

1. GİRİŞ

Doksorubisin, pek çok hematolojik ve solid malignansi kemoterapi protokollerinde yer alan antrasiklin türevi bir antibiyotiktir(1). Meme kanseri, akut lösemi, malign lenfoma, multiple myeloma, sarkoma ve tiroid kanseri gibi pek çok malignansinin tedavisinde etkinliği saptanmıştır ancak oldukça geniş spektruma dağılan toksik etkileri mevcuttur(2). Dermatolojik, allerjik, gasrointestinal yan etkileri vardır, kemik iliği baskılanmasına neden olabilir ve kümülatif dozlarda kardiyotoksiktir. İntravasküler infüzyonu sırasında meydana gelebilen damar dışına kaçıışı ve bunun sonucunda ortaya çıkan lokal cilt nekrozu da oldukça sık karşılaşılan bir komplikasyondur(3). Doksorubisin direk toksik etkisi ile hücre ölümüne yol açar ve intraselüler sahaya doksorubicin-deoksiribonükleikasit(DNA) kompleksi salınır, bu da yara iyileşmesinde rol alan sitokin ve büyüme faktörlerinin sentezini inhibe eder (3).

Kemoterapi tedavisi alan kanser hastalarında kemoterapötik ajanın damar dışına sızmasına bağlı cilt nekrozu sıklığı %6 olarak rapor edilmiştir(4). Antitümör ajanın subkutan dokuya sızması kendini sınırlayan bir inflamasyonla kendini gösterebileceği gibi cilt ve tendon, kemik gibi ciltaltı dokulara ilerleyebilir ve ciddi doku nekrozuna, eklem hareketi kaybına neden olabilir(2). Ortaya çıkan lokal toksisite ağrı, eritem ve ödem ile kendini gösterir(5). Ülserasyon ise günler hatta haftalar boyu ortaya çıkmayabilir ve aylar boyu ilerlemeye devam edebilir. Buna neden doksorubisinin komşu dokulara difüzyonudur çünkü dokuda en az bir ay süreyle kalabildiği gösterilmiştir(5).

Küçük ülserler kendiliğinden iyileşebilirken büyük ve cilt altı dokulara ilerlemiş ülserler cerrahi tedavi gerektirebilir(6). İmmüsuprese hastalarda ise ülserler sepsise neden olabilir (7). Yara iyileşmesi doku zedelenmesi ile başlayan ve inflamasyon, proliferasyon, migrasyon, anjiogenesis, matriks sentezi, kollajen depolanması, reepitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşumunu içeren karmaşık bir süreçtir. Doku hasarını inflamatuvar ve vasküler endotelial hücrelerin ortama göçünü sağlayan fibrin bazlı matriksin oluşumu izler(8). Anjiogenesis ise yara iyileşmesinin fizyolojik sürecinin bir parçasıdır(8). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit kaynaklı büyüme

faktörü (PDGF) gibi anjiogenik büyüme faktörleri yara iyileşmesinde rol oynar(9). Granülosit-makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF)' ün kemoterapötik ilaçların damar dışına kaçışında kullanılmış ve etkinliği gösterilmiştir(10).

Eritropoietin (EPO), 30.4 kD büyüklüğünde bir glikoproteindir ve eritroid seri elemanlarının proliferasyonu, maturasyonu ve diferansiasyonu için mutlak gereklidir(11). Rekombinant insan eritropoietini ise anemisi olan kronik böbrek yetmezliği, solid malignensi hastalarında kullanılır ve transfüzyon sıklığını azaltır(12). Tip 1 sitokin ailesine üyedir ve sitokinler için klasik olduğu üzere kemik iliği dışında pek çok dokuda etkisi vardır(13). EPO biyolojik etkilerini hücre yüzeyinde bulunan bir tip1 sitokin reseptörü olan eritropoietin reseptörü (EPOR) aracılığı ile gösterir. EPO ve EPOR'nin pek çok nonhematopoetik hücre türünde bulunduğu gösterilmiştir. Böbrek, kas ve barsak hücrelerinde EPOR ekspresyonu ve hücre proliferasyonu ile ilişkisi gösterilmiştir. EPOR vasküler endotelial hücreler tarafından da üretilir ve EPO'nun anjiogenesisi uyardığı gösterilmiştir(8). Ayrıca EPO'nun hücre kültüründe üretilmiş insan umbilikal ven endotel hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir(14). İn vitro olarak iskemiye maruz kalan endotel hücrelerinde EPO'nun apoptozisi antagonize ettiği saptanmıştır(15). EPO' nun miyokard ve böbrek üzerine de iskemik hasara karşı koruyucu etkisi vardır(13). Deneysel beyin iskemisi çalışması EPO ve EPOR'nin metabolik strese yanıtın bileşenleri olarak etki ettiğini göstermiştir(13). Bu çalışmalarda EPO' nun hücre koruyucu etkisi ortaya koyulmuştur. Hematopoetik hücreler ve endotelial hücrelerin her ikisinde CD31 ve CD34 ekspresyon etmeleri, EPO ile VEGF arası etkileşim ve yukarıda açıkladığımız EPO'nun yara iyileşmesindeki rolünün önemli derecede olabileceğini düşündürmektedir.

Doksozobisininin neden olduğu cilt nekrozunun tedavisinde pek çok lokal ve sistemik farmakolojik ajan ve cerrahi teknik denenmiştir. Bu çalışmada amacımız, EPO'nun doksozobisininin neden olduğu cilt nekrozuna karşı koruyucu ve tedavi edici etkisini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

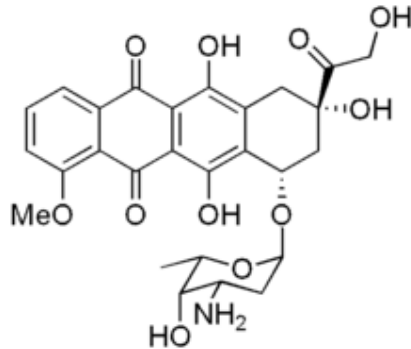
2.1.DOKSORUBİSİN

2.1.1.Doksorubisin ve Etki Mekanizmaları

Doksorubisin, pek çok hematolojik ve solid malignansi kemoterapi protokollerinde yer alan antrasiklin türevi bir antibiyotiktir(1). Etkin bir antineoplastik ajandır ve Hodgkin Lenfoma, nonHodgkin Lenfoma, akut lenfoblastik lösemi, metastatik meme kanseri, over kanseri, akciğer kanseri ve sarkomaların tedavi protokollerinde yer alır(1).

Doksorubisin hidroklorid (adriamisin) 1963 yılında bir mantar türü olan *Streptomyces peucetius* Caesius'un kültürlerinden üretilmiştir(16) ve antineoplastik bir ajan olarak ilk kez 1967de tanımlanmıştır(3,17). Sitotoksik bir antibiyotiktir. Faz spesifik bir ajan olmamakla birlikte S dönemindeki hücrelere etkinliği en fazladır(18, 19).

Antrasiklin molekülü, ilaca kırmızı rengini veren tetrasiklik çekirdek ile ona glikosidik bir bağ ile bağlı bir aminoşekerden(daunosamin) oluşur. Antrasiklin grubunun tüm üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır. Bunlar elektron alma ve verme işlevini görürler. Daunorubicin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile doksorubisin meydana gelir(18,20)(Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Doksorubisinin kimyasal yapısı.

Kimyasal yapısı daunorubisin ve epirubisine benzer. Bu nedenle tümör hücreleri bu ilaçlara çapraz rezistans gösterebilir(19). İdarubisin ise sentetik türevleridir(18,19). Daunorubisinden farkı 8 pozisyonundaki asetil grubu yerine hidroksiasetil grubu içermesidir. Epirubisin ise doksorubisinin 4 epimeridir(21). İdarubisin ise daunorubisinin aglikon halkasındaki C-4 grubundaki metil grubunu içermeyen sentetik türevidir(18).

Doksorubisin ve daunomisin, serbest difüzyon ile hücreye girer. Bazı hücrelerde antrasiklinler P170glikoprotein (P170gp) ile hücre dışına atılır. P170gp, bir membran proteini olup, vinka alkaloidleri, aktinomisin D, epipodofilotoksinler ve antrasiklinler gibi doğal kaynaklı ilaçları hücreden dışarıya doğru aktif olarak pompalar(20).

Doksorubisinin antineoplastik etkisini açıklayan 3 mekanizma vardır; nonspesifik olarak komşu baz çiftleri arasına yerleşerek DNA ve ribonükleik asit(RNA) sentezini bloke eder ve topoizomeraaz 2 enzimini inhibe ederek DNA'nın çift heliks yapısını kırar, hücre zarına tutunarak hücresel fonksiyonları bozar(1). Nükleus zarında bulunan sitokrom P-450 redüktaz enzimi antrasiklinlerin semikinon serbest radikallerine indirgenmesini sağlayan reaksiyonu katalize eder. Moleküler O₂'yi azaltır, DNA'nın tek sıra olmasına neden olan süperoksit iyonu ve hidrojen peroksit üretimini artırır(22). Sonuç olarak maruz kalan hücre DNA'sında kimyasal ve oksidatif hasar meydana gelir(23). Serbest radikal üretimi doksorubisinin demir ile reaksiyona girmesi ile uyarılır(18). Kalayanamaran ve ark. doksorubisinin submikromolar konsantrasyonlarında bile meydana gelen metal katalizörlü H₂O₂ üretiminin epitel hücreleri ve kardiyomyositlerde toksik etkiye neden olduğunu göstermişlerdir(24). Tümör hücresine komşu dokularda görülen bu etki de tümör büyümesi üzerine etkisini açıklayabilir(23). Süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimatik koruma faktörleri dokuları antrasiklinlerin toksik etkilerinden korur(18). Doksorubisinin metabolik enzimleri inhibisyonu, adenozintrifosfat (ATP) ve guanozinsulfurhidroksit(GSH)'ın azalması, membran hasarı sonucu endotelial disfonksiyona neden olur. Bu olayda hayvan ve insanlarda tümör büyümesinin önlemesini sağlar(23).

2.1.2.Dokсорubisinin Metabolizması ve Farmakokinetikleri

Mide asidinde stabil olmadığından gastrointestinal sistemden absorbe edilmez, sadece parenteral uygulanır(25). Ciddi doku hasarı yaptığından intramuskuler yada subkutan uygulanmaz, sadece intravenöz kullanılır(21). Kan-beyin bariyerini geçmez. Radyasyonun doku toksisitesini arttırabileceğinden aynı anda kullanılmamalıdır(18,19).

Plazma proteinlerine %70 oranında bağlanır, yarı ömrü 3-30 saat arasındır, intravenöz uygulamadan sonra 30 sn kadar kısa bir sürede karaciğer, akciğer, kalp ve böbreklere ulaşır. Hücreler tarafından absorbe edilir ve ardından nükleik asitlere bağlanır(21,22,25). Dokulara fazla bağlanıp yavaş salıverildiğinden, karaciğerde hızlı metabolize edilmesine rağmen vücutta kalışı ve etkisi uzun sürer (18). Karaciğer ve diğer dokularda aldo-keto redüktaz enzimi ile metabolize edilir ve aktif metaboliti olan dokсорubicinol ve intaktif metabolitleri olan dokсорubicinone, pek çok sitotoksik aglikon metabolitlerine ve konjugatlarına dönüşür(25). Karaciğerde metabolize olmak için öncelikle hepatik sinüzoidal endoteli, Disse aralığını geçip hepatosite girmesi gerekir. Hepatosite alınan dokсорubisin metabolitlerine ayrılır ve P-glikoprotein gibi taşıyıcılarla safraya atılır(26).

Esas olarak karaciğerden safra yoluyla elimine edilmesine rağmen az bir miktarda böbreklerden (%3-10) ve dışkıyla (%40-50) atılır. Dışkıyla atılan kısım değişmemiş ilaç şeklindedir(25). Böbreklerden itrahi ise ilaç uygulandıktan 1-2 gün sonra idrarın geçici bir süre için kırmızıya boyanmasına neden olur ancak bunun klinik önemi yoktur(18,25). Karaciğer fonksiyon bozukluğu olanlarda doz ayarlaması gerekirken böbrek yetmezliği olanlarda genellikle gerek yoktur (22).

2.1.3. Dokсорubisinin Yan Etkileri

2.1.3.1. Dermatolojik Yan Etkileri

Alopesi hemen hemen tüm hastalarda görülür ve tedavi sonlandıktan 2-3 ay içinde normale döner.

Çok hızlı verildiği takdirde yüzde flushing ortaya çıkar(25).

Fotosensitiviteye neden olabilir(25).

Tırnak yatağında hiperpigmentasyon veya bantlaşma meydana gelebilir(21).(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Tırnak yatağında doxorubicine bağlı gelişen bantlaşma.

2.1.3.2. Kemik İliği Supresyonu

Doz kısıtlamasına en sık neden olan yan etkidir. Lökopeni tedavinin 2. haftasında ortaya çıkar ve 4. haftanın sonlarında hücreler yükselir. Şiddeti ilacın dozuna ve kemik iliğinin rejenerasyon kapasitesine bağlı olarak değişir (21). Trombositopeni ve anemide görülebilir (26).

2.1.3.3. Mukozit

Stomatit, gastrointestinal mukozit, alopesi sık görülen ancak reversiblen yan etkilerdir (18). İlaç üst üste birkaç gün verildiğinde risk artar. Genellikle tedavinin 2. haftasında ortaya çıkar ve 3-7 gün içinde geriler(21).

2.1.3.4. Kardiyotoksite

Tedavinin kesilmesine neden olan en sık yan etkidir. Doksorubisine bağlı kardiyotoksite gelişme riskini yüksek kümülatif doz ($> 450 \text{ mg/m}^2$), diğer antrasiklinlerle veya anthracenedionlarla (ör. mitoksantron, mitomisin) kombine kemoterapi almış olmak, daha öncesinde yada eş zamanlı mediastinal/perikardial bölgeye radyoterapi almış olmak, daha önceden varolan kalp rahatsızlığı, genç yada ileri yaşta olmak, karaciğer hastalığı, bevacizumab, siklofosfamid, paklitaksel ve transtuzumab ile birlikte kemoterapi almak, miyokard kasılmasını suprese edebilecek ilaçlarla birlikte kullanmak, hipertermi, kadın cinsiyet (özellikle çocuklarda) gibi faktörler artırabilir (25).

2.1.3.5. Allerjik Reaksiyonlar

Ateş, döküntü ve ürtiker meydana gelebilir. Nadiren anafilaksi oluşabilir(25). Doksorubisine bağlı hipersensitivite reaksiyonlarının sıklığı %3-21 olarak rapor edilmiştir(4).

2.1.3.6. Endokrin Yan Etkiler

Doksorubisin tedavisi gonadal supresyon sonucunda oligospermi, azospermi veya amenoreye neden olabilir(25).

2.1.3.7. Gastrointestinal Yan Etkiler

Bulantı, anoreksiya ve diyareye neden olabilir, kolonda ülserasyonlar ve nekroz ortaya çıkabilir(25).

2.1.3.8. Damar Dışına Sızma ve Cilt Nekrozu

Damar dışına sızma (ekstravazasyon); intravenöz infüzyon sırasında intravasküler sahadan interstisiyel boşluğa olan kaçaaktır(3). Bu kaçak pek çok lokal doku hasarına neden olur. Erişkinlerde, sitotoksik ilaç kullanımı sırasında meydana gelen sızma sıklığı %0.1-6 arasında rapor edilmiştir(27). Çocuklarda ise bu oran %11-58'e kadar yükselmiştir(28).

Kemoterapi sırasında damar dışına kaçışın sıklığının artmasına yol açan risk faktörleri Tablo 2.1'de belirtilmiştir(29).

Tablo 2.1. Ekstravazasyon için risk faktörleri.

Ven fizyolojisi	Frajil, küçük, skleroze venler, damar büyüklüğü, kan akımı
Farmakolojik	Dokunun kemoterapotik ajana maruziyet süresi ve miktarı
Fizyolojik	Superior vena kava sendromu, lenfödem, periferik lenfadenopati, flebit
Radyolojik	Daha önce lokal radyasyon maruziyeti
Mekanik	İğne uygulama tekniği, enjeksiyon bölgesi, uygulama tecrübesi

Damar dışına sızmanın sebep olduğu doku hasarı farklı mekanizmalarla ortaya çıkar;

- Antrasiklin gibi ajanlar DNA'daki nükleik asitlere bağlanırlar ve böylece direk hücre ölümüne neden olurlar. Endositolizden sonra ölü hücrelerden ilacın salınmasına bağlı olarak komşu hücrelerin de ölümüne neden olur. Bu olayın sürekli tekrarı yara iyileşmesini engeller ve kronik ve progresif doku hasarına neden olur(16,30,31).
- Vinka alkaloidleri gibi DNA'ya bağlanmayan ajanlar hızlı metabolize olurlar ve bu da doku hasarının sınırlanmasını sağlar(32).

Kemoterapotik ajanlar sızma sonrası neden oldukları cilt nekrozuna göre 3 gruba ayrılırlar; vesikan, non-vesikan ve irritan(Tablo 2.2). Vesikan ajanların doku nekrozu oluşturma potansiyeli vardır. İrritan ajanlar ise doku nekrozuna neden

olmadan inflamatuvar reaksiyona neden olurlar. Vesikan kemoterapotik ajanlar ise 2 kategoride incelenir; DNA'ya bağlananlar ve bağlanmayanlar. DNA'ya bağlananlar sadece doku hasarına neden olmakla kalmazlar uzun süreli lezyonların gelişimine neden olurlar(6,29). Non-vesikan ilaçlar ise damar dışına sızdıklarında nadiren akut reaksiyona yada doku nekrozuna neden olurlar(33).

Tablo 2.2. Vesikan, irritan ve non-vesikan kemoterapotik ajanlar.

DNA'ya bağlanan vesikan ajanlar	
Alkilleyici ajanlar	Mekloreタミン
Antrasiklinler	Doksorubisin, daunorubisin, epirubisin, idarubisin
Antitümör antibiyotikler	Mitomisin, daktinomisin, mitoksantron
DNA'ya bağlanmayan vesikan ajanlar	
Vinka alkaloidleri	Vinblastin, vinkristin, vinorelbin, vindesin
Taksan	Paklitaksel
Nonklasik alkilleyiciler	Amsakrin
İrritan ajanlar	
Alkilleyici ajanlar	Karmustin, dakarbazin, ifosamid, melfelan, tiotepa, streptozosin
Platinyum analogları	Karboplatin, cisplatin, oksaliplatin
Topoizomeraz II inhibitörleri	Teniposid, etoposid
Antrasiklinler	Liposomal doksorubisin
Non-vesikan ilaçlar	Aldeslökin, L-asparajinaz, kladribin, sitarabin, lipozomal daunorubisin, floksuridin, 5-florourasil, gemitabin, irinotekan, metotreksat

Doksorubisinin damar dışına kaçışı ciddi ve irreversible doku hasarına neden olur. En sık görüldüğü yerler ise el sırtı ve antekübital fossa gibi yumuşak doku yoğunluğunun az olduğu yerlerdir(28). Ekstravazasyon meydana geldiğinde

yanma ve hassasiyet gibi semptomlar ortaya çıkabileceği gibi hiçbir şikayete neden olmayabilir(21). Bulgular ağrı ve lokalize inflamasyondan tam kat nekroz ve ülserasyona kadar değişen bir çerçevededir(33). Ağrının süresi hasarın derecesi ile doğru orantılıdır.(Şekil 1.3). Semptomların şiddeti infüzyon yerine, dokunun durumuna, ilacın konsantrasyonuna ve miktarına, hastanın genel beslenme durumuna bağlı olarak değişir ve genellikle sekel lezyonlar orijinal hasardan daha ciddidir(3,28,29,33). Etraf dokulardaki şişliğe eritem eşlik edebilir ve bül oluşumu en azından parsiyel kalınlıkta doku hasarına işaret eder, cildin koyulaşması görülebilir. Erken, sert bir endürasyon ve ağrı olası bir ülserin en iyi göstergeleridir. Kemoterapi sonrası radyoterapi veya sonraki kemoterapi kürlerinden sonra cilt toksisitesi reaktive olabilir. Buna neden ilk hasardan sonra yetersiz hücresel yanıt ve tekrarlayan hasar oluşumudur(28).



Şekil 2.3. Doksorubisine bağlı cilt nekrozuna örnek (10).

Kemoteropatik ajanlar oldukça sinsi bir şekilde lezyon oluştururlar çünkü çevre dokuya yayılırlar ve radyasyon nekrozuna benzer şekilde yavaş ilerleyen ülserler oluştururlar ve aynı şekilde meydana gelen lezyonun iyileşmeside oldukça

yavaştır(29,34). Doku hasarının kronik progresyonunun nedeni ajanın lokal olarak metabolize edilememesi veya lenfatik dolaşım ile uzaklaştırılmamasıdır.

Hücre düzeyinde, çeşitli ajanların damar dışına kaçışının sonucunda nekroz oluşumu sırasında aktive olduğu bilinen 5 mekanizma vardır(34);

1. Direk hücresel toksisite: Pek çok sitotoksik ajan vesikandır ve ilave olarak doku DNA'sına bağlanabilir ve hızlıca doku hasarına neden olabilir. Böylece ilaç ölen hücrelerden sağlam hücrelere sürekli salınım gösterir ve bu zaman içerisinde ülser boyutunun artmasına neden olur. Doksorubisinin ekstrevasyonu meydana geldikten 5 ay sonra hala dokuda kaldığı gösterilmiştir, bu da varolan lezyonların artmış doku hasarı ile kendini göstermesine neden olur.
2. Osmotik aktivite: Osmolaritesi serumdan (281-289 mosm/L) daha fazla olan maddeler osmotik olarak aktif olarak değerlendirilirler. Bu maddeler cilt altında bulduklarında hücre zarında osmotik hasara neden olurlar. Hücre zarındaki transport mekanizmalarının bozulmasına neden olarak hücre ölümüne yol açar. Örneğin; kontrast maddeler, antibiyotikler ve total parenteral beslenme sırasında meydana ekstrevasyon bu yolla doku hasarı yapar.
3. Vazopressor yada katyonik solüsyonların neden olduğu iskemik nekroz: Adrenalinin damar dışına sızmasında olduğu gibi düz kas çevresindeki kapillerlerde kontraksiyona neden olarak iskemik nekroza sebep olur.
4. Mekanik kompresyon: Ekstraselüler hidrostatik basınçta artış interstisiyel basıncı artırır, venöz kompresyonla birlikte arteriyel basınç artışına neden olur.
5. Bakteriye kolonizasyon: Eskar dokusu altında meydana gelerek doku iyileşmesini engeller.

Doksorubisine bağlı cilt nekrozunun mekanizmasını açıklamada kullanılan iki teori vardır; doksorubisin-DNA kompleksi hücre ölümüne neden olur, ölen hücrelerden salınan doksorubisin serbest kalır ve çevre dokuların DNA'sı ile kompleks meydana getirir(35,36). Bu da yara iyileşmesinde rol oynayan hücrelerin aktive olmasını sağlayan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin ortama salınmasını engeller(37,38). Diğer teori ise doksorubisinin bir semikinon serbest radikaline

enzimatik olarak dönüşümünün ardından oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sonucu hücre zarına toksik etkisi olan süperoksit, hidroksil ve peroksit radikalleri meydana gelmesidir(39).

Doksozobisinin damar dışına sızması sonucu meydana gelen doku nekrozunun histopatolojik incelemesinde kollajen yıkımı, tromboz ve eritrositlerin ekstrasvazyonu ve bozulmuş damarsal yapı bütünlüğü görülür. Dermiste, beklenen artmış inflamatuvar infiltrat görülmez. Avasküler, nekrotik, kronik ülser oluşumu izlenir. Ekstrasvazyonun 5. gününde endoplazmik retikulum dilate olur, çift zarlarda vakuoller oluşur, bazı hücrelerde mitokondri şişer ve hücre zarının lizisi sonucu pek çok hücre hasar görür. 3. haftada endoplazmik retikulum agrege olur, intraselüler mitokondriyer parçalanır ve pek çok damar hücre artıkları ile dolar. Bu dejeneratif değişiklikler ilk haftadan başlayarak 12. haftaya kadar sürer(4).

Damar dışına kaçışın tedavisinde pek çok yöntem denenmiştir ve hepsinde doku nekrozunun ve ülserasyonun ilerlemesini önlemek ortak amaçtır. Şüphelenildiği takdirde farmakolojik ve nonfarmakolojik adımları içeren önlemler alınmalıdır. İlk adım infüzyonun durdurulmasıdır ancak iğne ilacın daha fazla yayılmasını önlemek için yerinde bırakılmalıdır, 1-3 mL kan enjektör ile aspire edilmeli ve dokudaki ilaç konsantrasyonu azaltılmalıdır. Etkilenen ekstremitelerde yüksekte tutulmalı ve soğuk kompres uygulanmalıdır ve varsa doku nekrozunu önlemek için antidot uygulanmalıdır(28,29).

Doksozobisin ekstrasvazyonu için denenmiş ve faydalı etkisi olduğu görülmüş pek çok antidot vardır. Bu ajanlardan biri dimetilsulfoksit (DMSO)'dir. DMSO, etkili bir serbest radikal tutucusudur, dokuda oluşan serbest radikalleri nötralize eder ve topikal uygulandığında hızlıca dokuya penetre olur. DMSO %99 kullanılarak yapılan prospektif çalışmalarda etkili olduğu saptanmıştır(29).

Dekstrazoksan, topoizomeraz inhibitör II katalitik inhibitörüdür. İlaç demire bağlanır ve böylece antrasiklin-demir kompleksini ayırır ve böylece serbest radikallerin meydana gelmesini önler(29). Hayvan deneylerinden tek doz dekstrazoksan uygulanmasının antrasiklinlere bağlı ülser görülme sıklığını azalttığı ve ülser boyutunu küçülttüğüne dair veriler elde edilmiştir. İnsanlarda da benzer şekilde sonuç elde edilmiş sınırlı sayıda çalışma vardır(6).

Vargel ve ark.(4) tarafından yapılan bir çalışmada granülosit koloni stimule edici faktör (G-CSF) ve GM-CSF'nin önleyici rolleri deneysel bir düzenekte araştırılmış ve koloni stimule edici faktörlerin (CSF) lezyonların erken tedavisinde faydalı oldukları saptanmıştır. Gülbaş(10) tarafından yapılan klinik bir çalışmada ise GM-CSF insanlarda kemoterapötik ilacın damar dışına ekstrevasyonunda kullanılmış ve tedavi edici rolü gösterilmiştir.

Bir başka çalışmada düşük molekül ağırlıklı heparin fraksiyonlarının doku nekrozuna etkisi araştırılmış ve heparinin serbest doksorubisine bağlanma yoluyla ülser meydana gelme sıklığını ve büyüklüğünü azalttığı ve nekrozu önlemede faydalı olduğu görülmüş ancak farklı heparin fraksiyonlarının etkinliği kıyaslanmamıştır(6,17).

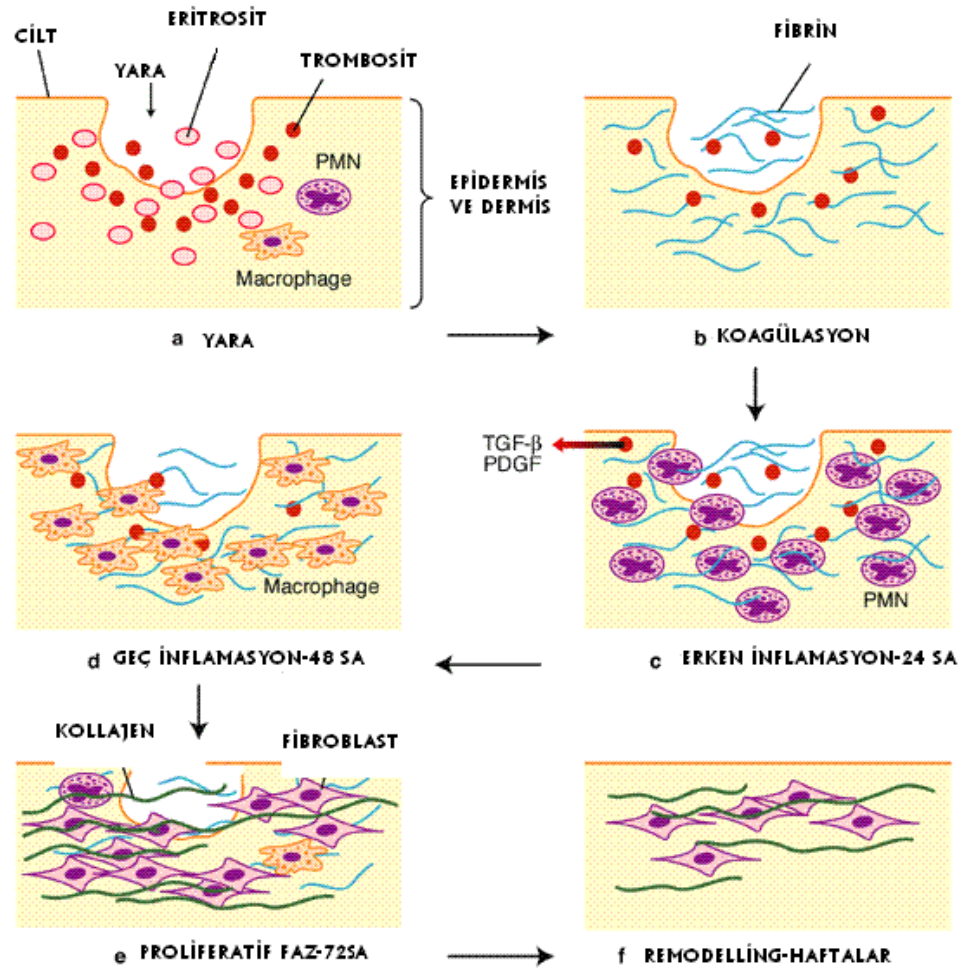
Lezyon bölgesine glukokortikoid enjeksiyonu denenmiş ancak kabul görmemiş çünkü doksorubisinin doku hasarına inflamasyon ile değil direkt doku nekrozu oluşturarak sebep olduğu saptanmıştır(6).

Meydana gelen lezyonların iyileşmesi oldukça güçtür ve aylar sürebilir. Çoğu immunsuprese olan bu hastalarda yara iyileşmesinin gecikmesinin ve morbiditenin artmasının nedeni sistemik yanıtın zayıflığıdır. Azalmış kollajen üretimi ve fibroblast proliferasyonunun inhibisyonu bu gecikmeyi açıklayabilir(4). Geniş ülserler geliştiğinde plastik cerrahi müdahalesi gerekebilir. Cerrahi uygulandığında tüm non-viable dokular ve eğer açık ülserler geliştirecek şekilde yayıldığı tüm dokular eksize edilmelidir (33).

2.2.YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşmesi, doku hasarına yanıt olarak ortaya çıkan, zedelenmiş dokunun bütünlüğünü ve fonksiyonunu tamir eden karmaşık bir süreçtir(8). İnflamasyon, hücre göçü, angiogenesis, matriks sentezi, kollajen birikimi ve reepitelizasyonu içerir(40). Birbirini takip eden bu olaylar inflamatuvar hücrelerin olay yerine toplanması ile başlar ve bunu proliferatif faz izler. Proliferatif faz boyunca fibroblastlar kollajen matriksin sentezini ve yeniden yapılanmasını sağlar, keratinositler yara boyunca yayılıp yeni bir epitelyal tabaka oluştururlar ve angiogenezis meydana gelir. Neovaskülarizasyon süresince, endotel hücreleri angiogenik fenotip kazanırlar ve proteaz üretirler, hücre göçü ve proliferasyonu meydana gelir, bu olayları proliferasyon ve diferansiyasyon takip eder ve yeni damar oluşumu ile sonuçlanır. Yeni damar oluşumu, besin ve oksijen taşınmasını sağlar ve yara iyileşmesinin en önemli adımıdır(41).

Eğer cerrahi inzisyonlarda olduğu gibi yara dudakları düzgün ve temiz ise buna primer iyileşme denir. İlk 24 saatte nötrofiller fibrin yumağına doğru ilerler ve ardından epitel hücreleri bazal membran oluşturmaya başlar. 3. günde nötrofiller makrofajlarla yer değiştirir ve granülasyon dokusu yara dudaklarının arasını doldurmaya başlar. 5. günde granülasyon dokusu iyice büyümüştür ve neovaskularizasyon maksimum boyuttadır, kollajen lifleri düzenli hale gelir ve yara dudakları arası köprüyü oluşturur, epidermis normal kalınlığına ve yapısına kavuşur. 2. hafta boyunca kollajen birikimi ve fibroblast proliferasyonu devam eder. 1. ayın sonunda skar dokusu inflamatuvar infiltrattan ziyade hücresel bağ dokusu şeklini alır. Ancak geniş doku defektlerinin olduğu durumlarda sekonder iyileşme görülür. Primer iyileşmeden farkı inflamatuvar reaksiyonun daha yoğun olması, daha fazla granülasyon dokusunun oluşması, fibroblastların düz kas hücresi özelliğini alarak miyofibroblasta dönüşmesi ve bunun sonucunda ortaya çıkan yara kontraksiyonudur(42). Şekil 2.4’ de yara iyileşmesinin basamakları gözlenmektedir.



Şekil 2.4. Yara iyileşmesinin fazları.

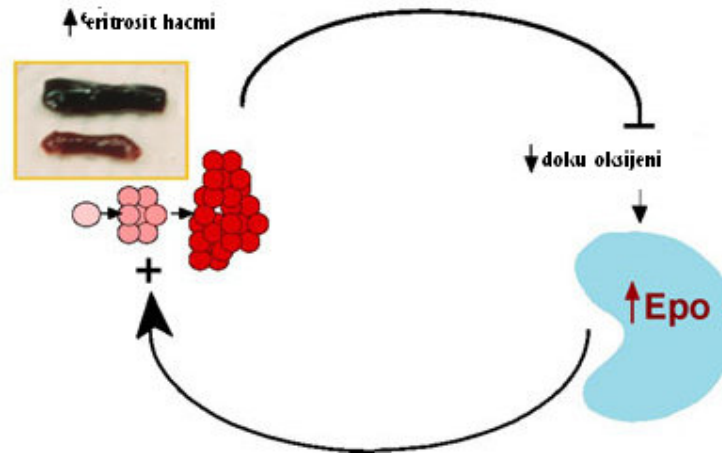
Yara iyileşmesinin bahsedilen tüm bu basamakları inflamatuvar hücreler, biyokimyasal mediatörler, ekstraselüler matris molekülleri ve mikroçevresel hücre popülasyonu arasındaki karmaşık ilişkinin sonucunda gelişir(43). Erken inflamatuvar faz boyunca nötrofil ve makrofajlar pek çok kemotaktik faktörün etkisi ile hasarlı dokuya yönelirler. Aktive olan bu hücreler reaktif oksijen radikali oluşumuna sebep olurlar(44).

Gecikmiş yara iyileşmesinin en önemli nedeni yetersiz kan akımıdır(14). Anjiogenesis, doku oksijenizasyonunu ve besin taşınmasını arttırmak amacı ile yeni damar oluşumu olarak tanımlanır ve yara iyileşmesinin en önemli adımıdır. Proliferatif fazda gelişir(45,46). Makrofaj ve keratinositlerden VEGF, fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi pek çok anjiogenik

büyüme faktörü salınır(41). Anjiogenesi stimule ettiği bilinen pek çok büyüme faktörü içinde VEGF en önemlisidir(45,47). Hasar görmüş dokuda VEGF'nin oluşumunu düzenleyen pek çok büyüme faktörü mevcuttur; FGF β ve PDGF, makrofajlar, keratinositler, iyileşen yaradaki hipoksik zon ve reaktif oksijen radikalleridir(27). Bunlardan birindeki eksiklik yara iyileşmesinde gecikmeye neden olur.

2.3. ERİTROPOİETİN, ETKİLERİ ve YARA İYİLEŞMESİNDEKİ ROLÜ

Eritropoietin(EPO), 30.4 kD büyüklüğünde, düşük molekül ağırlıklı bir glikoproteindir ve eritroid seri elemanlarının proliferasyonu, maturasyonu ve diferansiasyonu için mutlak gereklidir. Eritroid öncüllerin proliferasyon ve diferansiasyonunu artırırken antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırır ve apoptozisi inhibe eder. Böylece eritropoiezis ve eritrosit kaybı arasındaki dengeyi sağlayarak kırmızı küre hacmini belli bir düzeyde sabit tutar ve doku oksijenasyonunu artırır(48-51). (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. Eritropoietin ve kırmızı kan hücre kütlesi arası ilişki.

EPO, ilk kez 19.yy'ın sonlarında hipoksinin kırmızı kan hücrelerini artırdığı fark edilince gündeme gelmiştir ve 1950'lerde serum faktörü olarak tanımlanmıştır. 1970'te Miyake ve ark. aplastik anemili hastaların idrarından elde etmeyi başarmışlardır. 1985'te insan EPO geni klonlanmıştır ve o tarihten beri rekombinan EPO kronik böbrek yetmezliği başta olmak üzere pek çok hastalığın seyri sırasında

gelişen aneminin tedavisi için kullanılmaktadır(52). EPO'nun bir özelliği de ilk klonlanan hematopoietik büyüme faktörü olmasıdır (51). Endojen EPO'nun biyolojisinin anlaşılması ise 1990'ların başına denk gelmektedir(53).

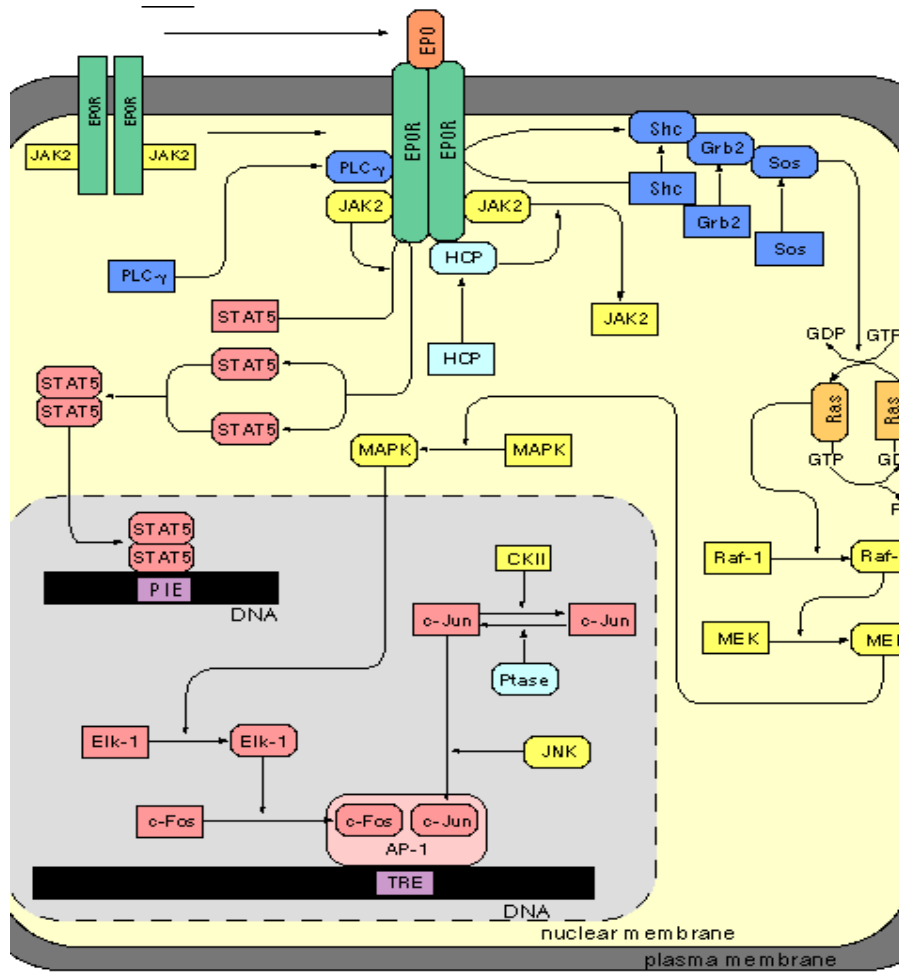
Primer olarak böbrek korteksindeki veya medullanın dış kısmındaki peritubuler interstisiyel hücrelerden hipoksiye yanıt olarak üretilir(11,54). Böbrekte sentezlendiği ilk olarak Jacobson ve ark. tarafından gösterilmiştir (51). Memelilerde gestasyonun erken dönemlerinde mesonefrik böbrekte yoğun olarak EPO gen ekspresyonu saptanmaktadır. Fetal ve neonatal dönemde karaciğerden de üretilebilir. Erişkin böbreğinde hipoksi, DNA'ya bağlanan protein olan *hipoksi induced factor-1* (HIF-1) ile EPO ekspresyonunu uyarır(55,56). Fetal ve neonatal dönemde karaciğerden de üretilebilir. Karaciğer EPO üretiminin %20'sini sağlar. Karaciğerde sentezi sağlayan hücreler santral ven çevresinde yerleşmişlerdir ancak böbrekteki fibroblast benzeri interstisiyel hücreleri ile ortak bazı özellikleri olan İto hücreleri de sentezden sorumludur(51). Bugün artık EPO'nun fiziksel veya metabolik stres yanıtında pek çok dokudan lokal olarak salındığı bilinmektedir(53).

EPO, 66-78kD büyüklüğünde bir protein yapısındadır(57). Tip 1 sitokin ailesine üyedir ve sitokinler için klasik olduğu üzere kemik iliği dışında pek çok dokuda etkisi vardır (13). EPO sentezi esas olarak hipoksi ile regüle edilir ve hipoksik şartlarda EPO gen transkripsiyonu artar. Sentezlenen EPO plazmaya salınır ve depolanmaz (51).

Plazmaya salınan EPO kemik iliğine geldiğinde, eritroid öncül hücre yüzeyindeki spesifik reseptörüne (EPOR) bağlanarak hücre içi etkilerini gösterir(8,58,59). EPO reseptörü eritroid hücre gelişiminde özellikle *colony forming unit eritroid*(CFU-E) ve pronormoblast aşamalarında en fazla görülür(57). Bu dönemde 1100 reseptör/hücre sayısına ulaşılır(11). Eritroid hücre farklılaşması süresince hücre yüzeylerindeki EPO reseptör sayısı azalır ve çeşitli çalışmalarda retikülosit ve matur eritrositlerin EPO reseptörü içermediği gösterilmiştir(57). Megakaryositlerde de EPOR ekspresyonu saptanmıştır(11). EPOR geni 1989'da D'Andrea ve ark. tarafından murin eritrolökemi hücrelerinden klonlanmıştır. EPOR, bir tip 1 sitokin reseptörüdür ve bu reseptör ailesi çeşitli interlökinler, GM-CSF, G-CSF, büyüme hormonu (GH) ve prolaktin reseptörlerini içerir(52,57).

EPOR'in ekstraselüler kısmı EPO için yüksek afiniteli ve düşük afiniteli iki bölümden oluşur(57). Reseptörün sitoplazmik kısmında aynı şekilde iki bölümden oluşur, plazma zarına yakın olan kısmı sinyal iletiminden sorumludur, diğer kısmının ise sinyal iletimi ile ilgisi yoktur(60,61). Sitokin reseptörlerinin sitoplazmik bölümleri katalitik aktiviteye sahip değildir ancak membran proksimal kısımlarında sınırlı benzerlikleri vardır. Bu benzerlikler box 1 (sitoplazmik domaindeki proline zengin ilk 20 aminoasit dizisi) ve box 2 (bir veya iki pozitif yüklü aminoasit ile sonlanan hidrofobik aminoasit kümesi) olarak tanımlanmıştır(11).

EPO, reseptörüne bağlanarak bir dizi intraselüler sinyal zincirini tetikler(Şekil 3); reseptöre bağlı tirozin kinaz olan *Janus family tyrosin protein kinaz 2* (JAK2) transfosforilasyon ile aktive olur, EPOR'nin sitoplazmik kısmındaki sekiz tirozin rezidüsünü fosforiler. EPOR'nin fosforile olan tirozin rezidüleri diğer intraselüler proteinleri *src homoloji 2* (SH2) domainleri üzerinden EPOR'üne bağlanmak üzere etkiler ve bunların da büyük kısmı sırasıyla fosforile olur(11). Fosforile olarak aktive olan proteinlerden biri *signal transducer and activator of transcription 1,3,5A ve 5B* (STAT 1,3,5A,5B)'dir. STAT 5 molekülü fosforilasyon sonrası EPOR'den ayrılır, dimerize olur, hedef genleri aktive etmek üzere nükleusa transloke olur ve bu olaylar öncül hücrenin proliferasyon ve diferansiyasyonunu sağlar(55,57,58). Hücre proliferasyonunda rolü olduğu bilinen Ras/MAP kinaz yolu da EPO tarafından aktive edilir. EPO'nun Ras'ı pek çok yoldan aktive ettiği gösterilmiştir. Grb2 sitoplazmik bir proteindir ve SH2 domaini üzerinden tirozin fosforillenmiş EPOR'e direk bağlanabilir veya tirozin fosfataz SHP2 veya SHC ile indirek olarak aktive eder. SHC JAK2 tarafından EPO'ya bağımlı olarak fosforillenir, fosforile SHC fosforile EPOR'e,Grb2'ye ve SOS'a bağlanır. Bu olaylar Ras'ın aktivasyonu ile sonuçlanır(11). Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI 3-kinaz)'ın p85 alt ünitesi ve EPO reseptörünün son tirozini SH2 domaini içerir. Tirozin fosforilasyonu ve PI-3 kinazla olan ilişkisi aktivasyon için alternatif bir yol oluşturabilir. EPO aktivasyonuna yanıt olarak SH2'nin fosforilasyonu eritroid hücre proliferasyonunun uyarılması ile sonuçlanır(52,57). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. EPO'nun hücre içi sinyal iletisi.

Eritroid hücrelerdeki PI 3-kinaz'ın fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber PI 3-kinaz'ın spesifik inhibitörü olan K562 ile tedavinin EPO'ya bağlı hemoglobin sentezini bloke ettiği gösterilmiştir(62). *Stem cell* faktörü(SCF) veya c-kit'in de EPOR'ünün fosforilasyonu yoluyla EPO ile etkileşimi mevcuttur, bu olayda eritroid hücrelerin artmış diferansiyasyon ve proliferasyonu ile sonuçlanır(57). SCF ve c-kit eksikliği olan farelerde normal sayıda *erythropoietic burst formation* (BFU-E)'a sahipken CFU-E gelişimi olmaz ve ağır anemi gelişir(11).

EPOR'de box 1 JAK2 aktivitesi için spesifiktir. Reseptörün sitoplazmik domainindeki çok sayıdaki tirozin rezidüsü (özellikle 343 ve 401 pozisyonundakiler) STAT5 aktivasyonunu artırır(11).

EPOR'e ligand bağlanması intraselüler Ca^{+2} artışına sebep olur. Ca'daki artış EPO'nun voltaj bağımsız iyon kanallarının geçirgenliğini arttırması ve tirozin fosforilasyonu ile meydana gelir(11).

EPO ve EPOR doğumdan hemen sonra pek çok dokuda yüksek miktarda bulunurken erişkinlerde çok düşük düzeyde bulunur. EPOR -/- olan embryolar nöral apoptozis sonrası azalmış nöronal progenitör hücre gelişimi ve anormal beyin gelişimi gösterir(63).

Silva ve ark. EPO'nun eritroid progenitör hücrelerde Bcl-2 ailesinden bir antiapoptotik gen olan Bcl-xL'yi arttırarak viabiliteyi arttırdığını göstermişlerdir. Bu hücreler EPO'suz ortamda kültüre edildiğinde Bcl-2 ve Bcl-xL'nin azalır ve hücreler apoptozise uğrar(64). Bcl-xL *knockout* fareler fetal hayatta hematopoietik hataya sebep olur ve embriyogenezis boyunca ağır anemiye neden olur(65).

Yapılan son çalışmalar EPO ve EPOR'nin etkilerinin sadece hematopoietik hücre serilerine sınırlı olmadığını göstermektedir(8,14,58). EPOR ekspresyonu umbilikal cord ve plasental endotel hücreleri gibi pek çok insan ve fare dokusunda gösterilmiştir ve EPO in vitro endotel hücre proliferasyonunu stimule edebilir. EPO'nun kültüre edilmiş endotel hücrelerinde proanjiogenik fenotipi indüklediği, chick koryoallantoik zarında neovaskülarizasyonu uyardığı, hücre kültüründe üretilmiş insan umbilikal ven endotel hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (14,58,59).

Çalışmalar EPO'nun pek çok noneritroid fonksiyonunu göstermiştir. EPOR, miyeloid hücreler, lenfositler ve megakaryositler gibi noneritroid hücrelerde ve pek çok nonhematopoetik hücrelerde, örneğin mesengial, miyokardial, düz kas liflerinde, sinir hücrelerinde, prostat hücrelerinde ve böbrek hücrelerinde tespit edilmiştir (66-68)(Tablo 3.1).

Tablo 2.3. EPOR ekspresyonu ve normal noneritroid hücrelerde potansiyel fonksiyonları.

EPOR ekspresyonu	Fonksiyonu
Astroisitler	Azalmış apoptotik hücre ölümü
Kardiyomyositler	Mitojenik
Endotelial hücreler	Mitojenik Endotelin-1 sentez ve salınımı Anjiogenik yanıt
Megakaryosit	Maturasyon
Mezengial hücreler	Artmış proliferasyon(in vitro)
Miyeloid hücreler	İmmunomodülasyon
Nöronlar	Trofik etki Artmış monoamin konsantrasyonu
Renal hücreler	Mitogenez
Prostat epitel hücreleri	Mitogenez
Vasküler düz kas hücreleri	Kasılma

Hayvan deneyi modellerinde EPO'nun yara iyileşmesi sırasında angiogenesisi uyardığı ve EPOR eksprese eden farelerde EPO sinyallerinin endotel hücrelerinin damar hasarı onarımında rol oynadığı gösterilmiştir(69,70).

EPO, VEGF'ye benzer bir etki ile mikrodolaşımda anjiogenezi artırır(71). VEGF, anjiogenezi ve artmış damar geçirgenliği için endojen bir uyarandır, iskemiye karşı oluşan doku yanıtını artırır(14).

Kapiller endotelial hücreler intraluminal yüzeylerinde EPOR eksprese ederler. İn vitro olarak iskemiye maruz kalan endotel hücrelerinde EPO'nun apoptozisi antagonize ettiği saptanmıştır(15).

İN vitro çalışmalarda EPO'nun eritropoietik aktivitesinden bağımsız olarak nöroprotektif etkisi olduğuna dair veriler vardır. Deneysel beyin iskemisi çalışması EPO ve EPOR'nin metabolik strese yanıtın bileşenleri olarak etki ettiğini göstermiştir(13). Bu etki tümör nekroz faktörü (TNF α), interlökin 1 ve 6 (IL-1 ve IL-6) gibi spesifik proinflamatuvar sitokinler aracılığı ile meydana gelir(63).

EPOnun miyokard ve böbrek üzerine de iskemik hasara karşı koruyucu etkisi vardır(13).

Hematopoetik ve endotelyal hücrelerin ortak bir hemanjioblast progenitör hücreden köken aldıkları fikri her iki hücre dizisinin ortak olarak CD31 ve CD34 hücre yüzey antijeni içermesinden kaynaklanır. Bu hipoteze dayanarak yapılan çalışmalarda EPO'nun hücre kültürlerinde endotel hücresi proliferasyon ve migrasyonu arttırdığı gösterilmiştir(9,14).

EPO'nun VEGF ve endotel hücreleri ile olan ilişkisi neovaskülarizasyon ve yara iyileşmesinde önemli olabilir. Ayrıca yara iyileşmesinde oldukça kritik bir rolü olan makrofajlarda EPOR ekspresyonu saptanmıştır(72). Fibrin matrikse lokal uygulanan egzojen rekombinant EPO, doza bağlı olarak granülasyon dokusu oluşumunu artırır. Soluble EPOR veya antiEPO monoklonal antikorları ise doza bağlı olarak granülasyon dokusu oluşumunu inhibe eder(72).

EPO, yara iyileşmesinin ilk fazını (hücre hareketlilikte artış, hücre matriksinin kırılması, hücre proliferasyonu) ve onu takip eden damarsal yapıların oluşumunu uyarır(9).

EPO bir büyüme faktörü ve anjiogenik faktör gibi davranabilir. EPO ve VEGF ile ilgili son yayınlar ve EPO'nun endotel hücresi mitoz ve motilitesini artırma özelliği yara iyileşmesindeki rolünü açıklayabilir(9).

3. MATERYAL – METOD

Bu çalışma, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı ve Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nde (TICAM) yapıldı. Çalışma grubu olarak 200-250 gr arasında değişen 31 dişi Spraque-Dawley cinsi rat, normal laboratuvar koşullarında, rat yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

Deney günü ratlara eterle anestezi verilerek sırt tüyleri traş edildi, batikon ve ardından SF ile yıkandı. Ardından ratlar her biri on hayvandan oluşan üç gruba ayrıldı.

Birinci gruba; 2 mg doksorubisin (doksorubicin HCl, Adriablastina flk Deva) 0,5 cc steril dilüsyon mayi ile sulandırıldıktan sonra intradermal olarak tek doz şeklinde uygulandı.

İkinci gruba; 2 mg doksorubisin 0,5 cc steril dilüsyon mayi ile sulandırıldıktan sonra intradermal olarak tek doz uygulandı, enjeksiyondan bir saat sonra dört kadrandan eşit miktarda serum fizyolojik (SF) total volum 0,4 cc olacak şekilde intradermal olarak enjekte edildi.

Üçüncü gruba; 2 mg doksorubisin aynı şekilde sulandırıldıktan sonra intradermal olarak tek doz uygulandı, enjeksiyondan bir saat sonra 400 IU/kg eritropoietin SF ile dilue edilerek (human rekombinant eritropoietin beta, Neorocormon) dört kadrandan eşit miktarda intradermal olarak enjekte edildi. EPO dilue edilirken total volumun 2. gruba verilen SF' in volumüne eşit olması sağlandı. Deneylerde kullanılan maddeler klinikte hastalara kullanılmak üzere reçete edilen ticari ürünlerin tedaviden arta kalanlarından elde edildi.

Enjeksiyon gününden sonraki bir aylık gözlem süreci boyunca her hafta ratların sırt bölgelerinde gelişen lezyonlar değerlendirildi, lezyonun en uzun iki dik çapı ölçüldü ve Vargel ve ark. in yaptığı çalışmadaki gibi $axb/2$ formülüne göre lezyon alanı hesaplandı(4). Her hafta ölçümleri takiben ratların fotoğrafları çekilerek lezyon boyutları kaydedildi.

Ay sonunda 80mg/kg pentobarbital ile intraperitoneal anestezi verildikten sonra nekroz dokusu çevre doku ile birlikte çıkarılarak biyopsisi alındı. Örnekler %10'luk formol içine koyuldu.

Patolojik değerlendirme Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. %10 formoldeki örneklerden parafin bloklar elde edildi.

Bloklardan seri kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin tekniği ile boyandı ve ışık mikroskopu ile histopatolojik olarak değerlendirildi. Değerlendirme uzman patolog tarafından k3r olarak yapıldı. Histopatolojik incelemede inflamasyon, 3dem, epitelizasyon, neovaskularizasyon, nekroz, fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezi parametreleri değerlendirildi ve 0= yok, 1= minimal, 2= orta, 3= şiddetli olarak skorlandı.

İstatiksel değerlendirmede Kruskal Wallis testi kullanıldı.

Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 28.09.2006 tarih ve 13 sayılı karar ile onay alındı.

4.BULGULAR

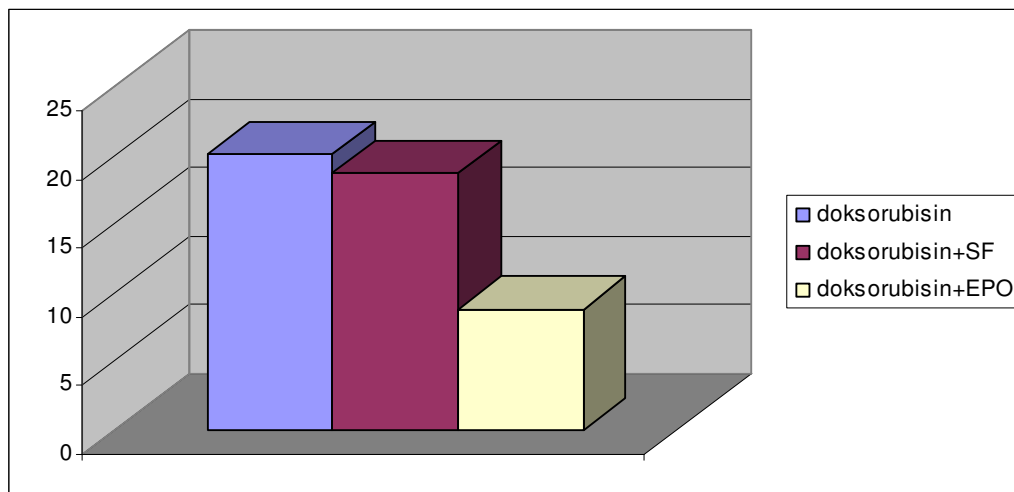
Sadece doksorubisin verilen birinci grup, doksorubisin ve SF verilen ikinci grup ve doksorubisin ve EPO verilen üçüncü grubun lezyon boyutları haftalık olarak ölçüldü. Grupların 1., 2., 3. ve 4. haftaların sonundaki lezyon boyutları Tablo 4.1, 4.2, 4.3, ve 4.4'te gösterilmiştir. Tablo 4.1'te görüldüğü gibi birinci haftanın sonunda gruplar arası nekroz boyutunun farkı değerlendirildiğinde birinci ve ikinci grup ile ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı. Her üç grup içinde en büyük lezyon çapı birinci grupta saptanırken üçüncü grupta oluşan lezyon boyutu en küçüktü.

Tablo 4.1. Birinci hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi.

1.hafta nekroz alanı	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	20,09		ns	*
2.grup	10	18,70	ns		
3.grup	10	8,80	*	*	
		H=9.99 sd=2 p=0.007			

*: $p < 0.05$

ns: $p > 0.05$



Şekil 4.1. Birinci hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi.

Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'te birinci haftanın sonunda oluşan nekrozların örnek fotoğrafları görülmektedir. Üçüncü grupta oluşan lezyon boyutunun diğer gruplardan küçük olduğu resimlerde de görülmektedir.



Şekil 4.2. 1. haftanın sonunda 1. grupta (sadece doksorubisin verilen grup) oluşan lezyona örnek.



Şekil 4.3. 1. haftanın sonunda 2. grupta (doksorubisin ve SF verilen grup) oluşan lezyona örnek.



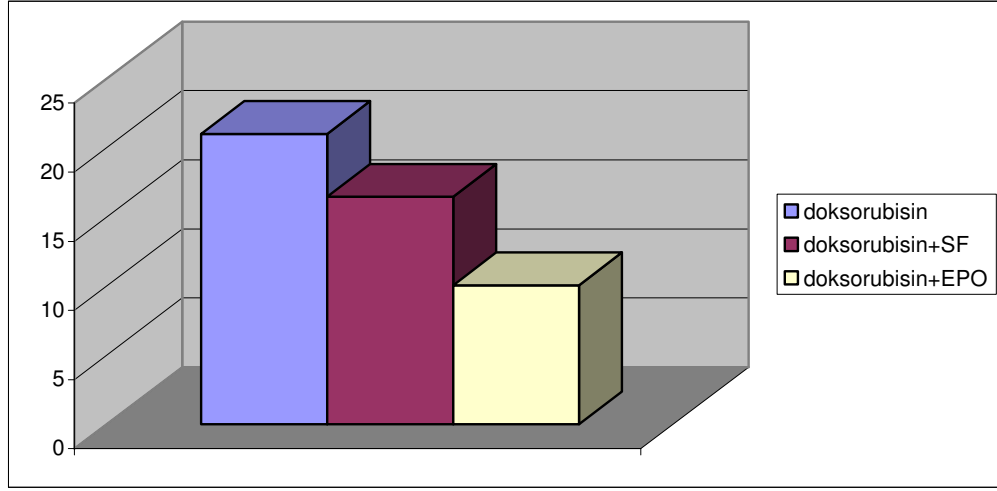
Şekil 4.4. 1. haftanın sonunda 3. grupta (doksorubisin ve EPO verilen grup) oluşan lezyona örnek.

İkinci haftanın sonunda ilerleyen lezyon boyutları gruplar arası karşılaştırıldığında birinci ve üçüncü gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Tablo 4.2 ve Şekil 4.5’de görüldüğü gibi birinci gruptaki lezyon boyutu 2. haftada da en büyük ve üçüncü grupta ise en küçüktür.

Tablo 4.2. İkinci hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi.

2.hafta nekroz alanı	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	21		ns	*
2. grup	10	16,45	ns		ns
3. grup	10	10,05	*	ns	
		H=7,727 sd=2 p=0,021			

*: $p < 0.05$

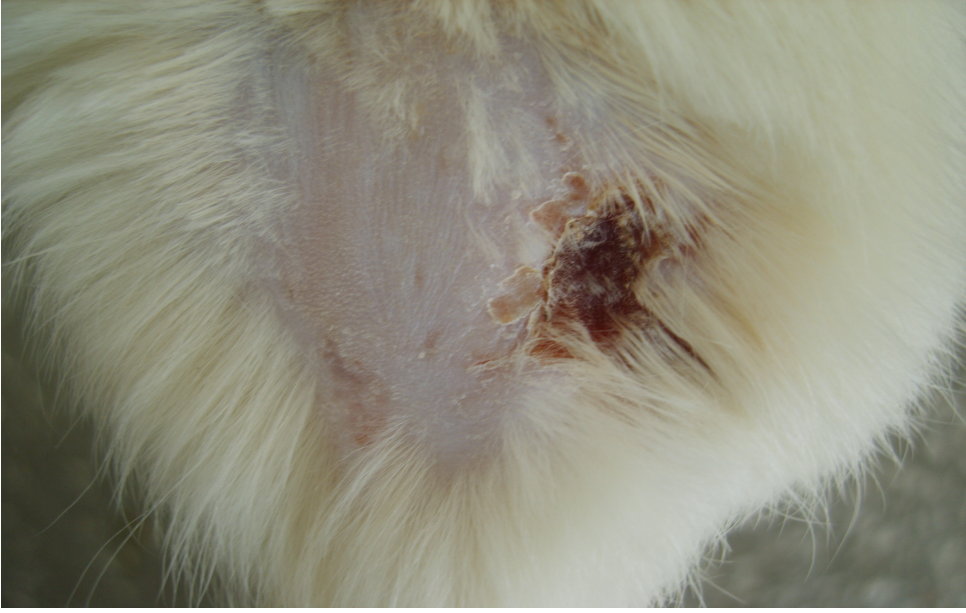


Şekil 4.5. İkinci hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi

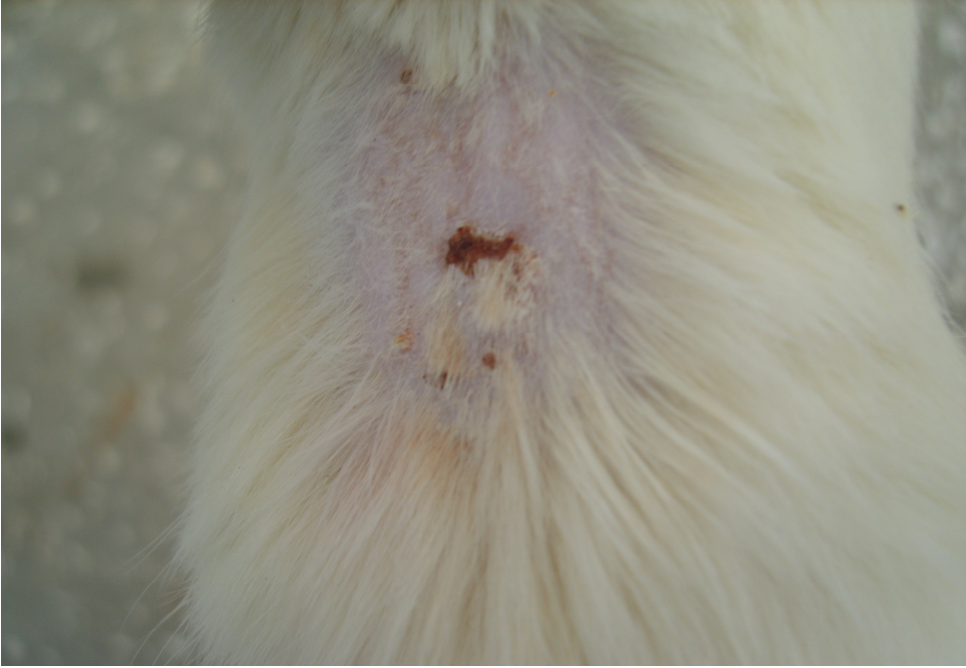
Şekil 4.6,4.7 ve 4.8' de ikinci haftanın sonunda oluşan nekrozların örnek fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.6. 2. haftanın sonunda 1. grupta oluşan lezyona örnek.



Şekil 4.7. 2. haftanın sonunda 2. grupta oluşan lezyona örnek.



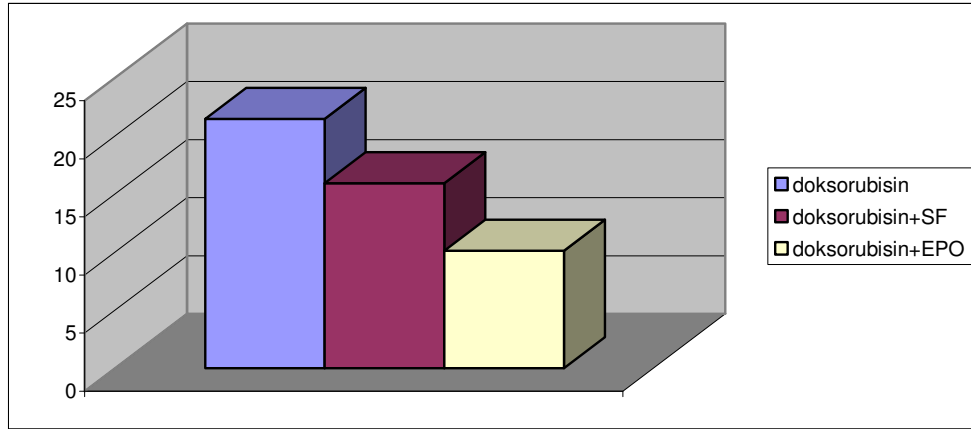
Şekil 4.8. 2. haftanın sonunda 3. grupta oluşan lezyona örnek.

Üçüncü haftanın sonunda lezyon boyutları değerlendirildiğinde birinci ve üçüncü gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Tablo 4.3 ve Şekil 4.9).

Tablo 4.3. Üçüncü hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi

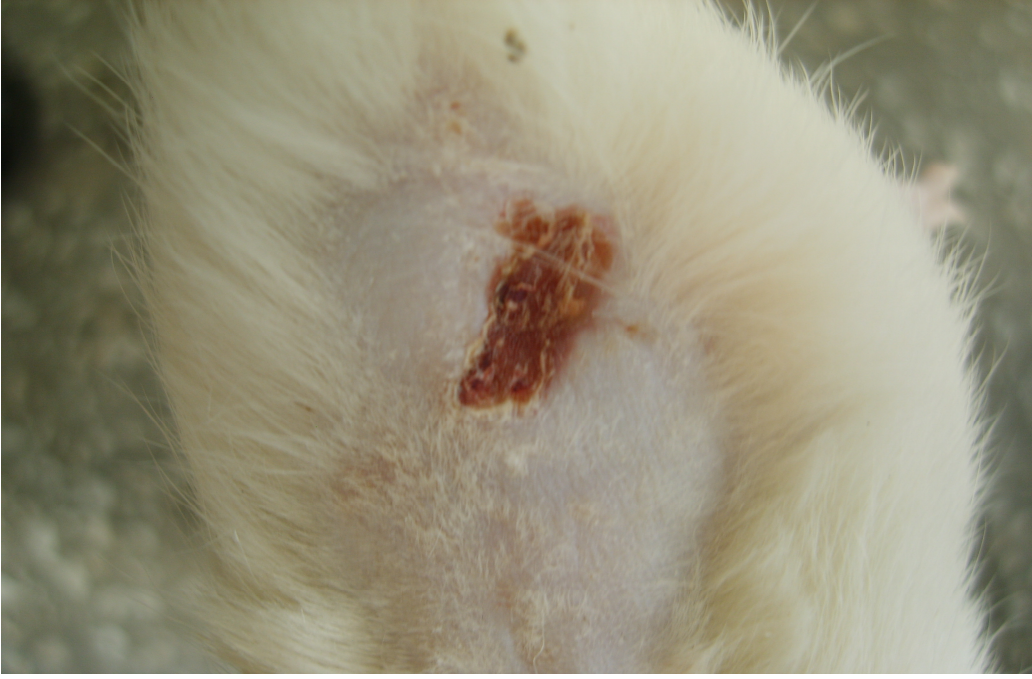
3.hafta nekroz alanı	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	21,45		ns	*
2.grup	10	15,90	ns		ns
3.grup	10	10,10	*	ns	
		H=8,677 sd=2 p=0.013			

*: $p < 0.05$



Şekil 4.9. Üçüncü hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi

Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12’de üçüncü haftanın sonunda oluşan nekrozların örnek fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.10. 3. haftanın sonunda 1. grupta oluşan lezyona örnek.



Şekil 4.11. 3. haftanın sonunda 2. grupta oluşan lezyona örnek.



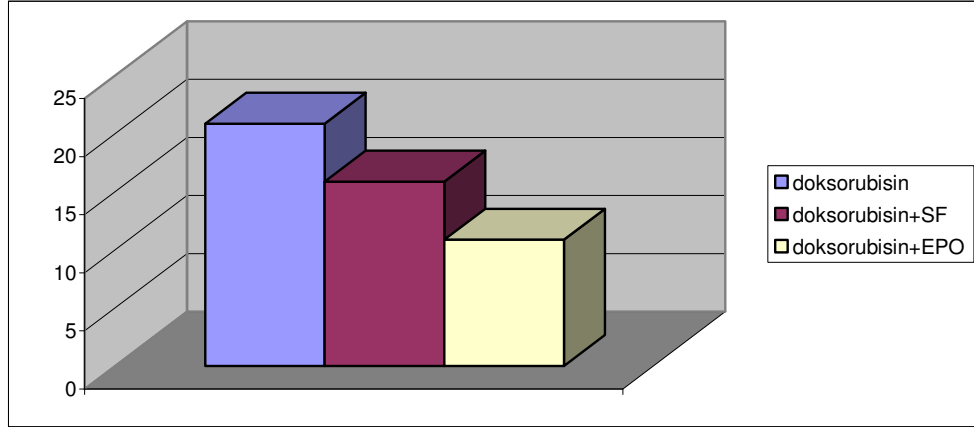
Şekil 4.12. 3. haftanın sonunda 3. grupta oluşan lezyona örnek.

Dördüncü haftanın sonunda lezyon boyutları değerlendirildi ve birinci grupta oluşan lezyonun en büyük, üçüncü gruptakininse en küçük olduğu görüldü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı. (Tablo 4.4 ve Şekil 4.13).

Tablo 4.4. Dördüncü hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi.

3.hafta nekroz alanı	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	20,82		ns	*
2.grup	10	15,85	ns		ns
3.grup	10	10,85	*	ns	
		H=6.936 sd=2 p=0.031			

*: p<0.05

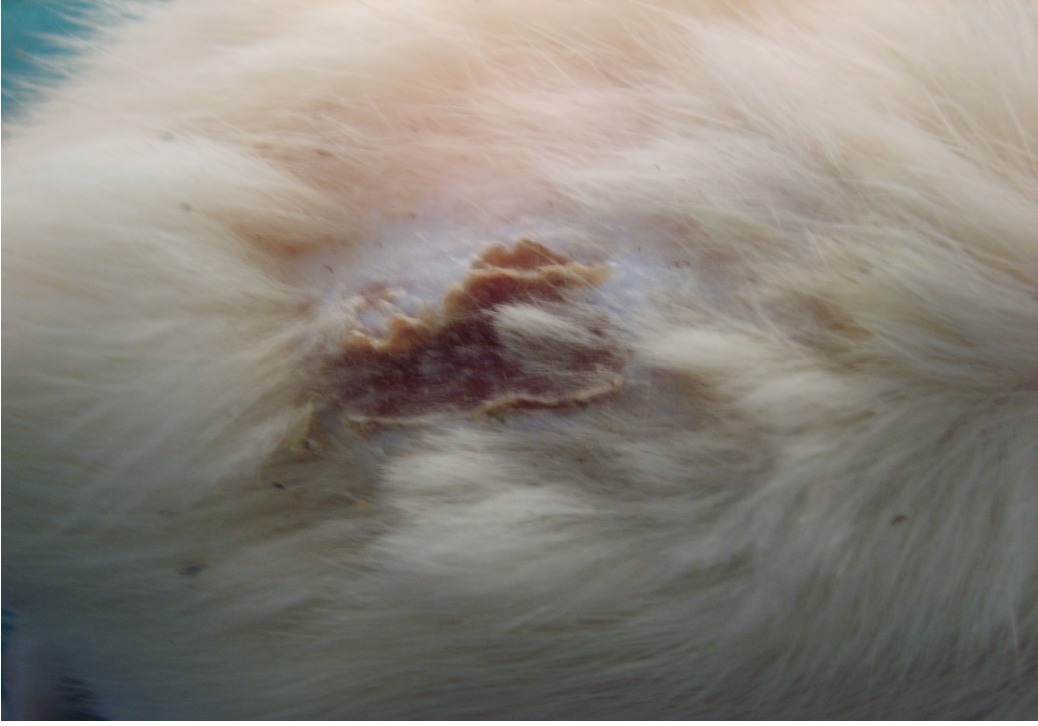


Şekil 4.13. Dördüncü hafta sonunda oluşan nekroz alanının gruplar arası farkının değerlendirilmesi.

Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16'da dördüncü haftanın sonunda oluşan nekrozların örnek fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.14. 4. haftanın sonunda 1. grupta oluşan lezyona örnek.



Şekil 4.15. 4. haftanın sonunda 2. grupta oluşan lezyona örnek.



Şekil 4.16. 4. haftanın sonunda 3. grupta oluşan lezyona örnek.

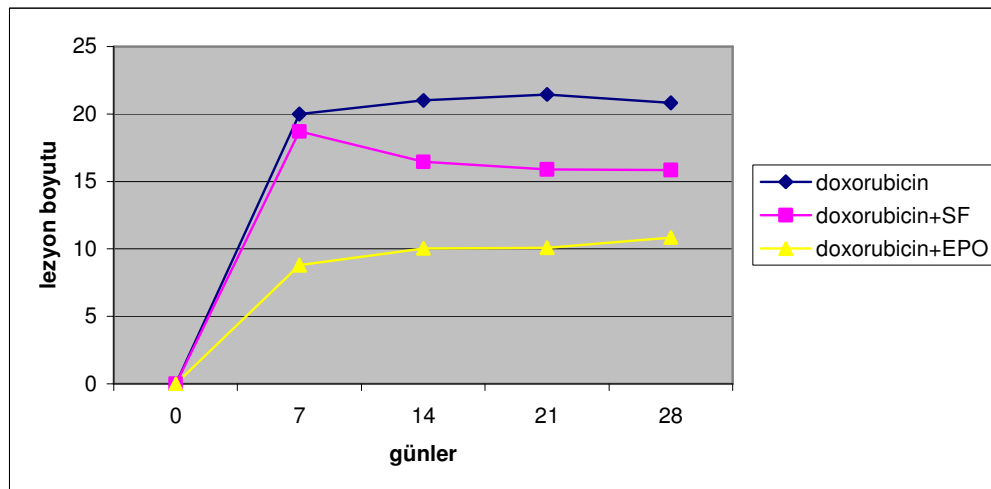
Her üç grubun haftalık nekroz boyutları Tablo 4.5' te toplu olarak değerlendirilmiştir. Her haftanın sonunda birinci, ikinci ve üçüncü grubun lezyon boyutları karşılaştırıldığında haftalar ilerledikçe lezyon boyutundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptandı.

Tablo 4.5. Haftalık nekroz boyutlarının gruplar arası karşılaştırılması.

Haftalar	n	1.grup	n	2.grup	n	3. grup
		Mean rank		Mean rank		Mean rank
1	11	20,09	10	18,70	10	8,80
2	11	21	10	16,45	10	10,05
3	11	21,45	10	15,90	10	10,10
4	11	20,82	10	15,85	10	10,85
		$\chi^2=1.737$ sd=3 p=0.629		$\chi^2=0.896$ sd=3 p=0.826		$\chi^2=4.565$ sd=3 p=0.207

p>0.05

Şekil 4.17'de her haftanın sonunda değerlendirilen lezyon boyutunun gruplar arası karşılaştırması grafik ile ifade edilmiştir.



Şekil 4.17. Haftalık nekroz boyutlarının gruplar arası karşılaştırılması.

Dördüncü haftanın sonunda alınan cilt biyopsileri histopatolojik inceleme ile değerlendirildi ve inflamasyon, ödem, epitalizasyon, neovaskülarizasyon, nekroz, fibroblast ve kollajen oluşumları skorlandı.

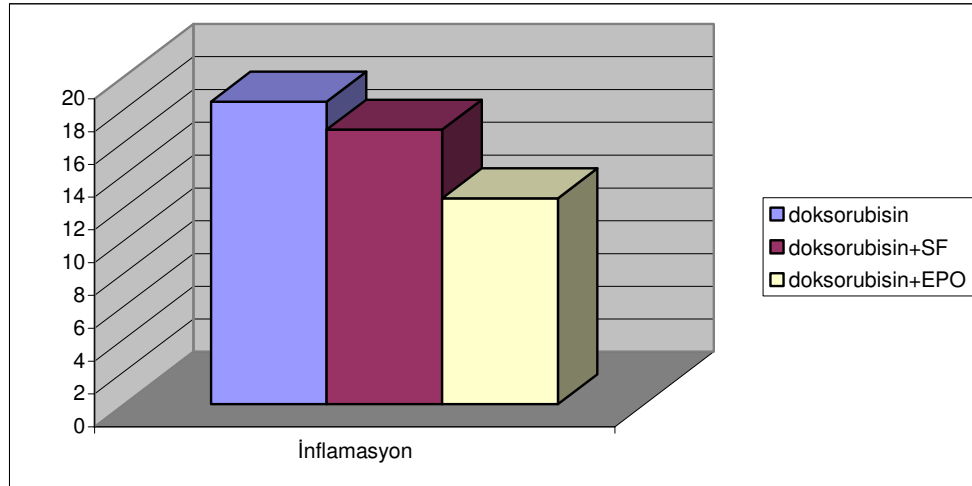
Tablo 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12’de patolojik değerlendirme için kullanılan parametrelerin gruplar arası tek tek değerlendirilmesi görülmektedir.

Tablo 4.6’da inflamasyon gelişimi gruplar arası değerlendirildi. Her üç grupta inflamasyon geliştiği ve inflamasyon gelişiminin gruplar arası anlamlı bir fark göstermediği saptandı.

Tablo 4.6. İnflamasyon oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	18,45		ns	ns
2.grup	10	16,75	ns		ns
3.grup	10	12,55	ns	ns	
		H:2,828 sd:2 p:0,243			

Şekil 4.18’de inflamasyon oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi grafik olarak gösterilmektedir.

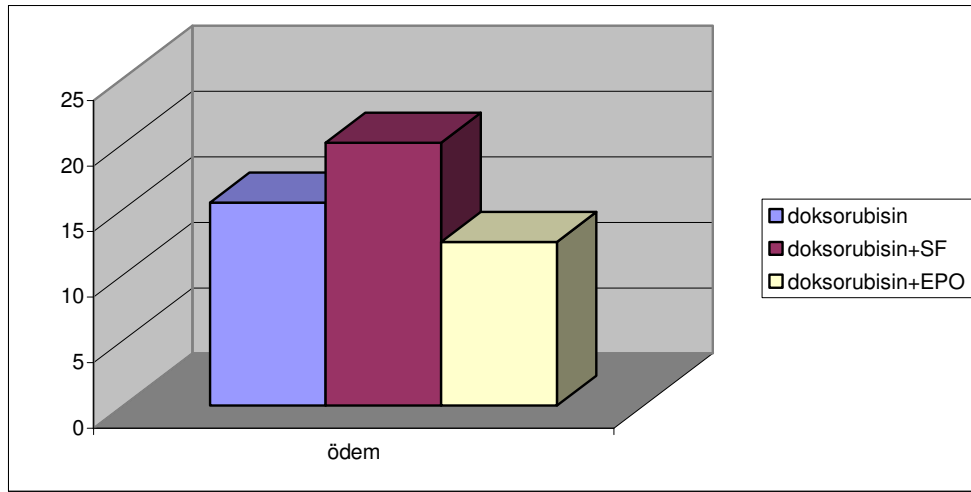


Şekil 4.18. Gruplar arası inflamasyon oluşumunun değerlendirilmesi.

Tablo 4.7’da ödem oluşumunun gruplar arası karşılaştırılması görülmektedir. Şekil 4.19’da da görüldüğü gibi ödem oluşumu gruplar arasında farklılık göstermemektedir.

Tablo 4.7. Ödem oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	15,50		ns	ns
2.grup	10	20,05	ns		ns
3.grup	10	12,50	ns	ns	
		H:4,084 sd:2 p:0,130			



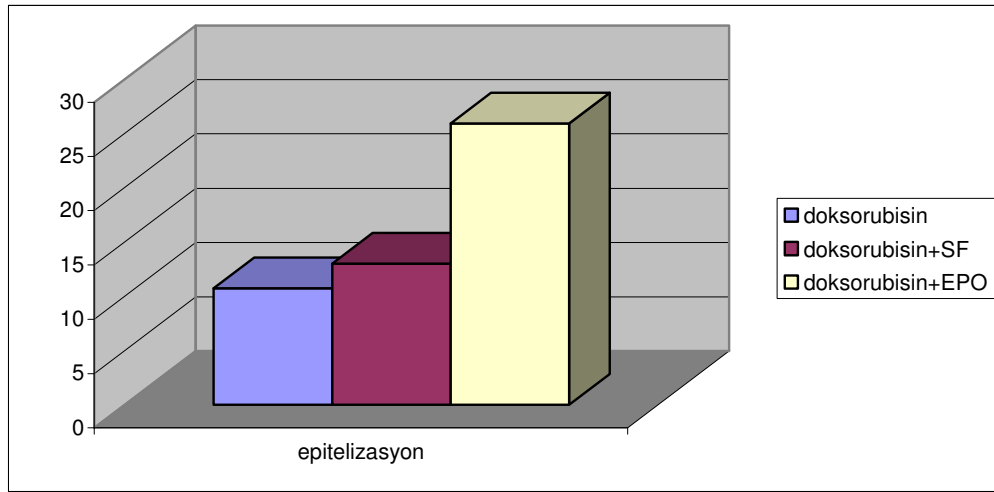
Şekil 4.19. Ödem oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi.

Epitelizasyon ve neovaskülarizasyon oluşumunun gruplar arası kıyaslanması Tablo 4.8 ve 4.9’da görülmektedir. Şekil 4.20 ve 4.21’de görüldüğü gibi üçüncü grupta her ikisinde daha fazla görülmektedir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Tablo 4.8. Epitelizasyon gelişiminin gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	10,73		ns	*
2.grup	10	13	ns		*
3.grup	10	25,90	*	*	
		H:15,555 sd:2 p<0,001			

*: p<0,001

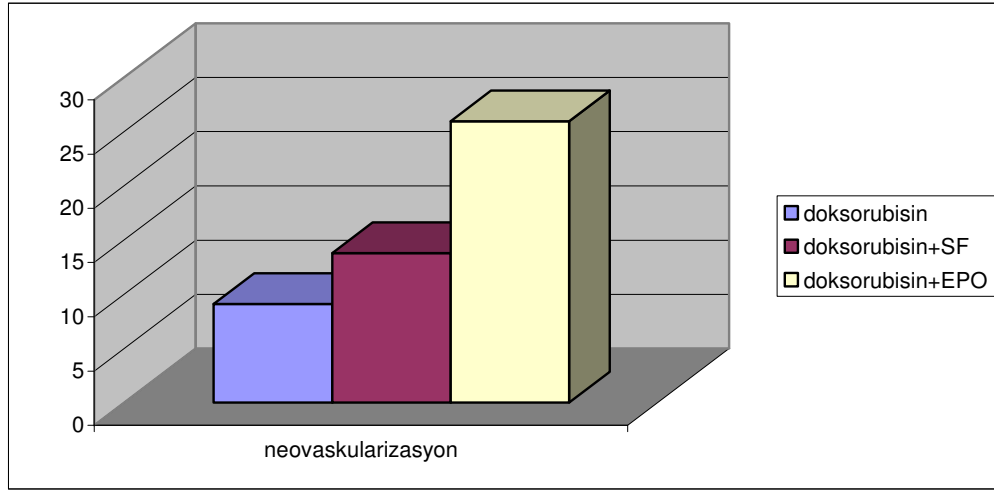


Şekil 4.20. Epitelizasyon gelişiminin gruplar arası değerlendirilmesi.

Tablo 4.9. Neovaskularizasyonun gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	9,05		ns	*
2.grup	10	13,75	ns		*
3.grup	10	25,90	*	*	
		H:22,011 sd:2 p<0,001			

*: p<0,001



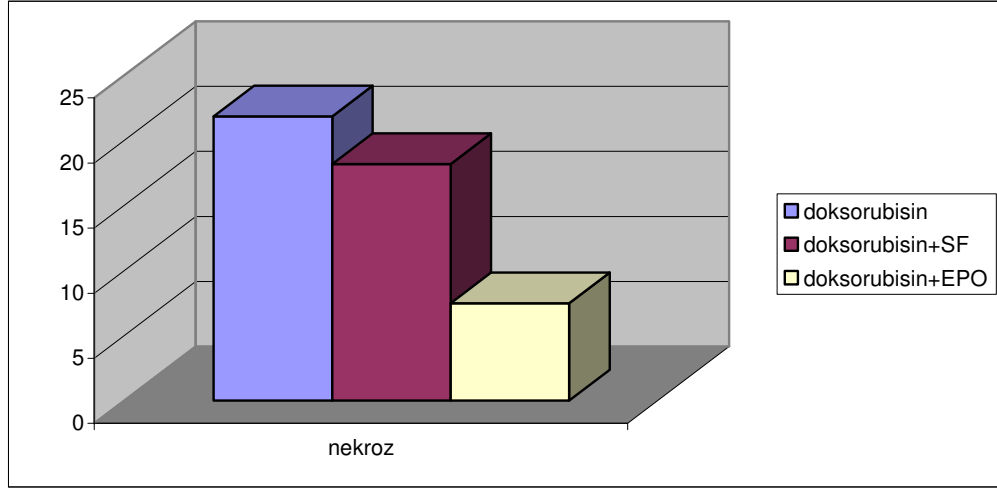
Şekil 4.21. Neovaskularizasyonun gruplar arası değerlendirilmesi.

Üç grup arasında nekroz oluşumu arası farklılık açısından değerlendirme yapıldığında sadece doksorubisin alan grupta nekroz oluşumunun en fazla olduğu görüldü. (Tablo 4.10 ve Şekil 4.22)

Tablo 4.10. Nekroz oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	21,82		ns	*
2.grup	10	18,15	ns		*
3.grup	10	7,45	*	*	
		H:15,684 sd:2 p<0,001			

*: p<0,001



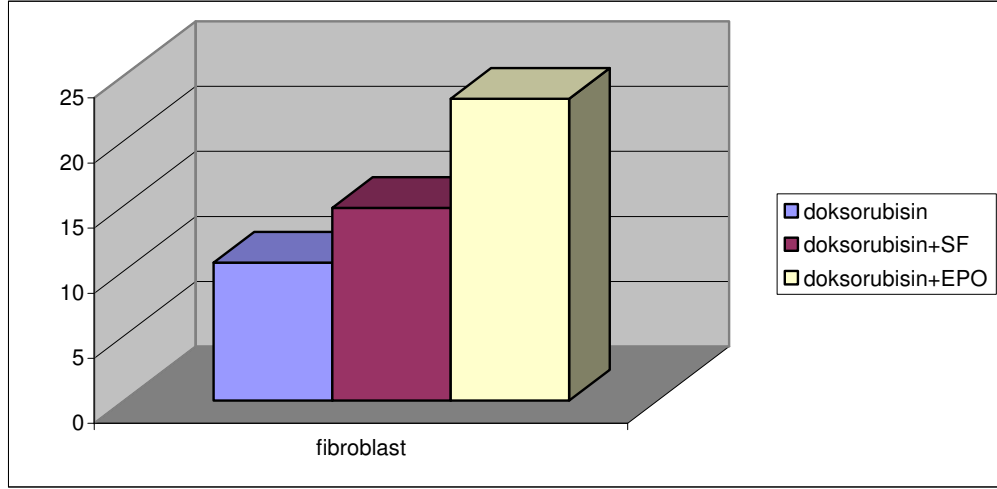
Şekil 4.22. Nekroz oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi.

Fibroblast oluşumu gruplar arası değerlendirildiğinde Tablo 4.11 ve Şekil 4.22'de görüldüğü gibi fibroblast oluşumunun üçüncü grupta en fazla oranda olduğu saptandı.

Tablo 4.11. Fibroblast varlığının gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	10,59		ns	*
2.grup	10	14,80	ns		ns
3.grup	10	23,15	*	ns	
		H:12,899 sd:2 p:0,002			

*: p:0,002



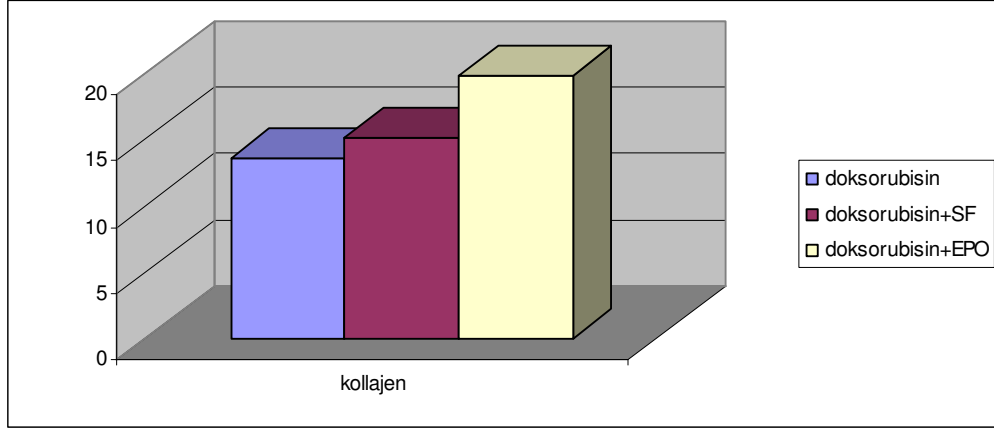
Şekil 4.22. Fibroblast varlığının gruplar arası değerlendirilmesi.

Her üç grubun lezyonları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde kollajen oluşumunun üçüncü grupta en fazla olduğu (Tablo 4.12) ve bu farkın Şekil 4.23'te görüldüğü gibi istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

Tablo 4.12. Kollajen oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Mean rank	Tukey HSD testi		
			1	2	3
1.grup	11	13,50		ns	*
2.grup	10	15,05	ns		ns
3.grup	10	19,70	*	ns	
		H: 6,392 sd:2 p:0,041			

*: p:0,041

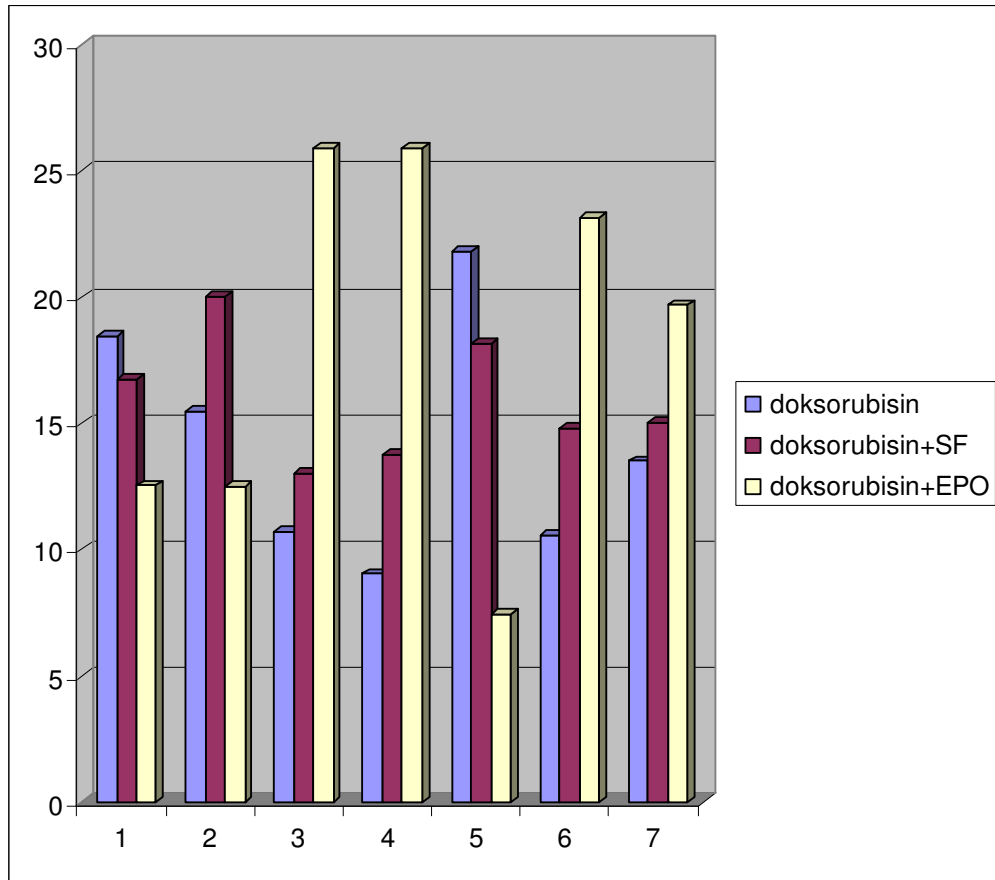


Şekil 4.23. Kollajen oluşumunun gruplar arası değerlendirilmesi.

Tablo 4.13 ve Şekil 4.24' te her üç grubun histopatolojik incelemeleri toplu olarak gösterilmiştir. Burada da görüldüğü gibi inflamasyon ve ödem oluşumunda gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına rağmen epitelizasyon, neovaskülarizasyon, nekroz, fibroblast gelişimi ve kollajen oluşumu arasında gruplar arası fark saptanmış ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Epitelizasyon, neovaskülarizasyon, fibroblast gelişimi ve kollajen oluşumu en fazla üçüncü grupta görülürken aynı grupta nekroz oluşumu en azdır.

Tablo 4.13. Üç grubun histopatolojik incelemelerinin toplu olarak değerlendirilmesi.

	1.grup	2.grup	3.grup	
İnflamasyon	18,45	16,75	12,55	H: 2,828±2 P: 0,243
Ödem	15,50	20,05	12,50	H: 4,084±2 P: 0,130
Epitelizasyon	10,73	13	25,90	H: 15,555±2 P< 0.001
Neovaskülarizasyon	9,05	13,75	25,90	H: 22,011±2 P< 0.001
Nekroz	21,82	18,15	7,45	H: 15,684±2 P< 0.001
Fibroblast	10,59	14,80	23,15	H: 15,684±2 P< 0.001
Kollajen	13,50	15,05	19,70	H: 6,392±2 P: 0,041



Şekil 4.24. Üç grubun histopatolojik incelemelerinin toplu olarak değerlendirilmesi

(1: inflamasyon, 2: ödem, 3: epitelizasyon, 4: neovaskularizasyon, 5: nekroz, 7: fibroblast, 8: kollajen).

5.TARTIŞMA

Doksohubisin sık kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır. Hastaların yaşam kalitesini düşüren damar dışına sızma, intravenöz uygulama sırasında meydana gelen ve oldukça sık görülen önemli bir yan etkisidir. Tedavide pek çok ajan denenmiş ancak hiçbirinin etkinliği yeterli bulunmamıştır. Bu noktadan hareketle biz çalışmamızda EPO'nun doksohubisin ekstrevasyonu sonucu meydana gelen cilt nekrozunun tedavisindeki yerini araştırdık ve önemli etkileri olduğunu gösterdik.

Deney protokolünü Vargel ve ark. nın (4) 2002 yılında yaptıkları çalışmadan uyarladık. Deney hayvanlarında oluşan lezyonlar haftalık olarak değerlendirildi ve literatürde doksohubisinle yapılan çalışmalarda belirtilen, cilt nekrozunun maksimum boyuta ulaştığı süreden iki hafta sonra yani 4. haftanın sonunda çalışma sonlandırıldı. EPO, Galeano ve ark. (9) tarafından daha önce yapılan çalışmalarda diabetik farelerde yara iyileşmesini arttırdığı saptanan dozda kullanıldı.

Çalışma sırasında her üç grupta oluşan nekroz boyutları haftalık olarak değerlendirildi. Birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftaların sonunda sadece doksohubisin verilen, doksohubisin ile birlikte SF uygulanan, doksohubisin ve EPO uygulanan grupların nekroz boyutları karşılaştırıldığında SF uygulanan gruptaki nekroz boyutunun sadece doksohubisin uygulanandan küçük olduğu saptanmasına rağmen EPO uygulanan grubun nekroz boyutunun en küçük olduğu ve diğer gruplarla arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Bunun nedeninin EPO' nun nekroz gelişimini önlemesi ve yara iyileşmesini azaltması, doksohubisin ve SF verilen grupta ise SF'in doksohubisini dilue etmesi olduğu düşünüldü. Benzer olarak, Vargel ve ark.nın yaptığı çalışmada (4) doksohubisinin neden olduğu cilt nekrozunun önlenmesinde GM-CSF ve G-CSF'nin rolleri araştırıldığında 10 günün sonunda GM-CSF ve G-CSF ile tedavi verilen gruplarda ülser boyutunun kontrol grubuna göre daha küçük olduğu saptandı. Bu çalışmada da bizimkine benzer şekilde doksohubisinin SF ile dilue edilmesi ortaya çıkan nekroz boyutunun küçük olmasına rağmen EPO gibi bir büyüme faktörü olan CSF'lerin daha etkin olduğu saptandı.

Ancak her grubun birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü haftaların sonunda nekroz boyutları ölçüldükten sonra nekroz boyutundaki artış karşılaştırıldığında

istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, literatürde 2002 yılında Aşkar ve ark.(17) tarafından yayınlanan bir çalışmada doksorubisin ile cilt nekrozu oluşturulan deney hayvanlarında ülser alanının 2 ve 3. haftalarda en büyük boyutlara ulaştığı saptanmıştır. Aynı şekilde Vargel ve ark.'ın(4) yaptığı çalışmada da ülser boyutlarının 2. haftanın sonunda en büyük olduğu saptandı. Bir kez dokuya geçen doksorubisinin haftalarca aynı yerde kalarak doku nekrozu yapabileceği bilindiğinden nekroz boyutunun haftalar ilerledikçe değişiklik göstermemesi ilacın dilue edilmesinin yada EPO' nun tedavi edici özelliğinden çok nekroz oluşumunu önlemede etkin olmasına bağlı olduğu düşünüldü. Çünkü EPO verilen grupta ilk haftadan itibaren lezyon boyutu en küçük olmasına rağmen ilerleyen haftalarda oluşmuş nekroz boyutunda bir gerileme saptanmamıştır.

Deney sonunda hayvanlardan lezyon biyopsileri alındı ve histopatolojik olarak inflamasyon, ödem, epitelizasyon, neovaskülarizasyon, nekroz gelişimi, fibroblast göçü ve kollajen oluşumu açısından değerlendirildi. Parametreler cilt lezyonu oluşumu ve yara iyileşmesinin basamaklarından seçildi.

Her üç grubun biyopsi örnekleri inflamasyon gelişimi açısından değerlendirilip elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında gruplar arası fark olmadığı saptandı. Literatürde ekstrasvazasyon alanına glukokortikoid enjeksiyonu ile yapılan çalışmalarda da yara iyileşmesi üzerine etkisi olmadığı görülmüş ve bunun nedeninin doksorubisinin inflamasyon gelişimine neden olmadan direk doku hasarı yapması olduğu düşünülmüştür(6). Benzer şekilde çalışmamızda inflamasyon oluşumunda gruplar arası fark görülmemesinin EPO'nun yetersiz antiinflamatuvar etkisinden değil doksorubisinin inflamasyon gelişimine sebep olmamasından kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda epitelizasyon ve neovaskülarizasyon gibi yara iyileşmesinin iki önemli basamağının EPO uygulanan grupta SF uygulanan ve herhangi bir ajan kullanılmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğunu gözledik.

Jaquet ve ark.(73) tarafından insan erişkin miyokard dokusundan köken alan endotel hücreleri üzerinde rHuEPO ve VEGF'nin anjiogenik etkisini karşılaştıran bir çalışma yapıldı ve rHuEPO ile uyarılan kapiller gelişimin uyarılmayan

fizyolojik gelişime göre %220 fazla olduğunu, EPO'nun VEGF ile benzer anjiogenik potansiyele sahip olduğu rapor edildi.

Buemi ve ark.(14) tarafından yapılan çalışmada iskemik cilt nekrozlarının iyileşmesinde rHuEPO'nun etkisi araştırılmış, neovaskularizasyonu ve dermal rejenerasyonu artırma yoluyla yara iyileşmesini arttırdığı saptanmıştır.

rHuEPO, insan endotel hücrelerinde erken (hücre proliferasyonu ve matriks metalloproteinaz -2 aktivasyonunu artırır) ve geç (vasküler tüpe farklılaşma) anjiogenik olayları artırarak proanjiogenik fenotip oluşumunu indükler(58,73).

Diabetik fareler üzerinde Galeano ve ark.'nın(41) yaptığı çalışmada diabetik farelerde olduğu gibi normoglisemik farelerde de rHuEPO uygulamasının yara iyileşmesini arttırdığı gözlenmiştir. Buda EPO'nun yara iyileşmesinde fizyolojik bir rolü olduğu, farmakolojik dozlarda kullanıldığında anjiogenik etkisi olduğu hipotezini destekler.

EPO ve EPOR'nin vasküler fonksiyonlar üzerindeki potansiyel rolü in vitro ve semi-in vivo çalışmalarla araştırılmış ve rat aortik ringlerinde mikrovasküler dallanmayı arttırdığı saptanmıştır(58).

Literatürde doksorubisin uygulanan deney hayvanlarında meydana gelen cilt nekrozlarının histopatolojik incelenmesinde 10. günde koagülasyon tipi iskemik nekroz oluştuğu, ciddi vasküler hasarın görüldüğü ve neovaskularizasyon meydana gelmediği rapor edilmiştir(4). Buradan yola çıkarak anjiogenesis ve neovaskularizasyonu arttıran EPO gibi bir ajanın nekroz gelişimini önleyebileceği ve tedavi edebileceği düşünülebilir.

Fibrin matrikse lokal uygulanan egzojen rekombinan EPO doza bağlı olarak granülasyon dokusu oluşumunu artırır(72). Endojen EPO, EPO reseptör yada antiEPO monoklonal antikorları ile nötralize edildiğinde doza bağlı olarak granülasyon doku oluşumunda inhibe olduğu gösterilmiştir(14).

VEGF ile sinerjistik etkisi olduğu saptanan EPO anjiogenesisi artırır ve bu da yara iyileşmesinin en önemli basamağıdır. Hematopoietik ve endotelial hücre yüzeyinde ortak saptanan bir marker olan CD31 ekspresyonu EPO'nun etkisi ile artar. Bu ve yukarıda bahsedilen diğer verilerin ışığında EPO'nun yara iyileşmesinde önemli bir etkisi olduğu görülmektedir. Literatürde EPO ile yapılan çalışmalardan elde sonuçlar bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında yara

iyileşmesini arttırdığı yönündeki bulguların örtüştüğünü ve buradan yola çıkarak yaptığımız çalışmada doksorubisinin cilt altına sızmasında meydana gelen nekrotik lezyonun iyileşmesinde etkin olduğunu saptadık.

rHuEPO uygulamasının artmış *inducible nitric oxide sentaz*(iNOS) ekspresyonu ile yara iyileşmesini arttırdığı düşünülmektedir. *Soluble* EPOR veya antiEPO monoklonal antikorları uygulandığında iNOS düzeyleri ve yara iyileşmesi azalmaktadır. iNOS'un yara iyileşmesindeki önemi iNOS *knockout* farelerde çalışılmış ve azalmış epitelizasyon ve yara kontraksiyonuna neden olduğu saptanmış. iNOS genlerinin kutanöz yaralara direk transfeksiyonunun da kollajen sentezini, epitelizasyonunu ve yara kontraksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir(8). Galeano ve ark.(9) bu noktadan yola çıkarak deneysel yanık yaralarına EPO'nun etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır ve EPO'nun reepitelizasyonu, VEGF sentezini ve doza bağlı olarak iNOS sentezini artırarak yara iyileşmesini arttırdığını saptamışlardır. Aynı çalışmada rHuEPO'nun inflamatuvar infiltrasyonu ve yanık ödemi azaltırken dermal ve epidermal rejenerasyonunu, fibroblast proliferasyonunu ve anjiogenesisi uyardığı saptanmıştır. Biz de çalışmamızda, doksorubisinin ekstrasvazasyonu sonucu cilt nekrozu oluşturduğumuz ratlardan rHuEPO verdiğimiz grupta fibroblast gelişimini, epitelizasyonu ve neovaskülarizasyonu en fazla saptadık ancak literatürden farklı olarak ödem ve inflamasyon gelişiminde SF verilen veya tedavisiz izlenen grupla EPO verilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadık.

2000 yılında Banerjee ve ark.(58) tarafından endotel hücre kültüründe yapılan çalışmada EPO'nun vasküler fonksiyon, sinyal transdüksiyonu ve enerji transferinde rolü olan pek çok gen ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Bu veriler literatürde ve bizim çalışmamızda gözlenen EPO tedavisi alan grupların histopatolojik incelemesinde saptanan artmış neovaskülarizasyonun patogenezi açıklanmaktadır.

Sayan ve ark.(40) tarafından yapılan çalışmada eritropoietinin yara iyileşmesine ve anjiogenesisine etkisi araştırılmıştır. rHuEPO ile tedavi edilen fare grubunda reepitelizasyon, kollajen sentezi, VEGF üretiminin daha fazla olduğu saptanmış, örneklerin histopatolojik incelemesiyle rHuEPO'nun derminin organizasyonunu uyardığı sonucuna varılmış. Artmış anjiogenesisin ise diğer

çalışmalarda olduğu gibi indüklenen VEGF sentezinden kaynaklandığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, rHuEPO verilen grupta proliferasyon, kollajen sentezi ve matriks remodellingin artmış olduğu görülmüştür ve EPO'nun fibroblast fonksiyonlarını etkileyerek kollajen sentezini arttırdığı düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda da Sayan ve ark. çalışmasının sonuçlarına benzer olarak EPO verilen grupta fibroblast oluşumu, kollajen sentezi, epitelizasyon tedavi verilmeyen veya SF verilen kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde fazlaydı.

Çalışmamızdan elde edilen veriler topluca değerlendirildiğinde, EPO'nun doksorubisinin ekstrasvazasyonuna bağlı cilt nekrozunun tedavisinde etkin olduğu ve ekstrasvazasyon geliştiğinde uygulanan EPO'nun nekroz gelişimini önlediği veya gelişen nekrozun cilt altı dokulara yayılımını azalttığı sonucu görülmektedir. Ancak oluşan nekroz boyutlarının haftalık değerlendirilmesine bakılırsa meydana gelen nekrozun boyutunda gerilemeye yol açmadığı saptanmıştır. Literatürde 2003 yılında Haroon ve ark.(8) tarafından yapılan bir çalışmada in vivo olarak fibrine bağlı yara iyileşmesinde EPO'nun rolü araştırılmış ve lokal tek doz EPO uygulamasının yara iyileşmesini belirgin olarak arttırdığı saptanmıştır. EPO'nun yara iyileşmesini sağlayan etkisinin granülasyon dokusundaki anjiogenesisi arttırma ve endotel hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu stimule etme özelliğine bağlı olduğu saptanmıştır.

Aydınlatılması gereken bir soru da kemoterapötik ilacın ekstrasvazasyonunun tedavisinde eritropoietinin, bu konuda önerilen DMSO, GM-CSF,G-CSF, düşük moleküler ağırlıklı heparin gibi tedavi yöntemlerinden daha etkin olup olmadığıdır. Bu sorunun cevabı EPO'nun diğer ajanlarla karşılaştırmalı olarak araştırılması ile ortaya konabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda EPO'nun non-hematopoitik bir etkisini; yara iyileşmesine olumlu etkisini gösterdik. Bizim çalışmamızı literatürden ayıran özelliği doksorubisinin ekstrasvazasyonunun tedavisinde EPO' nun ilk kez kullanılması ve tedavide etkinliğinin gösterilmesidir. Yapılacak insan çalışmaları ile EPO' nun doksorubisinin ekstrasvazasyonunun standart tedavisinde kullanabilecek bir ilaç olarak yeri ortaya çıkacaktır.

6.SONUÇLAR

Doksozubisinin ekstrasvazyonu sonucu ortaya çıkan cilt nekrozunun tedavisinde eritropoietinin yerini ortaya koyma amacıyla yaptığımız çalışmamızda aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

1. Doksozubisin verilen, doksozubin, ardından SF verilen grup ve doksozubisinin ardından EPO verilen gruplarda oluşan lezyon boyutları birinci haftanın sonunda gros olarak değerlendirildiğinde en büyük lezyon çapı birinci grupta saptanırken üçüncü grupta oluşan lezyon boyutu en küçüktü. Buda EPO' nun nekroz oluşumunu önleyici etkisinin mevcut olduğunu ortaya koymaktadır.

2. Lezyon boyutları ikinci haftanın sonunda gros olarak değerlendirildiğinde birinci gruptaki lezyon boyutu en büyük, üçüncü gruptaki ise en küçüktü ve EPO' nun ekstrasvazyon sonrası oluşan lezyon için koruyucu etkisini göstermektedir.

3. Deneyin sonlandırıldığı dördüncü haftanın sonunda da birinci gruptaki lezyon boyutunun en büyük ve üçüncü grupta ise en küçük olduğu görülmektedir. EPO' nun doksozubisine bağlı gelişen cilt nekrozunu önlemektedir.

4. Deneyin sonunda ratlardan alınan cilt biyopsileri histopatolojik olarak inflamasyon, ödem, epitelizasyon, neovaskularizasyon, nekroz fibroblast ve kollajen oluşumu parametreleri ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda üç grubun inflamasyon gelişimi açısından fark göstermediği görülmüş, EPO' nun antiinflamatuvar olmadığı sonucuna varılmıştır.

5. Benzer şekilde EPO' nun ödem oluşumuna etkisi yoktur.

6. Epitelizasyon oluşumu değerlendirildiğinde EPO verilen grupta epitelizasyonun en fazla olup EPO' nun epitelizasyonu arttırdığı saptanmıştır.

7. Gruplar arası neovaskularizasyon oluşumu karşılaştırıldığında üçüncü grupta neovaskularizasyon gelişiminin en fazla olduğu görüldü. EPO' nun neovaskularizasyonu artırıcı etkisi vardır.

8. Biyopsiler nekroz oluşumu açısından değerlendirildiğinde birinci grupta en fazla, üçüncü grupta ise en az olduğu saptandı. EPO nekroz gelişimini önlemektedir.

9. Fibroblast oluşumu gruplar arası karşılaştırıldığında üçüncü grupta diğer iki gruptanda fazla olduğu saptandı. EPO fibroblast göçünü arttırmaktadır.

10. Histopatolojik değerlendirmenin son parametresi olan kollajen oluşumu üçüncü grupta daha fazladır. EPO, yara iyileşmesinin diğer basamaklarında olduğu gibi kollajen oluşumunu da arttırmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Lu P. Monitoring Cardiac Function in Patients Receiving Doxorubicin. *Sem Nucl Med.* 2005; 35: 197-201
2. Bekerecioğlu M, Kutluhan A, Demirtaş İ, Karaayvaz M. Prevention of Adriamycin-Induced Skin Necrosis with Various Free Radical Scavengers. *Journal of Surgical Research.* 1998; 75: 61-65
3. Yılmaz M, Demirdöver, Mola F. Treatment Options in Extravasation Injury: An Experimental Study in Rats. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(7):2418-23
4. Vargel İ, Erdem A, Ertoy D, Pınar A, Erk Y, Altundağ MK, Güllü İ, Effects of Growth Factors on Doxorubicin-Induced Skin Necrosis: Documentation of Histomorphological Alterations and Early Treatment by GM-CSF and G-CSF. *Ann Plast Surg.* 2002; 49: 646- 653
5. Langer SW, Sehested M, Jensen PB. Treatment of Anthracycline Extravasation with Dexrazoxane. *Clinical Cancer Research.* 2000, 6: 3680-3686
6. Langstein HN, Duman H, Seeling D, Butler CE, Evans GRD. Retrospective Study of the Management of Chemotherapeutic Extravasation Injury. *Ann Plast Surg.* 2002;49: 369- 374
7. Linder RM, Upton J, Osteen R. Management of extensive doxorubicin hydrochloride extravasation injuries. *J Hand Surg.* 1983; 8: 32
8. Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO. A Novel Role for Eritropoietin During Fibrin-Induced Wound Healing Response. *Am J Pathol* 2003, 163:993- 1000
9. Galeano M, Altavilla D., Bitto A., Recombinant Human Erythropoietin Improves Angiogenesis and Wound Healing in Experimental Burn Wounds. *Crit Care Med.* 2006 Apr;34(4):1139- 46
10. Gülbaş Z. Hematopoietik Büyüme Faktörlerinin Onkolojide Yara İyileşmesinde Kullanımı. *Hematoloji-Onkoloji.* 2000; 2(3): 219- 221

11. Cheung JY, Miller BA. Molecular Mechanisms of Erythropoietin Signaling. *Nephron*. 2001;87:215- 222
12. Casadeval N, Rossert J. Importance of Biologic Follow-ons: experience with EPO. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2005, Vol. 18, No. 3, pp. 381- 387
13. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death and Differentiation*. 2004; 11, S37-S44
14. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Recombinant Human Erythropoietin Stimulates Angiogenesis and Healing of Ischemic Skin Wounds. *Shock*. 2004, Vol. 22, No.2,pp. 169- 173
15. Chong ZZ, Kang JQ and Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation*. 2002; 106: 2973-2979
16. Dorr RT. Antidotes to vesicant chemotherapy extravasations. *Blood*. Rev 1990;4; 41- 60
17. Aksar İ, Erbas MK, Gürlek A. Effects of heparin fractions on the prevention of skin necrosis resulting from adriamycin extravasation: an experimental study. *Ann Plast Surg*. 2002; 49:297- 301
18. Hardman JG, Limbird LE. Goodman&Gilman's' the Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Edition.2001.p.1425- 1429
19. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Hacettepe Taş. Kitapçılık. 2000. s.372- 407
20. Çubukçu M. Karnitin ve düşük moleküler ağırlıklı heparinin, antrasiklinlerin lipid peroksidasyonu aracılığıyla oluşturdukları kardiyotoksisite ve nefrotoksisite üzerine etkileri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi. Eskişehir. 2003
21. McEvoy GK. AHFS Drug Information 2004. Amer Soc of Health System; (December 2003)

22. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 2nd Edition. Lippincott-Raven Publishers. 1997
23. Wolf BM, Baynes WJ. The anticancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006 Feb;1760(2):267- 71
24. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol. Cell. Biochem*. 2002 May-Jun; 234- 235(1-2):119-24
25. BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 2006; 1- 13
26. Hilmer SH, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metabolism and Disposition*. 2004; 32: 794- 799
27. Schrijvers DL. Extravasation: A dreaded complication of chemotherapy. *Annals of Oncology*. 2003;14 Suppl 3:iii26- 30
28. Khan MS, Holmes JD. Reducing the morbidity from extravasation injuries. *Ann Plast Surg* 2002; 48: 628- 632
29. Goolsby TV, Lombardo FA. Extravasation of chemotherapeutic agents: prevention and treatment. *Semin Oncol*. 2006 Feb;33(1):139- 43
30. Dorr RT, Dordal MS, Koenig LM et al. High levels of doxorubicin in the tissues of a patient experiencing extravasation during a 4-day infusion. *Cancer*. 1999; 64: 2462- 2464
31. Sonneveld P, Wassenaar HA, Noter K. Long persistence of doxorubicin in human skin after extravasation. *Cancer Treatment Rep*. 1984; 68: 895- 896
32. Dorr RT. Pharmacological management of vesicant chemotherapy extravasations. In Dorr RT, Von Hoff DD(eds): *Cancer Chemotherapy Handbook*, 2nd edition. Norwalk, CT: Appleton&Lange 1993; 109- 118
33. Ener RA, Meglathery SB, Styler M. Extravasation of systemic hematological therapies. *Annals of Oncology*. 2004 Jun;15(6):858- 62

34. Uptom J, Mulliken JB, Murray JE. Major intravenous extravasation injuries. *Am J Surg.* 1979; 137:497- 506
35. Goodman J, Hochstein P. Generation of Free Radicals and Lipid Peroxidation by Redox Cycling of Adriamycin and Daunomycin. *Biochem. Biophys. Res.* 1977 Jul 25;77(2):797-803
36. Mimnaugh EG, Kremedy KA, Trush MA, Sinha BK. Adriamycin-enhanced membrane lipid peroxidation in isolated rat nuclei. *Cancer Res.* 1985 Jul;45(7):3296-304
37. Cox RF. Managing skin damage induced by doxorubicin hydrochloride and daunorubicin hydrochloride. *Am J Hosp Pharm.* 1984 Nov;41(11):2410- 4
38. Dorr RT, Alberts DS, Stone A. Cold protection and heat enhancement of doxorubicin skin toxicity in the mouse. *Cancer Treat Rep.* 1985 Apr;69(4):431-7
39. Bachur NR, Gee MV, Friedman RD. Nuclear catalysed antibiotic free radical formation. *Cancer Res.* 1982; 42: 1078
40. Sayan H, Özaçmak HV, Guven A, Aktaş RG, Özaçmak DI. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *Journal of investigative surgery,* 2006 May-Jun;19(3):163-73
41. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo BE, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic Mouse. *Diabetes.* 2004 Sep; 53(9):2509-17
42. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* 5th Edition. W.B. Saunders Company. 1999
43. Lebrede L, Barrie R, Woltering EA. DMSO protects against adriamycin-induced tissue necrosis. *J Surg Res.* 1992; 53: 62-65

44. Hajaridadeh H, Lebrede L, Barrie R, Woltering EA. Protective effect of doxorubicin in vitamin C or dimethyl sulfoxide skin ulceration in pig. *Ann Surg Oncol.* 1994; 1: 411-414
45. Lawrence HJ, Walsh D, Zappotowski KA et al. Topical dimethyl sulfoxide may prevent tissue damage from anthracycline extravasation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 23: 316-318
46. Olver IN, Aisner J, Hament A et al. A prospective study of topical dimethyl sulfoxide for treating anthracycline extravasation. *J Clin Oncol.* 1988; 6: 1732-1735
47. Bertilli G, Gozza A, Forno GB et al. Topical dimethyl sulfoxide for the prevention of soft tissue injury after extravasation of vesicant drugs: a prospective clinical study. *J Clin Oncol.* 1995; 13: 2851-2855
48. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood.* 1996; 88: 1576-82
49. Tilbrook PA, Klinken SP. Erythropoietin and erythropoietin receptor. *Growth Factors.* 1999; 17: 25-35
50. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol.* 1997; 273R: 1829-81
51. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica.* 1998; 83: 724-32
52. Yoshimura A, Arai K. The erythropoietin receptor and signal transduction. *The Oncologist.* 1996; 1: 337-339
53. Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: Biology and clinical promise. *Kidney International.* 2006; 70,246-250
54. Graber SE, Krantz SB. Erythropoietin: biology and clinical use. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1989; 3: 369- 400

55. Cheung JY, Miller BA. Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron*. 2001; 87: 215- 222
56. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 4304- 4308
57. Fisher JW. Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. *Experimental Biology and Medicine*. 2003; 228:1- 14
58. Kertesz N, Wu J, Chen HBT, Sucov MH, Wu H. The Role of Erythropoietin in Regulating Angiogenesis. *Developmental Biology*. 2004 Dec 1;276(1):101- 10
59. Weiss MJ. New insights into erythropoietin and epoetin alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *The Oncologist*. 2003; 8(suppl 3): 18- 29
60. Ohashi H, Maruyama K, Liu Y et al. Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 158- 162
61. Maruyama K, Miyata K, Yoshimura A. Proliferation and erythroid differentiation through the cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem*. 1994; 269: 5976- 5980
62. Kubota Y, Tanaka T, Yamaoka G, Yamaguchi M, Ohnishi H, Kawanishi K, Takahara J, Irino S. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, inhibits erythropoietin induced erythroid differentiation of K562 cells. *Leukemia*. 1996; 10: 720- 726
63. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM; Hempstead B, Flanders KC, Costantini F and Noguchi CT. Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development. *Development*. 2002; 129: 505-516

64. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G and Fernandez –Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood*. 1996; 88: 1576- 1582
65. Wagner KU, Claudio E, Rucker III EB, Riedlinger G, Broussard C, Schwartzberg PL, Siebenlist U and Henninghausen L. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development*. 2000; 127: 4949- 4958
66. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F et al. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J of Neuropathol Exp Neurol*. 2003; 62: 228- 236
67. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M et al. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res*. 2002; 64: 326- 333
68. Ribatti D, Presta M, Vacca A et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*. 1999; 93: 2627- 2636
69. Arcasoy MO, Amin K, Haroon ZA. Erythropoietin (EPO) receptor expression in macrophages is associated with EPO- mediated stimulation of wound healing response, angiogenesis and transforming growth factor β -1 production. *Proc Am Soc Hematol*. 2002; 100: 681a
70. Wang H, Pastore Y, Pool L et al. Gain of function mutation of human erythropoietin receptor in mice decreases neointimal formation. *Blood*. 2002; 100:680a-681a
71. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S and Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc. Res*. 2002; 64:326-333
72. Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO: A novel role for erythropoietin during fibrin induced wound healing response. *Am J Pathol*. 2003; 163: 993- 1000

73. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *European Journal of Clinical Investigation*. 2003; 33: 891-896