

T.C
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**5-FLUOROURASİL İLE KEMOTERAPİ UYGULANAN
TAVŞANLARDA SUBMANDİBÜLER GLANDIN
HİSTOPATOLOJİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Oktay ÖZEL

Tez Danışmanı: Doç.Dr. F. Sefa DEREKÖY

AFYONKARAHİSAR 2005

İşbu çalışma jürimiz tarafından KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

ÜYE

ÜYE

ONAY

DEKAN

T.C
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**5-FLUOROURASİL İLE KEMOTERAPİ UYGULANAN
TAVŞANLARDA SUBMANDİBÜLER GLANDIN
HİSTOPATOLOJİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Oktay ÖZEL

Tez Danışmanı: Doç.Dr. F. Sefa DEREKÖY

AFYONKARAHİSAR 2005

Tezimin hazırlanma sürecinin tamamında desteklerini hiç esirgemeyen sayın Doç. Dr. Fatma Aktepe ve tüm patoloji bölümüne teşekkür ederim.

Klinikte eğitimim sırasında her zaman yardımlarını esirgemeyerek yanımda olan sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz Yılmaz ve Yrd. Doç. Dr. Abdullah Ayçiçek hocalarıma ve tüm asistan arkadaşlarıma müteşekkirim.

Tüm araştırma görevliliğim süresince her konuda yardımını aldığım ve üzerimde emeği olan anabilim dalı başkanım ve tez danışmanım Doç. Dr. Sefa Dereköy'e teşekkürü bir borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
I-GİRİŞ VE AMAÇ	1
II-GENEL BİLGİLER	2
2.1. TARİHÇE	2
2.2. SUBMANDİBÜLER GLANDIN EMBRİYOLOJİSİ	3
2.3. SUBMANDİBÜLER GLANDIN ANATOMİSİ	5
2.4. SUBMANDİBÜLER GLANDIN HİSTOLOJİSİ	8
2.5. SUBMANDİBÜLER GLANDIN FİZYOLOJİSİ	10
2.6. 5-FLUOROURASİL	17
2.7. MUKOZİT VE KSEROSTOMİ	19
2.8. APOPTOZİS	23
2.9. HÜCRE REJENERASYONU VE PCNA (PROLİFERATİVE CELL NUCLEAR ANTİGEN)	28
III-MATERYAL VE METOD	29
3.1. DOKU ÖRNEKLERİ	29
3.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA	30
3.3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	31
3.4. APOPTOZİS İÇİN TUNEL BOYAMA	31
3.5. APOPTOTİK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	32
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	32
IV-BULGULAR	33
V-TARTIŞMA	40
VI-SONUÇ	43
VII-ÖZET	44
VIII-SUMMARY	46
IX-KAYNAKLAR	48

TABLolar ÇİZELGESİ

Tablo-I: Tükürükteki solid maddeler ve rolleri

Tablo -II: Tükürükteki solid ve sıvı maddelerin tükürük fonksiyonları ile ilişkisi

Tablo-III: Tükürük salgısını etkileyen hastalıklar

Tablo-IV: Kserostomiye sebep olan ilaçlar

Tablo-V: Çalışma grubundaki tavşanlarda yapılan uygulamalar

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil-1: Tükürük bezlerinin embriyolojik gelişmesi

Şekil-2: Submandibüler glanda komşu önemli yapılar

Şekil -3: Submandibüler glandın ağız tabanındaki yerleşimi

Şekil-4: Submandibüler glandın lokalizasyonu

Şekil-5: Tükürük bezine ait bir salgı ünitesi

Şekil-6: Submandibüler ve sublingual bezin sempatik ve parasempatik innervasyonu

Şekil-7: Apoptozisteki olayların şematik görünümü

Şekil-8: 5-FU'in aktivasyon yolları

Şekil-9: Duktal yapıların özelliklerinin gözleendiği normal tükürük bezinin histopatolojik görüntüsü

Şekil-10: Asiner yapıların özelliklerinin gözleendiği normal tükürük bezinin histopatolojik görüntüsü

Şekil-11: Asinüslerde kemoterapi etkisi

Şekil-12: Asinüs hücrelerinde apoptotik hücreler

Şekil-13: Duktusta apoptotik duktal hücreler

Şekil-14: PCNA antikoru ile duktal epitelyal hücre nükleuslarında pozitif boyanma gösteren proliferatif hücreler

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antineoplastik ilaçların stomatotoksik etkileriyle ortaya çıkan mukozit tabloları (stomatit, özefagofarenjit ve diare) kanser hastalarının morbiditesini ve tedavi maliyetini artırmaktadır. Bu komplikasyon aynı zamanda hastanede kalış süresini ve sörviyi önemli derecede etkiler. Mukozitli olgularda, ağız ve boğazda ağrı, beslenme ve konuşma bozuklukları, kilo kaybı, oral enfeksiyonlar, bakteriyemi ve sepsis görülmektedir. Mukoziti olan nütropenili hastalarda septisemi riski 4 kat fazladır (1). Şiddetli ülserasyonlarda mortalite oranı % 40'lara varmaktadır (2). Kemoterapi uygulanan hastalarda mukozit gelişme oranı % 40 olarak bildirilirken, 5-Fluorourasil' in (5- FU) baş boyun kanserlerinde % 4-74 oranında mukozite yol açtığı ileri sürülmüştür (3). Bu hastalarda görülen mukoziti tetikleyen faktörler henüz kesin olarak anlaşılmamış olup bir çok etken sorumlu tutulmaktadır (4). Yaş, vücut yüzeyi alanı, cinsiyet, kullanılan diğer ilaçlar, alkol ve sigara, nütrofil sayısı ve kserostomi bu faktörler arasında sayılabilir. Oral hijyenin devamlılığının sağlanması için normal histoloji ve fizyolojiye sahip tükürük bezleri gerekmektedir. Tükürükteki müsin glikoproteinleri oral mukozanın permabilitesini azaltırken, lubrikasyonla fonasyonu, çiğnemeyi ve yutmayı kolaylaştırır. Tükürük içeriğindeki antibakteriyel etkili lizozimler, laktoperoksidazlar, immünglobülinler, laktoferrinler ve histatinler sağlıklı bir oral mukozanın devamlılığını sağlarlar.

Oral mukozit profilaksisi için etkisi kanıtlanmış ajan ve tedavisinde bir altın standart henüz ortaya konabilmiş değildir (5).

Bu çalışmanın amacı, 5-FU' nun submandibüler gland histolojisi üzerindeki erken dönem etkilerini saptamaya çalışmaktır. Elde edilen sonuçları değerlendirilmesiyle kemoterapi uygulaması sonucu ortaya çıkan histopatolojik değişiklikleri izlemeyi sağlayacak standart bir hayvan modeli geliştirilecektir. Bu standart model, bu tür komplikasyonların profilaksisi için uygulanacak ilaçların veya değişik ajanların karşılaştırılmasında bir yöntem olarak kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 TARİHÇE

Tükürük bezi hastalıkları ilk olarak Hipokrat tarafından (MÖ 460-370) tanımlanmıştır (6). Submandibüler kanalı tanımlayan ve tükürük bezlerinin anatomisi ile ilgilenen Thomas Wharton (1614-1673) büyük veba salgını sırasında hastalar üzerinde araştırmalar yapmıştır. Bu konuda 1659 yılında "Adenographia" adlı eserini yayınlamıştır. Nicolaus Stenosis (1638-1686) hayvanda parotis kanalını ilk bulan kişidir. 1656'da ise insanda ilk parotis kanalını Frans de la Boe bulmuştur. Gaspar Bartholin tükürük bezinin anatomisinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. 1673'de Gerard Blasii sublingual ve submandibüler tükürük bezlerinin detaylı araştırmasını yapmıştır. 1727'de ise Albrecht von Haller submandibuler üçgene dikkatli bir kesi yapıp submandibuler bezin bipid yapısını göstermiştir.

1950 yılında Borghese, submandibüler gland epitelinin gelişiminde mezenşimal kapsülün önemli olduğunu ilk defa ortaya koymuştur (7).

Birinci Dünya savaşı sırasında zehirli gaz olarak kullanılan ve ciltte toksik vezikül oluşturan kükürtlü hardal (İng: Sulphur mustard) maddesinin insanlarda lenfoid doku ve kemik iliğinde atrofi yaptığının saptanması, daha sonraki yıllarda azotlu hardal (nitrojen mustard) bileşiklerinin hem kimyasal savaş aracı olarak geliştirilmesine hem de deney hayvanlarındaki tümörlerde denenmesine yol açmıştır. Bu incelemeler sonunda ilk defa 1948'de bir azotlu hardal olarak mekloretoamin adlı ilk alkilleyici ajan klinikte kullanılmaya başlandı ve böylece modern kanser kemoterapisi çağı açılmış oldu. Daha sonra 1957 yılında ilk kez Heidelberger tarafından 5-FU sentezlendi (8).

Cerrahi patoloji bilimi 1800'lerin sonlarında ortaya çıktı. 70-100 yıl kadar önce patologlar tümörlerin histogenezi konusunda merakla çalışmışlardı. Tümörün hücre orjini ve embriyonik kalıntıların rolü en çok ilgilendikleri noktalardı. Bir İsveçli radyoterapist olan Ahlbom, 1935'de tükürük bezi tümörleri üzerinde ilk kez geniş bir literatür analizi yapmıştır.

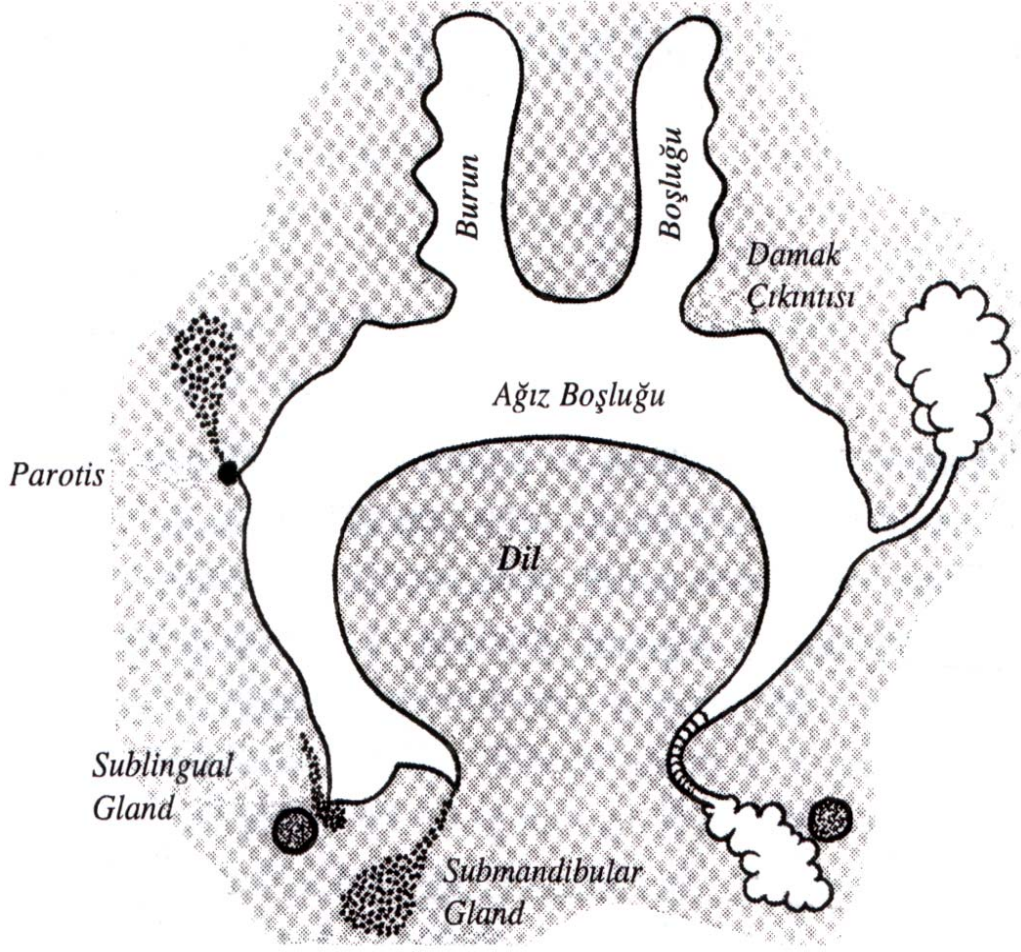
İlk kulak burun boğaz histopatolojisi Eagstone ve Wolff tarafından 1947'de yazıldı. 1953'de ise bir patolog olan Frank W. Foote ile baş boyun cerrahı Edgar I. Frazell, Memorial hastanesinde cerrahi uygulanan 877 hasta ile ilgili tecrübelerini yayınladılar. Bu çalışma, çizim ve resimleriyle, major tükürük bezi tümörlerinin ilk atlası oldu (9).

2.2 SUBMANDİBÜLER GLANDIN EMBRİYOLOJİSİ

Yüzün viseral bölümü, ağız boşluğu ve boyun esas olarak primitif brankiyal arklardan gelişir. Başın nörokranial parçası ise nöral plaktan gelişir. Tükürük glandları ağız boşluğu epitelinden gelişirler. Ağız boşluğunu döşeyen epitelin proliferasyonu ile oluşan solid hücre kümeleri mezenşim içine doğru yönelerek gland taslağını oluştururlar (10). Glandların kökenini oluşturan germ hücreleri ile ilgili çeşitli görüşler ileri sürülmekle beraber, genelde glandın ektodermal kökenli olduğu kabul edilir (11).

Major ve minör tükürük glandları, benzer olarak oral ektodermden solid tomurcuklar şeklinde gelişir. Bu epitelyal tomurcuklar zamanla proliferasyon olarak öncü hücreleri meydana getirirler. Öncü hücreler, ekskretuar duktusların bazal hücreleri ile intercalate duktal hücrelerdir. Çevre mezenşimal dokunun etkisi ile, öncü hücreler duktus, asinüs ve myoepitelyal hücrelere dönüşürler. Bu olay majör tükürük glandlarında intrauterin 6. haftada, minör tükürük glandlarında ise 9. haftada başlar (12).

Submandibüler gland, ektodermal kökenli olup primitif ağız epitelinden gelişir. Bu glandlar 5-6. haftada çıplak gözle görünür hale gelirler ve tükürük bezleri içinde en erken yerini alan gland olarak kabul edilirler (13).



Şekil 1: 6.5 haftalık embriyoda tükürük bezlerinin gelişimini gösteren frontal bir kesit (14)

2.3 SUBMANDİBÜLER GLANDIN ANATOMİSİ

Solunum ve sindirim yollarında bir çok tükürük glandı vardır. Bunlardan parotis, submandibüler ve sublingual glandlara majör tükürük glandları, küçük olanlarına ise minör tükürük glandları denir. Solunum ve sindirim sisteminde 800 ile 1000 kadar minör tükürük bezleri bulunmaktadır. Labial, bukkal, retromolar, glossopalatin, palatin, tonsiller ve lingual glandlar ise belli başlı minor tükürük glandlarıdır. Ayrıca, bu anatomik lokalizasyonlar dışında baş ve boyun bölgesinin değişik lokalizasyonlarında heterotopik olarak yerleşmiş, fonksiyon görmeyen tükürük glandları da bulunabilir (15).

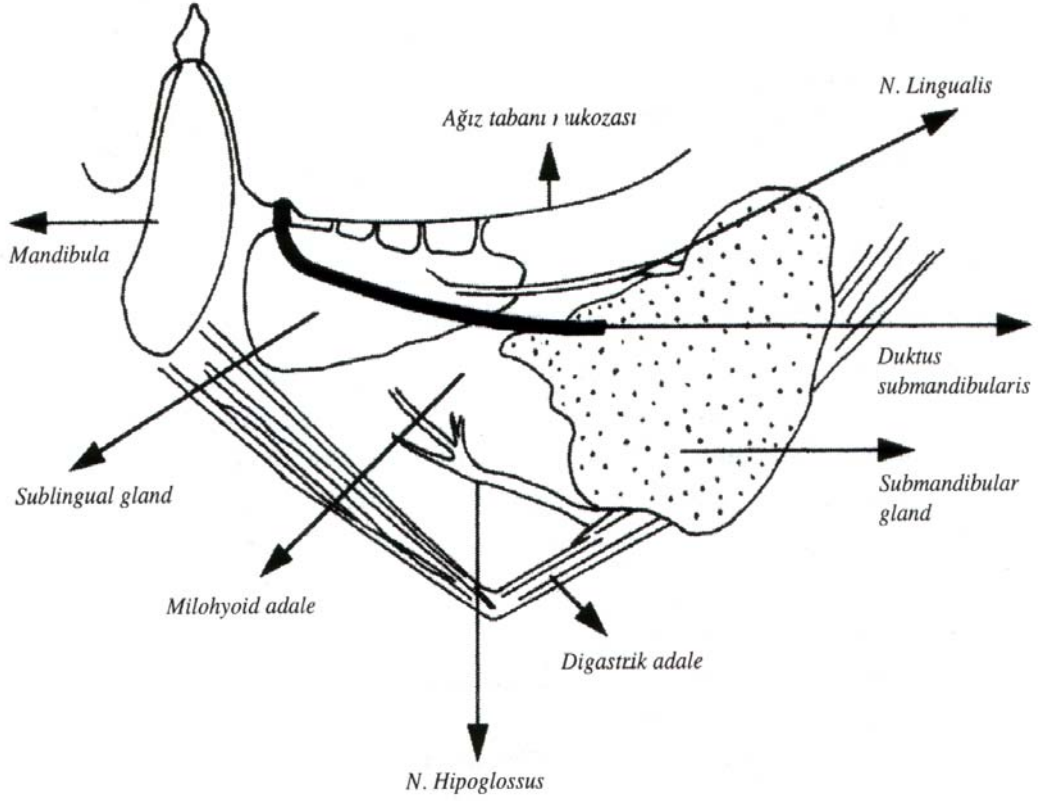
Submandibüler gland yaklaşık 7-12 gram ağırlığında oval şekilli bir bezdir. Büyük bölümü submandibüler üçgende bulunur. Bu üçgen yukarıda mandibulanın alt kenarı, aşağı önde digastrik kasın ön karnı, aşağı-arkada ise digastriğin arka karnı ile stilohyoid kas tarafından sınırlanır (16). Parotis ile arasında stilomandibüler ligaman bulunur. Bu ligaman, submandibüler glandı saran derin servikal fasyanın yüzeyel tabakasının stiloid proses ile angulus mandibula arasında uzanan bir parçasıdır. Ayrıca, gland servikal fasyadan kaynaklanan yoğun bir fibröz kapsülle de sarılıdır. Bezin dış yüzünün üst bölümü doğrudan mandibuladaki submandibular fossaya, kısmen de medial pterigoid kasa oturur. Alt bölümü ise deri, yüzeyel fasya, platisma ve derin fasya ile örtülüdür. Bu yüzde vena fasiyalisin dalları seyredir (17).

İç yüzü milohyoid kas, hyoglossal kas, stiloglossal kas, stilohyoid kas ve submental arter-ven ile komşudur. Fasiyal arter bu bezin arka tarafındaki bir oluk içinde seyredir.

Submandibüler gland'ın iç yüzünde unsinat proses denilen bir çıkıntı bulunur. Submandibüler gland bu çıkıntının yukarısında lingual sinir, aşağısında ise hipoglossal sinir ile komşuluk yapar (18).

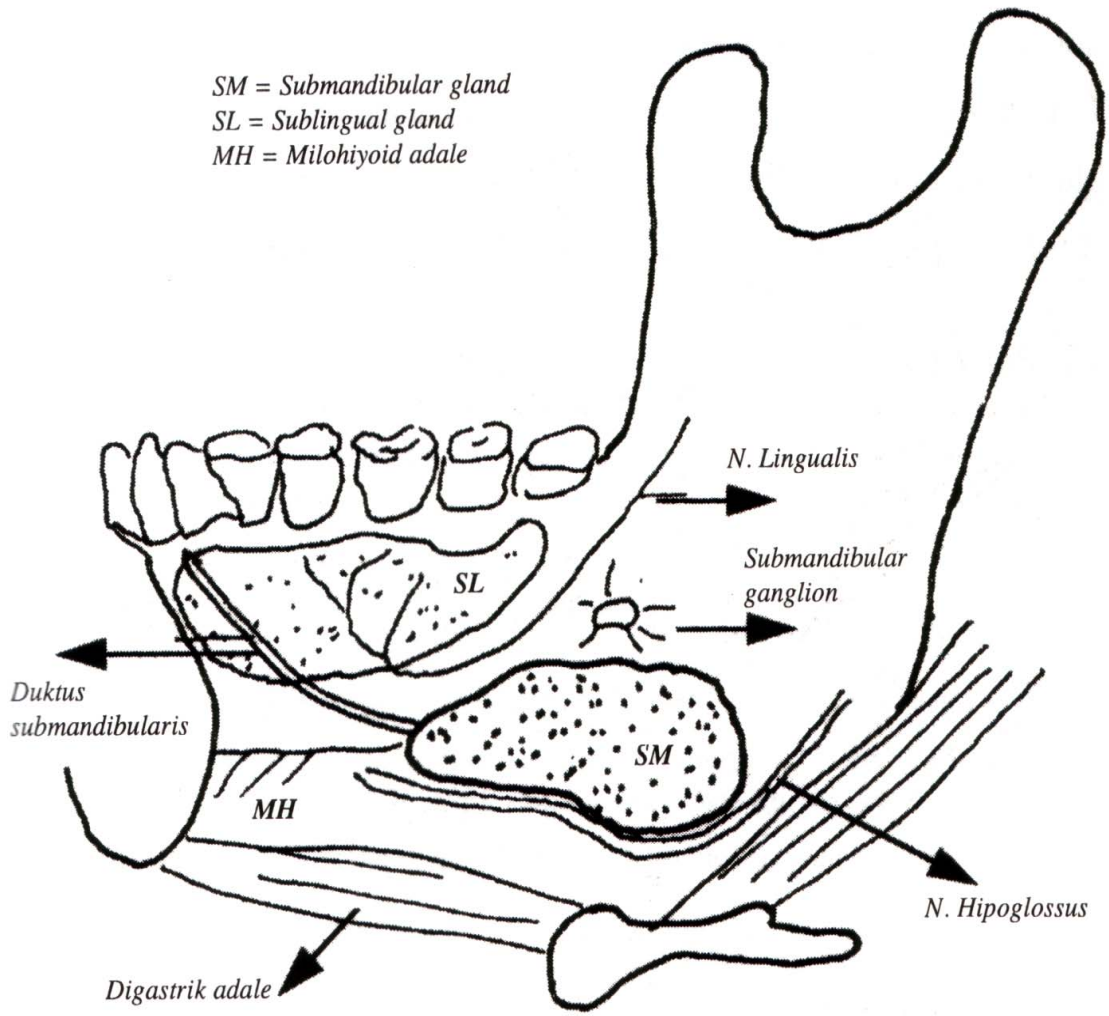
Submandibüler kanal (Wharton kanalı) yaklaşık 5 cm uzunluğundadır. Glandın iç yüzünde ince kanallar şeklinde başlar, öne doğru seyrederek önce mylohyoid kas ile hyoglossus kası arasında, daha sonra da sublingual gland ile genioglossus kası arasında seyredir.

Sonunda dar bir delik aracılığı ile oral kavite girişinde dil kökünün altında bulunan caruncula sublingualise açılır (17).

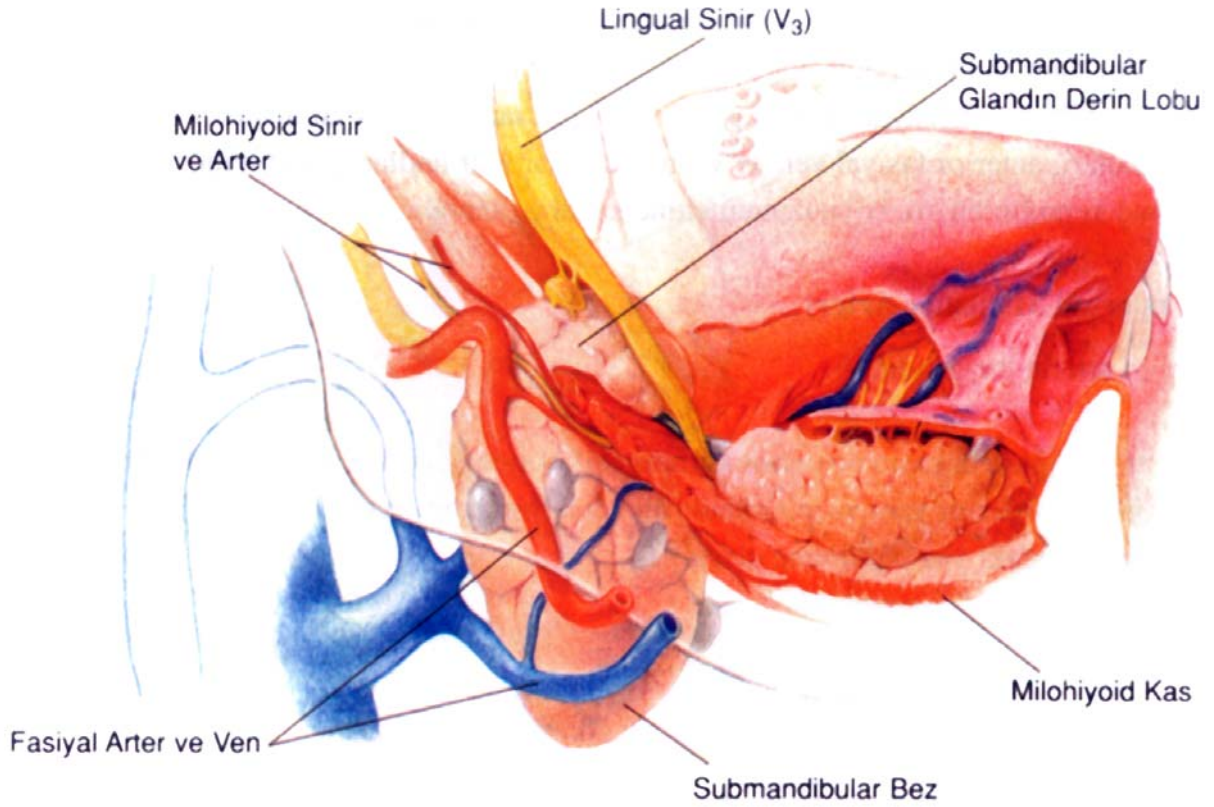


Şekil 2: Submandibüler glanda komşu önemli yapılar (14)

Submandibüler glandı lingual arter ve fasyal arterin dalları besler. Venleri de bu arterlerle birlikte seyrederek ve aynı ismi alırlar (17). Lenfatikleri submandibüler lenf nodlarına ve sonra juguler zincire boşalır. Bu bölgedeki lenf nodları submandibüler gland fasyası dışında lokalizedir. Submandibüler üçgende ortalama 8-10 lenf nodu bulunur. Bu bölgedeki lenf nodları periglandüler, perivasküler, retroglandüler ve retrovasküler olmak üzere gruplandırılabilir. Bezin içinde de 1 ile 12 arasında lenf nodu bulunabileceği saptanmıştır.



Şekil 3: Submandibüler glandın ağız tabanındaki yerleşimi (14)



Şekil 4 : Submandibüler glandın lokalizasyonu (19)

2.4 SUBMANDİBÜLER GLANDIN HİSTOLOJİSİ

Büyük tükürük bezleri kollajen liflerden zengin bir bağ dokusu kapsülü ile sarılmıştır. Bu kapsülden çıkan bağ dokusu septumları bezin içine girer ve bezi lobüllere ayırır. Damarlar ve sinirler hilumda bez içine girer ve lobüller içine doğru giderek dallanır. Her lobülün sekretuar ve duktal yapılarının çevresinde zengin damar ve sinir pleksusları bulunur.

Submandibüler gland dallanmış tübüloasiner bir bezdir. Sekretuar kısımları hem müköz hem de seröz hücreler içerir. Seröz hücreler ana komponenttir. Histolojik olarak saf müköz hücrelerden kolaylıkla ayırt edilir.

Seröz hücreler genellikle piramidal şekillidir. Geniş tabanlarıyla bazal lamina üzerine otururlar. Dar apikal yüzeylerinde kısa, düzensiz ve lümene bakan mikrovillüsler vardır. Bu hücreler protein salgılayan polarize hücre

özellikleri gösterirler. Seröz hücrelerin küresel biçimde oluşturdukları ve ortasında lümen bulunan yapılara asinüs (alveolus) adı verilir.

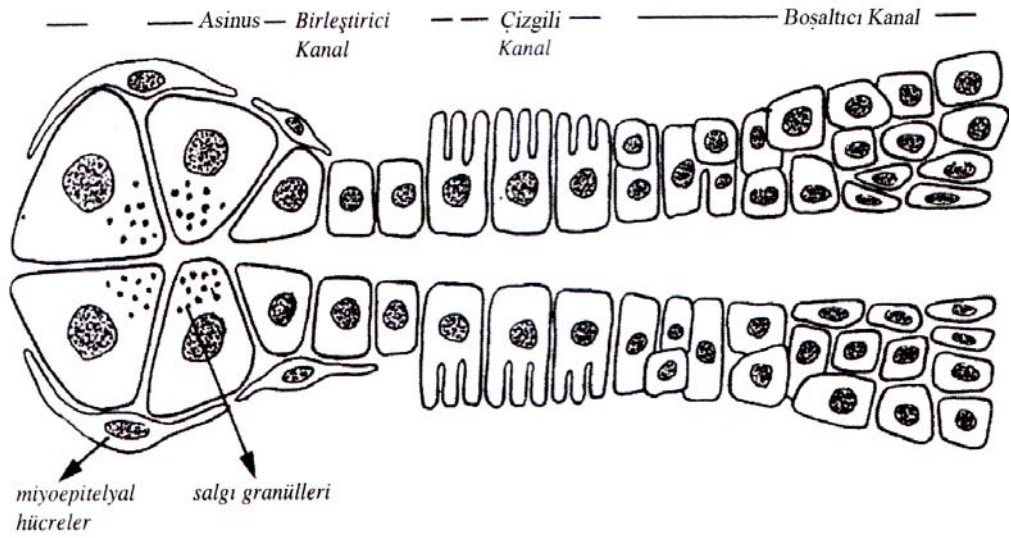
Müköz hücreler genellikle kübik ya da prizmatiktir. Nükleusları ovaldır ve hücre tabanına doğru basıktır. Müköz hücreler, genellikle bir lümen çevresinde silindirik olarak dizilerek tübüller oluştururlar (20).

Miyoeptilyal hücreler, tükürük glandlarının bez ve kanal epitellerinin bazal laminasında bulunur. Seröz asinüsleri saran miyoeptilyal hücreler oldukça dallanmış hücrelerdir ve bazen sepet hücreleri olarak isimlendirilirler. Müköz tübüller ve duktus interkalariste bulunanlar iğsi şekildedir ve kanalın uzunluğuna paralel olarak uzanırlar.

Kanal sisteminde salgı yapan son kısımlar, kübik epitel hücreleriyle döşeli olan duktus interkalarise (birleştirici kanal) açılır. Bu kanalların birkaç tanesi birleşerek intralobüler kanalın başka bir tipini, yani çizgili kanalı (İng: Striated duct) oluştururlar.

Her lobülün çizgili kanalları birleşir ve lobülleri ayıran bağ dokusu septumları içindeki kanallara açılır. Bu kanallara interlobüler kanallar ya da boşaltım kanalları (İng: Excretory canal) denir. Boşaltım kanalının epiteli başlangıçta çok katlı kübik epitel iken, daha distaldeki kısımları çok katlı prizmatik epitle döşelidir.

Wharton kanalı iki sıralı yüksek prizmatik, distalde ise çok katlı yassı epitle örtülüdür. Çevresinde elastik lifler içeren gevşek bir bazal membran yer alır. Distalde düz adele lifleri bulunur. Ayrıca ostiuma yakın parçasında geniş divertiküller görülür (14,21).



Şekil 5: Tükürük bezine ait bir salgı ünitesi. Santral bir lümen etrafına dizili asiner hücreler içinde salgı granülleri vardır. Asini hücreleri çevresinde miyoepitelial hücreler bulunur. Salgı asinus lümeninden birleştirici kanallar yoluyla çizgili kanallara ve daha sonra boşaltıcı kanallara boşalır (14).

2.5 SUBMANDİBULER GLANDIN FİZYOLOJİSİ

Normal günlük tükürük salgısı 800-1500 ml arasında değişir. Ortalama olarak 1000 ml'dir. İnsan tükürüğü, %70 oranında submandibüler gland, %25 oranında parotis gland ve %5 oranında sublingual glandın salgılarından oluşur (22).

Tükürük makromoleküller ve su olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Sulu kısım kan damarlarından, makromoleküller ise, asiner hücrelerin salgı granüllerinden gelir.

Tükürüğün % 99'unu su, % 1'ini ise inorganik iyonlar, salgısal glikoproteinler, serum elemanları ile enzimler oluşturur. Normal tükürük renksiz, şeffaf, visköz ve tatsızdır (23).

Tükürüğün dansitesi 1003-1009 arasında değişir. Hipotoniktir ve viskozitesi 19-35 arasındadır. Tükürüğün visköz özelliği, glikoprotein karışımı olan müsinlerden dolayıdır.

Tükürükte yer alan başlıca inorganik iyonlar, Na, K, Cl, HCO₃ olup Ca, Mg, HPO₃,I ve F iyonları da daha az miktarlarda bulunurlar. Ayrıca

sülfat, tiyosiyanat, nitrit ve eriyik halinde $\text{NH}_3, \text{CO}_2, \text{O}_2$ ve N gibi gazlar da yer alır (24).

Tükürüğün salgılanması refleks olarak 3 yolla meydana gelir (14).

1. Sefalik Faz:

Tükürük salgısı yiyeceklerin düşünülmesi veya kokusunun alınması ile başlar. Beyin korteksinden çıkan impulslar tükürük salgı merkezini uyararak salgıya neden olurlar.

2. Bukkal Faz

Ağızdaki tad alma veya dokunma duyularının uyarılması ile olur. Besinlerin ağız mukozasına yaptığı fizik ve kimyasal uyarılar afferent yollarla salgı merkezine iletilirler.

3. Gastrointestinal Faz

Mide ve üst sindirim sisteminden kalkan refleksle meydana gelir. İrritan maddeler yutulduğunda, refleks kuvvetlenir. Tükürük sulandırarak veya nötralize ederek bu maddelerin etkisini kısmen önler. Özefagusa giren besin maddeleri ile lümenin gerilmesi ve bu maddelerin midede mukozayı uymaları ile de tükürük salgısı olur.

Salgilama işleminde 3 olay görülmektedir (14):

1. Su ve bazı kristaloidlerin plazmadan doku sıvısına aktif sekresyon, aktif reabsorbsiyon ve pasif reabsorbsiyonla geçmesi
2. Kolloidal organik moleküllerin sentez ve sekresyonu
3. Bazı organik maddelerin diffüzyon ve sekresyonu

Tükürük iki ana tip protein sekresyonuna yol açar:

1. Pityalin (Alfa amilaz) içeren seröz bir salgı: Pityalin nişastaların sindirimi için gereklidir.

2. Müsin içeren müköz bir salgı: Kayganlaştırıcı ve yüzey koruyucu özelliklere sahiptir.

Tükürükteki solid maddeler içinde elektrolitler ve proteinler yer alır. Bu maddelerin bir çok görevleri vardır. Elektrolitlerden bikarbonat ve fosfat, fizyolojik pH için tamponlama sistemini oluştururken, proteinlerden

müsinler mukozal kayganlaştırma ve mikroorganizmaların agregasyonunu sağlarlar (Tablo 1) (24).

TABLO 1: Tükürükteki solid maddeler ve rolleri (Etkileri) (24)

ELEKTROLİTLER

Bikarbonat ve fosfat (Fizyolojik pH için tamponlama sistemi)

PROTEİNLER

Müsinler (Mukozal kayganlaştırma, mikroorganizmaların agregasyonu)

Prolin'den zengin proteinler (Dental koruma, kalsiyum bağlayıcı protein, mikroorganizmaların agregasyonu)

Histatinler (Antimikrobiyal)

s-IgA (Mikrobiyal adezyonun inhibisyonu)

Alfa-amilaz (Sindirim fonksiyonu, Karbonhidratların parçalanması)

Lizozim (Antimikrobiyal)

Lactoferrin (Antimikrobiyal)

Peroksidaz sistemi (Antimikrobiyal, H₂O₂'nin ayrıştırılması)

Epidermal growth faktör (Mukozal koruma, ülser iyileşmesi)

Tükürükteki solid ve sıvı maddeler, tükürük fonksiyonları üzerine etkilidirler. Örneğin sıvı içerik oral kavitenin temizlenmesine yardımcı olurken, solid içerik asit nötralizasyonunu sağlar (Tablo 2) (24).

TABLO 2: Tükürükteki solid ve sıvı maddelerin tükürük fonksiyonları ile ilişkisi (24)

SIVI

Oral kavitenin temizlenmesi

Yemeklerin ve tadılan bileşiklerin parçalanması/erimesi

Oral mukozayı kayganlaştırmak

Tat almayı kolaylaştırmak

Yutmayı kolaylaştırmak

Çiğnemeyi kolaylaştırmak

Konuşmayı kolaylaştırmak

SOLID

Dişleri korumak

Asit nötralizasyonu

Kalsiyum fosfat konsantrasyonunun saturasyonu

Oral mukozanın korunması

Mukozal örtü

Antimikrobiyal etki

Sindirim aktivitesi

Karbonhidrat ve lipidlerin ilk sindirimi

Tükürük oluşumu asinilerde başlarken, içeriği duktuslarda da bir miktar değişikliğe uğrar.

Tükürük salgısı primer sekresyon ve duktal sekresyonu içerir. Primer sekresyon asinüslerde olur. Plazmaya benzer elektrolit yapısı ve osmolalitesi vardır. Salgı tubullere ilerleyince, duktal hücrelerce değişikliğe uğrayarak hipotonik sıvı haline geçer.

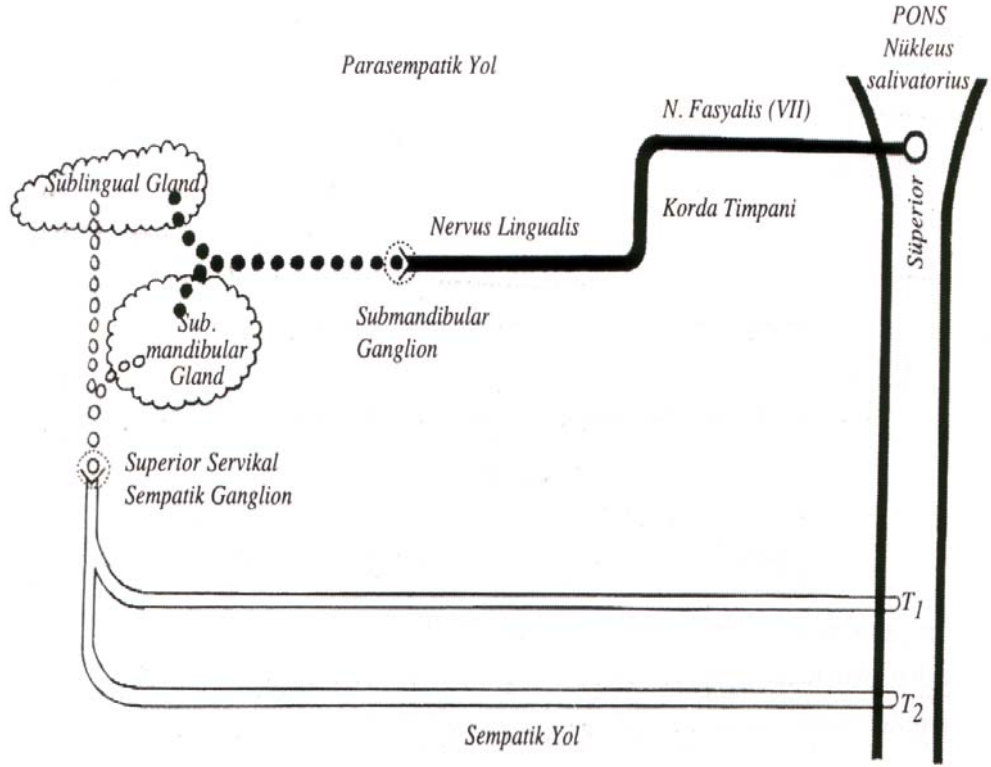
Sekretuar hücreler salgılarını ekzositoz yolu ile yaparlar. Bu genel olarak makromoleküllerin salgılanma yoludur. Asini plazma yapısına benzeyen primer salgıyı meydana getirir. Asiner salgılama elektrolitlerin aktif, suyun ise pasif transportuna bağlıdır. Asinüslerde enzimler, müsin ve diğer organik maddeler sentez ve ekskrete edilirler. Salgı daha distale

gittikçe yapısındaki elektrolitler, su ve organik maddeler değişir. Su ve elektrolitler rezorbe olur.

Bu alışverişte difüzyon ve aktif sekresyon gibi olaylar rol oynarlar. Salgı uyarıcıları asiner hücrelerin iyonlara karşı geçirgenliğini değiştirerek membran potansiyelinde değişiklik yaparlar. İki belirgin faktör hücre membran potansiyelinde değişiklik yapar. Bunlardan birisi, yüzey potansiyeli diğeri ise transmembranöz potansiyeldir. Hücre membranındaki fosfolipit, glikolipit ve glikoproteinler negatif yüzey potansiyelini; membran içi ve dışı arasındaki yük farkı ise transmembran potansiyelini oluşturur. Yüzey potansiyelinin transmembran potansiyele çok az katkısı vardır. Ancak uyarıların aksiyon potansiyeli oluşturmasını etkileyebilir. Asiner hücreler sodyum, potasyum ve klorun aktif transportu ile primer sekresyonu oluşturur. Otonom sinir sisteminin stimölasyonu ile hücreler hiperpolarize yani daha negatif olurlar. Primer salgının değişikliğe uğraması salgı akış hızına bağlıdır. Akış hızı fazla ise plazmaya göre daha hipotonik olan primer salgı oluşur. Duktal transportta sodyum yoğunluğunda azalma, potasyum yoğunluğunda artma olur. Salgı kanalları ile çevresinde yer alan vasküler yatak arasında su ve elektrolit alışverişi olur. Sodyum ve potasyum iyonları her iki yönde hareket edebilirse de sodyum salğıya karışır. Potasyum, sodyumun kanala girişinden daha hızlı olarak kana reabsorbe olur (14,25).

Tükürük bezlerinin fonksiyonu otonom sinir sisteminin kontrolü altındadır. Sempatik ve parasempatik uyarılar salğıya neden olurlar. Ancak parasempatik sinirlerin etkisi daha fazladır. Sempatik etki ortadan kalktığında fonksiyona etki azdır veya hiç değişiklik olmaz. Parasempatik etki ortadan kalkarsa gland atrofiye gider. Esas olarak tükürük oluşumu parasempatik uyarımla olur. Parasempatik aktivite hücre membranına etki yapan asetilkoline bağlıdır. Sempatik aktivite ise noradrenaline bağlıdır. Submandibüler glandda, sempatik uyarı damarları daraltıp (vazomotor) tükürük salgısında azalmaya yol açarken; parasempatik uyarı vazodilatasyon ve sekresyon yaptırıcı (sekretomotor) etkiye neden olur.

Submandibüler glandın parasempatik lifleri ponsdaki üst tükürük merkezinden (Nükleus salivatorius süperior) gelir. N. intermedius, chorda timpani ve lingual sinir yolu ile submandibüler gangliyonuna ulaşır. Bu gangliyon submandibüler beze bitişiktir ve lifleri submandibüler beze gider (14,26).



Şekil 6: Submandibüler ve sublingual bezin sempatik ve parasempatik inervasyonu (14).

Tükürük salgı hızı ve kimyasal yapısı, şu lokal ve sistemik nedenlere bağlı olarak değişiklik gösterir (14):

1. Yaş,cinsiyet
2. Uyku
3. Diyet
4. Dehidratasyon
5. Emosyonel etkenler
6. Enfeksiyon hastalıkları
7. Sinir sistemi hastalıkları
8. Kullanılan ilaçlar
9. Uyaranların cinsi ve uygulanış şekli

Tükürükte Bulunan Proteinler (14,24)

1. Albumin
2. Globulin, İmmünglobulin A
3. Enzimler (Alfa amilaz, peroksidaz, lizozim, fosfataz, hidrolaz, dehidrogenaz, esteraz, arginaz)
4. Glikoproteinler (Kan grubu-reaktif maddeleri)
5. Proline içeren proteinler
6. Histidine içeren proteinler
7. Aminoasitler
8. Polipeptidler

Submandibüler Glanddan Salgılanan Polipeptidler (14)

1. Renin
2. Kalikrein
3. Peptidazlar
4. Sinir büyüme faktörü
5. Mezodermal büyüme faktörü
6. Epidermal büyüme faktörü
7. Eritropoetin
8. Glukagon ve Glukagona benzer maddeler
9. Angiotensin II
10. Lenfoid faktör
11. Gastrin
12. Somatostatin

Tükürüğün Görevleri (14,24)

1. Sindirimde rol oynar
2. Lokmanın oluşmasına etkilidir
3. Tad almada rol oynar
4. Konuşmaya yardımcıdır
5. Su regülasyonunda rol oynar
6. Antiseptik özelliği vardır

7. Oral flora ve dişler üzerine etkilidir
8. Hormonal etkisi mevcuttur
9. Boşaltım fonksiyonu vardır

2.6. 5-FLUOROURASİL (5-FU)

Florlanmış bir primidin analogudur (27,28,29). Bazı tümör türlerinde hücrelerin, primidin bazı olan urasil'i normal vücut hücrelerine göre daha fazla kullandığının gözlenmesi üzerine sentez edilmiş bir ilaçtır. Vücutta önce fluorouridilata ve daha sonra bir dezoksinukleotid olan flourodezoksiuridilata (5-fluoro-2'-dezoksiüridin 5'-monofosfat) yani FdUMP'ye dönüştürüldükten sonra etkinlik kazanır (30). Bu aktif metabolit, folatlı kofaktör olan N⁵⁻¹⁰ metilentetrahidrofolat ile birlikte timidilat sentaz ile birleşerek üçlü kompleks yapar ve timidilat sentaz enzimini inhibe eder.

Timidilat sentaz, Uridilat(dUMP)+CH₃-→Timidilat(dTMP) reaksiyonunu katalize eder.

Timidilat (timin'in dezoksiribotid'i) oluşması azalınca, hücrede timin sentezi bozulmuş olur ve DNA sentezi duraklar. Fluorourasil, ikincil bir mekanizma ile de sitotoksik etki yapar. Fluorourasil'den vucutta oluşan fluorouridilat (FUMP), RNA yapısına katılır ve böylece RNA fonksiyonlarını ve protein sentezini bozar (31,32). 5-FU'nun en önemli antitümör etkisi timidilat sentazın inhibisyonu şeklinde açıklanabilir (33).

5-FU hücre siklusundaki S fazına etkilidir. Bu nedenle çoğalan hücreler üzerinde, istirahat halindekiere göre daha fazla sitotoksik etki yapar; fakat döneme-özü olma özelliği diğer antimetabolit ilaçları kadar belirgin değildir (34).

5-FU' nun vücutta dağılımı iyidir; beyine ve BOS'a geçer. Mide-barsak kanalından biyoyarlanımı %0-80 arasında değişkenlik gösterir ve tahmin edilemez (35). Önemli ölçüde ilk-geçiş eliminasyonuna uğrar. Karaciğerdeki metabolizması doyurulduğundan büyük dozlarda biyoyarlanımı artar. 5-FU başta karaciğerde olmak üzere bir çok dokuda metabolize olur. Oral biyoyarlanımının değişkenliği nedeni ile ağız yolundan ziyade, İV enjeksiyon veya enfüzyon şeklinde uygulanır.

Eliminasyon yarılanma ömrü 0,3 saattir. 5-FU karaciğer, barsak mukozası, tümör hücreleri ve diğer dokularda dihidroprimidin dehidrogenaz ile inaktive edilir. Bu enzimin kalıtsal eksikliğinde ilaca ileri derecede sensitivite gelişir. Bu ender durumda hasta takip eden dozlarda önemli bir ilaç toksisitesi yaşayabilir (34).

Mutad dozu günde 500 mg/m²'dir; IV injeksiyonla veya devamlı infüzyonla 5 gün verilir. Yüksek dozda (günde 800-1200 mg/m²) 5 gün boyunca devamlı IV infüzyonla verilebilir. Beş günlük uygulamalar 3-4 haftada bir tekrarlanır. Yüksek dozda verildiğinde birlikte kalsiyum folinat (ağızdan 4 saatte bir 100 mg/ m² 5 gün) verilir (36).

Fluorourasil, solid tümörlerin tedavisinde endikedir. Yaygın kolorektal kanser ve meme kanserinin adjuvant tedavisinde tek başına kullanılabilir. Ayrıca over, mesane, uterus serviksi, endometriyum, prostat, baş ve boyun, pankreas ve karaciğer kanserinin tedavisinde yararlı olabilir (30,35). Cildin bazal hücreli kanserinde ve baş-boyun bölgesindeki aktinik keratozlarda % 2 veya 5 oranında ilaç içeren merhem şeklinde lokal uygulanır. Yine şiddetli psöriyaziste etkilidir.

5-FU potent bir radyasyon duyarlaştırıcısıdır. Bu yüzden lokal ilerlemiş baş-boyun, özefagus, akciğer ve rektum tümörlerinin primer tedavisi için radyoterapi ile eş zamanlı olarak kullanılabilir (34,36).

5-FU' nun başlıca yan etkileri gastrointestinal bozukluklar ve kemik iliği depresyonudur. Anoreksi, bulantı ve kusma en sık görülenidir. 5-FU' nun tedavi sırasındaki toksisitesinin en erken semptomları da anoreksi ve bulantıdır. Mukozitler (stomatit, özefagofarenjit ve diyare), doz kısıtlayıcı yan tesirlerdir. Belirgin lökopeni yapabilir; trombositopeni genellikle belirgin olmaz. Lökopeni genellikle ilk enjeksiyondan 9-14 gün sonra olur. İntravenöz infüzyona başladıktan 48-72 saat sonra tehlikeli derecede koroner spazmına neden olabilir; bu etki kalsiyum antagonistleri ile düzeltilebilir. Yine kardiyotoksite 5-FU' nun nadir ancak ciddi bir komplikasyonudur. Alopesi, onkolizis, dermatit, pigmentasyon gibi cilt toksisitesi belirtilerine neden olabilir. Somnolans, serebellar ataksi ve yukarı motor nöron belirtileri gibi nörotoksik yan etkileri ve epifora, blefarit,

konjonktivit, skatrisyel ektropion, nazolakrimal kanal stenozu gibi oküler toksisite belirtilerine neden olabildiği bildirilmiştir (27,34,36).

2.6.1 KEMOTERAPİNİN TÜKÜRÜK SEKRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Ağız içinde kolaylıkla hasara yol açabilecek patojen bakteriler vardır. Tükürük bu zararlı patojenleri çeşitli yollarla önler. Örneğin, tükürük salgısı hem bakterileri hem de metabolik destekleri olan gıda artıklarını sürükleyerek uzaklaştırır. İkinci bir yol, tükürüğün bakterileri tahrip eden tiyoiyanat ve lizozim isimli faktörlerle bakterisit etki göstermesidir. Üçüncüsü ise yapısındaki önemli miktardaki protein antikorlarla bakterileri tahrip etmesidir (14,37).

Kemoterapi alan hastalarda tedavi sırasında ve sonrasında diş çürüğü riski artabilmektedir (38). Bazı çalışmalar kemoterapiyi takiben düşük tükürük akımı (39), azalmış tükürük pH ve tamponlama kapasitesi (40), artmış karyojenik bakteri miktarını (41) göstermişlerdir. Bu grup hastalarda diş çürüğü gelişme şansı yükselmiştir.

Kemoterapi alan hastalarda, stimüle edilmemiş tükürük pH'sında azalmayla birlikte Strep. Mutans ve Laktobasillus sayısında artış bulunmuştur. Kanser tedavisi nedeni ile bozulmuş gland fonksiyonu ve özellikle Ig-A ile ilişkili siyalokimyasal değişiklikler, oral kavitede fırsatçı enfeksiyon riskini artırmaktadır (41). Kemoterapi sırasında, tükürük akım hızında azalmayla birlikte tükürükteki mikroorganizmaların konsantrasyonu ikiye katlanır ve bu sırada yüksek oranlarda akut oral enfeksiyonlar oluşur (42). Kemoterapi özellikle şiddetli immünsüpresyon döneminde lokalize ve hızlı ilerleyen periodontal hastalıklara yol açar (43).

2.7 MUKOZİT VE KSEROSTOMİ

Antineoplastik ilaçlarla ortaya çıkan mukozit önemli, doz kısıtlayıcı ve maliyeti yüksek bir yan etkidir. Stomatotoksik kemoterapinin neden olduğu ülseratif lezyonlar ağrılı olup oral beslenmeyi bozar ve endojen oral floranın sekonder enfeksiyonlarına yol açar. Bu tablo kemik iliği transplantı

olanlarda, meme ve kolon kanseri için devamlı enfüzyon tedavisi alanlarda ve baş boyun kanseri nedeniyle kemoterapi alanlarda daha sık görülür (44). Morbidite ve mortalite üzerinde önemli etkileri olan mukozitler özellikle genç yaştaki olgularda daha sık görülür. Eş zamanlı radyoterapi, kemoterapinin stomatotoksik potansiyelini arttırır.

Mukozit dört safha gösteren bir biyolojik olaydır. İlk faz enflamatuvar/vasküler fazdır; ikinci faz epitelyal faz, üçüncü faz ülseratif/bakteriyolojik faz olup, iyileşme ile biter. Her safha birbirinden bağımsız olup, sitokinler ve kemoteröpötik ajanın direkt epitele etkisi, oral bakteriyel floranın ve hastanın kemik iliğinin durumu ile yakından ilişkili bir tablodur. 5-FU, metotreksat ve sitarabin gibi S fazını etkileyen antimetabolitler diğer nonspesifik ilaçlara göre daha stomatotoksikdir.

Tükürük bezi fizyolojisinin bozulmadan tükürük salgısının devamlılığının sağlanmasının, oral sağlığın korunmasındaki önemi açıktır. Ancak bu tür olgularda mukozite duyarlılığı etkileyen şartların multifaktöriyel olduğu ve çok iyi anlaşılmadığı bir gerçektir.

Kserostomi, apityalizm yada kuru ağız sendromu olarak bilinir. Kserostomi için kriter 0.1 ml/dk'nın altında bir istirahat tükürük salgı hızı veya 0.2 ml/dk'nın altında bir salgı hızına ek olarak kuru ağız semptomlarının varlığıdır (45). Etyolojisinde değişik bir çok etken suçlanabilir.

Tükürük salgısını etkileyen olaylar; endokrin hastalıklar, metabolik hastalıklar, glanduler atrofi, ilaçlar, dehidratasyon, psikolojik bozukluklar, tükürük taşları, Bell paralizi ve Sjögren sendromudur (Tablo 3) (14).

Kserostomiye sebep olan ilaçlar ise atropin sülfat, talastin hidroklorid, isoprenalin sülfat, barbütal, heksobarbital, methakualon, klorpromazin hidroklorid, diazepam, klonidin hidroklorid, pargilin hidroklorid, kloramfenikol, tiazid, metil dopa, nikotin, kokain, 5-FU' dur (Tablo 4) (14).

TABLO 3: Tükürük salgısını etkileyen hastalıklar (14)

1. Endokrin hastalıklar

Aldosteronizm

Cushing sendromu

Addison hastalığı

2. Metabolik hastalıklar

Alkolizm

Diabetes Mellitus

Kistik fibrozis

3. Glanduler atrofi

Radyoterapi

Kemoterapi

Kronik enflamasyon

4. İlaçlar

Kokain

Reserpin

Skopolamin

Antihistaminikler

Antiparkinson ilaçlar

Antidepresan ilaçlar

Antineoplastik ajanlar

5. Dehidratasyon

Ateş, şok

Diyare, kanama

Böbrek, kalp yetmezliği

Enfeksiyon hastalıkları

6. Psikolojik bozukluklar

Anksiyete

Erken psikoz

7. Tükürük taşları

8. Bell paralizi

9. Sjögren sendromu

TABLO 4: Kserostomiye sebep olan ilaçlar (14)

Atropin sülfat
Talastin hidroklorid
İsoprenalin sülfat
Barbütal
Heksobarbital
Methakualon
Klorpromazin hidroklorid
Diazepam
Klonidin hidroklorid
Pargilin hidroklorid
Kloramfenikol
Tiazid
Metil dopa
Nikotin
Kokain
5-FU

Kserostomili hastalarda oral mukoza önemli ölçüde kuru, üzeri yapışkan ve oldukça ince bir mukus tabakasıyla örtülü olup, ileri derecede hiperemik ve atrofiktir.

Dilin görünümü de aynı olup, yüzey epiteli yarıklıdır. Hastalar ağız kuruluşundan, yanma hissinden, tat alamamaktan, yutma ve konuşmada zorlandıklarından yakınır (46).

Kserostomi ağız mukozasının çabuk enfekte olmasına yol açar. Bu nedenle akut stomatitlere ve oral kandidiyazise sık rastlanır. Ayrıca diş çürükleri, periodontitler ve fetor oris, kserostomili hastalarda oldukça sık görülen patolojilerdir. Konuşma ve uyku paterni de bozulabilir (46,47).

Şiddetli kserostomisi olan hastalarda beslenme bozulduğu için performans ve sosyal aktivasyonları ile birlikte hayat kalitesi ciddi şekilde düşer.

Kserostomi tedavisinde ağız ıslatıcıları, yapay tükürük maddeleri ve tat stimülanları kullanılabilir. Bunlar semptomların kısa süreli olarak giderilmesine imkan tanır. Özellikle postradyasyon kserostomisinin tedavisinde muskarinik reseptör agonisti olan pilokarpin kullanılır (48,49).

2.8. APOPTOZİS

Apoptozis, her ne kadar bazı yönlerden nekroza özgü özellikleri taşıyorsa da, nekrozdaki ayırt edilmesi gereken farklı ve önemli bir ölüm şeklidir. Apoptozis nekrotik hücre ölümünde oluşan hücresel cinayetten ziyade hücresel bir intihar yoludur (50). Apoptozis bir çok önemli fizyolojik ve patolojik olayda programlanmış hücre ölümünden sorumludur. Apoptozise örnekler şöyle sıralanabilir:

1. İmplantasyon, organogenezis ve gelişimsel involüsyonda olduğu gibi embriyogenezis süresince hücrelerin programlanmış yıkımı

2. Menstrüel siklus süresince endometriumda veya süttten kesildikten sonra memede olduğu gibi hormona bağımlı fizyolojik involüsyonlar ya da kastrasyondan sonra prostatta olduğu gibi patolojik atrofi

3. Barsak kript epiteli gibi çoğalan hücrelerde hücre delesyonları veya tümörlerde hücre ölümü

4. Timusta otoreaktif T hücre delesyonları, sitokin starvasyonlu lenfositlerin hücre ölümü veya sitotoksik T hücreler tarafından oluşturulan hücre ölümüdür.

5. Onarılamayan DNA hasarına neden olan çeşitli hafif zedeleyici uyarıların (ısı, radyasyon, sitotoksik kanser ilaçları gibi) hücre intihar yollarını tetikler.

Hücrelerin fizyolojik apoptozise girmelerindeki yetersizlik aberan gelişime, tümör proliferasyonunun engellenememesine veya otoimmün hastalıklara neden olabilir.

Apoptozis mekanizmaları: Apoptozisin temelindeki mekanizmalar halen yapılan birçok araştırmanın konusudur. Temel olay 4 ayrı ancak birbiriyle örtüşen safhaya ayrılabilir:

1.Sinyalleşme: Apoptozis iç kaynaklı programlanmış olaylardan, büyüme faktörü yokluğu, özgül reseptör-ligand etkileşimleri, sitotoksik T hücrelerinden granzimlerin (sitotoksik T hücrelerin lizozom benzeri granüllerinde bulunan solubl mediatörler) salınması veya seçme zedeleyici ajanlara kadar sıralanan çeşitli sinyaller ile tetiklenebilir. Zardan geçen sinyaller ya daha önceden var olan ölüm programlarını önler veya ölüm dizisini başlatır. Ölüm dizisini başlatanlardan en önemlileri, plazma membran moleküllerinin tümör nekroz faktör reseptör ailesine ait olanlardır. Bu plazma membran reseptörleri, bir hücre içi ölüm bölgesi protein dizisini başlatır. Bu reseptörler oligomerize olduğu zaman başlatıcı kaspazların aktivasyonuna ve ölümle sonlanan enzim dizilerinin gelişimine yol açar.

2. Kontrol ve entegrasyon: Orijinal ölüm sinyallerini infaz programına bağlayan özgül proteinlerle gerçekleştirilir. Bu proteinler etkilerinin potansiyel öldürücü sinyallerin ya kesinleşmesi veya başarısızlıkla sonlanabilmesi nedeniyle önemlidir. Bu safhada iki ana yol vardır: 1. Ölüm sinyallerinin spesifik adaptör proteinler ile infaz mekanizmalarına direkt iletimi; 2. Mitokondrial permabilitenin BCL-2 protein familyasının üyeleri ile düzenlenmesi. İçteki mitokondrial membranda deliklerin oluşumu membran potansiyelinin azalması ile birlikte ATP üretiminin azalması ve mitokondrial şişmeye; dıştaki mitokondrial membranın permabilitesinin artması apoptotik tetik, sitokrom c'nin sitozol içine salınmasına neden olur. Serbestleşen sitokrom c'nin bazı sitoplazmik proteinleri aktive ettiği, hücreyi öldüren infazcı kaspaz aktivasyonunu tetiklediği ve proteolitik olayların gelişimini hazırladığı düşünülmektedir. BCL-2 mitokondriyal membranda bulunur. BCL-2 apoptozisi ve mitokondriyal permabilite artışını engeller, ve APAF-1 gibi proteinleri sabitleyerek engeller ve böylece kaspaz aktivasyonu oluşmaz. BCL-2 familyasının diğer üyeleri BCL-2'ye bağlanır ve onun antiapoptozis etkisini hafifletir; böylece BCL-XL

apoptozisi inhibe ederken, BAX ve BAD programlanmış hücre ölümünü artırır.

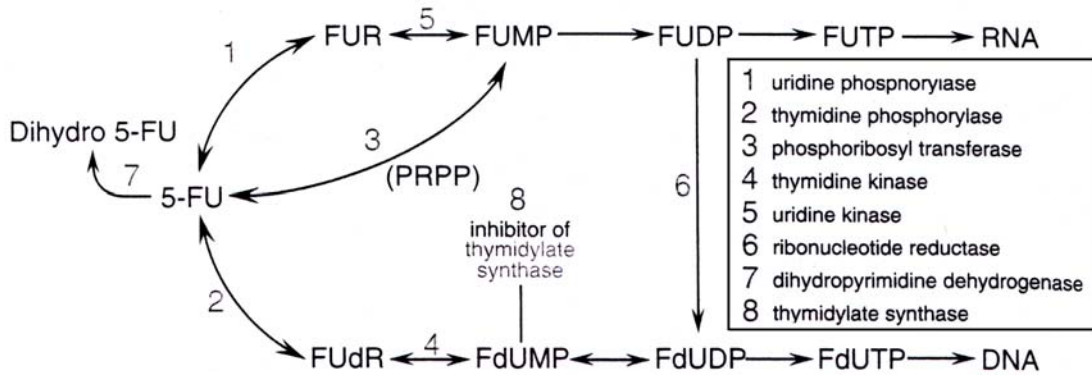
3. İnfaz: Apoptozisin bu yolu birtakım sitoplazmik katabolik enzimlerin sentezi ve/veya aktivasyonu sonucu oluşan farklı biyokimyasal olaylarla karakterlidir. Son infaz yolları apoptozisin bütün şekillerinde genel olarak izlenebilen ortak bölümler gösterir.

A- Kaspaz olarak adlandırılan bir proteaz sınıfı ile protein yarıklanması: Bu tarz adlandırma aktif bir sistein yerine sahip olmalarından ve aspartik asit artıklarından sonra yarılmalarından dolayıdır. Deneysel çalışmalarda, kaspazların herhangi birinin aşırı varlığının hücresel apoptozise neden olduğunu gösterilmiş ve bu nedenle de bunların sıkıca kontrol edilmesi gerektiğini ileri sürülmüştür. Bu gibi bir veya daha fazla kaspaz enzim aktivasyonunun kaçınılmaz olarak hücre intiharı ile sonlanacak olan diğer proteazların aktivasyonuna yol açtığı varsayılır.

B- Transglutaminaz aktivasyonu ile yaygın protein çapraz bağlanması: Eriyebilir sitoplazmik proteinleri ve özellikle hücre iskeleti proteinlerine kovalent bağla bağlanarak, kolaylıkla apoptozise gidebilen yoğunlaşmış kabuk şekline değiştirir.

C- Ca^{++} ve Mg^{++} -bağımlı endonükleazların etkisi ile 180 ile 200 bazlı çift parçalar şeklinde DNA yıkımı: Bu olay argoz jel elektroforezinde farklı boyutlu parçalara ayrılan karakteristik DNA'nın merdivenleşmesi şeklinde görülebilir. Bu yapı çoğunlukla nekrotik hücrelerde tipik olarak izlenen rastgele DNA parçalanmasından ayırt edilebilir. Merdivenleşmenin aynı zamanda nekrozun erken safhalarında da görülebileceği dikkate alınmalıdır. Bu nedenle, her ne kadar apoptozis için faydalı bir belirleyici ise de, DNA merdivenleşmesi programlanmış hücre ölümü için tanısal değildir.

4. Ölü Hücrelerin ortadan kaldırılması: Apoptotik hücreler ve bunların parçalarının yüzeylerinde komşu hücreler veya fagositler tarafından alınmalarını ve elden çıkarılmalarını kolaylaştıran belirleyici moleküller vardır. Bu apoptotik hücrelerin iç sitoplazmik yüzünden dış yüze doğru fosfotidilserinin çevrilmesiyle olur. Bu ve diğer değişiklikler öncül



Şekil 8: 5-FU'in aktivasyon yolları (34)

Azuma ve arkadaşları, tükürük bezi kanser hücrelerindeki 5-FU'nun indüklediği apoptozis mekanizmalarını incelemişlerdir (52). Aynı yazarları bu mekanizmalara ek olarak 5-FU'nun kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği yeni bir yolak bildirmişlerdir. NF- κ B proliferasyonda olduğu gibi enflamatuar ve immün cevaplarla ilgili düzenleyici genlerde önemli rol oynar. Stimüle edilmemiş şartlarda NF- κ B sitoplazmada IKB- α adlı inhibitör bir proteine bağlı olarak bulunur. Bu inhibitör proteinin NF- κ B'ye bağlanması, NF- κ B'nin nükleer lokalizasyon sinyallerini maskeler ve nükleusa translokasyonu engellenmiş olur. Aksine dış stimülasyon ile IKB- α fosforla bağlanırsa degradasyona uğrar. Böylelikle IKB- α 'nın degradasyonu NF- κ B'nin hedef genlerinin ekspresyonunu stimüle etmek üzere nükleer translokasyona yol açar. Burada 5-FU, kanser hücrelerinde IKB- α 'nın degradasyonunu önler böylece NF- κ B aktivitesini süprese eder. Bu da antiapoptotik proteinler olan TRAF-2 ve cIAP-1'in inaktivasyonuna yol açar. Bu olayı takiben kaspaz 8 ve kaspaz 3 aktivitesi artar ve böylece apoptotik süreç başlamış olur (52,53,54).

2.8.1.APOPTOZİS SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Bu yöntemler

- 1- Morfolojik değişiklikler
- 2- DNA fragmantasyonu
- 3- Kaspaz aktivasyonu
- 4- Hücre membran değişiklikleridir.

DNA fragmantasyon yöntemlerinden biri de TUNEL yöntemidir.

2.8.1.1. TUNEL

TUNEL, “Terminal deoxynucleotidyl transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling” kelimelerinin kısaltmasıdır. Apoptotik hücelere ait DNA’lar hızla parçalanmakta olduklarından birdenbire hücre içerisinde kromatin ağ bütünlüğünü kaybeder ve 3’-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede terminal deoxynucleotidyl transferase enzimi ortama eklenen biotin-dUTP’yi parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3’-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelirler. Bu yöntem tek tek hücrelerde in situ apoptozisi gösterebildiği için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir (55).

2.9. HÜCRE REJENERASYONU VE PCNA (PROLİFERATİVE CELL NUCLEAR ANTİGEN)

PCNA, aynı zamanda siklin olarak bilinmektedir. DNA polimerazın 36kD’luk delta subüniti olan PCNA, hücre proliferasyonunda G1 fazından M fazına kadar bulunur ve S fazında pik yapar. Bu antijen immunohistokimyasal, in situ ve flow sitometrik yöntemler ile saptanabilir. Bu antikor hücre proliferasyonunu gösteren bir belirteçtir (56).

MATERYAL VE METOD

DOKU ÖRNEKLERİ

Bu çalışmada ağırlıkları 1800 gram ile 2200 gram arasında değişen 30 adet beyaz, sağlıklı Yeni Zelanda tipi tavşan kullanılmıştır. Çalışma süresince denek hayvanlar, 3'erli gruplar halinde 15 metrekarelik gündüz ışığı ve gece lambası ile aydınlatılmış kapalı bir balkon sisteminde gözetim altında tutuldu. Ortam ısı 22±3 derece olacak şekilde düzenlendi ve uygun beslenme sağlandı. Yeşil sebzeler, havuç ve su başlıca besin kaynağı olarak verildi. Çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulundan onay alındı. Cerrahi girişim yapılacak tüm tavşanlara 25 mg/kg dozunda İM ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı Parke-Davis, İstanbul,Türkiye) ve 5 mg/kg dozunda İM Xylazine HCl (Alfazyne®, Alfasan International B.V. Woerden, Hollanda) ile anestezi uygulandı. Tüm tavşanlara cerrahi girişim olarak submandibüler gland eksizyonu yapıldı.

Her bir grupta 10 adet tavşan olacak şekilde 3 gruba ayrılan tavşanlardan birinci gruptakilere herhangi bir ilaç uygulanmadı. Bu kontrol grubu tavşanlarda anestezi altında bilateral submandibüler gland eksizyonu yapıldı (Tablo 5).

İkinci gruptaki tavşanlara 5 gün süreyle günde 4mg/kg'dan 5-FU (5-FU®, Choongwae Pharma Corporation Seoul,Korea) İM olarak uygulandı. Daha sonraki 5 gün boyunca herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. 11. gün anestezi altında bilateral submandibüler gland eksizyonu yapıldı.

Üçüncü gruptaki tavşanlara 5 gün süreyle günde 4mg/kg'dan 5-FU İM olarak uygulandı. Daha sonraki 5 gün ilaç uygulanmadı. 11. günden itibaren 5 gün daha 5-FU İM olarak uygulandı. 16. gün anestezi altında bilateral submandibüler gland eksizyonu yapıldı.

Tablo 5: Çalışma grubundaki tavşanlarda yapılan uygulamalar

GRUP	TAVŞAN SAYISI (ADET)	İLAÇ UYGULAMA PROTOKOLÜ	SUBMANDİBÜLER GLAND EKŞİZYON GÜNÜ
1 (Kontrol)	10	-	5. gün
2	10	4mg/kg/gün-5 gün	11. gün
3	10	4mg/kg/gün-5+5 gün	16. gün

Deney hayvanlarının sağ ve sol tükürük bezlerine ait materyallerden 2'şer doku örneklendi. Örneklenen dokular tamponlu formol solüsyonu ile 24 saat tespit edildikten sonra rutin doku takibi prosesi uygulandı. Parafine gömülen dokulardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen eosin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Dokularda mikroskopik olarak asinüs hücrelerinde sitoplazmik granüllerde irileşme ve düzensizleşme, enflamatuar hücre infiltrasyonu ve fibrozis varlığı değerlendirildi.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Poly-L-lisinli lamlara alınan kesitlerde hücre proliferasyonunu değerlendirmek için immünohistokimyasal boyama aşağıdaki şekilde uygulandı. Kesitler;

1. Deparafinizasyon ve dehidratasyon aşamasından geçirildi.
2. pH 6.0 olan sitrat tampon içerisinde mikrodalga fırında 90 watt güçte 2 kez 10'ar dakika kaynatıldı.
3. Tris buffer (İng: Tris buffered Saline) ile yıkandı.
4. Endojen peroksit aktivitesini gidermek için %1'lik H₂O₂ ile 5 dakika inkübe edildi.
5. Tris buffer ile yıkandı.

6. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için PCNA antikoru (1:200 dilüsyon, Neomarkers, ABD) ile 30 dakika inkübe edildi.
7. Tris buffer ile yıkandı.
8. Biotinlenmiş horseradish peroksidaz (Labvision, ABD) solüsyonunda 10 dakika inkübe edildi.
9. Tris buffer ile yıkandı.
10. Kromojen olarak 3-amino-9-ethylcarbazole solüsyonunda boyanma yoğunluğu kontrol edilerek 5-15 dakika bekletildi.
11. Distile sudan geçirildi.
12. Zıt boyama olarak Mayers hematoksilen (10 dakika) kullanıldı.
13. Distile suda yıkandı.
14. Kurutularak montajlandı.

Boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Her bir kesitte asinüslere ve duktuslara ait 500 hücre sayıldı ve PCNA antikoru ile pozitif boyanma gösteren nükleuslar kaydedildi. Her bir gruba ait pozitif hücre sayıları toplandı ve grup ortalamaları bulundu. Grup ortalamaları istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

APOPTOZİS İÇİN TUNEL BOYAMA

Dokularda apoptozise giden hücrelerin saptanmasında TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling) tekniği kullanıldı. Bu boyama prosedürü için 2 µm kalınlığındaki doku kesitleri poly-L-lisinli lamlara alındı. Boyama prosedürü Roche-Applied-Science (Cat no: 1 684 817) tarafından üretilen kitin kullanım kılavuzunda yazıldığı şekilde uygulandı. Ancak optimum boyanmanın elde edilebilmesi amacıyla bazı modifikasyonlara gidildi.

1. Kesitlere deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemleri uygulandı.
2. PBS (İng. Phosphate Buffered Saline) solüsyonu ile yıkandı.
3. % 0.1'lik tripsin ile 37⁰C de 10 dk inkübe edildi.
4. Mikrodalga fırında 350W ısıda 2 kez 10 dakika kaynatıldı.

5. PBS solüsyonu ile yıkandı.
6. 50 µl TUNEL mixture solüsyonunda 37⁰C de karanlıkta 60 dakika nemli ortamda bekletildi.
7. PBS solüsyonu ile yıkandı.
8. 50 µl converter-POD (İng: Peroxidase) solüsyonunda nemli ortam içerisinde 37⁰C de 2 saat inkübe edildi.
9. PBS solüsyonu ile yıkandı.
10. 50-100 µl diaminobenzidine solüsyonunda 15-25 dakika 10 dakika inkübe edildi.
11. PBS solüsyonu ile yıkandı.
12. Methyl gren ile oda ısısında 5 dakika bekletilerek zıt boyama yapıldı.
13. Distile su ile yıkandı.
14. Kesitler kurutuldu ve gliserin ile montaj yapıldı.

APOPTOTİK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Her bir kesit için ışık mikroskopisinde 400 büyük büyütme ile 10 farklı alanda diaminobenzidine kromojen ile kahverenkli boyanma gösteren asiner ve duktal apoptotik hücreler sayıldı. 10 farklı mikroskopi alanında sayılan apoptotik hücre sayıları toplandı. Her bir tükrük bezi için bulunan asiner ve duktal apoptotik hücre sayılarının grup ortalaması alındı ve grup apoptotik hücre sayılarının ortalamaları karşılaştırıldı.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

HE boyama yöntemi ile elde edilen sonuçları karşılaştırırken ki-kare testi kullanılmıştır. PCNA ve TUNEL boyama yöntemleri ile elde edilen sonuçları karşılaştırırken ise Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

BULGULAR

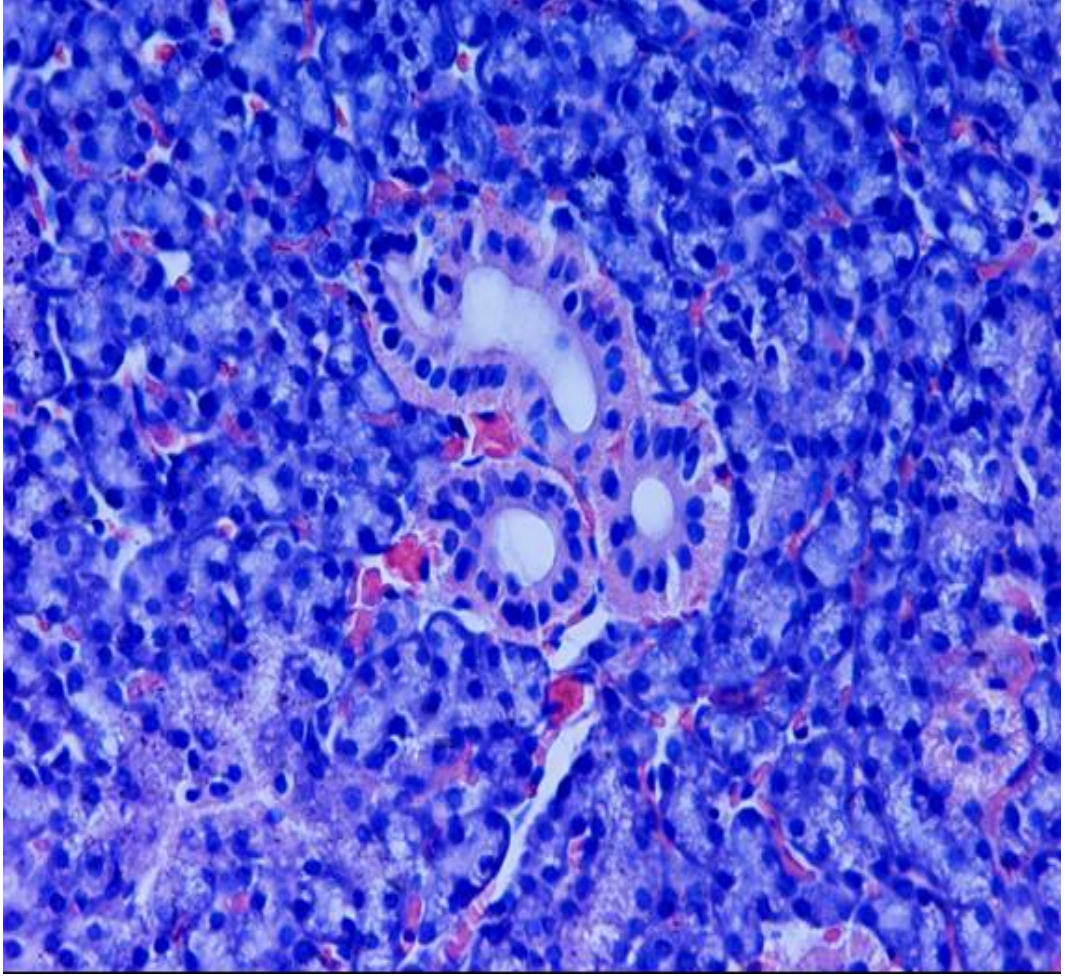
Her üç gruptaki tavşanlardan eksize edilen submandibüler glandların histopatolojik değerlendirmesinde HE ile boyamada enflamatuvar hücre artışı ve fibrozis görülmedi. Asinüs hücre sitoplazmalarında granüler değişikliğe grup 1 (kontrol)'de rastlanmadı (Şekil 9,10). Grup 2 ve 3' de ise granüler değişiklik 5'er tavşanda (%50 oranında) saptandı (Şekil 11) . Kontrol grubu ile diğer iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ($p<0.05$), 5-FU uygulanan her iki grup arasında ise herhangi bir anlamlı fark izlenmedi ($p>0.05$).

TUNEL boyama yöntemiyle grupların histopatolojik değerlendirilmesinde submandibüler gland asiner hücrelerindeki apoptozis grup 3' de daha yüksek oranda bulundu (Şekil 12). Grup 3 ile diğer iki grup arasında apoptozis oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ($p<0.05$), kontrol grubu ile grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

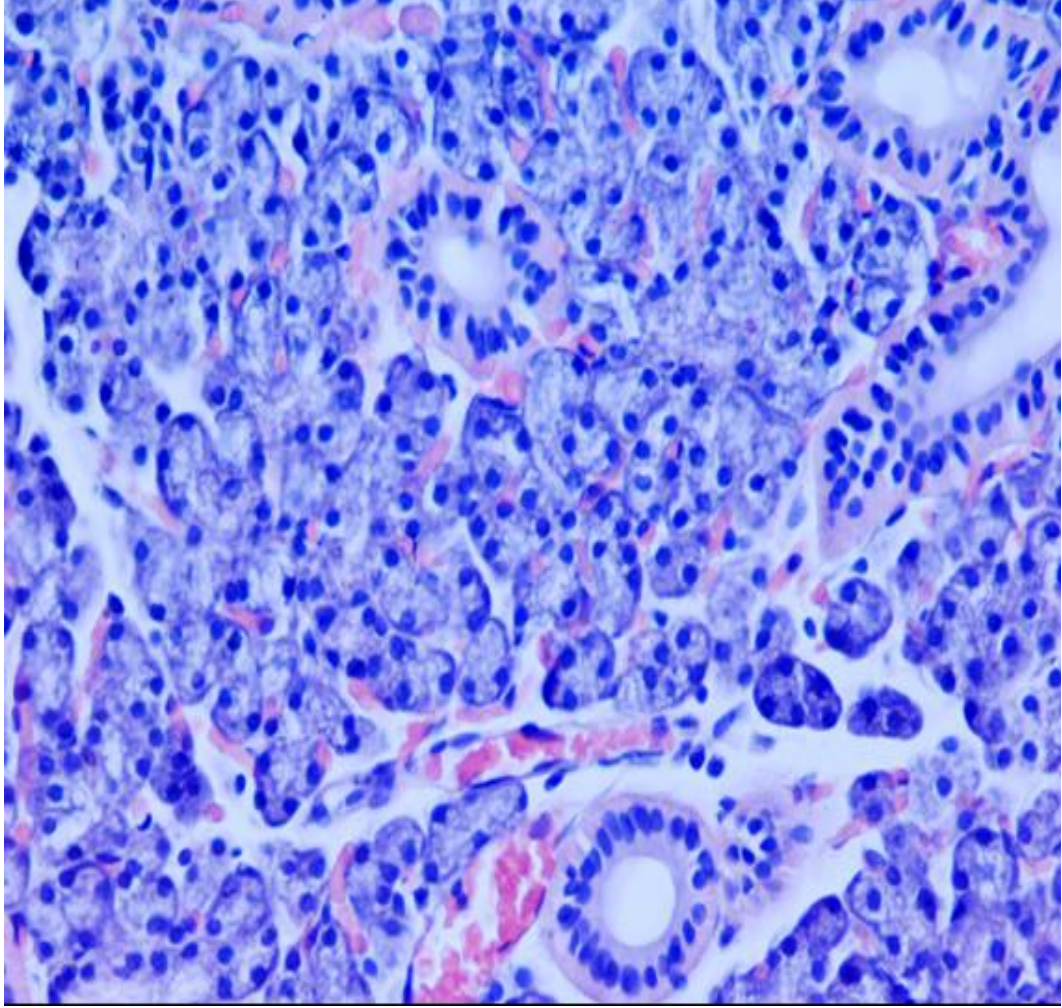
Yine TUNEL boyama yöntemiyle grupların histopatolojik değerlendirilmesinde submandibüler gland duktal hücrelerdeki apoptozis yine grup 3' de daha yüksek oranda bulundu (Şekil 13). Grup 3 ile diğer iki grup arasında apoptozis oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ($p<0.05$), kontrol grubu ile grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

PCNA boyamada tüm gruplardaki asiner hücrelerde hücre proliferasyonuna rastlanılmadı. Ancak duktal hücrelerdeki hücre proliferasyonu açısından, grup 3 ile diğer iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken ($p<0.05$) (Şekil 14), kontrol grubu ile grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

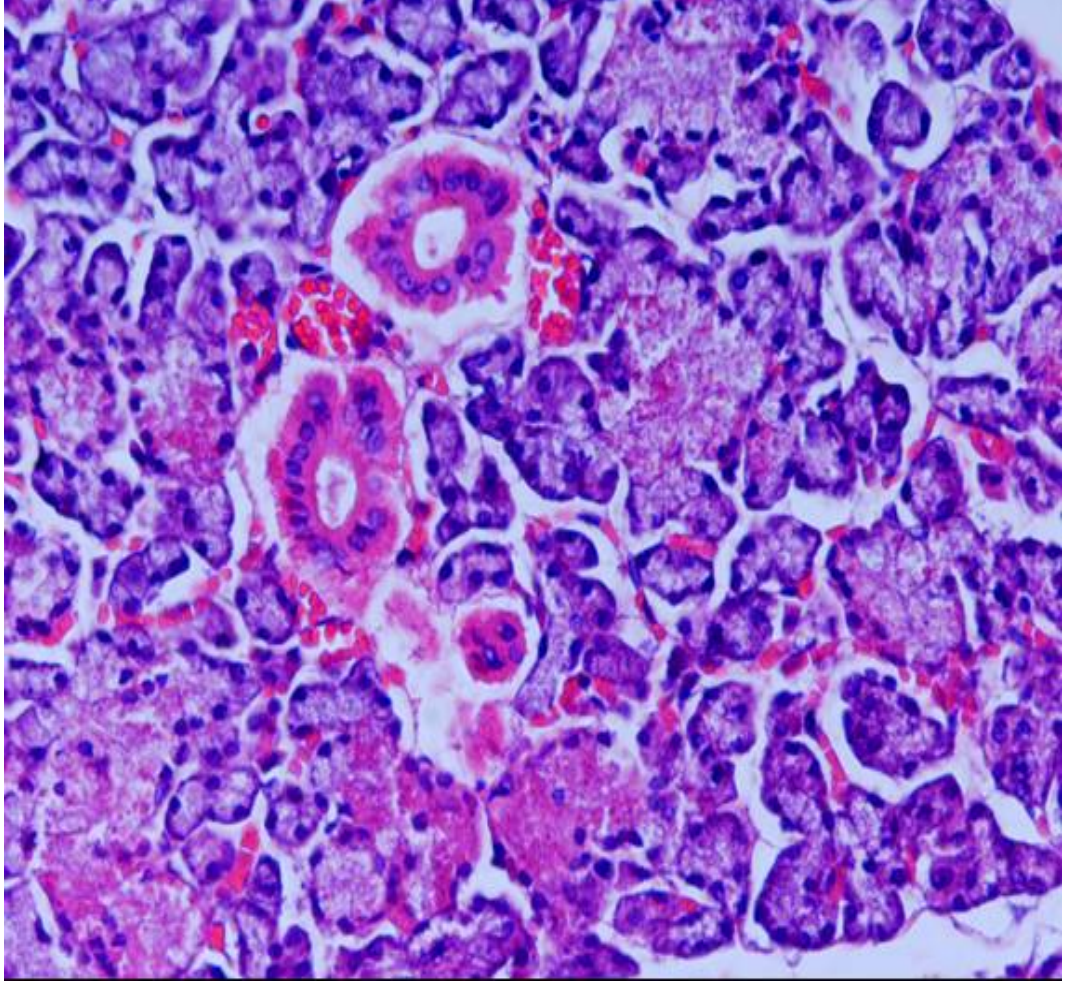
5-FU uygulanan tüm denek hayvanlarında tüy dökülmesi, lokal alopesi alanları ve beslenme bozuklukları ile kilo kaybı belirgin olarak izlendi.



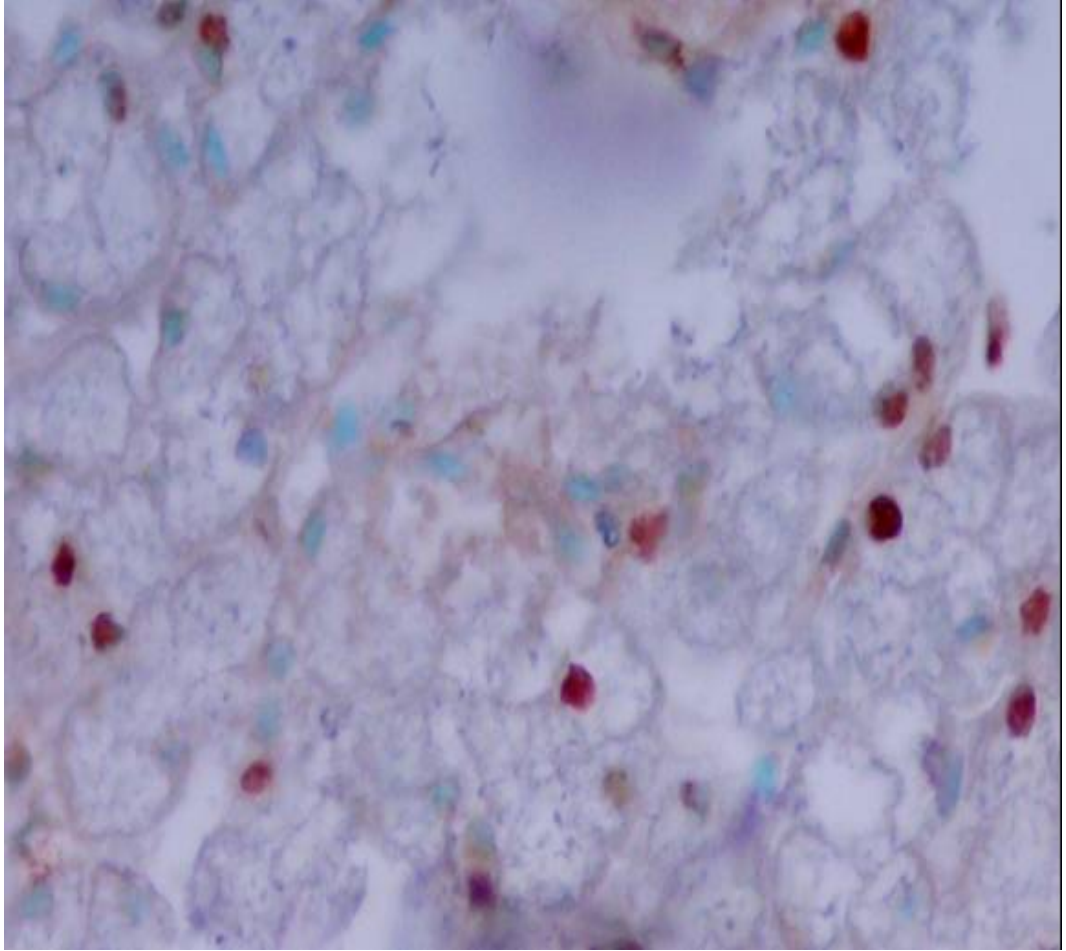
Şekil 9: Normal tükürük bezi; düzenli yapıda asinüs ve duktuslar. Duktuslar tek sıralı kübik epitel hücreleri ile döşeli (H&E, x400)



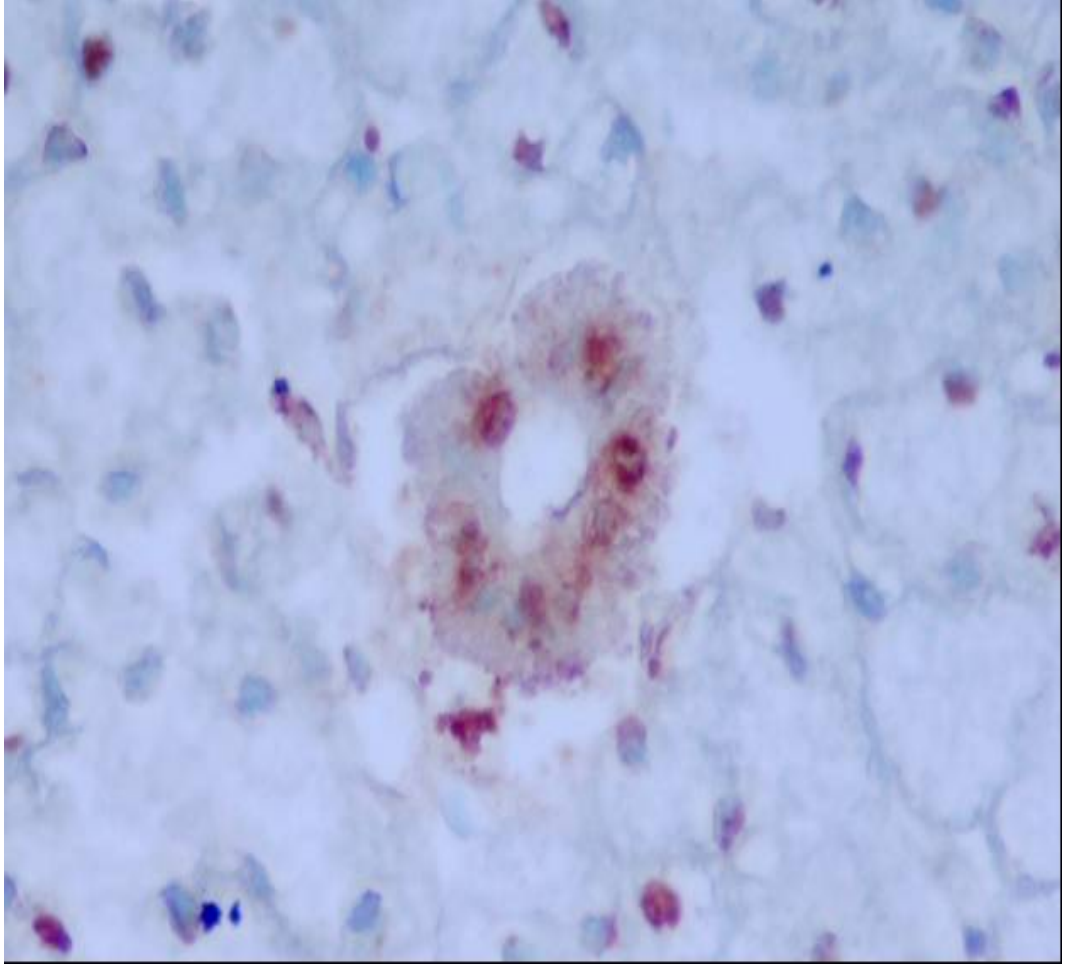
Şekil 10: Normal tükürük bezi; düzenli yapıda asinüs ve duktuslar. Asinüsler ince granüler sitoplazmaya sahip (H&E, x400)



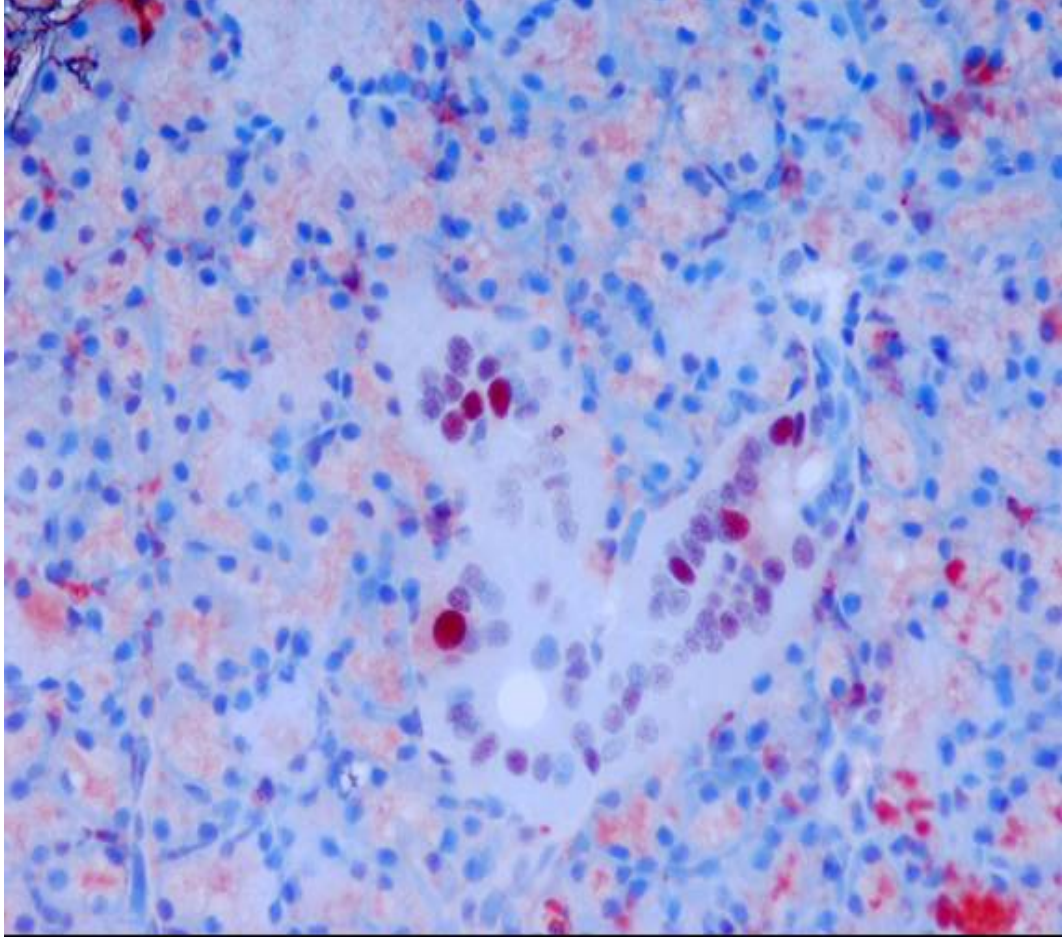
Şekil 11: Asinüslerde kemoterapi etkisi; asinüs hücre sitoplazmalarındaki granüller iri ve düzensiz (H&E, x400)



Şekil 12: Asinüs hücrelerinde kahve renkli boyanma gösteren apoptotik hücreler (TUNEL, x400)



Şekil 13: Duktusta kahve renkli boyanma gösteren apoptotik duktal hücreler TUNEL, x400)



Şekil 14: PCNA antikoru ile duktal epitelyal hücre nükleuslarında kırmızı renkte pozitif boyanma gösteren proliferatif hücreler (Immünohistokimyasal boyama, x400)

TARTIŞMA

Oral mukozit, radyoterapi veya kemoterapi uygulanan kanserli olguların morbiditelerini ve tedavi maliyetlerini arttıran ciddi bir komplikasyondur. 5-FU tükürük bezi kanserlerini de içeren tüm baş boyun karsinomlarında preoperatif veya postoperatif olarak kullanılan ve en etkin ilaçlar arasında yer alan kemoteröpötiktir (57). 5-FU, metotreksat, etoposid ve irinotekan gibi kemoteröpötik ajanlar aynı zamanda mukotoksik olup mukozite eğilimi arttırırlar (5). Kemoteröpötiklerin neden olduğu bu stomatotoksik tablolar, yalnızca hastaların beslenme ve hayat kalitesini bozmakla kalmaz aynı zamanda tedavi protokollerinin ertelenmesine ve doz azaltmalarına da neden olurlar. Mukotoksik etkilere hassasiyeti arttıran faktörler arasında tükürük salgısının azalması da sayılmaktadır. Mc Carthy ve arkadaşları sindirim sistemi kanseri tanısı ile 5-FU alan 63 olgunun iki aylık takipleri sırasında %46 oranında oral mukozit geliştiğini ve kserostominin oral mukozite eğilimi artırdığını bildirdiler (4). Aynı yazarlar azalan tükürük salgı hızının oral mukozit için önemli bir belirteç olduğunu ve bu nedenle stomatotoksik tedavi alanlarda bazal tükürük akımının rutin takibinin yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. Buna karşılık Jensen ve arkadaşları yapılan çalışmalarda standart yöntemlerin olmayışı, deneklerin sayısının azlığı, kısa çalışma dönemleri ve farklı tedavi rejimleri gibi nedenlerin kemoteröpötiklerin tükürük bezi fonksiyonları üzerindeki kesin etkilerinin anlaşılmasını önlediğini ileri sürmüşlerdir (24).

Tek doz intraperitoneal metotreksat enjeksiyonu yapılan ratlarda elektron mikroskopik olarak tükürük bezleri incelendiğinde, ilk 7 gündeki erken patolojik bulguların asiner ve duktal hücrelerin vakuolizasyonu ve şişmesi; asiner hücrelerde apoptoz ile çekirdeklerin piknozu ve sekresyon granüllerindeki azalma olduğu bildirildi (58). Aynı yazarlar kemoteröpötik dozlarının arttıkça patolojik değişikliklerin şiddet ve yaygınlığının da arttığını belirttiler. Mc Bride ve Siegel ise üç gün süreyle 15 mg/kg/gün metotreksatı intraperitoneal olarak enjekte ettikleri ratların submandibüler

glandlarında beta adrenerjik reseptörlerin arttığını saptadılar (59). Sunulan çalışmamızda ise tüm gruplardaki submandibüler gland kesitlerinin ışık mikroskobu ile değerlendirilmesinde enflamatuvar hücre ve fibrozise rastlanmadı. Kemoterapi uygulanan grup 2 ve 3'teki denek tavşanların tükürük glandı asiner hücre sitoplazmalarında granüler değişiklik saptandı ve ilaç uygulanmayan gruba göre bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Granüllerdeki bu kabalaşma bir sitoplazmik dejenerasyon bulgusu olup nonspesifiktir ve reversibl hücre zedelenmesini gösterir (51). Özellikle seröz hücrelerde izlenen bu sekretuar granüller pek çok proteolitik enzim ve ağır metaller içermektedir (60). Normal tavşan submandibüler glandı, proksimalde seröz tübüller ve distalde serömüköz asiniler içeren mikst bir tip gösterir (61). Sunulan çalışmamızda ilk iki grupta apoptoza rastlanmazken, 3. grubun asiner ve duktal hücrelerinde apoptoz saptandı. Bu sonuçlar, 5-FU uygulanan normal tükürük glandlarındaki ilk değişikliğin sitoplazmik granüllerde meydana geldiğini göstermektedir. Bu granüllerdeki bozunmanın ve içerdiği proteolitik enzimlerin sitoplazmaya salınması ile seröz hücrelerin otolize gittiği ileri sürülmüştür (62). Bleomisin veya 5-FU verilen farelerden elde edilen oral mukoza biyopsilerinde ilaç uygulamasından hemen 24 saat gibi erken bir dönemde subepitelyal dokuya hücre infiltrasyonu, vasküler dilatasyon ve lökosit marjinasyonu saptanmıştır (5). Bu erken mukozit tablosu ile sunulan çalışmamızda 5 gün ve 10 gün 5-FU verilen grup 1 ve grup 2'deki % 50 oranında görülen granüler değişiklikler göz önüne alındığında, mukozit gelişiminde tükürük bezi hasarının primer rol oynamadığı öne sürülebilir. 5'er günlük iki kür 5-FU uygulaması ile 3. grupta asiner ve duktal hücrelerde görülen apoptoz, tükürük bezi hasarının doz ve zaman bağımlı olarak ilerlediğini göstermektedir. Aota ve arkadaşları tükürük bezi kanserlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-FU'nun bu glanddaki kanser hücrelerinde apoptozisi uyardığını ve NF- κ B aktivitesinin süpresyonunun bu apoptoz gelişiminde rol oynayan bir mekanizma olabileceğini bildirmişlerdir (53). P53, c-jun ve interferon düzenleyici faktör-1 apoptozla ilişkili diğer bilinen transkripsiyon faktörleridir (54).

Tükürük bezi maligniteleri, aslında hem kemoterapiye hem de radyoterapiye rezistan tümörler olarak bildirilmiştir (63). Tükürük bezlerinin hücre ömrünün 60-120 gün arasında olması, düşük mitotik aktiviteye sahip olması ve hücrelerin çoğunlukla GO periyodunda bulunması tümörün direncinin nedenleri olarak sayılabilir (64). Sunulan çalışmamızda 10 günlük 5-FU tedavisini takiben asiner ve duktal hücrelerde apoptozun görülmesi ve sitoplazmik granüllerdeki değişiklikler, normal tükürük bezinin 5-FU ile etkilendiğini göstermektedir.

Sunulan çalışmamızda 3. grupta duktal hücrelerde proliferasyonu gösteren PCNA antikoru oranı diğer gruptakilere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Her üç grubun asinüs hücrelerinde ise proliferasyona rastlanmadı. Bu bulgu hasarlanma sonrası duktal hücrelerdeki rejenerasyonun, asiner hücelere göre daha erken dönemde ortaya çıktığını göstermektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, ışık mikroskobu ile histopatolojik değerlendirmede, 5-FU' nun submandibüler glandın asiner hücreleri üzerindeki etkilerinin ilk göstergesinin sitoplazmik sekretuar granüllerdeki değişiklikler olduğu saptandı. Hücreyi apoptozise götüren mekanizmalar arasında bu sitoplazmik sekretuar granüllerin bozunmasının etkisi de akla getirilmelidir.

Mukozit bulgularının kemoterapi tedavisini müteakiben ilk 24-48 saatte ortaya çıktığı bilinmektedir. Buna karşılık çalışmamızda 5-FU ile tedavi sonrası 11. gün yapılan kesitlerdeki değerlendirmede apoptozun kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farkının olmaması göz önüne alındığında 5-FU' nun tükürük bezi üzerindeki hasarlanma etkilerinin mukozit tablolarının ortaya çıkmasında primer faktör olmadığı anlaşılabilir. Daha geç dönemde mukozit tablolarının ağırlaşması ile tükürük bezi fonksiyonları arasında bir ilişkinin olduğunu düşünmek akla daha yakın gelmektedir.

Kemoterapi uygulanması sonrası ilaç uygulanmayan gruptan farklı bulguların, 3. grupta 10 gün süreyle 5-FU verilen denek tavşanlarda görülmesi; standart hayvan modelinin grup 3' teki uygulama ile oluşturulabileceğini göstermektedir. Bu model üzerinden tükürük bezini kemoterapi etkilerinden koruyan ajan denemelerinin yapılabileceği kanaatindeyiz.

Proliferasyonun en erken duktal hücrelerde izlenmesi rejenerasyon veya iyileşmenin bu hücrelerde asiner hücrelerden daha erken başladığının kanıtıdır. Yine tükürük bezi fonksiyonlarını koruyucu bir ajan uygulanmasında bu rejenerasyonun asinüs hücrelerinde de görülmesi bir kriter olarak kullanılabilir.

ÖZET

Antineoplastik ilaçların stomatotoksik etkileriyle ortaya çıkan mukozit tabloları kanser hastalarının morbiditesini ve tedavi maliyetini artırır. Bu hastalarda görülen mukoziti tetikleyen faktörler henüz kesin olarak anlaşılmamış olup bir çok etken sorumlu tutulmaktadır. Oral mukozit profilaksisi için etkisi kanıtlanmış ajan ve tedavisinde bir altın standart henüz ortaya konabilmiş değildir. Çalışmamızda, 5-FU' nun submandibüler gland histolojisi üzerindeki erken dönem etkilerini saptamayı ve standart bir hayvan modeli oluşturmayı amaçladık. 30 adet beyaz, sağlıklı Yeni Zelanda tipi tavşanın bilateral submandibüler glandları eksize edildi. Herhangi bir ilaç uygulanmayan birinci gruptaki 10 adet tavşandan kontrol grubu oluşturuldu. İkinci gruptaki tavşanlara 5 gün süreyle 5-FU uygulandı. Daha sonraki 5 gün boyunca herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. 11. gün anestezi altında bilateral submandibüler gland eksizyonu yapıldı. Üçüncü gruptaki tavşanlara 5 gün süreyle 5-FU uygulandı. Daha sonraki 5 gün ilaç uygulanmadı. 11. günden itibaren 5 gün daha 5-FU uygulandı. 16. gün anestezi altında bilateral submandibüler gland eksizyonu yapıldı. Eksize edilen submandibüler glandlarda, HE boyama ile histopatolojik değerlendirmeye, TUNEL metodu ile apoptozis'e, PCNA antikoru ile hücre proliferasyonuna bakıldı. Asinüs hücre sitoplazmalarında granüler değişikliğe kontrol grubunda rastlanmazken Grup 2 ve 3'de ise granüler değişiklik saptandı ve kontrol grubu ile diğer iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken, 5-FU uygulanan her iki grup arasında ise herhangi bir anlamlı fark izlenmedi. TUNEL boyama yöntemiyle grupların histopatolojik değerlendirilmesinde submandibüler gland asiner hücrelerdeki ve duktal hücrelerdeki apoptozis oranı açısından grup 3 ile diğer iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken, kontrol grubu ile grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. PCNA boyamada tüm gruplarda asiner hücrelerde hücre proliferasyonuna rastlanılmadı. Ancak duktal hücrelerdeki hücre proliferasyonu açısından, grup 3 ile diğer

iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark varken kontrol grubu ile grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Sonuç olarak kemoterapinin ilk günlerinde ortaya çıkan mukozitin primer olarak çalışmamızda daha geç dönemde görülen tükürük bezi hasarlanmasına dayanmadığı kanısına varıldı. Kemoterapi uygulaması sonrası ortaya çıkan ilk değişiklikler olan granüler kabalaşma ile apoptoz gelişimi arasında bir ilişkinin varlığına inanmaktayız. On gün 5-FU verilen üçüncü grup tükürük bulguları ile standart bir hayvan modeli oluşturulabileceği kanaatindeyiz.

SUMMARY

Mucositis induced by the stomatotoxic effects of antineoplastic drugs increases the morbidity and therapy cost of the patients. Factors that effect susceptibility to mucositis are multifactorial and poorly understood. Currently there are no proven effective agents for prophylaxis of oral mucositis and no gold standard exist for therapy. In this present study, our aim was to detect early effects of 5-flourouracil on submandibular gland histology and to build a standard animal model. 30 white and healthy New Zealand type rabbits were undergone bilateral submandibular gland excisions. The first, control group had ten rabbits not given any treatment. The ten rabbits of the second group rabbits were treated by 5-FU for five days. In this second group no therapy was given any more and on 11 th day submandibular glands were excised bilaterally. In the third group, the rabbits were given 5-FU for five days and no treatment was applied in the following five days. On 11 th day 5-FU was given for five more days. On the 16 th day, bilaterally submandibular glands were excised. Histopathologic evaluation of the glands was done by HE staining whereas apoptosis and cell proliferation were determined by TUNEL method and PCNA respectively. Granule changes were not found in asinus cell cytoplasms of control group sections while the changes were shown in the second and the third group. There was statistically significant difference between the control group and the other groups. But there was no difference between the second and the third groups. Apoptosis in asinus and ductal cells of submandibular glands was increased in the third group with a significant difference when compared the other groups. Cell proliferation was determined in ductal cells in the third group whereas no proliferation was shown in asinus cells.

As conclusion, in our opinion mucositis induced by chemotherapy in the first days of therapy was not associated primarily with salivary gland injury seen on later days. We believe on an association between apoptosis development and granules changes which were the first signs after

chemotherapy. With the salivary findings of the third group in which 5-FU was given for ten days, an establishment of an animal model may be possible.

KAYNAKLAR

- 1- Eting L.S, Bodey G.P, Keefe B.H. Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. Clin Infec Diseases 1992; 14:1201-1207
- 2- Sonis S.T, Oster G, Fuchs H, et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol 2001; 19:2201-2205.
- 3- Sonis S.T. Oral complications. In: Cancer Medicine, 4th edition, J.F. Holland et al. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1997 pp 3255-3264.
- 4- McCarthy G.M, Awde J.D, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. Oral Oncol 1998; 34:484-490.
- 5- Sonis S.T. Oral mucositis in cancer therapy. J Support Oncol 2004; 2 (Suppl. 3): 3-8.
- 6- Norman J.E deD. History of the salivary glands and mixed parotid tumour. In: Norman J.E deD, McGurk M. Color atlas and text of the salivary glands diseases, disorders and surgery. London: Mosby-Wolfe, 1995; 1-13.
- 7- Macauley S.P, Tarnuzzer R.W, Schultz G.S, Chegini N, Oxford G.E, Humphreys-Beher M.G. Extracellular matrix gene expression during Mouse submandibular gland development. Archs oral Biol. 1997; 42(6): 443-454.
- 8- Baguley B.C. A brief history of cancer chemotherapy. In: Baguley B.C, Ed. Anticancer drug development: Academic Pres. 2002; 1-9.
- 9- Fechner R.E. A brief history of Head and Neck Pathology. Mod Pathol 2002; 15(3):221-228
- 10- Larsen M, Hoffman M.P, Sakai T, Neibaur C, Mitchell M.J, Yamada M.K. Role of PI 3-kinase and PIP₃ in submandibular gland branching morphogenesis. Development Biology 2003; 255: 178-191.
- 11- Chi J.G. Prenatal development of human major salivary glands. Histological and immunohistochemical characteristics with reference to

adult and neoplastic salivary glands. Journal of Korean Medical Science. 1996; 11(3): 203-216.

12- Regezi J.A, Llyoyd R.V, Zarbo R.J, McClatchey K.D. Minor salivary gland tumors. A histologic and immunohistochemical study. Cancer 1985; 55: 108-115.

13- Alexander D.R, Stavrianos S, Lagogiannis, Faratzis G. Tumors of the submandibular gland: Clinopathologic analysis of 23 patients. J. Oral Maxillofac Surg 2004; 62:1203-1208.

14- Kaya S. Tükürük bezi hastalıkları, Ankara Güneş kitapevi, 1997.

15- Luna M.A, Ordonez N.G, Mackay B, Batakis J.G, Guillamendegui O. Salivary epithelial myoepithelial carcinomas of intercalated ducts. A clinical electron microscopic and immunocytochemical study. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1985; 59:482-490.

16- Flatau A.T, Mills P.R. Anatomy and physiology. In: Norman J.E deD, McGurk M. Color atlas and text of the salivary glands diseases, disorders and surgery. London: Mosby-Wolfe, 1995:13-59.

17- Snell S.R. (Çev. Yıldırım M) Klinik Anatomi, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 1997: 682-684.

18- Guyot L, Duroure F, Richard O, Lebeau J, Passagia J.-G, Raphael B. Submandibular gland endoscopic resection. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2005; 34(4):407-410.

19- Janfaza P, Montgomery W.W, Randolph G.W. (Çev. Dereköylü L). Boyun ön bölümleri. In: Janfaza P, Nadol J.B, Gala R.J, Fabian R.L, Montgomery W.W. (Çev. Cansız H) Baş ve boyunun cerrahi anatomisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2002: 629-675.

20- Sarioğlu S, Pabuççuoğlu H.U. Tükürük bezi tümörleri ve tümör benzeri lezyonları. İzmir Güven Kitabevi 2001.

21- Junqueira L.C, Carneiro J, Kelley R.O. (Çev. Aytekin Y.) Temel Histoloji. Barış Kitabevi. 1998: 302-304.

22- Pedersen A.M, Bardow A, Jensen S.B, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. Oral Dis 2002; 8:117-129.

23- Carroll W. R, Wolf G.T. (Çev. Keskin G) Tükrük bezleri. Ballanger J.J, Snow B.J. (Çev. Şenocak D. Kaleli Ç) Otorinolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2000: 390-400.

24- Jensen B.J, Pedersen M.A, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of salivary glands in cancer therapy. Support Care Cancer 2003; 11:207-225.

25- Nauntofte B. Regulation of electrolyte and fluid secretion in salivary acinar cells. Am J Physiol 1992; 263:823-837.

26- Endoh T. Modulation of voltage-dependent calcium channels by neurotransmitters and neuropeptides in parasympathetic submandibular ganglion neurons. Archives of Oral Biology 2004; 49:539-57.

27- Tutkun A, İnanlı S, Caymaz O, Ayanoğlu E, Duman D. Cardiotokxicity of 5-flourouracil. Auris Nasus Larynx 2001; 28:193-96.

28- Mycek M.J, Harvey R.A, Champe P.C. (Çev. Oktay Ş.) Farmakoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1998: 373-401.

29- Salmon S.E, Sartorelli A.C. (Çev. Küçüküseyin C) Kanser kemoterapisi. Katzung B.G. (Çev. Özüner Z.) Temel ve klinik farmakoloji. İstanbul: Barış Kitabevi, 1995: 1098-1144.

30- Correale P, Cerretani D, Marsili S, Pozzessere D, Petrioli R, Messinese S, Sabatino M, Roviello F, Pinto E, Francini G, Giorgi G. Gemcitabine increases systemic 5-flourouracil exposure in advanced cancer patients. European Journal of Cancer 2003; 39: 1547-1551.

31- Xian C.J, Howard G.S, Cool J.C, Foster B.K. Effects of acute 5-flourouracil chemotherapy and insulin-like growth factor-1 pretreatment on growth plate cartilage end metaphyseal bone in rats. Bone 2004; 35:739-749.

32- Toyoda K, Shibutani M, Sato H, Uneyama C, Takahashi M, Hayashi Y, Hirose M. Lack of Carcinogenicity and increased survival in F344 rats treated with 5- flourouracil for two years. Food and chemical toxicology 2000; 38:187-193.

33- Kuilenburg Andre B.P. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5- fluorouracil. *European Journal of cancer* 2004; 40: 939-950.

34- Chabner B.A, Ryan D.P, Paz-Ares L, Garcia-Carbanera R, Calabresi P. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Hardman J.G, Limbird L.E, Gilman A.G. Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill,2001:1989-1459.

35- Ferguson M.J, Ahmed F.Y, Cassidy J. The role of pro-drug therapy in the treatment of cancer. *Drug resistance updates* 2001; 4:225-232.

36- Kayaalp O.S. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Ankara,Hacettepe-Taş Kitapçılık 2000; 372-400.

37- Chun Y.M, Chun Y.C, Zong J.C. Selective use of a reserved mechanism for inducing calcium oscillations. *Cellular Signalling* 2004; 16:1435-1440.

38- Kinirons M.J, Fleming P, Boyd D. Dental caries experience of children in remission from acute lymphoblastic leukemia in relation to the duration of treatment and the period of time in remission. *Int J Paediatr Dent* 1995; 5:169-172.

39- Harrison T, Bigler L, Tucci M, et al. Salivary sIgA concentrations and stimulated whole saliva flow rates among women undergoing chemotherapy for breast cancer: an exploratory study. *Spec Care Dentist* 1998; 18:109-112.

40- Nasman M, Bjork O, Soderhall S, Ringden O, Dahllof G. Disturbances in the oral cavity in pediatric long-term survivors after different forms of antineoplastic therapy. *Pediatr Dent* 1994; 16:217-224.

41- Pajari U, Poikonen K, Larmas M, Lanning M. Salivary immunoglobulins, lysozyme,pH and microbial counts in children receiving antineoplastic therapy. *Scand J Dent Res* 1989; 97:171-177.

42- Bergmann O.J. Alterations in oral microflora and pathogenesis of acute oral infections during remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Scand J Infect Dis* 1991; 23:355-366.

43- Reynolds M.A, Minah G.E, Peterson D.E, et al. Periodontal disease and oral microbial successions during myelosuppressive cancer chemotherapy. *J Clin Periodontol* 1989; 16:185-189.

44- Sonis S.T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol* 1998; 34: 39-43.

45- Sreebry L.M, Valdini A. Xerostomia Part I : Relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 66:451-458.

46- Jha N, Seikaly H, Harris J, Williams D, Liu R, McGaw T, Hofmann H, Robinson D, Hanson J, Barnaby P. Prevention of radiation induced xerostomia by surgical transfer of submandibular salivary gland into the submental space. *Radiotherapy and Oncology* 2003; 66:283-289,

47- Horiot J-C, Lipinski F, Schraub S, Maulard-Durdux C, Bensadoun R.J, Ardiet M.J, et al. Post-radiation severe xerostomia relieved by pilocarpine. *Radiotherapy and Oncology* 2000; 55:233-39.

48- Haddad P, Karimi M. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of concomitant pilocarpine with head and neck irradiation for prevention of radiation-induced xerostomia. *Radiotherapy and Oncology* 2002; 64:29-32.

49- Neidermeier W, Matthaeus C, Meyer C, Staar S, Müller R.-P, Schulze H.-J. Radiation-induced hyposalivation and its treatment with oral pilocarpine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86:541-9.

50- Damjanov I, Linder J. Methods in Pathology. In: Damjanov I, Linder J. *Anderson's Pathology*. Mosby-Year Book, 1996: 264

51- Mitchell R.N, Cotran R.S. (Çev. Aker H). Hücre zedelenmesi adaptasyonu ve ölümü. Kumar V, Cotran R.S, Robbins S.L. (Çev. Çevikbaş U). *Robins Temel Patoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2003: 3-33.

52- Azuma M, Yamashita T, Aota K, Tamatani T, Sato M. 5-flourouracil suppression of NF- κ B is mediated by the inhibition of I κ B

kinase activity in human salivary gland cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2001; 282:292-296.

53- Aota K, Azuma M, Yamashita T, Tamatani T, Motegi K, Ishimaru N, Hayashi Y, Sato M. 5- fluorouracil induces apoptosis through the suppression of NF- κ B activity in human salivary gland cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2000; 273:1168-1174.

54- Motegi K, Azuma M, Aota K, Yamashita T, Tamatani T, Harada K, Yoshida H, Sato M. Effect of a mutant form of I κ B- α on 5- fluorouracil-induced apoptosis in transformed human salivary gland cells. *Oral Oncology*. 2001; 37:185-192.

55- Hekim N. Apoptozis. Kalıtsal hastalıklara moleküler tıp açısından bakış sempozyumu. 24-27 Eylül 2003: 115-140.

56- Rosai J. *Surgical Pathology*. Mosby-Year Book, 2004: 66

57- Fu K.K. Radiation therapy with 5- fluorouracil in head and neck cancer. *Semin. Radiat Oncol* 1997; 7: 274-282.

58- Romaniuk K, Gavin J.B, Adkins K.F. The effect of methotrexate on salivary glands in the rat (abstract no 261). *J. Dent Res (special issue)*: 1983; 62:678.

59- Mc Bride R.K, Siegel I.A. Effects of methotrexate on protein and amylase secretion by rat parotid and submandibular salivary glands. *Archs oral Biol*. 1988; 33(4): 245-249.

60- Kim K.H, Kim J.K, Sung M.W, Kim C.W. The effect of pilocarpine and atropine administration on radiation-induced injury of rat submandibular glands. *Acta Otolaryngol* 1991; 111: 967-973.

61- Ahlmer B.H. Irradiation of rabbit submandibular glands. *Acta Otol*. 1993; 113:210-219.

62- Abak K, Brunk U, Jurg B, Ericsson J. Morphological and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virchows Arch Pathol Incl Mol Pathol* 1984; 45:443-460.

63- Goode R.K, Auclair P.L, Ellis G.L. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands. *Cancer* 1998; 82:1217-1224.

64- Vissink A, Gravenmade E.J, Ligeon E.E, Kanings A.W. Effects of split-dose X irradiation on rat salivary gland function. *Radiat Res* 1991; 127: 52-57.

65- Grisius M.M. Salivary gland dysfunction : a review of systemic therapies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92:156-162.