T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

SUBMANDİBULAR GLANDA RADYOTERAPİ UYGULANAN RATLARDA APİGENİNİN RADYOPROTEKTİF ETKİSİ

HAZIRLAYAN
Bekir BÜYÜKÇELİK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa TÜZ

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2022-8721 nolu proje ile desteklenmektedir.

ISPARTA- 2023

'' Eşime ve İnci'me ithaf ediyorum.''

TEŞEKKÜR / ÖNSÖZ

Tez sürecimin her aşamasında birlikte çalıştığımız, tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa Tüz başta olmak üzere; uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, birlikte çalışmaktan onur duyduğum ve bu süreçte bana her açıdan destek olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hasan Yasan, Prof. Dr. Erdoğan Okur, Doç. Dr. Mehmet Emre Sivrice ve Doç. Dr. Yusuf Çağdaş Kumbul'a;

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, Arş. Gör. Dr. Fatma Caner, Arş. Gör. Dr. Sarper Sayın, Arş. Gör. Dr. Yunus Emre Ekinci, Arş. Gör. Dr. Furkan Yeşilkuş, Arş. Gör. Dr. Ali Başoğlu, Arş. Gör. Dr. Gökhan Keskin ve Arş. Gör. Dr. Yusuf Tuncel'e;

Benim için bir çalışma arkadaşından fazlası olan ve asistanlık eğitimine başladığım ilk günden beri koşulsuz desteği ile her zaman yanımda olan saygıdeğer dostum Uzm. Dr. Vural Akın'a;

Bu tez çalışması kapsamında yapılan histopatolojik ve immünhistokimyasal analizleri gerçekleştiren ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Özlem Özmen'e;

Başta Dilek Altındal olmak üzere ameliyathane ve servis hemşirelerimize, kliniğimizin odyometristleri ile diğer tüm ekip arkadaşlarıma;

Daima yanımda olan sevgili eşim Merve Büyükçelik'e;

Ve beni bugünlere getiren aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İTHAF ..... **i**
TEŞEKKÜR / ÖNSÖZ ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
RESİMLER DİZİNİ ..... **vii**
GRAFİKLER DİZİNİ ..... **viii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Tükürük Bezlerinin Embriyolojisi 3
2.2. Tükürük Bezlerinin Anatomisi 3
2.2.1. Parotis Bezinin Anatomisi 3
2.2.2. Submandibular Bezin Anatomisi 5
2.2.3. Sublingual Bezin Anatomisi 6
2.2.4. Minör Tükürük Bezlerinin Anatomisi 7
2.3. Tükürük Bezlerinin Fizyolojisi 7
2.4. Tükürük Bezlerinin Histolojisi 9
2.5. Radyoterapi 9
2.6. Kserostomi ve Diğer Oral Komplikasyonlar 12
2.7. Radyoprotektif Etki ve Amifostin 14
2.8. Apigenin 15
2.9. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa 16
3. GEREÇ VE YÖNTEM **18**
3.1. Etik Kurul Onayı ve Çalışmanın Gerçekleştirildiği Kurumlar 18
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması 18
3.3. Apigeninin Hazırlanması ve İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulamaları 20
3.4. Radyoterapi Uygulanması 22
3.5. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi ve Submandibular Bezlerin Eksizyonu 25
3.6. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler 27
3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi 30

4. BULGULAR **31**
5. TARTIŞMA **45**
6. SONUÇ VE ÖNERİLER **58**
ÖZET **59**
ABSTRACT **60**
KAYNAKLAR **61**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DAB **:** 3,3’ Diaminobenzidin Tetrahidroklorid

DMSO **:** Dimetil Sülfoksit

DNA **:** Deoksiribo Nükleik Asit

Gy **:** Gray

HE **:** Hematoksilen-Eozin

HPV **:** Human Papilloma Virüs

IL **:** İnterlökin

İP **:** İntraperitoneal

KT **:** Kemoterapi

RT **:** Radyoterapi

TNF-α **:** Tümör Nekrozis Faktör-Alfa

YART **:** Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratın Submandibular Bezinde Nekrotik Alanlar İçeren Çok Belirgin Duktal Hasar 38
Şekil 4.2. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratın Submandibular Bezinde Duktal Hasar 38
Şekil 4.3. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratta Asiner Hasar ve Nekrozlar 39
Şekil 4.4. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratta Submandibular Bezde Çok Sayıda Hücrede Belirgin Vakuolizasyonlar 39
Şekil 4.5. Şekil 4.4.'ün Büyütülmüş Görünümü, Submandibular Bezdeki Vakuolizasyonlar 40
Şekil 4.6. Grup 2'deki Bir Ratın Submandibular Bezinin Histopatolojik Görünümü, Submandibular Bezdeki Epitel Hücrelerinde Vakuolizasyonlarda Tamamen İyileşme 40
Şekil 4.7. Grup 3'teki Bir Ratın Submandibular Bezinde Kanama ve Epitel Hücrelerinde Vakuolizasyonlar 41
Şekil 4.8. Şekil 4.7.'nin Büyütülmüş Görünümü, Bazı Epitel Hücrelerinde Vakuolizasyonlar 41
Şekil 4.9. Grup 4'teki Bir Ratın Submandibular Bezinin Normal Histolojik Görünümü 42
Şekil 4.10. Şekil 4.9.'un Büyütülmüş Görünümü, Submandibular Bezin Normal Histolojik Görünümü 42
Şekil 4.11. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratın Tükürük Bezi Epitel Hücrelerinde Belirgin Şekilde Artmış TNF-α Ekspresyonları 43
Şekil 4.12. Grup 2'deki Bir Ratın Submandibular Bez Epitellerinde Belirgin Şekilde Azalmış TNF-α Ekspresyonları 43
Şekil 4.13. Grup 3'teki Bir Ratın Submandibular Bez Epitellerinde Azalmış TNF-α Ekspresyonları 44
Şekil 4.14. Grup 4'teki Bir Ratın Submandibular Bezinde Negatif TNF-α İmmünoreaksiyonları 44

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1. Deneyde Kullanılan Ratların Barınma ve Beslenme Ortamı..... 19
Resim 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması 20
Resim 3.3. İntraperitoneal Olarak Uygulanan Apigeninin Ticari Preparatı 21
Resim 3.4. Çözücü Olarak Kullanılan ve İntraperitoneal Olarak Uygulanan Dimetil Sülfoksitin Ticari Preparatı 21
Resim 3.5. Apigenin-DMSO Çözeltisinin İntraperitoneal Olarak Uygulanması 22
Resim 3.6. İntraperitoneal Olarak Uygulanan Ketamin ve Ksilazinin Ticari Preparatları 23
Resim 3.7. Strafor Platform Üzerine Supin Pozisyonda Tespit Edilen Ratlar 23
Resim 3.8. Lineer Akseleratör 24
Resim 3.9. Radyoterapi Uygulanan Ratlar 24
Resim 3.10. Sakrifikasyon Öncesinde İntraperitoneal Anestezik Madde Uygulanması 25
Resim 3.11. Strafor Platform Üzerine Tespit Edilen Sakrifiye Edilmiş Rat 26
Resim 3.12. Vertikal İnsizyon Sonrasında Diseksiyon Yapılmış Rat 26
Resim 3.13. Submandibular Bezlerin Eksizyonu 27

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Nekroz Parametresine Ait Skorların Dağılımı 33

Grafik 4.2. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Asiner Hasar Parametresine Ait Skorların Dağılımı 34

Grafik 4.3. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Duktal Hasar Parametresine Ait Skorların Dağılımı 35

Grafik 4.4. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Vakuolizasyon Parametresine Ait Skorların Dağılımı 36

Grafik 4.5. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te TNF-α Ekspresyonu Parametresine Ait Skorların Dağılımı..... 37

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1. Grup 4'e Ait Histopatolojik ve İmmünhistokimyasal İnceleme Skorları 31

Tablo 4.2. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün Histopatolojik ve İmmünhistokimyasal Bulgular Açısından Karşılaştırılması 32

1. GİRİŞ

Baş-boyun kanserleri, tüm kanser vakalarının yaklaşık %6'sını oluşturur. Bu bölgenin kanserleri sıklık bakımından tüm kanserler arasında yedinci sıradadır. Farklı histolojik alt tipleri olmakla birlikte, en sık görülen histolojik tip yassı hücreli karsinomdur (1). Baş-boyun kanserlerinde ana risk faktörleri sigara, alkol, oral hijyen bozukluğu ve human papilloma virüsdür (HPV). Özellikle HPV'ye bağlı baş-boyun kanserleri giderek artmaktadır. Baş-boyun kanserleri erken evrelerde semptom göstermeyebilir, buna bağlı olarak tanı anında hastaların yaklaşık %40'ı metastatik hastalık ile başvururlar. Cerrahi, radyoterapi (RT) ve kemoterapi (KT) tedavi seçenekleri hastaya uygun olarak modifiye edilir. Tedavide amaç sadece sağkalımı iyileştirmek değil aynı zamanda organ fonksiyonunu korumaktır. HPV ile ilişkili olan yassı hücreli karsinomlar, KT ve RT'ye daha iyi yanıt verirler (1,2).

Radyoterapi; küratif, palyatif, neoadjuvan veya adjuvan olarak baş-boyun kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon, doğrudan etki ile deoksiribo nükleik asit (DNA) hasarına ve indirekt etkisiyle de serbest radikallerin hücre içinde hasara neden olması ile etki gösterir. Konvansiyonel RT'den teknolojinin gelişmesi ile konformal RT'ye geçilmiştir. Radyoterapide amaç hedef organa istenilen dozun uygulanmasıdır. Fakat komşu kritik organların istenmeyen dozda radyasyona maruz kalması yan etkilere neden olacaktır. Radyoterapide kritik organların etkilenmesi en aza indirgenecek şekilde tedavi planı oluşturulsa da mevcut RT uygulama teknikleri ile kritik organ etkilenmeleri henüz kabul edilebilir seviyede değildir. Baş-boyun bölgesinde medulla spinalis, beyin sapı, karotis arterler ve tükürük bezleri gibi kritik organlar bulunmaktadır. Tükürük bezlerinin etkilenmesine bağlı olarak RT sonrasında kserostomi, disfaji, tat bozukluğu ve konuşma güçlüğü görülebilir. Bu yan etkiler yaşam kalitesini azaltmanın yanında, iştahsızlık ve kilo kaybına neden olarak tedavi sürecinin tamamlanmasını olumsuz etkilemektedirler (3-5).

Radyoterapinin neden olduğu radyasyon hasarını azaltmak için uzun zamandır; etkili ve tolere edilebilir radyoprotektif madde arayışı devam etmektedir. İdeal radyoprotektif ajan kolay tolere edilebilir, ulaşılabilir ve kullanımı kolay olmalıdır. Doğal fitokimyasallardan olan apigeninin antienflamatuar ve antioksidan özellikleri

bildirilmiştir (6). Literatürde apigeninin hücre kültüründe lenfositler üzerinde radyasyonun olumsuz etkilerini baskıladığı ve fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada radyasyona bağlı gastrointestinal hasarı yavaşlattığı bildirilmiştir (7,8). Apigeninin daha önceki çalışmalarda gösterilen bu etkileri, submandibular bez üzerinde radyoprotektif etki gösterebileceğine dair olan hipotezimizin temelini oluşturmaktadır. Bu hipotezden yola çıkarak çalışmamızda apigeninin, ratların submandibular bezi üzerinde histopatolojik ve immünhistokimyasal olarak radyoprotektif etkisini incelemeyi planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tükürük Bezlerinin Embriyolojisi

Majör tükürük bezlerinin embriyolojik gelişimi üç ana aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada oral ektodermin, etrafındaki mezenkime doğru gelişmesi ile duktuslar dallanarak temel yapıyı oluşturlar. İkinci aşama lobüllerin tanınması ile karakterizedir. Son aşama interkale duktusların ve asinüslerin olgunlaşması ile tamamlanır (9). Tükürük bezlerinin gelişimi dallanma morfogenezinin tipik bir örneğidir; tıpkı akciğer, pankreas ve böbrek gibi (10).

İntrauterin dönemde yaklaşık olarak 6 ila 8. hafta arasında başlayan bu süreçte, ilk olarak primordial parotis bezi izlenir. Sadece memelilerde bulunan parotis bezi aynı zamanda intraparankimal olarak lenfatik sisteme sahip tek tükürük bezidir. Bunun sebebi parotis bezi kapsülünün gelişiminin lenfatik sistem gelişiminden sonra tamamlanmasıdır (11). Parotis bezinden sonra ağız tabanında submandibular bez ve onu takiben paralingual sulkusda sublingual tükürük bezi gelişmeye başlar. Submandibular bez en erken anatomik pozisyonuna yerleşen majör tükürük bezidir. Submandibular bezler majör tükürük bezleri içerisinde kapsül yapısı en belirgin olan bezlerdir. Minör tükürük bezleri, intrauterin 12. haftada üst solunum yolu ektoderminden oluşan tübüloasiner birimlerden gelişirler (12, 13).

2.2. Tükürük Bezlerinin Anatomisi

2.2.1. Parotis Bezinin Anatomisi

Parotis bezi majör tükürük bezlerinin en büyüğü olup saf seröz salgı yapmaktadır. Yaklaşık olarak 30 gr ağırlığındadır. En büyük tükürük bezi olmasına rağmen tükürük salgısının yaklaşık olarak %30'unu üretmektedir. Preauriküler bölgede ters bir üçgen şeklinde yerleşmiştir. Parotis bezi üstte zigomatik proses, arkada dış kulak yolu ve altta submandibular tükürük bezinin posterosüperioruna kadar uzanmaktadır. Bez içerisinden geçen fasiyal sinir tarafından yüzeyel (lateral) ve derin (medial) olmak üzere iki loba ayrılır. Ayrıca parotisin ana boşaltım kanalı (Stenon veya Stensen) ile zigoma arasında yerleşen, parotis bezinden farklı olarak

müsinöz asinüsler de içeren aksesuar lob toplumda %20 oranında görülmektedir. Aksesuar lobun salgıları bir kanal yardımı ile parotis kanalına açılır (13, 14).

Derin servikal fasyanın daha kalın olan yüzeyel kısmı parotis bezini sararak süperiorda zigomadan, masseter ve sternokleidomastoid kaslara uzanır. Servikal fasyanın derin tabakası ise stilomandibular ligamana kadar uzanmaktadır. Stilomandibular ligaman derin lob yerleşimli parotis bezi kitlelerinin veya parafaringeal kitlelerin eksizyonunda önemli bir sınırdır. Stilomandibular tenotomi cerrahi görüş sağlama açısından önemli bir manevradır (15). Dış kulak yolu anterioru ile parotis bezinin fasyasının zayıf olduğu embriyolojik bir kalıntı olan Huschke forameni, dış kulak yolu enfeksiyonlarının parotis lojuna yayılmasına sebep olabilmektedir (16).

Parotis bezi salgılarını ön sınırından başlayan zigomanın 1 cm altında ve zigomaya paralel uzanımlı Stenon kanalı ile oral kavite vestibülüne boşaltır. Stenon kanalı yaklaşık 6 cm uzunluğundadır. Buksinatör kası ve bukkal yağ tabakasını geçerek ikinci maksiller molar diş seviyesinden oral kaviteye açılır (17)

Fasiyal sinir, stilomastoid foramen yoluyla kafa tabanından çıkar. Parotis bezine girmeden önce digastrik kasın posterior karnını, stilohyoid kası ve postauriküler kası innerve eden motor dallarını verir. Fasiyal sinir ana trunkusu parotis bezinin içerisinde pes anserinusu (kaz ayağı) oluşturup temporozigomatik ve servikofasiyal olmak üzere iki kola ayrılır, sonrasında da yukardan aşağıya doğru sırasıyla temporal, zigomatik, bukkal, marjinal mandibular ve servikal dallara ayrılarak yüz kaslarını innerve eder (18). Aurikularis magnus siniri ise servikal pleksusun duysal bir dalıdır. Aurikula, lobül ve parotis bezinin duyusunu alır. Gereklilik halinde fasiyal sinir grefti olarak kullanılabilir (19).

Parotis bezi otonom sinir sistemi kontrolünde sempatik ve parasempatik innervasyona sahiptir. Parasempatik uyarı beyin sapında ponsda yerleşimli nükleus salivatorius inferiordan çıkarak glossofaringeal sinir içerisinde ilerler. Timpanik pleksusu oluşturmak için orta kulağa doğru ilerledikten sonra minör petrozal sinir yardımı ile otik gangliona ulaşmak üzere foramen ovaleden dışarı çıkar. İnfratemporal fossada otik ganglionu terk ederek aurikulotemporal sinire katılır ve bu sinir yardımı ile parotis bezi innerve edilir. Sempatik uyarı süperior servikal gangliondan, karotid

pleksus yardımı ile tükürük bezlerine ulaşır. Parasempatik uyarı seröz tükürük salgısını daha belirgin artırırken, sempatik uyarı proteinlerin salgılanmasını artırır. Parotidektomi sonrasında kalan parotis dokusundaki serbest parasempatik lifler tarafından ter bezlerinin anormal otonom innervasyonu Frey sendromuna (aurikulotemporal sendrom) neden olmaktadır (20).

Parotis bezinin arteriyel beslenmesi eksternal karotis arterin terminal dalları olan süperfisiyal temporal arter ve maksiller arterden sağlanır. Venöz drenajı ise süperfisiyal temporal ven ve maksiller venin birleşmesiyle oluşan retromandibular ven yardımı ile eksternal juguler vene dökülür.

Parotis bezini diğer tükürük bezlerinden ayıran önemli özellik içerisinde ve çevresinde lenf düğümlerinin bulunmasıdır. İntraparankimal lenf düğümlerinin yaklaşık %90'ı parankim ve kapsül arasına yerleşim gösterir. Parotis bölgesi lenfatikleri dış kulak yolu, aurikula, skalp ve nazofarenksin lenfatik drenajını sağlar (21).

2.2.2. Submandibular Bezin Anatomisi

Submandibular bez yaklaşık olarak 8-15 gr ağırlığında olup, ikinci en büyük tükürük bezidir. Submandibular bez, ön sınırını digastrik kasın anterior karnı, posterior sınırını digastrik kasın posterior karnı ve üst tarafı mandibula ile sınırlı submandibular üçgende bulunmaktadır. Submandibular bezin büyük kısmı mylohiyoid kasın posterolateralinde yerleşmektedir (17).

Submandibular bez, hem muköz hem seröz asiner hücreler içermesi nedeni ile serömuköz salgı yapar. Submandibular bez tüm tükürük salgısının yaklaşık olarak %60'ını üretmektedir. Submandibular bez salgılarını Wharton kanalı yardımı ile sublingual alandaki karunkula sublingualis denilen mukozal katlantıdan oral kaviteye boşaltır. Wharton kanalı yaklaşık olarak 5 cm uzunluğunda olup, seyrinde hipoglossal sinirin üstünden, lingual sinirin alt tarafından geçer. Wharton kanalı mylohiyoid kas ve hyoglossus kas arasından posteriordan anteriora doğru seyreder (17).

Submandibular bez derin servikal fasya ile çevrelenmiştir. Fasiyal sinirin marjinal mandibular dalının fasyanın yüzeyinden geçmesi sebebiyle bölgeye

planlanan cerrahilerde submandibular bez fasyasının derininden ilerlenmesi siniri korumak için güvenilir bir yöntemdir (17).

Submandibular ve sublingual bezler fasiyal sinirin lifleri tarafından innerve edilirler. Parasempatik innervasyon beyin sapında ponsta yerleşimli nükleus salivatorius süperiordan çıkarak fasiyal sinirin mastoid segmentinde verdiği dalı olan korda timpaniye katılır. Sonrasında lingual sinire katılan preganglionik lifler submandibular gangliona ulaşır. Ganglionu terk eden postganglionik lifler submandibular ve sublingual bezi innerve eder. Süperior servikal gangliondan gelen sempatik innervasyon lingual arteri takip eden lifler ile submandibular beze ulaşır (13, 17).

Submandibular bezin ana arteriyel beslenmesi eksternal karotis arterin dalı olan fasiyal arter ve lingual arter tarafından sağlanır. Submandibular bez eksizyonu sırasında fasiyal arter önce mandibulanın alt sınırında sonra digastrik kasın posterior karnının süperiorunda olmak üzere iki kere ligate edilmelidir. Bezin venöz drenajı anterior fasiyal ven tarafından sağlanır. Submandibular bez cerrahisi esnasında fasiyal venin ligasyonu ve süperiora ekartasyonu cerrahi esnasında marjinal mandibular sinirin korunmasına katkıda bulunur. Yukarıda bahsedildiği gibi bezin fasyası veya fasiyal ven ekartasyonu postoperatif marjinal mandibular sinir yaralanmasını en aza indirecektir (17). Submandibular bezin lenfatik drenajı derin servikal lenf nodlarına olmaktadır.

2.2.3. Sublingual Bezin Anatomisi

Sublingual tükürük bezi majör tükürük bezlerinin en küçüğüdür. Yaklaşık olarak 3 gr ağırlığında olup, submukozal yerleşimlidir. Mylohiyoid kasın üzerinde yerleşmiş olan bezin posterioru submandibular bez ile komşudur. Medialde genioglossus kas ile komşudur. Genioglossus kas ile aralarından lingual sinir ve Wharton kanalı geçer. Sublingual bez salgılarının bir kısmını Rivinus kanalları ile doğrudan ağız tabanına yaparken bir kısmınıda Bartholin kanalı adı verilen kanala salgılayarak onun Wharton kanalına drenajı ile oral kaviteye ulaştırır (13, 17, 22).

Sublingual bezin temel arteriyel beslenmesi lingual arter ve fasiyal arterin submental dalından sağlanır. Otonom sinir sistemi tarafından kontrolünde ise

parasempatik uyarı submandibular gangliondan ayrılan postganglionik lifler tarafından sağlanırken, sempatik uyarı ise fasiyal arteri takip eden lifler yardımı ile sublingual beze ulaşır (17).

Sublingual bezin lenfatikleri submandibular lenf düğümlerine drene olurlar. Genellikle sublingual tükürük bezinden kaynaklanan ranulalar klinik olarak sık karşılaşılan ağız tabanı yerleşimli benign, kistik lezyonlardır (13).

2.2.4. Minör Tükürük Bezlerinin Anatomisi

Minör tükürük bezleri paranazal sinüsler de dahil olmak üzere aerodigestif traktın genelinde submukozal tabakada yaygın olarak bulunurlar. Sert damağın anteriorunda ve gingivada sayısal olarak nipeten daha az minör tükürük bezi vardır. Bir insanda ortalama 800 ila 1000 arasında minör tükürük bezi bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bezler tüm tükürük salgısının %8'inden sorumludur. Her minör tükürük bezi salgısını kendi kanalları yardımı ile kavitelere ulaştırır (17, 22). Çoğunluğu mikst tip salgı yapmasına rağmen, saf seröz ve saf muköz salgı yapanları da vardır. Minör tükürük bezleri majörlerin aksine kapsül yapısına sahip değillerdir (13).

Minör tükürük bezlerinin post ganglionik parasempatik uyarısı esas olarak lingual sinir ile seyreden lifler aracılığıyla taşınmasına rağmen damakta yerleşimli minör tükürük bezlerinin postganglionik lifleri sfenopalatin gangliondan kaynaklanır. Uykuda majör tükürük bezleri sekresyon yapmazken, minör tükürük bezleri sürekli salgı yaparak mukozanın nemlendirilmesi görevini üstlenirler (23).

Klinik olarak tükürük bezi tutulumları ile seyreden Sjögren sendromu gibi hastalıklarda minör tükürük bezi biyopsileri tanıda yardımcı olmaktadır (24).

2.3. Tükürük Bezlerinin Fizyolojisi

Tükürük salgılanması otonom sinir sisteminin kontrolünde olan, iki aşamalı aktif bir süreçtir. Sağlıklı kişilerde günlük ortalama bir litre tükürük salgılanır. Tükürük salgılanması ilk olarak asinüslerden izotonik bir salgı olarak başlar ve duktal sistemden geçerken elektrolit düzenlenmesi ile hipotonik biçimde tamamlanır (25). Tükürüğün hipotonisitesi tat çözünürlüğünü artırır (26).

Tükürükte en fazla miktarda bulunan bileşen sudur ve tükürüğün yaklaşık olarak %99'unu oluşturur. Tükürüğün kalan kısmı sodyum, potasyum, klorür gibi inorganik bileşenlerden ve protein, glikoprotein, yağ asidi gibi organik bileşenlerden oluşmaktadır (27).

Tükürük salgısı gün boyu devam etmekte olup; uyku, cinsiyet, yaş, ilaç kullanımı ve beslenme gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Uyarılmamış ortalama tükürük akım hızı 0,3 ml/dk iken beslenme esnasında 2 ml/dk'ya kadar yükselebilmektedir. Tükürük akım hızının artması ile birlikte duktal sistemde elektrolit emilimi yavaşlar ve daha az modifiye edilmiş tükürük salgısı oral kaviteye ulaşır (25).

Tükürüğün pH değeri 6-7 arasında hafif asidik düzeydedir. Tükürüğün pH değeri temel olarak bikarbonat tampon sistemi tarafından sağlanır. Stimüle edilmiş tükürükteki bikarbonat konsantrasyonu diyet asidinin nötralizasyonu için daha fazladır (27).

Tükürük bezlerinde parasempatik uyarı elektrolit salgılanmasını tetikler iken, sempatik uyarı protein sentezini artırır. Tükürük bezlerinde protein sentezi süreklidir ve sentezlenen proteinler hücrede zimojen granüllerinde depolanıp ekzositoz ile salınırlar. Alfa-amilaz seröz tükürükte en çok bulunan proteindir. Muköz asinüsler müsin sentezi yaparken, seröz asinüsler elektrolit, antibakteriyel ve antiviral ajanlar ile başta alfa-amilaz olmak üzere diğer tükürük enzimlerini salgılarlar. Alfa-amilaz midenin asidik pH'sına ulaştığı zaman deaktive olur (25, 28).

Kalsiyum ve fosfat, dişlerin mineralizasyonu için tükürüğün en önemli bileşenleridir. Tükürükteki kalsiyumun yarısı staterin gibi proteinlerde kalan yarısı ise iyonize halde bulunmaktadır. Kalsiyumun tamamının iyonize halde olmaması tükürük kanalında çökmesine engel olmaktadır. Diş minesi oral kavitenin pH değeri 5,6'nın altında olduğu zaman çözünmeye başlar. Oral kavitenin pH değeri asidik olma eğilimindedir (reflü, asidik gazlı içecek tüketimi). Bikarbonat tamponlama sistemi buna engel olarak oral kavitenin pH değerini dengelemektedir (25, 27, 28).

Oral mukozadaki ana müsinler glikoproteindirler. Müsinler mukozayı film tabakası olarak sararlar. Bakterileri aglütine ederek kolonizasyonlarını inhibe ederlerler. Çiğneme, yutma ve konuşma müsinlerin kayganlaştırıcı etkileriyle

desteklenir (26). Tükürük immünoglobulin A'sı çeşitli mikroorganizmalara bağlanarak, mikroorganizmaların adezyonuna engel olur. Histatinler ise çeşitli mantarların hücre duvarında yapısal değişikliklere neden olan tükürük peptitlerindendir. Lizozimler, gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında hasara neden olan enzimlerdir. Yine tükürükte bulunan laktoferrin ve laktoperoksidaz antimikrobiyal savunma sisteminin önemli birer parçasıdırlar. Tükürüğün yapısında bulunan büyüme faktörleri oral kavite, özefagus ve mide de dahil olmak üzere mukozal yüzeyler üzerinde sitoprotektif bir etki oluştururlar (25, 27).

Tükürüğün fonksiyonları; tamponlama ve temizleme, lubrikasyon ve koruma, tat ve sindirim, diş sağlığının korunması ve antibakteriyel etki olarak özetlenebilir. Tüm fonksiyonlar temelde ağız sağlığını koruma ve dengede tutmaya yardımcı olur (26).

2.4. Tükürük Bezlerinin Histolojisi

Tükürük bezleri mukozaya salgı yapan ekzokrin bezlerdir. Tükürük bezlerinin yapısındaki stroma mezenşim kökenli bağ dokusu tarafından oluşturulur. Bez parankimini ise asinüsler, duktuslar ve boşaltım kanalları oluşturur.

Tükürük bezlerinin en distal ünitesi olan asinüsler izotonik yapıdaki primer tükürük salgısını yaparlar. Asinüslerde sekretuvar hücrelerin etrafında miyoepitelyal hücreler bulunmaktadır. Miyoepitelyal hücrelerin kasılmasıyla salgılanan tükürük sırası ile interkale ve çizgili kanallardan geçerek boşaltım kanallarına ulaşır. Çizgili kanallar duktal sistemin en özel bölümüdürler. Lümen ve ekstraselüler boşluk arasında elektrolitlerin salgılanmasını ve geri emilimini kontrol ederler (29). İntralobüler kanallar olarak da bilinen çizgili kanallar, interlobüler ve interlober kanallar yardımı ile ana boşaltım kanallarına modifiye tükürüğü salgılarlar (29, 30).

2.5. Radyoterapi

Baş-boyun kanserleri dünyada yıllık 550 000'den fazla kişiyi etkilemekte olup, baş-boyun kanserleri en sık görülen yedinci malignitedir (3, 4). Baş-boyun kanserlerinde sigara, alkol, Epstein-Barr virüs, HPV ve oral hijyen bozukluğu ana risk faktörleridir. Baş-boyun kanserleri multidisipliner olarak değerlendirilmektedir.

Tedavide kullanılacak yöntemler cerrahi, RT ve KT'dir. Tedavi yöntemleri seçilirken; tümörün tipi, diferansiasyon derecesi, metastaz varlığı, konuşma ve yutmanın korunması, hastanın mesleği ve genel durumu gibi birçok faktör göz önünde bulundurulur (3, 5).

İyonlaştırıcı radyasyon direkt ve indirekt etki ile temel hedef olan DNA'ya hasar verir. Direkt etki doğrudan DNA molekülüne hasar verilmesi, indirekt etki ise radyasyonun etkisi ile açığa çıkan serbest radikallerin DNA ve diğer hücresel yapılar ile etkileşime girerek oluşturduğu hasardır (3). DNA hasarı, genetik onarım için zaman tanıyan geçici kontrol noktalarının etkinleştirilmesi veya hücre ölümü ile sonuçlanan hücre büyümesinin durmasını tetikleyen sinyalleri başlatır (31). Hücrelerin radyosensitivitesinin en yüksek olduğu fazlar G2 ve M fazlarıdır. Buna bağlı olarak mitotik aktivitenin ve oksijenizasyonun fazla olduğu dokular RT'den daha fazla etkilenirler (3, 31).

Baş-boyun kanserlerinde RT volümü içerisinde medulla spinalis, beyin sapı, optik sinir, brakiyal pleksus, karotis arterler ve tükürük bezleri gibi kritik organlar bulunmaktadır (3, 4). Modern RT'de amaç, hedef volüme yüksek radyasyon vermenin yanında kritik organları korumaktır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte konvansiyonel RT'den konformal RT'ye geçilerek kritik organ korunması ve hedef volümde istenen doza ulaşılması daha etkin şekilde sağlanmaktadır. Konformal RT; üç boyutlu RT ve yoğunluk ayarlı radyoterapi (YART) şeklinde uygulanabilir (4, 32).

Yoğunluk ayarlı radyoterapi günümüzde baş-boyun kanserlerinin tedavisinde en çok tercih edilen tekniktir. Radyoterapide tedavi planlamasında öncelikle tümör yerleşimi ve uzanımının belirlenmesi gerekir. Görüntüleme yöntemlerinde tespit edilen kısım gros tümör volümü olarak adlandırılır. Gros tümör volümünün etrafındaki mikroskobik tümör infiltrasyonunu içeren kısmın volüme dahil edilmesi için tümörün T evresine göre gros tümör volümünü kapsayacak şekilde klinik hedef volüm çizimi yapılır. Bu çizimleri takiben pozisyon ve hasta solunumu gibi olası sapmalara karşı ek bir volüm eklenerek planlanan hedef volüm oluşturulur. Planlanan hedef volüm her ışınlandığında klinik hedef volüme yeterli doz ulaşması sağlanmış olur. Fakat hedef volümler kadar kritik organların yerleşimi de tedavi planlamasında çok önemlidir (3, 4).

Radyoterapide uygulanacak olan toplam dozun parçalara bölünerek zamana göre dağılımına fraksiyonasyon denir. Fraksiyonasyon tümörü kontrol edecek dozu uygularken yan etkileri tolere edilebilir seviyede tutmamızı sağlar. Konvansiyonel fraksiyonasyon, haftada beş gün RT uygulaması iki gün ara verilmesi şeklinde olan ve en sık kullanılan tedavi planıdır (3, 33).

Radyoterapi neoadjuvan, adjuvan, palyatif ve küratif gibi farklı şekillerde planlanabilir. Aynı zamanda RT, konkomitan (eş zamanlı) kemoradyoterapi tedavi rejimlerinde de kullanılmaktadır (3). Tümör hücreleri KT sonrasında daha radyosensitif hale getirilebilir fakat konkomitan tedavide daha yüksek oranda akut toksisite olabileceği unutulmamalıdır (34, 35).

Radyoterapiye bağlı morbidite; tedavi dozu, tedavi volümü, hastalık evresi ve eşlik eden hastalıklar gibi birçok faktöre bağlıdır (3, 5). Radyoterapiye bağlı yan etkiler görülme zamanına göre akut ve geç olmak üzere iki gruba kategorize edilebilir. Akut yan etkiler RT esnasında veya takibindeki üç ay içerisinde gözlenen etkilerdir. Geç yan etkiler ise tedaviden 3-6 ay sonra ortaya çıkar. Konvansiyonel RT'den konformal RT'ye geçiş yan etkileri önemli oranda azaltmış olsa da hala ciddi morbidite oluşturmaktadır (4, 35).

Mukozit, disfaji, tükürük viskozitesinde ve miktarında değişiklik, ciltte eritem, burunda kuruluk akut gözlenen yan etkilerdir. Akut yan etkiler RT sonuna doğru artış göstermekte olup, yaklaşık olarak iki ay sonra azalmaktadır (3-5). Yutma, sağlıklı bireylere göre baş-boyun kanserli hastalarda anlamlı derecede uzamıştır (36). Postoperatif RT tükürük salgısını azaltarak ve faringeal kasları fibrozise uğratarak disfajiyi artırır (37, 38). Kserostomi ve disfaji tedavi sonrası dönemde hastalarda normal diyet toleransını azaltmıştır (39). Kserostomi, RT uygulanan hastalarda tükürük bezleri hasarına sekonder olarak en sık görülen yan etkidir (40, 41). Radyoterapi tükürük miktarının değişiminin yanı sıra tükürük bileşiminde de değişikliğe neden olur. Tükürük viskozitesi artarak, sarı veya kahverengi bir renk alabilir (42, 43).

Radyoterapinin baş-boyunda en korkulan yan etkisi olarak bilinen karotis patlaması sendromu ise nadir görülen fakat mortal seyreden bir klinik tablodur. Özellikle yeniden ışınlama gereken hastalarda risk daha fazladır. Tümörün karotisi

180°'den fazla sarması, cilt invazyonu, ülserasyon varlığı ve büyük tümör hacmi karotis kanaması ile ilişkili ana faktörlerdir (35, 44, 45).

2.6. Kserostomi ve Diğer Oral Komplikasyonlar

Günümüzde hiposalivasyon ve kserostominin iki ayrı terim olduğu kabul görmektedir (46). Kserostomi, ağız kuruluğu semptomunu ifade eder. Hiposalivasyon ise azalmış tükürük akış hızının tanımıdır (46, 47). Hiposalivasyon, kserostominin en yaygın etiyolojik faktörüdür (47).

Kserostomi; yaş, cinsiyet, ilaç kullanımı, otoimmün hastalıklar, diabetes mellitus ve baş-boyun bölgesine alınan RT'ye bağlı olarak meydana gelebilir. Kserostomi, yaygın olarak kullanılan birçok ilacın da önemli bir yan etkisidir (48). Örneğin trisiklik antidepresanların parasempatolitik etkilerine bağlı yan etkisi olarak kserostomi sıklıkla görülmektedir (48). Kserostomi riskinin alınan ilaç sayısı ile doğru orantılı olarak artması yaşlı insanların etkilenme ihtimalini artırmaktadır (49, 50). Kserostomi, baş-boyun bölgesine RT uygulanan hastalarda görülen en sık yan etkidir (40, 41). Tükürük bezlerinin yapısındaki seröz asiner hücreler, muköz asiner hücreler ve duktal hücrelere göre daha radyosensitiftirler (51, 52). Radyoterapi tükürük miktarının azalması ve bileşiminin değişmesine neden olur. Bikarbonat konsantrasyonunun azalmasına bağlı azalmış tamponlama kapasitesi, tükürük pH'sının azalması, değişen elektrolit seviyeleri ve artmış viskozite RT'nin sonucudur (51, 52). Tükürük akış hızındaki azalmaya ve yapısındaki değişikliğe bağlı olarak oral florada candida ve laktobasil türlerinde artış izlenir (51, 54). Bu değişim mukozit ile sık karışan oral kandidiyazise yol açabilir (55, 56).

Kserostomiye bağlı olarak hastalar tat kaybı, ağızda rahatsızlık hissi, konuşma ve yutma güçlüklerinden yakınırlar (57). Konuşma, çiğneme ve yutma mukozaların yetersiz lubrikasyonu nedeni ile olumsuz etkilenir (51). Azalan tükürük akışı, protez kullanımında zorluklara ve artmış sürtünmeye bağlı olarak oral mukozanın kolayca travmatize olmasına neden olur. Radyoterapiye bağlı erken bir yan etki olan oral radyasyon mukoziti de konuşma ve yutma güçlüğüne yol açar (51). Radyasyon mukoziti en şiddetli olarak yumuşak damakta görülür. Kronik alkolizm, sigara

kullanımı ve eş zamanlı KT uygulanmasında daha ciddi mukozal hasarlar izlenir (51, 58, 59).

Oral flora değişimi, değişen tükürük bileşenleri ve hiposalivasyon hızla ilerleyen radyasyon çürüklerine neden olabilir. Ek olarak mine ve dentinin radyasyona bağlı etkilendiği söylense de kserostomi radyasyon çürüklerindeki en önemli faktördür (51, 60).

Tat alma bozukluğu RT'nin tat tomurcuklarına direk etkisi, hiposalivasyon ve tükürük yapısının değişmesinin bir sonucudur. Azalan ve değişen tükürük akışı, tat tomurcuklarına ulaşan maddelerin çözünmesini ve taşınmasını azaltır. Tat kaybı genellikle RT'den sonra bir yıl içinde normale yakın bir seviyeye döner (51). Fakat tat kaybı RT sürecinde hastalarda rahatsız edici komplikasyonlardan olan iştah ve kilo kaybına yol açabilir (59, 61, 62).

Radyoterapi sonrasında kemik matriksinde değişiklikler diğer dokulara göre nispeten yavaş gelişir. Osteoblastlar, osteoklastlardan daha radyosensitif oldukları için litik aktivitede artış meydana gelir. Kemiğe RT uygulamanın en ciddi potansiyel komplikasyonu osteoradyonekrozdur. Osteoradyonekroz, RT'nin neden olduğu ağrının yanı sıra iskemik nekroza bağlı olarak kemik yapısının kaybıdır (61, 63). Mandibula maksilladan daha fazla etkilenir. Patogenezinde RT, travma ve enfeksiyon yer almaktadır. Travma, oral kavitedeki olası patojenlerin kemiğe geçişini kolaylaştırmaktadır. Radyoterapiye bağlı azalmış rejenerasyon yeteneği nedeni ile enfeksiyonun engellenmesi güç bir hal almıştır. Diş çekimi en yaygın travma nedenidir ve buna bağlı olarak doğal dişleri olan hastalarda osteoradyonekroz gelişme olasılığı daha yüksektir (64, 65). Diş çekimi sonrası yetersiz iyileşme süresi de osteoradyonekroz için bir risk faktörüdür (66). Osteoradyonekroz ışınlamayı takiben herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir fakat geç vakalar çoğunlukla travma sonrasında izlenirler (63, 67).

Radyoterapiye bağlı komplikasyonlar yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltmaktadır. Kserostomi malign hastalarda önemsiz bir semptom değildir ve hastaların yaşam kalitesi üzerinde göz ardı edilemez etkileri vardır (46). Yaşam kalitesindeki bozulmalar nedeniyle baş-boyun malignitesi olan tüm hastalarda psikoterapi ve duygusal destek önerilmektedir (5).

2.7. Radyoprotektif Etki ve Amifostin

İyonlaştırıcı radyasyon günümüzde tıbbi görüntülemede ve tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır (68, 69). İyonlaştırıcı radyasyon direkt etki ile DNA'yı hedef alır. İndirekt etki ile oluşan serbest radikaller, DNA hasarının yanı sıra apopitozu ve hücre içi işlev bozukluğunu indükleyerek hasara neden olurlar (70).

Doğal radyoprotektif ajanlar, radyasyon hasarını azaltmak için iyonlaştırıcı radyasyona maruziyetten önce veya sonra kullanılabilen doğal bileşiklerden elde edilen toksik olmayan veya düşük toksisitesi olan ürünlerdir (71). Doğal radyoprotektif ajanlara alternatif olarak farmakolojik ürünler bildirilmiştir. Amifostin bunlardan en çok bilineni ve klinik araştırmaları yapılmış olanıdır (72).

Soğuk savaş döneminde radyoprotektif ajanlar olası nükleer silahlardan korunmak için önemli bir role sahipti. Bu dönemde radyoprotektif madde arayışı hız kazanmıştır. Walter Reed Ordu Araştırma Enstitüsü'nde radyoprotektif 4000'den fazla madde test edilmiş olup içlerinde amifostinin (WR-2721) tolere edilebilir toksisite gösterdiği belirlenmiştir (72, 73). Amifostin hidrofilik yapıda olup kan-beyin bariyerini geçemez (74). Eliminasyon oranları dokular arasında farklılık göstermektedir. Amifostin, bazen amifostin tedavisinin kesilmesine bazen de RT'nin gecikmesine neden olacak yüksek oranda ciddi yan etki potansiyeline sahiptir (75).

Amifostinin yan etkilerinden çoğu doza bağımlıdır. Başlıca doz sınırlayıcı yan etkisi geçici hipotansiyondur. Bulantı, kusma, metalik tat, karaciğer enzimlerinde yükselme ve geçici hipokalsemi diğer yan etkilerindendir. Amifostin alan çoğu hasta beraberinde antiemetik de almaktadır. Amifostinin yaşamı tehdit edebilen ve dozdan bağımsız gelişen en önemli yan etkisi, anaflaktoid reaksiyon veya toksik epidermal nekroliz ile sonuçlanan alerjik reaksiyonlardır (75, 76). Subkutan uygulama, intravenöz uygulamaya göre daha az toksisiteye neden olmaktadır (77, 78).

Amifostin ilk olarak sisplatine bağlı nefrotoksisiteyi azaltmak için onay almıştır (72, 79). Baş-boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılan RT'nin neden olduğu mukozit ve kserostomi tedavi sürecini kesintiye uğratan yan etkilerdir (80). Radyoterapide güvenli şekilde verilecek olan radyasyon miktarını artırmak için, yan etkileri azaltan moleküllere ihtiyaç vardır (76). Amifostin, 1999 yılında baş-boyun kanserlerinde RT'nin neden olduğu kserostomiden korunmak için kullanım onayı

almıştır (75). Amifostinin, baş-boyun RT'sinin neden olduğu mukozit, kserostomi ve disfajide anlamlı ölçüde azalma sağladığı birçok çalışmada bildirilmiştir (81). Akciğer kanseri için konvansiyonel RT alan 146 hastada yapılan çalışmada akciğer fibrozisi ve özefajit insidansı amifostin ile önemli ölçüde azalmıştır (82). Amifostin ile ilgili diğer bir tartışma konusu ise tümör hücrelerinde de radyoprotektif etki göstermesidir (72). Son olarak amifostin ciddi yan etkileri ve tümör hücrelerinde radyoprotektif etkisi tartışmalı olmasından ötürü günümüzde yaygın olarak kullanılmamaktadır (75, 76).

2.8. Apigenin

Doğal olarak oluşan fitokimyasallardan olan flavonoidler polifenollerin en büyük grubudur (6, 83). Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir. Flavonoidler hemen hemen tüm bitkilerde bulunarak bitkinin metabolizmasının düzenlenmesi, zararlı güneş ışınlarından korunması gibi fonksiyonlarda görev alırlar (6).

Apigenin (4′,5,7-trihidroksiflavon) yaygın ve çok çalışılan fitokimyasallardan biridir. Apigenin esas olarak maydanoz, kereviz, soğan, mısır, pirinç, çay, portakal, elma, kekik, biberiye ve papatyada glikozile halde bulunur (6, 84, 85). Apigenin sarı renkli kristal yapıda bir katıdır (84). Apigenin yavaş emilim ve eliminasyon fazları ile yavaş metabolize olmaktadır. Farmakokinetik incelemeler sonucunda 91,8 saat olarak bulunan apigenin yarılanma ömrü de bu durumu doğrulamaktadır. Apigeninin atılımı esas olarak üriner sistem ile meydana gelmektedir. Radyoaktif apigenin uygulanan ratlarda on gün sonra verilen dozun yaklaşık olarak %25'inin mevcut olması, apigeninin yavaş metabolize olduğunu ve vücutta biriktiğini göstermektedir (85).

Literatürde flavonoidlerin en çok antienflamatuar ve antioksidan özellikleri bildirilmiştir (6). Apigeninin de potansiyel terapötik etkisinin altında yatan mekanizmalar literatürde bildirilmiştir. Apigenin farklı siklin bağımlı kinazların ve diğer genlerin ekspresyonunu düzenleyerek farklı evrelerde hücre döngüsünün durmasını sağlar (86). Sitokrom C'nin salınmasını kontrol ederek intrinsik apopitotik yolları regüle eder. Ayrıca apigenin malign hücrelerde Bcl-2, Bax, STAT-3 ve Akt proteinlerinin ekspresyonunu modüle ederek apopitozu aktive eder (87, 88). Apigenin siklooksijenaz-2 aktivitesini azaltır. Hücresel oksidatif strese karşı glutatyon sentaz,

katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimlerin ekspresyonunu artırır. Yapılan bir çalışmada apigeninin rat makrofajlarında proinflamatuar bir sitokin olan interlökin-6 (IL-6) düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (6). Apigeninin farelerde yapılan astım modellerinde, hava yolu duyarlılığını ve total IgE seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (89). Ayrıca literatürde cilt gençleştirme, diyabet, depresyon, multipl skleroz, amnezi ve osteoartrit ile ilgili yapılmış çalışmaları mevcuttur (6, 90- 93).

Apigeninin etki mekanizması net olmamakla birlikte terapötik etkilerini antioksidan ve antienflamatuar etkileri aracılığı ile gerçekleştirdiği düşünülmekte olup daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.9. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa

Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), başlangıçta tümörler üzerindeki litik etkileri ile tanınmasına rağmen sonradan enflamasyon ve immünolojik bozukluklara aracılık ettiği gösterilmiş güçlü bir proinflamatuar sitokindir (94, 95). TNF-α, transmembran TNF-α'nın TNF-α dönüştürücü enzim tarafından işlenmesinden sonra çözünür form olarak salınır. Çözünmüş TNF-α ile birlikte transmembran TNF-α da enflamatuar yanıtta rol almaktadır (95).

TNF-α, çeşitli hücre tipleri üzerinde pleiotropik etkiler göstermekle birlikte kronik inflamatuar hastalıkların patogenezinde de kritik bir öneme sahiptir (96). TNF-α'nın inflamatuar hastalıklardaki rolünün keşfinden sonra bu sitokini hedef alan çeşitli moleküllerin geliştirilmesinin yolu açılmıştır. Bu süreçte geliştirilen anti-TNF-α ajanları romatoid artrit, inflamatuar bağırsak hastalıkları ve psoriazis başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır (95, 97). TNF-α, bakteriyel, viral ve parazitik enfeksiyonlara karşı konak savunmasında aktif rol almaktadır (96, 97). Anti-TNF-α ajanları ile tedaviye başlanmadan önce tüm bireylerin tüberküloz açısından taranması önerilmektedir. Tedaviye bağlı olarak konak immünitesinin M. tuberculosis enfeksiyonuna karşı azaldığı bilinmektedir (95, 98).

Hem RT hem de KT'nin, kanser hastalarında primer tümörün tedavisinin yanı sıra sağlıklı dokular üzerinde de etkileri vardır. Bu istenmeyen etkiler dokularda inflamatuar yanıta neden olur. İnflamatuar yanıt sitokinler aracılığı ile düzenlenmektedir (99). TNF-α'da başlangıçta belirtildiği gibi inflamatuar süreçte rol

oynayan proinflamatuar bir sitokindir. KT ve RT'ye yanıt olarak dokulardan salgılanmaktadır. Citrin ve ark. yapmış oldukları çalışmada, baş-boyun malignitesi için RT alan hastalarda tükürük örneklemesi ile sitokin seviyelerini ölçmüştür. Artan radyasyon dozu ile birlikte IL-6, IL-8 ve TNF-α seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (100). Literatürde, proinflamatuar sitokinlerin değişim paterninin RT uygulanan dokularda akut enflamasyonu gösterebileceği bildirilmiştir (100, 101).

Sonuç olarak TNF-α immün yanıt ve enflamasyonda rol alan bir sitokindir. Radyoterapinin neden olduğu yan etkilerin azaltılması, sitokinlerin kontrolü ile mümkün olabilir (99). Gelecekte başta otoimmün hastalıklar olmak üzere kronik inflamatuar hastalık yelpazesinin etkin tedavisi için TNF-α üzerinde daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır (102).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı ve Çalışmanın Gerçekleştirildiği Kurumlar

Araştırmaya, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden 13.07.2021 tarihli 788 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra başlanmıştır. Bu araştırma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2022-8721 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Deney hayvanları, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Deney hayvanlarının bakımı da aynı kurumun laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Radyoterapi uygulaması Özel Meddem Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Kliniği'nde hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Sekiz haftalık, 40 adet 250-300 gram ağırlığındaki erkek, Wistar albino ratlar, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Tüm ratlar yeni ortamlarına alışabilmeleri için deneyden bir hafta önce başlanılarak 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış, %40 ila %60 arasında rölatif nem oranına ve 20 °C ila 24 °C arasında ortam sıcaklığına sahip odalarda barındırıldı (Resim 3.1). Ratların beslenme ihtiyaçları besin kısıtlaması olmadan Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nin kurallarına uygun olarak yapıldı.



Resim 3.1. Deneyde Kullanılan Ratların Barınma ve Beslenme Ortamı

Bir haftalık adaptasyon döneminden sonra, ratlar randomize ve eşit şekilde dağıtılarak dört deney grubu oluşturuldu (Resim 3.2.):

- *Grup 1 (RT Grubu):* Baş ve boyun bölgesini içerecek şekilde tek doz 16 Gray (Gy) RT uygulanması planlandı. Bu grup ile RT'nin submandibular bezde yaptığı değişikliklerin incelenmesi hedeflendi.
- *Grup 2 (RT - Apigenin – Dimetil Sülfoksit (DMSO) Grubu):* Radyoterapi uygulamasından iki gün önce tek doz intraperitoneal (i.p.) 25 mg/kg apigenin (Apigenin 100mg, Cayman Chemical, Michigan, Amerika Birleşik Devletleri) (1 ml DMSO içerisinde 15 mg apigenin çözünmüş şekilde) verilmesi planlandı. Bu grup ile RT sonrası submandibular bezde meydana gelen değişikliklere apigeninin etkisinin incelenmesi hedeflendi.
- *Grup 3 (RT - DMSO Grubu):* Radyoterapi uygulamasından iki gün önce tek doz i.p. 1,66 ml/kg DMSO (Dimetil Sülfoksit ≥99,9, Isolab Chemicals, Eschau, Almanya) verilmesi planlandı. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun RT sonrası submandibular bezdeki olası etkilerinin incelenmesi hedeflendi.
- *Grup 4 (Apigenin - DMSO Grubu):* Diğer gruplarla eş zamanlı olacak şekilde tek doz i.p. 25 mg/kg apigenin (1 ml DMSO içerisinde 15 mg apigenin çözünmüş şekilde) verilmesi planlandı. Bu gruba RT uygulanmayacaktır. Bu

grup ile sadece apigenin uygulanmasının submandibular bezdeki etkilerinin incelenmesi hedeflendi.



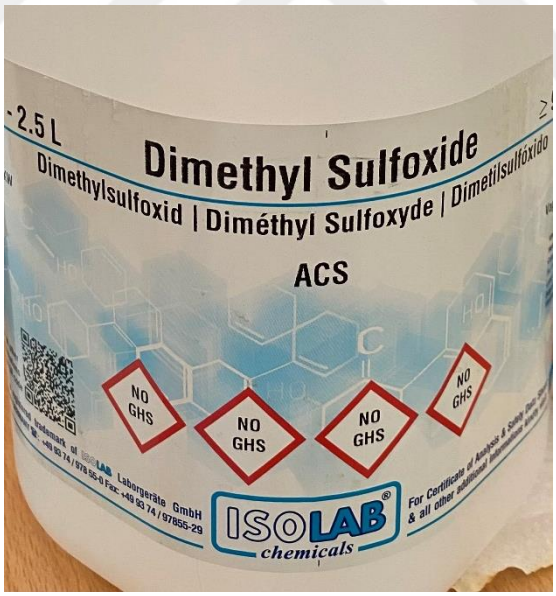
Resim 3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

3.3. Apigeninin Hazırlanması ve İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulamaları

Apigenin, DMSO veya etanol içerisinde çözündürülerek i.p. uygulanabilen bir maddedir. Çalışmamızda üretici talimatlarına uygun olarak apigeninin enjeksiyona hazır hale getirilmesi amacıyla 15 mg apigenin (Resim 3.3) için çözücü olarak 1 ml DMSO (Resim 3.4) kullanıldı (103). Apigeninin yarı ömrünün 91,8 saat olması üzerine çalışmamızda RT'den 48 saat önce uygulama yapılmasına karar verilmiştir (85). Grup 2 ve Grup 4'te 25 mg/kg apigenin yukarıda belirtilen oranda DMSO içerisinde çözündürülerek RT'den 48 saat önce i.p. olarak uygunlandı. Grup 3'te ise diğer gruplar ile standardizasyon sağlanması için 25 mg/kg apigenin – DMSO çözeltisine karşılık gelen 1,66 ml/kg DMSO i.p. olarak uygulandı (Resim 3.5).



Resim 3.3. İntraperitoneal Olarak Uygulanan Apigeninin Ticari Preparatı



Resim 3.4. Çözücü Olarak Kullanılan ve İntraperitoneal Olarak Uygulanan Dimetil Sülfoksitin Ticari Preparatı



Resim 3.5. Apigenin-DMSO Çözeltisinin İntraperitoneal Olarak Uygulanması

3.4. Radyoterapi Uygulanması

Yukarıda belirtilen i.p. enjeksiyonlardan 48 saat sonra uygun transfer koşulları sağlanarak RT uygulanacak olan Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün Özel Meddem Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Kliniğine transferi sağlandı. Ratlara, 90 mg/kg dozunda ketamin (Ketasol %10, Richter Pharma, Wels, Avusturya) ve 10 mg/kg dozunda ksilazin (Rompun %2, Bayer, Leverkusen, Almanya) i.p. yoldan uygulanarak genel anestezi sağlandı (Resim 3.6.). Genel anestezisi sağlanan ratlar onlu gruplar halinde strafor platform üzerine supin pozisyonda dört ekstremitesinden flaster yardımı ile tespit edildi (Resim 3.7). Baş ve boyun bölgeleri 40 × 10 cm'lik alana yerleşecek şekilde ratlara pozisyon verildi. Kaynak-eksen mesafesi tekniği ile kaynak-yüzey mesafesi 100 cm olacak şekilde Varian marka lineer akseleratör (Clinac DMX, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri) ile RT uygulandı. Radyoterapi, 6 MV foton demetleri ile orta hat derinlikleri kullanılarak ön alandan 40×10 cm^2 tek ön alandan, 1,5 cm derinliğe ulaşacak şekilde planlandı. Tek doz 16 Gy RT uygulandı (Resim 3.8, Resim 3.9).



Resim 3.6. İntraperitoneal Olarak Uygulanan Ketamin Ve Ksilazinin Ticari Preparatları



Resim 3.7. Strafor Platform Üzerine Supin Pozisyonda Tespit Edilen Ratlar



Resim 3.8. Lineer Akseleratör



Resim 3.9. Radyoterapi Uygulanan Ratlar

3.5. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi ve Submandibular Bezlerin Eksizyonu

Radyoterapinin akut etkilerinin histopatolojik olarak gözlenmesi için en az 24 saat geçmesi gerekmektedir. Biz de çalışmamızda RT'nin akut etkilerinin net gözlemlenmesi için 48. saatte sakrifikasyon yapmayı planladık (104, 105). Radyoterapi uygulamasından 48 saat sonra i.p. olarak 270 mg/kg dozunda ketamin ve 30 mg/kg dozunda ksilazin uygulanarak genel anestezi sağlanmasını takiben tüm gruplardaki ratlar dekapite edilerek sakrifiye edildi (Resim 3.10.). Sakrifikasyon tamamlandıktan sonra ratlar supin pozisyonda strafor platform üzerinde tespit edildi (Resim 3.11). Tüm ratlara orta hattan vertikal insizyon yapıldı (Resim 3.12). İnsizyon sonrasında künt diseksiyon ile bilateral submandibular bezin etrafı diseke edilerek serbestlendikten sonra (Resim 3.13), her iki submandibular bez eksize edilerek %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu içine koyuldu.



Resim 3.10. Sakrifikasyon Öncesinde İntraperitoneal Anestezik Madde Uygulanması



Resim 3.11. Strafor Platform Üzerine Tespit Edilen Sakrifiye Edilmiş Rat



Resim 3.12. Vertikal İnsizyon Sonrasında Diseksiyon Yapılmış Rat



Resim 3.13. Submandibular Bezlerin Eksizyonu

3.6. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonu içine koyuldu. Doku örnekleri laboratuvara kör şekilde teslim edildi. Formaldehitin doku içine daha iyi penetre olması için doku üzerinde ince kesiler yapıldı. İki günlük formaldehit tespitinin ardından submandibular bez örnekleri doku takip kasetlerine alındı. Tüm kasetler büyük bir kavanoza alınarak tekrar formaldehit solüsyonu içine atıldı. Kasetler bir gün daha formaldehit solüsyonu içinde tespit için bekletildikten sonra tüm kasetler ertesi gün akşamüzeri rutin histopatolojik doku takibi için tam otomatik doku takip cihazının sepetine dizilerek (Leica ASP300S, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) cihaza yerleştirildi. Cihaz günlük doku takip programına ayarlanarak gece boyunca doku takibi işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla içlerinde submandibular bez dokuları bulunan doku takip kasetleri cihaz içerisinde gece boyunca %70'lik düşük dereceli alkollerden başlanarak %100'lük yüksek dereceli alkollere geçirildi ve dokular içindeki sular alındı. Ardından iki adet ksilol serisinden geçirilerek dokulardaki yağın alınması ve daha sonra sıcak parafinden geçirilerek doku boşluklarına parafinin dolması sağlandı. Ertesi sabah doku takibi tamamlanan submandibular bez doku örneklerinin blokajları yapıldı. Bu amaçla doku takip kasetleri ototeknikon cihazından alınarak blokaj işlemi için doku gömme

cihazının (Leica Histocore Arcadia H, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) sıcak bölümüne alındı ve parafine blokajları yapıldı. Bu işlemin ardından bloklar parafin cihazının soğuk tabla bölümüne alındı ve burada bir saat tutularak parafinin tamamen donması sağlandı. Bloklardan 4-5 saat soğutulduktan sonra tam otomatik mikrotom (Leica 2155 model rotary mikrotom, Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) ile 5µm kalınlığında iki seri kesit alındı. Kesitler kurumaları için bir gece oda ısısında bekletildi.

Ertesi gün tüm kesitler hematoksilen-eozin (HE) boyama için köprülere dizilerek boyama işlemine geçildi. Boyama için öncelikle kesitler üzerindeki parafin kalıntılarının erimesi ve kesitlerin lam üzerine daha iyi yapışması için iki saat süreyle 60^0 C'lik etüvde tutuldu. Tamamen kuruyan ve parafinleri eritilen kesitler 30'ar dakika süre ile üç ayrı ksilol serisinden geçirilerek üzerlerindeki parafinin kalıntıları tamamen uzaklaştırıldı. Bu işlemin ardından kesitler yüksek dereceli alkollerden düşük dereceli alkollere (sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik) geçirilerek dokular hidrate edildi. Daha sonra hematoksilenle 15 dakika boyanıp distile su ile yıkandıktan sonra eozinle üç dakika süreyle boyaması yapıldı. Bunun ardından düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere geçirilerek (sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük) dokuların dehidre edilmesi sağlandı. Ardından ksilol içinde parlatılan kesitlerin üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı. Boyaması tamamlanan preparatlar bir gün kurutulduktan sonra ışık mikroskop altında incelenmeye hazır hale getirildi. Işık mikroskobunda (Olympus CX21, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) incelenen preparatlardan kamera (Olympus DP26, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ile mikroskobik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) kullanıldı.

Histopatolojik incelemelerde hücre nekrozu, asiner hasar, duktal hasar ve vakoulizasyona göre skorlama yapıldı. En belirgin bulgu olan vakuolizasyon Kim ve arkadaşlarının yaptığı şekilde vakuolizasyonlu asini hücre sayılarına göre modifiye edilerek skorlandı. Vakuolizasyon skorlamasında bir mikroskop sahasındaki vakuollü hücre sayısına göre 0; 0–1 hücre, 1; 2–10 hücre, 2; 11–20 hücre, 3; 21 hücreden fazla hücre olarak değerlendirildi (106). Benzer şekilde nekroz, asiner hasar ve duktal hasar da 0-3 arasında lezyonların şiddetine göre semikantitatif olarak skorlandı (105, 107).

Histopatolojik skorlamalar 20'lik objektif altında yapıldı ve 0-3 arasında değerler kullanıldı. Morfometrik analizler ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.

Parafin bloklardan histopatolojik inceleme için kesitler alınırken bir seri kesit de immünohistokimyasal analiz için alındı ve kesitler polilizinli lamlara çekildi. İmmunohistokimyasal inceleme için kesitler TNF-α ekspresyonlarının değerlendirilmesi için streptavidin-biyotin kompleks peroksidaz yöntemine göre boyandı. Bu inceleme için primer ve sekonder antikorlar (Abcam, Cambridge, İngiltere) kullanıldı. Kesitlerde TNF-α (Anti-TNF alpha antibody [EPR21753-109] (ab205587) 1/100 dilüe, Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık) ekspresyonlarının saptanabilmesi amacıyla immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla öncelikle kesitler 45^0 C sıcaklıktaki etüvde bir gece boyunca tutularak kesitlerin lam üzerine daha iyi yapışması ve kuruması sağlandı. Daha sonra boyama sepetlerindeki kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden geçirildi bu amaçla ksilolden geçirilen kesitlerin üzerindeki parafin kalıntıları uzaklaştırıldı ve yüksek dereceli alkollerden düşük dereceli alkollere geçirilerek (%100'lükten %70'lik alkole) sonrasında kesitler hidrate edildi. Tüm kesitler, son alkolden alındıktan sonra distile su içinde 10 dakika süre ile tutularak yıkandı. Bu aşamanın ardından doku kesitleri nemli kamara içine alındı ve sitrat tampon solüsyonu ile mikrodalga fırında kaynatma işlemi dışındaki tüm aşamalar nemli kamara içinde gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal boyama işlemi sırasında öncelikle kesitler endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek amacıyla metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu içinde 20 dakika süre ile bekletildi. Ardından doku kesitleri mikrodalga fırında kaynatmak için sitrat tamponlu solüsyonunun içerisine alındı ve beşer dakika süreyle iki defa kaynatıldı. Bu işlemin ardından kesitler iki defa fosfat tamponlu salin ile yıkandı. Kesitlerdeki nonspesifik bağlanmaları uzaklaştırmak için kesitler üzerine normal keçi serumu damlatılarak 45 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından yıkama yapılmadan protein bloğun fazlası atıldı ve kesitler üzerine primer antikor konularak tüm gece boyunca +4°C'de buzdolabında tutuldu. Ertesi sabah kesitler tekrar aynı şekil ve süre ile fosfat tamponlu salin içinde yıkandı ve ardından kesitlere streptavidin damlatılarak 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu süre

sonunda fosfat tamponlu salin ile yine iki kez yıkandı. Ardından kesitlere biyotinli serum damlatılarak 30 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı ve sonra tekrar fosfat tamponlu salin içinde iki kez yıkamaları gerçekleştirildi. Bu işlemin ardından submandibular bez dokusu kesitlerin üzerine 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) kromojen damlatılarak şekillenen reaksiyonun görünür hale getirildi. Daha sonra Harris hematoksilen boyası ile karşıt boyama yapılarak immünohistokimyasal yöntem tamamlandı. Tüm bu aşamaların ardından kesitlerin üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve bir gece oda sıcaklığında kurutulduktan sonra ışık mikroskobunda incelendi.

İmmunohistokimyasal boyanma şiddeti 0 ile 3 arasında semikantitatif olarak skorlandı, 0= negatif, 1= hafif ekspresyon, 2= orta ekspresyon ve 3= şiddetli ekspresyon olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal skorlamalar için Image J 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Amerika Birleşik Devletleri) programı kullanıldı.

3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

Veriler, IBM SPSS.23 (International Business Machines Corporation, New York, Amerika Birleşik Devletleri) programına aktarılarak istatistiksel analizlerle değerlendirildi. İstatistiksel analizlere geçmeden önce veri giriş hatasının olmaması ve parametrelerin beklenen aralıkta olup olmadığı ile ilgili kontroller yapıldı. Kategorik değişkenlerin tanımlanmasında sayı (n) ve yüzde (%) değerleri verildi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler ki-kare testi ile incelendi. Bütün analizlerde anlamlılık düzeyi olarak $p<0.05$ değeri kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma kapsamında her grupta 10 adet olacak şekilde toplam 40 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Grup 4'teki ratlara RT uygulanmamış, sadece apigenin DMSO içerisinde çözündürülerek i.p. olarak verilmiştir. Bu grubun oluşturulma nedeni apigenin ve DMSO'nun doku üzerinde sonuçları etkileyen olumsuz bir değişime yol açıp açmadığının tespit edilmesidir. Yapılan histopatolojik ve immünhistokimyasal analizlere göre nekroz, asiner hasar, duktal hasar ve vakuolizasyon açısından tüm ratlar 0 olarak skorlanmıştır. TNF-α ekspresyonu açısından ise yalnızca bir rat 1 olarak skorlanmışken, diğer ratlar 0 olarak skorlanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Grup 4'e Ait Histopatolojik ve İmmünhistokimyasal İnceleme Skorları

Parametreler	Skor	Grup 4 (n = 10)
Nekroz	0	10 (%100)
	1	0 (%0)
	2	0 (%0)
	3	0 (%0)
Asiner Hasar	0	10 (%100)
	1	0 (%0)
	2	0 (%0)
	3	0 (%0)
Duktal Hasar	0	10 (%100)
	1	0 (%0)
	2	0 (%0)
	3	0 (%0)
Vakuolizasyon	0	10 (%100)
	1	0 (%0)
	2	0 (%0)
	3	0 (%0)
TNF-α Ekspresyonu	0	9 (%90)
	1	1 (%10)
	2	0 (%0)
	3	0 (%0)

Tablo 4.1'de sunulan sonuçlara göre apigenin ve DMSO'nun doku üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı söylenebilir. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün histopatolojik ve immünhistokimyasal bulgular açısından karşılaştırma sonuçları Tablo 4.2'de sunulmuştur.

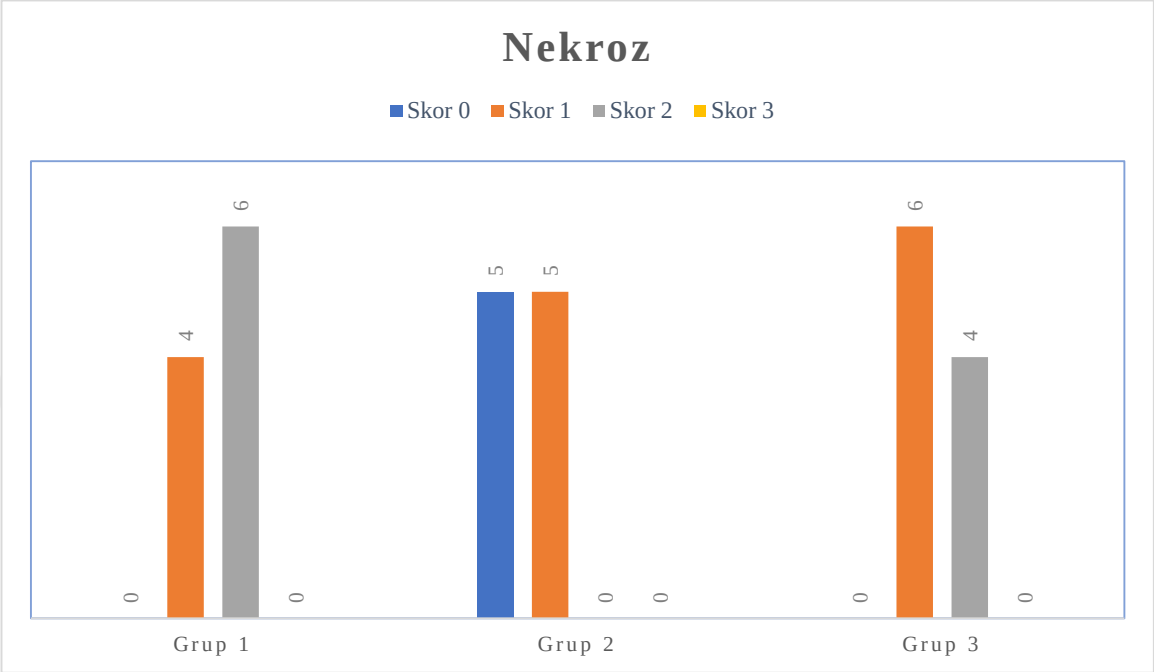
Tablo 4.2. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün Histopatolojik ve İmmünhistokimyasal Bulgular Açısından Karşılaştırılması

	Skor	Grup 1 (n = 10)	Grup 2 (n = 10)	Grup 3 (n = 10)	*p**
Nekroz	0	0 (%0)	5 (%50)	0 (%0)	0,003†
	1	4 (%40)	5 (%50)	6 (%60)	0,004‡
	2	6 (%60)	0 (%0)	4 (%40)	0,328§
	3	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0,011¶
Asiner Hasar	0	0 (%0)	3 (%30)	0 (%0)	0,007†
	1	3 (%30)	7 (%70)	5 (%50)	0,003‡
	2	7 (%70)	0 (%0)	5 (%50)	0,325§
	3	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0,016¶
Duktal Hasar	0	0 (%0)	3 (%30)	1 (%10)	0,179†
	1	5 (%50)	6 (%60)	6 (%60)	0,056‡
	2	5 (%50)	1 (%10)	3 (%30)	0,451§
	3	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0,368¶
Vakuolizasyon	0	0 (%0)	5 (%50)	0 (%0)	<0,001†
	1	1 (%10)	5 (%50)	4 (%40)	0,001‡
	2	2 (%20)	0 (%0)	6 (%60)	0,005§
	3	7 (%70)	0 (%0)	0 (%0)	0,004¶
TNF-α Ekspresyonu	0	0 (%0)	4 (%40)	1 (%10)	<0,001†
	1	0 (%0)	6 (%60)	7 (%70)	<0,001‡
	2	3 (%30)	0 (%0)	2 (%20)	0,002§
	3	7 (%70)	0 (%0)	0 (%0)	0,144¶

*: Ki-kare Testi
†: Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ün karşılaştırılması; ‡: Grup 1 ve Grup 2'nin karşılaştırılması; §: Grup 1 ve Grup 3'ün karşılaştırılması; ¶: Grup 2 ve Grup 3'ün karşılaştırılması

Nekroz parametresi açısından sadece RT uygulanan ratlardan oluşan Grup 1'deki ratların dört tanesi skor 1, altı tanesi ise skor 2 olarak sınıflandırılmıştır. Bu grupta hiçbir rat skor 0 ve skor 3 olarak sınıflandırılmadı. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla DMSO içerisinde çözündürülen apigenin uygulanan Grup 2'de ise beş rat skor 0, beş rat ise skor 1 olarak sınıflandırıldı. Bu grupta skor 2 ve skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla sadece DMSO uygulanan ratlardan oluşan Grup 3'te altı rat skor 1, dört rat skor 2 olarak sınıflandırılmıştı. Bu grupta skor 0 ve skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Yapılan istatistiksel analizde üç grubun karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi (p = 0,003). Grupların ikili karşılaştırılmasında Grup 1 ve Grup 2, Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark varken (p değerleri sırasıyla: 0,004, 0,011), Grup 1 ve Grup 3 arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (p = 0,328). Bu sonuçlara göre apigenin ve DMSO uygulanan ratlardaki nekroz skorları diğer iki gruba göre anlamlı olarak daha düşüktür.

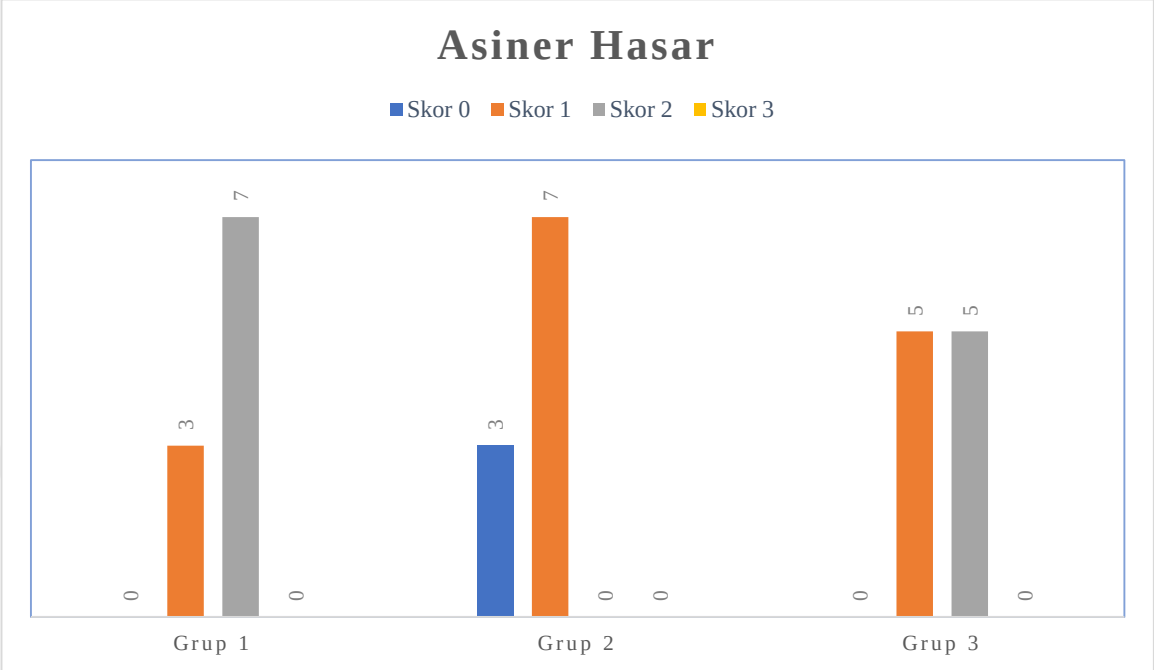
Tek başına DMSO uygulamasının RT uygulanan ratlarda nekroz skorunda anlamlı değişiklik yapmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2, Grafik 4.1).



Grafik 4.1. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Nekroz Parametresine Ait Skorların Dağılımı

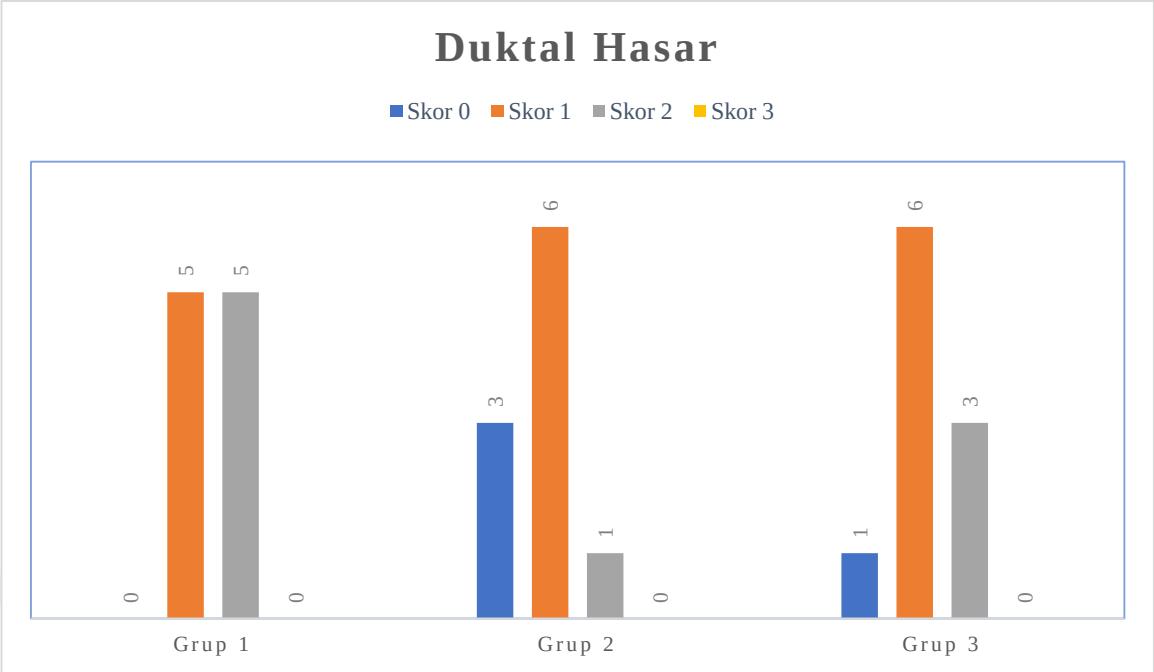
Asiner hasar parametresi açısından sadece RT uygulanan ratlardan oluşan Grup 1'deki ratların üç tanesi skor 1, yedi tanesi ise skor 2 olarak sınıflandırılmıştır. Bu grupta hiçbir rat skor 0 ve skor 3 olarak sınıflandırılmamıştır. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla DMSO içerisinde çözündürülen apigenin uygulanan Grup 2'de ise üç rat skor 0, yedi rat ise skor 1 olarak sınıflandırıldı. Bu grupta skor 2 ve skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla sadece DMSO uygulanan ratlardan oluşan Grup 3'te beş rat skor 1, beş rat skor 2 olarak sınıflandırılmıştı. Bu grupta Skor 0 ve Skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Yapılan istatistiksel analizde üç grubun karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p = 0,007$). Grupların ikili karşılaştırılmasında Grup 1 ve Grup 2, Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark varken (p değerleri sırasıyla: 0,003, 0,016), Grup 1 ve Grup 3 arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p = 0,325$). Bu sonuçlara göre apigenin ve DMSO uygulanan ratlardaki asiner hasar skorları diğer iki gruba göre anlamlı olarak daha

düşüktür. Tek başına DMSO uygulamasının RT uygulanan ratlarda asiner hasar skorunda anlamlı değişiklik yapmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2, Grafik 4.2).



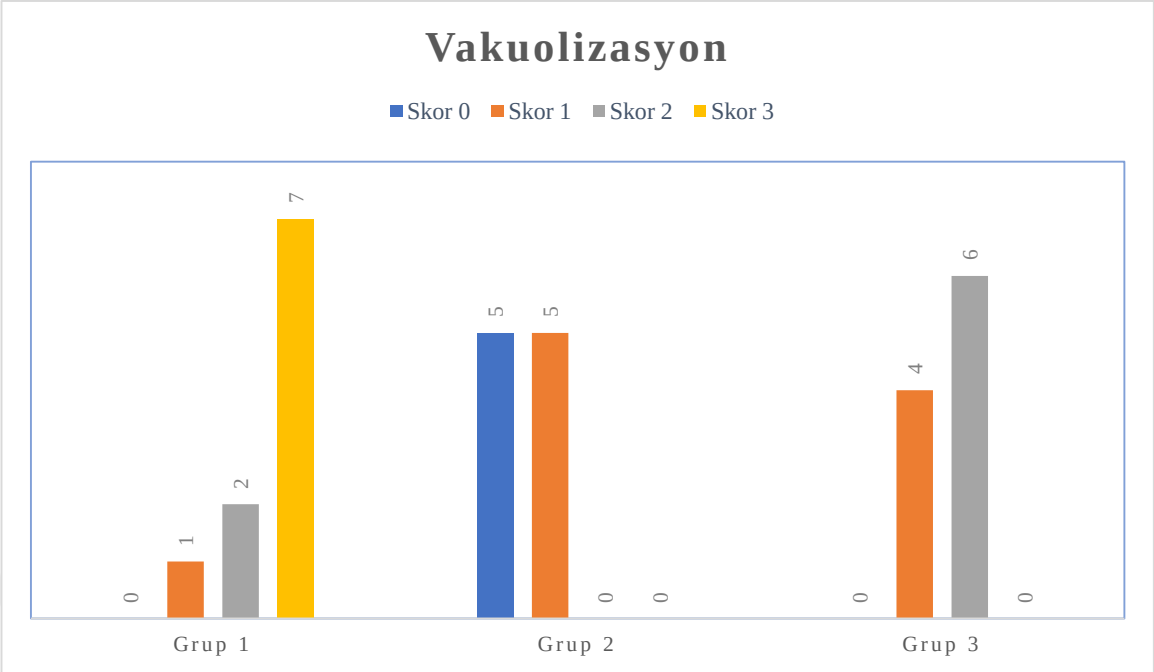
Grafik 4.2. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Asiner Hasar Parametresine Ait Skorların Dağılımı

Duktal hasar parametresi açısından sadece RT uygulanan ratlardan oluşan Grup 1'deki ratların beş tanesi skor 1, beş tanesi ise skor 2 olarak sınıflandırılmıştır. Bu grupta hiçbir rat skor 0 ve skor 3 olarak sınıflandırılmamıştır. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla DMSO içerisinde çözündürülen apigenin uygulanan Grup 2'de ise üç rat skor 0, altı rat skor 1, bir rat ise skor 2 olarak sınıflandırıldı. Bu grupta skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla sadece DMSO uygulanan ratlardan oluşan Grup 3'te bir rat skor 0, altı rat skor 1, üç rat ise skor 2 olarak sınıflandırılmıştı. Bu grupta skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Yapılan istatistiksel analizde üç grubun karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p = 0{,}179$). (Tablo 4.2, Grafik 4.3)



Grafik 4.3. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Duktal Hasar Parametresine Ait Skorların Dağılımı

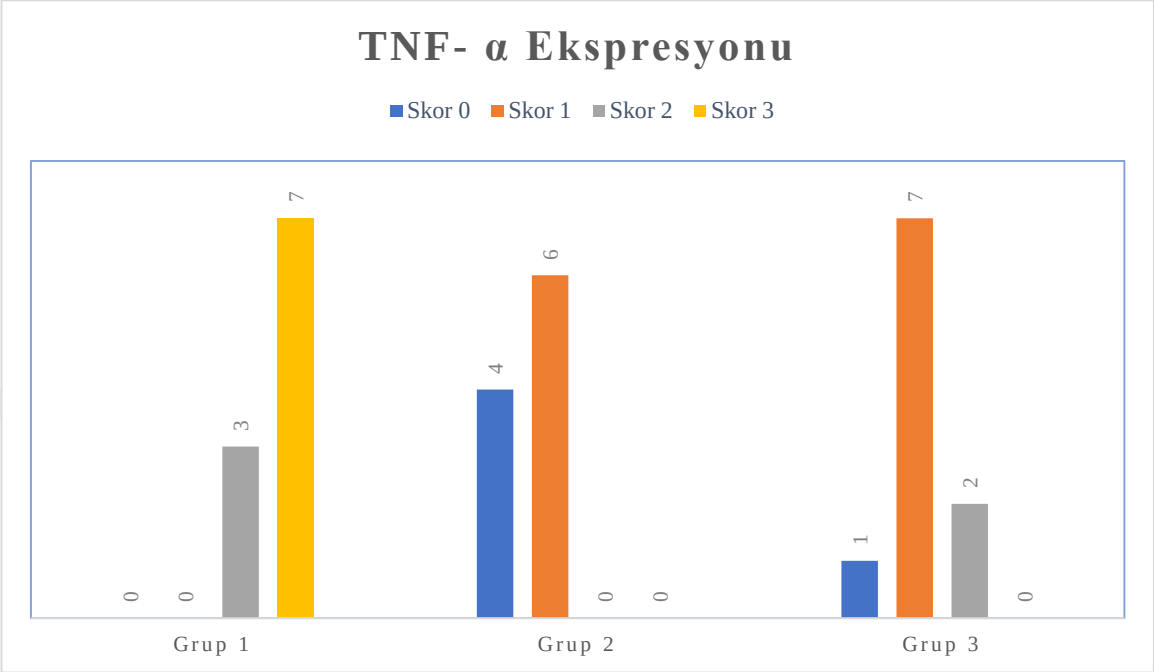
Vakuolizasyon parametresi açısından sadece RT uygulanan ratlardan oluşan Grup 1'deki ratların bir tanesi skor 1, iki tanesi skor 2, yedi tanesi ise skor 3 olarak sınıflandırılmıştır. Bu grupta hiçbir rat skor 0 olarak sınıflandırılmamıştır. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla DMSO içerisinde çözündürülen apigenin uygulanan Grup 2'de ise beş rat skor 0, beş rat ise skor 1 olarak sınıflandırıldı. Bu grupta skor 2 ve skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla sadece DMSO uygulanan ratlardan oluşan Grup 3'te dört rat skor 1, altı rat skor 2 olarak sınıflandırılmıştı. Bu grupta skor 0 ve skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Yapılan istatistiksel analizde üç grubun karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p < 0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında Grup 1 ve Grup 2, Grup 1 ve Grup 3, Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p değerleri sırasıyla: 0,001, 0,005, 0,004). Bu sonuçlara göre apigenin ve DMSO uygulanan ratlardaki asiner hasar skorları diğer iki gruba göre anlamlı olarak daha düşüktür. Tek başına DMSO uygulamasının da RT uygulanan ratlarda vakuolizasyon skorunda anlamlı düzeyde düşüş oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2, Grafik 4.4).



Grafik 4.4. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te Vakuolizasyon Parametresine Ait Skorların Dağılımı

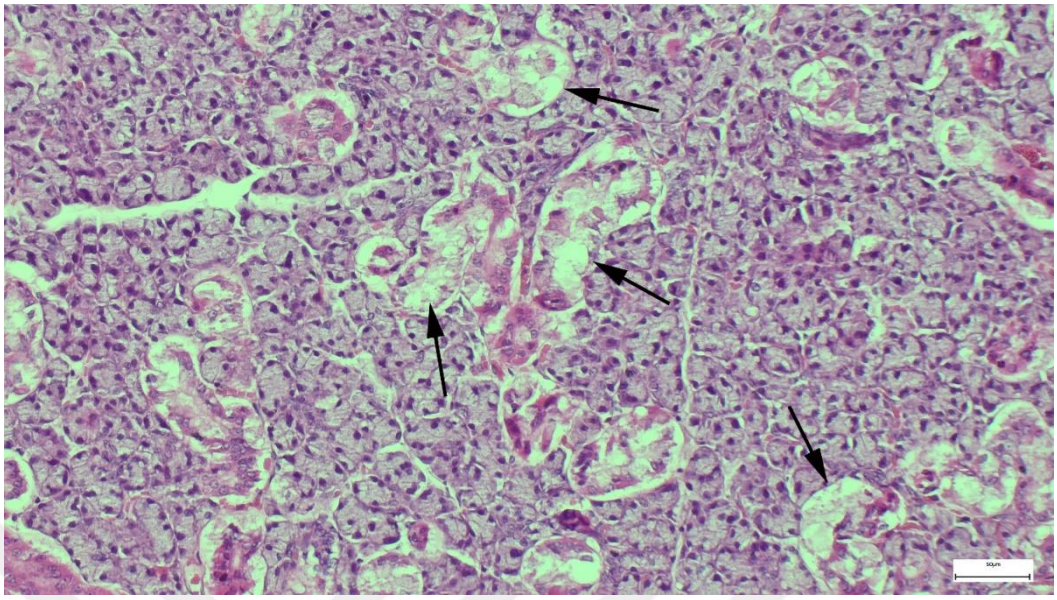
TNF-α ekspresyonu parametresi açısından sadece RT uygulanan ratlardan oluşan Grup 1'deki ratların üç tanesi skor 2, yedi tanesi ise skor 3 olarak sınıflandırılmıştır. Bu grupta hiçbir rat skor 0 ve skor 1 olarak sınıflandırılmadı. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla DMSO içerisinde çözündürülen apigenin uygulanan Grup 2'de ise dört rat skor 0, altı rat ise skor 1 olarak sınıflandırıldı. Bu grupta skor 2 ve skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Radyoterapi uygulaması öncesinde i.p. yolla sadece DMSO uygulanan ratlardan oluşan Grup 3'te bir rat skor 0, yedi rat skor 1, iki rat skor 2 olarak sınıflandırılmıştı. Bu grupta skor 3 olarak sınıflandırılan rat bulunmamaktaydı. Yapılan istatistiksel analizde üç grubun karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p < 0,001$). Grupların ikili karşılaştırılmasında Grup 1 ve Grup 2, Grup 1 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark varken (p değerleri sırasıyla: <0,001, 0,02), Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p = 0,144$). Bu sonuçlara göre apigenin ve DMSO uygulanan ratlardaki ve tek başına DMSO uygulanan ratlardaki TNF-α ekspresyonu Grup 1'e göre anlamlı olarak daha düşüktür. Fakat apigenin ve DMSO

uygulamasının tek başına DMSO uygulanan gruba göre TNF-α ekspresyonu skorunda anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2, Grafik 4.5).

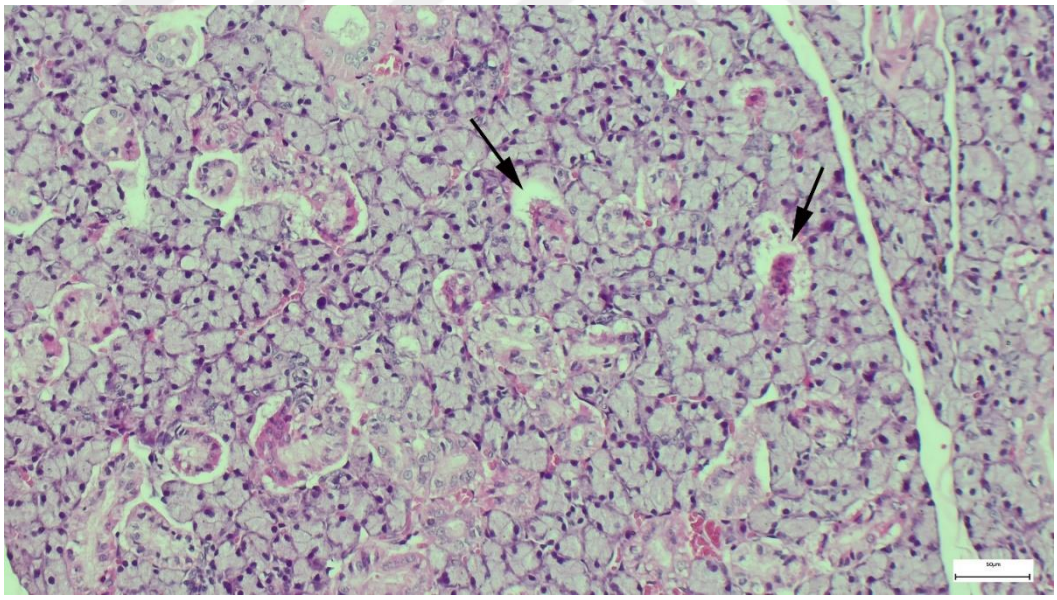


Grafik 4.5. Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te TNF-α Ekspresyonu Parametresine Ait Skorların Dağılımı

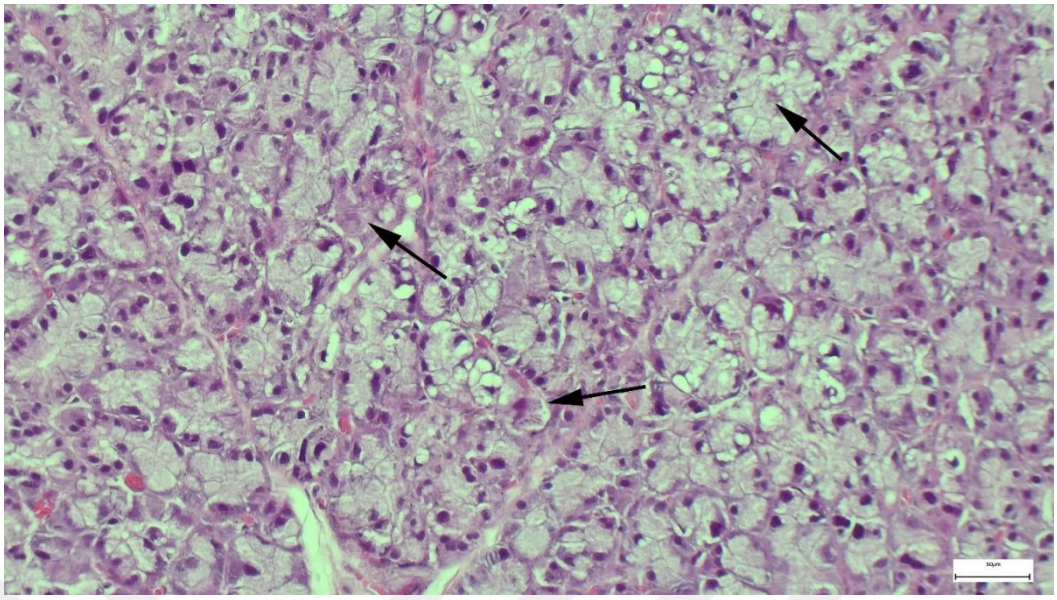
Özetle, submandibular bezlerin gruplara göre histopatolojik bulguları incelendiğinde Grup 1'de damarlarda şiddetli hiperemi, bazı ratlarda kanama odakları, bez asinilerinde vakuolleşme ve hem duktal hem de asiner hücrelerde nekroz ile karakterize dejeneratif değişiklikler dikkati çekti. Bu gruptaki bazı ratların submandibular bezlerinde hafif yangısal hücre infiltrasyonları da gözlendi (Şekil 4.1.-4.5.). Grup 2'de tüm patolojik bulgularda belirgin bir iyileşme görüldü (Şekil 4.6.). Grup 3'te bir ratta patolojik bulgularda azalma gözlendi ancak bu iyileşme Grup 2'ye göre daha hafifti (Şekil 4.7., 4.8.). Grup 4'teki ratların submandibular bezleri normal doku histolojisi gözlendi. Bu gruptaki ratlarda herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Şekil 4.9., 4.10.). Grup 1'de epitel hücrelerinde belirgin şekilde artmış TNF-α ekspresyonları tespit edilmişken, Grup 2'de bu ekspresyon belirgin şekilde azalmıştı, bu azalma Grup 3'teki azalmadan daha fazlaydı. Grup 4'te TNF-α ekspresyonu açısından pozitif immünreaksiyona rastlanmadı (Şekil 4.11.-4.14.).



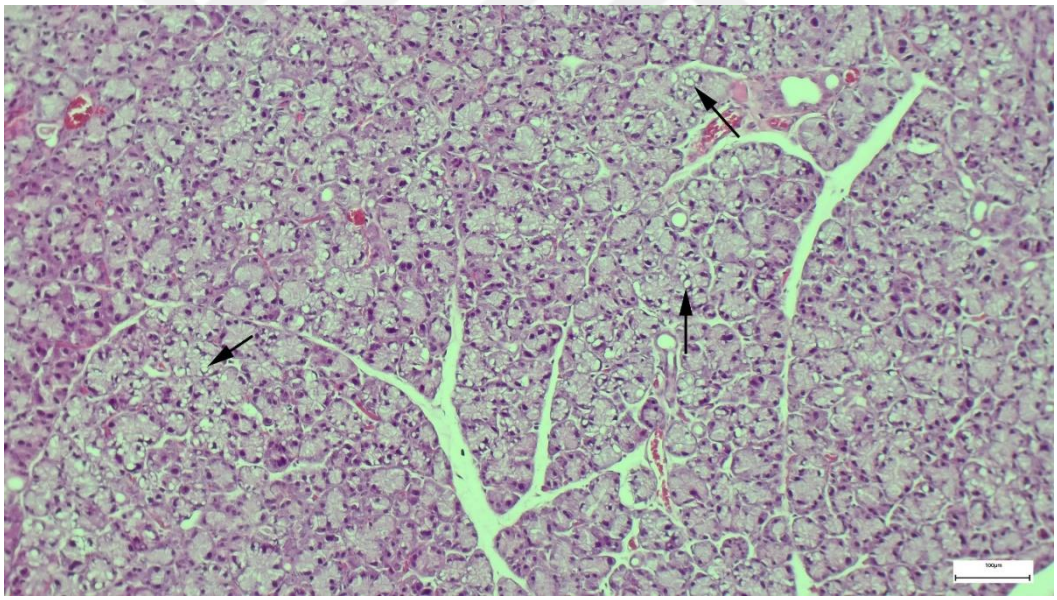
Şekil 4.1. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratın Submandibular Bezinde Nekrotik Alanlar İçeren Çok Belirgin Duktal Hasar (Oklar) (Hematoksilen-Eozin, Bar=50µm, 200×)



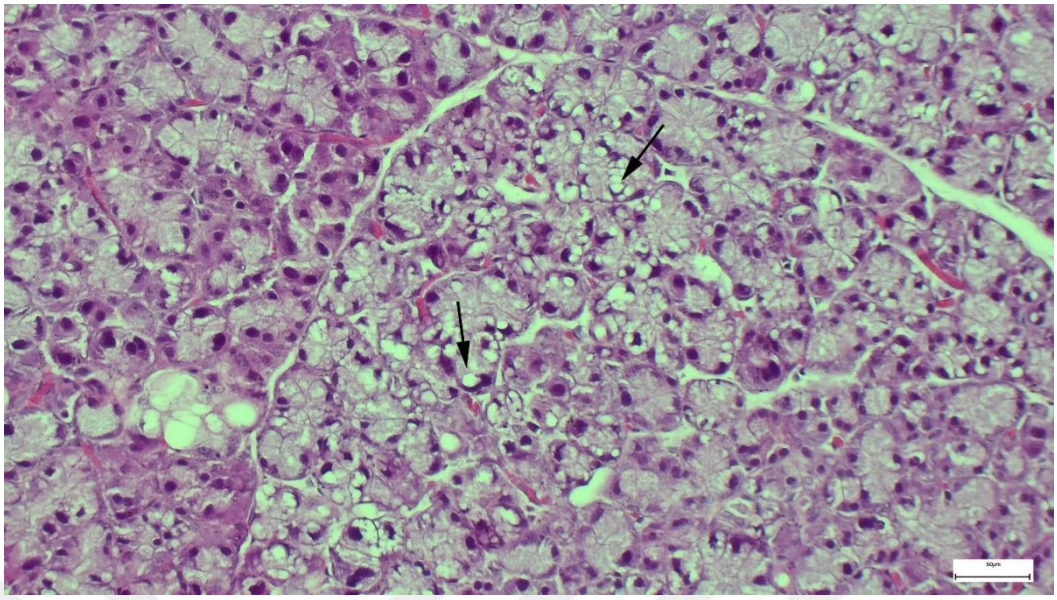
Şekil 4.2. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratın Submandibular Bezinde Duktal Hasar (Oklar) (Hematoksilen-Eozin, Bar=50µm, 200×)



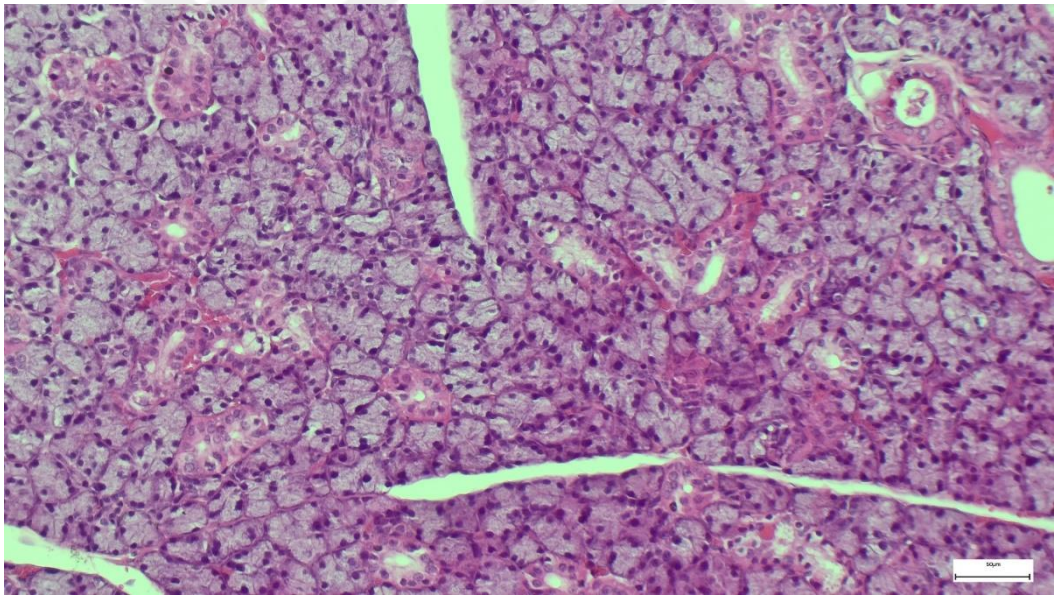
Şekil 4.3. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratta Asiner Hasar ve Nekrozlar (Oklar) (Hematoksilen-Eozin, Bar=50µm, 200×)



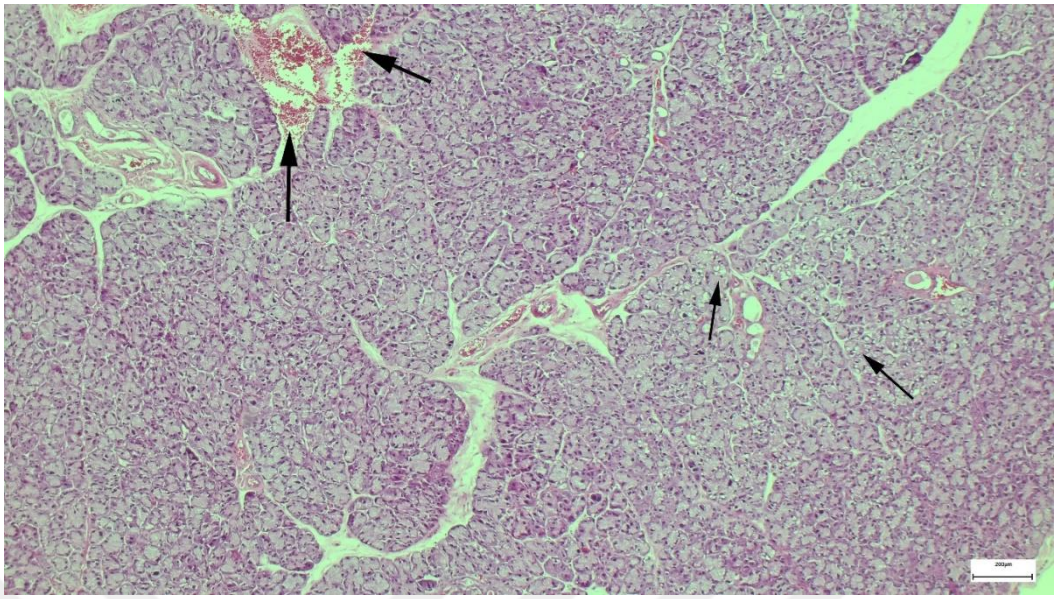
Şekil 4.4. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratta Submandibular Bezde Çok Sayıda Hücrede Belirgin Vakuolizasyonlar (Oklar) (Hematoksilen-Eozin, Bar=100µm, 100×)



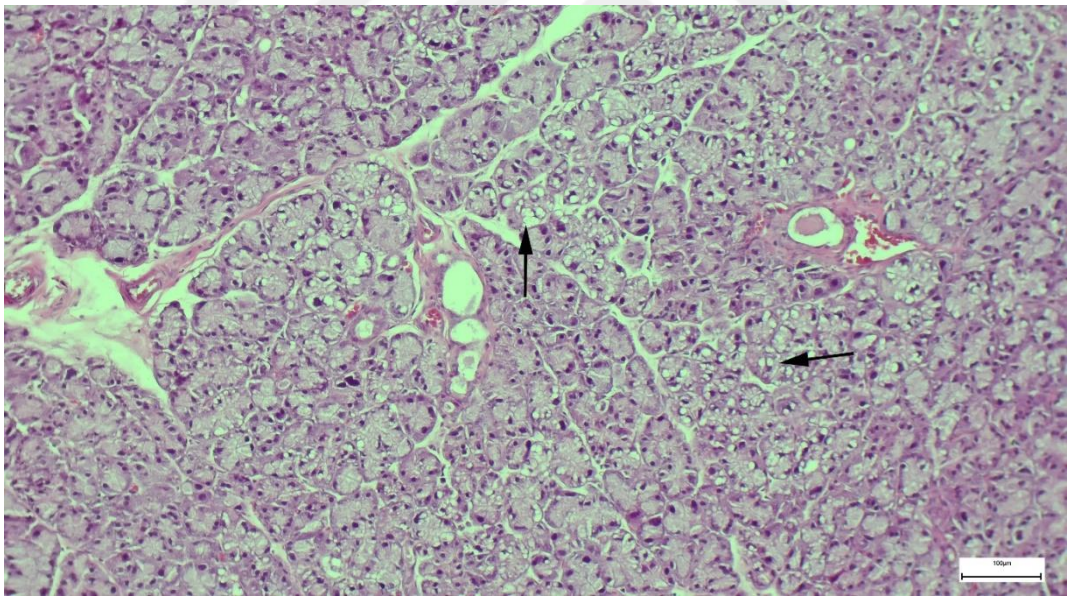
Şekil 4.5. Şekil 4.4.'ün Büyütülmüş Görünümü, Submandibular Bezdeki Vakuolizasyonlar (Oklar) (Hematoksilen-Eozin, Bar=50µm, 200×)



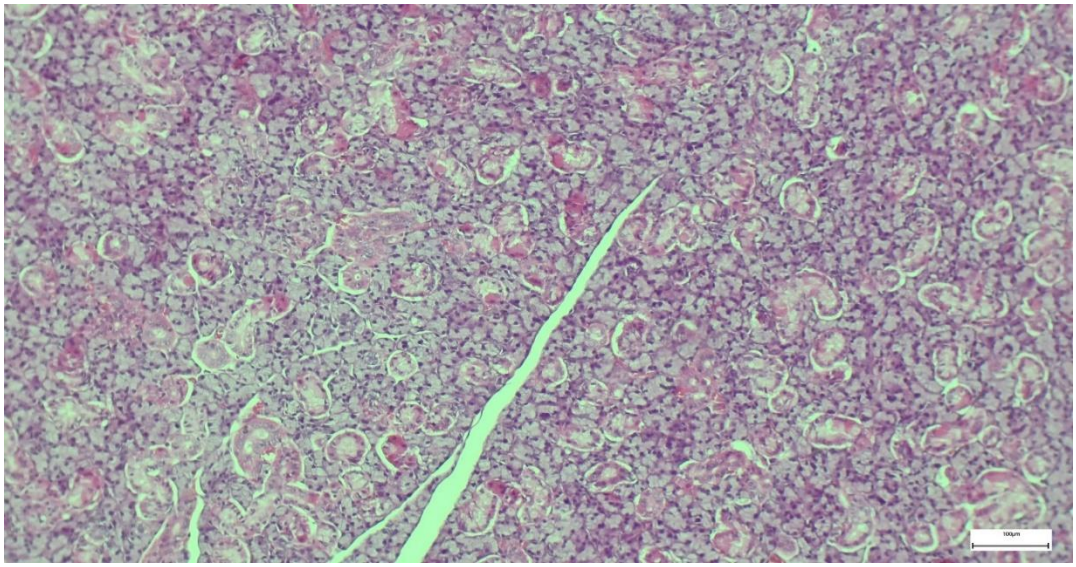
Şekil 4.6. Grup 2'deki Bir Ratın Submandibular Bezinin Histopatolojik Görünümü, Submandibular Bezdeki Epitel Hücrelerinde Vakuolizasyonlarda Tamamen İyileşme (Hematoksilen-Eozin, Bar=50µm, 200×)



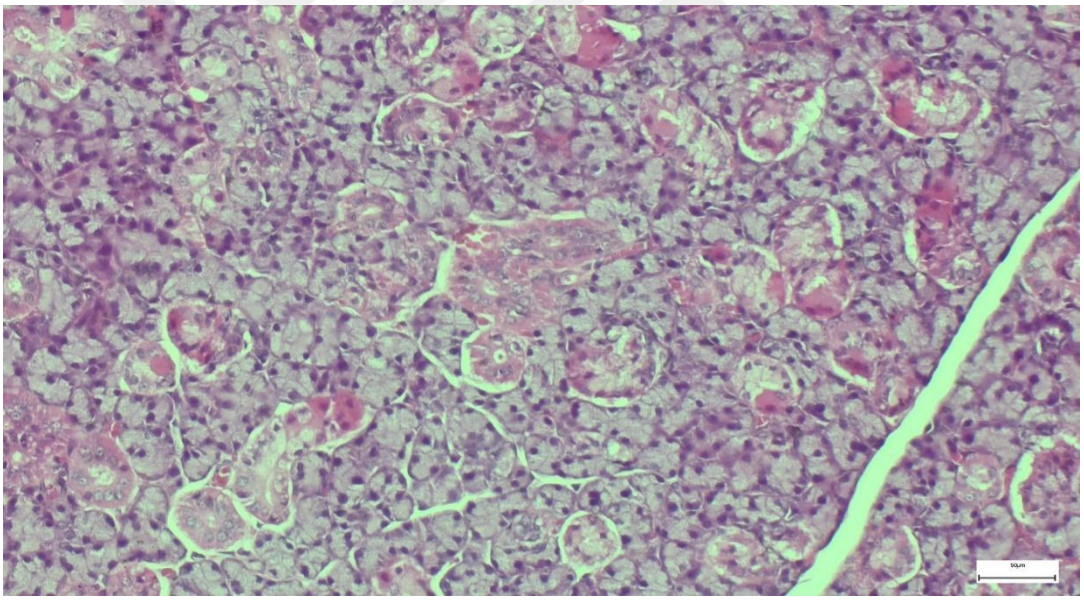
Şekil 4.7. Grup 3'teki Bir Ratın Submandibular Bezinde Kanama (Kalın Ok) ve Epitel Hücrelerinde Vakuolizasyonlar (İnce Ok) (Hematoksilen-Eozin, Bar=200µm, 50×)



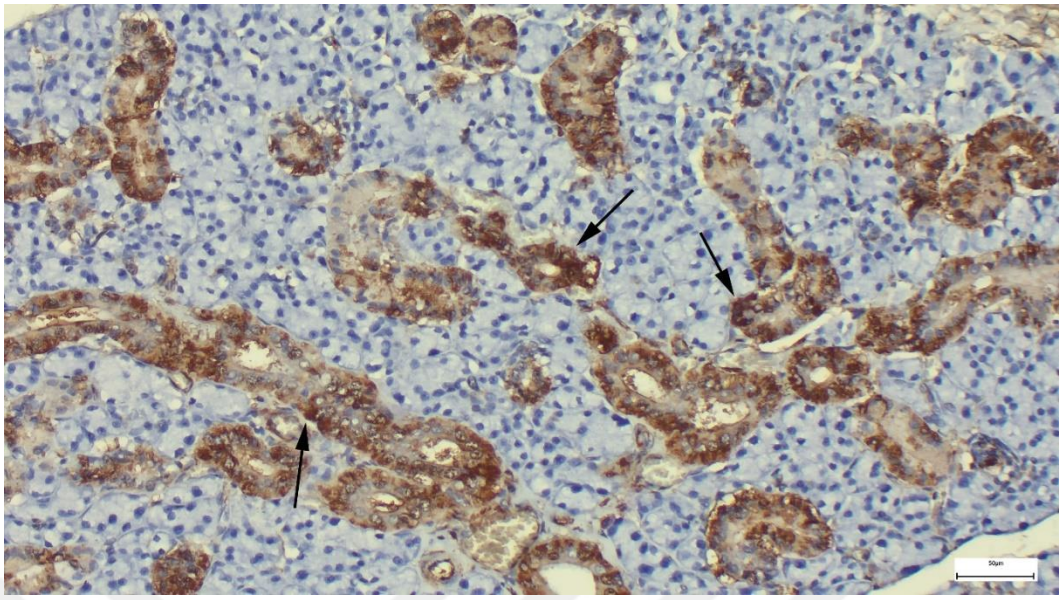
Şekil 4.8. Şekil 4.7.'nin Büyütülmüş Görünümü, Bazı Epitel Hücrelerinde Vakuolizasyonlar (Oklar) (Hematoksilen-Eozin, Bar=100µm, 100×)



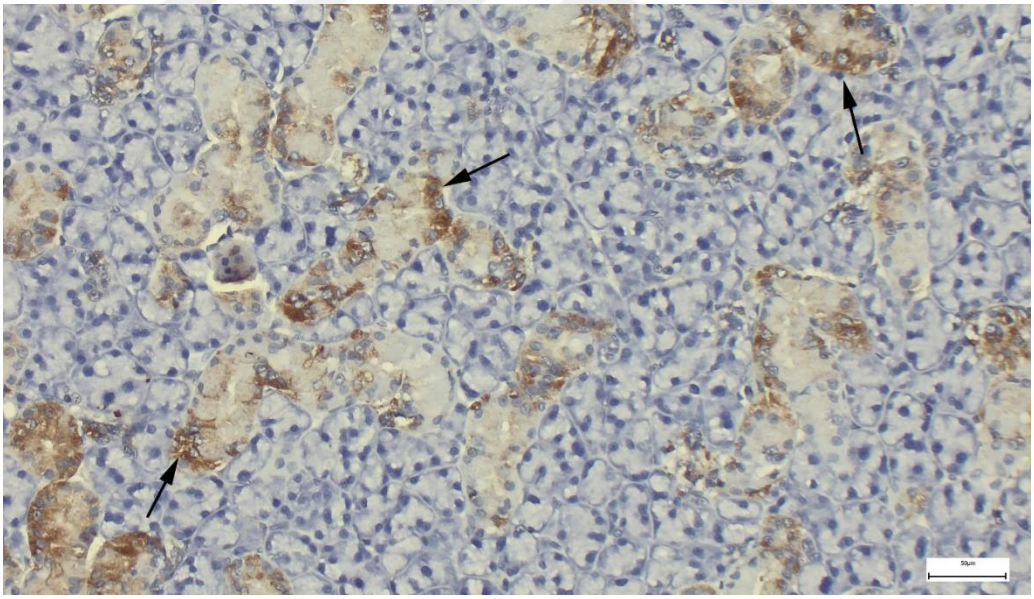
Şekil 4.9. Grup 4'teki Bir Ratın Submandibular Bezinin Normal Histolojik Görünümü (Hematoksilen-Eozin, Bar=100µm, 100×)



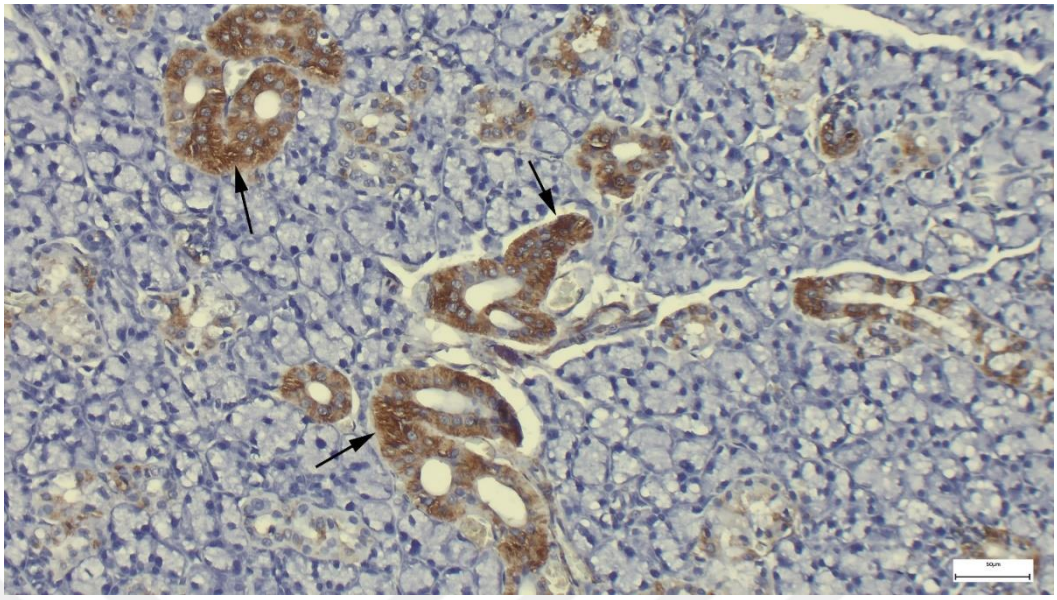
Şekil 4.10. Şekil 4.9.'un Büyütülmüş Görünümü, Submandibular Bezin Normal Histolojik Görünümü (Hematoksilen-Eozin, Bar=50µm, 200×)



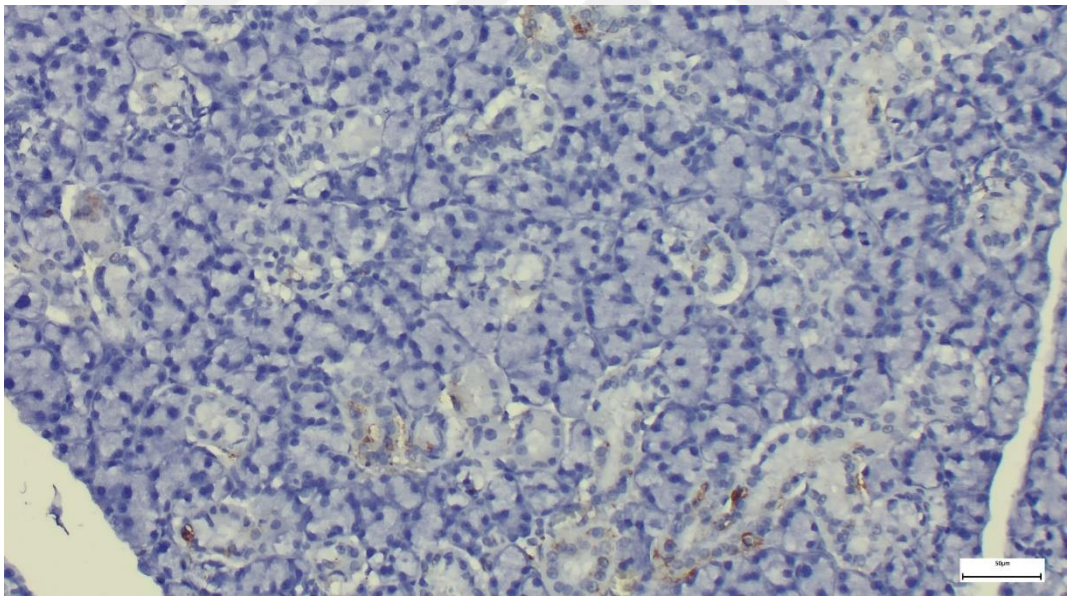
Şekil 4.11. Grup 1'de Yer Alan Bir Ratın Tükürük Bezi Epitel Hücrelerinde Belirgin Şekilde Artmış TNF-α Ekspresyonları (Oklar) (Streptavidin Biyotin Peroksidaz Tekniği, Bar=50µm, 200×)



Şekil 4.12. Grup 2'deki Bir Ratın Submandibular Bez Epitellerinde Belirgin Şekilde Azalmış TNF-α Ekspresyonları (Oklar) (Streptavidin Biyotin Peroksidaz Tekniği, Bar=50µm, 200×)



Şekil 4.13. Grup 3'teki Bir Ratın Submandibular Bez Epitellerinde Azalmış TNF-α Ekspresyonları (Oklar), (Streptavidin Biyotin Peroksidaz Tekniği, Bar=50µm, 200×)



Şekil 4.14. Grup 4'teki Bir Ratın Submandibular Bezinde Negatif TNF-α İmmünoreaksiyonları (Streptavidin Biyotin Peroksidaz Tekniği, Bar=50µm, 200×)

5. TARTIŞMA

Baş-boyun kanserleri tüm kanserler arasında sıklık bakımından yedinci sıradadırlar (3, 4). Baş-boyun kanserleri en sık larenks, oral kavite, orofarenks, nazofarenks, nazal kavite, paranazal sinüsler ve tükürük bezlerinden köken alırlar. Histolojik olarak en sık rastlanan alt tipi yassı hücreli karsinomdur. Oral, farengeal ve larengeal yassı hücreli karsinomlar bu bölgedeki tüm malignitelerin yaklaşık olarak %90'ını oluşturmaktadırlar (108).

Radyoterapi, röntgen teknolojisinde X ışınlarının kullanılmasıyla gündeme gelmiştir. Başlangıçta bakteriyosidal özellikleri ön plana çıkmasına rağmen daha sonra kanser hücreleri üzerindeki etkinliği saptanarak bu yöndeki kullanımı popülerlik kazanmıştır. İlk olarak Wilhelm Röntgen 1895 yılında X ışınlarını keşfetmiştir, yaklaşık bir yıl sonra Grubbe RT'yi meme kanseri tedavisinde kullanmıştır (109). RT'de hedef, kanser hücrelerinin bölünmesini inhibe ederek, kanser hücrelerini yok etmektir. Kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla daha hızlı ve daha fazla bölünme göstermesi bu etki mekanizmasının temelini oluşturmaktadır (110).

Baş-boyun bölgesi kanserlerinin büyük kısmı radyosensitiftir. Bu nedenle baş-boyun bölgesi tümörlerinin tedavisinde sıklıkla cerrahi ile birlikte RT de uygulanabilmektedir. Baş-boyun bölgesi kanserlerinin yaklaşık %75'inde RT primer veya adjuvan olarak kullanılmakta ve tedavide fayda sağlamaktadır (108). Erken evreli kanserlerde cerrahiye alternatif olarak sunulmaktadır. Radyoterapi, özellikle orofarenks, hipofarenks ve larenkste organ koruyucu tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Bu amaçla erken evre hastalıkta sadece RT, ileri evre hastalıkta ise KT ile kombine şekilde tercih edilmektedir (3, 108). Ayrıca baş-boyun bölgesi kanserlerinin tedavisinde, primer bölgeye yönelik tedavi dışında boyun metastazlarına yönelik de RT kullanılmaktadır. Nazofarenks kanserinin tedavisinde ise ilk seçenek RT'dir. Nazofarenks kanserinde primer tümör veya rekürren tümöre yönelik kullanılırken, boyun metastastazları için de sıklıkla uygulanmaktadır (111). Buna ek olarak erken evre (T1) glottik larenks kanserlerinde cerrahiye alternatif birinci seçenek tedavi yöntemi olarak tercih edilebilmektedir. Parsiyel-total larenjektomi ve boyun diseksiyonu sonrası adjuvan olarak da kullanılmaktadır. Cerrahi uygulanan erken evre hastalarda cerrahi sınırın pozitif olması veya yakın olması, lenfatik ve vasküler

invazyon, perinöral invazyon ve lenf nodu metastazı gibi durumlarda RT adjuvan olarak uygulanmaktadır (111). Yine baş-boyun tümörlerinden, tükürük bezi tümörlerinin geçmişte radyosensitif olmadıkları ve RT'den fayda görmedikleri bildirilmiş olmasına rağmen, yeni yapılan çalışmalarda adjuvan tedavide ve opere edilemeyen tümörlerde etkili olduğu bildirilmiştir (112, 113). Benign tükürük bezi tümörlerinin tedavisinde RT'nin yeri olmasa da pleomorfik adenomlarda intraoperatif kapsül yırtılması durumunda nükslerin önlenmesi amacıyla RT'nin faydalı olduğu belirtilmiştir (113, 114). Radyoterapi hastanın prognozunu önemli ölçüde iyileştirirken, hedef bölge çevresindeki normal dokuların da iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması kaçınılmaz olmaktadır. Selektif olmaması, alan içinde yer alan tüm dokulara etkili olması sebebiyle uygulama sonrasında hastalarda ciddi komplikasyonlara ve sekellere yol açmaktadır (115).

Tükürük bezleri yaşam kalitesi üzerinde yüksek etkiye sahip organlardır. Baş-boyun bölgesinde tümörü çevreleyen normal dokular arasında bulunan tükürük bezleri, genellikle RT alacak dokuya göre daha yüzeyel yerleşimlidir. Bu nedenle iyonlaştırıcı ışınların tümöre ulaşması için tükürük bezlerini geçmesi gerekir (115, 116). Tükürük bezleri de baş-boyun bölgesine uygulanan bu iyonlaştırıcı radyasyondan etkilenirler. Tükürük bezleri histolojik olarak çok iyi diferensiyasyon göstermelerine rağmen baş-boyun bölgesindeki kanserlere yönelik RT'den etkilenen en hassas yapılardır. Radyasyonun tükürük bezlerine verdiği hasar ilk olarak Bergonie tarafından 1911'de gösterilmiştir. Bu konu uzun bir süre göz ardı edilmiş ve üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. İlk olarak Kashima ve Kirkham'ın 1965 yılında bu konuda yaptıkları çalışmanın üzerinden yarım asırdan fazla süre geçmesine ve binin üzerinde farklı çalışma yapılmasına karşın bu konuda hala bir fikir birliği bulunmamaktadır. Kashima ve Kirkham tarafından ilk tarif edildiğinde parotis bezinin radyosensitif ancak submandibular bezin radyorezistan olduğu bildirilmiştir (117). Tükürük bezlerinde seröz asiner hücrelerin yüksek radyasyon duyarlılığı, parotis bezlerinin neden radyasyona daha duyarlı olduğunu açıklamaktadır. Çünkü parotis bezinde submandibular bezle karşılaştırıldığında çok daha fazla sayıda seröz asiner hücre mevcuttur (118). Primatlarda ve ratlarda en çok etkilenen yapıların seröz asiner hücreler olduğu morfolojik çalışmalarda gösterilmiştir (119). Coppes ve ark. 2002'de,

Nagler'in aksine, yaptıkları çalışmada submandibular bezin fraksiyone RT'de parotis bezine kıyasla daha yüksek radyosensitivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (119).

Submandibular bez hem seröz hem muköz asiner hücreler içerir. Submandibular bezde daha yoğun olarak bulunan muköz asinüslerin salgısının korunmasının, hem istirahatte hem de stimülasyon ile tükürük salgısı yaptıkları için sadece stimülasyon ile tükürük salgısı yapan parotis bezinden daha değerli olduğu düşünülmektedir. Submandibular bezler sürekli olarak serömuköz tükürük salgılarlar. Submandibular bezler, uyarılmamış tükürük salgısının %60'ından fazlasını üretirler. Bu şekilde istirahat halinde tükürük salgılanmasından ve gece oral kavitenin nemini sağlamaktan sorumludurlar (108, 116). Radyoterapiye bağlı kserostominin önlenmesinde, serömuköz karakterdeki hem bazal hem de stimüle tükürük salgısının çoğundan sorumlu olan submandibular bezin, radyasyon kaynaklı hasardan korunması önem arz etmektedir (108). Radyoterapiye bağlı kserostomideki olası etkisi nedeniyle bu çalışmada apigeninin radyoprotektan etkilerini submandibular bez üzerinde incelemeyi hedefledik.

Tükürük bezleri birkaç çeşit hücre tipi içerir. Asiner hücreler, sıvı ve protein sekresyonundan sorumludurlar. Asinüslerde sekretuvar hücrelerin etrafında miyoepitelyal hücreler bulunmaktadır. Miyoepitelyal hücrelerin kasılmasıyla salgılanan tükürük sırası ile interkale ve çizgili kanallardan geçerek boşaltım kanallarına ulaşır. Çizgili kanallar duktal sistemin en özel bölümüdürler. Lümen ve ekstraselüler boşluk arasında elektrolitlerin salgılanmasını ve geri emilimini kontrol ederler (29). İyonlaştırıcı radyasyon direkt olarak DNA hasarına yol açarken, indirekt olarak radyasyonun etkisi ile açığa çıkan serbest radikallerin DNA ve diğer hücresel yapılar ile etkileşime girmesi de hücresel hasara neden olur. Radyoterapiye bağlı hasar sonrası gelişen hiposalivasyon sadece asiner hücre hasarına bağlı değil, aynı zamanda progenitör yeteneğine sahip primitif glandüler kök hücre hasarına da bağlıdır (120). Radyoterapiyi takiben tükürük bezlerinin disfonksiyonu akut ve kronik olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Klinik olarak, akut tükürük bezi disfonksiyonu radyasyondan sonraki günlerde ortaya çıkar ve hiposalivasyon, asiner hücre kaybı, glandüler etkilenme ve tükürük bileşimindeki değişiklikler şeklinde kendini gösterir. Kronik tükürük bezi disfonksiyonu, radyasyondan aylar ila yıllar sonra ortaya çıkar ve azalmış tükürük akışı ve tükürük bileşimindeki değişiklikler ile karakterizedir (116).

Radyoterapinin baş-boyun bölgesine uygulaması sonrasında pek çok yan etki ortaya çıkmaktadır. Bunlar arasında cilt hasarı, saç dökülmesi, ağız kuruluğu, periodontal hastalıklar, boğaz ağrısı, yutma ve çiğneme güçlüğü, tat bozukluğu, mukozit, seröz otit, nokturnal oral rahatsızlık hissi, yüz ve baş ağrısı ve yorgunluk sayılabilir. Kserostomi ise RT'nin en sık görülen uzun vadeli komplikasyonudur ve uygulanan ışınlama dozu ve ışınlanan tükürük dokusunun hacmi ile ilişkilidir. Kserostomi sıklıkla RT'nin ilk seansından dört hafta sonra başlar (110) ve oral komplikasyonların ortaya çıkmasından sorumludur (121, 122). Bu semptomlar, yaşam kalitesinde dramatik azalmaya yol açan yönetmesi oldukça zor olan klinik tablolardır (110, 115).

Radyoterapide amaç, çevre sağlıklı dokuların ve tükürük bezlerinin korunarak tümör dokusuna maksimum dozun uygulanmasıdır. Tükürük bezlerinde RT'ye bağlı yan etkilerin tespit edilmesiyle birlikte bu durumu önlemeye yönelik arayışlar ortaya çıkmıştır. Radyoterapinin tükürük bezleri üzerindeki yan etkilerini ve buna bağlı olarak ortaya çıkan patolojileri azaltmak veya ortadan kaldırmak için farklı yöntemler öne sürülmüştür. Bunlardan bir tanesi de gelişmiş teknolojiler ve RT uygulama yöntemleri kullanarak tükürük bezleri üzerindeki etkileri minimuma indirmektir. Standart fraksiyone RT, genel olarak haftanın beş günü yedi hafta boyunca günlük ortalama 2 Gy olacak şekilde uygulanır. Ancak bu yöntemde çevre dokular ve tükürük bezleri korunamamaktadır. Hızlandırılmış fraksiyone RT'de ise toplam dozu daha kısa sürede vererek lokorejyonel kontrol amaçlanırken, değişken fraksiyone RT'de ise normal dokularda geç toksisiteye neden olmaksızın total dozu arttırıp daha kısa sürede vererek lokorejyonel kontrolü sağlayarak komplikasyonların azaltılması hedeflemektedir. İlk fraksiyone RT, 1920'de Regaurd tarafından uygulanmıştır (108). Bir başka uygulama olan hiperfraksiyon rejiminde ise fraksiyon başına düşen dozun azaltılması ve total dozun normalden fazla uygulanması ile geç komplikasyonların önlenmesi amaçlanmaktadır (123).

Deneysel hayvan çalışmalarında ise insanlardan farklı olarak iki tür RT yöntemi uygulanmaktadır. Tek yüksek doz RT veya uzun sürede uygulanan fraksiyone RT'dir. Farelerde tek doz RT 2-18 Gy, fraksiyone doz ise beş günlük toplam 28 Gy olarak verilmektedir. Ratlarda ise 7,5-20 Gy tek doz, 20-75 Gy beş günlük fraksiyone dozlarda uygulanmaktadır. Tavşan ve maymunlarda ise daha yüksek fraksiyone 37.5-

70 Gy verilmektedir. Krishnan ve ark. yapmış olduğu submandibular bezde radyasyonun neden olduğu akut histomorfometrik değişikliklerin incelendiği çalışmada ratlar 15 Gy tek doz olarak ışınlanmışlardır (124). Biz de literatüre uygun olarak çalışmamızda ratlara tek doz 16 Gy RT uyguladık (125).

Radyoterapiye bağlı olarak ortaya çıkan erken veya geç tükürük bezi fonksiyon kaybını azaltmak için birtakım protokoller geliştirilmiştir. Teknolojinin gelişmesi ile konvansiyonel RT yerini günümüzde konformal RT'ye bırakmıştır. Konformal RT'de, bilgisayarlı tomografiden elde edilen üç boyutlu görüntüler yardımı ile hedef bölge ve kritik organların çizimi ile tümöre maksimum dozun verilmesi ve etraf sağlıklı dokulara minimum dozun etki etmesi hedeflenmektedir. Konformal RT temelde üç boyutlu konformal RT ve YART şeklinde uygulanmaktadır (3, 108). Yoğunluk ayarlı radyoterapi genellikle nazofarenks ve orofarenks karsinomları için kullanılmakta olup; beyin, beyin sapı, optik sinir ve tükürük bezi gibi komşu kritik organların daha iyi korunmasını sağladığı düşünülmektedir (108). Yoğunluk ayarlı radyoterapinin sağlıklı doku üzerindeki koruyucu etkisi, yüksek doz radyasyona maruz kalan bölgelere komşu bölgelerin alt tolerans dozlarından etkilenir. Buna da banyo-duş etkisi denir. Literatürde bir fare modelinde, parotis bezi üzerinde banyo-duş etkisi gösterilmiş ve ileri derecede fonksiyon kaybına neden olduğu tespit edilmiştir (126). Yoğunluk ayarlı radyoterapi uygulamalarında hastaların en az %40'ında orta veya ağır derecede kserostomi meydana geldiği bildirilmiştir (115). Yoğunluk ayarlı radyoterapi uygulaması ile meydana gelen yüksek orandaki tükürük bezi disfonksiyonu banyo-duş etkisi ile açıklanmaktadır ve bu durum sağlıklı dokuları korumayı hedefleyen YART tekniğinin de tükürük bezlerinin korunmasına katkısının sınırlı olduğunu göstermektedir.

Tükürük bezlerinin korunmasını hedefleyen bir başka yöntem de şu anda kullanılan fotonlar yerine yüklü parçacıklar olarak protonların kullanılmasıdır. Bu yöntemle tümöre aynı dozda RT verilirken çevre dokular minimal düzeyde etkilenir (108). Protonların yapısal özellikleri nedeniyle foton RT'siyle karşılaştırıldığında daha iyi bir doz dağılımı sağlayarak, sağlıklı dokulara verilen dozu en aza indirir. Bu şekilde RT sonrası rejenerasyona izin verdiği iddia edilmiştir, fakat yüksek maliyeti nedeni ile kullanımı sınırlıdır (115).

Yine tükürük bezleri üzerine RT'nin etkisini azaltmak için önerilen bir başka yöntem de adaptif RT'dir. RT'den sonra tümörün ve komşu normal dokuların boyut olarak olarak küçülmesi sık görülen bir durumdur. Adaptif RT, normal dokular ve tümör hacmindeki değişiklikler göz önünde bulundurularak radyasyon dozunun yeniden planlanması temeline dayanır (108).

Yukarıda bahsedilen farklı RT uygulama teknikleri yeterli sağlıklı doku ve tükürük bezi koruma özelliğine sahip olmadığından bu konuda arayışlar devam etmektedir. Bunlardan biri de tükürük bezi dokusunda radyasyon hasarını azaltmak için tükürük bezlerini daha düşük bir kümülatif radyasyon dozu alan bölgeye taşımayı hedefleyen cerrahi yöntemlerdir (115). Seikaly ve ark. 2001 yılında yeni bir teknik bildirmişlerdir. Bu teknikte submandibular tükürük bezinin cerrahi olarak RT öncesi submental boşluğa taşınmasını önermişlerdir. Bu yöntem orofarenks, hipofarenks ve larenksin cilt ve lenfatik tutulumu olmayan primer tümörleri için uygulanabilir (108, 127). Ancak tükürük bezi transferi uygulaması RT öncesi ek bir cerrahi işlem ile hem morbiditeyi arttıracak hem de tedaviye başlamayı geciktirecektir. Bu nedenle bu yöntem uygulanabilir değildir.

Radyasyona bağlı hiposalivasyonun altında yatan ana neden, progenitör ve kök hücre hasarından kaynaklanan tükürük üreten asiner hücrelerin azalmasıdır (115). Bu nedenle RT sonrası tükürük bezlerinin fonksiyonunu geri kazandırmayı hedefleyen yöntemlerden birisi de kök hücre tranplantasyonudur. Kök ve progenitör hücrelerin hasarlı hücreleri yenilediği birçok kemirgen ve insan dokusunda tanımlanmıştır (115, 128, 129). Bu hücreler, RT başlamadan önce tükürük bezlerinden alınabilir ve RT tamamlandıktan sonra duktal sisteme geri verilebilir, böylelikle daha sonra hasarlı tükürük bezlerini onarabilirler. Bahsedilen kök hücre tedavisi gelecek vaad etmektedir ancak hala etkin ve kullanılabilir bir metot olarak benimsenmemiştir.

Sağlıklı dokular belirli ajanlarla RT'ye karşı iki yöntemle korunabilirler. Bunlardan biri kanserli hücreleri RT'ye hassas hale getirmek diğeri ise sağlıklı dokuları radyasyona dirençli hale getirmektir. Birinci yöntemde radyasyon duyarlılaştırıcıların kullanımı RT'ye yanıtı iyileştirebilir. Çünkü kanser hücreleri genellikle hipoksiktir ve buna bağlı olarak radyasyona dirençlidir. Bu mekanizmaya örnek olarak kemoterapötik bir ajan olan sisplatinin radyo hassaslaştırıcı olarak

kullanıldığında RT'nin hedef dokuya etkisinin arttırıldığı gösterilmiştir (108). İkinci yöntem için literatürde tükürük bezlerinin radyasyon direncini arttırmak, duyarlılığını azaltmak amacıyla birçok madde kullanılmıştır. Bunlardan en popüler olanlar amifostin, pilokarpin ve apopitozu baskılayıcılardır (insülin büyüme faktörü-1, keratinosit büyüme faktörü) (105, 115, 116, 130). Bunlar arasından yalnızca amifostin klinik kullanıma girmiştir ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından bu endikasyon için onaylanmıştır. Amifostin, tükürük bezi RT'den etkilenen hastalara verilmektedir. Ancak amifostinin kullanımı hipotansiyon ve alerjik reaksiyon gibi yan etkileri nedeniyle sınırlıdır. Çünkü hastalar tarafından kullanımı çoğu kez reddedilmektedir, tedavi devamlılığı sağlanamamaktadır (130, 131). Bu nedenle, minimal yan etkileri olan, doğal, toksik olmayan ve uzun yarı ömürlü radyoprotektan maddeler araştırılmaktadır. Nagler ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada çinko-desforaksaminin radyoprotektif etkinliğini göstermeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla 20 mg/kg dozda çinko-desforaksamin i.p. olarak 15 Gy RT'den 90 dakika önce uygulamışlar ve iki ay sonra ortaya çıkan değişiklikleri incelemişlerdir. Çinko-desforaksaminin submandibular bez üzerine radyoprotektan etkisi olmadığı kanaatine varmışlardır (132). Bir başka çalışmada Lopez-Jornet ve ark. RT'den 24 saat önce ratlara kurkumin ve likopen verip bu maddelerin parotis bezi üzerindeki radyoprotektif etkilerini incelemişlerdir (105). Bahsedilen bu çalışmada Grup 1'e 50 mg/kg kurkumin, Grup 2'ye 20 mg/kg likopen, Grup 3'e DMSO ve Grup 4'e sadece RT verilmiştir. Uygulanan kurkumin ve likopen çalışmamızla benzer şekilde DMSO içerisinde çözdürülerek i.p. olarak uygulanmıştır. Tek doz 20 Gy RT sonrası 24. saatte ratlar sakrifiye edilmiştir. Parotis dokuları histopatolojik incelemede çalışmamızda olduğu gibi nekroz, asiner hasar, duktal hasar ve vakuolizasyon açısından değerlendirilmiştir. Kurkumin açısından hücre nekrozu ve asiner hasar parametrelerinde istatistiksel bir fark bulunamamış, duktal hasar yönünden ise belirgin fark tespit edilmiştir. Likopen uygulanan grupta ise duktal hasar ve vakuolizasyonda belirgin farklılık gözlenmiştir. Aynı çalışmada çözdürücü olarak kullanılan DMSO'nun da koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Ancak bu konu çalışmada tartışılmamıştır. (105). Teymoortash ve ark. 2009 yılında tükürük bezine botulinum toksini uygulayarak RT hasarını önlediklerini bildirmişlerdir (133). Elsürer ve ark. spironolaktonun tükürük bezlerini RT'ye karşı koruyuculuğunu araştırdıkları

çalışmada 21. gün ve 100. günde yaptıkları karşılaştırmada enflamasyon parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır. Ancak aynı yazarlar 100. günde perivaskülar ve periduktal fibrozis açısından çok ciddi fark gözlemlemişlerdir. Spironolaktonun tükürük bezinde RT'ye bağlı geç fibrozisi önlediğini bildirmişlerdir (116). Bahsedilen bu çalışmalarda radyoprotektan özelliği olabilecek madde arayışında kesin bir sonuca halen ulaşılamamıştır. Bu amaçla araştırmacılar radyoprotektif özelliği olan, toksik olmayan, uzun yarı ömürlü madde arayışları neticesinde bitkisel kökenli ajanlara yönelmişlerdir. Bunlardan en göze çarpan grup flavonoidlerdir. Flavonoidler, bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolitlerdir. İlk olarak radyasyon duyarlılaştırıcı ve antitümör aktivitesi bulunan maddeler olarak değerlendirilmişlerdir (134). Zamanla radyoprotektif etkilerinin keşfedilmesi üzerine flavonoidlere olan ilgi artmıştır (135). Flavonoidler yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaları ve çoğu bitkisel gıdanın içerisinde bulunmaları nedeniyle radyoprotektif amaçla kullanımları giderek popülerleşmektedir. Flavonoidler arasında kuersetin, naringenin, apigenin, genistein, daidzein sayılabilir. Özellikle soya kökenli izoflavonlardan olan genistein ve glistein; yeşil çaydan elde edilen epikathekhin, bezelye ve sarımsakta bulunan apigenin, soğan dış kabuğunda bulunan kuersetinin radyoprotektif etkileri gösterilmiştir (135).

Flavonoidlerin düşük toksisiteleri, antienflamatuar ve antioksidatif etkileriyle RT hasarına bağlı fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. Genistein, daidzein, glistein gibi flavonoidlerin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri oluşturulan farelerde yapılan çalışmada RT'ye bağlı hemoraji, enflamasyon ve fibrozisi azalttığı saptanmıştır. Ek olarak normal dokuları koruduğu, tümör hücrelerinde büyük vakuoller oluşturarak dejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (136). Genistein antienflamatuar etkilerini granulositler, monositler ve lenfositleri etkileyerek göstermektedir (137). Baikaleinin ise hidroksil ve alkil radikal temizleyici aktivitesi ile DNA hasarını önlediği gösterilmiştir (138).

Kuersetin, çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan polifenolik bir flavonoiddir. Antikanserojen, antienflamatuar, antiviral, antioksidan ve psikostimülan özellikleri nedeniyle birçok çalışmanın odak noktası olmuştur. Kuersetinin antioksidan etkileri, serbest radikalleri temizleyici ve endojen antioksidan seviyesini arttırıcı özellikleri aracılığıyla oluşturduğu gösterilmiştir (122, 139). Naringenin, geniş biyolojik ve

farmakolojik aktiviteye sahip doğal bir flavonoiddir. Antikanserojen, antienflamatuar, antidiyabetik ve antioksidan etkileri bulunmaktadır. Naringeninin antioksidan etkinliği özellikle belirgindir. Bunu, lipoksijenaz, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz, siklooksijenaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerin inhibisyonu ve güçlü serbest radikal temizleme özelliği ile gösterir. Ayrıca naringenin, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin fizyolojik seviyelerini arttırır (122, 140). Radyoterapiye bağlı olarak gelişen submandibular bez hasarı, temel olarak oksidatif stres ve enflamasyon ile bağlantılıdır. Güçlü antioksidan ve antienflamatuar etkileri ile naringenin ve kuersetin, radyasyona bağlı submandibular bez hasarına karşı koruyucudur (122).

Literatürde apigeninin tükürük bezleri üzerine radyoprotektif etkisini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle biz de çalışmamızda apigenini kullanmayı tercih ettik. Bir flavonoid olan apigenin, esas olarak maydanoz, kereviz, soğan, sarımsak, bezelye, mısır, pirinç, çay, portakal, elma, kekik, biberiye ve papatyada glikozile halde bulunur (6, 84, 85). Apigenin sarı renkli kristal yapıda bir katıdır. Suda çözünmez, sadece etanol ve DMSO'da çözünebilmektedir. Apigeninin yarılanma ömrü 91,8 saat olarak bildirilmiştir (85).

Apigenin, hayvan ve insan çalışmalarında farklı amaçlarla kullanılmıştır. Apigeninin Alzheimer hastalığı ve amnezideki etkinliği hayvan modellerinde gösterilmiştir. Depresyonda ise IL-1B ve TNF-α üretimini azaltarak anormal davranışları engellediği gösterilmiştir (6). İnsan çalışmalarında ise Alzheimer hastalığı, insomnia, osteoartrit ve anksiyete üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir (141). Hiperglisemik ratlarda, glukoz ile indüklenmiş insülini arttırmış ve insülin direncini azaltmıştır (6, 91). Apigeninin ayrıca antitümör etkileri hem in vivo hem de in vitro olarak deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Apigeninin topikal olarak kullanımı ultraviyole ile indüklenen papillom ve yassı hücreli karsinom gelişimini engellemiştir. Öte yandan patofizyolojisi açıklanamasa bile in vitro çalışmalarda apigeninin meme, prostat, cilt ve tiroid kanseri gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Apigeninin prostat kanserinde tümör büyümesini durdurduğu ve metastaz oranını azalttığı gösterilmiştir (6, 142). Apigeninin antioksidatif ve serbest radikal temizleyici etkisiyle sitoprotektif etki gösterdiği ortaya konmuştur (143). Rithidech ve ark. 2005 yılında yaptıkları insan lenfositleri ile oluşturulan hücre kültürü çalışmasında

apigeninin radyoprotektif etkilerini değerlendirmişlerdir. Bahsedilen bu çalışmada apigeninin 2,5, 5, 10 ve 25 mg/ml gibi dozlarda etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre apigenin dozu arttıkça mikronükleus sayısı azalmaktadır. Apigeninin radyoprotektif ajan olarak kullanılabileceğini ve radyoprotektif etkisinin antioksidatif aktiviteye bağlı olarak ortaya çıktığı öne sürülmüştür (7). Begum ve ark. tarafından yapılmış olan RT uygulanmış farelerde oksidatif stres ve hematolojik parametrelerin incelendiği çalışmada 100 mg/kg üzeri apigenin dozlarında farelerde mortalite meydana geldiği bildirilmiştir (144). Singh ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada i.p. olarak 25, 50, 100 ve 200 mg/kg apigenin uyguladıkları ratlarda 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarının güvenli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında ise karaciğer enzimlerinde bozulma, serumda serbest oksijen radikalleri ve lipit peroksidasyonunda artış tespit edilmiştir. Singh ve ark. bu çalışmada i.p. toksik dozun 100mg/kg olduğunu belirtmişlerdir (145). Biz de bu çerçevede ratlara 25 mg/kg apigenin uygulayarak RT'ye karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

DMSO yüksek çözünürlüğe sahiptir ve birçok maddenin çözdürülmesi için kullanılmaktadır. Peng ve ark. 2020 yılında yaptıkları deneysel çalışmada DMSO'nun hematopetik ve progenitör hücreler üzerinde radyoprotektif bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Bu etkinin apopitozdan bağımsız olduğunu bildirmişlerdir (146). Yang ve ark. ise 2018 yılında yaptıkları çalışmada oral mukozadaki akut radyasyon hasarının DMSO uygulanmış ratlarda azaldığını göstermişlerdir (147). Apigeninin i.p. uygulanması için DMSO içerisinde çözünmesi gerekmektedir. Bu nedenle biz de çalışmamızda saf apigenini DMSO içerisinde çözünmüş hale getirdik ve 25 mg/kg olacak şekilde doz ayarlaması yaptık. Ayrıca DMSO'nun olası radyoprotektif etkisini de göstermek ve apigeninin etkisini ayrıca değerlendirmek amacıyla diğer çalışmalardan farklı olarak sadece DMSO uygulanan ve sonrasında RT verilen bir deney grubu da oluşturduk. Bu şekilde apigenin ve DMSO'nun radyoprotektif etkisini karşılaştırdık. Nekroz, asiner hasar ve duktal hasar yönünden DMSO'nun radyoprotektif etkisinin olmadığını gözlemledik. Ancak vakuolizasyon yönünden DMSO'nun radyoprotektif etkisinin olduğunu tespit ettik. Vakuolizasyon, enfeksiyon ve enflamasyonda ilk ortaya çıkan ve en çok görülen nonspesifik hasar olduğu için antioksidan etkisi olan DMSO tarafından engellendiği düşünüldü. Çalışmamızda

apigenin dozunu ve biyoyararlanımını standardize etmek amacıyla i.p. enjeksiyon ile uygulama tercih edilmiştir. Bu nedenle DMSO kullanımı bir zorunluluk olarak karşımıza çıkmıştır.

Lopez-Jornet ve ark. kurkumin ve likopen ile yaptıkları çalışmada RT'den 24 saat önce bu ajanların verilmesinin radyoprotektif etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (105). Biz de çalışmamızda apigenini RT'den 48 saat önce ratlara i.p. olarak uyguladık. Öte yandan apigenin yarı ömrünün 91.8 saat olması ve yavaş metabolize olması sebebiyle tek doz verilmesinin yeterli olacağını düşündük. Nagler ve ark. 1993'te ilk kez radyasyonun tükürük bezi üzerine akut etkilerini göstermiştir. Seröz asinüs hasarı, nekroz ve akut enflamasyon gibi histolojik değişiklikler RT uygulanmasından 24 saat sonra ortaya çıkmaktadır (148). Bu nedenle çalışmamızda RT'nin akut etkilerinin incelenebilmesi için RT uygulamasından 48 saat sonra hayvanları sakrifiye ettik ve sonuçları histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirip tartıştık.

Çalışmamızdaki Grup 4, apigeninin tükürük bezi üzerinde histopatolojik ve immünohistokimyasal etkilerinin olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla oluşturuldu. Dördüncü grupta nekroz, asiner hasar, duktal hasar ve vakuolizasyon yönünden hiçbir hayvanda olumsuz bir bulguya rastlanmamıştır. Çalışmamızda çoklu karşılaştırma bu yüzden ilk üç grup arasında yapılmıştır. Çalışmamız sonucunda 25 mg/kg dozunda apigeninin i.p. uygulamasının tükürük bezleri üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı ve güvenli bir madde olduğu ortaya konulmuştur.

Nekroz yönünden üç grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya çıkmıştır. Bu farkın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığı araştırıldığında apigeninin RT'ye bağlı doku nekrozunu belirgin olarak azalttığı görülmektedir. DMSO'nun ise nekroz açısından RT etkilerini azaltmada etkili olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçtan apigeninin, DMSO'ya göre nekroz açısından RT'nin olumsuz etkilerini daha belirgin olarak önlediği anlaşılmaktadır. Ancak bu etki istatistiksel olarak nispeten daha az güçlüdür. Bu nedenle çözelti halinde bulunan iki maddenin (Apigenin - DMSO) sinerjik etki göstererek bu farkın oluşmasına yol açtığını düşünüyoruz. DMSO'nun da apigenin çözeltisi kadar olmasa da hücreler üzerinde nekrozu önleme açısından koruyucu etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

Histolojik çalışmalar, RT'den 1-2 saat sonra hem primat hem de kemirgen parotis bezlerinde asiner hücre hasarının belirgin morfolojik kanıtlarını ortaya koymuştur (132). Çalışmamızda apigeninin RT'ye bağlı asiner hücre hasarını belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir. DMSO'nun RT'ye bağlı asiner hasarı azaltmada etkili olmadığı gösterilmiştir. Apigeninin DMSO'ya göre asiner hasarı istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla engellediği görülmektedir. Ancak bu fark apigenin ile sadece RT uygulanan grup arasında olduğu kadar güçlü değildir.

Apigeninin duktal hasar yönünden RT'ye karşı koruyucu etkisi olmamasından ziyade duktal hücrelerin de RT'ye dirençli olduğundan bahsedebiliriz. Bunun olası sebebi duktal hücrelerin matür hücreler olması ve proliferasyona uğramamalarıdır (149). Bunların duktal hücrelere radyorezistan özellik kazandırdığı kanaatindeyiz.

Vakuoller, hücre sitoplazması içinde sıvı dolu keseciklerdir. Hücre içinde atık maddelerin depolanmasında ve elimine edilmesinde rol alırlar. Enfeksiyon ve enflamasyon durumunda sayıları artmaktadır. Apigeninin, RT'ye bağlı vakuolizasyon açısından koruyucu etkiye sahip olduğu görülmüştür. Benzer etki DMSO'da da tespit edilmiştir ancak bu etki apigeninin etkisi kadar güçlü değildir.

TNF-α, akut enflamasyon durumunda lenfositler, nötrofiller, monositler ve diğer birçok hücre tarafından üretilen bir proinflamatuar sitokindir. Hücre içinde nekroz veya apopitoza yol açan çeşitli sinyal yolaklarında rol alır. Citrin ve ark. tarafından yapılan çalışmada baş-boyun bölgesine uygulanan RT dozu artırıldığında tükürükten izole edilen IL-6, IL-8 ve TNF-α sitokin seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (100). Radyoterapinin rat jejunum ve kolonunda neden olduğu akut hasarın IL-6 ve TNF-α ekspresyon seviyeleri ile doğrudan ilişkili olduğu Ong ve ark. tarafından bildirilmiştir (101). TNF-α, enflamasyonun önemli bir belirteci olduğundan artmış TNF-α ekspresyonu genellikle tükürük bezi hipofonksiyonuna neden olan inflamatuar olaylara işaret etmektedir. Osteoblastik hücre gruplarında yapılan bir çalışmada apigeninin TNF-α inhibisyonuna bağlı olarak IL-6 ve nitrik oksit üretimini azalttığı bildirilmiştir (150). Fare makrofajlarında yapılan farklı bir çalışmada da apigeninin TNF-α ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur (151). Limaye ve ark. çalışmasında da i.p. lipopolisakkarit enjeksiyonu sonrası sistemik enflamasyon meydana getirilmiştir, bunun sonucunda TNF-α miktarında artış ve

hiposalivasyon izlenmiştir (152). Bizim çalışmamızda apigenin-DMSO çözeltisi, RT'ye bağlı TNF-α ekspresyonunda meydana gelecek artışı engellemiştir. Apigenin ile DMSO arasında RT sonrası TNF-α seviyesi açısından bir fark bulunamamıştır. DMSO, RT uygulanan tükürük bezi hücrelerinde histopatolojik olarak apigenin kadar etkili olmamakla beraber, immünohistokimyasal olarak apigenin ile benzer etkiyi gösterdiği söylenebilir. Apigenin bitkisel kökenli iken, DMSO organokükürt bileşiği olan bir kimyasaldır. Bu nedenle kar zarar hesabı göz önüne alındığında apigeninin bir adım önde olduğu kanaatindeyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda apigeninin tükürük bezinde histopatolojik olarak nekroz, asiner hasar ve vakuolizasyonu önlemede etkin bir radyoprotektan ajan olduğu kanaatine varılmıştır. Apigenin hücresel düzeyde DMSO'ya bir üstünlüğü mevcuttur ancak tükürük bezindeki TNF-α ekspresyonunu azaltma açısından DMSO'ya göre üstünlüğü tespit edilememiştir. Çalışmamız apigeninin tükürük bezi dokuları üzerinde histopatolojik ve immünhistokimyasal olarak radyoprotektif etkisini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.

Bu çalışmanın başlıca kısıtlılıkları tükürük bezi ağırlıklarının değerlendirilmemesi, tükürük miktarının ölçülmemesi ve kan amilaz düzeyinin belirlenmemiş olmasıdır.

Çalışmamız gıda kökenli, doğal, toksik olmayan ve uzun etkili apigeninin radyoprotektan ajan olarak kullanılabileceği konusunda umut vadeden bir deneysel araştırma olup ileride yapılacak çalışmalara bu konuda ışık tutacağı kanaatideyiz.

ÖZET

Submandibular Glanda Radyoterapi Uygulanan Ratlarda Apigeninin Radyoprotektif Etkisi

Baş-boyun bölgesi kanserleri nedeniyle uygulanan radyoterapi sonrasında meydana gelen kserostomi, hastaların hayat kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir. Kserostomiyi önlemek için çeşitli radyoprotektif maddeler önerilmiş olmasına rağmen ideal bir madde mevcut değildir. Bu çalışmada apigeninin, ratların submandibular bezi üzerindeki radyoprotektif etkilerini ortaya koymayı amaçladık.

Her grupta 10 rat olacak şekilde dört deney grubu oluşturuldu. Grup 1'deki ratlara sadece radyoterapi uygulandı ve herhangi bir ilaç verilmedi. Grup 2'dekilere radyoterapi uygulamasından 48 saat önce 25 mg/kg dozunda, dimetil sülfoksit içerisinde çözdürülmüş apigenin; Grup 3'tekilere ise sadece 1,66 ml/kg dozunda dimetil sülfoksit intraperitoneal olarak verildi. Grup 4'e radyoterapi uygulanmadı ve intraperitoneal olarak 25 mg/kg dozunda, dimetil sülfoksit içerisinde çözdürülmüş apigenin verildi. İntraperitoneal ilaç uygulamaları tüm gruplarda eş zamanlı yapıldı ve tüm ratlar radyoterapi uygulamasından 48 saat sonra sakrifiye edildi. Eksize edilen submandibular bezler histopatolojik ve immünhistokimyasal olarak incelendi. Nekroz, asiner hasar, duktal hasar, vakuolizasyon mevcudiyeti ve TNF-α ekspresyonu 0,1,2,3 olarak skorlandı.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda Grup 2'nin nekroz, asiner hasar ve vakuolizasyon açısından Grup 1'e göre anlamlı olarak korunduğu gözlendi (sırasıyla p değerleri: 0,004, 0,003, 0,001). Benzer şekilde TNF-α ekspresyonu da anlamlı düzeyde azalmıştı (<0,001). Grup 1 ve 3 arasındaki karşılaştırmalarda ise nekroz ve asiner hasar açısından anlamlı fark yoktu (p değerleri sırasıyla: 0,328, 0,325), vakuolizasyon ve TNF-α ekspresyonu açısından ise iki grup arasındaki fark anlamlıydı (p değerleri sırasıyla: 0,005, 0,02). Grup 1, 2 ve 3 arasında arasında duktal hasar açısından ise farklılık tespit edilmedi (p=0,179).

Çalışmamızda histopatolojik olarak apigeninin nekroz, asiner hasar ve vakuolizasyonu önlemede etkin bir radyoprotektan ajan olduğu bulunmuştur. İmmünohistokimyasal olarak da apigenin-DMSO çözeltisinin TNF-α düzeylerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Gıda kökenli, doğal, toksik olmayan, uzun etkili apigeninin radyoprotektan ajan olarak kullanılabileceği konusunda umut vadeden bu deneysel çalışmanın gelecekte yapılacak çeşitli araştırmalara ışık tutabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Apigenin, radyoterapi, submandibular bez, kserostomi, radyoprotektif etki

ABSTRACT

Radioprotective Effect of Apigenin on Submandibular Gland of İrradiated Rats

Xerostomi following application of radiotherapy due to head and neck cancer remarkably diminish the life quality. Although various radioprotective agents have been proposed to prevent xerostomia, an ideal agent is not still existed. We aimed to introduce the radioprotective effects of apigenin on the submandibular gland of rats in this study.

Four experimental groups were composed of 10 rats in each group. Rats in Group 1 were applied radiotherapy solely and administered no drug. Apigenin dissolved in DMSO at a dose of 25 mg/kg 48 hours before radiotherapy administration to Group 2; In Group 3, only 1.66 ml/kg of DMSO was given intraperitoneally. Group 4 did not receive radiotherapy and apigenin dissolved in DMSO was given intraperitoneally at a dose of 25 mg/kg. Intraperitoneal drug administrations were performed simultaneously in all groups and all rats were sacrificed 48 hours after radiotherapy administration. The excised submandibular glands were examined histopathologically and immunohistochemically. Existence of necrosis, acinar damage, ductal damage, vacuolization, and TNF-α expression were scored as 0,1,2,3.

As a result of the statistical analyzes, it was observed that Group 2 was significantly protected compared to Group 1 in terms of necrosis, acinar damage and vacuolization. (p values: 0.004, 0.003, 0.001, respectively). Similarly, TNF-α expression was also significantly decreased ($p<0.001$). In comparisons between Groups 1 and 3, there was no significant difference in terms of necrosis and acinar damage (p values: 0.328, 0.325, respectively), while the difference between the two groups was significant in terms of vacuolization and TNF-α expression (p values: 0.005, 0.02, respectively). There was no difference between Groups 1, 2 and 3 in terms of ductal damage ($p=0.179$).

In our study, apigenin was found to be an effective radioprotectant agent in terms of preventing necrosis, acinar damage and vacuolization, histopathologically. It has been shown that apigenin-DMSO solution causes a decrease in TNF-α levels, immunohistochemically. We suggest that this promising experimental study on the use of food-derived, natural, non-toxic, long-acting apigenin as a radioprotectant agent may set light on various future studies.

Keywords: Apigenin, radiotherapy, submandibular gland, xerostomia, radioprotective effect

KAYNAKLAR

1- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. Lancet. 2008; 371(9625): 1695-1709. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60728-X.

2- Chai RC, Lambie D, Verma M, Punyadeera C. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. Cancer Med. 2015; 4(4): 596-607. doi: 10.1002/cam4.424.

3- Sen M, Karakaya E, Demiral AN. Baş Boyun Kanserinde Radyoterapi. İçinde: Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. Koç C, Editör. 3. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2019: s. 1053-1075.

4- Alterio D, Marvaso G, Ferrari A, Volpe S, Orecchia R, Jereczek-Fossa BA. Modern radiotherapy for head and neck cancer. Semin Oncol. 2019; 46(3): 233-245. doi: 10.1053/j.seminoncol.2019.07.002.

5- Nguyen NP, Sallah S, Karlsson U, Antoine JE. Combined chemotherapy and radiation therapy for head and neck malignancies: quality of life issues. Cancer. 2002; 94(4): 1131-1141. doi: 10.1002/cncr.10257.

6- Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. Int J Mol Sci. 2019; 20(6): 1305. doi: 10.3390/ijms20061305.

7- Rithidech KN, Tungjai M, Whorton EB. Protective effect of apigenin on radiation-induced chromosomal damage in human lymphocytes. Mutat Res. 2005; 585(1-2): 96-104. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.04.003.

8- Begum N, Rajendra Prasad N, Kanimozhi G, Agilan B. Apigenin prevents gamma radiation-induced gastrointestinal damages by modulating inflammatory and apoptotic signalling mediators. Nat Prod Res. 2022; 36(6): 1631-1635. doi: 10.1080/14786419.2021.1893316.

9- Patel VN, Hoffman MP. Salivary gland development: a template for regeneration. Semin Cell Dev Biol. 2014; 25-26: 52-60. doi: 10.1016/j.semcdb.2013.12.001.

10- Jaskoll T, Melnick M. Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF-alpha/EGF, IGF, TGF-beta, TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF-beta2, TGF-beta3, and EGF-r null mutations. Anat Rec. 1999; 256(3): 252-268. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(19991101)256:3<252::AID-AR5>3.0.CO;2-6.

11- Som P M, Miletich I. The embryology of the salivary glands: an update. Neurographics. 2015; 5(4): 167-177. doi: 10.3174/ng.4150122.

12- Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. Monogr Oral Sci. 2014; 24: 1-13. doi: 10.1159/000358776.

13- Ghannam MG, Singh P. Anatomy, Head and Neck, Salivary Glands. [Updated 2022 Jun 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538325/

14- Carlson GW. The salivary glands. Embryology, anatomy, and surgical applications. Surg Clin North Am. 2000; 80(1): 261-273. doi: 10.1016/s0039-6109(05)70405-9.

15- Orabi AA, Riad MA, O'Regan MB. Stylomandibular tenotomy in the transcervical removal of large benign parapharyngeal tumours. Br J Oral Maxillofac Surg. 2002; 40(4): 313-316. doi: 10.1016/s0266-4356(02)00146-8.

16- van der Meer WL, van Tilburg M, Mitea C, Postma AA. A Persistent Foramen of Huschke: A Small Road to Misery in Necrotizing External Otitis. AJNR Am J Neuroradiol. 2019; 40(9): 1552-1556. doi: 10.3174/ajnr.A6161.

17- Holsinger FC, Bui DT. Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands. In: Salivary Gland Disorders. Myers EN, Ferris RL, Eds. Berlin: Springer, 2007: p. 1-16.

18- Monkhouse WS. The anatomy of the facial nerve. Ear Nose Throat J. 1990; 69(10): 677-683.

19- Matejcík V. Peripheral nerve reconstruction by autograft. Injury. 2002; 33(7): 627-631. doi: 10.1016/s0020-1383(02)00073-6.

20- Motz KM, Kim YJ. Auriculotemporal Syndrome (Frey Syndrome). Otolaryngol Clin North Am. 2016; 49(2): 501-509. doi: 10.1016/j.otc.2015.10.010.

21- Garatea-Crelgo J, Gay-Escoda C, Bermejo B, Buenechea-Imaz R. Morphological study of the parotid lymph nodes. J Craniomaxillofac Surg. 1993; 21(5): 207-209. doi: 10.1016/s1010-5182(05)80483-4.

22- Beale T, Madani G. Anatomy of the salivary glands. Semin Ultrasound CT MR. 2006; 27(6): 436-439. doi: 10.1053/j.sult.2006.09.001.

23- Ishizuka K, Oskutyte D, Satoh Y, Murakami T. Multi-source inputs converge on the superior salivatory nucleus neurons in anaesthetized rats. Auton Neurosci. 2010; 156(1-2): 104-110. doi: 10.1016/j.autneu.2010.03.014.

24- Guellec D, Cornec D, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Marcorelles P, Pers JO, et al. Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjögren's syndrome: a systematic review. Autoimmun Rev. 2013; 12(3): 416-420. doi: 10.1016/j.autrev.2012.08.001.

25- Varga G. Physiology of the salivary glands. Surgery (Oxford), 2012; 30(11): 578-583. doi: 10.1016/j.mpsur.2012.09.010.

26- Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001; 85(2): 162-169. doi: 10.1067/mpr.2001.113778.

27- Proctor GB. The physiology of salivary secretion. Periodontol 2000. 2016; 70(1): 11-25. doi: 10.1111/prd.12116.

28- Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO3 secretion. Physiol Rev. 2012; 92(1): 39-74. doi: 10.1152/physrev.00011.2011.

29- Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. Acta Histochem Cytochem. 2012; 45(5): 241-250. doi: 10.1267/ahc.12013.

30- Amano O. The salivary gland: anatomy for surgeons and researchers. Jpn J Oral Maxillofac Surg. 2011; 57(7): 384-393. doi: 10.5794/jjoms.57.384.

31- Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004; 59(4): 928-942. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.03.005.

32- Roopashri G, Baig M. Current advances in radiotherapy of head and neck malignancies. J Int Oral Health. 2013; 5(6): 119-123.

33- Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, Zhang Q, Grégoire V, Nankivell M, et al. Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. Lancet Oncol. 2017; 18(9): 1221-1237. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30458-8.

34- Dragovic J, Doyle TJ, Tilchen EJ, Nichols RD, Benninger MS, Carlson ER, et al. Accelerated fractionation radiotherapy and concomitant chemotherapy in patients with stage IV inoperable head and neck cancer. Cancer. 1995; 76(9): 1655-1661. doi: 10.1002/1097-0142(19951101)76:9<1655::aid-cncr2820760923>3.0.co;2-q.

35- Ho JC, Phan J. Reirradiation of head and neck cancer using modern highly conformal techniques. Head Neck. 2018; 40(9): 2078-2093. doi: 10.1002/hed.25180.

36- Stenson KM, MacCracken E, List M, Haraf DJ, Brockstein B, Weichselbaum R, et al. Swallowing function in patients with head and neck cancer prior to treatment. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2000; 126(3): 371-377. doi: 10.1001/archotol.126.3.371.

37- Pauloski BR, Rademaker AW, Logemann JA, Colangelo LA. Speech and swallowing in irradiated and nonirradiated postsurgical oral cancer patients. Otolaryngol Head Neck Surg. 1998; 118(5): 616-624. doi: 10.1177/019459989811800509.

38- Pauloski BR, Logemann JA. Impact of tongue base and posterior pharyngeal wall biomechanics on pharyngeal clearance in irradiated postsurgical oral and oropharyngeal cancer patients. Head Neck. 2000; 22(2): 120-131. doi: 10.1002/(sici)1097-0347(200003)22:2<120::aid-hed3>3.0.co;2-u.

39- List MA, Mumby P, Haraf D, Siston A, Mick R, MacCracken E, et al. Performance and quality of life outcome in patients completing concomitant chemoradiotherapy protocols for head and neck cancer. Qual Life Res. 1997; 6(3): 274-284. doi: 10.1023/a:1026419023481.

40- Huguenin PU, Taussky D, Moe K, Meister A, Baumert B, Lütolf UM, et al. Quality of life in patients cured from a carcinoma of the head and neck by radiotherapy: the importance of the target volume. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999; 45(1): 47-52. doi: 10.1016/s0360-3016(99)00128-5.

41- Hammerlid E, Mercke C, Sullivan M, Westin T. A prospective quality of life study of patients with oral or pharyngeal carcinoma treated with external beam irradiation with or without brachytherapy. Oral Oncol. 1997; 33(3): 189-196. doi: 10.1016/s0964-1955(96)00069-3.

42- Ben-Aryeh H, Gutman D, Szargel R, Laufer D. Effects of irradiation on saliva in cancer patients. Int J Oral Surg. 1975; 4(5): 205-210. doi: 10.1016/s0300-9785(75)80027-5.

43- Dreizen S, Brown LR, Handler S, Levy BM. Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes. Cancer. 1976; 38(1): 273-278. doi: 10.1002/1097-0142(197607)38:1<273::aid-cncr2820380141>3.0.co;2-8.

44- Gebhardt BJ, Vargo JA, Ling D, Jones B, Mohney M, Clump DA, et al. Carotid Dosimetry and the Risk of Carotid Blowout Syndrome After Reirradiation With Head and Neck Stereotactic Body Radiation Therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2018; 101(1): 195-200. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.11.045.

45- Thalhammer C, Husmann M, Glanzmann C, Studer G, Amann-Vesti BR. Carotid artery disease after head and neck radiotherapy. Vasa. 2015; 44(1): 23-30. doi: 10.1024/0301-1526/a000403.

46- Nederfors T. Xerostomia and hyposalivation. Adv Dent Res. 2000; 14: 48-56. doi: 10.1177/08959374000140010701.

47- Jensen JL, Barkvoll P. Clinical implications of the dry mouth. Oral mucosal diseases. Ann N Y Acad Sci. 1998; 842: 156-162. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09643.x.

48- Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia: etiology, recognition and treatment. J Am Dent Assoc. 2003; 134(1): 61-69. doi: 10.14219/jada.archive.2003.0018.

49- Wu AJ, Ship JA. A characterization of major salivary gland flow rates in the presence of medications and systemic diseases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993; 76(3): 301-306. doi: 10.1016/0030-4220(93)90258-6.

50- Schein OD, Hochberg MC, Muñoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K, Provost T, et al. Dry eye and dry mouth in the elderly: a population-based assessment. Arch Intern Med. 1999; 159(12): 1359-1363. doi: 10.1001/archinte.159.12.1359.

51- Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. Crit Rev Oral Biol Med. 2003; 14(3): 199-212. doi: 10.1177/154411130301400305.

52- Dreyer JO, Sakuma Y, Seifert G. Die Strahlen-Sialadenitis. Stadieneinteilung und Immunhistologie [Radiation-induced sialadenitis. Stage classification and immunohistology]. Pathologe. 1989; 10(3): 165-170. German.

53- Dreizen S, Brown LR, Handler S, Levy BM. Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes. Cancer. 1976; 38(1): 273-278. doi: 10.1002/1097-0142(197607)38:1<273::aid-cncr2820380141>3.0.co;2-8.

54- Epstein JB, Chin EA, Jacobson JJ, Rishiraj B, Le N. The relationships among fluoride, cariogenic oral flora, and salivary flow rate during radiation therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 86(3): 286-292. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90173-1.

55- Silverman S Jr, Luangjarmekorn L, Greenspan D. Occurrence of oral Candida in irradiated head and neck cancer patients. J Oral Med. 1984; 39(4): 194-196.

56- Ramirez-Amador V, Silverman S Jr, Mayer P, Tyler M, Quivey J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997; 84(2): 149-153. doi: 10.1016/s1079-2104(97)90061-5.

57- Baudelet M, Van den Steen L, Tomassen P, Bonte K, Deron P, Huvenne W et al. Very late xerostomia, dysphagia, and neck fibrosis after head and neck radiotherapy. Head Neck. 2019; 41(10): 3594-3603. doi: 10.1002/hed.25880.

58- Beumer J 3rd, Curtis T, Harrison RE. Radiation therapy of the oral cavity: sequelae and management, part 1. Head Neck Surg. 1979; 1(4): 301-312. doi: 10.1002/hed.2890010404.

59- Ohrn KE, Wahlin YB, Sjödén PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. Support Care Cancer. 2001; 9(4): 247-257. doi: 10.1007/s005200000214.

60- al-Nawas B, Grötz KA, Rose E, Duschner H, Kann P, Wagner W. Using ultrasound transmission velocity to analyse the mechanical properties of teeth after in vitro, in situ, and in vivo irradiation. Clin Oral Investig. 2000; 4(3): 168-172. doi: 10.1007/s007840000068.

61- Specht L. Oral complications in the head and neck radiation patient. Introduction and scope of the problem. Support Care Cancer. 2002; 10(1): 36-39. doi: 10.1007/s005200100283.

62- Chencharick JD, Mossman KL. Nutritional consequences of the radiotherapy of head and neck cancer. Cancer. 1983; 51(5): 811-815. doi: 10.1002/1097-0142(19830301)51:5<811::aid-cncr2820510511>3.0.co;2-m.

63- Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. J Oral Maxillofac Surg. 2000; 58(10): 1088-1093. doi: 10.1053/joms.2000.9562.

64- Jham BC, da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. Braz J Otorhinolaryngol. 2006; 72(5): 704-708. doi: 10.1016/s1808-8694(15)31029-6.

65- Meyer I. Infectious diseases of the jaws. J Oral Surg. 1970; 28(1): 17-26.

66- Tong AC, Leung AC, Cheng JC, Sham J. Incidence of complicated healing and osteoradionecrosis following tooth extraction in patients receiving radiotherapy for treatment of nasopharyngeal carcinoma. Aust Dent J. 1999; 44(3): 187-194. doi: 10.1111/j.1834-7819.1999.tb00220.x.

67- Epstein J, van der Meij E, McKenzie M, Wong F, Lepawsky M, Stevenson-Moore P. Postradiation osteonecrosis of the mandible: a long-term follow-up study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997; 83(6): 657-662. doi: 10.1016/s1079-2104(97)90314-0.

68- Wang W, Xue C, Mao X. Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides. Int J Biol Macromol. 2020; 153: 373-384. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.203.

69- Gerić M, Gajski G, Mihaljević B, Miljanić S, Domijan AM, Garaj-Vrhovac V. Radioprotective properties of food colorant sodium copper chlorophyllin on human peripheral blood cells in vitro. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2019; 845: 403027. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.02.008.

70- Li X, Wang L, Wang Z. Radioprotective activity of neutral polysaccharides isolated from the fruiting bodies of Hohenbuehelia serotina. Phys Med. 2015; 31(4): 352-359. doi: 10.1016/j.ejmp.2015.02.004.

71- Dobrzyńska MM. Resveratrol as promising natural radioprotector. A review. Rocz Panstw Zakl Hig. 2013; 64(4): 255-262.

72- Andreassen CN, Grau C, Lindegaard JC. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. Semin Radiat Oncol. 2003; 13(1): 62-72. doi: 10.1053/srao.2003.50006.

73- Santini V, Giles FJ. The potential of amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. Haematologica. 1999; 84(11): 1035-1042.

74- Washburn LC, Rafter JJ, Hayes RL. Prediction of the effective radioprotective dose of WR-2721 in humans through an interspecies tissue distribution study. Radiat Res. 1976; 66(1): 100-105.

75- Rades D, Fehlauer F, Bajrovic A, Mahlmann B, Richter E, Alberti W. Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients. Radiother Oncol. 2004; 70(3): 261-264. doi: 10.1016/j.radonc.2003.10.005.

76- Gu J, Zhu S, Li X, Wu H, Li Y, Hua F. Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. PLoS One. 2014; 9(5): 95968. doi: 10.1371/journal.pone.0095968.

77- Anné PR. Phase II trial of subcutaneous amifostine in patients undergoing radiation therapy for head and neck cancer. Semin Oncol. 2002; 29(6 Suppl 19): 80-83. doi: 10.1053/sonc.2002.37350b.

78- Koukourakis MI, Kyrias G, Kakolyris S, Kouroussis C, Frangiadaki C, Giatromanolaki A, et al. Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. J Clin Oncol. 2000; 18(11): 2226-2233. doi: 10.1200/JCO.2000.18.11.2226.

79- Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, Meropol NJ, Cohen GI, Broder G, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. J Clin Oncol. 1999; 17(10): 3333-3355. doi: 10.1200/JCO.1999.17.10.3333.

80- Brizel DM, Wasserman TH, Henke M, Strnad V, Rudat V, Monnier A, et al. Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer. J Clin Oncol. 2000; 18(19): 3339-3345. doi: 10.1200/JCO.2000.18.19.3339.

81- Sasse AD, Clark LG, Sasse EC, Clark OA. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006; 64(3): 784-791. doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.06.023.

82- Antonadou D, Coliarakis N, Synodinou M, Athanassiou H, Kouveli A, Verigos C, et al. Randomized phase III trial of radiation treatment +/- amifostine in patients with advanced-stage lung cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001; 51(4): 915-922. doi: 10.1016/s0360-3016(01)01713-8.

83- Amarowicz R, Carle R, Dongowski G, Durazzo A, Galensa R, Kammerer D, et al. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. Mol Nutr Food Res. 2009; 53 Suppl 2: 151-183. doi: 10.1002/mnfr.200700486.

84- Ali F, Rahul Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. Int J Food Properties. 2017; 20(6), 1197-1238. doi: 10.1080/10942912.2016.1207188.

85- Gradolatto A, Basly JP, Berges R, Teyssier C, Chagnon MC, Siess MH, et al. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. Drug Metab Dispos. 2005; 33(1): 49-54. doi: 10.1124/dmd.104.000893.

86- Takagaki N, Sowa Y, Oki T, Nakanishi R, Yogosawa S, Sakai T. Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. Int J Oncol. 2005; 26(1): 185-189. doi: 10.3892/ijo.26.1.185.

87- Seo HS, Choi HS, Kim SR, Choi YK, Woo SM, Shin I, et al. Apigenin induces apoptosis via extrinsic pathway, inducing p53 and inhibiting STAT3 and NFκB signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. Mol Cell Biochem. 2012; 366(1-2): 319-334. doi: 10.1007/s11010-012-1310-2.

88- Karmakar S, Davis KA, Choudhury SR, Deeconda A, Banik NL, Ray SK. Bcl-2 inhibitor and apigenin worked synergistically in human malignant neuroblastoma cell lines and increased apoptosis with activation of extrinsic and intrinsic pathways. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 388(4): 705-710. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.071.

89- Li RR, Pang LL, Du Q, Shi Y, Dai WJ, Yin KS. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2010; 32(3): 364-370. doi: 10.3109/08923970903420566.

90- Zhang Y, Wang J, Cheng X, Yi B, Zhang X, Li Q. Apigenin induces dermal collagen synthesis via smad2/3 signaling pathway. Eur J Histochem. 2015; 59(2): 2467. doi: 10.4081/ejh.2015.2467.

91- Ren B, Qin W, Wu F, Wang S, Pan C, Wang L, et al. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. Eur J Pharmacol. 2016; 773: 13-23. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.01.002.

92- Yi LT, Li JM, Li YC, Pan Y, Xu Q, Kong LD. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. Life Sci. 2008; 82(13-14): 741-751. doi: 10.1016/j.lfs.2008.01.007.

93- Shoara R, Hashempur MH, Ashraf A, Salehi A, Dehshahri S, Habibagahi Z. Efficacy and safety of topical Matricaria chamomilla L. (chamomile) oil for knee osteoarthritis: A randomized controlled clinical trial. Complement Ther Clin Pract. 2015; 21(3): 181-187. doi: 10.1016/j.ctcp.2015.06.003.

94- Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. Crit Care Med. 1993; 21(10 Suppl): 447-463. doi: 10.1097/00003246-199310001-00006.

95- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. Rheumatology (Oxford). 2010; 49(7): 1215-1228. doi: 10.1093/rheumatology/keq031.

96- Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol. 2008; 214(2): 149-160. doi: 10.1002/path.2287.

97- Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? Annu Rev Immunol. 2001; 19: 163-196. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.163.

98- Wallis RS, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. Clin Infect Dis. 2004; 38(9): 1261-1265. doi: 10.1086/383317.

99- Plevová P. Radiotherapy-and chemotherapy-induced normal tissue damage: the role of cytokines and adhesion molecules. Radiol Oncol. 2002; 36(2): 109-119.

100- Citrin DE, Hitchcock YJ, Chung EJ, Frandsen J, Urick ME, Shield W, et al. Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies. Radiat Oncol. 2012; 7: 64. doi: 10.1186/1748-717X-7-64.

101- Ong ZY, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Darby JM, Logan RM, et al. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. Radiat Oncol. 2010; 5: 22. doi: 10.1186/1748-717X-5-22.

102- Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) in Autoimmune Disease and Current TNF-α Inhibitors in Therapeutics. Int J Mol Sci. 2021; 22(5): 2719. doi: 10.3390/ijms22052719.

103- Apigenin [Internet]. Cayman Chemical; 12.12.2022 [cited date accessed]. Available from: https://www.caymanchem.com/product/10010275/apigenin.

104- Rezaeyan A, Fardid R, Haddadi GH, Takhshid MA, Hosseinzadeh M, Najafi M, et al. Evaluating Radioprotective Effect of Hesperidin on Acute Radiation Damage in the Lung Tissue of Rats. J Biomed Phys Eng. 2016; 6(3): 165-174.

105- Lopez-Jornet P, Gómez-García F, García Carrillo N, Valle-Rodríguez E, Xerafin A, Vicente-Ortega V. Radioprotective effects of lycopene and curcumin during local irradiation of parotid glands in Sprague Dawley rats. Br J Oral Maxillofac Surg. 2016; 54(3): 275-279. doi: 10.1016/j.bjoms.2016.01.013.

106- Kim JH, Kim KM, Jung MH, Jung JH, Kang KM, Jeong BK, et al. Protective effects of alpha lipoic acid on radiation-induced salivary gland injury in rats. Oncotarget. 2016; 7(20): 29143-29153. doi: 10.18632/oncotarget.8661.

107- Konak M, Cincik H, Erkul E, Kucukodaci Z, Gungor A, Ozdemir S, et al. The protective effects of different treatments on rat salivary glands after radiotherapy. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2016; 273(12): 4501-4506. doi: 10.1007/s00405-016-4159-2.

108- Alfouzan AF. Radiation therapy in head and neck cancer. Saudi Med J. 2021; 42(3): 247-254. doi: 10.15537/smj.2021.42.3.20210660.

109- Lederman M. The early history of radiotherapy: 1895-1939. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1981; 7(5): 639-648. doi: 10.1016/0360-3016(81)90379-5.

110- Brook I. Early side effects of radiation treatment for head and neck cancer. Cancer Radiother. 2021; 25(5): 507-513. doi: 10.1016/j.canrad.2021.02.001.

111- Cengiz M. Baş-Boyun Kanserlerinde Radyoterapi. İçinde: Kulak Burun Boğaz Baş Boyun Cerrahisi – Baş Boyun Cerrahisi. Önerci TM, Korkmaz MH, Editörler. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2021: s. 477-482.

112- Yeh SA. Radiotherapy for head and neck cancer. Semin Plast Surg. 2010; 24(2): 127-136. doi: 10.1055/s-0030-1255330.

113- Tokgöz SA, Vuralkan E, Yılmaz O. Tükrük Bezi Tümörleri. İçinde: Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. Koç C, Editör. 3. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2019: s. 881-895.

114- Chen AM, Garcia J, Bucci MK, Quivey JM, Eisele DW. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: long-term outcome of patients treated with radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006; 66(4): 1031-1035. doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.06.036.

115- Vissink A, van Luijk P, Langendijk JA, Coppes RP. Current ideas to reduce or salvage radiation damage to salivary glands. Oral Dis. 2015; 21(1): 1-10. doi: 10.1111/odi.12222.

116- Elsurer C, Celik ZE, Yavas G, Yavas C. Spironolactone ameliorates the radiation-induced late fibrosis in salivary glands in a rat model. International J Radiation Res. 2010; 18(1): 149-155. doi: 10.18869/acadpub.ijrr.18.1.149.

117- Kashima HK, Kirkham WR, Andrews JR. Postirradiation sialoadentis. Am J Roentgenol. 1965; 94: 271-291.

118- Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. Oral Dis. 2002; 8(3): 141-146. doi: 10.1034/j.1601-0825.2002.02838.x.

119- Coppes RP, Vissink A, Konings AW. Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. Radiother Oncol. 2002; 63(3): 321-328. doi: 10.1016/s0167-8140(02)00129-9.

120- De la Cal C, Fernández-Solari J, Mohn C, Prestifilippo J, Pugnaloni A, Medina V, et al. Radiation produces irreversible chronic dysfunction in the submandibular glands of the rat. Open Dent J. 2012; 6: 8-13. doi: 10.2174/1874210601206010008.

121- Liu G, Qiu X, Tan X, Miao R, Tian W, Jing W. Efficacy of a 1% malic acid spray for xerostomia treatment: A systematic review and meta-analysis. Oral Dis. 2023; 29(3): 862-872. doi: 10.1111/odi.14116.

122- Sakat MS, Kılıç K, Sahin A, Ozmen HK, Yıldırım S, Kiziltunc A, et al. The protective efficacy of Quercetin and Naringenin against radiation-related submandibular gland injury in female rats: A histopathological, immunohistochemical, and biochemical study. Arch Oral Biol. 2022; 142: 105510. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105510.

123- Karagöz T, Korkmaz MH. Baş-Boyun Kanserlerinde Yeni Tedavi Modaliteleri. İçinde: Kulak Burun Boğaz Baş Boyun Cerrahisi – Baş Boyun Cerrahisi. Önerci TM, Korkmaz MH, Editörler. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2021: s. 23-31.

124- Krishnan M, Tennavan A, Saraswathy S, Sekhri T, Singh AK, Nair V. Acute Radiation-Induced Changes in Sprague-Dawley Rat Submandibular Glands: A Histomorphometric Analysis. World J Oncol. 2017; 8(2): 45-52. doi: 10.14740/wjon1021w.

125- Kim JY, An CH, Kim JY, Jung JK. Experimental Animal Model Systems for Understanding Salivary Secretory Disorders. Int J Mol Sci. 2020; 21(22): 8423. doi: 10.3390/ijms21228423.

126- van Luijk P, Faber H, Schippers JM, Brandenburg S, Langendijk JA, Meertens H, et al. Bath and shower effects in the rat parotid gland explain increased relative risk of parotid gland dysfunction after intensity-modulated radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009; 74(4): 1002-1005. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.03.039.

127- Seikaly H, Jha N, Harris JR, Barnaby P, Liu R, Williams D, et al. Long-term outcomes of submandibular gland transfer for prevention of postradiation xerostomia. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004; 130(8): 956-961. doi: 10.1001/archotol.130.8.956.

128- Coppes RP, Stokman MA. Stem cells and the repair of radiation-induced salivary gland damage. Oral Dis. 2011; 17(2): 143-153. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01723.x.

129- Pringle S, Van Os R, Coppes RP. Concise review: Adult salivary gland stem cells and a potential therapy for xerostomia. Stem Cells. 2013; 31(4): 613-619. doi: 10.1002/stem.1327.

130- Grundmann O, Fillinger JL, Victory KR, Burd R, Limesand KH. Restoration of radiation therapy-induced salivary gland dysfunction in mice by post therapy IGF-1 administration. BMC Cancer. 2010; 10: 417. doi: 10.1186/1471-2407-10-417.

131- Rosen EM, Day R, Singh VK. New approaches to radiation protection. Front Oncol. 2015; 4: 381. doi: 10.3389/fonc.2014.00381.

132- Nagler R, Marmary Y, Golan E, Chevion M. Novel protection strategy against X-ray-induced damage to salivary glands. Radiat Res. 1998; 149(3): 271-276.

133- Teymoortash A, Müller F, Juricko J, Bieker M, Mandic R, Librizzi D, et al. Botulinum toxin prevents radiotherapy-induced salivary gland damage. Oral Oncol. 2009; 45(8): 737-739. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.11.014.

134- van Rijn J, van den Berg J. Flavonoids as enhancers of x-ray-induced cell damage in hepatoma cells. Clin Cancer Res. 1997; 3(10): 1775-1779.

135- Fischer N, Seo EJ, Efferth T. Prevention from radiation damage by natural products. Phytomedicine. 2018; 47: 192-200. doi: 10.1016/j.phymed.2017.11.005.

136- Hillman GG, Singh-Gupta V, Runyan L, Yunker CK, Rakowski JT, Sarkar FH, et l. Soy isoflavones radiosensitize lung cancer while mitigating normal tissue injury. Radiother Oncol. 2011; 101(2): 329-336. doi: 10.1016/j.radonc.2011.10.020.

137- Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R, Tarkowski A. Genistein as an anti-inflammatory agent. Inflamm Res. 2003; 52(8): 341-346. doi: 10.1007/s00011-003-1182-8.

138- Gandhi NM. Baicalein protects mice against radiation-induced DNA damages and genotoxicity. Mol Cell Biochem. 2013; 379(1-2): 277-281. doi: 10.1007/s11010-013-1649-z.

139- Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. Nutrients. 2016; 8(3): 167. doi: 10.3390/nu8030167.

140- Joshi R, Kulkarni YA, Wairkar S. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. Life Sci. 2018; 215: 43-56. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.066.

141- Zhao L, Wang JL, Liu R, Li XX, Li JF, Zhang L. Neuroprotective, anti-amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenin in an Alzheimer's disease mouse model. Molecules. 2013; 18(8): 9949-9965. doi: 10.3390/molecules18089949.

142- Shukla S, Bhaskaran N, Babcook MA, Fu P, Maclennan GT, Gupta S. Apigenin inhibits prostate cancer progression in TRAMP mice via targeting PI3K/Akt/FoxO pathway. Carcinogenesis. 2014; 35(2): 452-460. doi: 10.1093/carcin/bgt316.

143- Rašković A, Gigov S, Čapo I, Paut Kusturica M, Milijašević B, Kojić-Damjanov S, et al. Antioxidative and Protective Actions of Apigenin in a Paracetamol-Induced Hepatotoxicity Rat Model. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2017; 42(5): 849-856. doi: 10.1007/s13318-017-0407-0.

144- Begum N, Prasad NR, Thayalan K. Apigenin protects gamma-radiation induced oxidative stress, hematological changes and animal survival in whole body irradiated Swiss albino mice. International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases. 2012; 2(1): 45-52. doi: 10.4103/2231-0738.93134.

145- Singh P, Mishra SK, Noel S, Sharma S, Rath SK. Acute exposure of apigenin induces hepatotoxicity in Swiss mice. PLoS One. 2012; 7(2): 31964. doi: 10.1371/journal.pone.0031964.

146- Peng R, Zhang W, Zuo Z, Shan Y, Liu X, Tang Y, et al. Dimethyl sulfoxide, a potent oral radioprotective agent, confers radioprotection of hematopoietic stem and progenitor cells independent of apoptosis. Free Radic Biol Med. 2020; 153: 1-11. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.021.

147- Yang C, Tang H, Wang L, Peng R, Bai F, Shan Y, et al. Dimethyl Sulfoxide Prevents Radiation-Induced Oral Mucositis Through Facilitating DNA Double-Strand Break Repair in Epithelial Stem Cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2018; 102(5): 1577-1589. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.07.2010.

148- Nagler RM, Baum BJ, Fox PC. Acute effects of X irradiation on the function of rat salivary glands. Radiat Res. 1993; 136(1): 42-47.

149- Silvers AR, Som PM. Salivary glands. Radiol Clin North Am. 1998; 36(5): 941-966. doi: 10.1016/s0033-8389(05)70070-1.

150- Choi EM. Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Pharmazie. 2007; 62(3): 216-220.

151- Park CH, Min SY, Yu HW, Kim K, Kim S, Lee HJ, et al. Effects of Apigenin on RBL-2H3, RAW264.7, and HaCaT Cells: Anti-Allergic, Anti-Inflammatory, and Skin-Protective Activities. Int J Mol Sci. 2020; 21(13): 4620. doi: 10.3390/ijms21134620.

152- Limaye A, Hall BE, Zhang L, Cho A, Prochazkova M, Zheng C, et al. Targeted TNF-α Overexpression Drives Salivary Gland Inflammation. J Dent Res. 2019; 98(6): 713-719. doi: 10.1177/0022034519837240.