu epitelyal neoplazmin kûratif tedavisinde cerrahi ile birlikte preoperatif (neoadjuvan) veya postoperatif (adjuvan) radyoterapi günümüzde sıkça uygulanmaktadır. Cerrahi ve RT'nin beraber uygulanmasının temel mantığı, her iki tedavi yaklaşımı sonrası görülen tedavi başarısızlıklarının oldukça farklı mekanizmalarla olması nedeniyledir. Preoperatif RT, rezeksiyon sahası kenarlarındaki ve cerrahi esnasında çevreye ekilebilecek tümöral hücreleri sterilize etmek, bazı durumlarda da lokal ileri evre tümörler gibi rezeke edilemeyecek durumdaki tümörlerde tümör hacmini rezeke edilebilecek kadar küçültmek amacıyla uygulanmaktadır (13, 57). Her tedavi hastaya sağlayacağı yarar yanında doğal olarak bazı riskleri ve istenmeyen etkileri de içermektedir. Radyoterapi uygulamasıyla tedavi sahasına giren tüm normal dokularda olduğu gibi ciltte de radyasyon hasarı meydana gelmektedir. Radyoterapiye bağlı meydana gelen erken ve geç dönem doku hasarı,

radasyunun mikrovasküler ve destek bağ dokusunda meydana getirdiği değişikliklere bağlı olarak oluşur. İyonize radyasyonun normal dokular üzerindeki etkisi; uygulanan toplam radyasyon dozuna, fraksiyonasyon şemasına, tedavi hacmine ve dokunun kinetiğine bağlıdır (43).

Onkolojide GM-CSF, myeloid dışı malignansiler için sitotoksik kemoterapi uygulanan hastalarda febril nötropeni oluş sıklığını ve süresini azaltmak için kullanılır. Son yıllarda kemoterapi veya radyoterapi gören hastalarda cilt ve mukozadaki belli yan etkilerin azaltılması amacıyla da kullanılmaktadır (1).

Lenfoid olmayan dokulardaki Langerhans hücreleri gibi dendritik hücreler (doku dendritik hücreleri), lenfoid organlardaki dendritik hücrelere göre daha az matürdürler ve T hücrelerine duyarlı değildirler (26, 27, 58). 1992 yılında Kaplan ve arkadaşları, GM-CSF uygulanmış lepralı hastaların ciltlerinde keratinosit gelişiminin ve dermise Langerhans hücre göçünün arttığını, yara iyileşmesinin hızlandığını göstermişlerdir (26). Bir başka çalışmada ise GM-CSF'in insan derisine enjeksiyonu ile keratinositlerin proliferasyonunun ve epidermisin rejenere diferansiyasyonunun arttığı gösterilmiştir (7).

Modern radyasyon tekniklerine büyüme faktörleri eklenerek tek model iyileşme bozuklukları düzeltilebilir. Ratlarda yapılacak cilt kesisi modelinde, 8 Gy'lik Cobalt 60 foton tüm vücut ışınlaması kemik iliğini baskılayarak dolaşımdaki monositlerin yanısıra yara iyileşmesinde önemli olan mononükleer fagosit sistemde belirgin baskılanma oluşturur (11).

Bu randomize, kontrollü çalışmada literatürde daha önce bildirilmeyen tüm vücut ışınlama ile kemik iliği baskılanarak cerrahi insizyon uygulanan hayvan

modellerinde GM-CSF'in yara iyileşmesi üzerine etkisinin yara kopma kuvveti ve histopatolojik değerlendirmeye araştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Yara İyileşmesinin Histopatolojisi

Temiz bir insizyon varlığında ve yara ağzları dikişle yanyana getirildiğinde görülen iyileşme yara iyileşmesinin en az komplike örneğidir ve primer iyileşme (Primary Union, Healing by First Intension) olarak adlandırılır. İnsizyon sınırlı sayıda epitel ve bağ dokusu hücresi yıkımına sebep olur. İnsizyon alanı dardır, hemen fibrin ve kan hücreleri içeren pıhtı ile dolar. Yüzeydeki pıhtının dehidrate olmasıyla krut meydana gelir. Krut yarayı örter ve dış çevreden izole eder (16).

İyileşme erken dönemde akut inflamasyonla başlar, 24 saat içinde insizyon kenarları nötrofiller ve monositlerce infiltre edilir ve eksuda sıvısı ile ödemlenir. Makrofajlar; mikroorganizmaları, ölü parankim hücreleri ve nötrofillerin oluşturduğu nekrotik debrisleri ortadan kaldırır. Genellikle 3-5. güne kadar, bazen ise 24 saat gibi çok kısa süre sonra fibroblastlar ve vasküler endotel hücreleri proliferasyon olarak yara iyileşmesinin temel özelliği olan özel bir tip dokuyu, "granülasyon dokusunu" meydana getirirler (2). Granülasyon dokusundaki proliferasyon fibroblastlar artmış miktarda granüler endoplazmik retikulum içerir ve histolojik kesitlerde iri ve tombul yapıda izlenirler(16).

Fibroblastların görevi proteoglikan ve kollajen sentezlemektir. Bazıları ise çentikli nükleus yapısı ile granülasyon dokusunun periferinde yoğunlaşarak düz kas hücresi özellikleri kazanırlar ve myofibroblast olarak adlandırılırlar (56). Uygun

kemotaktik stimulus varlığında, hemen her zaman bulunan makrofajlara ek olarak nötrofiller, eozinofiller, mast hücreleri ve lenfositler de granülasyon dokusunda görülür. İyileşme ilerledikçe kollajende artış, fibroblast ve damar sayısında azalma gerçekleşir. Sonuçta, granülasyon dokusu inaktif görünümde içsi fibroblastlar, yoğun kollajen demetleri, elastik doku fragmanları, ekstrasellüler matriks ve az sayıda damardan oluşan skar dokusuna dönüşür. 7-10. gün sonunda epidermis normal kalınlığa ve matürasyona ulaşır. Yüzey keratinizasyonu görülür. Yara gerilme kuvvetindeki artış ilk 6 ay boyunca devam eder ve orijinal gücün % 80'ine ulaşır (15, 16).

Yara iyileşmesinde rol oynayan makrofaj, fibroblast ve endotel hücrelerinin onarım kapasitesi; dokunun oksijenizasyonu, laktat düzeyleri ve ortamdaki büyüme faktörlerinden başka beslenme ve endokrin durum gibi sistemik faktörlerden de etkilenir (28).

2.2. İyonize Radyasyonun Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

İntraoperatif radyoterapi haricindeki hemen tüm radyasyon tedavileri zorunlu olarak deriyi ilgilendirmektedir. Derideki her hücre tipi radyasyon hasarına kendine özgü bir şekilde cevap verir. Terapötik radyasyon, yara iyileşmesinde çeşitli basamakları değiştirerek etkisini gösterir. Derideki geç radyasyon etkilerinin, yara iyileşmesini belirgin olarak engellediği bilinmektedir. Ancak, latent devrenin uzunluğu nedeniyle hayvan modeli oluşturmada karşılaşılan güçlükler, araştırmacıların çoğunlukla radyasyonun yara iyileşmesine erken etkileri üzerinde yoğunlaşmalarına neden olmuştur (3).

Bu çalışmalar sonucundaki radyasyonun yara iyileşmesine etkisi ile ilgili bulgular şöyledir (5):

1) İskemi:

Damarların bazal membranlarında meydana gelen dejeneratif değişiklikler, damar geçirgenliğinin artması, tromboz, fibrozis ve iskemi ile sonuçlanır. Endotel hücrelerinin radyasyon nedeniyle çoğalma yeteneğini kaybetmesi, uzun vadede kan damarlarının ortadan kalkmasıyla sonuçlanmaktadır. Normal olarak yara iyileşmesi basamaklarından birini oluşturan angiogenez radyasyon etkisiyle bozulur.

2) Hipoksi:

İskeminin doğal sonucu olarak doku hipoksisi ortaya çıkar. Yara iyileşmesinde oksijen perfüzyonunun gerekli olduğu basamaklar durur. Bunlar: Nötrofillerin antibakteriyel aktivitesi, kollajen sentezi, epitel hücre replikasyon hızı ve angiogenezdur. Oksijen, lizil hidroksilasyonu ve çapraz bağlanma sırasında gereklidir. Hipoksik alanda angiogenezin artması için, periferde oksijen perfüzyonunun yüksek olması gerekmektedir. Hipoksi, dokuyu enfeksiyonlara açık hale getirir (45).

3) Hematopoezin azalması:

Tüm vücut ışınlamasından sonraki 2 gün içerisinde kemik iliğindeki radyosensitif hücreler ölür. Yara iyileşmesi sırasında çeşitli kan elemanları rol oynamaktadır. Lenfositler dışında dolaşımdaki hücreler, ömürleri ile orantılı olarak sayıca azalır. Sırasıyla etkilenen hücreler olarak nötrofiller, monositler, trombositler ve eritrositler

sayılabilir. Özellikle makrofaj prekürsörlerinin azalması, yara iyileşmesindeki gecikmeden sorumlu olabilir (4, 5, 45, 63).

4) Fibroblastlara toksik etki:

Bağ dokusunun radyasyona duyarlılığı orta derecededir; ancak fibroblastlar onarılmaz derecede zedelenir. Fibroblastlar, başta kollajen sentezi olmak üzere deri onarımı ve yeniden şekillenme evrelerinde en önemli hücrelerdir. Klinikte, kontraktürle sonuçlanan cilt atrofisi ve fibrozis görülür. Kronik radyasyon etkilerini araştırmak amacıyla radyoterapi uygulanan hastalardan hazırlanan fibroblast kültürlerinde büyümenin normal kontrollere göre çok daha yavaş olduğu görülmüştür (4, 45).

5) Epitel hücrelerinde ölüm veya mitotik aktivitenin bozulması:

Radyasyon etkisiyle anormal mitozlar, büyük, bozuk şekilli hücreler oluşur. Epitel hücrelerinin çoğu ölür, epidermis incelikler veya tamamen ortadan kalkar (45).

Yara iyileşmesinde rol oynayan çok çeşitli büyüme faktörlerinin salınımının radyasyon etkisiyle arttığı gösterilmiştir. Ancak biyolojik aktivitelerinin ne şekilde etkilendiği henüz bilinmemektedir. Bazı büyüme faktörlerinin (PDGF, TGF- β), hipoksik etkileri geri çevirmede etkili olduğu bilinmektedir (45).

Radyoterapi ile yara iyileşmesinin gecikmesi iki nedenle olur: 1) İnflamatuvar reaksiyona bağlı olarak dokuda vaskülarizasyon ve mikrosirkülasyonun bozulması 2) Radyasyonun yara iyileşmesi için gerekli olan kemik iliği veya dermal kökenli hücreler

üzerine sitotoksik etkisi. Yanase ve arkadaşları, preoperatif RT uyguladıkları hayvan yara modellerinde radyasyonun yara iyileşmesine etkisinde 3 ayrı evre olduğunu belirtmişlerdir: 1) Işınlamadan hemen sonra etkinin en az olduğu dönemde hafif yara kontraksiyonu mevcuttur. 2) Işınlamadan 2 hafta sonra doza bağımlı olarak yara kontraksiyonunda belirgin azalma olur. 3) Işınlamadan 8 hafta sonra yara kontraksiyonu düzelir (71).

Araştırmalar yara iyileşmesinde azalmaya neden olan eşik dozun 8 Gy, maksimum dozun 20 Gy olduğunu göstermiştir. Tedavi edici radyasyonun bölünmüş ufak dozlarda verilmesi ile yara iyileşmesinin bozulması daha az görülmektedir (4, 5). Radyoterapinin yara iyileşmesini geciktirdiği anlaşıldıktan sonra bu bilgilerden günlük kullanımda nasıl faydalanılacağı önem kazanmıştır. Araştırmalar, yaralanmadan 1 hafta sonra verilen radyasyonun yara iyileşmesini etkilemediğini göstermiştir. Radyoterapi ile cerrahinin birlikte kullanılacağı durumlar için de bu planlama önemlidir. Radyoterapi, orta dozlarda ve cerrahiden 3-6 hafta önce uygulandığında komplikasyonları arttırmaz. Ancak dozun 50 Gy'den fazla olması veya radyoterapinin 10 Gy gibi düşük dozda bile olsa cerrahiden 24 saat önce verilmesi komplikasyonları arttırmakta ve yara iyileşmesini geciktirmektedir (5). Radyoterapi cerrahiden sonra uygulanacaksa yara iyileşmesi için 8-10 gün beklenmelidir (29).

2.3. Büyüme Faktörleri ve Yara İyileşmesi

Büyüme faktörleri ağırlıkları 4000-60000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktiviteyi etkileyebilen proteinlerdir. Farklı faktörlerin görevleri ve etkileri ile ilgili hala yeni bulgular elde edilmektedir. Büyüme faktörleri;

endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin mekanizmalar aracılığıyla hücrel fonksiyonlarını gerçekleştirirler.

- Endokrin yolla etkileyen faktörler hedef hücreye kan yoluyla gider ve uzaktaki hücreleri de etkiler.
- Parakrin yolla etki eden faktörler salgılandıkları bölgede etkilidirler.
- Otokrin faktörler salgılandıkları hücrenin fonksiyonlarına etkirler.

Bazı transforme fibroblastlar, hiç salgılanmamış faktörlere hücrenin kendi içinde, intrakrin mekanizma ile yanıt verirler (61). Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi için, o hücrenin o faktör için reseptöre sahip olması gerekir. Reseptöre bağlanma sonucunda hücre içinde özgül bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki, çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörü bulunur. Büyüme faktörlerinin o bölgedeki konsantrasyonu ve reseptöre bağlanan miktarı, elde edilecek sonucu belirler. Matriks de büyüme faktörlerinin çözünürlüğünü değiştirerek hücrel aktiviteleri düzenleyecek konsantrasyonun değişmesini sağlayabilir. Ayrıca matriks, büyüme faktörlerinin bağlanıp çözülmesini ayarlayarak ortamdaki faktörler için rezervuar görevi görür. Yine matriks, herhangi bir hücrenin herhangi bir büyüme faktörüne vereceği yanıtı belirleyebilir (36).

TABLO I. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Büyüme Faktörleri*

Büyüme Faktörü	Kaynağı	Görevleri
Trombosit-kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor, PDGF)	Trombositler, makrofajlar	Fibroblast proliferasyonu nötrofil ve makrofaj kemotaksisi ve proliferasyonu, angiogenez
Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor β , TGF- β)	Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofaj, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, kemotaksis, indirekt angiogenez, diğer büyüme faktörlerinin etkilerine yardım
Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF)	Trombositler (?), tükürük, idrar, anne sütü, plazma	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunun uyarılması
Transforme edici büyüme faktörü alfa (Transforming growth factor α , TGF- α)	Aktive makrofajlar (?), trombosit, keratinosit, bazı dokular	EGF'ye benzer
İnterlökinler (Interleukins 1-2, IL-1,2)	Makrofaj, lenfosit, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, kollajenaz, nötrofil kemotaksisi
İnterferonlar (Interferons, IFN)	Lenfositler, fibroblastlar	Fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezinin inhibisyonu

Büyüme Faktörü	Kaynağı	Görevleri
Lökosit kaynaklı büyüme faktörü (Leucocyte derived growth factor, LDGF)	Makrofaj, mast hücresi, T lenfositler	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
Bağ dokusu büyüme faktörü (Connective tissue growth factor, CTGF)	Endotel hücreler, fibroblastlar	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
Fibroblast büyüme faktörleri (Fibroblast growth factors, FGF)	Beyin, pitüiter bez, makrofaj, diğer doku ve hücreler	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, matris depolanmasını uyarır, anjiogenez, yara kontraksiyonu
Keratinosit büyüme faktörleri (keratinocyte growth factors, KGF)	Fibroblastlar	Epitel hücre proliferasyonu
İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1)	Karaciğer, plazma, fibroblastlar	Sülfatlı proteoglikanlar ve kollajen sentezini, fibroblast proliferasyonunu uyarır
İnsülin büyüme hormonu (Human growth hormone, HGH)	Pitüiter bez, plazma	Anabolizan, IGF-1'i uyarır

*(32,62)

2.4. Granülosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktörü

2.4.1. Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri

Rekombinan İnsan Granülosit Makrofaj-Koloni Stimüle Edici Faktörü (recombinant Human Granulocyte Macrophage –Colony Stimulating Factor, rHuGM-CSF) olan Molgramostim suda çözünebilen, non-glikozile, 100. pozisyonda izolösün içeren bir proteindir. 127 aminoasit içerir ve moleküler ağırlığı 14477 daltondur. Molgramostim insan GM-CSF geninin genetik mühendislik yöntemleri ile plazmidine aktarıldığı bir Escherichia coli suşu ile üretilir (25, 65).

GM-CSF, hem hematopoezisin düzenlenmesinde hem de olgun myeloid hücrelerin aktivasyonunda rol alan çok görevli bir glikoprotein olduğundan, in vitro düzeyde hematopoetik hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyonlarını uyararak granülosit, monosit/ makrofaj ve T lenfosit artışını sağlar. İnsan tümör klonojenik izleniminde taze tümör hücresi ekimleri ile yapılan çalışmalarda, Molgramostimin tümör hücre büyümesini uyarmadığı ve inhibe etmediği gösterilmiştir (38). GM-CSF, monositler üzerindeki sınıf II major doku uyumluluk antijeni (HLA Class II) ekspresyonunu artırabilir ve antikor üretimini güçlendirebilir. Bakteri fagositozunun güçlendirilmesi, malign hücreler üzerindeki sitotoksitenin artırılması ve konak savunmasının önemli bir reaksiyonu olan oksidatif metabolizma artışında öncüllük gibi olgun nötrofillerin fonksiyonel aktivitelerini belirgin olarak artırır (27, 65, 66).

2.4.2. GM-CSF'in Yara İyileşmesindeki Yeri

GM-CSF'in hücresel kaynakları T lenfositler, makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar ve keratinositlerdir (37, 42, 49). Tümör Nekrozis Faktör (TNF)- α , TNF- β ve İnterlökin (IL)-1; endotelial hücreler ve fibroblastlarda GM-CSF sentezinin efektif indükleyicileridir (39, 42, 68). GM-CSF genel olarak hematopoetik etkileriyle bilinir, ancak bazı ekstra-hematopoetik etkileri de vardır. Bunlardan birisi de fibroblastların yanısıra ultrastrüktürel olarak tipik myofibroblastların oluşumunu sağlamasıdır. Granülasyon dokusunun retraksiyonu kontraktil özelliği olan stromal hücrelerce (myofibroblastlar gibi) sağlanır (42, 55).

Normal yara iyileşmesi için yara yerine makrofaj ve fibroblast göçü gereklidir. Dolaşımdaki monositler, yaradaki makrofajların öncüsü olarak kabul edilirken, fibroblastlar dermisteki sessiz hücrelerden oluşurlar. Her iki hücre tipi de iyileşen yara bölgesine kemotaktik bir uyarım sonrası gelirler (44). Homeostatik durumlarda, GM-CSF geninin keratinositlerde ekspresyonu ve proteinin sekresyonu sınırlıdır. Ancak mekanik stres ve IL-1 veya TNF- α ile in vitro temas durumlarında keratinositler GM-CSF sentezlemeye zorlanırlar (33). GM-CSF ve aktive T hücrelerden üretilen IL-3 keratinositleri prolifere ederler (21). Tam kanıtlanmamasına rağmen, sitokin ve/veya stresle aktive olmuş keratinositlerden salınan GM-CSF'in, epidermal büyüme ve diferansiyasyonunda otokrin ve/veya parakrin regülatör olarak görev yaptığı düşünülmektedir. GM-CSF'le indüklenen sekonder sitokinlerin salınmasına bağlı olarak GM-CSF'in epidermal hücre proliferasyonuna/ diferansiyasyonuna etkisinin indirekt olduğu kabul edilmektedir (35). Bunlara ilave olarak GM-CSF; tümörisidal, fagositik ve antimikrobial aktiviteler açısından konak makrofaj fonksiyonlarını, mitotik

aktiviteler oranını, hücre adezyon ve integrin ekspresyonunu, hücre yüzey reseptörlerinin regülasyonunu, monosit diferansiyasyonunu, kemotaksis ve proliferasyonunu etkiler (8, 25).

Bazı çalışmalar sonucunda GM-CSF'in kemik iliği kök hücrelerinin uyarımı dışında yara iyileşmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Literatürde GM-CSF'in basınç ülserlerinde, orak hücreli anemi ülserlerinde, Kaposi sarkomu lezyonlarında, Behçet hastalığı ve cilt ülserlerinde, kemoterapi ekstremitasyonunda topikal lezyon etrafına uygulanarak olumlu sonuçlar alındığını belirten raporlar mevcuttur (1, 6, 14, 20, 22, 52, 59). Doku kültürü çalışmalarında GM-CSF varlığında keratinositlerin ve Langerhans hücrelerinin çoğalmasında artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca epidermal ve dermal bütünlük rekonstrüksiyonu için önemli olan potent immünostimulan APC ve hücrelerel elemanların epidermis boyunca birikmesi ile rejeneratif diferansiyasyon görülür (42).

2.4.3. Yan Etkileri

Klinik çalışmalar sırasında bildirilen istenmeyen yan etkilerin çoğu genellikle birlikte giden hastalıklarla veya onların tedavi yöntemleriyle bağlantılı olduğundan bu yan etkilerin GM-CSF ile ilişkisi tam olarak belirlenememektedir. En sık görülen istenmeyen yan etkiler ateş, bulantı, dispne, diyare, döküntü, titreme, kusma, halsizlik, iştahsızlık, kas-iskelet ağrısıdır (42). Ancak %20 hastada subfebril ateş veya beyaz kürede minimal artış olabilir. %50 hastada eozinofillerde 3 kat artış olur. LDH değerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ciltiçi/ ciltaltı tedavi sırasında veya sonrasında kan kimyası ve idrar analizlerinde hiçbir bozulma görülmemiştir (26).

Eritematöz makül ve papüllerle karakterize yaygın cilt erüpsiyonları sc veya iv uygulama sonrası sık görülen yan etkidir. Bu değişiklikler intradermal enjeksiyon sonrası nadiren görülür (24, 26).

2.4.4. Yara Onarımında Kritik Rolü Olan Hücre Tipleri Üzerine GM-CSF'in İn Vitro Aktiviteleri

GM-CSF hematopoetik etkileriyle bilinmektedir. Ancak belli non-hematopoetik aktiviteleri de bulunmaktadır. Doku şekillenmesinde kritik görevi olan hücre tipleri ve hücre fonksiyonları üzerine GM-CSF'in fonksiyonel etkileri vardır. Homeostatik durumlarda, GM-CSF geninin keratinositlerden ekspresyonu ve proteinin sekresyonu sınırlıdır. Ancak, mekanik stres ve IL-1 veya TNF- α ile in vitro temas durumunda keratinositler GM-CSF mRNA'yı biriktirmeye ve GM-CSF salgılamaya zorlanırlar (34, 60). GM-CSF ve T hücrelerden üretilen IL-3 nanogram konsantrasyonlarda keratinositleri proliferere ederler (21). Tam olarak kanıtlanmamasına rağmen, sitokin ve/veya stresle aktive olmuş keratinositlerden salınan GM-CSF, epidermal büyüme ve diferansiyasyonunda otokrin ve/veya parakrin düzenleyici olarak görev yapar. GM-CSF'le indüklenen sekonder sitokinlerin salınmasına bağlı olarak GM-CSF'in epidermal hücre proliferasyonu/ diferansiyasyonuna etkisinin indirekt olduğu düşünülebilir.

IL-6'nın, GM-CSF uygulanmasından sonra hızlıca indüklenmesi ve in vivo keratinositler için potent büyüme stimülatörü olması, sitokinlerin epidermal onarımda GM-CSF yanısıra rol aldıklarını düşündürülebilir (35). GM-CSF keratinositler için pan-aktif edici stimülatör değildir. Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor-

EGF) sentezini veya EGF reseptör ekspresyonunu modifiye etmez (64). Uyarılmış deriden salınan keratinosit bağımlı GM-CSF, hasar ortamındaki epidermal Langerhans hücrelerinin (Langerhans Cell- LC) potent immünoestimulan, antijen-sunucu hücrelere dönüşmesine neden olur (23, 69). İn vitro araştırmalarla GM-CSF'in kemik iliği fibroblast prekürsörleri ve bazı transforme mezenkimal hücre serilerinin proliferasyonunu hızlandığı gösterilmiştir (12). GM-CSF ayrıca; insan endotelial hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonunu hızlandırır, neoanjiogenezde rol oynar (8).

2.5. Yara Kopma Kuvveti ve Yara İyileşmesindeki Önemi

Gerginlik kuvveti (Tensile Strength- TS) birim alana düşen yük olarak tariflenir. Birimi pound/ inch² veya kg/ cm² dir. Kopma kuvveti ise (Breaking Strength- BS) alan boyutundan bağımsız olarak bir yarayı veya dokuyu kopartmak için gereken kuvvet miktarıdır (50). Vücudun farklı bölümlerinde cilt kopma kuvveti değişebilir, ancak gerginlik kuvveti sabittir. Bu farklılık cildin kalınlığı ile de değişebilir. Cilt kalınlığı yaşla arttıkça yara kopma kuvveti (Wound Breaking Strength-WBS) de buna paralel olarak değişir. Klinisyenleri WBS daha çok ilgilendirmektedir (50). WBS doku kollajen oranı, mukopolisakkarid miktarı ve kollajenlerin çapraz bağlanma derecesinden etkilenir (50).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Araştırma Planı

Çalışma protokolü Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel/ Tıbbi Cerrahi Araştırma Ünitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. 40 adet erişkin (250-350 mg), erkek, Wistar-Albino rat 4 gruba randomize edilmiştir. Grup 1 (n=10), ışınlanmayan ve GM-CSF uygulanmayan grubu; Grup 2 (n=9), ışınlanmayan GM-CSF uygulanan grubu; Grup 3 (n=6), ışınlanan ancak GM-CSF uygulanmayan grubu; Grup 4 (n=7), ışınlanan ve GM-CSF uygulanan grubu temsil etmektedir. Her bir grup için 10'ar denek planlanmasına rağmen 3 rat yetersiz RT dozu nedeniyle çalışma dışında bırakılmıştır. Bunun haricinde çalışma süresince 5 ölüm meydana gelmiştir. 1 tanesi çalışmanın erken döneminde bilinmeyen nedenlerle olmuştur. 4 tanesi 2. anestezi uygulaması sırasında veya hemen sonrasında olmuştur. Yukarıda parantez içinde belirtilen sayılar değerlendirme için uygun olan deneklerin sayısını belirtmektedir.

Grup 3 ve 4'teki deneklere ışınlama öncesinde intraperitoneal Ketamin HCl, 50 mg/ kg ile anestezi uygulandı. Işınlamadan 2 gün sonra insizyon işlemi öncesinde tüm gruplara aynı şekilde anestezi uygulandı. Daha önceden RT alan deneklerin (Grup 3 ve 4) insizyon işlemi öncesindeki 2. anestezi dozları ilk dozlarına göre %30 azaltıldı. Grup 2 ve 4'teki deneklere RT'den 2 gün sonra insizyon işleminden hemen sonra her iki yara ağzı arasından ciltaltı doku üzerine tüberkülin şırıngasıyla topikal olarak insizyon başına 15µg, 0,1 ml hacimde rHuGM-CSF (Molgramostim, Leucomax®, Novartis/ Schiering-Plough, Switzerland) uygulandı.

Denekler çalışma öncesinde ve sonrasında standart fare yemi ile beslendiler. Serbest olarak sularını içmelerine müsaade edildi. Cerrahi insizyon uygulaması sonrası her denek ayrı kafeste barındırıldı.

3.2. Tüm Vücut Işınlaması (Total Body Irradiation-TBI)

Cobalt 60 teleterapi cihazında (Theratron 780 C), ışın hedefinden 1m uzağa 116.1 rad/ dk.lık doz hızında, 30x30 cm.lik alanda 3 cm. derinlikteki vücut dozu 8 Gy olacak şekilde tüm vücut ışınlaması yapıldı (44). 8 Gy'lik radyasyon dozunun medyan lethal dozdan düşük, kemik iliğinde geçici depresyon oluşturacak doz olduğu gösterilmiştir (44). Tek ön ışınlama ile 4 denek aynı anda ışınladı. Deneklerin başları radyoterapi alanı dışında tutuldu. 5 mm derinlikteki cildin aldığı doz 8.83 Gy olarak hesaplandı. Bu dozun dermal fibroblastlar üzerinde minimal etkisi vardır. Tüm vücutta $\pm$ %10'dan daha fazla doz değişikliği kaydedilmedi (11). Cobalt 60 ünitesi Farmer Ionization Chamber (PTV Unidose Dosimeter, Nuclear Enterprises Ltd, Beenham Reading, UK) (0,1 cc) iyon odası kullanılarak kalibre edildi.

3.3. Düz Cerrahi Kesi Oluşturulması

Daha önceki deneysel hayvan çalışmalarının sonuçlarında radyoterapi ile cerrahi arasındaki 3 haftalık araya kıyasla 2 günlük ara süresinde daha iyi yara iyileşmesi elde edildiği belirtilmiştir (44). Bu gerekçeyle ışınlamadan 2 gün sonra denekler cerrahi işleme tabi tutuldular. Deneklere 50 mg/kg (2. kez anestezi alanlara %30 azaltılmış dozda) Ketamin HCl ile anestezi uygulandı. İnterskapüler bölgedeki sırt derisi traşlanarak temizlendi. Tam anestezi uygulanmış deneklerde sırt derisine 4

cm uzunluğunda tek bir tam kat cilt kesisi uygulandı (44). Kesi hatları 4 adet (4/0 ipek) cerrahi dikişle kapatıldı. Tüm işlemler esnasında sterilitenin korunmasına özen gösterildi. Cerrahi sonrası 9. günde anestezi doz fazlasıyla (daha önceden kullanılan dozun 3 katı dozla) denekler feda edildi. Yara kopma kuvveti ve histopatolojik inceleme için yara doku örnekleri alındı.

3.4. Yara Kopma Kuvveti Ölçümleri

Yara kopma kuvveti (WBS) analizi açısından yarayı değerlendirmek için cerrahi sonrası 2. hafta (özellikle 9. gün) daha önceki çalışmalarda en uygun zaman olarak bulunmuştur (44). Alınan deri örnekleri, 5 x 5 mm boyutlarında kesildi. Vertikal olarak yaraya paralel her iki taraftaki deri kısımları yaradan 3 mm uzaklıkta olacak şekilde iki adet kıskaç ile sıkıştırıldı. Kıskaçların bir tanesi Grass Model 7 poligrafın "Force Displacement Transducer FTO3"ına, diğeri dakikada sabit bir hızla (2 cm/ dk) dönen silindire bağlandı. Silindir dönerken yara dudaklarında karşıt yönde gelişen gerim poligrafın yazdırıcı ucu ile kağıt üzerine kaydedildi. Yara dudaklarının birbirinden ayrıldığı an yazdırıcı ucun bulunduğu yüksekliğin gram cinsinden karşılığı hesaplanarak, yara gerimi değeri olarak kullanıldı (9, 18).

3.5. Histopatolojik İnceleme

Tüm gruptaki deneklerden alınan 5 x 5 mmlik yara hattını da içeren cilt dokusu örnekleri formalin:ethanol (1:99) ile fikse edildi. Histolojik analiz için 5 µmlik kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar her

grupta granülasyon doku gelişimi ve kollajenizasyon açısından ışık mikroskopunda incelendi (11, 46).

3.6. Sonuçların Analizi

Tüm ölçüm ve değerlendirmeler önceden kodlanmış doku örneklerinde ve grup özelliği bilinmeksizin yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri, bilgisayarda istatistik paket programı (SPSS 9.01 for Windows, SPSS, Inc.) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında WBS ölçümlerinin varyans analizini değerlendirmek için Levene testi kullanıldı. Grup varyansları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bulgular nonparametrik, Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standard hata (SEM) olarak belirtildi. Sadece iki yönlü test sonuçları kullanıldı. %95'lik güven aralığı (Confidence Interval, CI) ile gruplar arası fark belirtildi. 0.05 veya daha düşük olan p değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Yara Kopma Kuvveti Sonuçları

Yara dokusundaki WBS (g/ mm²) ölçüm sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Tüm vücut ışınlaması yapılan deneklerde, ışınlamadan 2 gün sonra topikal olarak 15 µg dozda rHuGM-CSF uygulanan grupta WBS, kontrol grubuna oranla % 133 artmış olarak bulundu (Grup 3 ve 4). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.003) (%95 CI- Grup 3 için 12.52 ile 21.86, Grup 4 için 32.99 ile 43.56 arası). TBI yapılan deneklerde belirgin yara iyileşme bozukluğu saptandı. İnsizyondan 9 gün sonra (RT'den 11 gün sonra) yapılan ölçümlerde ışınlanmış kontrol grubunun WBS

ölçümlerinin, ışınlanmamış kontrol grubu WBS ölçüm değerlerinin %25'ine düştüğü tespit edildi (Grup 1 ve 3). RT sonrası ortalama WBS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı bulundu ($p=0.001$) (%95 CI-Grup 1 için 63.05 ile 75.12; Grup 3 için 12.52 ile 21.86 arası). İlacın uygulandığı gruplarda (Grup 2 ve 4); RT sonrası WBS değerinin eşlenmiş kontrol grubu WBS değerinin %82.3'üne düştüğü saptandı ($p=0.049$) (%95 CI- Grup 2 için 38.52 ile 54.52; Grup 4 için 32.99 ile 43.56 arası). Işınlanmamış kontrol ve ilaç uygulanan gruplarda (Grup 1 ve 2) ilaç uygulamasıyla WBS değerlerinin kontrol grubu WBS değerlerinin %67.3'üne düştüğü saptandı ($p=0.001$) (%95 CI- Grup 1 için 63.05 ile 75.12; Grup 2 için 38.52 ile 54.52 arası) (Şekil 1, 2, 3).

Tablo 1- Yara Dokusu Yara Kopma Kuvveti (WBS) Ölçümleri

GRUP	PARAMETRE
	Yara Kopma Kuvveti (g/ mm ²)
	Ortalama $\pm$ SE*
Işınlanmamış	
Grup 1	69.08 $\pm$ 2.67 ^a
Grup 2	46.52 $\pm$ 3.46 ^b
Işınlanmış	
Grup 3	17.19 $\pm$ 1.82 ^c
Grup 4	38.28 $\pm$ 2.16 ^d

*SE-Ortalamanın Standard Hatası

Grup 1: Kontrol, Grup 2 : GM-CSF uygulanmış, Grup 3: Işınlanmış kontrol, Grup 4: Işınlanmış ve GM-CSF uygulanmış grup.

%95 CI; (a) 63.05 - 75.12

(b) 38.52 - 54.52

(c) 12.52 - 21.86

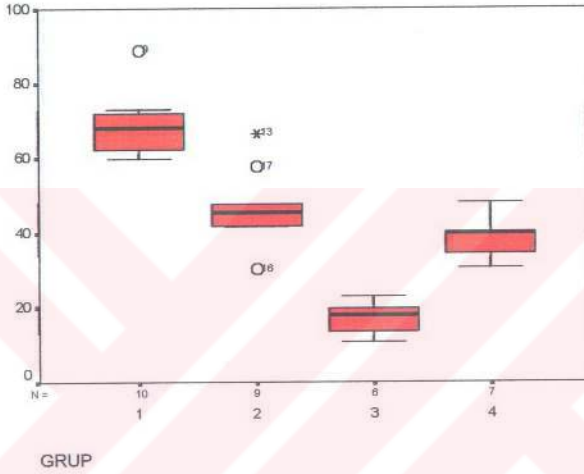
(d) 32.99 - 43.56

(a,b) p=0.001, (a,c) p= 0.001,

(b,d) p=0.049, (c,d) p=0.003

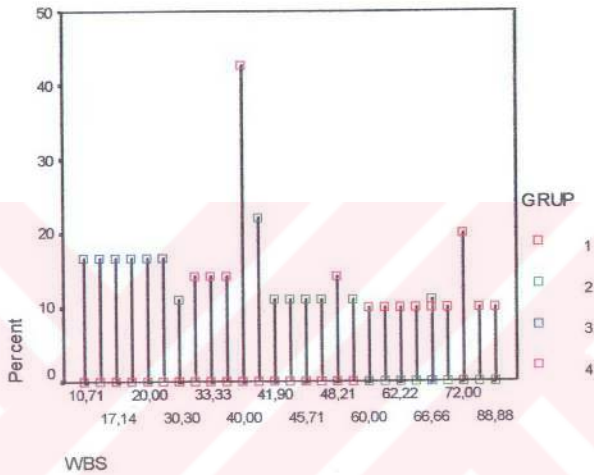
ŞEKİL I- Gruplara Göre WBS Sonuçlarının Genel Dağılımı

WBS



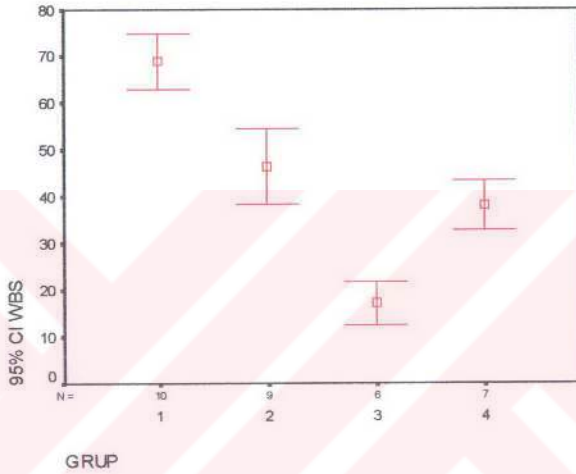
Grup 1: Kontrol, Grup 2 : GM-CSF uygulanmış, Grup 3: Işınlanmış kontrol, Grup 4: Işınlanmış ve GM-CSF uygulanmış grup.

ŞEKİL II- Gruplara Göre WBS Değerlerinin Yüzde Dağılımları



Grup 1: Kontrol, Grup 2 : GM-CSF uygulanmış, Grup 3: Işınlanmış kontrol grup, Grup 4: Işınlanmış ve GM-CSF uygulanmış grup.

ŞEKİL III- Gruplara Göre WBS Değerlerinin Güven Aralık Sınırları



Grup 1: Kontrol, Grup 2 : GM-CSF uygulanmış, Grup 3: Işınlanmış kontrol, Grup 4: Işınlanmış ve GM-CSF uygulanmış grup.

4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

4.2.1. Gruplara Göre Her Bir Denekteki Detaylı Mikroskopik Bilgi

Grup 1- Işınlanmayan ve GM-CSF Uygulanmayan Grup (Kontrol)

- 1) Yüzeyde reepitelize alanda hiperplazik çok katlı yassı epitel ile altta az sayıda iltihabi eleman içeren granülasyon dokusu saptandı.
- 2) Yüzeyde (travmatik) geniş erozyon ve altta yüzeyel iltihabi granülasyon dokusu izlendi.
- 3) Yüzeyde hiperplazik dejenere epitel altında geniş bir alanda genç iltihabi granülasyon dokusu saptandı.
- 4) Epitelize olmuş, hafif deprese alan altında dar alanda granülasyon dokusu izlendi.
- 5) Derin dokularda iltihabi doku üzerinde, yüzeyde granülasyon dokusu saptandı.
- 6) Reepitelize olmamış deprese alan altında yukarıda iltihabi elemanlardan derine doğru fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu izlendi.
- 7) Yüzeyde çok kalınlaşmış yassı epitel mevcut. İnsizyon hattı tam olarak kapanmış. Yüzeyel ve yaygın az sayıda iltihabi hücreler, aktif fibroblastlar görüldü. Kollajenizasyon mevcuttu.
- 8) Yüzeyde tamamlanmış epitelizasyon altında genç fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu izlendi.
- 9) Kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altında iltihabi granülasyon dokusu izlendi.
- 10) Reepitelize olmamış deprese alan altında yukarıda iltihabi elemanlardan derine doğru fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu izlendi.

Grup 2- Işınlanmayan Ancak GM-CSF Uygulanan Grup

- 1) Yüzey epitelizasyonunun tamamlandığı ve epitel altında ince bir zon şeklinde iltihabi elemanlarını az sayıda içeren genç fibroblastik bağ dokusunun geliştiği gözlemlendi. Bu dokunun deri ekleriyle çevrelendiği saptandı. Enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı.
- 2) Yüzeyde epitelizasyonun tamamlandığı ve geniş bir deprese alan varlığı ile yeni gelişen epitelin ince görünümü dikkati çekti. Derinin derin kısımlarında az sayıda iltihabi eleman içeren granülasyon dokusunun varlığı ve bu alanda kas dokusunun parçalanarak iltihabi reaksiyonun daha derin dokulara ilerlediği görüldü.
- 3) Yüzeyde geniş deprese bir alan ve bu alanın periferik kısımlarında epitelde hiperplazi ancak tabanında epitel kaybı olduğu dikkati çekti. Deplase alanı dolduran nötrofil lökosit, nükleer debrillerden oluşan iltihabi eksuda (pü niteliğinde materyal) gözlemlendi. Derinin tüm tabakalarını geçerek kas dokusunu parçalayan yaygın iltihabi inflamasyon saptandı. Çevrede dev hücre formasyonları dikkati çekti.
- 4) Yüzeyde küçük bir deprese alanı döşeyen hiperplazik epitel gözlemlendi. Bu alana denk düşen kısımda müküller tabakaya kadar uzanan iltihabi elemanlardan yoksun, genç fibroblastlarla karakterize granülasyon dokusu izlendi.
- 5) Yüzeyde küçük bir deprese alan ve bu alanı döşeyen kalınlaşmış çok katlı yassı epitel ile kas tabakasına doğru uzanan genç, seyrek iltihabi hücre içeren iltihabi granülasyon dokusu saptandı.

- 6) Yüzeyde geniş deprese alanı döşeyen kalın ve çok katlı yassı epitel ile epidermisin hemen altından başlayarak tüm tabakalar boyunca devam eden ve geniş bir alanda izlenen, orta kısmı apseleşmiş iltihabi reaksiyon izlendi. Yer yer dev hücre formasyonları saptandı. İnflamasyonun yağ dokusunu parçaladığı izlendi.
- 7) Hafifçe kalınlaşan çok katlı yassı epitelin döşediği deprese alan altında ince bir zon şeklinde az sayıda iltihabi eleman içeren genç granülasyon dokusu saptandı. Kesi yerinin kas dokusuna ulaştığı alanda dev hücre formasyonları saptandı.
- 8) Yüzeyde minimal depresyon alanı ve bu alan altına denk düşen ince bir zon şeklinde iltihabi granülasyon dokusu gözlemlendi.
- 9) Yüzeyde epitelin hafif kalınlaştığı, reepitelizasyonun tamamlandığı, insizyon alanı boyunca genç granülasyon dokusunun geliştiği gözlemlendi. Derinin derin kısımlarında yabancı cisim tipi dev hücrelerle karakterli reaksiyon dikkati çekti.

Grup 3- Işınlanan ancak GM-CSF Uygulanmayan Grup

- 1) Yüzeyde reepitelizasyonun tamamlandığı, çok yaygın iltihabi elemanlardan zengin, dev hücre formasyonu ile karakterize granülasyon dokusunun bulunduğu gözlemlendi.
- 2) Çok deprese ve çok kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altından başlayarak ciltaltı yağ dokusuna kadar ilerleyen iltihabi granülasyon dokusu izlendi. Ciltaltı yağ dokusunda apse formasyonları dikkati çekti.
- 3) Kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altında küçük bir alanda yaygın iltihabi hücre içeren iltihabi granülasyon dokusu gözlemlendi.
- 4) Epitelize olmuş, kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altında derin dermiste orta kısmı apse formasyonu ile karakterize iltihabi hücrelerce zengin granülasyon dokusu ve dev hücre formasyonu gözlemlendi.
- 5) Rejenerasyonunu tamamlamış çok katlı yassı epitel altında dermiste yoğun iltihabi hücreden zengin, ortasında mikroapse odağı bulunan granülasyon dokusu izlendi.
- 6) Epitelizasyonunu tamamlamış, kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altından başlayarak tüm deri katları boyunca ilerleyen iltihabi granülasyon dokusu gözlemlendi. Ciltaltı yağ dokusunda apse formasyonları saptandı.

Grup 4- Işınlanan ve GM-CSF Uygulanan Grup

- 1) Yüzeyde reepitelizasyonunu tamamlamış kalın epitel altında yüzeysel iltihabi granülasyon dokusu izlendi. Fibroblast hücre hakimiyeti saptandı.
- 2) Kalınlaşmış ve reepitelize olmuş çok katlı yassı epitel altında kas dokusunu da içeren aktivitesini kaybetmiş iltihabi granülasyon dokusu izlendi.
- 3) Çok katlı yassı epitelin kalınlaşarak rejenere olduğu saptandı. Derin dermise kadar ilerleyen çok az iltihabi hücre içeren genç granülasyon dokusu saptandı.
- 4) Reepitelizasyonun ve iltihabi granülasyon dokusunun tamamlandığı saptandı.
- 5) Yüzeyde normal kalınlıktaki rejenere olmuş çok katlı yassı epitel altında küçük bir granülasyon odağı saptandı.
- 6) Geniş bir alanda kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altından derin tabakalara kadar ilerleyen iltihabi hücrelerden zengin dev hücre formasyonu saptandı.
- 7) Reepitelizasyonun ve iltihabi granülasyon dokusunun tamamlandığı izlendi.

4.2.2. Genel Grup Özellikleri

Grup 1- Işınlanmayan ve GM-CSF Uygulanmayan Grup (Kontrol)

Bu grupta genel olarak reepitelizasyonun tamamlandığı epitel altında geniş bir alanda özellikle derinde genç fibroblastlardan zengin iltihabi eleman içeren granülasyon dokusu saptandı. Üç denekte ise reepitelizasyonun tamamlanmadığı görüldü. Histolojik incelemenin yapıldığı zaman gözönüne alındığında bu bulgular normal yara iyileşmesiyle uyumlu bulundu (Resim 1).

Grup 2- Işınlanmayan Ancak GM-CSF Uygulanan Grup

Bu grupta reepitelizasyonun tamamlandığı, yüzeyde normalde kalın çok katlı yassı epitel altında derinin tüm tabakalarını tutarak müsküler tabakaya kadar uzanan, yer yer kas dokusunu da parçalayan iltihabi elemanlardan yoksun, genç fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu izlendi. Preparatların yarısında epidermisin hemen altında başlayarak tüm tabakalar boyunca devam eden ve geniş bir alanda devam eden, orta kısmı apseleşmiş iltihabi reaksiyon izlendi. İnflamasyonun yağ dokusunu yer yer parçaladığı gözlemlendi. Derini derin kısımlarında yabancı cisim tipi dev hücrelerle karakterize reaksiyon dikkati çekti (Resim 2, 3, 4, 5).

Grup 3- Işınlanan ancak GM-CSF Uygulanmayan Grup

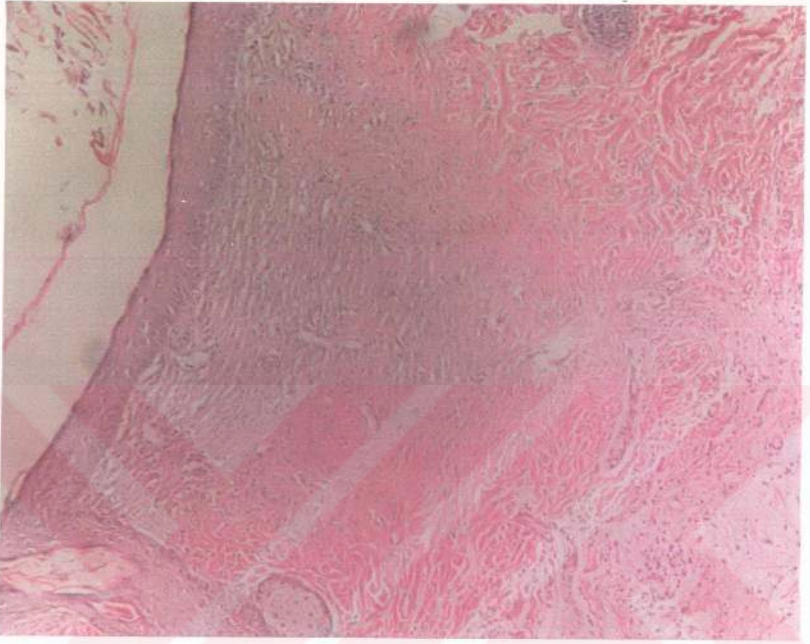
Bu grupta epitelizasyonun tamamlandığı, kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altından başlayarak derin katlara kadar uzanan yaygın iltihabi elemanlardan zengin iltihabi granülasyon dokusu izlendi. Dermisin çeşitli katlarında granülasyon dokusu

içinde veya ciltaltı yağ dokusunda apse formasyonları saptandı. Normal yara iyileşmesinin gerilediği belirlendi (Resim 6, 7).

Grup 4- Işınlanan ve GM-CSF Uygulanan Grup

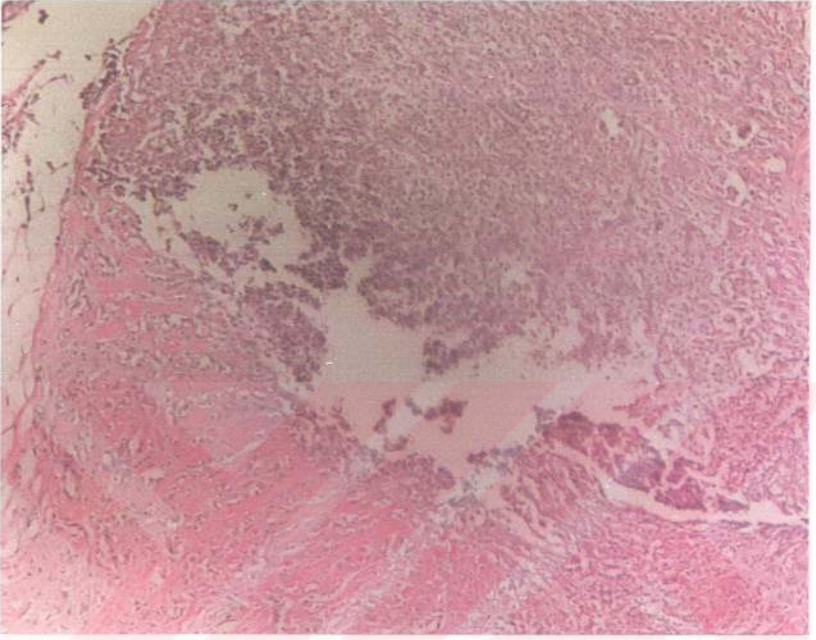
Bu grupta çoğunlukla reepitelizasyonun ve granölasyon dokusunun tamamlandığı, çok katlı yassı epitelin tüm deneklerde geniş bir alanda çok kalınlaştığı saptandı. Granölasyon dokusu olduğu düşünölen kısımların periferinde fibroblast hücre hakimiyeti izlendi. Radyoterapi ile gerileyen yara iyileşmesinin normal yara iyileşmesine yakın düzeldiği tespit edildi (Resim 8, 9, 10).





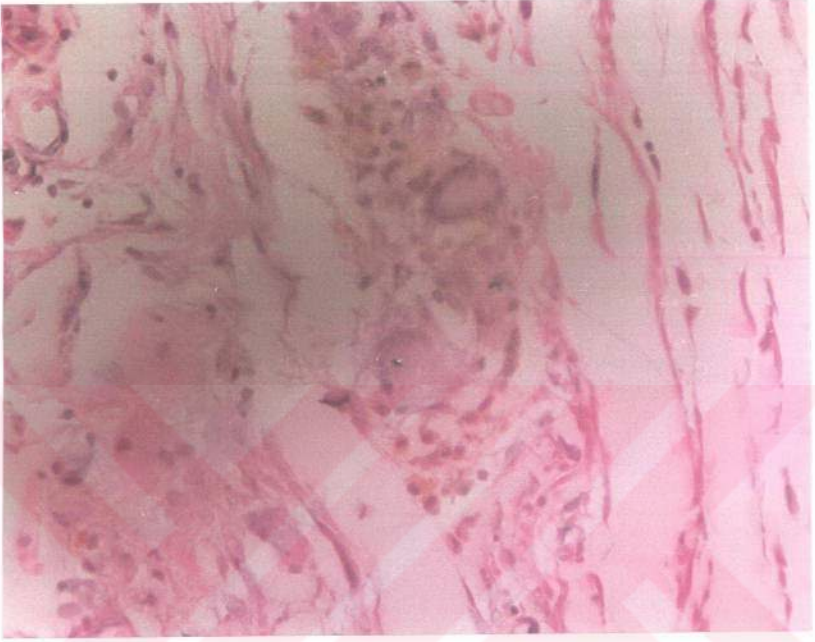
RESİM 1: Işınlanmayan ve GM-CSF Uygulanmayan Grup (Grup 1).

Yüzeyde tamamlanmış epitelizasyon altında genç fibroblastlardan zengin granülasyon dokusu. HE X 200



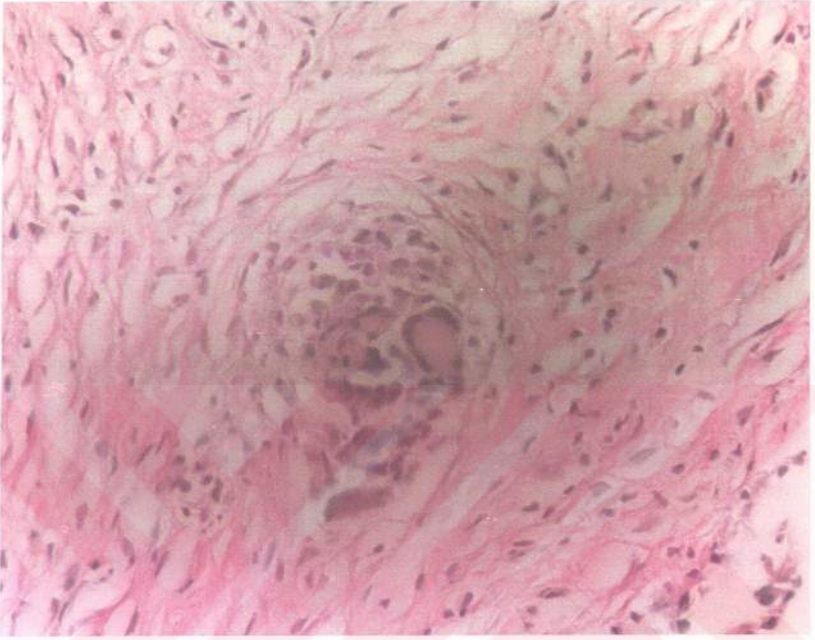
RESİM 2: Işınlanmayan ancak GM-CSF Uygulanan Grup (Grup 2).

Yüzeyde epitel kaybının altında deplase alanı dolduran nötrofil lökosit, nükleer debrillerden oluşan iltihabi eksuda (pü niteliğinde materyal). HE X 200



RESİM 3: Işınlanmayan ancak GM-CSF Uygulanan Grup (Grup 2).

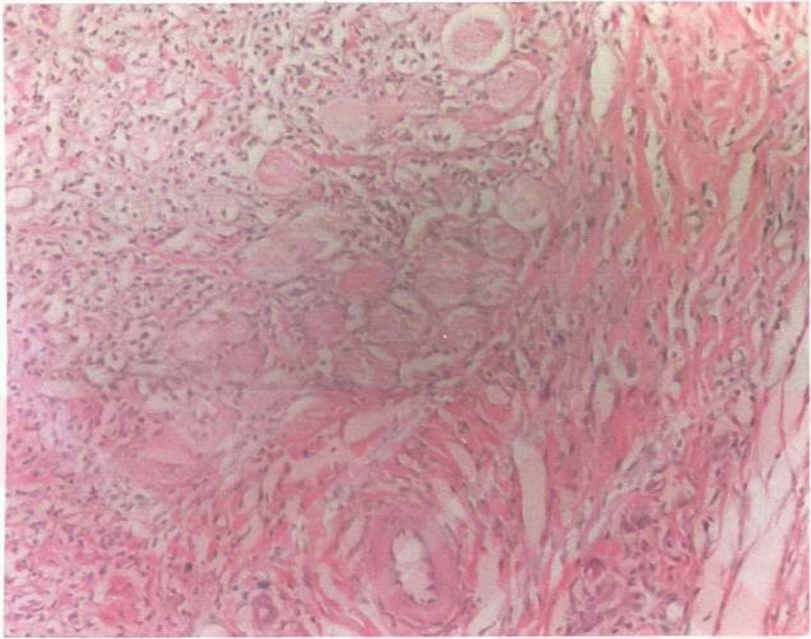
Derinin her katında yaygın olarak gözlenen dev hücre formasyonları. HE X 400



RESİM 4: Işınlanmayan ancak GM-CSF Uygulanan Grup (Grup 2).

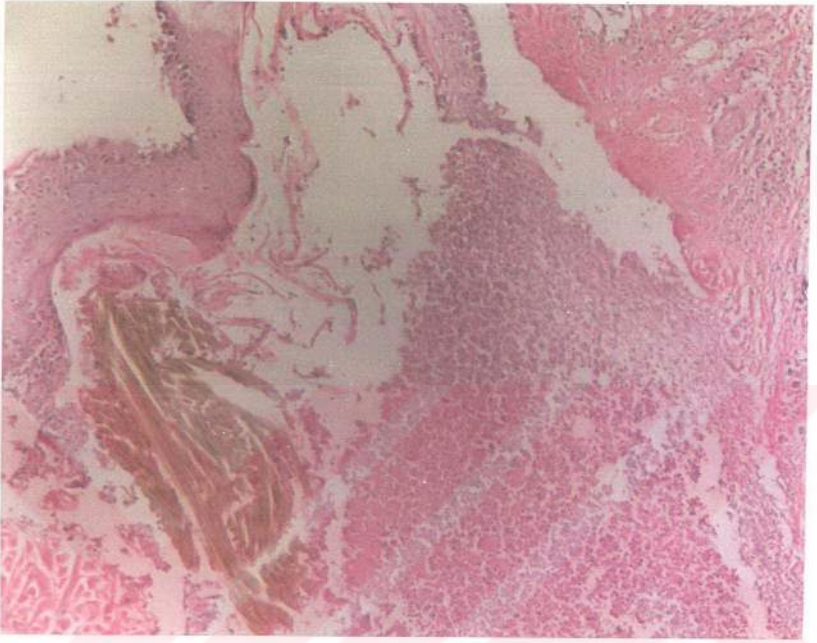
Derinin derin kısımlarında yabancı cisim tipi dev hücrelerle karakterize reaksiyon. HE

X 400



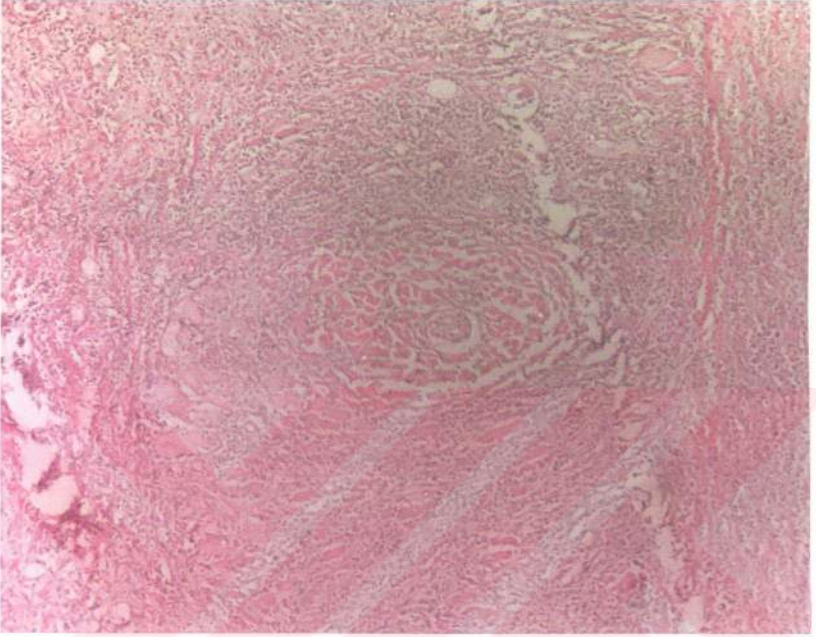
RESİM 5: Işınlanan ancak GM-CSF Uygulanmayan Grup (Grup 2).

Az sayıda iltihabi eleman içeren granülasyon dokusu altında kas dokusu yanında dev hücre formasyonları. HE X 400



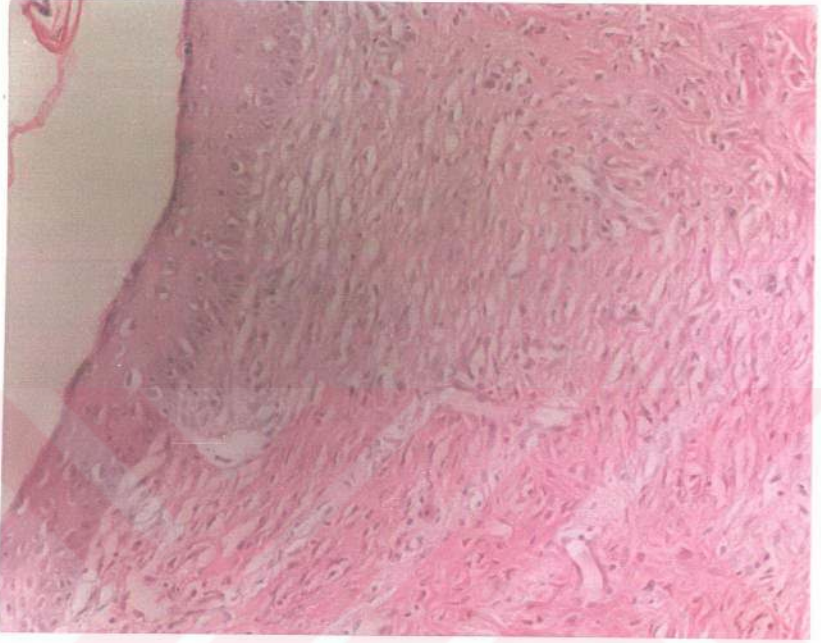
RESİM 6: Işınlanan ancak GM-CSF Uygulanmayan Grup (Grup 3).

Çok deprese ve kalınlaşmış çok katlı yassı epitel altında apse formasyonu. HE X 400



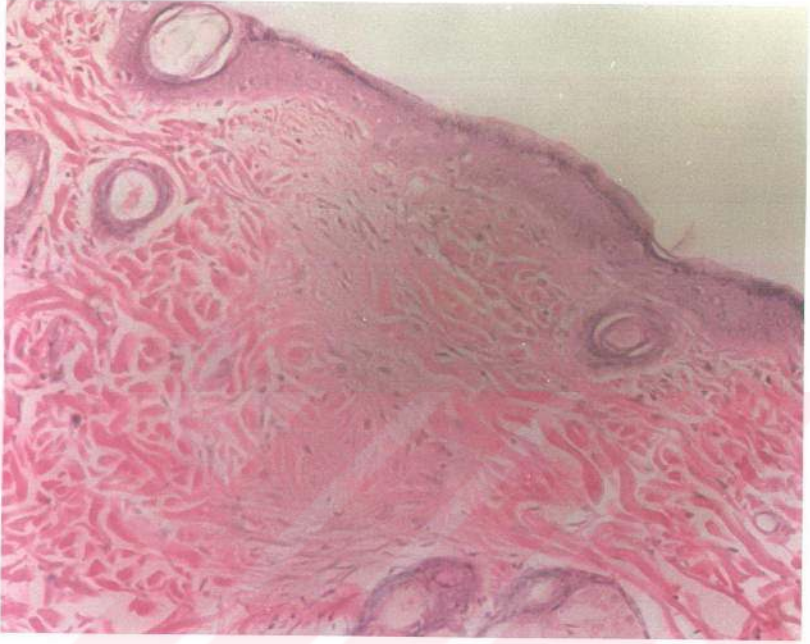
RESİM 7: Işınlanan ancak GM-CSF Uygulanmayan Grup (Grup 3).

Derin dermiste orta kısmı apse formasyonu ile karakterize iltihabi hücrelerce zengin granülasyon dokusu ve dev hücre formasyonu. HE X 400



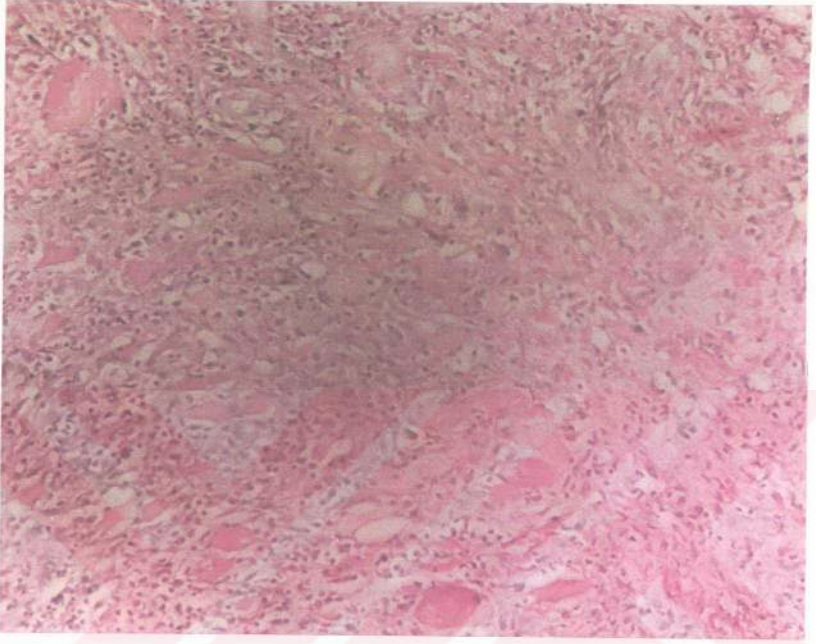
RESİM 8: Işınlanan ve GM-CSF Uygulanan Grup (Grup 4).

Kalınlaşmış ve reepitelize olmuş çok katlı yassı epitel altında aktivitesini kaybetmiş granülasyon dokusu. HE X 200



RESİM 9: Işınlanan ve GM-CSF Uygulanan Grup (Grup 4).

Yüzeyde normal kalınlıkta rejenere olmuş epitel altında kesi hattı boyunca ilerleyen granülasyon dokusu. HE X 100



RESİM 10: Işınlanan ve GM-CSF Uygulanan Grup (Grup 4) .

Müsküler tabakaya kadar uzanan iltihabi hücrelerden zengin yaygın dev hücre formasyonları. HE X 400

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Radyasyon tedavisi malign hastalıkların küratif ve palyatif tedavisinde önemli bir role sahiptir. Tümör dokusunda radyasyonun dozunu arttırmayı amaçlayan çalışmalarda normal doku hasarının da arttığı bilinmektedir. Neoadjuvan ışınlama sonrası ortaya çıkan yara iyileşme bozuklukları postoperatif dönemde önemli morbidite oluşturmaktadır. Işınlanmış dokuya uygulanacak cerrahi işlem iki yönden incelenmelidir. Önceden ışınlanmış dokuda yapılacak cerrahi prosedürün performansı ve ışınlama nedeniyle oluşan radyasyon ülserine yapılması gereken cerrahi müdahaleler. 1895'te Roentgen'in X-ışınını keşfinden hemen sonra bir yıl içinde radyasyona bağlı doku hasarı ve cilt kanserleri tanımlanmıştır (40). Literatürde GM-CSF uygulamasıyla yara iyileşmesinin hızlandığını belirten klinik ve deneysel çalışmalar mevcuttur. Ancak klinik uygulamalarda kullanılan doza eşdeğerde gamma ışınıyla TBI uygulanmış deneklerdeki cilt yarasına tek seans rHuGM-CSF uygulamasının yara kopma kuvvetini artırdığı ve ışınlamayla gerileyen granülasyon dokusunu düzelttiği literatürde ilk defa bu çalışmayla gösterilmiştir.

GM-CSF, in vitro ve in vivo olarak keratinositleri proliferetme yeteneği olduğu kanıtlanan tek sitokindir (53, 55, 70). İmmünsuprese deneklerde ve enfekte yaralarda lokal GM-CSF uygulamasıyla yara iyileşmesinin ve yara kopma kuvvetinin hızlandığı gösterilmiştir (53, 55). Deneysel bir çalışmada topikal olarak GM-CSF uygulanan deneklerin cilt dokusundaki 9. gündeki yara kopma kuvveti, ilaç uygulanmayan grubun WBS ölçümünden %42 daha fazla bulunmuştur (25). Bizim çalışmamızda ışınlanmamış ilaç uygulanmış grubun (Grup 2) WBS değeri eş kontrol grubuna (Grup 1) göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda yara

başına 15 µg olacak şekilde GM-CSF insizyon arasından ciltaltı dokuya uygulanmıştır. Histopatolojik incelemelerde ışınlanmamış, ilaç uygulanan grupta (Grup 2) ilaç uygulanmamış kontrol grubuna (Grup 1) kıyasla mononükleer hücre infiltrasyonunda (makrofaj ve fibroblastlar) artış dikkati çekmiştir. Ayrıca ışınlanmamış, ilaç uygulanan gruptaki çoğu denekte derin tabakalar boyunca devam edebilen ve geniş bir alanda izlenen, genelde orta kısmı apseleşmiş iltihabi reaksiyon, beraberinde yer yer dev hücre formasyonları ile karakterize yabancı cisim reaksiyonu gözlenmiştir. GM-CSF'in topikal uygulandığı literatürdeki diğer çalışmalarda ilaç ışınlanmamış deneklere genellikle emülsifiye kollajen süngerlerle uygulanmıştır (25). Bizim çalışmamızdaki ışınlanmamış, GM-CSF uygulanan deneklerde (Grup 2) histopatolojik olarak tespit edilen yara iyileşmesindeki gecikme, yabancı cisim reaksiyonları ve WBS'teki azalma ilacın uygulanma şekline bağlanmıştır (25). Işınlanan ve GM-CSF uygulanan gruba da (Grup 4) ilaç aynı yolla uygulanmasına rağmen bu tarz reaksiyonlar gözlenmemiştir. Bu durum ışınlanmayla azalan iltihabi hücrelerin bu formasyonu oluşturacak sayı ve fonksiyonda olamamasına bağlanmıştır.

İnflamasyon ve iskemi yara iyileşmesinin bileşenleridir. Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında üretilen oksijen radikallerinin artmasıyla WBS'de ve kollajen sentezinde erken bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (67). Diğer deneysel çalışmalarımızda ışınlanmış rat cildine GM-CSF uygulanmasıyla yara dokusunda antioksidan olarak görev yapan ve yara iyileşmesinin hızlanmasını sağlayan redükte glutatyon (GSH) (30) oranının arttığı; yara iyileşmesini geciktiren lipid peroksidasyonunun (30) ve doku histamin oranının (31) azaldığı gösterilmiştir.

Akut ve kronik lezyon koşulları yara iyileşmesini belirgin olarak inhibe eder. Bu olayın, belli bakteriyel ürünlerin kollajenin depolanmasını azaltması ve kollajen yıkım hızını artırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (47). Yara kenarı retraksiyonunu artıracak, keratinosit proliferasyon ve migrasyonunu indükleyecek, neo-anjiogenezisi amplifiye edecek ve yaranın bakteriyel yükünü kontrolde tutacak, inflamatuvar olaylar ve belirli immün cevapların uygun indüksiyonunu sağlayacak terapötik ajanlar halen araştırılmaktadır. Yaranın kontraksiyonu, hareket ve hücresel kasılmadan sorumlu olan fibroblastların aktivitesine bağlıdır. Fibroblastların hareketi için fibrin ve fibronektin gereklidir. GM-CSF gibi büyüme faktörlerinin yara iyileşmesinde rolü olduğu gösterilmesine rağmen ışınlanmış dokudaki etkileri ve altta yatan mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir. GM-CSF'in fibroblastlar ve fibronektin düzeyine etkisi araştırılmaktadır (53).

Bu çalışmadaki kısıtlayıcı faktörlerden bir tanesi her ne kadar daha önceden kodlanarak etiketlenmiş doku örnekleri kullanılarak, tarafsız olarak değerlendirme yapılmasına dikkat edilse de histopatolojik değerlendirmenin tek bir patolog tarafından yapılmış olmasıdır. Birden fazla sayıda patolog tarafından yapılacak değerlendirme sonuçlarının çalışma duyarlılığını artıracığı kesindir. Çalışmadaki bir diğer kısıtlayıcı faktör ise ilaç uygulamasının farklı bir teknik veya dozla kıyaslanamamasıdır. Şöyle ki; daha önceden yapılan bir çalışmada GM-CSF'in düşük dozlarda tekrarlayarak uygulanması tek doz uygulamaya üstün bulunmuştur. GM-CSF'in erken faz sonrası kontraksiyonun en hızlı olduğu dönemde en etkin olduğu gözönünde bulundurulursa, bu dönemde tekrarlayan ilaç uygulamalarının daha etkin

olması anlaşılabilir (53). Daha ileri çalışmalarla tekrarlayan dozlarda ilaç uygulaması sonuçlarının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Son zamanlarda yara iyileşmesi modelleri ve kemo/ radyoterapiye bağlı gelişen mukozitlerin önlenmesinde GM-CSF kullanımının çok popüler olmasına karşılık bu tedavi modellerinin maliyeti bir hayli yüksektir. Belirtilen komplikasyonların tedavi veya profilaksisinde bu kadar yaygın kullanılmasından önce ilgili oldukları tüm mekanizmaların, optimum doz şemalarının ve hangi hasta alt grubunda klinikte rutin olan diğer ilaç uygulamaları haricinde ek yarar sağlayacağını belirlemek için daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır (10, 17, 41, 48, 54). Bizim çalışmamızda topikal olarak (yara hattına sc) literatürden daha farklı , ancak klinik uygulamalara daha yakın bir doz şemasında uygulanan GM-CSF'in WBS ölçümleri ve granülasyon dokusuna etkisi araştırıldı. Elde edilen anlamlı olumlu sonuçlarla terapötik bir şans olduğu belirtilse de ilacı bu endikasyonla klinik kullanıma geçirmeden önce enzimlerle (Ör: Süperoksit Dismutaz, Glutatyon Transferaz vs.) yapılacak çalışmalar hücresel seviyede meydana gelen olaylar açısından önemli bilgileri ortaya koyabilir.

Farklı bir çalışmada GM-CSF kaynağının (fare veya insan kaynaklı- murine/ human) önemli olmadığı, yara iyileşmesi açısından etkisinin türden bağımsız olduğu belirtilmiştir (53). Her ne kadar çalışmamızda bir grup denekte (Grup 2-ışınlanmamış, GM-CSF uygulanmışlarda) ilaç yabancı cisim reaksiyonu oluştursa da, diğer grupta (Grup 4-ışınlanmış ve GM-CSF uygulanmış) bu tarz bir reaksiyon görülmemesi, yara iyileşmesinin ve reepitelizasyonun tam olması nedeniyle bu reaksiyonların GM-CSF'in türe bağlı etkisinden çok daha önceden de belirtildiği üzere ilacın uygulanma şekline bağlı olduğu düşünüldü (19, 25).

Çok sayıda büyüme faktörü ve sitokinin yara iyileşmesi, yara hücre migrasyonu ve oksijen radikallerinin detoksifikasyonunu regüle ettiği bilinmektedir (25, 27). Sonuç olarak büyüme faktörlerinden biri olan GM-CSF'in ışınlanmış deneklerde yara gerimini artırdığı, histolojik olarak da iyileşmeyi hızlandırıcı yönde etki yaptığı görülmüştür. Dolayısıyla bu glikoproteinin yara iyileşmesindeki etkisinin olumlu olduğu söylenebilir. Bununla birlikte araştırmamızdaki verilerin daha kantitatif değerlendirilebilmesi amacıyla bu bulguların yara dokusundaki enzim düzeyleri ve farklı ilaç dozlarının etkisiyle destekleneceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. ÖZET

Özellikle lokal ileri evre tümörler olmak üzere malignansinin küratif tedavisinde preoperatif radyoterapi halen güncelliğini korumaktadır. Radyoterapi uygulaması; doz, volüm ve zamana bağlı olarak yara iyileşmesini geciktirmekte ve hematopoezisi azaltmaktadır. Radyoterapinin cilt üzerine olumsuz etkileri nedeniyle cerrahi ertelenmekte ve tümör üzerindeki küratif etki daha az olmaktadır.

Bu kontrollü, randomize deneysel çalışmada preoperatif tüm vücut ışınlaması sonrası oluşturulan cerrahi kesi modelinde kesi esnasında topikal olarak uygulanan GM-CSF'in yara iyileşmesi üzerine etkisi yara kopma kuvveti ve histopatolojik incelemeyle değerlendirildi. Deneklerin yarısına 8 Gy'lik tüm vücut ışınlaması uygulanıp RTden 2 gün sonra 4 gruba randomize edildi. Grup1: Kontrol; Grup 2: GM-CSF uygulanan grup; Grup 3: Işınlanan kontrol; Grup 4: Işınlanan ve GM-CSF uygulanan grup. GM-CSF tek dozda, yara başına 15 µg, topikal olarak uygulandı.

Tüm vücut ışınlamasıyla yara kopma kuvveti ve histopatolojik değerlendirmeye göre yara iyileşmesinin bozulduğu saptandı. Işınlanan ve GM-CSF uygulanan deneklerde yara kopma kuvvetinin istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı saptandı. Histopatolojik değerlendirmeye ışınlanmış gruplarda bozulmuş olarak saptanan yara iyileşmesinin GM-CSF uygulamasıyla düzeldiği ve normal yara iyileşmesine yaklaştığı gözlemlendi. Böylece GM-CSF'in radyoterapiye bağlı yara iyileşmesindeki bozulmayı düzelttiği sonucuna varıldı. Bu bulguların doku enzim düzeyleri ölçümü ve farklı dozajdaki ilaç uygulamasıyla yapılacak daha ileri çalışmalarla desteklenmesi uygun bulundu.

KAYNAKLAR

- 1) Allı N, Karakayalı G, Kahraman I, Artüz F: Local intralesional therapy with rHuGM-CSF for a large genital ulcer in Behçet's disease. Br J Dermatol 136: 633-653, 1997.
- 2) Ausprunck DH: Tumor angiogenesis: Chemical messengers of the inflammatory process. İkinci baskı. Houck JC (ed) Elsevier, Amsterdam 1979; S: 317.
- 3) Aydıngöz İA: İyonize radyasyonun deri ve yara iyileşmesi üzerine etkisi: Tüm yönleriyle yara iyileşmesi. Birinci baskı. Erdem C, Çelebi CR (eds). Ayrıntı, Ankara 1996, S: 17-19.
- 4) Bernstein EF, Salomon GD, Harisiadis L, Talbot T, Harrington F, Russo A, Uitto J: Collgen gene expression and wound strength in normal and radiation-impaired wounds. J Dermatol Surg Oncol 19: 564-570, 1993.
- 5) Bernstein EF, Sullivan FJ, Mitchel JB: Biology of chronic radiation effects on tissues and wound healing. Clin Plast Surg 20: 435-453, 1993.
- 6) Boente P, Sampaio C, Brandao MA, Moreira ED, Badaro R, Jones TC: Local perilesional therapy with rHuGM-CSF for Kaposi's sarcoma. Lancet 341: 1154, 1993.
- 7) Braunstein S, Kaplan G, Gottlieb AB, Schwartz M, Walsh G, Abalos RM, Fajardo TT, Guido LS, Krueger JG: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin in vivo. J Invest Dermatol 103: 601-604, 1994.
- 8) Bussolino F, Wang JM, Defilippi P, Turrini F, Sanavio F, Edgell C, Aglietta M, Arese P, Mantovanni A: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor

induces human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 337: 471-473, 1989.

- 9) Celebi N, Erden N, Gönül B, Koz M: Effects of epidermal growth factor dosage forms on dermal wound strength in mice. *J Pharm Pharmacol* 46: 386-387, 1987.
- 10) Chi KH, Chen CH, Chan WK, Chow KC, Chen SY, Yen SH, Chao JY, Chang CY, Chen KY: Effect of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on oral mucositis in head and neck cancer patients after cisplatin, fluorouracil and leukovorin treatment. *J Clin Oncol* 13: 2620-2628, 1995.
- 11) Cromack DT, Reyes BP, Purdy JA, Pierce GF, Mustoe TA: Acceleration of tissue repair by transforming growth factor- β_1 : Identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced healing deficits. *Surgery* 113: 36-42, 1993.
- 12) Dedhar S, Gaboury L, Galloway P, Eaves C: Human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor acts on a variety of cell types of nonhematopoietic origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9253-9257, 1988.
- 13) Egehan İ: Radyasyon Onkolojisi: Kanser Temel Bilgiler Korunma Tanı ve Tedavi. Birinci baskı. Başaklar C (ed) Ersa, Ankara 1998, S: 27-32.
- 14) El Saghir NS, Bizri AR, Shabb NS, Husami TW, Salem Z, Shamseddine AL: Pressure ulcer accelerated with local injections of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor. *J Infect* 35: 179-182, 1997.
- 15) Emami B, Lyman J, Brown A, Colia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M: Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21: 109-122, 1991.

- 16)Ertoý D: Yara iyileşmesinin histopatolojisi: Tüm yönleriyle yara iyileşmesi. Birinci baskı. Erdem C, Çelebi CR (eds). Ayrıntı, Ankara 1996, S: 17-19.
- 17)Ezzeldin MI, Al-Mulhim FA: Effect of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on chemotherapy induced oral mucositis in non-neutropenic cancer patients. Med Oncol 14: 47-51, 1997.
- 18)Gorodetsky R, McBride WH, Withers HR, Miller GG: Effect of fibroblast implants on wound healing of irradiated skin: Assay of wound strength and quantitative immunohistology of collagen. Radiat Res 125: 181-186, 1991.
- 19)Gu Q, Wang D, Cui C, Gao Y, Xia G, Cui X: Effects of radiation on wound healing. J Environ Pathol Toxicol Oncol 17: 117-123, 1998.
- 20)Halabe A, Ingber A, Hodak E, David M: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor- A novel therapy in the healing of chronic ulcerative lesions. Med Sci Res 23: 65-66, 1995.
- 21)Hannock GE, Kaplan G, Cohn ZA: Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. J Exp Med 168: 1395-1402, 1988.
- 22)Hermans P, Gori A, Lemone M, Franchioly P, Clumeck N: Possible role of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on the rapid progression of AIDS-related Kaposi's sarcoma lesions in vivo. Br J Haematol 87: 413-414, 1994.
- 23)Heufler C, Koch F, Schuler G: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor and interleukin-1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. J Exp Med 167: 700-705, 1987.
- 24)Horn TD, Burke PJ, Karp LE, Hood AF: Intravenous administration of recombinant

Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor causes a cutaneous eruption. Arch Dermatol 127: 49-52, 1992.

- 25)Jyung RW, Wu L, Pierce GF, Mustoe TA: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor and Granulocyte-Colony Stimulating Factor: Differential action on incisional wound healing. Surgery 115: 325-334,1994.
- 26)Kaplan G, Walsh G, Guido LS, Meyn P, Burkhardt RA, Abalos RM, Barker J, Frindt PA, Fajardo TT, Celona R: Novel responses of human skin to intradermal recombinant Granulocyte/ Macrophage-Colony Stimulating Factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth and enhanced wound healing. J Exp Med 175: 1717-1728, 1992.
- 27)Kawada A, Hiruma M, Noguchi H, Ishibashi A, Motoyoshi K, Kawada I: Granulocyte and Macrophage-Colony Stimulating Factor stimulates proliferation of human keratinocytes. Arch Dermatol Res 289: 600-602, 1997.
- 28)Kawase Y, Naitos HM, Sekine I, Fujii H: The effect of ionizing radiation on epidermal Langerhans cells- A quantitative analysis of autopsy cases with radiation therapy. J Radiat Res 31: 246-255, 1990.
- 29)Kenneth R, Stevens JR: The soft tissue: Radiation Oncology: Rationale, Technique, Results. Altıncı baskı. Cox JD (ed) Mosby-Year Book Inc., St. Louis 1989, S: 83-111.
- 30)Kılıç D, Sayan H, Gönül B, Egehan İ: The effect of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on the glutathione and lipid peroxidation of rat during total body irradiation. 19th ESTRO Annual Meeting, September 19-23, 2000, İstanbul, S: 179 (P-685).

- 31) Kılıç D, Sayan H, Gönül B, Egehan İ: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor modulates histamine and ascorbic acid concentration in the irradiated skin wound. 19th ESTRO Annual Meeting, September 19-23, 2000, İstanbul, S: 179 (P-687).
- 32) Kingsnorth AN, Slavin J: Peptide growth factors and wound healing. Br J Surg 78: 1286-1290, 1991.
- 33) Kupper TS, Lee F, Bichal N, Clark S, Dower S: IL-1 binds to specific receptors on human keratinocytes and induces Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor RNA and protein. J Clin Invest 82: 1787-1792, 1988.
- 34) Kupper TS, Lee F, Coleman D, Chodakewitz J, Flood P, Horowitz M: Keratinocyte derived T-cell growth factor (KTGF) is identical to Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF). J Invest Dermatol 91: 185-188, 1988.
- 35) Krueger JG, Ray A, Tamm I, Sehgal P: Expression and function of Interleukin-6 in epithelial cells. J Cell Biochem 45: 327-331, 1991.
- 36) Lawrence WT, Diegel-Mann RF: Growth factors in wound healing. Clin Dermatol 12: 157-169, 1994.
- 37) Ledney GD, Stewart DA, Gruber DF, Gelston HM, Exum ED, Sheehy DA: Hematopoietic colony-forming cells from mice after wound trauma. J Surg Res 38: 55-65, 1985.
- 38) Lieschke GJ, Maher D, Cebon J, O'Connor M, Green M, Sheridan W, Boyd A, Rallings M, Bonnem E, Metcalf D: Effects of bacterially synthesized recombinant human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor in patients with advanced malignancy. Ann Int Med 110: 357-364, 1989.

- 39)Lopez AF, Williamson DJ, Gamble JR, Begley CG, Harlon JM, Klebanoff SJ, Waltersdorff A, Wong G, Clark SC, Vadas MA: Recombinant Human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression and survival. *J Clin Invest* 78: 1220-1228, 1986.
- 40)Luce EA: The irradiated wound: Symposium on wound management. *Surg Clin North Am* 64: 821-829, 1984.
- 41)Makkonen TA, Minn H, Jekunen A, Vilja P, Tuominen J, Joensu H: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor and sucalfate in prevention of radiation-induced mucositis: A prospective randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46: 525-534, 2000.
- 42)Maurer D, Stingl G: Wound Healing: Manual of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor. Birinci baskı. Marty M (ed) Blackwell Science Ltd, UK 1996, S: 208-218.
- 43)Michalowski AS: On radiation damage to normal tissues and treatment. *Acta Oncol* 33: 139-157, 1994.
- 44)Mustoe TA, Purdy J, Gramates P, Deuel TF, Thomason A, Pierce GF: Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. *Am J Surg* 158: 345-350, 1989.
- 45)Mustoe TA, Porras-Reyes BH: Modulation of wound healing response in chronic irradiated tissues. *Clin Plast Surg* 20: 465-472, 1993.
- 46)Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Casisi NJ, Nguyen T, Kalra A: Transforming growth factor- β 1 improves wound healing and random flap

survival in normal and irradiated rats. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122: 171-177, 1996.

47)Ninikoski J, Grislis G, Hunt TK: Respiratory gas tensions and collagen in infected wounds. Ann Surg 175: 588-593, 1972.

48)O'Reilly M, Silver GM, Gamelli RL, Davis JH, Herbert JC: Dose dependency of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor for improving survival following burn wound infection. J Trauma 36: 486-490, 1994.

49)Pastore S, Belasio EF, Albanesi C, Chinni LM, Gianetti A, Girolomoni G: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. J Clin Invest 99: 3009-3017, 1997.

50)Peacock EE: Collagenolysis and the biochemistry of wound healing: Wound repair. Üçüncü baskı. Peacock EE (ed) WB Saunders, Philadelphia 1984, S: 102-140.

51)Perez CA: Principles and practice of radiation oncology. Üçüncü baskı. Perez CA, Brady LW (ed) Lippincott-Raven, Philadelphia 1997, S: 155-177.

52)Pieters RC, Rojer RA, Saleh AW, Saleh AE, Duits AJ: Molgramostim to treat SS-sickle cell leg ulcers. Lancet 345: 528, 1995.

53)Robson M, Kucukcelebi A, Carp SS, Hayward PG, Hui PS, Cowan WT, Ko F, Cooper DM: Effects of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor on wound contraction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13 (Suppl 2): 41-46, 1994.

54)Rovirosa A, Ferre J, Biete A: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor mouthwashes heal oral ulcers during head and neck radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 41: 747-754, 1998.

- 55) Rubbia-Brandt L, Sappino AP, Gabbiani G: Locally applied Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor induces the accumulation of α -smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchow Archiv B Cell Pathol* 60: 73-82, 1991.
- 56) Ryan GB: Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol* 5: 55-59, 1979.
- 57) Sause WT: Principles of combining radiation therapy and surgery: Moss' radiation oncology: Rationale, Technique, Results. Yedinci baskı. Cox JD (ed), Mosby-Year Book Inc., St. Louis, 1994, S: 67-78.
- 58) Schuler G, Romani N: Hematopoietic growth factors and mononuclear phagocytes, epidermal Langerhans cells as a model for studying the effects of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor and other cytokines on the biology of dendritic cells: Hematopoietic Growth Factors and Mononuclear Phagocytes. Birinci baskı. Van Furth R (ed) Basel, Karger, 1993, S: 197-204.
- 59) Shamseddine AL, Khalil AM, Kibbi AG, Abu Nasr TA, Seoud MAF, El Saghir NS: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor for treatment of chemotherapy extravasation. *Eur J Gynaec Oncol* 19: 479-481. 1998.
- 60) Sieff C, Tsai S, Faller D: Interleukin-1 induces cultured human endothelial cell production of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor. *J Clin Invest* 79: 48-51, 1987.
- 61) Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, Ross R: Effects of growth factors in vivo. *Am J Pathol* 129: 601-613, 1987.

- 62)Steenfos HH: Growth factors and wound healing. Scand J Plast Reconstr Hand Surg 28: 95-105, 1994.
- 63)Tokarek R, Bernstein EF, Sullivan F: Effect of therapeutic radiation on wound healing. Clin Dermatol 12: 57-70, 1994.
- 64)Valyi Nagy I, Jensen PJ, Albelda SM, Rodeck U: Cytokine induced expression of transforming growth factor- α and the epidermal growth factor receptor in neonatal skin explants. J Invest Dermatol 99: 350-356, 1992.
- 65)Wakefield PE, James WD, Samlaska CP, Meitzer MS: Colony stimulating factors. J Am Acad Dermatol 23: 903-912, 1990.
- 66)Weisbart RH, Gasson JC, Golde DW: Colony stimulating factors and host defence. Ann Int Med 110: 297-303, 1989.
- 67)White MJ, Heckler F: Oxygen free radicals and wound healing. Clin Plast Surg 17: 473-483, 1990.
- 68)Wing EJ, Magee DM, Whiteside TL, Kaplan SS, Shadduck RK: Recombinant human Granulocyte/ Macrophage-Colony Stimulating Factor enhances monocyte cytotoxicity and secretion of TNF- α and interferon in cancer patients. Blood 73: 643-646, 1989.
- 69)Witmer-Pack MD, Oliver W, Vallinsky J, Schuler G, Steinmann RM: Granulocyte/ Macrophage-Colony Stimulating Factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. J Exp Med 166: 1484-1498, 1987.
- 70)Xing Z, Gauldie J, Tremblay GM, Hewlett B, Addison C: Intradermal transgenic expression of Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor induces

neutrophilia, epidermal hyperplasia, Langerhans cell/ macrophage accumulation and dermal fibrosis. Lab Invest 77: 615-622, 1997.

- 71)Yanase A, Ueda M, Kanade T, Torii S, Matsuyama M: Irradiation effects on wound contraction using a connective tissue model. Ann Plast Surg 30: 435-440, 1993.

