

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE RADYASYONA BAĞLI GELİŞEN
ORAL MUKOZİTİN DERMATAN SÜLFAT İLE
MODÜLASYONU: DİFERANSİYASYON
SÜREÇLERİNE ETKİLERİ**

NİLSU ÇİNİ

**MEDİKAL FİZİK DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970200

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE RADYASYONA BAĞLI GELİŞEN
ORAL MUKOZİTİN DERMATAN SÜLFAT İLE
MODÜLASYONU: DİFERANSİYASYON
SÜREÇLERİNE ETKİLERİ**

NİLSU ÇİNİ

**MEDİKAL FİZİK DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. L. Zümre ARICAN ALICIKUŞ

Prof. Dr. Wolfgang Dörr

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970200

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medikal Fizik Anabilim Dalı, Medikal Fizik Doktora programı öğrencisi Nilsu ÇİNİ 'FARELERDE RADYASYONA BAĞLI GELİŞEN ORAL MUKOZİTİN DERMATAN SÜLFAT İLE MODÜLASYONU: DİFERANSİYASYON SÜREÇLERİNE ETKİLERİ' konulu Doktora tezini ...23.09.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Fadime Akman

Dokuz Eylül Üniversitesi Dahili Tıp Bilimleri Radyasyon Onkolojisi A.D.

ÜYE

Prof. Dr. Safiye Aktaş

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

Temel Onkoloji A.D.

ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül Yurt

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

ÜYE

Prof. Dr. Turgay Karalı

Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü

Nükleer Bilimler A.D.

ÜYE

Prof. Dr. Zeynep Özşaran

Ege Üniversitesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü

Radyasyon Onkolojisi A.D.

ÜYE

Doç. Dr. Zümre Arıcan Alıcıkış

Dokuz Eylül Üniversitesi Dahili Tıp Bilimleri Radyasyon Onkolojisi A.D.

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Türkan Ertay

Dokuz Eylül Üniversitesi Dahili Tıp Bilimleri

Nükleer Tıp A.D.

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Cüneyt Çeliktaş

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi

Fizik Bölümü Nükleer Fizik A.D.

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vii
ÖNSÖZ (TEŞEKKÜR).....	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Malign Hastalıklar.....	6
2.2. Baş-Boyun Kanseri: Önemi ve Tedavi Yaklaşımları.....	6
2.3. Oral Mukoza.....	12
2.3.1. Oral Mukozanın Katmanları.....	13
2.3.2. Oral Mukozanın Histolojik Yapısı.....	15
2.3.3. Normal Oral Epitelin Proliferasyon Modeli.....	17
2.3.4. Normal Oral Epitelin Diferansiyasyon Modeli.....	17
2.3.5. Hücre Döngüsü.....	19
2.4. Baş-Boyun Kanseri Radyo(Kemo)Terapinin Yan Etkileri.....	21
2.4.1. Erken Yan Etkiler.....	22
2.4.2. Oral mukozit.....	23

2.4.3. Geç Yan Etkiler.....	25
2.4.4. Önemli Geç Yan Etkiler.....	29
2.5. Radyasyona Maruz Kalan Doku Yatıtını Etkileyen Faktörler.....	29
2.5.1. Radyoduyarlılık.....	30
2.5.2. Tamir.....	30
2.5.3. Yeniden Düzenlenme.....	30
2.5.4. Yeniden Çoğalma.....	31
2.5.5. Yeniden Oksijenlenme.....	32
2.5.6. Işınlanan Hacim.....	33
2.5.7. Uzun- dönem Restorasyon.....	33
2.5.8. Moleküler Radyopatoloji.....	34
2.6. Radyasyona Bağlı Oral Gelişen Mukozit için Hayvan Modelleri.....	35
2.7. Dermatan Sülfat.....	36
2.8. Proliferasyon Belirteci olarak p16.....	37
2.9. Diferansiyasyon Belirteci olarak p21.....	38
2.10. Epitelyal Hücre Bağlantılarının Belirteci olarak Sitokeratin.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Araştırmanın Tipi.....	41
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	41
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	41
3.4. Çalışma Materyali.....	41

3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	42
3.6. Veri Toplama Araçları.....	42
3.6.1. Hayvanlar ve Barındırılması.....	42
3.6.2. Işınlama ve Dermatan Sülfat Tedavisinin Uygulanması.....	43
3.6.3. ImmünoHisto Kimyasal Boyama	45
3.6.4. Boyanan Hücrelerin Değerlendirilmesi.....	46
3.6.4.1. Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi.....	47
3.6.4.1.1. p16 İşaretlenme İndeksi.....	48
3.6.4.1.2. p21 İşaretlenme İndeksi.....	48
3.6.4.1.3. Sitokeratin İşaretlenme İndeksi.....	48
3.6.4.2. Boyanma Yoğunluğu.....	48
3.6.4.3. Epitel Kalınlık ve Hücre Sayıları.....	48
3.7. Araştırma Planı.....	49
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistik.....	49
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	50
3.10. Etik Kurul Onayı.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. p16 İşaretlenme Paterni, İndeksi ve Boyama Yoğunluğu.....	52
4.2. p21 İşaretlenme Paterni, İndeksi ve Boyama Yoğunluğu.....	54
4.3. Sitokeratin İşaretlenme Paterni, İndeksi ve Boyama Yoğunluğu.....	56
4.4. Epitel Kalınlık ve Hücre Sayıları.....	58

5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
7. KAYNAKLAR.....	67
8. EKLER.....	80
8.1 Etik Kurul Onayları (EK 1).....	80
8.1.1. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Onayı.....	80
8.1.2. Avusturya Hükümeti Federal Bilim ve Araştırma Bakanlığı Almanca ve Türkçe Etik Kurul Onayları.....	81
8.2. Özgeçmiş (EK 2).....	91
8.3. Tez ve Tez ile İlişkili Konularda Yayımlanmış Makaleler (EK 3).....	94
8.3.1. Sylvia Gruber, Nilsu Cini, Lisa-Marie Kowald, JuliaMayer,Andreas Rohorzka, Peter Kuess, Wolfgang Dörr. Upregulated epithelial junction expression represents a novel parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation in oral mucosa. Strahlenther Onkol. 2018.....	94
8.3.2. Sylvia Gruber, Marlene Arnold, Nilsu Cini, Victoria Gernedl, Sabine Hetzendorfer,Lisa-Marie Kowald, Peter Kuess, Julia Mayer, Susanne Morava, Stephanie Pfaffinger, Andreas Rohorzka, Wolfgang Dörr. Radioprotective effects of dermatan sulfate in a preclinical model of oral mucositis–targeting inflammation, hypoxia and junction proteins without stimulating proliferation. Int J Mol Sci. 2018.....	104
8.4. Tez ile İlgili Konuda Yayımlanamak üzere Kabul Edilen Makale (EK4).....	118
8.4.1. Nilsu Çini, Sylvia Gruber, Zumre Arıcan Alıcıkuş, Wolfgang Dörr. Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by dermatan sulfate: effects on differentiation processes. Strahlenther Onkol. 2019.....	118

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Konvansiyonel fraksiyonasyonun farklı fraksiyonasyon

şemalarının karşılaştırılması.....9

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. BBK Anatomik lokalizasyonları.....7

Şekil 2.2. BBK RT tedavi alanındaki normal doku tanımlamaları.....10

Şekil 2.3. İnsan normal oral mukozasının histolojik yapısı.....15

Şekil 2.4. Fare normal oral mukozasının histolojik yapısı.....16

Şekil 2.5. Hücre döngüsünün kontrol noktaları.....20

Şekil.2.6. Hücre döngüsü ve radyoduyarlılık.....21

Şekil 2.7. RT ve KT altında OM gelişim süreci.....23

Şekil 2.8. WHO ve NCI-CTC OM ölçeklendirmeleri ve tanımları.....24

Şekil 2.9. Radyasyona bağlı gelişen fibrozisin ve normal yaranın iyileşme yolları.....26

Şekil 2.10. Radyasyon ile indüklenen fibroenez oluşumunda yer alan önemli süreçler.....28

Şekil 2.11. Preklinik fare modelinde alt dil epiteli ülseri.....36

Şekil 3.1. Fare Işınlama Dizaynı.....44

Şekil 3.2. Deney dizaynı.....44

Şekil 3.3. p16 ile İHK boyanan fare alt dil epiteli.....47

Şekil 4.1. Farksiyone IR +/- DS sırasında p16, p21 ve SK ekspresyonu.....51

Şekil 4.2. Fraksiyone IR +/- DS'in p16 için pozitif hücre sayısı %'si	
ve boyanma yoğunluğuna etkisi.....	53
Şekil 4.3. Fraksiyone IR +/- DS'in p21 için pozitif hücre sayısı %'si	
ve boyanma yoğunluğuna etkisi.....	55
Şekil 4.4. Fraksiyone IR +/- DS'in SK için pozitif hücre sayısı %'si	
ve boyanma yoğunluğuna etkisi.....	57
Şekil 4.5. Fraksiyone IR +/- DS tedavisi sırasında p16, p21 ve SK	
epitelyal ekspresyonunda rölatif epitelyal kalınlık.....	59
Şekil 4.6. Fraksiyone IR +/- DS tedavisi sırasında p16, p21 ve SK	
epitelyal ekspresyonunda rölatif epitelyal hücre sayıları.....	61

KISALTMALAR

OM: Oral Mukozit

BBK: Baş-Boyun Kanseri

RKT: Radyo Kemo Terapi

DS: Dermatan Sülfat

IR: Irradiation- Işınlama

IHK: İmmünohistokimyasal

SK: Sitokeratin

SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom

BBSHK: Baş-Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom

HPV: Human PapillomaVirus- İnsan Papillom Virüsü

RT: Radyoterapi

KT: Kemoterapi

IMRT: Intensity Modulated Radiation Theraphy- Yoğunluk Ayarlı Radyo Terapi

VMAT: Volumetric Arc Theraphy- Volüm Ayarlı Ark Terapi

IGRT: Image Guided Radiation Theraphy- Görüntü Kılavuzlu Radyo Terapi

SRS: Stereotactic Radio Surgery- Stereotaktik Radyo Cerrahi

Gy: Gray

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor- Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

Rb: Retinoblastom

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

ROS: Reactive Oxygen Species- Reaktif Oksijen Türleri

WHO: World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü

NCI: National Cancer Institute- Ulusal Kansere Enstitüsü

CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events- Yan Etkiler için Ortak Terim Kriterleri

MASCC: The Multinational Association of Supportive Care in Cancer- Çokuluslu Kanserde Destek Bakım Derneği

ISOO: International Society of Oral Oncology- Uluslararası Oral Onkoloji Derneği

ECM: Extracellular Matrix- Hücre Dışı Matriks

LAP: Latency Associated Peptide- Gecikme İlişkili Peptit

TGF β : Transforming Growth Factor- β - Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β

RNS: Reactive Nitrogen Species- Reaktif Azot Türleri

GAG: Glikozaminoglikan

FGF: Fibroblast Growth Factor- Fibroblast Büyüme Faktörü

HCII: Heparin Cofactor II- Heparin Kofaktör II

APC: Activated Protein C- Aktive Protein C

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern- Patojenle İlişkili Moleküler Model

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor- Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü

SD: Standart Deviation- Standart Sapma

a.u.: arbitrary unit- rastgele birim

SEM: Standart Error Mean- Standart Hata Ortalaması

ÖNSÖZ (TEŞEKKÜR)

Tez çalışması, Viyana Medikal Üniversitesi Radyoterapi Anabilim Dalı Uygulamalı ve Translasyonel Radyobioloji (Applied and Translational Radiobiology-ATLAB) ve İyon Tedavisi ve Araştırma Merkezi MedAustron, Klinik Olmayan Araştırma Bölümü (Applied and Translational Radiobiology Nonclinical Research Ion Therapy and Research Center MedAustron) laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bu kapsamda her iki birimin laboratuvar ekibine içtenlik ile teşekkür ederim.

Doktora öğrencisi olduğum ve doktora ders eğitimim süresince emeği geçen DEÜ Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda ve DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medikal Fizik Anabilim Dalı'nda bizlere rehberlik eden sevgili hocalarıma teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışmasının ortaya çıkışını sağlayan, beni öğrencisi olarak Viyana'ya davet eden ve dört yıl boyunca her ziyaretimin tüm sürecini yöneten Viyana Medikal Üniversitesinde görevli değerli tez danışmanım Prof. Dr. Wolfagnag Dörr'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

En başından beri destekçim ve örnek aldığım Dokuz Eylül Üniversitesinde görevli tez danışmanım sayın Doç. Dr. Zümre Arıcan Alıcıkuş'a çalışmanın her aşamasında gösterdiği ilgi ve yardımlar için çok teşekkür ederim.

Tezin deney sürecinde ve çalışmanın her aşamasında benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşan, çalışma sonuca ulaşmaya kadar sonsuz özveri ve titizlik gösteren, Sylvia Gruber'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Wiener Neustadt'da bana evlerini açan, destekleri ile bu çalışmayı dört yıl boyunca İzmir, İstanbul ve Viyana arasında coşku ile sürdürmemi sağlayan Kahraman, Şen ve Ceylan ailelerine en derin minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini ve güvenlerini her zaman yanımda hissettiğim biricik ve değerli geniş aileme, her anıma mutluluk katan dostlarıma sonsuz teşekkürler.

Nilsu ÇİNİ

2019, İSTANBUL

ÖZET

FARELERDE RADYASYONA BAĞLI GELİŞEN ORAL MUKOZİTİN DERMATAN SÜLFAT İLE MODÜLASYONU: DİFERANSİYASYON SÜREÇLERİNE ETKİLERİ

Nilsu ÇİNİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Fizik Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir

nilsucini@gmail.com

Amaç: Oral mukozit (OM), baş boyun kanserleri (BBK) tedavisinde uygulanan radyokemoterapinin (RKT) sık görülen, erken yan etkisidir. Bu ülseratif epitelyal oluşumun moleküler patogenezinde, epitelyal hücrelerin diferansiyasyon süreçlerindeki değişikliklerin etkili olduğu düşünülmektedir. Fraksiyone ışınlama (Irradiation-IR) sırasında dermatan sülfat (DS) uygulamasının oral mukozanın radyasyon toleransını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Tasarlanan hayvan modelinde IR tek başına veya DS tedavisi ile kombinasyonu altında oral epitelyal diferansiyasyonun mekanizmasının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal-Metod: İmmünsistemi normal C3H/Neu suşundan dişi/erkek 140 fare, günlük fraksiyone 3 Gray(Gy) iki hafta boyunca toplam doz 30Gy/10fraksiyon, tek başına IR ve IR'ye ek DS tedavisi ile (IR+DS) ışınıldı. Her iki deney kolunda 14 gün boyunca, iki günde bir fare grubu (n=3) kurban edildi. Hücre proliferasyon belirteci p16, differansiyasyon belirteci p21 ve hücre iskelet bütünlüğünün göstergesi sitokeratin (SK) antikoru ile örneklerin boyanması doku spesifik protokollere göre yapıldı. İstatistiksel analizler, tek-yön ANOVA testi ile SPSS 17'de yapıldı.

Bulgular: p16 analizinde germinal (proliferasyon) tabakada tek başına IR ve IR+DS arasında anlamlı fark bulunamamıştır. p21 analizlerinde, fonksiyonel (diferansiyasyon) tabaka için, tek başına IR ve IR+DS arasında fark anlamlıdır ($p<0.05$), DS uygulanan kolda p21 pozitif hücre sayısı azalmıştır. Sitokeratin antikoru analizlerinde ise SK pozitif hücrelerin germinal ve fonksiyonel tabaka için ve her iki deney kolunda normal düzeyin altına düşmediği ve DS kolunda anlamlı fark ile üstünlüğü görülmüştür ($p<0.05$). Epitelyal kalınlıklar incelendiğinde, DS uygulanan deney kolunda ortalama epitelyal kalınlığının tek başına IR kolundan daha

yüksek olduğu bulunmuş olmasına rağmen ortalama hücre sayıları için anlamlı fark gözlenmemiştir.

Sonuç: Dermatan Sülfatın oral mukoza koruyucu özelliği, proliferasyonu uyarmak yerine, hücresel diferansiyasyonun inhibisyonuna ve hücreler arası mekanik bağların artışına yol açan etkilerin kombinasyonu ile kaliteli hücre kaybını önler ve mekanik bütünlüğü sağlar.

Anahtar Kelimeler: oral mukozit; fare modeli; dermatan sülfat; fraksiyonasyon; proliferasyon, diferansiyasyon; hücresel bağlantılar



ABSTRACT

MODULATION OF RADIATION-INDUCED ORAL MUCOSITIS (MOUSE) BY DERMATAN SULFATE: EFFECTS ON DIFFERENTIATION PROCESSES

Nilsu ÇİİNİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Fizik Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir

nilsucini@gmail.com

Purpose: During head-and-neck cancer (HNC) radio-chemotherapy (RChT) oral mucositis (OM) is the most frequently dose-limiting early side effect. Changes in the differentiation processes of epithelial cells are thought to be effective in the molecular pathogenesis of this ulcerative epithelial formation. Application of Dermatan Sulphate (DS) during fractionated irradiation (IR) has been shown to significantly increase the radiation tolerance of the oral mucosa. In the designed animal model, it was aimed to investigate the mechanism of oral epithelial differentiation by IR alone or in combination with DS treatment.

Materials and Methods: Both male/female 140 mice from the C3H/Neu strain with the normal immune system were irradiated over two weeks with daily fractionated 3 Gray (Gy) with total dose 30Gy/10fraction, IR alone and additional DS treatment (IR+DS). The mouse group (n = 3) was sacrificed every two days for 14 days in both experimental arms. Samples were stained with cell proliferation marker p16, differentiation marker p21 and cytokeratin (SK) antibody indicating cellular skeletal integrity according to tissue-specific protocols. Statistical analysis was performed with SPSS 17 by one-way ANOVA test.

Results: In p16 analysis, no significant difference was found between IR alone and IR+DS arms in the germinal (proliferation) layer. In p21 analysis, the difference between IR alone and IR+DS was significant ($p < 0.05$) for the functional (differentiation) layer, and the number of p21 positive cells decreased in the DS-treated arm. In cytokeratin antibody analysis, CK positive cells were not below the normal level for germinal and functional layer and in both experimental arms and superiority was found in DS arm ($p < 0.05$). When the epithelial thicknesses were examined, it was found that the mean epithelial thickness was higher in the

IR+DS arm than the IR alone arm, but no significant difference was observed for the average cell numbers.

Conclusion: The oral mucosal protective property of Dermatan Sulphate prevents quality cell loss and provides mechanical integrity by combining effects that lead to inhibition of cellular differentiation and increased intracellular bonds, rather than stimulating proliferation.

Keywords: oral mucositis; mouse model; dermatan sulfate; fractionation; proliferation, differentiation; cellular junctions



1. GİRİŞ VE AMAC

Oral Mukozit (OM), baş-boyun kanseri (BBK) radyokemoterapisinin (RKT) sık karşılaşılan, genelde doz sınırlayıcı erken yan etkisidir (1, 2). Oral mukozit oluşumuna epitelyal hücrelerin diferansiyasyon süreçlerindeki değişikliklerin katkısının olduğu düşünülmektedir, ancak bu ülseratif epitelyal oluşumun moleküler patogenezi belirsizdir.

Tasarlanan bir fare modeli üzerinde yapılan çalışmalarda günlük fraksiyone Işınlama (Irradiation- IR) sırasında dermatan sülfatın (DS), oral mukozanın radyasyon toleransını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (3).

Mukoza koruyucu özelliğinin temeli olarak, DS'in antikoagülan aktivitesi ile, ki bu özellik vasküler yapıların daraldığı bölgelerde kanlanma desteğini artırır, enflamasyonu azalttığı düşünülmektedir (4). Ayrıca DS etkisinin, epitelyal diferansiyasyonun modülasyonunu içerebilecek ve daha önce tarif edilmemiş mekanizmalarının tanımlanması gerekmektedir (5).

Bu çalışmanın amacı, Dörr W. (3) tarafından kurulan fare modelinde, tek başına günlük fraksiyone IR ve IR'nin DS tedavisi ile kombinasyonu altında, oral epitelyal diferansiyasyon sürecini araştırmak ve karakterize etmektir.

Çalışmada, farelerin dil örnekleri ile yapılacak immünohistokimyasal (İHK) analizler, hücre proliferasyonunun p16 belirteci ile, hücre diferansiyasyonunun p21 belirteci ile ve hücre iskelet bütünlüğünün Sitokeratin (SK) antikoru ile incelenmesi üzerine planlanmıştır.

Bu tez çalışmasının hipotezi, DS proliferasyonu uyarmadan OM üzerinde iyileştirici bir etkiye sahiptir. Bu etki diferansiyasyonun modülasyonunu ve hücresel bağlar üzerindeki etkilerin daha önce tanımlanmamış kombinasyonlarını içermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Malign Hastalıklar

Kanser, tüm dünyada yaşanan ölümlerin önde gelen nedenidir. Dünya çapında, 2008 yılında yaklaşık 12.7 milyon yeni kanser vakası ve 7.6 milyon kanser nedeniyle ölüm olduğu tahmin edilmekte olup vakaların %56'sı ve ölümlerin %64'ü ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmiştir (6).

Sadece 2012 yılında, yaklaşık 14.1 milyon yeni kanser vakası ve 8.2 milyon kanser nedeniyle ölümün meydana geldiği açıklanmıştır (7).

2.2. Baş-Boyun Kanserleri: Önemi ve Tedavi Stratejileri

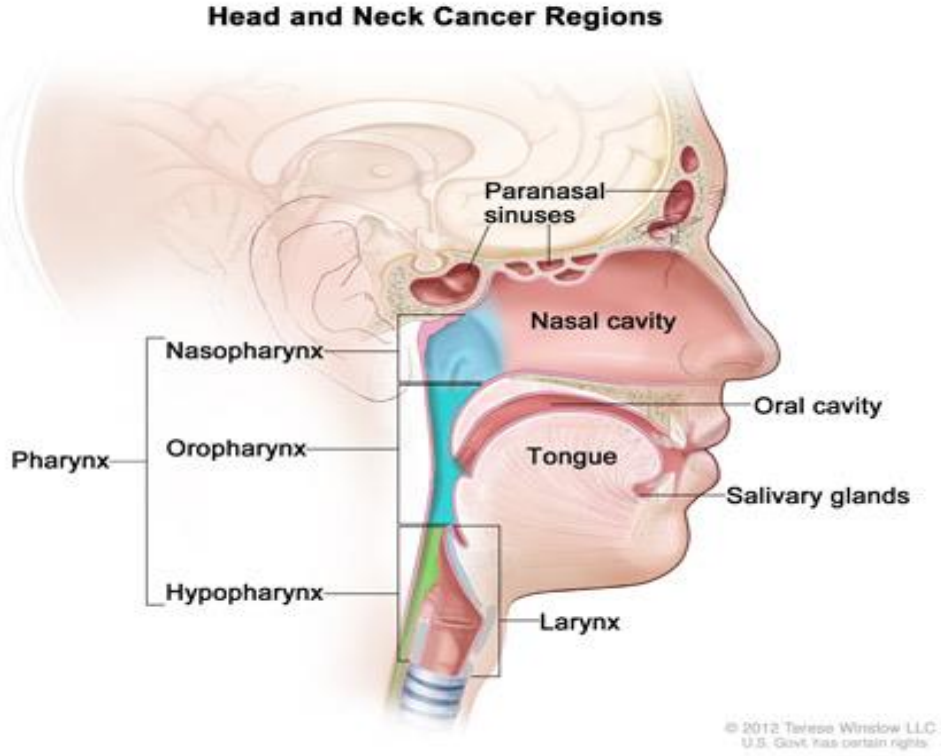
Baş-boyun kanserinin tüm maligniteler içinde oranı %18 olup dünyadaki en yaygın altıncı kanser türüdür (8, 9).

Baş-boyun kanseri genellikle, çoğunlukla majör ve minör tükürük bezi kanserleri ile birlikte gruplanmış üst aerodigestif sistem (paranasal sinüsler, nazal kavite, farenks, oral kavite ve larenks) mukozal yüzeylerinin skuamöz hücreli karsinomları (SHK) ve aynı anatomik yerleşimlerde meydana gelen diğer nadir patolojileri (örneğin, adenokarsinomlar, sarkomlar ve melanomlar) kapsamaktadır (10). (Şekil 2.1)

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (BBSHK), iki primer kanserojen yolaktan biri ile gelişen heterojen bir tümör grubudur. Bu yollardan biri, tütün ve alkole maruziyet sonucu kimyasal kanserojenler ile indüklenen tümör oluşumunu, diğeri ise viral olarak indüklenen tümör oluşumudur. İnsan Papillom Virüsü (Human Papilloma Virus- HPV) negatif ve pozitif olan BBSHK'ları içinde HPV (+) durum önemli ölçüde hastalık ile ilişkilidir ve belirgin hastalık varlığını temsil eder. Hastalığın farklı oluşum yollarının varlığı, moleküler patogenezdaki farklılıkları, evreleme sınıflamalarını ve tedavi rejimlerindeki farklı sonuçları açıklar (11).

Sigara içimi, alkol tüketimi, kötü beslenme, fiziksel hareketsizlik ve üreme değişiklikleri gibi kanser risklerini arttırdığı bilinen yaşam tarzı davranışlarının benimsenmesi, ekonomik olarak az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerin kanser yükünü daha da arttırmıştır (7). Erkeklerde BBK insidansı kadınlardan daha fazladır. Bu durum, erkeklerin risk faktörlerine daha fazla maruziyeti ile açıklanabilir (12).

Kansere bağlı sağkalım gelişmekte olan ülkelerde daha kötü olma eğiliminde olup, büyük olasılıkla bu durum tanı anında hastalığın geç evrede olmasının yanısıra standart tedavi yöntemlerine zamanında ve sınırlı erişimin bir kombinasyonudur (6).



¹Şekil 2.1. BBK Anatomik lokalizasyonları

Tanı anında tümörün yerleşimi ve evresi gibi hastalık ile ilgili ve eşlik eden hastalık gibi hasta ile ilgili parametrelere bağlı olarak cerrahi, radyoterapi (RT) ve kemoterapinin (KT) kombinasyonu ile BBK tedavisi multidisipliner bir yaklaşımdır (14).

Cerrahi

Cerrahinin amacı, rezeksiyonun yeterliliğinden ödün vermeksizin, tutulu olmayan yapıların mümkün olduğunca korunarak tümörün tamamen çıkarılmasıdır. Cerrahi, uzak (akciğer, karaciğer) metastaz yokluğunda, baş-boyunda ortaya çıkan ve tekrarlayan tümörlerin sağaltımı için uygun bir yöntemdir (15).

¹<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#q1>(24.02.2019)

Cerrahi tekniklerdeki gelişmeler ve cerrahi sonrası RT ve / veya RKT tedavisinin rutin kullanımı ile birlikte, son on yılda sağkalım istatistiklerinde iyileşme sağladı (16).

Baş-boyun kanserli hastaların başarılı tedavisi, onkolojik kontrolü en üst düzeye çıkarmak ve tedavi yan etkilerinin normal dokunun şekli ve işlevi üzerindeki etkisini en aza indirmek için multidisipliner tedavi stratejilerine dayanır (17).

Radyoterapi

Son 10 yılda, BBK'nin RT ile tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir (18). Radyoterapi uygulamalarında Yoğunluk Ayarlı Radyo Terapi (Intensity Modulated Radiation Therapy- IMRT), Volüm Ayarlı Ark Terapi (Volume Modulated Arc Therapy- VMAT), Görüntü Kılavuzluğunda Radyo Terapi (Image Guided Radiation Therapy- IGRT) ve Stereotaktik Radyocerrahi (Stereotactic Radio Surgery- SRS) gibi gelişen teknolojiyle oluşturulan yeni teknikler, maksimum dozu tümöre verirken tümör çevresindeki sağlıklı dokuya minimum dozun verilmesine yönelik tedavi planının tasarlanmasında faydalı olmuştur.

Radyoterapi tedavisinde minimum yan etki ve maksimum tümör kontrolü elde etmek için farklı fraksiyonasyon şemaları kullanılmıştır. Fraksiyonasyon yoluyla tümör hücrelerinin radyasyon cevabını etkileyen biyolojik faktörlerin tedavi etkinliğine dahil edilmesi sağlanmıştır.

Temel fraksiyonasyon şemaları; konvansiyonel (standart) fraksiyonasyon, hiperfraksiyonasyon, akselere (hızlandırılmış) fraksiyonasyon, hipofraksiyonasyon Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Konvansiyonel (standart) fraksiyonasyon günlük fraksiyon dozu 1.8-2 Gy (Gray) ile günde bir ve haftada 5 fraksiyon olarak uygulanır. Toplam fraksiyon sayısı 25-35 olacak şekilde 45-70 Gy arasında toplam RT tedavi dozu hedeflenir.

Hiperfraksiyonasyonda amaç, günlük fraksiyon dozunu azaltırken, toplam dozu arttırarak lokal tümör kontrolünü artırmak ve normal dokunun geç yan etkilerini azaltmaktır. Fraksiyon dozu günde 1.2-1.5 Gy ile fraksiyonlar arasındaki süre en az 6 saat olacak şekilde günlük 2 fraksiyonda uygulanır. Toplam 60-70 fraksiyonda toplam RT tedavi dozu konvansiyonel fraksiyonasyondan %10 daha fazladır. Konvansiyonel fraksiyonasyon ile karşılaştırıldığında, hiperfraksiyonasyonunun erken yan etkisi aynı veya biraz yüksek ve geç yan etkisi daha düşüktür.

Akselere (hızlandırılmış) fraksiyonasyonda amaç toplam tedavi süresini ve tümör hücrelerinin yeniden çoğalma (repopülasyon) riskini azaltmaktır. Fraksiyon dozu,

konvansiyonel fraksiyonasyon ile aynı veya daha düşüktür, günlük fraksiyon 1'den fazladır ve haftalık fraksiyonların toplam sayısı 5'ten fazladır. Toplam fraksiyon sayısı konvansiyonel fraksiyonasyon ile aynı, toplam doz konvansiyonel fraksiyonasyon ile aynı veya daha düşüktür.

Akselere fraksiyonasyon, konvansiyonel fraksiyonasyon ile benzer geç yan etkilere sahiptir, ancak erken yan etki daha fazladır. Bu şema için sorun, erken doku yan etkileri nedeniyle tedavinin erken sonlandırılmasına bağlı toplam tedavi dozunun azaltılması ve lokal tümör kontrolünün kaybıdır.

Hipofraksiyonasyonda amaç günlük yüksek fraksiyon dozu ile palyasyon veya SRS tedavisi vermektir. Hipofraksiyonasyon artan günlük fraksiyon dozu > 2 Gy ve aynı veya daha düşük toplam tedavi dozu ile uygulanır. Konvansiyonel fraksiyonasyon ile karşılaştırıldığında hipofraksiyonasyon aynı veya daha az haftalık fraksiyon sayısına ve daha düşük toplam tedavi dozuna sahiptir. Hipofraksiyonasyon şeması ile artan geç yan etki ve konvansiyonel fraksiyonasyon ile aynı erken yan etki elde edilir.

Fraksiyonasyon rejiminin seçiminde, tümörün radyasyon cevabını tanımlayan biyolojik faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Hipofraksiyone rejimler, melanom gibi yavaş çöğalan tümörler için uygun olabilir. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu gibi hızlı çöğalan tümörlerde, hiper fraksiyone ve/veya akselere şemalardan yararlanılabilir.

Tablo 2.1. Konvansiyonel fraksiyonasyonun farklı fraksiyonasyon şemalarının karşılaştırılması

	Fraksiyon dozu	Günlük fraksiyon sayısı	Haftalık fraksiyon sayısı	Toplam fraksiyon sayısı	Toplam doz
Konvansiyonel fraksiyonasyon	1.8-2 Gy	1	5	25-35	45-70 Gy
Hiperfraksiyonasyon	1.2-1.5 Gy	>1	>5	60-70	≈ >%10
Akselere fraksiyonasyon	1.5-2 Gy	>1	>5	25-35	45-70 Gy ya da az
Hipofraksiyonasyon	>2 Gy	≤1	<5	≤	<

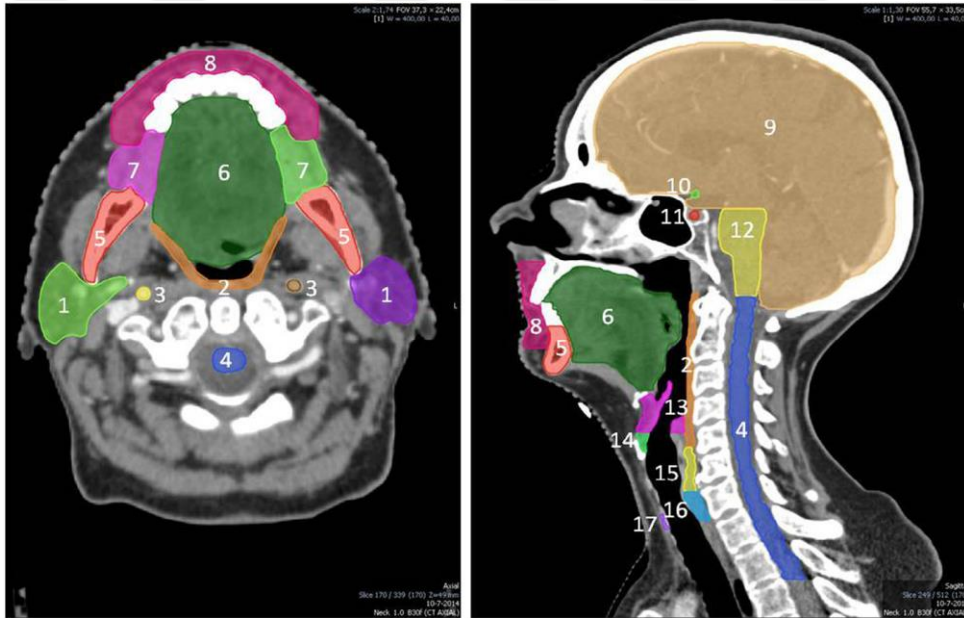
Teknik ilerlemelerin yanı sıra; radyasyon, tümör hücreleri ve normal dokular arasındaki etkileşimlerin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması; değiştirilmiş fraksiyonasyon

rejimlerinin gelişmesine, RT'nin KT veya hedefe yönelik ajanlarla birlikte kullanılmasını ve heterojen doz reçetelerinin geliştirilmesini sağlamıştır (18).

Gelişen teknolojiye rağmen, tümöre komşu yerleşimli önemli miktarda normal doku hacmi, ihmal edilemeyecek radyasyon dozuna maruz kalmaktadır.

Bu yeni teknolojilerin radyasyon onkolojisi pratiğinde tam anlamıyla faydalanmak için, hedeflerin ve risk altındaki organların tutarlı bir şekilde tanımlanması giderek daha önemli hale gelmiştir (19).

Baş-boyun kanseri tedavisi sırasında RT tedavi bölgesinde ve/veya tümöre komşu olabilecek normal dokular oldukça çok sayıda olup spinal kord, beyin sapı, optik sinir, kiazma, beyin, orbita, lens, mandibula, temporomandibular eklem, koklea, oral kavite, mukoza, cilt, brakial pleksus şeklinde listelenebilir (19). (Şekil 2.2.)



²Şekil 2.2. BBK RT tedavi alanındaki normal doku tanımlamaları

Klavuzlarına göre risk altındaki normal dokuların aksiyal (sol) ve sagittal (sağ) görünümü; parotis bezleri (1), farengeal konstriktör kaslar (2), karotid arterler (3), spinal kord (4), mandibula (5), oral kavite (6), bukkal mukoza (7), dudaklar (8), beyin (9), kiazma (10), hipofiz bezi (11), beyin sapı (12), supraglottik larenks (13), glottik bölge (14), krikofarengeal giriş (15), servikal özofagus (16) ve tiroid (17)

²Brouwer CL, Steenbakkers RJ, Bourhis J, et al. CT-based delineation of organs at risk in the head and neck region: DAHANCA, EORTC, GORTEC, HKNPCSG, NCIC CTG, NCRI, NRG oncology and TROG consensus guidelines. *Radiother Oncol.* 2015; 117(1): 83-90

Kemoterapi

Kemoterapi tümörü Deoksiribonükleik Asit (DNA) sentezi seviyesinde yok etmeyi hedeflemektedir (20). Tek başına KT solid tümörler için büyük oranda palyatif amaçlıdır. Küratif BBK tedavisinde KT, neoadjuvan protokollerde cerrahi veya RT öncesi tümör boyutunu küçültmek için veya radyoduyarlastırıcı olarak RT ile eş zamanlı uygulanır (21). Sisplatin bazlı eşzamanlı KT, SHK için standart protokoldür (22).

Sisplatin, yaygın olarak solid tümörler için kullanılan platin bazlı ilaçlar ailesine dahildir. Platin bazlı bileşiklerin sitotoksitesisi, uygulamadan sonra platin-DNA eklentilerinin oluşumuna dayanır. Sisplatin tercihen DNA bazlı guanine bağlanır ve DNA replikasyonuna müdahale eden ve hücre ölümüne yol açan çoklu guaninleri çapraz bağlar (23).

Farklı çalışmalar, hiperfraksiyone veya akselere RT rejimleri ile kombine edilmiş; platin bileşiği ve 5-florourasil (24, 25), düşük-doz sisplatin (26) veya 5-florourasil ve ek sisplatinin (27) sağkalıma yararlarını göstermektedir.

Ayrıca seçici olarak hipoksik hücreleri hedef alan 5-florourasil ile kombinasyon halinde olan mitomisin C, randomize faz 3 bir klinik çalışmada umut verici sonuçlar göstermiştir (28).

Hormonoterapi

Meme, endometriyum ve prostat gibi bazı kanser hücreleri yapılarında bulunan hormon reseptörleri nedeniyle östrojene ya da testesterona duyarlı olabilir. Bir anlamda vücutta bu hormonların varlığı bu kanser hücrelerinin artmasına neden olabilir. Hormonoterapide amaç, bu kanser hücrelerinin ilgili hormona duyarlılığını ortadan kaldırarak, kanserin tedavisini sağlamaktır. Bu tedavinin etkileri az olmakla birlikte, ilgili hormonun eksikliğinden kaynaklı sıcak basması, üşüme ya da hafif eklem ağrıları raporlanmıştır (20).

Hedefe yönelik tedaviler

Moleküler biyolojinin gelişmesi ile kanser hücrelerinin gelişim mekanizması daha iyi tanımlanmıştır. Çalışma sonuçlarına dayanarak RT ve KT gibi DNA yapısını hedef alan tedavi yaklaşımlarının yanı sıra, hücre değişimini tetikleyen mekanizmayı hedefleyen yeni hedef tedaviler geliştirilmiştir. Hedefe yönelik tedaviler sinyal ileti mekanizmasını değiştirerek, uyarıcı moleküllerin reseptörlere bağlanmasını ve yeni damar gelişimini (anjiogenez) önleyerek, kanser tedavisinde önemli bir rol oynar. Etki mekanizmaları belirli bir reseptör ya da moleküle bağlanma üzerinden ilerlediği için, belli özelliklere sahip hasta gruplarında kullanılırlar. Örneğin Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR) inhibitörü olan Cetuximab EGFR-ekspresyonu olan metastatik

kolorektal kanserde tedavi olarak kullanılabilir. Hastaya verildikten sonra, sadece vücuttaki ilgili hücre grubu ile etkileşen bu tedavinin yan etkilerinin tolere edilebilecek kadar az olduğu gözlenmiştir (20).

2.3. Oral Mukoza

Oral mukoza, yapıları birçok özel işlevi yerine getirmek için adapte olmuş, eşsiz ve çok fonksiyonlu bir membrandır (29).

Oral kavitenin epitel, mukozanın keratinizasyonunda sahip olduğu bölgesel farklılıklar ile eşsiz işlevleri için çok uygundur. Diş eti ve sert damak, çiğneme sırasında düzenli olarak mekanik strese dayanan keratinize mukozal yüzeylerdir. Keratin 1 ve 10 gibi daha yüksek moleküler ağırlıklı keratinlerin eksprese edilmesine ek olarak, bu doku altta yatan bağ dokusu ve kemik yapıya sıkıca bağlıdır (30).

Ağız tabanında, bukkal bölgelerde, dilin ve sulkusların alt yüzeyinde yer alan keratinize olmayan mukoza, konuşma veya yeme eylemlerine kolaylık sağlamak amacı ile oldukça esnektir. Bu bölgedeki dokularda keratin 4 ve 13'ü içeren düşük moleküler ağırlıklı keratinler eksprese edilir (31).

Keratinizasyondaki farklılıkların yanı sıra, doku kalınlığı ve hücre yenilenme süresinde bölgesel farklılıklar vardır. Epitelyal homeostaz için, hücre üretim oranının, deskuamasyon oranına eşit olması gereklidir. Bu kavram, yenilenme (turnover) zamanı olarak bilinir. Bukkal mukoza epitelinin yenilenme süresi 14 gün iken sert damak epitel 24 günlük yenilenme süresine sahiptir (30).

Cildin ortalama yenilenme süresi ise 28 gündür. Yenilenme süresi, iyileşme oranını ve dokunun kalınlığını da belirler. Epitelyal hücre üretimi ve deskuamasyon arasındaki dengenin mukozal sağlık açısından önemli etkileri vardır (29).

Dilin dorsumu, mekanik papilla, tat tomurcukları, dokusal ve sıcaklık duyu yapıları olan özelleşmiş mukoza ile kaplıdır (32, 33).

Oral mukozanın en önemli işlevi, altta bulunan dokuların mekanik veya kimyasal strese karşı korunmasıdır. Bu koruma, sıvı kaybını engellemek ve beslenme, çevresel veya mikrobiyal kaynaklı ajanların potansiyel istilasını önlemek amacıyla, dış epitel tabakalarında geçirgenlik bariyerli hücrelerin sıkı bir şekilde paketlenmesiyle gerçekleştirilir (30).

2.3.1. Oral Mukozanın Katmanları

Oral mukozanın katmanları, tabakalı skuamöz epiteli temsil eder. Yapısal ve işlevsel olarak; özelleşmiş, çiğneme ve astar mukozal katmanlar ayırt edilebilir özelliklere sahiptirler (30).

Özelleşmiş mukozal katman çoğunlukla dilin dorsumunda bulunur ve mekanik papilla, tat tomurcukları, dokunsal ve sıcaklık duyuşal yapıları içerir. Çiğneme mukozal katman, sert damak, diş eti gibi belirgin mekanik gerilime sahip bölgelerde bulunur ve epiteli keratinizidir. Astar mukozal katman ise ağız boşluğunun kalanını kaplar; kemirgenlerin aksine insanlarda bu katmanın yapısı keratinize değildir (34).

Oral mukoza, yüzeydeki mekanik ve kimyasal stres yoluyla kalıcı fizyolojik hücre kaybının germinal doku kompartmanlarındaki hücre üretimi ile tam olarak dengelendiğı, tipik hızlı yenilenen doku temsilidir (35).

Proliferasyon hızı, ilgili bölgedeki hücre sayısı ile ilişkilidir ve yaklaşık 5 günlük bir sabit yenilenme hızı (yani tüm hücrelerin bir kez değıştirildiğı zaman) ile sonuçlanmaktadır (36, 37).

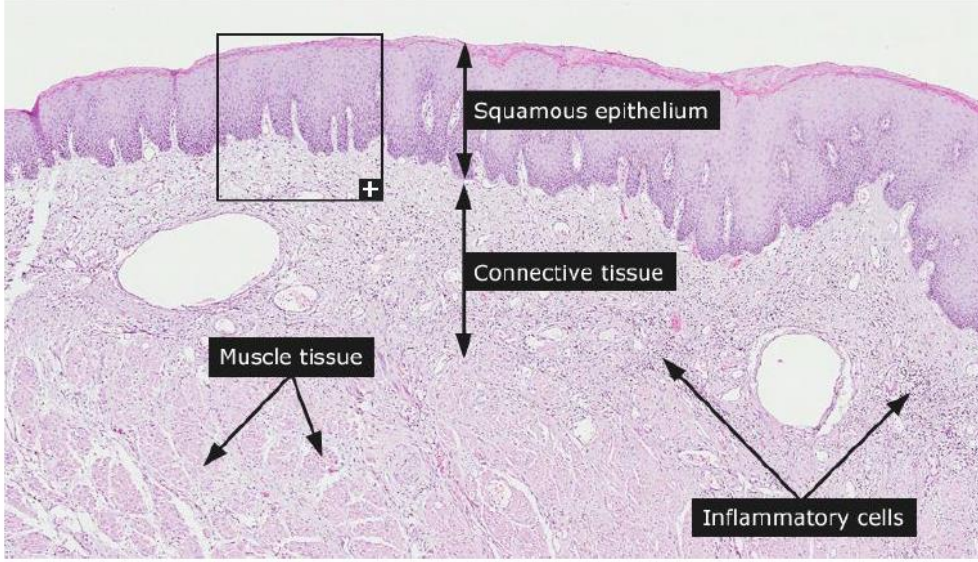
Proliferasyon, çoğalan hücrelerin bir kısmını temsil eden dokuya özgü kök hücrelere dayanır. Kök hücreler, fizyolojik olarak yeni bir kök hücreye (ki bu kendini sürekli yenileyen bir sistemi temsil eder) ve bir kök hücre olmayan yavru hücreye bölünür. İkincisi, bir geçiş hücresi (transit hücre) olarak, terminal diferansiyasyona uğramadan ve yüzeyde kaybolmadan önce, sınırlı sayıda hücre bölünmesine uğrayabilir. Proliferasyon ölçümlerinin, temel olarak transit proliferasyonu değerdendirdiğı vurgulanmalıdır; şu anda, geçerli bir oral epitelyal kök hücre belirteci tanımlanmamıştır (34).

Oral kavitedeki yüzeyler *tabakalı skuamöz keratinize olmayan epitel* ile kaplanmıştır (Şek.2.3.A). Çok katmanlı epitelin varlığında altta bulunan yapılar mekanik, kimyasal ve termal zararlardan korunur. Tabandaki membrandan başlayarak katmanlar, bir bazal katman, bir spinöz hücre katmanı ve yüzeyel katmanı içerir. *Bazal katman*, mitotik aktivite gösteren ve hücre yenilenmesinden sorumlu olan kolumnar hücreleri içerir. Bazal katmanın üstünde, poligonal hücreleri içeren spinöz hücre katmanı (*stratum spinosum*) dezmozomlarla bir arada tutulur. En üstteki katman düz skuamöz hücrelerden oluşan yüzeysel katmandır. (Şek.2.3.B)

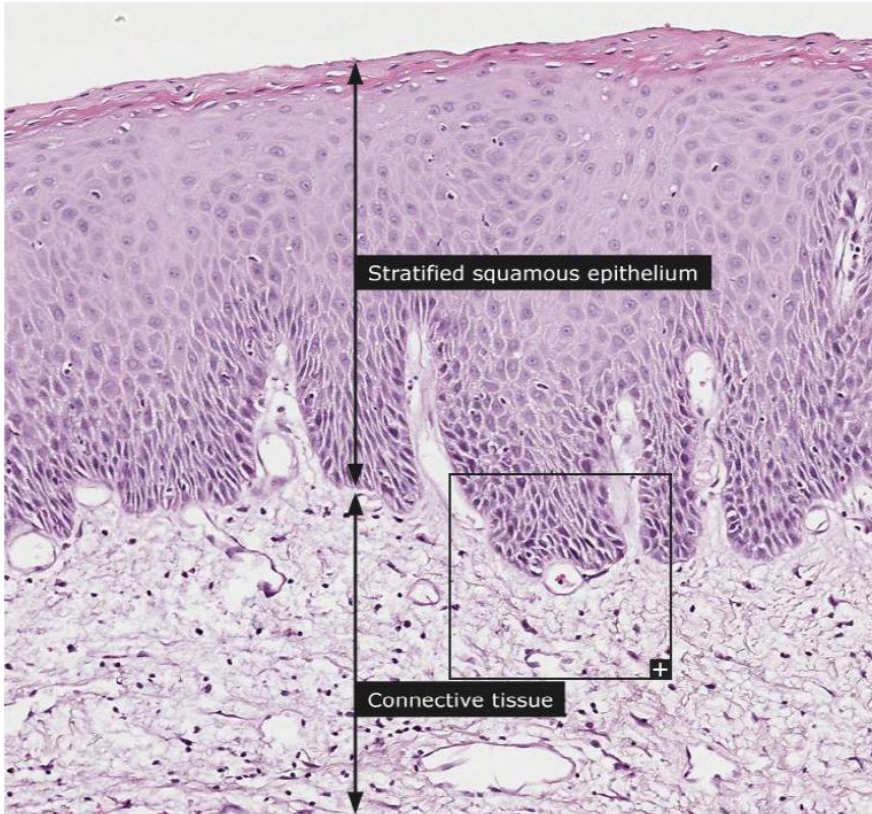
Oral mukoza zengin bir kan kaynağına sahiptir ve altta yatan lamina propria mukozasında, çok sayıda kılcal damar içeren gevşek bir bağ dokusu vardır. Dağınık lenfositler normal olarak lamina propriada da bulunur. Papilla olarak adlandırılan *bağ dokunun* parmak benzeri çıkıntıları, epitelyal tabakaya katlanır. *Kılcal damarlar* (Şek.2.3.C),

endotel hücrelerinin tek bir katmanı ile kaplanır ve çevreleyen bir bazal laminaya sahiptir. Lamina proprianın altında, büyük kollajen lifleri ve mukozayı altındaki *kas dokusuna* bağlayan elastik lifler içeren submukoza bulunur (38).

A



B



c



³Şekil 2.3. A. B. C. İnsan normal oral mukozasının histolojik yapısı

2.3.2. Oral Mukozanın Histolojik Yapısı

İnsan oral mukozası, farklı bir doku mimarisine sahip çok katmanlı skuamöz epitelden oluşur. Taban membran, altta yatan vasküler-bağ dokusunu bazal epitelyal tabakadan (stratum basale) ayırır. Üsteki membran, çok sıkı yerleşmiş silindirik çekirdekli hücreler içerir (39).

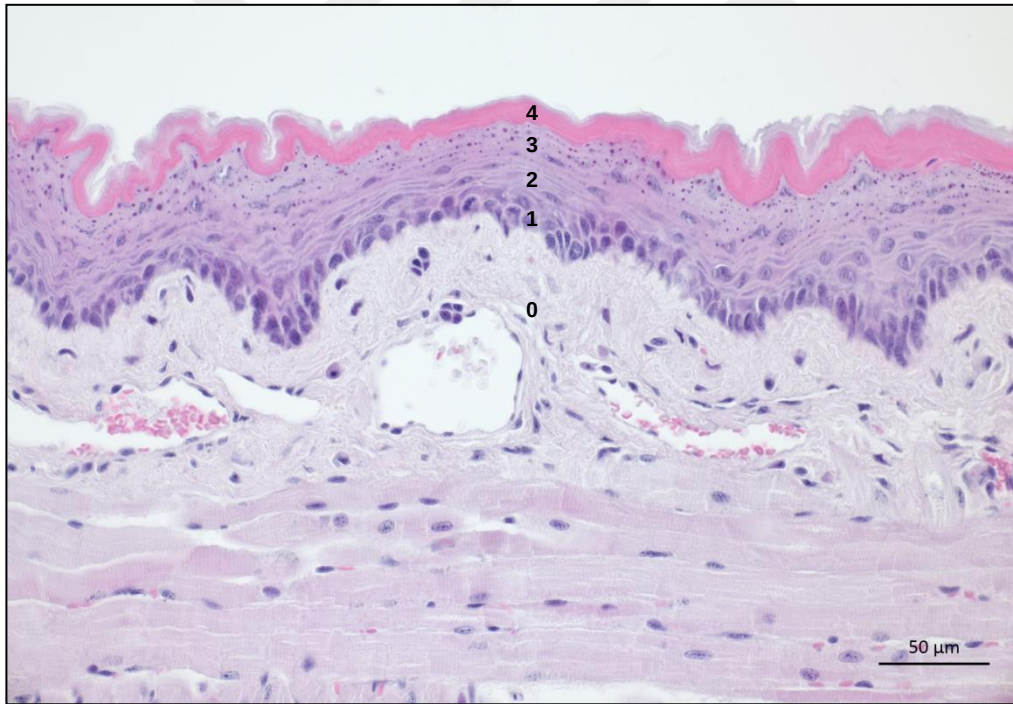
Silindirik hücreler içeren bazal epitel hücre tabakası, vasküler ve fibröz doku içeren alt mukozal tabakadan bazal membran tarafından ayrılır. Suprabazal spinöz katman, farklı hücre-hücre temasları ile karakterizedir. Proliferasyon, bazal ve spinöz tabakanın alt kısımlarında meydana gelir, bu kısım germinal tabakayı temsil eder. Germinal tabakada (stratum germinativum) kök hücre çoğalmasından veya geçiş hücresinin bölünmesinden elde edilen hücre üretimi, bazal tabaka ve spinöz tabakanın daha derin iç kısımlarıyla sınırlıdır (40).

³<https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/oral+mucosa> (21.04.2019)

Post-mitotik hücreli fonksiyonel tabaka, spinöz katman ve granülide katmanın kalıntı kısmını içeren; bazofilik keratohiyalin granüller ile karakterize edilir (30).

Diferansiyasyon sırasında, hücreler boyut olarak artar ve yüzeysel tabakaya doğru yaslanır (40). Spinöz katman ve granüler katmanda uzun ve çentikli bir form geliştirirler. Hücreler sadece çiğneme mukozasında bulunan tam-keratinize tabakanın yüzeyine geçmeden önce, hücre çekirdeği bozulur ve hücrenin içinden çıkar. Yüzeysel katmanda, yani stratum korneum'da, keratohiyalin keratine dönüştürülür (41, 42).

Fare oral mukozası (Şekil 2.4.) büyük ölçüde insan oral mukozasına benzemektedir. Aynı şekilde, germinal katman, fonksiyonel katman ve yüzeysel katmandan oluşan çok katmanlı bir skuamöz epitel yapısı sunar. İnsan oral mukozasının aksine, farelerin oral mukozası tüm katmanlarda tamamen keratinizedir. Bununla birlikte bu farklılığın, IR'ya epitel yanıtının terminal diferansiyasyondan ziyade proliferasyon ve başlangıç diferansiyasyon süreçleriyle ilgili olması nedeniyle, yalnızca küçük radyobiyojik sonuçları vardır (43).



Şekil 2.4. Fare normal oral mukozasının histolojik yapısı -Haematoxylin & Eosin boyanan alt dil epiteli; Murin alt dil mukozası, stratum bazale (1), stratum spinosum (2), stratum granulosum (3) ve stratum corneum (4) olan dört ana katmandan oluşur. Stratum bazale altında, vasküler-bağ dokusu (0) doku stabilitesi ve besin kaynağı sağlar.

⁴© S. Gruber. Gruber S. Epithelial cell signaling in radiation-induced oral mucositis as a basis for biological targeting - preclinical studies. Vienna, Med Uni Vienna, PhD Thesis, 2016.

2.3.3. Normal Oral Epitelin Proliferasyon Modeli

Oral mukoza, germinal tabakadaki sürekli proliferasyon ile yüzeydeki kalıcı hücre ve keratin kaybı arasında kesin bir denge ile karakterize edilir. Böyle bir kararlı durumun mekaniği, sistemdeki tüm hücrelerin bir kez değiştirilmesi için gereken zaman ile ifade edilebilir, bu durum yenilenme süresi (turnover time) olarak adlandırılır (44). Hücre sayıları ve bunlara karşılık gelen proliferasyon oranları oral kavitedeki farklı lokalizasyonlara göre değişir. İnsan oral mukozasının tanımlanan yenilenme süresi yaklaşık 5 gün olarak açıklanmıştır (3).

Hücre proliferasyonu, sadece birkaç veri mevcut olmasına rağmen, belirgin bir günlük ritmi izler. Bir çalışmada S-fazı pik değeri öğleden sonra 10:00'da bulunurken (45), diğer bir çalışmada S-faz pik değerinin sabah 11:00- 16:00 saatleri arasında olduğu gözlenmiştir (46). Bu farkın nedeni, farklı hücre döngüsü analitik yöntemlerin kullanılması ve/veya proliferasyon başlangıcı için indükleyici olan uyuma ve besin alımı rutinlerinin farklı şekilde uygulanması olabilir (43).

Belirgin günlük hücre döngüsü ritmi fare oral mukozasında da gözlenmiştir. Dilin alt yüzeyi için, sabah 10:00'da maksimum mitotik aktivite, sabah 02:00'deki S-faz pikinden önce oluştuğu, ortalama hücre döngüsünün süresi 2-3 gün, G1 faz süresinin ise 3-4 gün olduğu gözlemlenmiştir (47, 48).

2.3.4. Normal Oral Epitelin Diferansiyasyon Modeli

Epidermis organizma ve çevre arasında koruyucu bir engel olarak önemli bir rol oynar. Epiderminin bu fonksiyonu, bazal bölgedeki kararlı hücrelerin epidermal yüzeye, yukarı doğru hareket etmesiyle aşamalı olarak gerçekleşen bir diferansiyasyon programından kaynaklanmaktadır. Bu süreç, bazal hücreden olgun, cansız skuamöz hücreye fenotipik evrimi ile oluşan farklı proteinlerin sıralı ekspresyonu ile karakterize edilir (49).

Genel olarak, tüm tabakalı oral epitellerdeki bazal hücreler benzer keratinleri eksprese ederken, suprabazal hücreler, farklı bir diferansiyasyon programına bağlı olduğunu gösteren özellikli bir seri belirteci eksprese eder (50).

Son 20 yılda, memeli epitel hücrelerinin diferansiyasyonunun araştırılması, SK kaynaklı sito-iskeletin filamentleri olan, filaggrin, involucrin ve loricrin gibi yapısal proteinlerin tanınmasıyla kolaylaştırılmıştır (51).

Proliferatif bazal hücreler, diferansiyasyon ve hücre göçü başladığında keratin K5+K14 çiftini eksprese ederken, K1+K10 ekspresyonuna geçer. Loricrin ve filaggrin ise terminal diferansiyasyon aşamalarında eksprese edilir (52- 55).

Filaggrin ve öncüsü profilaggrin, gralünize tabakanın hücrelerinde sentezlenir. Profilaggrin, keratohiyalin granüllerinin bir bileşenidir ve 10-12 filaggrin birimini serbest bırakmak için enzimatik olarak sindirilir. Bu süreç, keratinize tabakalı skuamöz epitelde SK demetlerinin oluşumunda önemlidir. Filaggrin, epidermisin, diş etinin ve dilin keratinize tabakalı skuamöz epitelinde tanımlanmıştır (51, 56- 59). Lorikrin ve inkludeukrin, terminal diferansiyasyon sırasında keratinosit hücre zarının iç kısmını kaplayan bir protein kılıfı olan kornifiye zarfın bileşenleridir. Lorikrin granulize tabakada sentezlenir ve epidermis, diş eti ve damakta bulunur (51, 60). Kornifiye zarfın yaklaşık %75'i, %5'lik involukrin ile karşılaştırıldığında, lorikrinden oluşur. Terminal diferansiyasyon sırasında suda çözünmeyen bir bariyer oluşturmak için dışarı itilen lipidler için bir bağlanma bölgesi olarak işlev görür. Kornifiye zarftaki rolüne rağmen, involucrin oral mukozayı kaplayan keratinleşmemiş tabakalı skuamöz epitelde mevcuttur (58, 59).

Hücre döngüsünün gerilemesi, çoğu dokuda terminal diferansiyasyon için ortak bir önkoşuldur. Sonuç olarak, hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan moleküller, hücre diferansiyasyonunu modüle eden ilave fonksiyonlara sahip olabilir. Bu hipotez, proteinlerin Rb (retinablastom) ailesinden olduğu durumda açıkça doğrulanmıştır (49). Bütün bu proteinler, E2f transkripsiyon faktörü ailesinin farklı üyelerine bağlanma ve inhibe etme kabiliyetleri ile G1 fazı sırasında hücre döngüsü ilerlemesini modüle eder. Ek olarak, Rb ailesinin farklı üyelerinden yoksun farelerin analizlerinde, bu proteinlerin diferansiyasyon işleminin farklı yönlerini çeşitli dokularda düzenlediği gösterildi (61, 62).

Epidermal ve mukozal keratinositler, bazal katmandan yüzeye doğru hareket ettiklerinde terminal diferansiyasyona uğrarlar (63). Normal insan keratinositleri, in vitro olarak sınırlı sayıda hücre bölünmesine maruz kalır ve iki katında bir artış gösterir. Sonunda, tekrarlayıcı yaşlanma (replicative senescence) olarak bilinen büyüme durmasına (growth arrest) uğrarlar (64).

İnsan ağzının mukoza zarı yapı ve işleve göre değişkenlik gösterir. Çiğneme (diş eti, sert damak) tabakası ve astar (yumuşak damak, yanak, dudaklar, alveolar mukoza, oral kavitenin zemini) tabakası olarak iki ana tipe ayrılır (65-67).

Bu tipler arasındaki ana morfolojik farklılıklar, epitelin diferansiyasyon modelinde ve yapısında, epitelin lamina propria ile ara yüzeyinde, bağ dokusu liflerinin yoğunluğu ve elastikiyetinde gözlenir (68).

Katmanlı epiteli analiz etmek için stereolojik bir sistemin kullanılması (69-71), epitel tarafından mastikülatör (sert damak) ve astar (bukkal) mukozada gösterilen diferansiyasyon modellerini karakterize etmiştir (72, 67). Normal insan alveoler mukozasının epitelindeki diferansiyasyon modelleri de tarif edilmiştir (73).

Birlikte ele alındığında, epidermis, proliferasyon ve diferansiyasyonu incelemek için mükemmel bir modeldir. Bununla birlikte, epidermal diferansiyasyonu düzenleyen moleküler mekanizmalar hala büyük ölçüde bilinmemektedir (49).

2.3.5. Hücre Döngüsü

İnterfaz: S (sentez) fazı, G (Gap-boşluk) 2 fazı, G1fazı, M (Mitoz) olarak ayrılır. M fazından G1'e geçiş arasında Go fazı yer alır.

G1 fazı: RNA ve protein sentezlenir. Fakat henüz DNA sentezi yoktur. Zaman olarak en değişken olanıdır ve memelilerde yaklaşık 11 saat sürer. Hücreyi bölünmeye indükleyen proteinler (büyüme faktörleri) aktive olur. Büyüme için şartlar uygun değilse siklus geciktirilir ve hücre G0'a girer.

S fazı: RNA sentezi devam eder. Protein sentezi en yüksek seviyeye çıkar. Çok sayıda replikasyon kaynağı aktive olur. DNA sentezi başlar ve iki misline çıkar. Sentrozom (sentrionlar) kendini eşlemeye başlar.

G2 fazı: Mitoz için hazırlık aşamasıdır. Yoğunlaşan kromozomlar mikroskop altında görülebilir. Yaklaşık 1- 4 saat arasında sürer. DNA sentezi durur, RNA ve protein sentezi devam eder. Sentrozom kopyalanması tamamlanır. Organeller çoğalır ve iki katına çıkar. Mitozu aktive edecek proteinler birikir.

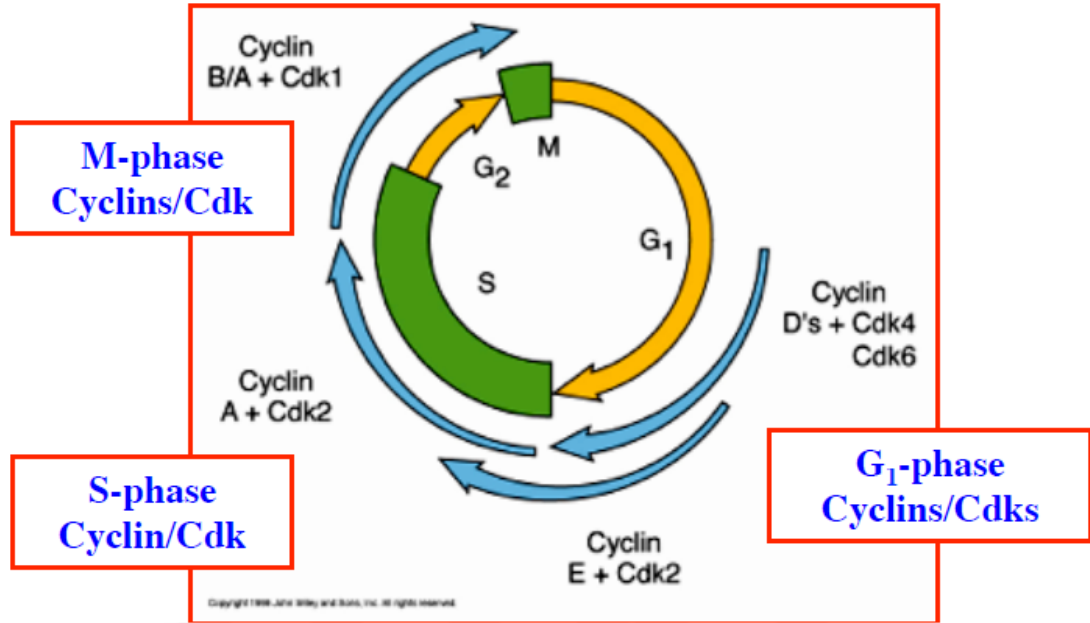
M fazı: Profaz, Metafaz, Anafaz, Telofaz evrelerini içerir. Mitotik ipliklerin oluşumu ilk sinyallerdir. Sentrozom kopyalanır. Yavru kromozomlar ve sitokinez meydana gelir.

Go fazı: Hücrelerin G1 evresinde kaldığı ve büyümelerinin durduğu evredir. Metabolik aktiviteye sahiptirler. Uygun hücre-dışı sinyaller tarafından uyarılmadıkça çoğalmazlar.

Büyüme faktörleri hücre döngüsünü geç G1 de R (restriksiyon) noktası denilen noktada kontrol eder. Bu noktada büyüme faktörleri yoksa hücre Go evresine girer.

G1 içindeki dönüşü olmayan noktanın aşılması büyüme faktörleri ve diferansiyasyon uyarıcıları gibi iç ve dış sinyallere bağlıdır. Kanser hücreleri bu kontrolü kaybeder ve sürekli döngü içinde kalırlar. R noktasının açılı S evresine girilmesi siklin bağımlı kinazlar tarafından kontrol edilir.

Memeli hücrelerinin G1 noktasında durması p53 proteini aracılığı ile olmaktadır. p53 proteini siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21'in ekspresyonunu uyarır. p21 proteini bir çok siklin bağımlı kinaz / siklin kompleksini inhibe eder (Şekil 2.5.) (74).



⁵Şekil 2.5. Hücre döngüsünün kontrol noktaları

Karakterize döngüsü içinde hücre, yapısal ve işlevsel olarak özelleşmiş fazlara ayrılmıştır. Bu sırada her fazı temsil eden hücresel olaylar, hücrenin IR'a duyarlılığını belirlemektedir. Ayrıca hücre döngüsünün sıklığı yani, dokuya özgü hücrelerin hücre döngüsünü tamamlama hızları ve dokunun yenilenme hızı, radyasyon duyarlılığını etkilemektedir.

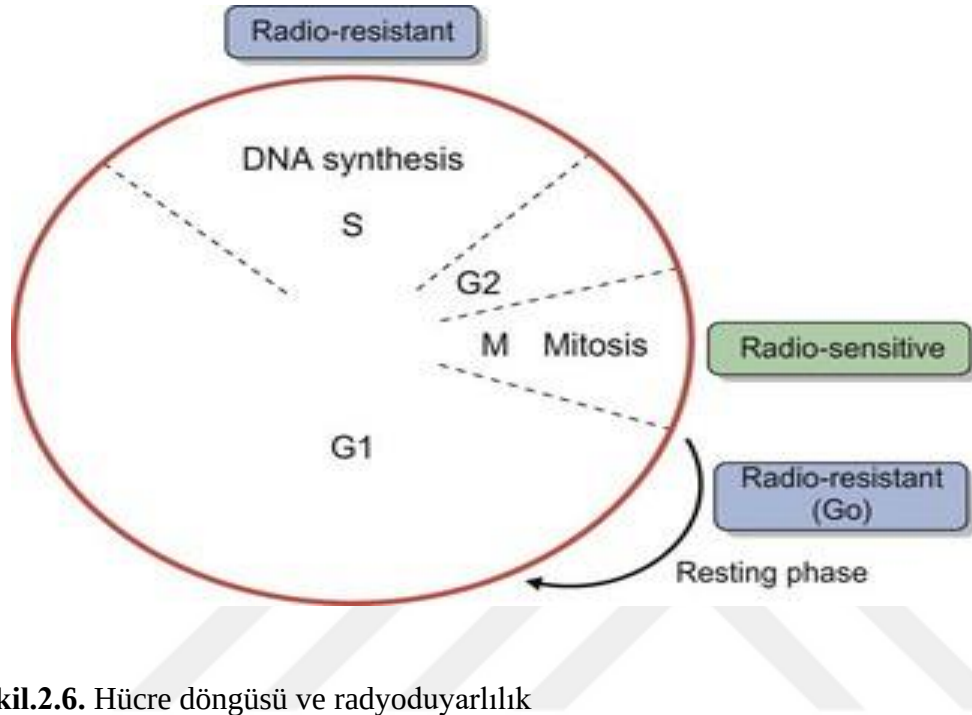
Bölünen hücreler genellikle, bölünmeyen diferansiye hücrelere göre radyasyona karşı daha hassastır.

Yüksek oranda bölünmüş hücrelere sahip dokular, örneğin kemik iliği ve gastrointestinal epitel, çoğalmayan hücrelere sahip dokulardan, örneğin fibröz dokular ve iskelet kaslarından daha fazla radyoduyarlıdır.

Büyüme oranı yüksek olan tümör hücreleri, düşük büyüme oranı olan tümör hücrelerine göre daha radyoduyarlıdır.

⁵http://metinaytekin.com/dersler/Hucre_Dongusu_Y_Lisans_Hazirlık.pdf/ (08.05.19)

Hücrelerin, hücre döngüsünün fazlarından geçerken radyo duyarlılıkları da değişir. M / G2 fazındaki hücreler en fazla radyo-duyarlıdır ve S (özellikle geç S fazı) / G1 evresindeki hücreler en radyo dirençlidir. Dinlenme (Go) hücreleri ayrıca radyo-dirençlidir (Şekil 2.6.) (75).



⁶Şekil.2.6. Hücre döngüsü ve radyoduyarlılık

2.4. Baş-boyun kanseri radyo(kemo)terapisinin yan etkileri

Zamana bağlı olarak, dokulardaki erken reaksiyonlar, radyasyona maruz kalınan ilk günü takiben, sonraki günler ve izleyen haftalar içinde gözlenir. Latent zamanı aylardan yıllara hatta 10 yıllara uzayan, herhangi bir semptom geç yan etki olarak kabul edilir.

Reçete edilen IR dozu arttıkça, lokal tümör kontrolü artar, bunun yanı sıra tümöre komşu normal dokuda da yan etki oluşma riski artar. En iyi tümör kontrolünü sağlayacak olan reçete edilen IR dozu, tümör yakınındaki normal dokunun radyasyon toleransına ve erken/geç yan etki gösterme özelliğine bağlıdır.

Radyoterapi sırasında veya sonrasında normal doku yan etkisinin ciddiyetini ve görülme oranını etkileyen çeşitli faktörler gözlenmiştir. α / β oranı, ışınlanan normal doku hacmi, tamir yarı zamanı ve normal dokunun repopülasyon hızı gibi, dokunun radyasyon duyarlılığı etkileyen bir dizi faktör tanımlanmıştır.

⁶<https://veteriankey.com/radiation-therapy-4/> (08.05.2019)

Tedavi ile ilgili faktörler; IR enerjisi ve IR ışın demetinin kalitesi, fraksiyon dozu ve fraksiyonlar arasında geçen süre, fraksiyon sayısı, toplam radyasyon dozu ve toplam tedavi süresi şeklinde sıralanabilir.

Buna ek olarak, cerrahi ve KT'nin tek başına ve / veya RT ile birlikte verildiği kombine tedavi modelitelerinde, ek tedavilerin yan etkileri radyasyonun yan etki mekanizmasını etkilemektedir. Ayrıca yaş, cinsiyet, ırk, eşlik eden hastalıklar, sosyo-ekonomik durum gibi hastayla ilgili faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Oral mukozitin farklı tedavi yaklaşımları altında gelişimini araştıran çalışmalar, OM gelişim yüzdesini, çocukluk çağı tümöründe %52-80 (76), ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi) 'de ise %46 oranında olduğunu göstermiştir (77).

Yetişkinler için OM gelişim oranları, konvansiyonel KT ile %20- 40, yüksek doz KT alan hastalarda %80 ve BBK nedeniyle RT alan hastalarda %100 olarak gözlenmiştir (78-80).

Pediyatrik ve ergen hastalarda, bazal hücrelerin proliferasyon faktörü ve dolayısı ile hücrelerin yenilenme hızı yetişkinlere göre daha yüksektir, bu nedenle OM'nin oluşma riski artar (81).

2.4.1. Erken Yan Etkiler

Genel olarak erken IR yan etkileri, fizyolojik olarak kalıcı hücre kaybının, dokunun diferansiye post-mitotik hücrelerinin germinal kısımlarındaki proliferasyon ile iyi dengelendiği, hızlı yenilenen dokularda gözlenir (82, 83).

Tipik örnek dokular, kemik iliğindeki hücre üretimi ile hematopoetik sistem, üst ve alt gastrointestinal sistemin epitelidir. Bu tür doku sistemlerinin radyasyona maruz kalması hücre üretim hızını etkiler, normal hücre kaybı oranı ise en azından uzun bir doz maruziyeti süresinde değişmeden devam eder.

Proliferatif bozulmanın bir sonucu olarak, diferansiye olan doku katmanlarına azalan hücresel destek, ilerleyen hipoplaziye ve nihayetinde hücre deplasyonuna yol açar (84).

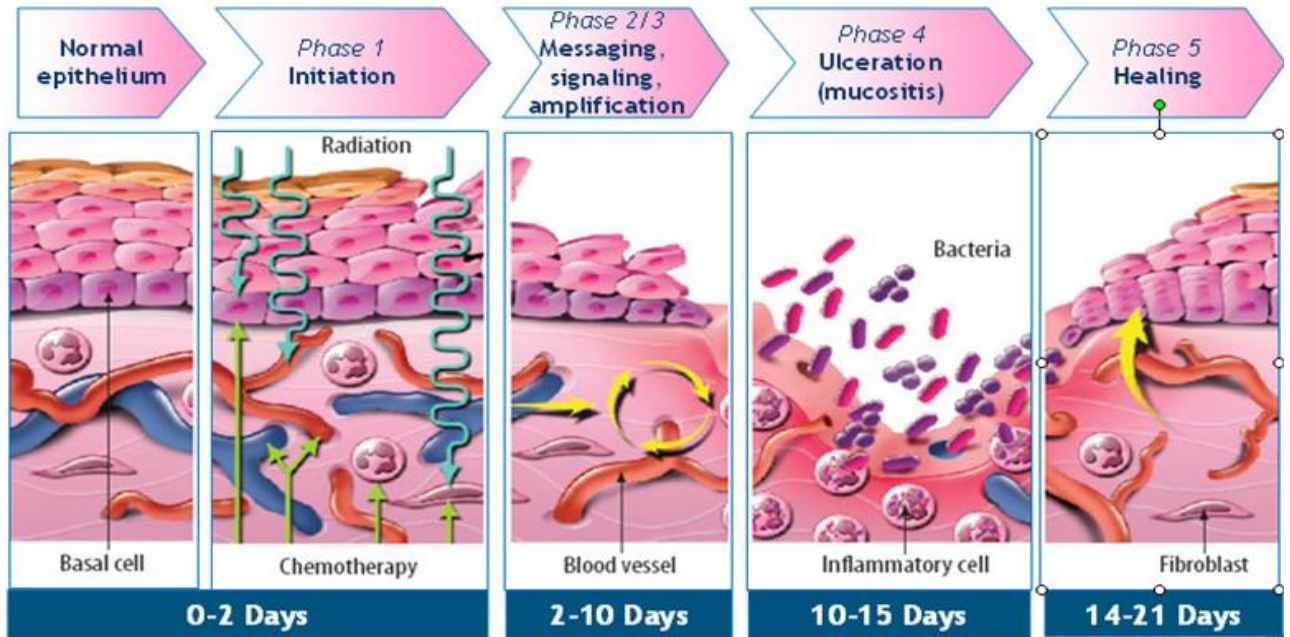
Erken yan etkiler, hızlı bölünen ve olgun hücre hayatta kalma süresi kısa olan dokularda tedavinin başlangıcını takiben birkaç gün/haftada görülmeye başlar.

Baş-boyun bölgesine RT tedavisi alacak hastanın ağız sağlığı, özellikle oral kavite ve ana tükürük bezleri RT tedavi alanının içinde ise, ciddi bir şekilde etkilenir (85). Radyoterapiye bağlı mukozal doku hasarının neden olduğu akut yan etkiler; eritem, kısmi (parçalı) mukozit, birleşik mukozit, ülserasyon şeklinde sıralanır.

2.4.2. Oral Mukozit

Mukozal epitel, bütünlüğünü koruyan bir dengededir. Mekanik veya kimyasal etkileşimlerin ardından yüzeyel hücre kaybı, germinal tabakadaki hücre üretimini tetikler. Ancak, iyonlaştırıcı radyasyon, germinal tabakadaki hücre üretimini etkiler ve inhibe eder. Öte yandan, yüzey hücre kaybı fizyolojik olarak da devam etmektedir. Bu sürecin sonunda, ilerlemiş hipoplazi ve son olarak epitel denüdasyon ve ülserasyon gelişir.

Beş aşamalı bir kronolojik süreç OM'nin patogenetik mekanizmasını açıklar: başlangıçta, IR ve/veya KT, hücre hasarı indükler ve bazal epitel hücrelerin ölümüne neden olan serbest radikaller oluşur. Bu durumu, hücre ölümlerini arttıran enflamatuvar faktörlerde bir artış izler. Proinflamatuvar sitokinlerin yükselmesi ikincil bir enfeksiyonu hızlandıran mukozal ülserasyonlara neden olur. Son aşamada, epitelyal proliferasyonun yanı sıra hücresel ve doku diferansiyasyonu meydana gelir (86, 87). (Şekil 2.7.)



Şekil 2.7. RT ve KT altında OM gelişim süreci

⁷Sonis ST. The pathobiology of mucositis. Nat Rev Cancer. 2004; 4(4): 277–84.

Hücresele seviyedeki radyasyon reaksiyonu, Reaktif Oksijen Türevlerinin (Reactive Oxygen Species- ROS) iyonlaştırmacı radyasyonun uyarılmasına cevap olarak meydana gelir, ve ROS direkt veya indirekt DNA hasarı oluşturur. Bu durum epitel keratinositlerin transkripsiyon faktöründe ve ayrıca fibroblastlarda, endotel hücrelerde ve makrofajlarda çeşitli seri sinyal modifikasyonuna ve aktivasyonuna yol açar (86).

Günümüzde, OM'nin gelişimini önleme ve tedavi stratejilerini açıklayan bir çok model vardır (88). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization- WHO) bir OM değerlendirme skalası yayınladı. Ulusal Kanseri Enstitüsü (The National Cancer Institute- NCI), Yan Etkiler için Ortak Terim Kriterlerini (Common Terminology Criteria for Adverse Events- CTCAE) yayınladı.

Bu iki skala mukozit için ayrı subjektif ve objektif ölçekleri içerir: Derece 1- Mukozanın eritemi; Derece 2- Parçalı ülserasyonlar veya psödomembranlar; Derece 3- Birleşik ülserasyonlar veya psödomembranlar; minör travma ile kanama; Derece 4- Doku nekrozu; önemli ölçüde spontan kanama; hayati tehlike taşıyan sonuçlar; Derece 5- Ölüm (89). (Şekil 2.8.)

	WHO Skalası	NCI-CTC Klinik	NCI-CTC Fonksiyonel
Derece 1	Oral ağrı, eritema	Eritema	Minimal Semptomlar, normal diyet; fonksiyon etkilemeyen minimal solunum semptomları
Derece 2	Ülser ancak katı yiyebilir	Parçalı ülserasyonlar veya psödomembranlar	Semptomatik ama yiyebilir ve yutabilir şekilde modifiye diyet; fonksiyonu etkileyen ancak günlük hayatı etkilemeyen solunum semptomları
Derece 3	Oral ülserler ve sadece sıvı tüketebilir	Birleşik ülserasyonlar veya psödomembranlar; minör travma ile kanama	Semptomatik ve ağız yolu ile beslenme ve su tüketimi yeterli değil; günlük hayatı etkileyen solunum semptomları
Derece 4	Oral beslenme imkansız	Doku nekrozu; önemli ölçüde spontan kanama; hayati tehlike taşıyan sonuçlar	Hayati tehlike taşıyan sonuçları olan semptomlar
Derece 5	Mevcut değil	Ölüm	Ölüm

^aŞekil 2.8. WHO ve NCI-CTC OM ölçeklendirmeleri ve tanımları

^a<https://www.semanticscholar.org/paper/NCCN-Task-Force-Report.-prevention-and-management-Bensinger-Schubert/c17b7de133d42bd876fe2b141a6ba00b6ae22340> (11.05.2019)

Radyoterapi uygulanan BBK hastalarında OM'nin tedavisi ve yönetimi, hastanın yaşam kalitesi ve tedavinin devamlılığı için büyük bir önem taşımaktadır. Akut mukozal reaksiyonların şiddeti, eritem ve ödemi izleyen, parçalı mukozit, birleşik mukozit ve ülserasyonla birlikte artar. Epitel dokunun tek seferde, 3 Gy ve fazlası IR dozuna maruz kalmasıyla OM başlar. Maruziyetin 4.5 Gy'den fazla olduğu durumda ise kalıcı veya uzun süren kserostomi, tat alma fonksiyonlarındaki değişiklikler, ses kısıklığı, yutma güçlüğü, gıda alımında zorluklar gelişebilir.

Oral mukozitin gelişimi, tıbbi olumsuzluklara ek olarak, konuşma güçlüğü, kötü nefes kokusu, düşük yaşam kalitesi, uyku sorunları, kaygı gibi psikolojik ve sosyolojik olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Tıbbi olumsuzluklara ek olarak gelişen tedavi motivasyonunda azalma, tedavinin kesilmesine neden olabilir. Özellikle BBK hastalarında RT başladıktan sonra, RT tedavisinin kesilmesi tümör kontrol olasılığında %26'lık bir kayıba yol açmaktadır (90).

Şimdiye kadar OM'nin tedavisi ve / veya önlenmesi için kanıta dayalı herhangi bir klinik uygulama rehberi olmamıştır (87).

Çokuluslu Kanserde Destekleyici Bakım Derneği ve Uluslararası Oral Onkoloji Derneği (The Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology- MASCC/ISOO) 2014 yılında, OM için kanıta dayalı klinik uygulama kılavuzu yayınladı. Bu kılavuzda tedavi yöntemleri yedi gruba ayrılmıştır: (1) temel ağız bakımı; (2) büyüme faktörleri ve sitokinler; (3) anti-enflamatuar ajanlar; (4) antimikrobiyal, ağız yüzeyini kaplayan maddeler, anestezipler ve analjezikler; (5) lazer ve ışık tedavisi; (6) kriyoterapi; ve (7) doğal ve çeşitli ajanlar (89).

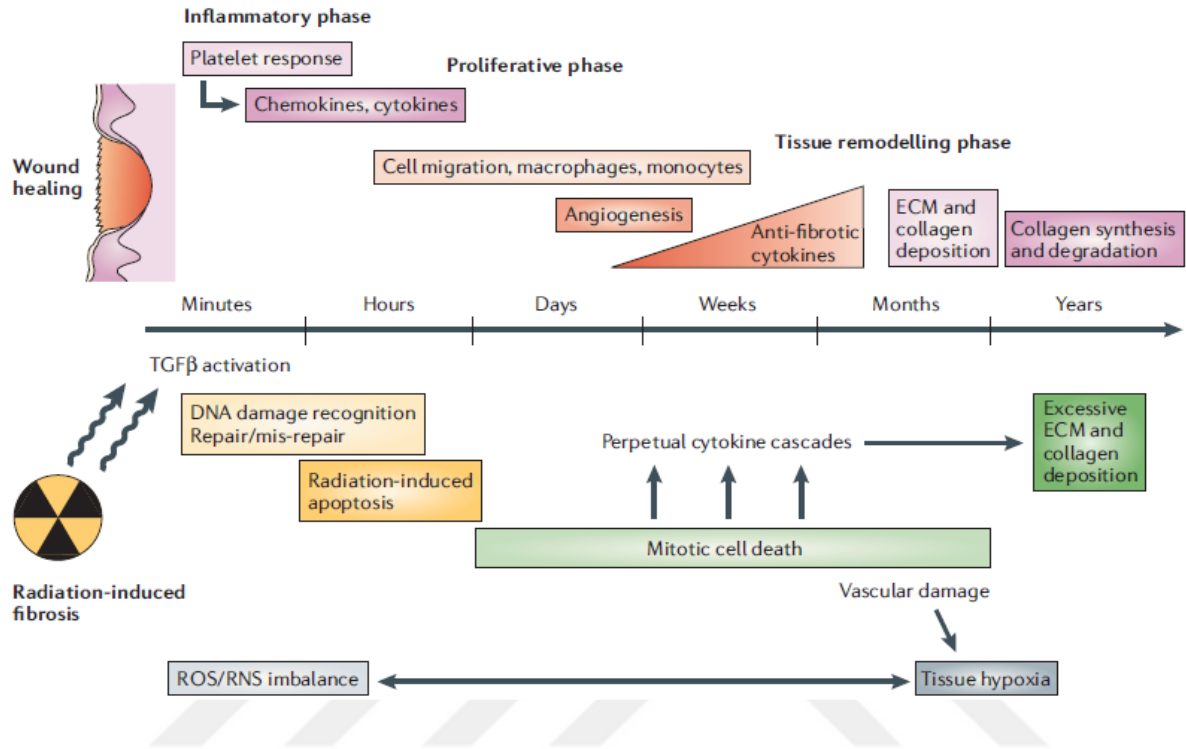
2.4.3. Geç Yan Etkiler

Geç (kronik) radyasyon yan etkilerinin patogenezi daha karmaşıktır ve organ parankimini, damar ve bağ dokusu bileşenlerini, ve birçok durumda, bağışıklık sisteminin, özellikle makrofajların katkısını içermektedir (35).

Parankimal hücrelerin cevabı organa özeldir. Bu hücrelerin belirli bir bölümünün radyasyona maruz kalması sonucunda hasar, tarif edilen mekanizmalara göre, hava yolu epiteli veya ürotelium gibi yavaş-yenilenme zamanına sahip parankimal dokularda ortaya çıkabilir, bu durum hücre kaybına ve (yavaş ilerleyen) parankimal hipoplaziye neden olabilir.

Hücre kaybı, çoğalmayan hücrelerin hücre döngüsüne alınmasına, ve sonuç olarak bu hücrelerin mitotik ölüm veya başka hücre ölüm yolları ile tamamen kaybına neden olabilir.

Mitotik fibroblastların radyasyona maruz kalması, erken diferansiyasyonlarını post-mitotik fibrositlere doğru tetikler. Bu durum doku fibrozunun gelişmesine temel oluşturacak, kollajenlerin sentezinde ve birikmesinde önemli bir artışa neden olur (91, 92). (Şekil 2.9.)



Şekil 2.9. Radyasyona bağlı gelişen fibrozisin ve normal yaranın iyileşme yolları

Işınlama ve geç normal doku hasarının klinik ortaya çıkışı arasında geçen sürede bir dizi hücrel aktivite gözlenmiştir. Işınlamadan hemen sonra birçok sitokin serisinin aktif hale geldiği ve hasar ekspresyonu boyunca aktif kaldıkları görülmüştür. Bu durumda, tetikleyici olay olarak radyasyona bağlı gelişen hücre ölümünün rolü olmasına rağmen, sitokinlerin erken salınmasının yol açtığı aktif bir biyolojik tepkinin de rolünün olduğu açıktır.

Bu cevaba, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin veya kemokinlerin serbest bırakılması veya aktivasyonu yoluyla, aktif olarak yanıt veren enflamatuvar, stromal, endotel ve parankimal hücreleri içeren çeşitli hücre tipleri aracılık eder.

Normal yara iyileşmesi (zaman çizelgesinin üstünde), travmadan hemen sonra yapılan ilk trombosit tepkisinden, bir yıldan uzun bir süre sonra yara dokusu son şeklini alana kadar, doku hasarına kesin olarak düzenlenmiş bir cevabı temsil eder.

Radyasyon tüm yara-iyileştirici mekanizmayı harekete geçirir (Şekil 2.10.), ancak bu işlemlere ek olarak, radyasyon hasarının kendine özgü doğası, normal yara iyileşmesinde yer alan olaylardan farklı bir dizi işlemi (zaman çizelgesinin altında) başlatır.

Bu işlem normal yara iyileşmesinin tüm zaman çizelgesini kapsar, ancak hücre dışı matrisin (extracellular matrix- ECM) ve radyasyon fibrozisinin karakteristik ürünü olan kollajenin aşırı derecede birikmesine yol açan yara iyileşmesinin kontrolüne sürekli müdahalesi olasıdır.

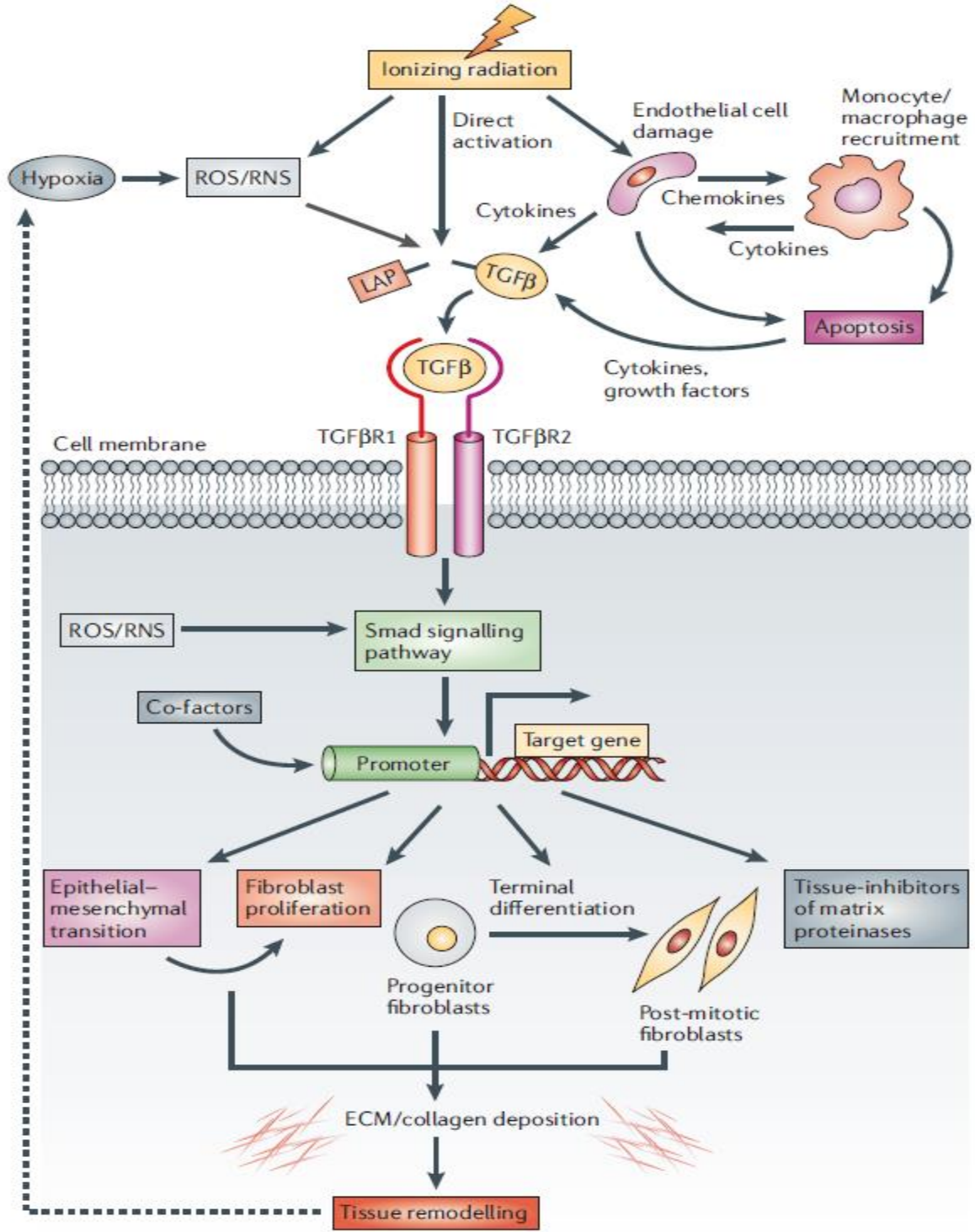
İyonlaştırıcı radyasyon, gecikme ilişkili peptidin (latency associated peptide- LAP) aktif olgun dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming Growth Factor- TGF β) formundan ayrışması yoluyla, doğrudan TGF β 'yı aktive eder. Ayrıca radyasyon endotel hücrelerine zarar verir, bu da TGF β dahil pro-fibrotik sitokinlerin salınımına yol açan hücreler bir yanıt başlatır. Radyasyonun üçüncü ana etkisi, ROS ve reaktif azot türevlerinin (reactive nitrogen species- RNS) homeostaz kontrolünü bozmasıdır. Bu da yine TGF β 'nın aktivasyonuna yol açar ve doğrudan Smad sinyal yolağına müdahale eder. Bu hücre dışı olaylar TGF β sinyal yolağını aktive eder. Sonuçta ECM ve kolajen birikiminde artışa yol açan çeşitli transkripsiyonel tepkiler ortaya çıkar. Radyasyona bağlı vasküler hasar ve kontrolsüz doku modelinin tekrarı doku hipoksisine neden olabilir, ki bu durum fibrojenik cevabı sürdüren mekanizmalardan biri olabilir (93).

Vaskülaritenin radyasyona maruz kalması, endotel hücre fonksiyonlarında değişikliklere veya kayıplara ve dolayısıyla telanjiektazi olarak gözlenen trombüs oluşumu ve damar tıkanıklığı, kılcal damar kaybı veya küçük damarların patolojik şeklinde genişlemesi ilerlerleyen “sızdıran” damarlara neden olur (35, 94).

Tüm bu değişiklikler, belirgin şekilde IR dozuna maruz kalan doku içindeki kanlanmayı ve kan akış yolundaki alt doku bölümlerini doku fonksiyon kaybının gelişmesine neden olacak şekilde etkilemektedir. Çok geç radyasyon etkileri için, örneğin kardiyovasküler sistemde, vasküler bileşen baskın patofizyolojik faktör olarak görünmektedir (84).

Geç yan etkiler, hücreleri yavaş bölünen ve olgun hücre yaşam süresi daha uzun olan dokularda RT tedavisini takiben aylar / yıllar sonra ortaya çıkar. Geç IR sekeli, vasküler hasar ve parankimal doku kaybı sonucu oluşur. Bu etkiler tamamen tamir edilemez.

Radyoterapiye bağlı mukozal doku hasarının neden olduğu geç yan etkiler; mukozal epitelin incilmesi, mukoza esnekliğinde azalma, fibroz (mukoza altında sertleşme), ülserasyon, disfaji, stomatit olarak sıralanabilir.



¹⁰**Şekil 2.10.** Radyasyon ile indüklenen fibroenez oluşumunda yer alan önemli süreçler

^{9, 10} Bentzen MS. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(9): 702-13.

2.4.4. Önemli (Consequential) Geç Yan Etkiler

Erken radyasyon yan etkilerinin, mekanik veya fiziksel strese karşı fizyolojik koruyucu bir bariyerin parçalanması ve kaybolması ile bağlantılı olduğu durumlarda, önemli geç yan etkiler gelişir (35, 95).

Bu yan etkiler, özellikle, mekanik ve kimyasal etkilerin bir kombinasyonuna maruz kalan üst ve alt sindirim sisteminin yüzeyel epiteli (oral kavite, özefagus, ince ve kalın bağırsak, rektum), kimyasal strese maruz kalan mesane epiteli, majör mekanik aşınma ve yıpranmaya maruz kalan lokalizasyonlardaki epidermis, ve ayrıca akciğer epiteli için gözlenir.

Zaman süreci ve klinik ortaya çıkışı ile ilgili olarak, belirgin geç yan etkiler, genel kronik radyasyon reaksiyonlarına benzer. Bununla birlikte, radyobiyojik davranışları, daha az belirgin olarak fraksiyonasyon etkisi ve belirgin olarak toplam tedavi süresinin etkisi ile, erken yanıt veren doku bileşeni ile ilişkilidir.

Kılcal geçirgenliğin bozulması ve bağ dokusu hasarı nedeniyle; mukoza düzlüğü, mukoza epitelinin incilmesi, mukozanın esnekliğinde azalma, submukozal indüksiyon ve kalıcı ülserasyon gözlenir (84).

2.5. Radyasyona Maruz Kalan Dokunun Yanıtını Etkileyen Faktörler

Hemen hemen tüm dokularda iyonlaştırıcı radyasyonun yan etkileri gözlenebilir. Bazı durumlarda, erken yan etkilerin önemi, yani şiddeti ve / veya kalış süresi, aynı doku veya organdaki geç yan etkilerin ortaya çıkış olasılığını etkilemektedir (önemli geç yan etkiler).

Normal dokuların radyasyon toleransını önemli ölçüde etkileyen radyasyon etkisinin özellikleri ile ilgili bir dizi faktör tanımlanmıştır, radyasyon maruziyetinin R'leri, özellikle RT için şöyle özetlenmiştir (84).

Sırasıyla:

Radyoduyarlılık (intrinsic Radiosensitivity) (96);

Tamir (Recovery) (97);

Yeniden Çoğalma (Repopulation) (97);

Yeniden Düzenlenme (Redistribution) (97);

Yeniden Oksijenlenme (Reoxygenation) (97);

Işınlanan Volüm (iRradiated volume) (98);

Uzun-süreli Restorasyon (Long-term Restoration) (99); ve

Moleküler Radyopatoloji (100).

2.5.1. Radyoduyarlılık (intrinsic Radiosensitivity)

Radyobiyolojik hedef / kök hücre kavramı, herhangi bir organ veya dokunun radyasyon toleransının, dokuya özgü hedef hücrelerin sayısı ve içsel radyoduyarlılığı ile tanımlandığını öne sürer (35, 83).

Bununla birlikte, özelleşmiş hedef hücre belirteçleri, normal dokuların büyük çoğunluğu için eksiktir. Bu nedenle, bu kavram varsayımsaldır ama geçerli olarak kabul edilmelidir. Bu bağlamda, tolerans dozu, söz konusu sonlanım noktasının minimum olasılığı (genellikle yüzde birkaçında) ile ilişkili maksimum radyasyon dozu olarak tanımlanmaktadır (83).

2.5.2. Tamir (Recovery)

Tamir, belirli bir toplam radyasyon dozunun, tek bir fraksiyonda akut uygulamak yerine ayrı fraksiyonlar halinde uygulanmasının, doku yan etkilerinin görülme sıklığını azalttığı gözlemini tanımlar. Buna karşılık, eğer radyasyon maruziyeti daha küçük doz fraksiyonlarında veya daha küçük doz hızlarında meydana gelirse, belirli bir doku etkisini indüklemek için gereken toplam doz (yani tolerans dozu) artar.

Toplam radyasyona maruz kalma süresi boyunca, altta yatan bir mekanizma hedef hücrelerin hücresel bütünlüğünün restorasyonudur. Bu durum sıklıkla “tamir” olarak adlandırılır ve DNA onarımının bu etkiye katılımını gösterir. Her ne kadar DNA onarımının rolünün önemi şüphesiz olsa da, örneğin ölümcül hasar görmüş hücrelerin devam eden, potansiyel olarak değişmiş metabolik aktivitesi gibi diğer mekanizmalar dokuların iyileşme fenomenine katkıda bulunur (83). Tamir, yapılan klinik öncesi araştırmalarda ve yapılan klinik çalışmalarda, sayısız sonlanım noktası için nicelendirilmiştir (35,101,102).

Tamir kavramında, genel olarak fraksiyonasyon etkisi düşüktür, ancak erken normal doku yan etkileri için hala önemlidir ve geç doku yan etki sonlanım noktaları için belirgindir.

2.5.3. Yeniden Düzenlenme (Redistribution)

Yeniden Düzenlenme, hücre döngüsünün fazları arasındaki radyo-duyarlılık farkı olarak tanımlanır. Hücre döngüleri arasında, S fazındaki hücrelerin (özellikle S fazının son kısmı) genel olarak IR'ye en dirençli, ve çok geç G2 ve mitoz fazındaki hücrelerinin IR'ye en duyarlı olma eğilimi vardır. S fazındaki direncin sebebinin, homolog rekombinasyon olduğu düşünülmektedir; hasar görmemiş kardeş şablonunun S fazı boyunca daha fazla kullanılabilir

olması sonucu çoğaltılarak, DNA'daki yapısal değişikliklerin yanı sıra replikasyon sırasında tamir komplekslerine erişilmesini kolaylaştırır.

Geç G2 ve mitoz için radyoduyarlılık muhtemelen bu hücrelerin, radyasyona maruz kalınan dakikalar içinde meydana gelir. G2'nin başındaki hücrelerin homolog rekombinasyonunu kullanarak zararlarını onarmasını sağlayan G2'de son bir kontrol noktasını geçmesinden kaynaklanmaktadır. Bu fenomenin asenkron hücre popülasyonu üzerindeki etkisi, IR'yi takiben hayatta kalan hücrelerde belirli bir derece senkronizasyon yaratmasıdır.

Proliferatif hücrelerin hücre döngüsünün yeniden düzenlenmesi ile, fraksiyonlar arasında hücrenin fazları, radyodirençli fazdan radyoduyarlı faza değişir.

Dokunun belirli bir miktar IR dozuna maruziyetinden kısa bir süre sonra, tüm hücreler IR'den öncesinde olduğu gibi hücre döngüsünde tam olarak aynı fazda olacaktır, ancak bazıları üreme bütünlüğünü yitirecektir ve bu hücre sayısının en büyük olma eğilimi radyodirençli S fazındadır. Işınlama sonrası zamanın artmasıyla, hayatta kalan klonojenik hücreler, IR öncesi gibi hücre döngüsü boyunca aynı dağılımı gösterecektir (103).

2.5.4. Yeniden Çoğalma (Repopulation)

Normal dokulardaki repopülasyon, genellikle, artan toplam tedavi süresi ile birlikte radyasyon toleransında artış olarak tanımlanır (82, 83). Hızlı yenilenen normal dokularda meydana gelen tipik erken radyasyon yan etkileri için gözlenir. Bu durum, uzun süreli radyasyona maruz kalma sırasında indüklenen doku değişiklikleri ile başlatılmış gibi görünen bir doku rejenerasyon tepkisine dayanmaktadır. Karmaşık biyolojik mekanizmalar, hem kök/hedef hücrede hem de toplam doku seviyesinde proliferatif yapının derin bir şekilde yeniden düzenlenmesini içerir.

Normal doku repopülasyonunun altında yatan biyolojik mekanizmalar “3A” olarak özetlenmiştir (82, 83, 104, 105): Asymmetry loss (Asimetri kaybı); Acceleration of stem/target cell divisions (Kök/hedef hücre bölümlerinin hızlandırılması.); and Abortive divisions of doomed cells (Sterilize hücrelerin abortif bölünmeleri).

Asimetri kaybı (Asymmetry loss)

Hedef/kök hücre hipotezi olarak asimetri kaybı, hızlı yenilenen dokuların radyasyon toleransının dokuya özgü hedef hücre sayısı ile tanımlandığını varsaymaktadır. Bu nedenle, repopülasyon başladıktan sonra görülen sürekli maruziyetten beklenen radyasyon toleransındaki azalmanın telafi edilmesi, IR tarafından sterilize edilenleri değiştirmek için

yeni hedef hücrelerin üretilmesine dayanmalıdır. Fizyolojik olarak, hedef hücreler ortalama olarak asimetrik, yani bir yeni kök ve bir transit / diferansiye yavru hücreye bölünerek kök hücre sayısını korurlar. Aksine, yeni hedef hücrelerin ek üretimi, simetrik iki yavru kök hücre bölünmelerini gerektirir (104).

Hızlanma (Acceleration)

Oral mukozada repopülasyon sırasında doz telafisi oranı olarak tanımlanan kök / hedef hücre bölünmelerinin hızlanması 1 haftada 2 Gy / fraksiyon için 5_0.5 ile 5_1 arasında olduğu bulunmuştur (82, 104, 105). Yaklaşık 0.5 olan kök hücrelerin 2 Gy doz sonrası hayatta kalan oranına dayanarak, bu durum 7 gün içinde 5 simetrik bölünmeyi gerektirir, fizyolojik hücre döngü süresinden büyük ölçüde daha kısa olan 1.4 günlük bir hücre döngü süresine karşılık gelir ki bu durumda bölünmeler hızlanmıştır diyebiliriz.

Abortif bölünmeler (Abortive divisions)

Etkili repopülasyon, diferansiyasyon ve hücre kaybının fizyolojik oranlarında devam etmesine rağmen (106), genel hücre sayısının sabit kalması, veya sadece çok hafif azalması ile ilişkilidir (82, 105, 107). Dahası, genel hücre üretiminin değerlendirilmesi, büyük ölçüde değişmeyen bir aktiviteyi ortaya koymuştur (104, 108). Bununla birlikte, kök hücrelerin büyük çoğunluğu repopülasyon etkin hale gelmeden önce sterilize olur. Sonuç olarak, hücre kaybını engellemek için orijinal (toplam) hücrelerin sayısının oluşması, kalan kök hücrelerin, sadece birkaç saat gibi gerçekleşme olasılığı az olan, kısa hücre döngüsü süresi ile proliferasyonunu gerektirecektir (82, 104, 108).

Bu nedenle, hücrelerin hayatta kalan kök hücrelerden başka kaynaklardan üretilmesi gerekir. “Ölüme mahkum” veya “sterilize” kök hücreler, abortif bölünme şeklinde rezidüel bir proliferatif kapasiteye sahiptir, bu da yavru hücrelerin neredeyse normal diferansiyasyonuna neden olur (84, 106).

2.5.5. Yeniden Oksijenlenme (Reoxygenation)

Oksijen, radyasyon duyarlılığının en güçlü etkileyicilerinden biri olarak bilinmekte olup hipoksik hücrelerin radyasyona karşı 2-3 kat daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (109- 111).

Ek olarak, insan tümörleri, lokal nüks veya sistemik hastalık nedeniyle sıklıkla kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilen akut ve kronik hipoksik bölgeleri içerir (112- 116). Tümör mikro ortamı sürekli değişen oksijen ve pH gradyanları ile dinamiktir (117, 118).

Aralıklı damar kapanmasına bağlı geçici akut hipoksi bölgeleri hızlı bir şekilde reoksijenasyona neden olabilir, oysa oksijen difüzyonunun sınırlandırılmasından dolayı kronik hipoksi daha uzun sürebilir (119).

Klinik radyobiyojideki ana kavram, hipoksik bölgelerdeki tümör alt popölasyonlarının, artan terapötik faydayı hedeflemede kritik öneme sahip olmasıdır, ancak akut veya kronik hipoksik hücrelerin önemli olup olmadığı konusunda hala tartışma vardır (118).

Doz fraksiyonları arasındaki reoksijenasyonun, genel olarak tümör radyosensitivitesini artırarak RT'nin etkinliğini arttırdığına inanılmaktadır. Bununla birlikte, bu deneylerin çoğunun, oksijen seviyelerinin hızlı bir şekilde düştüğü ve tümörlerin ışınlamadan sonra yeniden oksijenlendiği koşullar altında yapıldığı belirtilmelidir. Tümör mikro-çevresindeki bu sert ve stresli değişim, örneğin hızlı diferansiyasyonu tetikleyerek, kanser kök hücrelerini etkileyebilir (120).

2.5.6. Işınlanan Hacim (IRradiated Volume)

Radyoterapide, son yıllarda radyasyon fiziğindeki teknolojik gelişmeler, yüksek doz hacminin makroskopik ve mikroskopik tümör dokusunda ilerici bir şekilde yapılandırılmasına neden olmuştur. Sonuç olarak, önemli dozlara maruz kalan normal doku hacimleri önemli ölçüde azalmış ve bu hacimler içinde doz dağılımı inhomojen hale gelmiştir. Bu durum, tüm doku veya organ yerine, normal dokunun fraksiyonel bir hacminin belirli dozlara maruz bırakılmasının etkisinin dikkate alınması gerektiği anlamına gelir. Ayrıca, olası radyasyon maruziyetleri en sık RT alan sahası yakınında yerel bir bölgede meydana gelir. Sonuç olarak, bir organın ışınlanan hacminin büyüklüğü, dokunun radyasyon maruziyetinin klinik sonuçlarını belirleyen önemli bir parametre olarak dikkate alınmalıdır (83, 98).

Radyasyona maruz kalan hacim, doku hassasiyeti ve birim hacim başına patolojik değişiklikler aynı olsa bile, doku yan etkilerinin klinik olarak ortaya çıkışının kalitesini ve sonuçlarını etkileyebilir (örneğin cilt ülseri durumunda). Buna karşılık, aynı klinik semptomların ve sonuçların altında yatan patolojik değişiklikler, akciğer için gösterildiği gibi, farklı doz-hacim parametrelerine ve mekanizmalarına bağlı olabilir (84, 121).

2.5.7. Uzun-dönem Restorasyon (Long-term Restoration)

Uzun-dönem restorasyon (yenilenme), radyasyona ilk maruziyetten aylar- yıllar sonrasına uzanan zamanlarda doku toleransı üzerinde etkilidir (84, 99). Normal dokuların radyasyon

maruziyetinde, genel tedavi süresi boyunca ve tedavi sonrasında süregelen farklı zaman dilimleri dikkate alınmalıdır. İlk zaman dilimi olarak, IR maruziyetini takiben dakikalar ile saatler arası kısa bir ölçekte, ölümcül hasarın tamamen onarılamaması durumu dokunun radyasyon toleransını azaltabilir. İkincisinde, IR maruziyetini takiben birkaç gün ile hafta arasında (diğer bir deyişle, değişken toplam tedavi sürelerine sahip fraksiyone RT'nin seyri sırasında) radyasyona bağlı doku rejenerasyonu yani "repopülasyon" radyasyon toleransını modüle edebilir. Radyasyona bağlı bu rejenerasyon tepkisi radyasyona erken yanıt veren dokularda görülür. Son olarak üçüncüsünde, IR maruziyetini takiben aylar ile yıllar arasında, bazı dokularda uzun-sürekli restorasyon meydana gelebilir ve bu durum onları yeniden IR'ye daha dirençli hale getirir. Aynı zamanda, yeniden IR toleransının azalmasına neden olan, hasarın uzun vadeli progresyonu diğer dokularda ortaya çıkabilir. Son tedavi haftalarında 2 Gy'nin altında doz uygulandığında, önceki zamanlara kıyasla, çok daha yüksek oranda hastanın OM'si iyileşir (122). Bu durum, yeniden çoğalma (repopülasyon) sürecinin etkin hale gelmesinden önceki bir gecikme süresini gösterir (82).

2.5.8. Moleküler Radyopatoloji (Molecular Radiopathology)

Dokuların radyasyona maruz kalmasından sonra, herhangi bir klinik değişiklik ortaya çıkmadan önce, 'hasar oluşum mekanizması' olarak özetlenebilecek bu süreçteki tüm etkinlikler bir bütündür (83, 100). Bu seri işlemler, serbest radikallerin ve akut oksidatif stresin indüklenmesi ile başlatılır. Bunlar, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi ve dolayısıyla çeşitli hücre içi ve hücre dışı sinyal yollarının modifikasyonu ile sonuçlanır. Bu değişiklikler tüm doku bileşenlerinde (parankim dokular, fibroblastlar, vasküler yapılar) ve ayrıca aktif halde olan- IR'ye doğrudan maruz kalmayla veya yukarıda belirtilen değişiklikler nedeniyle- makrofajlar ve diğer tüm immün hücrelerde gözlenebilir.

Tüm bu olayların kombinasyonu, hücresel / histolojik seviyedeki (örneğin hücre ölümü, diferansiyasyon veya proliferasyon, DNA hasar yanıtı, kronik oksidatif stres ve diğerleri) dokuya özgü değişikliklerin yanı sıra spesifik olmayan değişimleride indükler. Entegre yanıt, daha önce tarif edilmiş bilinen patolojik değişiklikler ile sonuçlanır.

Moleküler/doku radyopatolojisi süreçleri hakkında ayrıntılı bilgi, daha sonraki makroskopik doku etkilerinin gelişme olasılığının tahmini için biyobelirteçlerin belirlenmesi ve ayrıca bu tür etkilerin modifikasyonu için biyolojiye dayalı girişimsel stratejilerin geliştirilmesi için önemli bir önkoşuldur (84).

2.6. Radyasyona Bağlı Gelişen Oral Mukozit için Hayvan Modelleri

Farelerle ilk oral IR deneyleri, 1962'de Goepp R. ve Fitch F. tarafından yapıldı. Bu çalışmalardaki sonlanım noktası, farelerin başlarının bütün olarak IR'ye maruziyetinden sonra gelişen yan etkiler sonucunda azalan beslenmeye bağlı önemli kilo kaybı sonucu hayvanların ölümü olmuştur (123). Histolojik olarak, oral mukozada meydana gelen değişiklikler, temel altta yatan patoloji olarak tanımlandı.

Hayvanların burun- ağız bölgelerinin tamamının IR'den sonra, fare dudak modeli ilk olarak Parkins CS. ve ark. tarafından tanımlandı (124). Bu modelde, farelerin dudaklarında gelişen radyasyon reaksiyonu gıda alımını engelledi ve ciddi kilo kaybına neden oldu. Ayrıca, çalışmada dudakta gelişen reaksiyonun sadece dudak mukozasına değil dudak cildinin yapısına da bağlı olduğu gözlemlendi. Moses R. ve Kummermehr J. 1986'da, radyobiyojik çalışmalar için fare dili modelini geliştirdi (125). Dillerin bütün olarak klinik uygulama ile paralel doz seviyelerine göre ışınladığı için, bu model için de azalmış gıda alımı söz konusudur. Ayrıca, fraksiyone IR sırasında, fareler üzerinde tekrarlanan anestezi ve dil fiksasyonu nedeniyle süregelen potansiyel manipülasyonunun hedef yapı olan dil mukozasında radyasyon dışı travma oluşabileceği gözlemlendi. Bu nedenle model Dörr W. tarafından geliştirildi ve değiştirildi (3). Fraksiyone IR, dil yerine tüm ağız-burun bölgesine anestezi uygulanı. Bu bölgeye uygulanan toplam doz, klinik olarak etkili seviyenin altında kaldı. Gerçek radyasyon reaksiyonun simülasyonu, sadece alt dil yüzeyindeki 3x3 mm²'lik bir tedavi alanına verilen bir test dozu deneyleriyle sağlandı (Şekil 2.11.). Tek doz çalışmaları için de aynı teknik uygulandı. Oral mukozitin klinik ortaya çıkışını, tanımlanan belirli bir tedavi alanı ile sınırlandırmak, radyasyona bağlı gelişen yan etkiler sonucu gelişen kilo kaybını giderdi, ve hayvan üzerindeki yükü büyük ölçüde azalttı (43).



¹¹**Şekil 2.11.** Preklinik fare modelinde alt dil epiteli ülseri- 3. derece birleşik OM reaksiyonunun klinik gözlemi (© Gruber, 2016)

2.7. Dermatan Sülfat

Dermatan sülfat, diğer Glikozaminoglikanlar (GAG) gibi yara iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Dermatan sülfat, Fibroblast Büyüme Faktörü- 2'ye (Fibroblast Growth Factor- FGF) bağlanarak yaralanmaya yanıt olarak hücre proliferasyonunu uyarır (5).

Ek olarak, DS bir pıhtılaşma önleyici (anti-koagülant) olarak görev yapar. Antitrombin III'ün serin homologu olan Heparin Kofaktör II'ye (Heparin Cofactor II- HCII) bağlanır. Dermatan sülfat ayrıca, pıhtılaşma serilerinin endojen bir inhibitörü olan Aktive Protein C'nin (Activated Protein C- APC) etkisini artırarak pıhtılaşmayı da etkiler. Tüm bu özellikleri ile DS'nin en etkili GAG olduğu bildirilmiştir (4).

Glikozaminoglikanlar, memeli dokularında en bol bulunan heteropolisakaritler olan lineer karbonhidratlardır (126). Glikozaminoglikanlar enzimlerin ve büyüme faktörlerinin aktivasyonu, hücrelerin hücre içi matriks ile etkileşimi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer almaktadır. Yaralanmadan sonra, GAG salınır ve Patojenle İlişkili Moleküler Modeller (Pathogen Associated Molecular Patterns- PAMP) gibi davranır (127).

¹¹Gruber S. *Epithelial cell signaling in radiation-induced oral mucositis as a basis for biological targeting - preclinical studies*. Vienna, Med Uni Vienna, PhD Thesis, 2016.

Buna ek olarak GAG'lar, FGF sinyalinin yayılmasını kolaylaştırarak yara iyileşmesine de katılırlar. Fibroblast Büyüme Faktörünün, GAG'lara çok afinitesi vardır ve stabilizasyonlarını sağlar (126). Dört farklı GAG tipi vardır; Heparan Sülfat / Heparin, Kondroitin / Dermatan Sülfat, Keratin Sülfat, Hyaluronan.

Fibroblast Büyüme Faktörü ailesi 23 üyeye sahiptir Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü (Fibroblast Growth Factor Receptor- FGFR): FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4 (128). Fibroblast Büyüme Faktörü, hücre büyümesi ve diferansiyasyonun kontrolü, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve tümör oluşumunda farklı roller oynar. Fibroblast Büyüme Faktörleri heparin bağlayıcı kofaktörler olarak da bilinirler (129- 131). Şimdiye kadar, sadece FGF-2'nin DS'e bağlandığı ve DS tarafından aktive edildiği bildirilmiştir (4).

Fibroblast Büyüme Faktörü-2, FGF ailesinin en iyi karakterize edilmiş üyesidir. Mezenkimal hücre göçünü, proliferasyon ve diferansiyasyon gösteren bir mitojen olarak işlev gören FGF-2'nin, yara iyileşmesinde kilit bir oyuncu olması muhtemeldir. Yaralarda, bol çözünük halde bulunan GAG'lar çoğunlukla DS şeklindedir, ve hücre proliferasyonu için FGF-2 sinyalini destekler (5).

2.8. Proliferasyon Belirteci olarak p16

Birçok çalışmada, p16'nın hücresel siklus fazlarındaki aktivitesi araştırılmış ve proliferasyona işaret eden S-fazı ile ilişkilendirilmiştir.

HPV ile ilişkili kanserlerde p16 proteininin aşırı ekspresyonu tekrar tekrar rapor edilmiştir. Ayrıca p16 İHK'sı oral kavite displazisinin varlığını tanımak için potansiyel bir belirteç olarak tarif edilmiştir (132).

p16, hücre döngüsü progresyonunda (ilerlemesinde) rol oynayan Rb sinyal yolağının önemli bir üyesidir (133).

p16 proteini, siklin bağımlı kinazlar 4 ve 6'yı inhibe ederek işlev gören bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. p21 geninde haritalanan p16INK4A proteini, siklin bağımlı kinaz 4 ve siklin bağımlı kinaz 6'nın inhibisyonu ve ardından Rb siklin bağımlı fosforilasyonun engellenmesi yoluyla hücre döngüsünün progresyonunda negatif regülatör olarak işlev görür (134). Retinablastom geni hücre döngüsünün bekçisi olarak adlandırılır. Bu genlerde oluşan mutasyonlar, genin kodladığı proteinin görevini yerine getirmesini engellemektedir.

p16INK4A'nın genetik değişiklikleri, hücre döngüsünün G1 fazındaki kısıtlama noktasının deregülasyonuna (serbest kalmasına) neden olur ve hücrel transformasyonu destekler (135- 137).

Kanser dokularında bu proteinin kaybolduğu veya ekspresyonunun azaldığı görölmüştür. Yapılan bir çalışmada tek başına p16 kaybının, akciğer epitel hücre sağkalımı üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı, ancak bu durum S fazındaki hücrelerin oranının azaldığı ve G1 ve G2/M'de ise daha fazla oranda hücrenin azaldığı, değiştirilmiş bir hücre döngüsü profili ile sonuçlanmıştır (138).

Sonuç olarak, ek p16 kaybı genetik dengesizliğe ve hücrel ölümsüzleşme ve transformasyona karşı duyarlılığın artmasına neden olmuştur. p16, hücrel yaşlanma sırasında bir kontrol noktası işlevi görür (139).

2.9. Diferansiyasyon Belirteci olarak p21

Farklı çalışmalarda, p21'in hücre döngüsünün fazları üzerindeki etkisi ve hücrel diferansiyasyona etkisi araştırılmış ve diferansiyasyon süreciyle etkileşimi gözlenmiştir. Bir çalışmanın sonucuna göre, p21 proteini, terminal diferansiyasyon sürecinde yer almaktadır (139).

p21 proteini, p21 tümör baskılayıcı gen ürünüdür (140). p21, hücre döngüsü sırasında G1'den S fazına geçişi kontrol eden siklin bağımlı kinaz aktivitesini inhibe eder (141). Bu durum hücrenin DNA'sını onarması için zaman sağlar.

p21 ekspresyonunun, oral epitelyal displastik lezyonların oral skuamöz hücreli kansere ilerlemesiyle arttığı bulunmuş, bu durum p21 ekspresyonunun oral malignite gelişiminde prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği olarak yorumlanmıştır (141).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü olarak p21, hücre döngüsünün negatif kontrolünden ve tümör baskılanmasından sorumludur, p21 büyüme durmasını ('growth arrest') uyarır (142).

İlk klonlanmış Cip/Kip üyesi siklin bağımlı kinaz inhibitörü, p21'dir ve DNA hasarına yanıt olarak G1/S fazının baskılanmasından sorumludur. p21'in "büyüme durmasını" ("growth arrest") uyardığı, p53'nin "büyüme durmasını" ("growth arrest") sağladığı ve p27'nin diferansiyasyon genlerini indüklediği bilinmektedir (143).

2.10. Epitelyal Hücre Bağlantılarının Belirteci olarak Sitokeratin

Sitokeratinler, epitelyal hücrelerinin hücre iskeletinde bulunan proteinlerdir (144). Temel işlevi, epitelyal hücrelere mekanik kuvvet kazandırmaktır. Ancak bu fonksiyonun önemi hücre tipine bağlıdır (145).

Epitelyal yapısal proteinler, keratinler ve keratin ile ilişkili proteinler, diferansiyasyon belirteçleri olarak kullanılırlar. Çünkü ekspresyonları hem bölgeye özgü hem de diferansiyasyona özgüdür (50).

Radyasyon epitelde hasarı indükler, SK salınımı, hücre ölümü ve bazal hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır (146- 148). Radyoterapinin ilk haftasında epitelyal yenilenme azalırken, ikinci haftada kompanse edici epitelyal repopülasyonunun restorasyonu gözlenir (148, 149). Bu epitelyal değişiklikler, büyük olasılıkla her evrede SK'nın diferansiyel ekspresyonuna yol açar (150, 151).

Son 20 yılda, memeli epitel hücrelerinin diferansiyasyonunun araştırılması, sito-iskeletin SK filamentleri, filaggrin, involucrin ve loricrin gibi yapısal proteinlerin tanımlanmasıyla kolaylaştırılmıştır (51).

Sitokeratin filamentleri hücreler arası bağlamda da önemlidir. Hemidesmozomların yanı sıra, desmozomlara da eklenirler. Böylece hücre-hücre adezyonunda ve ayrıca epitelyal hücrelerin altta yatan bağ dokusu ile bağlanmasına yardımcı olurlar. Bu yapısal fonksiyonun yanı sıra, SK bazı membran proteinlerinin taşınmasında da rol oynar (152- 154).

Apoptoziste SK'nın rolü birçok çalışmada belgelenmiştir (155- 157). Apoptozis sürecinde, preapoptotik olay, keratin filamentinin hiper fosforilasyonudur. Bu SK'ler daha sonra kaspaz tarafından parçalanır (158, 159). Bu keratin çiftinin parçalanması, apoptoz işleminin özelliği olan kromatinin yoğunlaşmasına yol açan sitoplazmik ve çekirdeksel hücre iskeletinin çökmesine neden olur.

Apoptozis sırasında organize hücre parçalanması, enflamatuar yanıtın indüklenmesini önlemek için esastır. Sitokeratin ağının programlanmış imhası bu nedenle önemlidir. Sitokeratin bileşimindeki küçük bir kusur, hücrenin, kolonik hiperplazi durumunda önerilen apoptoza duyarlılığını etkileyebilir. Ayrıca, SK'nin keratinize epitel hücrelerdeki ekspresyonu, oluşumu, fonksiyonu, ve temel özellikleri olan; SK çifti arasındaki sıkı bağlantı anahtar görevi, terminal hücre diferansiyasyonu (koruma bariyeri) ve SK ara filamentlerinin hücresel mekanik bütünlüğünün sağlanmasındaki hayati rolü hakkında çok fazla bilgi elde edilmiştir.

Bununla birlikte, hepatik doku gibi keratinize olmayan epitel hakkındaki tablo hala belirsizliğini korumaktadır. Bozulmuş SK yapısı, bu hücreleri mekanik hasara daha yatkın hale getirebilir ve epitel tabakasının bütünlüğünde bir kusur yaratabilir (145).

Keratinler, tabakalı keratinize epitelyal hücrelerin baskın sito-iskelet proteinidir ve en hassas epitelyal diferansiyasyon ve proliferasyon belirteçleridir (51, 160, 161). Ancak, daha önceki hiçbir çalışma radyasyona bağlı gelişen OM'de SK ekspresyonu üzerine odaklanmamıştır (162).



3. MATERIAL AND METHOD

3.1. Araştırmanın Tipi

Hayvan (fare) doku örnekleri üzerinde İHK analiz.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma, Viyana Medikal Üniversitesi Radyoterapi Anabilim Dalı Uygulamalı ve Translasyonel Radyobioloji (Applied and Translational Radiobiology-ATLAB) ve İyon Tedavisi ve Araştırma Merkezi MedAustron, Klinik Olmayan Araştırma Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Araştırmanın planlanan süresi Mayıs 2016 - Haziran 2018 tarihleri arasındadır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Viyana Medikal Üniversitesi Biyomedikal Araştırma Departmanından temin edilen, immünsistemi normal olan C3H / Neu suşundan dişi / erkek toplam 140 fareden alınan dil doku örnekleri üzerinde İHK analiz yapıldı.

Tüm temel in vivo deneyler, mevcut hayvan refahı mevzuatına göre ilgili makamların onayı ile yapıldı (etik kurul onay no. BMWF 66.009/0039-II/3b/2014).

3.4. Araştırmanın materyali

Normal immünolojik yanıtı sahip, inbred C3H / Neu suşundan fareler, bu çalışmada İHK analiz edilecek doku örneklerini elde etmek için kullanıldı. Oral mukozanın radyasyon yanıtında cinsiyete bağlı farklılık bulunamamıştır (43, 163), bu nedenle hem erkek hem dişi fareler bu çalışmaya dahil edildi.

Çalışma iki deneysel kol içermektedir: günlük fraksiyone IR'nin tek başına olduğu 1. deney kolunu ve IR'nin DS'in günlük sistemik uygulandığı (IR+DS) 2. deney kolunu oluşturmuştur. Dermatan sülfat tedavisi subkutan olarak 4 mg / kg / gün uygulandı.

Deney sürecinin belirlenen günlerinde, fareler intraperitoneal olarak enjekte edilen 60 mg/kg pentobarbiton sodyum ile immobilize edildi ve boyun dislokasyonu (atlantookspital eklemin dislokasyon) ile sakrifiye edildi.

Dilleri tabanlarından çıkarıldı ve orta hattından iki yarıya ayrıldı. Çıkarılan diller formalin içine 24-48 saat sabitlendi, dehidrasyonu (Sakura® & Tissue-Tek® VIPTM 5-Vakum İnfiltrasyon İşlemcisi) sağlandı ve 24 saat boyunca parafine (Sakura® & Tissue-Tek® TECTM 5-Doku Parafine Gömme Konsol Sistemi) gömüldü. Bu çalışma için, kesitler bir mikrotomla (Leica RM 2255) 3 µm (mikrometre) kalınlığında kesildi.

İmmünohistokimyasal boyama Leica Biosystems BOND RX cihazı kullanılarak optimize edilmiş (spesifik doku için) standart protokollere göre yapıldı.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Bu çalışmada, radyobiyojik araştırmalar için kullanılabilir farelerin dil örneklerinde radyasyona bağlı gelişen OM'nin patobiyojisini açıklamak üzere, proliferasyon (p16)/diferansiyasyon (p21) belirteçlerinin ve epitelyal hücre bağlantılarının antikorumun (SK) ekspresyonu karakterize edildi.

Analiz edilen **Bağımlı Değişkenler**; (her bir belirtecin ekspresyon modeline bağlı olarak): pozitif hücrelerin relatif sayısı, boyanma yoğunluğu (isteğe bağlı, yarı-niceliksel puan), pozitif ekspresyonun homojenliği / röletif alanı, epitelyal kalınlık.

Bağımsız Değişkenler; IR ve DS tedavisinin uygulanması, uygulanan IR fraksiyonunun sayısı /toplam tedavi süresi.

3.6. Veri Toplama Araçları

Veriler, belirteç / antikor bağımlı değişkenler için İHK olarak boyanmış doku kesitlerinin mikroskopik olarak manuel incelenmesiyle toplandı.

3.6.1. Hayvanlar ve Bakımı

Bu tez çalışmasında, doku örneklerini elde etmek için normal immune sistemi olan C3H / Neu suşundan fareler kullanıldı. Önceki çalışmalarda oral mukozanın radyasyon yanıtında cinsiyete bağlı farklılık bulunamamıştır (163). Bu nedenle, çalışmaya hem erkek hem dişi fareler dahil edildi.

Farelere düzenli olarak, konvansiyonel sıcaklıkta, kontrollü sıcaklık (22±2 ° C), nem (55±% 10) ve 12 saat gündüz/gece ritmi sağlandı. Hayvanlar, 530 cm² zemin alanına sahip 1284L Euro standardı Tip II L Makrolon® kafeslerde (Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg,

Almanya), kafes başına maksimum 5 hayvan olarak, kavak ağacı yatak üzerinde (ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Viyana, Avusturya), standart bakım diyetine (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Almanya) ve standart perspex içme şişelerindeki taze suya kısıtlama olmadan ulaşacak şekilde barındırıldı. Deneylerin başlangıcında farelerin yaşı, 8 ile 12 hafta arasındaydı (43).

3.6.2. Işınlama Tekniği ve Dermatan Sülfat Tedavisinin Uygulanması

Bu çalışmada kullanılan hayvan modeli Dörr W. tarafından geliştirilmiş ve kurulmuştur (3). Çalışma günlük fraksiyone IR'nin tek başına ve günlük sistemik DS tedavisi ile IR'nin birlikte uygulandığı iki deneysel kolu içermektedir.

Işınlama

Ağız-burun (snout) bölgesine, 2 hafta boyunca (0- 4, 7- 11 günlerde) 3 Gy / gün dozunda ve 5 fraksiyon / hafta olacak şekilde anestezi olmadan yapıldı. Haftasonu IR verilmedi (5.- 6. ve 12.- 13. günler).

Fareler 10:00 ve 13:00 arasında ışınladı. Işınlama, 200 kV voltaj ve 20 mA tüp akımıyla çalıştırılan, bir X-ışını tüpü (YXLON Y.TU 320-D03, YXLON International GmbH Hamburg, Almanya) ile verildi. 5.5 mm fokus büyüklüğü ve 3 mm Berilyum (Be) ve 3 mm Alüminyum (Al) ışın filtresi kullanılarak, 45.5 cm fokus- obje mesafesinde doz hızı 1.027 Gy / dk hesaplandı (164).

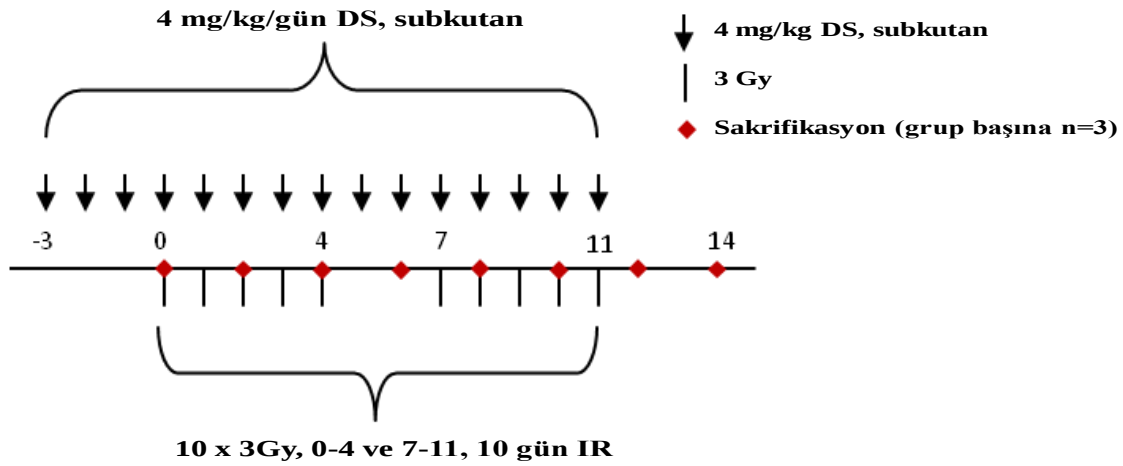
Anestezi uygulanmamış hayvanlar plastik tüplere (iç çap 2 cm) yönlendirildi ve ağız-burun bölgeleri, tüplerin ön ucunu kapatan Perspex bloğundan bir konik deliğe (10 mm- 6 mm) yerleştirildi. Arka uçlar, farelerin geri çıkmasını önlemek için kapatıldı. Beş ile sekiz hayvan aynı anda ışınladı. Herbirinin ağız-burun pozisyonları arasındaki doz homojenliği $\%3.2 \pm 0.5$ idi.

Sekiz hayvanın eşzamanlı doz ayarlaması için, fareler IR cihazının merkez ışınına (dikey ışın yönüne) standart bir şekilde yerleştirildi. İlave bir 4 mm Al ve 0.6 mm Cu ışın filtresi kullanılarak; 45.5 cm odak-cilt mesafesinde doz hızı 1 Gy/dk olarak ayarlandı.

Hayvanların gövdeleri kurşun eşdeğeri MCP-96'dan (HEK Medizintechnik, Lübeck, Almanya) oluşan 12 mm kalınlığında bir kolimatör plakası ile korundu. Tedavi alanı gözden boğaza kadar olan, ve böylece tüm dili içeren bölgeyi kapsamaktadır (Şekil 3.1) (165).



¹Şekil 3.1. Fare Işınlama Dizaynı



²Şekil 3.2. Deney Dizaynı

¹Gruber S, Cini N, Kowald LM, et al. Upregulated epithelial junction expression represents a novel parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation in oral mucosa. *Strahlenther Onkol.* 2018; 194(8): 771-79

²Gruber S, Arnold M, Cini N, et al. Radioprotective effects of dermatan sulfate in a preclinical model of oral mucositis – targeting inflammation, hypoxia and junction proteins without stimulating proliferation. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6). pii: E1684.

Dermatan sülafat tedavisinin uygulanışı

Salin içinde çözölmüş 1 mg/ml konsantrasyonda günlük 4 mg/kg DS (Sigma Aldrich, MO, ABD, Kat. C3788), IR günlerinde IR'den iki saat sonra ve IR olmayan günler değışen zamanlarda, subkutan olarak uygulandı. Işınlama 0. gün'den başladığı kabul edilerek, IR + DS grubuna DS iki hafta boyunca -3. günden 11. güne kadar her gün verildi. (Şekil 3.2)

Sakrifikasyon

Günaşırı aralıklarla, hayvan grupları (n = 3), intraoperitonel enjeksiyon ile 60 mg / kg pentobarbiton sodyum ile immobilize edildikten sonra boyun dislokasyonu (atlantookspital eklemin dislokasyon) ile sakrifiye edildi (Şekil 3.2). Dilleri tabanlarından çıkarıldı, ardından orta hattın iki yarıya ayrıldı.

Çıkarılan diller formalin içine 24-48 saat sabitlendi, dehidrasyon (Sakura® & Tissue-Tek® VIPTM 5-Vakum İnfiltrasyon İşlemcisi) sağlandı ve 24 saat boyunca parafin içine (Sakura® & Tissue-Tek® TECTM 5-Doku Parafin Gömme Konsol Sistemi) gömüldü. Bu çalışma için, kesitler bir mikrotom kullanılarak (Leica RM 2255) 3 µm kalınlığında kesildi. İmmünohistokimyasal boyama Leica Biosystems BOND RX cihazı kullanılarak optimize edilmiş (spesifik doku için) standart protokollere göre yapıldı.

3.6.3. İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyama, formalinle fıkse edilmiş, parafine gömülmüş ve standart protokollere göre (spesifik doku için) optimize edilmiş 3 µm kalınlığında kesilmiş dil kesitleri üzerinde Leica Biosystems BOND RX kullanılarak yapıldı. Histolojik hazırlık prosedürleri daha önceki çalışmalarda detaylı olarak bildirildi (166).

Boyanacak kesitlerin, 95°C'de 30 dakika inkübasyonunu takiben, parafinden Leica Bond Dewax çözeltisi ile arındırıldı (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Groove, IL; Cat no. AR9222), Bond Epitope Retrieval 1 çözeltisi (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Groove, IL; Cat no. AR9961) ile antijen alımı ve spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin %2 keçi serumu ile bloke edilmesi işlemlerinden geçti. Birincil antikor bağlanması, Leica Bond Rafine Tespit kiti (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Groove, IL; Cat no. DS 9800) kullanılarak diaminobenzidin kromojen ve bir haematoksinin karşı boyama ile görselleştirildi. Birincil antikorlar, Leica Bond Antikoru Seyreltici tampon çözeltisinde (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Groove, IL; ABD, Kat no. AR9352) seyreltildi (165).

Çalışmada kullanılan her belirteç / antikor için önceden yapılan pilot çalışmalarada, farklı konsantrasyonlara karşılık gelen boyanma yoğunlukluları mikroskopta manuel değerlendirildi ve en iyi boyanmayı sağlayan yoğunluklar seçildi..

Seçilen optimum konsantrasyon oranları; Anti-p16 ARC antikor 1:50 (Abcam, Cambridge, MA, ABD; Cat no. 51243; tavşan monoklonal), Anti-p21 Ras antikor 1:100 (Abcam, Cambridge, MA, ABD; Cat no. 86696; fare monoklonal) ve Anti-Cytokeratin 5 antikor 1:5000 (Abcam, Cambridge, MA, ABD; Cat no. 52635; tavşan monoklonal) olarak uygulandı.

Boyamadan çıkan numuneler dehidrasyon için yoğunluğu sırasıyla artan bir alkol serisi ve ardından Xylol yıkamasından geçti. Kesitlerin üzerine entellan damlatıldı ve kesitler bir lamel ile kapatıldı.

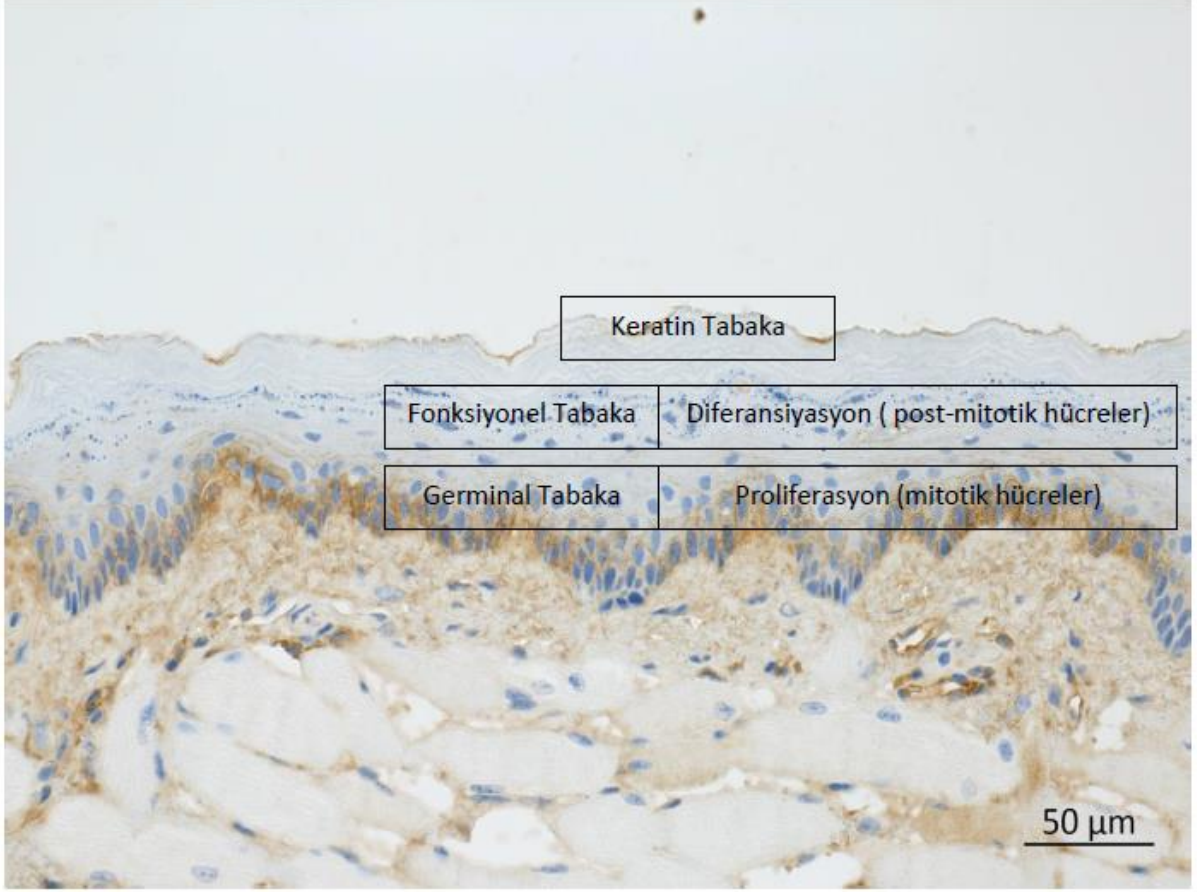
3.6.4. Boyanan Hücrelerin Değerlendirilmesi

Mikroskopik analizler, bir Axio Lab.A1 HAL 35 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, ABD) ile alan bazında 400x0.65 büyütmedev kare grid kullanılarak yapıldı. Fare alt dil epiteli, uçtan başalayarak dilin sonuna kadar analiz edildi. En az 3, en fazla 8 olacak şekilde ortalama 5 görsel alan değerlendirildi. Her görsel alanda, pozitif hücre sayısı, toplam hücre sayısına normalize edilerek kayıt edildi. Pozitif hücrelerin oranı, germinal ve fonksiyonel epitel tabakalar için ayrı ayrı değerlendirildi.

Ek olarak, eksprese edilen protein miktarına karşılık gelen boyanma yoğunluğu, 0 (sinyal yok), 1 (zayıf sinyal), 2 (orta sinyal) ila 3 (güçlü sinyal) arasında yarı-kantitatif rastgele puanlama ile değerlendirildi. Her bir pozitif hücre için ayrı ayrı değil, görsel alan başına boyanma yoğunluğu skorlandı.

Ayrıca epitelyal kalınlık, epitelin germinal, fonksiyonel ve keratin tabakası için dilin ventral yüzeyinin iki temsili konumunda ölçüldü (Şekil 3.3.).

Pozitif hücreler ve hücrelerin boyama yoğunluğu, yoğun bir eğitimden sonra iki bağımsız ve deneyimli araştırmacı tarafından kör bir şekilde değerlendirildi. Gözlemciler arası değişkenliğin ihmal edilebilir olduğu bulundu (165).



Şekil 3.3. p16 ile İHK boyanan fare alt dil epiteli. (© N. Cini 2018)

p16 ile boyanmış fare alt dil epitelinin temsili histofotoğrafı (tedavi edilmemiş kontrol grubu 0. gün). Germinal ve fonksiyonel epitelyal kompartmanları ile birlikte keratin tabakası alt dil yüzey epiteli oluşturur. Ölçek skalası: 50µm

3.6.4.1. Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi

Boyanan örnekler, 400x0.65 kat büyütme ile ışık mikroskopunda (Axio Lab.A1 HAL 35) incelendi. Germinal ve fonksiyonel tabakanın hücreleri bir kare grid yardımıyla sayıldı (bir görsel alan = 250µm). Boyanma indeksi (*labeling index*), pozitif hücrelerin rölatif sayısıdır.

3.6.4.1.1. p16 İşaretlenme İndeksi

p16 pozitif hücrelerin sayısı, toplam hücre sayısına (veya bu çalışma için, germinal tabakanın ve fonksiyonel tabakanın toplam hücre sayısına bölünmesiyle) bölündü ve 100'ün faktörü ile çarpıldı.

3.6.4.1.2. p21 İşaretlenme İndeksi

p21 pozitif hücrelerin sayısı, toplam hücre sayısına (veya bu çalışma için, germinal tabakanın ve fonksiyonel tabakanın toplam hücre sayısına bölünmesiyle) bölündü ve 100'ün faktörü ile çarpıldı.

3.6.4.1.3. Sitokeratin İşaretlenme İndeksi

Sitokeratin pozitif hücrelerin sayısı, toplam hücre sayısına (veya bu çalışma için, germinal tabakanın ve fonksiyonel tabakanın toplam hücre sayısına bölünmesiyle) bölündü ve 100'ün faktörü ile çarpıldı.

3.6.4.2. Boyanma Yoğunluğu

Eksprese edilen protein miktarına karşılık gelen boyama yoğunluğu, 0 (sinyal yok), 1 (zayıf sinyal), 2 (orta sinyal) ila 3 (güçlü sinyal) arasında yarı-kantitatif rastgele bir puan ile değerlendirildi. Her bir pozitif hücre için ayrı ayrı değil, görsel alan başına boyama yoğunluğu skorlandı (165).

3.6.4.3. Epitelyal Kalınlık

Epitelyal kalınlık, bir kare grid kullanılarak ışık mikroskobu ile epitelin germinal, fonksiyonel ve keratin tabakası için dilin ventral yüzeyinin iki temsili konumunda ölçüldü.

3.7. Araştırma Planı



3.8. Verilerin Analizi ve İstatistik

Her bir gün için, her deney kolunda 3 farenin verileri toplandı. Örneklerin analizlerinde, germinal, fonksiyonel ve keratin tabakalar için dil epitelinin iki temsili konumunda epitel kalınlığı, ayrıca germinal ve fonksiyonel tabakalar için, pozitif hücre rölatif sayısı (işaretlenme indeksi), ve boyama yoğunluğu skorları değerlendirildi.

İstatistiksel analiz için, SPSS 17 istatistiksel yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanıldı. Her fare için ayrı ayrı ortalama değerler hesaplandı. Bu değerlerden her grup için ortalama değer ve standart sapma (standard deviation- SD) hesaplandı. Üç hayvandan oluşan her deney grubu için ortalama değerler ve standart hatalar elde edildi. Grafiklerin oluşturulması için GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) kullanıldı (165).

Deney kollarındaki ortalama değerler arasındaki farkın anlamlılığını test etmek için varyans analizi (tek-yönlü ANOVA) uygulandı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

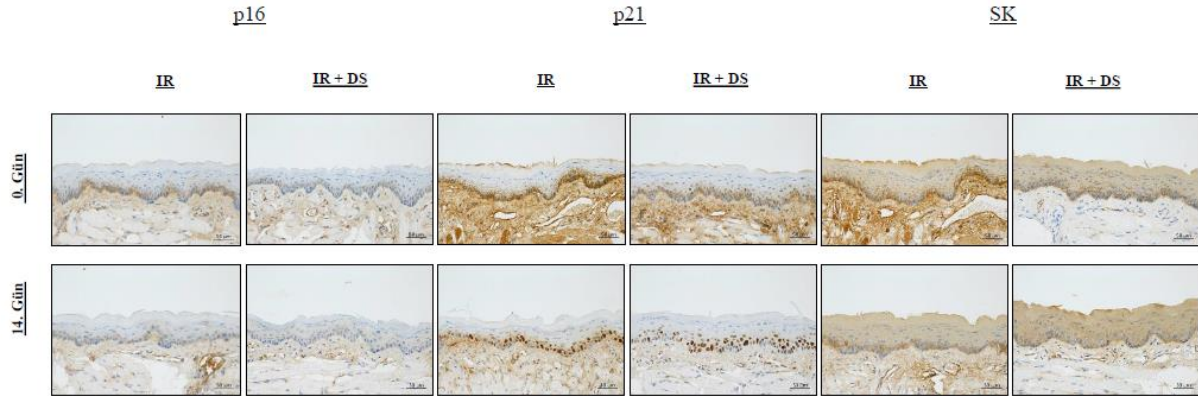
İmmünohistokimyasal boyanma protokolleri suboptimal olabilir. Bu durumda, protokoller yeniden optimize edilecektir. Bununla birlikte, çoğu protokol önceki çalışmalarda fare dili örnekleri için oluşturulmuştur ve optimize edilmiştir. Numune sayısı sınırlıdır. Ancak, deney grubu başına ortalama 3 örnek mevcuttur. Önceki çalışmalarımız açıkça, bu kadar sayıda örnek ile son derece kesin verilerin elde edildiğini göstermiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için numunelerin elde edildiği orijinal hayvan deneyleri, ilgili makam tarafından, BMWF 66.009 / 0039-II / 3b / 2014 (proje lideri: Prof. Dr. Dörr W.) tescil numarası altında onaylanmıştır. Avusturya Federal Bilim, Araştırma ve Ekonomi Bakanlığı'na ait onay belgesi ektedir. Avusturya'da belirtilen laboratuvarlarda yapılacak bu numunelerin analizleri için daha fazla onay gerekmedi.

Ek olarak bu etik kurul onayı ile Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün etik kuruluna başvuruldu ve 28/03/2017 tarihli etik kurul toplantısında tez projesi, 'Farelerde radyasyona bağlı gelişen oral mukozitin dermatan sülfat ile modülasyonu: diferansiyasyon süreçlerine etkileri' adlı ile onay aldı.

4. BULGULAR



Şekil 4.1. Fraksiyone IR +/- DS sırasında p16, p21 ve SK ekspresyonu

0.gün (ışınlanmamış ve tedavi uygulanmamış kontroller) ve IR'yi takiben 14. günde alınan örneklerle ait p16, p21 ve SK boyanan fare alt dil epitelinin temsili histofotografileri.

Ölçek skalası: 50µm

Literatür ve önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda bu tez çalışmasında; proliferasyon belirteci olarak p16, diferansiyasyon belirteci olarak p21 ve hücre iskeletinin bütünlüğünün belirteci olarak SK antikorunun analiz edilmesi planlandı.

Dermatan sülfat tedavisi, p16 için boyanma yoğunluğunda anlamlı bir fark yaratmadı.

Bununla birlikte, p21 için, DS uygulanan deney koluna ait fare dil epiteli kesitlerinde boyanma yoğunluğu, özellikle fonksiyonel tabaka için belirli bir dereceye kadar azalmıştır.

Dermatan sülfat tedavisinin, SK antikoru için etkisi, fraksiyone RT'nin etkisi ile her iki grupta da benzer ancak DS kolunda daha anlamlı olarak üstün bulundu.

4.1. p16 İşaretlenme Paterni, İndeksi ve Boyama Yoğunluğu

Germinal Tabaka

Germinal tabaka üzerinde, p16 pozitif hücrelerin yüzdesi her iki deney kolunda kontrol grubu aralığında kalmıştır.

Kontrol grubu aralığı %91.2-98.2 idi. Tek başına IR ve IR + DS kolları arasında pozitif hücrelerin %'sinin anlamlılığı 0. gün için. $p = 0.6$, 6. gün $p = 0.06$ ve 12. gün. $p = 0.009$ 'dur. İstatistiksel anlamlılık sadece 12. gün için bulundu. (Şekil 4.2. A.)

Germinal tabakadaki boyanma yoğunluğu tek başına IR kolu için 6., 10. ve 14. günlerde, ve IR + DS kolu için 8. ve 14. günlerde incelendi; ve bu günler için 1.6- 2.0 rastgele birim (arbitrary unit- a.u.) olan kontrol grubu aralığından saptığı gözlemlendi

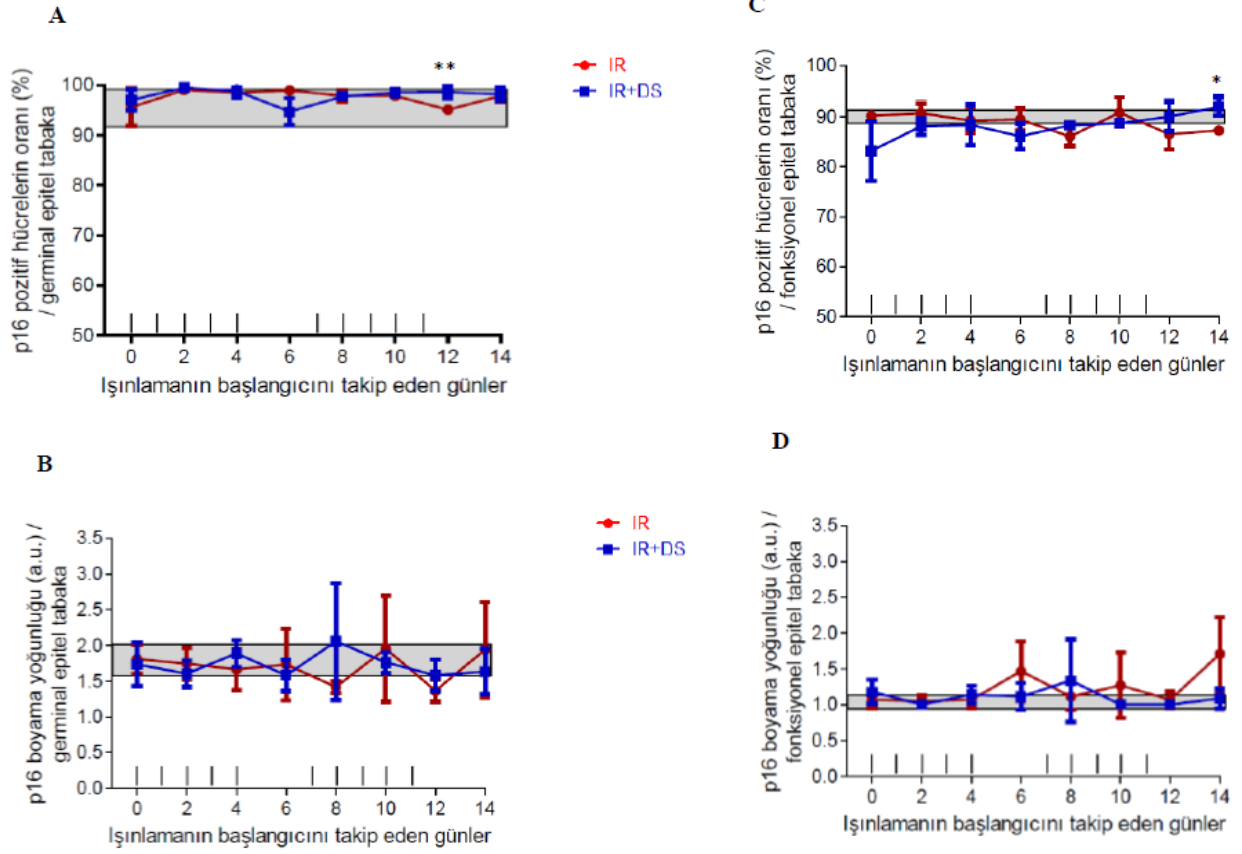
Tek başına IR ve IR + DS deney kolları arasında anlamlı farklılık 4. gün için $p = 0.3$, 8. gün için $p = 0.25$ ve 14. gün için $p = 0.52$ olarak bulundu. (Şekil 4.2.B.)

Fonksiyonel Tabaka

Fonksiyonel tabakadaki, p16'nın pozitif hücrelerinin yüzdesi, 14. gün hariç, her iki kolda da anlamlı bir fark yaratmadı. Kontrol grubu aralığı %89.5-91.2 idi.

Tek başına IR ve IR + DS koluları arasında pozitif hücrelerin %'si, 0. gün için $p = 0.12$, 6. gün için $p = 0.17$ ve 14. gün için $p = 0.016$ olarak yalnızca 14. günde anlamlı fark bulundu. (Şekil 4.2.C.)

Fonksiyonel tabaka için p16 boyama yoğunluğu, tek başına IR kolunda 6, 10 ve 14 günlerde kontrol grubu aralığından (1- 1.2 a.u.) fazladır. Bu günler için tek başına IR ile IR + DS deney kolları arasındaki farkın anlamlılığı 6. gün $p = 0.25$, 8. gün $p = 0.56$, 10. gün $p = 0.37$ ve 14. gün $p = 0.11$ bulundu. İki deney kolu arasında anlamlı bir fark yoktur. (Şekil 4.2.D.)



Şekil 4.2. Fraksiyone IR +/- DS'in p16 için pozitif hücre sayısı %'si ve boyanma yoğunluğuna etkisi.

p16 ekspresyon değişiklikleri germinal ve fonksiyonel epitel tabakalarda analiz edildi. Boyanma sinyal yoğunluğu, 0 (sinyal yok), 1 (zayıf), 2 (orta) veya maksimum 3 (güçlü) rastgele puanlama ile yarı- kantitatif olarak değerlendirildi. p16, deney kolu başına 3 örnekte, 14 gün boyunca gün aşırı (iki günde bir) analiz edildi. Veri noktaları 3 hayvanın ortalamasını temsil eder, hata çubukları +/- 1 Standart Hata Ortalaması (Standart Error Mean- SEM) gösterir. Gölge alanlar, 3 kontrol hayvanından gelen ortalamayı (+/- 1 SEM) göstermektedir. Fraksiyonasyon protokolü, apsinsin tepesinde belirtilmektedir.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.2. p21 İşaretlenme Paterni, İndeksi ve Boyama Yoğunluğu

Germinal Tabaka

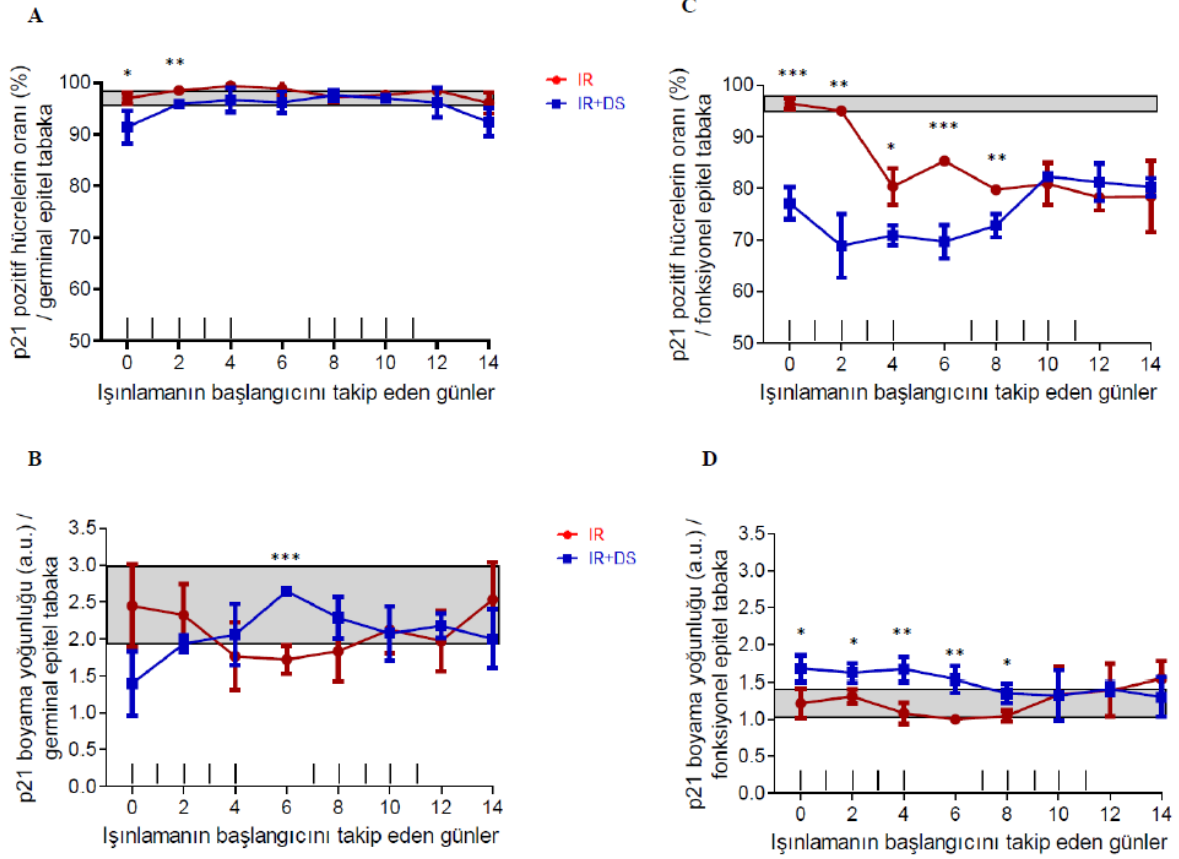
Germinal tabakada, p21 pozitif hücrelerin yüzdesi kontrol grubu aralığındaydı ve 14. günde tek başına IR kolu için minimum değer %83.2 idi. IR + DS kolu için, p21 pozitif hücrelerin yüzdesinin 0. ve 14. günlerde minimum %89.5 değerinde olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu aralığı %95.8-97.8 idi. Tek başına IR ve IR + DS deney kolları arasında pozitif hücrelerin %'sinin anlamlılığı 0. gün için $p = 0.04$ ve 2. gün için $p = 0.003$, 6. gün $p = 0.14$ ve 14. gün $p = 0.14$ olarak bulundu. (Şekil 4.3.A.)

Germinal tabakadaki p21 boyanma yoğunluğu 6. günde IR + DS ve tek başına IR kolları arasında anlamlı bir fark yarattı. Tek başına IR ve IR+DS kolları arasındaki anlamlılık 0. gün için $p = 0.06$, 6. gün için $p = 0.001$ ve 14 gün için $p = 0.22$ idi. IR + DS deney kolu için 0. günde en düşük seviyede olan boyanma yoğunluğu 6. güne kadar kontrol grubu aralığına (1.8-2.8 a.u.) yükseldi ve 14. günde bu aralığın en alt seviyesine azalarak ilerledi. (Şekil 4.3.B.)

Fonksiyonel Tabaka

Fonksiyonel tabaka için, p21 pozitif hücrelerin yüzdesi, IR + DS kolunda, tek başına IR koluna kıyasla 10. güne kadar anlamlı derecede düşük ilerlediği gözlemlendi. 10. günden itibaren IR + DS kolu tek başına IR koluyla yakın değerlere ilerledi. Tek başına IR ve IR + DS kolları arasındaki pozitif hücrelerin %'sinin anlamlılığı, 0 gün için $p = 0.001$, 2. gün $p = 0.002$, 4. gün $p = 0.016$, 6. gün $p = 0.001$, 8. gün $p = 0.008$, 10. gün $p = 0.57$ ve 14. gün $p = 0.68$ olarak bulundu. Kontrol grubu aralığı %95.8-97.7 idi. (Şekil 4.3.C.)

Fonksiyonel tabakadaki p21 boyama yoğunluğu IR + DS kolunda, tek başına IR kolu ile kıyaslandığında, 0. gün için $p = 0.04$, 2. gün için $p = 0.03$, 4. gün için $p = 0.01$, 6 gün için $p = 0.007$, 8. gün için $p = 0.03$, 10 gün için $p = 0.97$ ve 14. gün için $p = 0.30$ idi. Tek IR kolu için değerlerin kontrol grubu aralığı 1-1.40 a.u. arasında değiştiği gözlemlendi. (Şekil 4.3.D.)



Şekil 4.3. Fraksiyone IR +/- DS'in p21 için pozitif hücre sayısı %'si ve boyanma yoğunluğuna etkisi.

p21 ekspresyon değişiklikleri germinal ve fonksiyonel epitel tabakalarda analiz edildi. Boyanma sinyal yoğunluğu, 0 (sinyal yok), 1 (zayıf), 2 (orta) veya maksimum 3 (güçlü) rastgele puanlama ile yarı- kantitatif olarak değerlendirildi. p21, deney kolu başına 3 örnekte, 14 gün boyunca gün aşırı (iki günde bir) analiz edildi. Veri noktaları 3 hayvanın ortalamasını temsil eder, hata çubukları ± 1 SEM gösterir. Gölge alanlar, 3 kontrol hayvanından gelen ortalamayı (± 1 SEM) göstermektedir. Fraksiyasyon protokolü, apsinsin tepesinde belirtilmektedir.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.3. Sitokeratin İşaretlenme Paterni, İndeksi ve Boyama Yoğunluğu

Germinal Tabaka

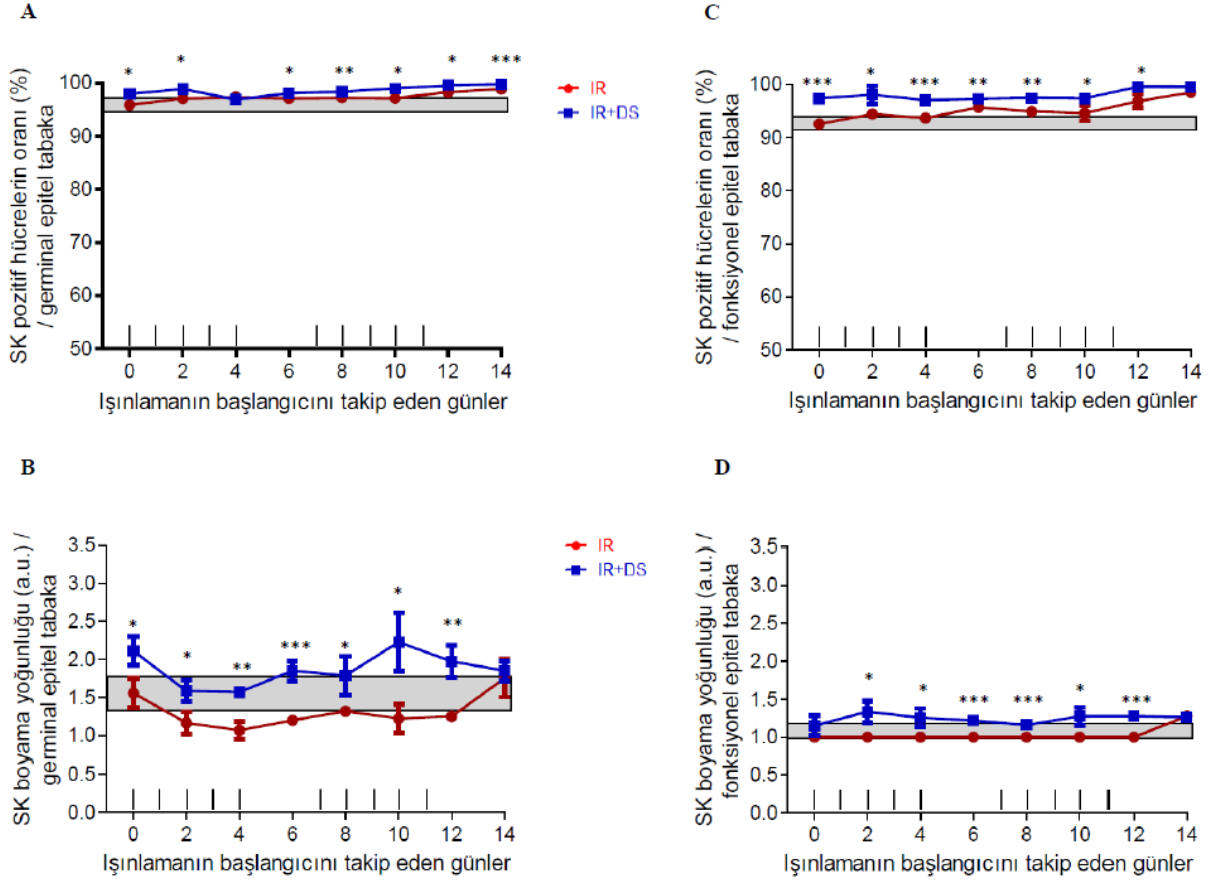
Sitokeratin pozitif hücrelerin yüzdesi, germinal tabakada her iki deney kolu için kontrol grubu aralığının altına düşmedi. IR + DS kolu, 4. gün hariç, tek başına IR kolundan anlamlı olarak yüksek izlendi. Tek başına IR ve IR + DS kolları arasında SK pozitif hücrelerin %'sinin anlamlılığı 0. gün $p = 0.011$, 2. gün $p = 0.015$, 4. gün için $p=0.47$, 6. gün $p = 0.034$, 8. gün $p = 0.007$, 10. gün $p = 0.021$, 12. gün $p = 0.02$ ve 14. gün $p = 0.00$ idi. Kontrol grubu aralığı %95.2-96.3'tür. (Şekil 4.4.A)

Sitokeratin boyanma yoğunluğu DS ile tedavi edilen grupta tek başına IR'ye göre anlamlı olarak daha yüksekti. Tek başına IR ve IR+DS arasındaki anlamlılık, 0. gün için $p = 0.025$, 2. gün için $p = 0.025$, 4. gün için $p = 0.003$, 6. gün için $p = 0.001$, 8. gün için $p = 0.035$, 10. gün için $p = 0.015$, 12. gün için $p = 0.004$ ve 14 gün için $p = 0.57$ idi. Kontrol grubu aralığı 1.67-1.33 a.u. idi. (Şekil 4.4.B.)

Fonksiyonel Tabaka

Sitokeratin pozitif hücrelerin yüzdesi, tek başına IR kolu için kontrol grubunun üst sınırında gezerken, IR + DS kolu tek başına IR kolundan anlamlı olarak yüksektir. 14. güne kadar anlamlı derecede daha yüksek bir yüzde gözlemlendi. Tek başına IR ve IR + DS kolları arasındaki pozitif hücrelerin %'sinin anlamlılığı, 0. gün $p = 0.001$, 2. gün $p = 0.028$, 4. gün, $p = 0.001$, 6. gün $p = 0.002$, 8. gün $p = 0.003$, 10. gün $p = 0.04$, 12. gün $p = 0.022$ ve 14. gün $p = 0.10$ olarak bulundu. Kontrol grubu aralığı %91.9-92.9'dur. (Şekil 4.4.C.)

Fonksiyonel tabaka için SK boyama yoğunluğu değerlendirildiğinde, boyama yoğunluğu DS ile tedavi edilen grupta tek başına IR koluna göre anlamlı olarak daha yüksekti. Tek başına IR kolu kontrol grubu aralığında olduğu gözlemlendi (1 a.u.). Tek başına IR ve IR+ DS deney kolları arasındaki anlamlı fark, 0. gün için $p = 0.121$, 2. gün için $p = 0.016$, 4. gün için $p = 0.024$, 6. gün için $p = 0.000$, 8. gün için $p = 0.000$, 10. gün için $p = 0.015$, 12. gün için $p = 0.000$ ve 14. gün için $p = 0.74$ idi. Kontrol grubu aralığı 1.0 a.u. (Şekil4.4.D.)



Şekil 4.4. Fraksiyone IR +/- DS'in SK için pozitif hücre sayısı %'si ve boyanma yoğunluğuna etkisi.

Sitokeratin ekspresyon değişiklikleri germinal ve fonksiyonel epitel tabakalarda analiz edildi. Boyama sinyal yoğunluğu, 0 (sinyal yok), 1 (zayıf), 2 (orta) veya maksimum 3 (güçlü) rastgele puanlama ile yarı- kantitatif olarak değerlendirildi. Sitokeratin, deney kolu başına 3 örnekte, 14 gün boyunca gün aşırı (iki günde bir) analiz edildi. Veri noktaları 3 hayvanın ortalamasını temsil eder, hata çubukları +/- 1 SEM gösterir. Gölge alanlar, 3 kontrol hayvanından gelen ortalamayı (+/- 1 SEM) göstermektedir. Fraksiyonasyon protokolü, apsinin tepesinde belirtilmektedir.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.4. Epitelyal Kalınlık ve Hücre Sayıları

Epitelyal Kalınlık

p16, p21 ve SK için epitelyal kalınlıklar ayrı ayrı incelendi.

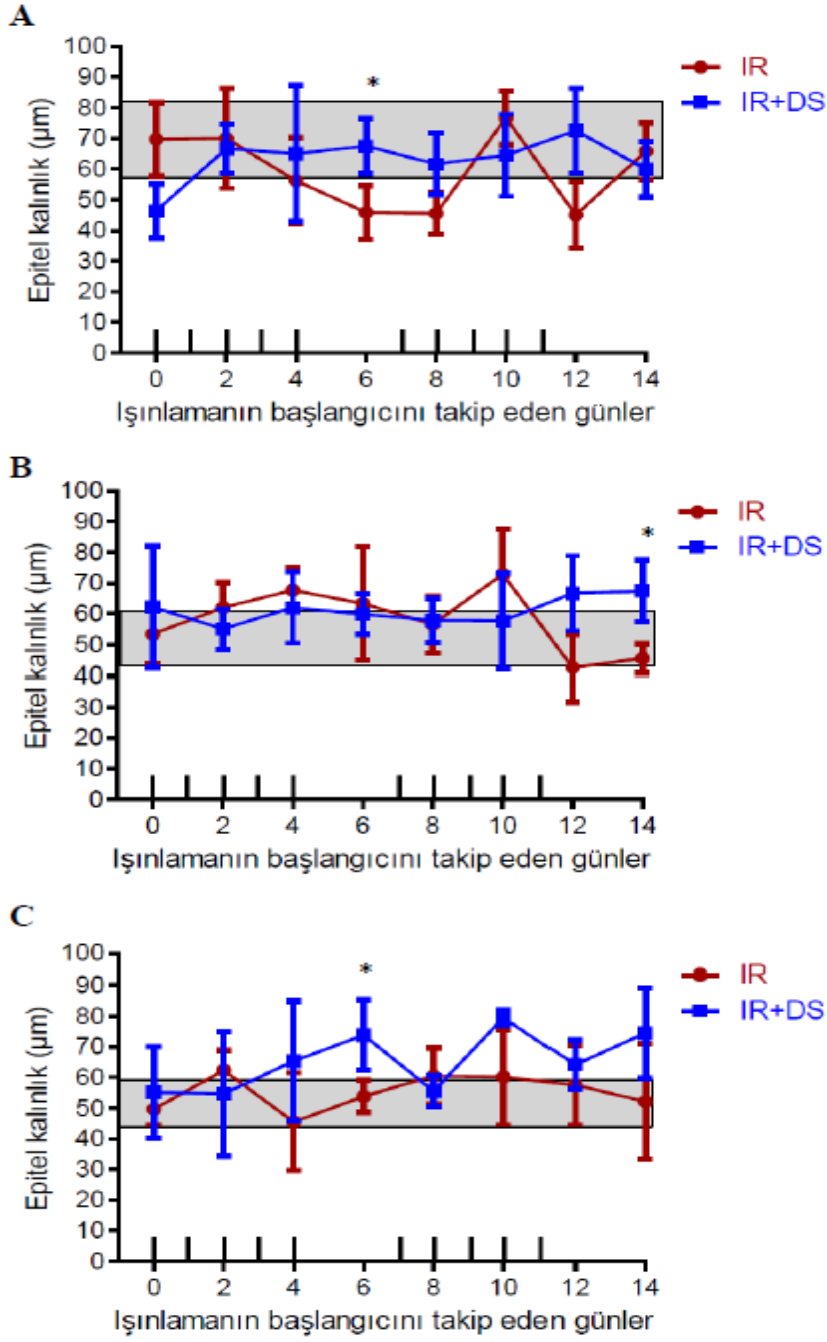
p16 için IR + DS kolunun, 0. gün hariç kontrol grubunu belirten gri çubuğun altına düşmediğini gözlemlendi. (Şekil 4.5.A.)

Tek başına IR kolundaki ortalama epitel kalınlığı 57.5 μm , p16 için 59 μm idi; p21 için 57.9 μm ve SK için 55.2 μm .

IR + DS kolunun ortalama kalınlığı 63.15 μm , p16 için 63 μm idi; p21 için 61 μm ve SK için 65.33 μm olarak hesaplandı.

Tek başına IR ve IR + DS kolları arasındaki anlamlı fark; p16 için 6. günde $p = 0.04$ (Şekil 4.5.A.), p21 için 14. günde $p = 0.03$ (Şekil 4.5.B.) ve SK için 6. günde $p = 0.05$ bulundu (Şekil 4.5.C.).

Bu bulgulara göre, DS uygulanan deney kolunda, ortalama epitelyal kalınlıklar, p16, p21 ve SK için tek başına IR kolundan daha yüksektir.



Şekil 4.5. Fraksiyone IR +/- DS tedavisi sırasında p16 (A), p21 (B) ve SK (C) epitelyal ekspresyonunda rölatif epitelyal kalınlık

Her dil kesitindeki temsili noktalarda epitelyal kalınlıklar belirlendi. p16, p21 ve SK, deney kolu başına 3 örnekte, 14 gün boyunca gün aşırı (iki günde bir) analiz edildi. Veri noktaları 3 hayvanın ortalamasını temsil eder, hata çubukları +/- 1 SEM gösterir. Gölge alanlar, 3 kontrol hayvanından gelen ortalamayı (+/- 1 SEM) göstermektedir. Fraksiyonasyon protokolü, apsinsin tepesinde belirtilmektedir.

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

Hücre Sayıları

Toplam epitelyal hücre sayıları p 16, p21 ve SK için incelendi.

Tek başına IR kolundaki ortalama toplam epitelyal hücre sayısı 349, p16 için 371, p21 için 343 ve SK için 335'tir.

IR + DS kolunun ortalama toplam epitelyal hücre sayısı 328, p16 için 325, p21 için 344 ve SK için 316 olarak hesaplandı.

Tek başına IR ve IR + DS deney kolları arasında sadece 6. günde p21 için $p = 0.043$ ile anlamlı bulundu. (Şekil 4.6.D.)

Germinal epiteyal hücre sayıları p 16, p21 ve SK için incelendi.

Tek başına IR kolundaki ortalama germinal epiteyal hücre sayısı 233, p16 için 239, p21 için 232 ve SK için 230'dur.

IR + DS kolunun ortalama germinal epiteyal hücre sayısı 218, p16 için 217, p21 için 226 ve SK için 213 olarak hesaplandı.

Tek başına IR ve IR + DS deney kolları arasında sadece 6. günde p21 için $p = 0.028$ ile anlamlıydı. (Şekil 4.6.E.)

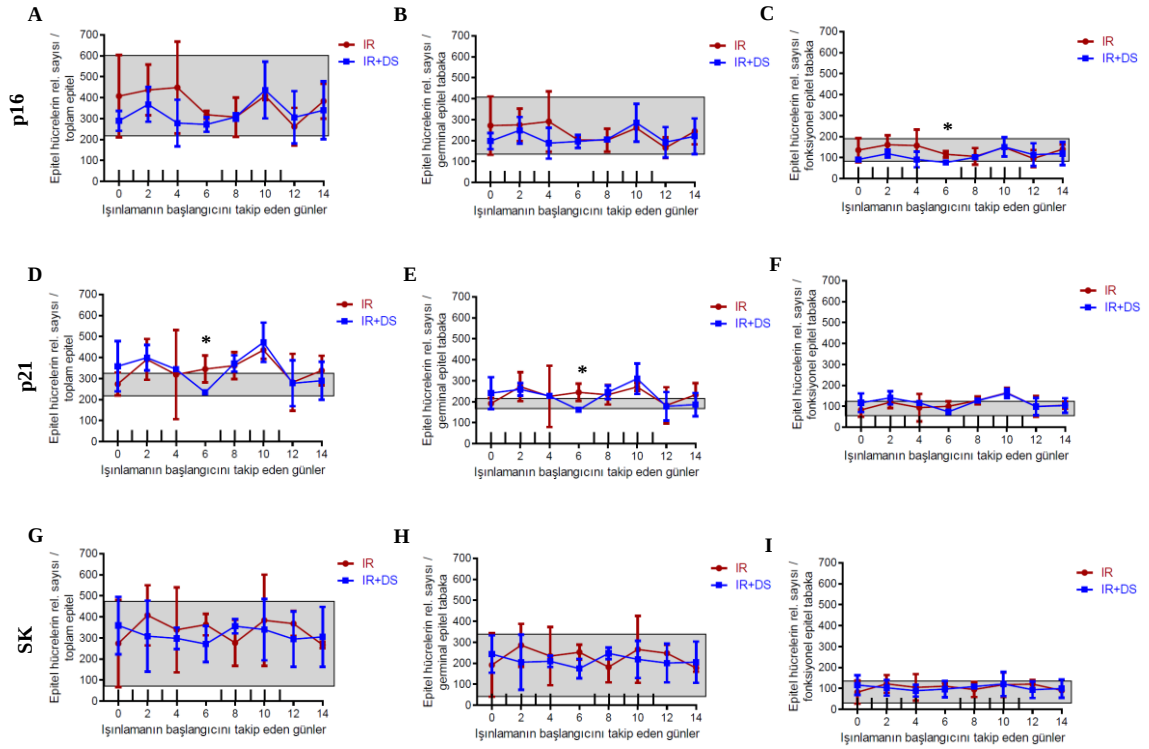
Fonksiyonel epiteyal hücre sayıları p 16, p21 ve SK için incelendi.

Tek başına IR kolundaki ortalama fonksiyonel epitelyal hücre sayısı 116, p16 için 132, p21 için 112 ve SK için 105'dir.

IR + DS kolunun ortalama fonksiyonel epitelyal hücre sayısı 110, p16 için 108, p21 için 117 ve SK için 103 olarak hesaplandı.

Tek başına IR ve IR + DS deney kolları arasında sadece 6. günde p16 için $p = 0.012$ ile anlamlıydı. (Şekil 4.6.C.)

Bu bulgulara göre, tek başına IR ve IR + DS deney kolları arasında; toplam epitelyal hücre sayıları, germinal epitelyal hücre sayıları ve fonksiyonel epitelyal hücre sayıları için anlamlı bir farklılık yoktur. IR + DS kolundaki epitelyal kalınlığının daha yüksek olmasına rağmen, p16, p21 ve SK için, tek başına IR kolunun ortalama epitelyal hücre sayıları IR + DS kolundan belirli günlerde daha yüksektir. Ancak güçlü anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.6. Fraksiyone IR +/- DS tedavisi sırasında p16, p21 ve SK epitelyal ekspresyonunda rölatif epitelyal hücre sayıları

Her dil kesitindeki hücre sayıları, toplam epitelyal tabaka, germinal epitelyal tabaka ve fonksiyonel epitelyal tabaka için p16, p21 ve SK, deney kolu başına 3 örnekte, 14 gün boyunca gün aşırı (iki günde bir) analiz edildi. Veri noktaları 3 hayvanın ortalamasını temsil eder, hata çubukları +/- 1 SEM gösterir. Gölge alanlar, 3 kontrol hayvanından gelen ortalamayı (+/- 1 SEM) göstermektedir. Fraksiyonasyon protokolü, apsinsin tepesinde belirtilmektedir.

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

5. TARTIŞMA

Oral mukozit, KT ve/veya RT ile tedavi edilen BBK hastalarında gözlenen, oral mukozanın eritemli ve ağırlı ülseratif lezyonlarının tanımıdır (89).

Çalışmaların çoğuna göre, OM yüksek doz KT alan hastaların %80'inde ve BBK için RT alan hastaların %100'ünde ve konvansiyonel KT alan hastaların yaklaşık %20-40'ında görülür (87, 89).

Oral mukozit, yutma güçlüğü (disfaji), tat alma değişikliği, kilo kaybı ve ikincil enfeksiyonlara neden olan acı verici bir komplikasyondur. Bu komplikasyonlar tedaviyi önemli ölçüde zorlaştırabilir, hastanın tedavi süresini uzatabilir ve yaşam kalitesini azaltabilir (167).

Radyasyon epitelde hasara neden olur, SK salınımı hücre ölümü veya bazal hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır. Maruz kalınan radyasyonun indüklediği doku hasarına hücresel düzeyde tamire yönelik yanıt mekanizmaları gelişir. Ancak bu mekanizmaların normal yaralanmaya karşı verilen iyileşme yanıtından daha farklı bir yol üzerinden ilerlediği düşünülmektedir (146- 148).

Tasarlanan bir fare modeli üzerinde yapılan çalışmalarda günlük fraksiyone IR sırasında DS'in, oral mukozanın radyasyon toleransını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (3).

Mukoza koruyucu özelliklerinin temeli olarak, DS'in antikoagülan aktivitesi ile, ki bu özellik vasküler yapıların daraldığı bölgelerde kanlanma desteğini arttırıp enflamasyonu azalttığı düşünülmektedir (4).

Gruber S. ve ark.'nın bir çalışmasında, radyasyona bağlı gelişen OM'de günlük fraksiyone RT'nin yapıştırıcı (adherens) ve sıkı (tight) hücresel bağlar üzerindeki kuvvetlendirici etkisini gözlemlemiştir (165). Sonuç olarak farksiyone IR'nin epitelyal hücre bağlantıları üzerindeki etkisinin anlamlı derecede üstün olduğu OM gelişim olasılığını azalttığı bulunmuştur.

Gruber S. ve ark.'nın bir başka çalışmalarında, DS'nin radyasyona bağlı gelişen OM üzerindeki iyileştirici etkisini epitelyal hücre bağlantısı, hipoksi ve enflamasyon belirteçleri üzerinden kanıtlamıştır (168). Dermatan sülfatın, hücreler arası bağlantılar üzerinde sağladığı epitelyal bütünlük ve kohezyon gelişimi, kalite hücrelerinin kaybını önlemektedir.

Hetzendorfer S.'in çalışmasında ise, DS'in radyasyona bağlı gelişen OM üzerindeki iyileştirici etkisi araştırılmış ve bu etkinin hücre proliferasyonun uyarılması üzerinden ilerlemediği ortaya konmuştur (164).

Katmanlı epiteli analiz etmek için stereolojik bir sistemin kullanılması, epitel tarafından mastikülatör (sert damak) ve astar (bukkal) mukozasından gösterilen diferansiyasyon

modellerini karakterize etmiştir. Normal insan alveoler mukozasının epitelindeki diferansiyasyon modelleri de tarif edilmiştir. Birlikte ele alındığında, epidermis, proliferasyon ve diferansiyasyonu incelemek için mükemmel bir modeldir. Bununla birlikte, epidermal diferansiyasyonu düzenleyen moleküler mekanizmalar hala büyük ölçüde bilinmemektedir (49).

Bu tez çalışmasında DS'nin radyasyona bağlı gelişen OM üzerindeki tüm bu etkilerini mümkün olduğunca geniş bir pencereden gözlemlemek için proliferasyon belirteci p16, diferansiyasyon belirteci p21 ve hücre iskeletin bütünlüğünün işareti olan SK antikorunu incelenmiştir. Dermatan sülfat tedavisinin, kullandığımız biyobelirteç-antikor özelliklerine bağlı olarak hücre düzeyinde etkileri gözlenmiştir.

Çalışmamızda proliferasyon belirteci p16 için, germinal (proliferasyon) ve fonksiyonel (diferansiyasyon) tabakadaki analizlerde her iki deney kolu karşılaştırıldığında, DS'in proliferasyonu uyardığı yönünde anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu sonuç, Hetzendorfer S.'nin çalışmasında elde edilen DS'in proliferasyon sürecini uyarmadığı bilgisini desteklemektedir (164).

Epitelyal yapısal proteinler, keratinler ve keratin ile ilişkili proteinler, diferansiyasyon belirteçleri olarak kullanışlıdır. Çünkü ekspresyonları hem bölgeye özgü hem de diferansiyasyona özgüdür (50).

Farklı çalışmalarda, p21'in hücre döngüsünün fazları üzerindeki etkisi ve hücre diferansiyasyona etkisi araştırılmış ve diferansiyasyon süreciyle etkileşimi gözlenmiştir. Bir çalışma p21'in "büyüme durgunluğunu" uyardığını (142) ve bir diğeri ise terminal diferansiyasyon sürecinde yer aldığını göstermektedir (139).

Dermatan sülfatın diferansiyasyon belirteci p21 üzerinden OM üzerindeki iyileştirici etkisi incelendiğinde, DS uygulanan kolda fonksiyonel (diferansiyasyonu temsil eden) tabaka için p21 pozitif hücre %'sinin anlamlı fark ile azaldığını gözlenmiştir.

Dermatan sülfatın etki mekanizmasını gözlemlediğimiz önceki çalışmaları göz önüne aldığımızda, DS'nin OM iyileştirici özelliğinin hücresel bağlantıları uyararak diferansiyasyon sürecini inhibe ettiği düşünülmektedir.

Bu durumda, hücresel diferansiyasyonu inhibe edilen hücreler, diferansiye olup yüzeye doğru ilerlemek için bulundukları tabakadan kaçamaz ve var olan hücre kaybı önlenir. Bu mekanizma ile IR öncesi hücre sayısı korunmaya çalışılır. Bu anlamda ele alındığında çalışmamız epitalyal diferansiyasyon sürecini inceleyen ilk çalışmadır.

Sitokeratinlerin temel işlevi, epitelyal hücelere mekanik kuvvet kazandırmaktır. Bozulmuş SK yapısı, bu hüceleri mekanik hasara karşı daha duyarlı hale getirebilir ve epitel tabakasının bütünlüğünde bir kusur yaratabilir.

Keratinler, tabakalı keratinize epitelyal hücelerin baskın sito-iskelet proteinidir ve en hassas epitelyal diferansiyasyon ve proliferasyon belirteçleridir (51, 160, 161). Ancak, daha önceki hiçbir çalışma radyasyona bağlı gelişen OM'de SK ekspresyonu üzerine odaklanmamıştır (162).

Bonan PR. ve ark.'nın çalışmalarında SK ekspresyonunun artmasının, epitelinin reaktif proliferasyonu ve RT'nin ilk evrelerinde normal oral mukozanın artan direnciyle ilişkili olabileceği gözlemlenmiştir (162). Çalışmamızda, DS uygulanan koldaki SK pozitif hücelerin yüzdesi, tek başına IR kolundan üstündü. Dermatan sülfat, hücresel düzeyde mekanik gücü desteklemektedir.

Ayrıca, deneyin her iki kolundaki pozitif hücre yüzdesi, kontrol grubundaki pozitif hücre yüzdesi normal aralığının altına düşmedi. Bu etki, önceki çalışmalarda bulunan fraksiyone RT'nin hücelar arası bağlantılar üzerindeki kuvvetlendirici pozitif etkisini destekler.

Sitokeratin antikorumun incelenmesinin bir sonucu olarak, DS uygulanan deney kolunda SK pozitif hücre yüzdesi anlamlı olarak daha yüksektir. Bunun yanısıra germinal ve fonksiyonel tabakalar arasındaki anlamlılık karşılaştırıldığında, DS'in diferansiyasyonun inhibisyonu mekanizması etkisi ile birleşerek fonsiyonel tabakada deney kolları arasındaki anlamlı fark daha büyüktür. Çalışmamız bu anlamda radyasyona bağlı gelişen OM üzerinde SK ekspresyonu inceleyen öncü çalışmalardan biridir.

Bu bulgular OM oluşumuna karşı, DS'in hücresel proliferasyonu uyarmadan, diferansiyasyonu inhibe ettiğini ve hücresel bağlantıların bütünlüğünü aktive ettiğini göstermektedir.

Kozma ve ark. normal dokular yerine, meme kanseri tümör hücre örnekleri üzerinde DS'in etkisi araştırmıştır (169). Genel olarak DS'in, diğer sülfatlı GAG'lara benzer şekilde hücre için, hem büyüme faktörü biyoyararlanım ve stabilitenin düzenleyicisi hem de büyüme faktörü yardımcı reseptörleri olarak, işlev görebileceği kabul edilmektedir.

Bu çalışma, DS'in incelenen meme kanseri hüceleri üzerinde çoğunlukla ters etkilere neden olduğunu göstermektedir. Bu hipotez, DS'in yüksek dozlarının meme kanseri proliferasyonunda bir azalmaya yol açtığının bulunmasıyla da desteklenmektedir. Bu etki, bir ligand ve hücre yüzeyi reseptörüne aynı anda bağlanma için ayrı ayrı DS zincirleri arasındaki rekabetten kaynaklanabilir.

Öte yandan, sağlam DS zincirlerinin ve bunların fragmanlarının ters aktivitesi bazı pratik (terapötik) ilişki düzeyine sahip olabilir. Bu çalışmanın sonuçları, DS'in kanser ortamındaki karmaşık rolünü açıkça göstermektedir ve GAG'ın anti-kanser potansiyelini ortaya çıkarmıştır (169).

Bir çeşit GAG olan DS'in bu çalışmada ortaya koyulan özelliklerinin yanı sıra, önceki çalışmalarda gözlenen ve bizim çalışmamızda da desteklenen, OM üzerindeki iyileştirici etki mekanizması birbirini destekleyen bir bütünlük içindedir. Ayrıca ileri araştırmalar için BBK hücre örneklerinde çalışılmasını destekleyen önemli bir sonucu vurgulamıştır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, DS'nin OM üzerindeki etkisini, proliferasyon belirteci p16, diferansiyasyon belirteci p21 ve hücresel iskeletin bütünlüğünün işareti olan SK antikoru üzerinden araştırdık.

Dermatan sülfatın, yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi proliferasyonu uyarmadan (165), hücreler arası bağlatıları uyarak diferansiyasyonu inhibe ettiğini ve hücresel düzeyde mekanik dayanıklılığı desteklediğini, ve epitelyal tabakanın bütünlüğünü yarattığını, gözlemledik. Çalışmamız bu anlamda radyasyona bağlı gelişen OM üzerinde SK ekspresyonu epitalyal diferansiyasyon sürecini inceleyen öncü çalışmalardan biridir.

Dermatan sülfatın bu etkileri göz önüne alındığında, var olan hücrelerin korunmasını takiben OM oluşumu gecikebilir ve / veya OM'in kalış süresi ya da şiddeti azalabilir. Ve bu çalışma, DS'in OM üzerindeki iyileştirici etkisinin kanıtını desteklemektedir.

Daha fazla araştırma için, DS'in normal mukozal doku ve meme kanseri üzerindeki ümit verici mekanizmasına bakarak, BBK tümör hücreleri üzerindeki etkisini proliferasyon ve diferansiyasyon belirteçleri üzerinden incelemek olasıdır.

Çalışmamız bu açıdan değerlendirildiğinde, normal mukozal doku hayvan modeli üzerindeki çalışmaları ile tutarlıydı, ve ileri çalışmalar için ümit verici sonuçlar ortaya koydu.

7. KAYNAKLAR

1. Sonis ST. Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2013; 33: 236-40.
2. Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Robles-García M, et al. Cancer treatment-induced oral mucositis: a critical review. Int J Oral Maxillofac Surg. 2012; 41(2): 225-38.
3. Dörr W. et al. Untersuchung zur Strahlenreaktion des unbehandelten und stimulierten Zungenepithels der Maus, Diss. med. vet. 1987.
4. Trowbridge JM, Gallo RL. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. Glycobiology. 2002; 12: 117-25.
5. Penc SF, Pomahac B, Winkler T et al. All dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. J Biol Chem. 1998; 273, 28116-21.
6. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61: 69-90.
7. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015; 65: 87-108.
8. Başak K, Sağlam Y, Yıldız AG, et al. Profile of head and neck cancers in Dr. Lütfi Kırdar Kartal educational and research hospital. Turk Patoloji Derg. 2015, 31: 119-25.
9. Petruzzelli GJ. Transoral laser microsurgery: applications in head and neck oncology. Expert Rev Med Devices. 2009; 6: 599-602.
10. Ringash J, Bernstein LJ, Devins G, et al. Head and neck cancer survivorship: learning the needs, meeting the needs. Semin Radiat Oncol. 2018; 28(1): 64-74.
11. Economopoulou P, Bourhis J, Psyrri A. Research progress in head and neck squamous cell carcinoma: best abstracts of ICHNO 2015. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2015: 323-28.
12. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, et al. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. Oral Dis. 2000; 6(2): 65-74.
13. <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#q1> 24.02.2019
14. Alicikus ZA, Akman F, Ataman OU, et al. Importance of patient, tumour and treatment related factors on quality of life in head and neck cancer patients after definitive treatment. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2009; 266(9):1461- 68.

15. Strong E. Surgical management of oral cancer. *Dent Clin North Am.* 1990; 34(2): 185-203.
16. Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *The oncologist.* 2010; 15(9): 994–1001.
17. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015; 24(3): 491-508.
18. Grégoire V, Langendijk JA, Nuyts S. Advances in radiotherapy for head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(29): 3277-84.
19. Brouwer CL, Steenbakkers RJ, Bourhis J, et al. CT-based delineation of organs at risk in the head and neck region: DAHANCA, EORTC, GORTEC, HKNPCSG, NCIC CTG, NCRI, NRG oncology and TROG consensus guidelines. *Radiother Oncol.* 2015; 117(1): 83-90.
20. Can G, Kanser, In: Eti Aslan F, Olgun N, editors. *Fizyopatoloji*, 1st ed. Ankara, Akademisyen Tıp Kitapevi, 2017, p. 47-48.
21. Busch CJ, Tribius S, Schafhausen P, et al. The current role of systemic chemotherapy in the primary treatment of head and neck cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015; 41: 217-21.
22. Lau H, Brar S, Hao D, et al. Concomitant low-dose cisplatin and three-dimensional conformal radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Analysis of survival and toxicity. *Head Neck.* 2006; 28: 189-96.
23. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 307-20.
24. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, et al. Group M-NC. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol.* 2009; 92 (1): 4-14.
25. Blanchard P, Baujat B, Holostenco V, et al. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiother Oncol.* 2011; 100(1): 33-40.
26. Jeremic B, Milicic B, Dagovic A, et al. Radiation therapy with or without concurrent low-dose daily chemotherapy in locally advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2004; 22(17): 3540-48.
27. Bensadoun RJ, Benezery K, Dassonville O, et al. French multicenter phase III randomized study testing concurrent twice-a-day radiotherapy and cisplatin/5-fluorouracil chemotherapy (BiRCF) in unresectable pharyngeal carcinoma: Results at 2 years (FNCLCC-GORTEC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 64(4): 983-94.

28. Budach V, Stromberger C, Poettgen C, et al. Hyperfractionated accelerated radiation therapy (HART) of 70.6 Gy with concurrent 5-FU/Mitomycin C is superior to HART of 77.6 Gy alone in locally advanced head and neck cancer: long-term results of the ARO 95-06 randomized phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015; 91(5): 916-24.
29. Qin R, Steel A, Fazel N. Oral mucosa biology and salivary biomarkers. *Clin Dermatol.* 2017; 35(5): 477-83.
30. Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001; 29: 7-15.
31. Barrett AW, Selvarajah S, Franey S, et al. Interspecies variations in oral epithelial cytokeratin expression. *J Anat.* 1998; 193: 185-93.
32. Collins LM, Dawes C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res.* 1987; 66(8): 1300-02.
33. Ray C, Henrikson JEM. Oral Cavity. In: Ross MH, Pawlina W. editors *Histology*. Lippincott Williams and Wilkins; 1997. p. 245-54.
34. Gruber S, Dörr W. Tissue reactions to ionizing radiation-Oral mucosa. *Mutat Res.* 2016; 770: 292-98.
35. Dörr W, Pathogenesis of normal tissue side effects, In: M. Joiner, A. Van der Kogel editors, *Basic Clinical Radiobiology*, 4th edition, London, Hodder Arnold, 2009, p. 169–90.
36. Dörr W, Hamilton CS, Boyd T, et al. Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 52: 911–17.
37. Dörr W, Jacubek A, Kummermehr J, et al. Effects of stimulated repopulation on oral mucositis during conventional radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1995; 37(2): 100–107.
38. <https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/oral+mucosa> 21.04.2019
39. Hume WJ, Potten CS. Proliferative units in stratified squamous epithelium. *Clin Exp Dermatol.* 1983; 8(1): 95-106.
40. Murase N, Fukui S, Mori M. Heterogeneity of keratin distribution in the oral mucosa and skin of mammals as determined using monoclonal antibodies. *Histochemistry.* 1986; 85(4): 265-76.
41. Hume WJ, Moore JK. Sheet preparations of the stratum granulosum from mammalian skin and oral epithelium. *J Anat.* 1985; 140: 669-78.

42. Schroeder HE, Amstad-Jossi M. Type and variability of the stratum corneum in normal and diseased human oral stratified epithelia. *J Biol Buccale*. 1984; 12(2): 101-16.
43. Gruber S. Epithelial cell signaling in radiation-induced oral mucositis as a basis for biological targeting - preclinical studies. Vienna, Med Uni Vienna, PhD Thesis, 2016.
44. Leblond CP, Walker BE. Renewal of cell populations. *Physiol Rev*. 1956; 36(2): 255-76.
45. Warnakulasuriya KA, MacDonald DG. Diurnal variation in labelling index in human buccal epithelium. *Arch Oral Biol*. 1993; 38(12): 1107-11.
46. Bjarnason GA, Jordan RC, Sothorn RB. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. *Am J Pathol*. 1999; 154(2): 613-22.
47. Dörr W, Kummermehr J. Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal conditions and following single dose irradiation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1991; 60(5): 287-94.
48. Dörr W, Arui J, Beisker W, et al. Cell kinetic studies in mouse tongue mucosa by autoradiographic, immunohistochemical and flow cytometric techniques. *Cell Prolif*. 1994; 27(6): 321-32.
49. Ruiz S, Segrelles C, Bravo A, et al. Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development*. 2003;130(11): 2341-53.
50. Dale BA, Salonen J, Jones AH. New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1990; 1(3): 167-90.
51. Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(4): 383-408.
52. Byrne C. Regulation of gene expression in developing epidermal epithelia. *Bioessays*. 1997; 19(8): 691-98.
53. Byrne C, Tainsky M, Fuchs E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 1994; 120(9): 2369-83.
54. Fuchs E. Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. *Harvey Lect*. 1998; 94: 47-77.
55. Fuchs E, Byrne C. The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4: 725-36.

56. Itoiz ME, Conti CJ, Lanfranchi HE, et al. Immunohistochemical detection of filaggrin in preneoplastic and neoplastic lesions of the human oral mucosa. *Am J Pathol.* 1985; 119(3): 456-61.
57. Smith SA, Dale BA. Immunologic localization of filaggrin in human oral epithelia and correlation with keratinisation. *J Invest Dermatol.* 1986; 86(2): 168-72.
58. Vigneswaran N, Peters KP, Hornstein OP, et al. Comparison of cytokeratin, filaggrin and involucrin profiles in oral leukoplakias and carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18(7): 377-90.
59. Reibel J, Clausen H, Dale BA, et al. Immunohistochemical analysis of stratum corneum components in oral squamous epithelia. *Differentiation.* 1989; 41(3): 237-44.
60. Hohl D, Roop D. Loricrin. In: Darmon M, Blumenberg M, editors. *Molecular biology of the skin: The keratinocyte.* San Diego: Academic Press; 1993. p. 151-79.
61. Classon M, Dyson N. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* 2001; 264(1): 135-47.
62. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene.* 1999; 18(55), 7873-82.
63. Larjava H. Expression of beta 1 integrins in normal human keratinocytes. *Am J Med Sci.* 1991; 301(1): 63-68.
64. Sedivy JM. Can ends justify the means? Telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(16): 9078-81.
65. Meyer J, Gerson SJ. A comparison of human palatal and buccal mucosa. *Periodontics.* 1964; 2: 284-91.
66. Squier CA, Johnson NW, Hackemann M. Structure and function of normal human oral mucosa. In: Dolby AE, editors. *Oral mucosa in health and disease*, Oxford: Blackwell Scient. Publ.; 1976. p. 1-112.
67. Landay MA, Schroeder HE. Quantitative electron microscopic analysis of the stratified epithelium of normal human buccal mucosa. *Cell Tiss. Res.* 1977; 177(3): 383-405.
68. Bernimoulin JP, Schroeder HE. Changes in the differentiation pattern of oral mucosal epithelium following heterotopic connective tissue transplantation in man. *Pathol Res Pract.* 1980; 166(2-3): 290-312.
69. Schroeder HE, Münzel-Pedrazzoli S. Application of stereologic methods to stratified gingival epithelia. *J Microscopy.* 1970; 92(3): 179-98.

70. Hammer B, Schroeder HE. Stereologic system and on/off-line computer program for analysing oral epithelia, based on a model of stratification. *Arch Oral BioI*. 1977; 22(5): 337-41.
71. Schroeder HE. Mucous membranes: Stereology applied to layered structures. In: Weibel ER, editor. *Stereologic Principles for Biomorphometry*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1979. p. 289-96.
72. Meyer M, Schroeder HE. A quantitative electron microscopic analysis of the keratinizing epithelium of normal human hard palate. *Cell Tiss Res*. 1975; 158(2): 177-203.
73. Bernimoulin JP, Schroeder HE. Quantitative electron microscopic analysis of the epithelium of normal human alveolar mucosa. *Cell Tissue Res*. 1977; 180(3): 383-401.
74. http://metinaytekin.com/dersler/Hucre_Dongusu_Y_Lisans_Hazirlik.pdf/ 08.05.19
75. <https://veteriankey.com/radiation-therapy-4/> 08.05.2019
76. Cheng KK, Chang AM, Yuen MP. Prevention of oral mucositis in paediatric patients treated with chemotherapy; a randomised crossover trial comparing two protocols of oral care. *Eur J Cancer*. 2004; 40(8): 1208-16.
77. Figliolia SL, Oliveira DT, Pereira MC, et al. Oral mucositis in acute lymphoblastic leukaemia: analysis of 169 paediatric patients. *Oral Dis*. 2008; 14(8): 761-66.
78. Jones JA, Avritscher EB, Cooksley CD, et al. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. *Support Care Cancer*. 2006; 14(6): 505-15.
79. Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, et al. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer*. 2006; 106(2): 329-36.
80. Vera-Llonch M, Oster G, Ford CM, et al. Oral mucositis and outcomes of autologous hematopoietic stem-cell transplantation following high-dose melphalan conditioning for multiple myeloma. *J Support Oncol*. 2007; 5(5): 231-35.
81. Sonis S, Clark J. Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. *Oncology (Williston Park)*. 1991; 5(12): 11-8; discussion 18-22.
82. Dörr W. Time factors in normal tissue responses to irradiation. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. *Basic clinical radiobiology*. forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold, 2009; p. 149–57.

83. Dörr W, Schmidt M. Normal tissue radiobiology. In: Brahme A, Hendry JH, editors. Comprehensive biomedical physics. Seventh edition. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 75–95.
84. Dörr W. Radiobiology of tissue reactions. *Ann ICRP*. 2015; 44(1 Suppl): 58-68.
85. Agbaje JO, Jacobs R, Michiels K, et al. Bone healing after dental extractions in irradiated patients: a pilot study on a novel technique for volume assessment of healing tooth sockets. *Clin Oral Investig*. 2009; 13(3): 257-61.
86. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(4): 277–84.
87. Kashiwazaki H, Matsushita T, Sugita J, et al. Professional oral health care reduces oral mucositis and febrile neutropenia in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Support Care Cancer*. 2012; 20(2): 367–73.
88. Wang L, Gu Z, Zhai R, et al. Efficacy of oral cryotherapy on oral mucositis prevention in patients with hematological malignancies undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0128763.
89. Lalla RV, Bowen J, Barasch A, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014; 120(10): 1453-61.
90. Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;23(2):457-67.
91. Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol*. 1995; 35(2): 83-90.
92. Yarnold J, Brotons MC. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol*. 2010; 97(1): 149-61.
93. Bentzen MS. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(9): 702-13.
94. Fajardo LF, Berthrong M, Anderson RE. Radiation pathology. New York: Oxford University Press; 2001.
95. Dörr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol*. 2001; 61(3): 223–31.
96. Steel GG. Basic clinical radiobiology for radiation oncologists. London: Edward Arnold Publications; 1993.
97. Withers HR. The four Rs of radiotherapy. In: Lett JT, Adler H, editors. Advances in radiation biology. fifth edition. New York: Academic Press; 1975. p. 241-71.

98. Dörr W, Van der Kogel AJ. The volume effect in radiotherapy. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. Basic clinical radiobiology. forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold; 2009. p. 191-206.
99. Dörr W, Stewart FA. Retreatment tolerance of normal tissues. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. Basic clinical radiobiology. forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold; 2009. p. 259-70.
100. Dörr W. Biological response modifiers: normal tissues. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. Basic clinical radiobiology. forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold; 2009. p. 301-15.
101. Bentzen SM, Joiner MC. The linear-quadratic approach in clinical practice. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. Basic clinical radiobiology. forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold; 2009. p. 120-34.
102. Joiner MC, Bentzen SM. Fractionation: the linear-quadratic approach. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. Basic clinical radiobiology. Forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold; 2009. p. 102–19.
103. Zips D. Tumor growth and response to to radiation. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. Basic clinical radiobiology. Forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold; 2009. p. 78- 101.
104. Dörr W. Three A's of repopulation during fractionated irradiation in squamous epithelia: asymmetry loss, acceleration of stem-cell divisions and abortive divisions. Int J Radiat Biol. 1997; 72: 635-43.
105. Dörr W. Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results. Int J Radiat Biol. 2003; 79: 531-37.
106. Dörr W, Emmendorfer H, Weber-Frisch M. Tissue kinetics in mouse tongue mucosa during daily fractionated radiotherapy. Cell Prolif. 1996; 29: 495-504.
107. Dörr W, Kummermehr J. Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiations or following single doses. Radiother Oncol. 1990; 17: 249-59.
108. Dörr W, Emmendorfer H, Haide E, et al. Proliferation equivalent of 'accelerated repopulation' in mouse oral mucosa. Int J Radiat Biol. 1994; 66: 157-67.
109. Schwarz G. Ueber desensibilisierung gegen röntgen und radium strahlen. Muenchner Medizinische Wochenschrift. 1909; 24: 1-2.
110. Holthusen H. Beiträge zur Biologie der Strahlenwirkung. Pflüger's Arch Ges Physiol. 1921;.187:.1-24.

111. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*. 1955; 9: 539-49.
112. Hockel M, Schlenger K, Aral B, et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*. 1996; 56(19): 4509-15.
113. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, et al. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*. 1996; 56(5): 941-43.
114. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, et al. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997; 38(2): 285-89.
115. Fyles A, Milosevic M, Hedley D, et al. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol*. 2002; 20(3): 680-87.
116. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol*. 2005; 77(1): 18–24.
117. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(12): 967-75.
118. Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(3): 180-92.
119. Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells*. 2010; 28(4): 639-48.
120. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007; 110(8): 3056-63.
121. Novakova-Jiresova A, van Luijk P, van Goor H, et al. Changes in expression of injury after irradiation of increasing volumes in rat lung. *Int J Radiat Oncol Biol Physics*. 2007; 67: 1510-18.
122. Fletcher GH, MacComb WS, Shalek RJ. Radiation therapy in the management of cancer of the oral cavity and oropharynx. In: *Advances in radiation therapy*. Springfield; 1962.
123. Goepp R, Fitch F. Pathological study of oral radiation death in mice. *Radiat Res*. 1962; 16: 833-45.

124. Parkins CS, Fowler JF, Yu S. A murine model of lip epidermal/mucosal reactions to X-irradiation. *Radiother Oncol.* 1983; 1: 159-65.
125. Moses R, Kummermehr J. Radiation response of the mouse tongue epithelium. *Br J Cancer Suppl.* 1986; 7: 12-15.
126. Plichta JK, Radek KA. Sugar-coating wound repair: a review of FGF-10 and dermatan sulfate in wound healing and their potential application in burn wounds. *J Burn Care Res.* 2012; 33: 299-310.
127. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006; 20(1): 9-22.
128. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10: 116–29.
129. Belleudi F, Leone L, Nobili V, et al. Keratinocyte growth factor receptor ligands target the receptor to different intracellular pathways. *Traffic.* 2007; 8: 1854-72.
130. LaRochelle WJ, Sakaguchi K, Atabey N, et al. Heparan sulfate proteoglycan modulates keratinocyte growth factor signaling through interaction with both ligand and receptor. *Biochemistry.* 1999; 38(6): 1765–71.
131. Kwan C. P. Venkataraman G, Shriver Z, et al. Probing fibroblast growth factor dimerization and role of heparinlike glycosaminoglycans in modulating dimerization and signaling. *J Biol.Chem.* 2001; 276(26): 23421-29.
132. Kakei Y, Akashi M, Komatsubara H, et al. p16 overexpression in malignant and premalignant lesions of the oral and esophageal mucosa following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Head Neck Oncol.* 2012; 4: 38.
133. Knudsen ES, Knudsen KE. Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle. *Exp Biol Med.* 2006; 231: 1271-81.
134. Muirhead DM, Hoffman HT, Robinson RA. Correlation of clinicopathological features with immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins p16 and retinoblastoma: distinct association with keratinisation and differentiation in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 2006; 59: 711-15.
135. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1378: F115-77.

136. Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol*. 2003; 39: 213-21.
137. Yuen PW, Man M, Lam KY, et al. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*. 2002; 55: 58-60.
138. Sen M, Akeno N, Reece A, et al. p16 controls epithelial cell growth and suppresses carcinogenesis through mechanisms that do not require RB1 function. *Oncogenesis*. 2017; 6(4): e320.
139. Kanavaros P, Stefanaki K, Rontogianni D, et al. Immunohistochemical expression of p53, p21 /waf1, Rb, p16, cyclin 01, p27, Ki67, c.yclin A, cyclin 81, bcl2, bax and bak proteins and apoptotic index in normal thymus. *Histol Histopathol*. 2001; 16(4): 1005-12.
140. Safadi RA, Al Jaber SZ, Hammad HM, et al. Oral lichen planus shows higher expressions of tumor suppressor gene products of p53 and p21 compared to oral mucositis. An immunohistochemical study. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(6): 454-61.
141. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, et al. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 94(5): 593-600.
142. Wang Y, Yuan Z, You C, et al. Overexpression p21WAF1/CIP1 in suppressing retinal pigment epithelial cells and progression of proliferative vitreoretinopathy via inhibition CDK2 and cyclin E. *BMC Ophthalmol*. 2014; 14: 144.
143. Ay ME, Terzioğlu O, Terzi C, et al. Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*. 2006; 5(1): 20-25.
144. Calenic B, Greabu M, Caruntu C, et al. Oral keratinocyte stem/progenitor cells: specific markers, molecular signaling pathways and potential uses. *Periodontol* 2000. 2015; 69(1): 68-82.
145. Chougule P, Sumitran-Holgersson S. Cytokeratins of the liver and intestine epithelial cells during development and diseases. In: Hamilton G, editor. *Cytokeratins - tools in oncology*. 1st edition. Croatia: Intech; 2012. p.15-32.
146. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol*. 1998; 34(1): 39-43.

147. Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. *Oncologist*. 1998; 3: 446-51.
148. Scully C, Epstein JB. Oral health care for the cancer patient. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996; 32B: 281-92.
149. Dörr W, Hamilton CS, Boyd T, et al. Radiation induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001; 52: 911-17.
150. Morgan PR, Shirlaw PJ, Johnson NW, et al. Potential applications on antikeratin antibodies in oral diagnosis. *J Oral Pathol*. 1987; 16: 212-22.
151. Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, et al. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Moll Cell Biol*. 1999; 19: 3086-94.
152. Coulombe PA, Tong X, Mazzalupo S, et al. Great promises yet to be fulfilled: Defining keratin intermediate filament function in vivo. *Eur J Cell Biol*. 2004; 83(11): 735-46.
153. Zhou Q, Cadrin M, Herrmann H, et al. Keratin 20 serine 13 phosphorylation is a stress and intestinal goblet cell marker. *J Biol Chem*. 2006; 281(24): 16453-61.
154. Kim S, Coulombe PA. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev*. 2007; 21(13): 1581-97.
155. Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem*. 1997; 272(52): 33197-203.
156. Oshima RG. Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ*. 2002; 9(5): 486-92.
157. Owens DW, Lane EB. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays*. 2003; 25(8): 748-58.
158. Lee JC, Schickling O, Stegh AH, et al. DEDD regulates degradation of intermediate filaments during apoptosis. *J Cell Biol*. 2002; 158(6): 1051-66.
159. Dinsdale D, Lee JC, Dewson G, et al. Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis. *Am J Pathol*. 2004; 164(2): 395-407.
160. Kirfel J, Magin TM, Reichelt J. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(1): 56-71.
161. Gibbs S, Ponec M. Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis, hard palate and buccal mucosa. *Arch Oral Biol*. 2000; 45: 149-58.

162. Bonan PR, Kaminagakura E, Pires FR, et al. Cytokeratin expression in initial oral mucositis of head and neck irradiated patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101(2): 205-11.
163. Gruber S, Schmidt M, Bozsaky E, et al. Modulation of radiation-induced oral mucositis by pentoxifylline: Preclinical studies. *Strahlenther Onkol.* 2015; 191(3): 242-47.
164. Hetzendorfer S. Impact of Dermatan Sulfate on the Proliferative Activity of the Oral Epithelium in Mice. Vienna, Uni Vienna, Bachelor of Science thesis, 2015.
165. Gruber S, Cini N, Kowald LM, et al. Upregulated epithelial junction expression represents a novel parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation in oral mucosa. *Strahlenther Onkol.* 2018; 194(8): 771-79.
166. Gruber S, Bozsaky E, Roitinger E, et al. Early inflammatory changes in radiation-induced oral mucositis effect of pentoxifylline in a mouse model. *Strahlenther Onkol.* 2017; 193: 499–507.
167. Erdem O, Güngörmüş Z. The effect of royal jelly on oral mucositis in patients undergoing radiotherapy and chemotherapy. *Holist Nurs Pract.* 2014; 28(4): 242-46.
168. Gruber S, Arnold M, Cini N, et al. Radioprotective effects of dermatan sulfate in a preclinical model of oral mucositis – targeting inflammation, hypoxia and junction proteins without stimulating proliferation. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6). pii: E1684.
169. Koźma EM, Wisowski G, Latocha M, et al. Complex influence of dermatan sulphate on breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014; 239(12): 1575-88.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayları

8.1.1. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Onayı (EK1)

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ	
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	
YÖNETİM KURULU KARARLARI	
TOPLANTI SAYISI: 15	TOPLANTI GÜNÜ:
Salı	
TOPLANTI TARİHİ: 28.03.2017	TOPLANTI SAATİ:
11:30	
KARAR 05/ Enstitümüz Medikal Fizik Anabilim Dalı Başkanlığının 24.03.2017 tarih ve 08 sayılı yazısı okundu. Medikal Fizik Anabilim Dalı Medikal Fizik Doktora Programı öğrencisi Nilsu ÇİNi'nin, Tez Danışmanı Doç.Dr.L.Zümre ARICAN ALICIKUŞ tarafından önerilen ve Etik Kurul Onayı alınan Tez konusunun aşağıdaki şekilde kabulüne oy birliği ile karar verildi.	
<u>Tez Konusu:</u> "Farelerde Radyasona Bağlı Gelişen Oral Mukozitin Dermatan Sülfat ile Modülasyonu: Diferansiyasyon Süreçlerine Etkileri"	
<u>Not 1</u> : Teze DEU.HSI.PhD-2013970200 kodu verilmiştir. Tezin iç ve dış kapaklarında yer alması gereklidir.	
<u>Not 2</u> : Tez önerisi Enstitü Yönetim Kurulu tarafından onaylanan öğrencilerin Enstitümüz Web sayfasında yer alan Tez Veri Giriş Formunu doldurarak Enstitümüze teslim etmesi gerekmektedir.	

8.1.2. Avusturya Hükümeti Federal Bilim ve Araştırma Bakanlığı Almanca ve Türkçe Etik Kurul Onayları

B.M.W.F^a
Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung

Herrn
Prof.Dr. Wolfgang Dörr
p.A. Universitätsklinik für Strahlentherapie & CDL
für Medizinische Strahlenforschung
Medizinische Universität Wien
Währinger Gürtel 18-20
1090 Wien

mit dem Ersuchen um Kenntnisnahme und Information.

Beilage

Wien, 4. Februar 2014
Für den Bundesminister:
Dr. Alois Haslinger

Elektronisch gefertigt

Signaturwert	md7ChNWGellPkykkEgnwHgy90jFdaFra7ZEMwJoraKy2M33hE/XSBw62CLP7vCdWc+bpZIRPnngedCHHKiyUX0B6yExcB9agLuEw9IMShnaBaJfRfTJKntIhBVWoreUe5R5CYOQ7Wn7Zv+vZSEVgG91aEXPLU3B69pX0qY4=	
	Unterzeichner	Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung
	Datum/Zeit-UTC	2014-02-04T12:04:41+01:00
	Ausstellen-Zertifikat	CN=a-sign-corporate-light-02.OU=a-sign-corporate-light-02.O=A-Trust Ges. f. Sicherheitssysteme im elektr. Datenverkehr GmbH,C=AT
	Serien-Nr.	535233
	Methoden	urn:pdfsigfilterbka.gv.at:binerv1.1.0
Hinweis	Dieses Dokument wurde amtssigniert.	
Prüfinformation	Informationen zur Prüfung der elektronischen Signatur finden Sie unter: http://www.signaturprüfung.gv.at Informationen zur Prüfung des Ausdrucks finden Sie unter: http://www.bmwf.gv.at/verifizierung .	

Geschäftszahl: BMWF-66.009/0039-11/3b/2014
Sachbearbeiter/in: Dr. Alois Haslinger
Abteilung: II/3b
E-Mail: alois.haslinger@bmwf.gv.at
Telefon/Fax: (+43) 01/53120-7114 / 53120-997114
Ihr Zeichen:

Antwortschreiben bitte unter Anführung der Geschäftszahl.

Minoritenplatz 5, 1014 Wien
www.bmwf.gv.at

DVR 0084301

Medizinische Universität Wien
Büro des Rektors
Spitalgasse 23
1090 Wien

Universitätsklinik für Strahlentherapie & CDL für
Medizinische Strahlenforschung,
Genehmigung eines Projekts gemäß
Tierversuchsgesetz 2012, BGBl. I Nr. 114/2012

BESCHEID

Das Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung hat über Ihren mit Zl. 341/115-97/98 aus 2013/14 vom 21. November 2013 übermittelten Antrag gemäß Tierversuchsgesetz 2012, BGBl. I Nr. 114/2012 (TVG 2012), wie folgt entschieden:

SPRUCH

1. Antragsgemäß wird der Medizinischen Universität Wien die Genehmigung gemäß § 26 TVG 2012 zu dem in der Beilage umschriebenen Projekt

„Modifikation der radiogenen Mucositis enoralis (Maus) durch systemische Gabe von Heparin oder Dermatansulfat; Kurztitel: Mukositis / Heparin“

- und gemäß § 26 Abs. 7 TVG 2012 bis 31. Dezember 2017 befristet - erteilt.

Die Beilage stellt somit einen integrierten Bestandteil dieser Genehmigung dar.

Die Tierversuche in diesem Projekt sind Schweregraden bis zu und einschließlich Schweregrad „mittel“ zugeordnet, eine rückblickende Bewertung ist nicht erforderlich.

2. Dem Projektleiter Prof.Dr. Wolfgang Dörr wird die Genehmigung gemäß § 27 TVG 2012 - beschränkt auf die Durchführung des in Ziffer 1 genannten Projekts - erteilt. Der Projektleiter hat das Projekt nur im Einklang mit der Genehmigung durchzuführen und dafür Sorge zu tragen, dass bei einer Nichteinhaltung geeignete Abhilfemaßnahmen ergriffen und aufgezeichnet werden, er hat weiters Tierversuche zu beenden, wenn unnötige Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden bei einem Tier im Laufe eines Tierversuchs verursacht werden.

Geschäftszahl: BMWF-66.009/0039-11/3b/2014
Sachbearbeiter/in: Dr. Alois Haslinger
Abteilung: II/3b
E-Mail: alois.haslinger@bmwf.gv.at
Telefon/Fax: (+43) 01/53120-7114 / 53120-997114
Ihr Zeichen:

Antwortschreiben bitte unter Anführung der Geschäftszahl.

Minoritenplatz 5, 1014 Wien
www.bmwf.gv.at

DVR 0084301

3. Der Medizinischen Universität Wien wird die Genehmigung als Verwender gemäß § 16 TVG 2012 - beschränkt auf die Durchführung des in Ziffer 1 genannten Projekts - erteilt. Der Verwender hat Aufzeichnungen gemäß § 22 TVG 2012 zu führen und aufzubewahren. Zur statistischen Erfassung der in Tierversuchen verwendeten Tiere sind die Daten gemäß § 22 Abs. 3 TVG 2012 bis zum 1. März eines jeden Jahres dem Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung bekannt zu geben.
4. Zur Überwachung der Einhaltung des Tierversuchsgesetzes 2012 werden vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung betraute Kontrollorgane gemäß § 32 TVG 2012 angesagt oder unangesagt die Verwendereinrichtung kontrollieren. Den Kontrollorganen ist Zutritt zur Verwendereinrichtung sowie Zugang zu allen Informationen, die für die Einhaltung des Tierversuchsgesetzes 2012 relevant sein könnten, zu gewähren. Die Kontrollorgane sind mit einem Ausweis des Bundesministeriums für Wissenschaft und Forschung ausgestattet.

BEGRÜNDUNG

Die Medizinische Universität Wien hat mit Zl. 341/115-97/98 aus 2013/14 vom 21. November 2013 einen Antrag auf Genehmigung eines Projekts gemäß § 26 TVG 2012 eingebracht.

Als Ergebnis der Projektbeurteilung gemäß § 29 TVG 2012 wurde festgestellt:

1. Das Projekt ist aus wissenschaftlicher Sicht gerechtfertigt,
2. die Zwecke des Projekts rechtfertigen die Verwendung von Tieren,
3. das Projekt ist so gestaltet, dass die Tierversuche auf möglichst schmerzlose und umweltverträgliche Weise durchgeführt werden.

Da die erforderlichen Genehmigungsvoraussetzungen gegeben sind, war spruchgemäß zu entscheiden.

RECHTSMITTELBELEHRUNG

Gegen diesen Bescheid ist ein ordentliches Rechtsmittel nicht zulässig.

HINWEIS

Gegen diesen Bescheid kann binnen vier Wochen ab Zustellung Beschwerde an das Bundesverwaltungsgericht erhoben werden.

Gegen diesen Bescheid kann binnen sechs Wochen ab Zustellung Beschwerde an den Verfassungsgerichtshof erhoben werden. Diese muss von einem Rechtsanwalt unterschrieben sein. Für eine derartige Beschwerde ist eine Eingabengebühr von 240 Euro zu entrichten.

Beilage

Diese Genehmigung ergeht in Abschrift an:

1. Prof.Dr. Wolfgang Dörr, p.A. Universitätsklinik für Strahlentherapie & CDL für Medizinische Strahlenforschung
2. Kommission für Tierversuchsangelegenheiten

Wien, 4. Februar 2014

Für den Bundesminister:

Dr. Alois Haslinger

Elektronisch gefertigt

Signaturwert	g7WxyuKfHnGhMMLFJ1mVwagcRb5cUjncEvVFcRPH1Hd96dYanm3hVig5BT33Ea9uwQc8ApDZqJMpG+bFF8njRDGmV3SsBpviSDNEKDBmPBVw7JAUWwTqhwPisOYLeHGsAkQoZT9yHPEjxR+vVLQTr0OHBRISp1c=	
	Unterzeichner	Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung
	Datum/Zeit-UTC	2014-02-04T12:02:57+01:00
	Aussteller-Zertifikat	CN=a-sign-corporate-light-02,OU=a-sign-corporate-light-02,OA=Trust Ges. f. Sicherheitssysteme im elektr. Datenverkehr GmbH,LC=AT
	Serien-Nr.	635233
	Methode	urn:pdfsigfilter:tkk.gv.at:binacrv1.1.0
Hinweis	Dieses Dokument wurde elektronisch signiert.	
Prüfinformation	Informationen zur Prüfung der elektronischen Signatur finden Sie unter: http://www.signatutpruefung.gv.at . Informationen zur Prüfung des Ausdrucks finden Sie unter: http://www.bmwf.gv.at/verifizierung .	

**Ethik-Kommission der MUW zur Beratung und Begutachtung von
Forschungsprojekten am Tier**

**Antrag auf Bewilligung eines Tierversuchs
gem. Tierversuchsgesetz 1988, BGBl. 501/1989**

- 1.) **Institut/Klinik:** Univ.-Klinik für Strahlentherapie & CD Labor für Medizinische
..... Strahlenforschung für die Radioonkologie
- 2.) **Verantwortlicher Leiter des Tierversuchs:**
..... Prof. Dr. med. vet. et rer. medic. habil. Wolfgang Dörr.....
- 3.) **Kurztitel des Tierversuchs:**
..... Mukositis / Heparin.....
- 4.) **Kurzfassung des Tierversuchs:**

Das vorliegende Versuchsvorhaben soll klären, in welchem Umfang bei der Strahlentherapie von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich eine Gabe von Heparin oder Dermatan-Sulfat die klinische Ausprägung von frühen Nebenwirkungen an der Mundschleimhaut vermindern kann. Dies würde die Belastung der Patienten vermindern und die Heilungsaussichten durch Vermeidung von Behandlungsunterbrechungen signifikant verbessern.

Die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist eine der wichtigsten frühen Nebenwirkungen der Radio(chemo)therapie im Kopf-Hals-Bereich. Sie beeinträchtigt massiv die Lebensqualität der Patienten und erzwingt wegen der Schmerzhaftigkeit und der damit verbundenen Behinderung der Kommunikation und der Nahrungsaufnahme häufig eine Unterbrechung der Behandlung. Hierdurch vermindern sich die Heilungschancen drastisch. Die sozioökonomischen Konsequenzen der Nebenwirkungen der Therapie sind äußerst relevant.

Alle Experimente sollen am etablierten Modell der Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus durchgeführt werden. Die kliniknahe fraktionierte Bestrahlung erfolgt perkutan, wodurch nur subklinische Schäden induziert werden. Die manifeste Strahlenreaktion wird durch eine lokale Bestrahlung eines Testfeldes auf der Zungenunterseite ausgelöst, wobei die Höhe der dazu nötigen Dosis von der Vorschädigung abhängig ist. Die Dauer der klinischen Reaktion liegt im Bereich weniger Tage. Begleitende histologische/immunhistochemische Untersuchungen sind vorgesehen.

Insgesamt werden 1615 Mäuse (Inzuchtstamm C3H/Neu, Abt. Biomed. Forschung) beantragt.

Der Schweregrad der Belastung der Tiere wird in der Gesamtschau aller Maßnahmen und induzierten Veränderungen als gering bis maximal mäßig (beim Vorliegen einer positiven Strahlenreaktion, dann ca. 3 Tage) angenommen.

Stellungnahme

Sitzung vom: 13. November 2013

Der Antrag entspricht in Aufbau und Methodik der wissenschaftlichen Fragestellung und wurde entsprechend den Empfehlungen der Ethik-Kommission überarbeitet.

Die Belastung ist als bis zu mittelgradig einzustufen, wird jedoch durch klare Abbruchkriterien minimiert.

Die Versuche werden gemäß den Richtlinien der Medizinischen Universität Wien (Good Scientific Practice) durchgeführt.

Eine Genehmigungsdauer von 3 Jahren wird befürwortet.

EINGELANGT: **21. Nov. 2013**

**BUNDESMINISTERIUM FÜR
WISSENSCHAFT UND FORSCHUNG**

Eing.: **26. NOV. 2013**

ZAHL

Bg.:

Zahl: 66009/309 II/3a/2013

Der Antrag wird:
befürwortet
abgelehnt

M. Losert

Univ. Prof. Dr. U. M. Losert
Koordinator

U. Schütz
Univ. Prof. Dr. W. Schütz
Rektor

Sayın
Prof. Dr. Wolfgang Dörr
p.A. Tıbbi radyoterapiye yönelik
Radyoterapi & CDL Üniversite Kliniği
Viyana Tıp Üniversitesi
Währinger Gürtel 18-20
1090 Viyana

Bilgi edinilmesi ricasıyla.

Ek

Viyana, 4 Şubat 2014

Federal Bakan adına:

Dr. Alois Haslinger

Elektronik ortamda düzenlenmiştir

Dijital analitik değer	md7CHN/VGwP8gYkXEqwltgY42gF4aFis725Vweparky2M33bE/XSBw60CLP/VcWz+to2RPmcefDH+H9JUX8leY
İmza sahibi	Federal Bilim ve Araştırma Bakanlığı
Tarih/Saat/UTC	2014-02-04T12:04:11+01:00
Dönerleştiren sertifikası	China-sign-corporate-light-02.0U+sign-corporate-light-02.0+V-Trust Ges. f. Sicherheitssysteme im eGov. Datenverkehr GmbH, C=AT
Sertifika No	03.02.03
Yönelim	amtsbigElektronik-gv-act@neov1.1.0
Bilgi	Bu belge dijitaldir.
Doğrulama bilgileri	Elektronik imza için bilgilerin asıl yeri olan adreslere ulaşabilirsiniz: http://www.signaturprotektung.gv.at . Güvenlik bilgileri için de asıl yeri olan adreslere ulaşabilirsiniz: http://www.bmwf.gv.at/verifizierung .



Dosya numarası:
Yetkililerimiz:
Daire:
E-Posta:
Telefon/Faks:
Yazınızın numarası:

BMW-F66.009/0039-II/3b/2014
Dr. Alois Haslinger
II/3b
alois.haslinger@bmwf.gv.at
(+43) 01/58120-7114/53120-997114

Yazınızda lütfen dosya numarasını bildiriniz.

Almanca
Türkçe
Serif Ahmet Saman

Bu tercümenin noteriğimizi yayınlı
Tercümanı: Serif Ahmet Saman
Saman tarafından
Almanca
Türkçe
Tercüme edildiğini onaylıyorum.
27.02.2014

Minoritenplatz 5, 1014 Wien
www.bmwf.gv.at

DWIR 0064301

Viyana Tıp Üniversitesi
Rektörlüğü
Spitalgasse 23 1090 Wien

Tıbbi radyoterapiye yönelik
Radyoterapi & CDL Üniversite Kliniği
2012 tarihli Hayvan Deneyleri Kanunu gereği ruhsat,
Resmi Gazete BGBl. I No. 114/2012

BİLDİRİM

Federal Bilim ve Araştırma Bakanlığı, 21 Kasım 2013 tarihinde iletilmiş olan Zl. 341/115-97/98 ve 2013/14 numaralı talebiniz üzerine BGBl. I No. 114/2012 (TVG 2012) sayılı Resmi Gazetede yayımlanmış 2012 tarihli Hayvan Deneyleri Kanunu gereği aşağıda yer aldığı şekilde karar vermiştir:

KARAR

1. Başvuru doğrultusunda Viyana Tıp Üniversitesine 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 26. maddesi gereği ve - ve 2012 Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 26. maddesinin 7. fıkrası gereği 31 Aralık 2017 tarihine kadar olmak kaydıyla ekte tarifi bulunan ve aşağıda belirtilmiş olan proje kapsamında izin verilmiştir:

"Sistemik şekilde Heparin veya Dermatan sülfat verilmesi suretiyle radyogen Mucositis enoralisin (fare) modifikasyonu; Başlık özeti: Mukozit / Heparin"

Ek kısım bu suretle bu iznin ayrılmaz bir parçasını teşkil etmektedir.

Bu proje kapsamındaki hayvan deneyleri "orta (dahil)" seviyesine kadar derecelere tabiidir. Geriye dönül değerlendirme zorunluluğu bulunmamaktadır.

2. Proje Müdürü Prof. Dr. Wolfgang Dörr'e 1. maddede anılan projeyle sınırlı olmak üzere 2012 Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 27. maddesi gereği izin tahsis edilmiştir. Proje Müdürü projeyi eadece izin kapsamında uygulamak ve iznin şartlarının yerine getirilmemesi durumunda uygun önlemler alınmasını ve kaydedilmesini sağlamakla yükümlüdür. Proje Müdürü bunun dışında hayvan deneylerinden birinde hayvanda gereksiz ağrı, hastalık, korku veya kalıcı hasar meydana gelmesi durumunda hayvan deneylerini durdurmak durumundadır.



Dosya numarası:

Yetkili memur:

Daire:

E-Posta:

Telefon/Faks:

Yazınızın numarası:

BMWF-66.009/0039-II/3b/2014

Dr. Alois Haslinger

II/3b

aloeis.haslinger@bmwf.gv.at

(+43) 01/53120-7114/53120-997114

Yazışmalarda lütfen dosya numarasını bildiriniz.

Minoritenplatz 5.1014 Wien

www.bmwf.gv.at

DVR 0084301

3. Viyana Tıp Üniversitesine 1. maddede anılan projeyle sınırlı olmak üzere 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 16. maddesi gereği kullanıcı olarak izin tahsis edilmiştir. Kullanıcı, 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 22. maddesi gereği kayıt gerçekleştirmek ve bu kaydı muhafaza etmekle yükümlüdür. Hayvan deneylerinde kullanılan hayvanların sistematik bir şekilde kaydedilmesi için 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 22. maddesinin 3. fıkrası gereği bu bilgiler Federal Bilim ve Araştırma Bakanlığına bildirilmek durumundadır.
4. 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununa uyulduğunun denetimini sağlamak amacıyla Federal Bilim ve Araştırma Bakanlığınca görevlendirilmiş organlar 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 32. maddesi gereği kullanıcının tesislerini haber vererek veya haber vermeksizin denetleme yetkisine sahiptirler. Bu doğrultuda kontrol organlarına kullanıcının tesislerine ve 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununa uyulması bakımından öneme haiz olabilecek her nevi bilgiye erişim sağlanmak zorundadır. Kontrol organları Federal Bilim ve Araştırma Bakanlığı kimliğine sahiptirler.

GEREKÇE

Viyana Tıp Üniversitesi, 21 Kasım 2013 tarihinde 341/115-97/98 ve 2013/14 sayılı başvurusuyla 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 26. maddesi gereği proje kapsamında izin verilmesi başvurusunda bulunmuştur.

Projenin değerlendirilmesi sonucu olarak 2012 yılı Avusturya Hayvan Deneyleri Kanununun (TVG) 29. maddesi gereği aşağıda yer alan tespitlerde bulunmaktadır:

1. Proje bilimsel olarak yeterli gerekliliğe sahiptir;
2. Projenin amacı, hayvanların kullanılmasını haklı çıkarmaktadır;
3. Proje, hayvan deneylerinin mümkün olduğu kadar ağrısız ve çevreye uygun bir şekilde uygulanacak şekilde tasarlanmıştır.

Gerekli izin koşullarının yerine getirilmiş olmasından dolayı karar başlığında yer aldığı şekliyle karar verilmesi gerekmiştir.

KANUN YOLU HAKKINDA BİLGİLENDİRME

Bu bildirim karşı kanun yolları kapalıdır.

BİLGİLENDİRME

Bu bildirim karşı tebliği sonrası dört hafta içerisinde Federal İdare Mahkemesinde itirazda bulunabilir.

Bu bildirim karşı tebliği sonrası dört hafta içerisinde Federal Anayasa Mahkemesinde itirazda bulunabilir. İtiraz dilekçeleri bir Avukat tarafından imzalanmış olmalıdır. Bu itirazlar için 240 Euro

harç yatırılmak mecburiyeti vardır.



izin suretinin dağıtımı:

1. Prof. Dr. Wolfgang Dörr, p.A. Tıbbi radyoterapiye yönelik
2. Radyoterapi & CDL Üniversite Kliniği

Wien, 4. Februar 2014

Für den Bundesminister:

Dr. Alois Flaslinger

Elektronisch gefertigt

Signaturwert	p7WyoK0R4yG3WMLFJ1mVomgcRbGwJlencGvVfDR9H1H+eR6rVdWm3uVUq5B733EzBueQaB+ApDZgMdrG+PFF 8mjR0GmV39s8pWSD1PaD8mPBvW7JAUUmrTzhWfH5OTLunGSNeCoT5yMPEvR+eVLQTr0OHsRISp1cm	
Unterschrift	Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung	
Datum/Zeit-UTC	2014-02-04T12:02:57+01:00	
Aussteller-Zertifikat	CN=a-sign-corporate-light-02,OU=a-sign-corporate-light-02,OU=a-Trial G&S, f. Sicherheitsysteme in elektr. Datenverkehr GmbH,CA=AT	
Serien-Nr.	635223	
Method	sm.pdfsig1forbka-gratibinar-v1.1.0	
Hinweis	Dieses Dokument wurde amsigniert.	
Teyit bilgisi	Detaylı bilgi için lütfen http://www.signaturverwaltung.gv.at adresinden ulaşabilirsiniz. Sadece bu bilgilerin teyidi için http://www.bmwf.gv.at/vonfderung adresinden ulaşabilirsiniz.	



Viyana Tıp Üniversitesi, Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen araştırma projelerine
yönelik danışmanlık ve bilirkişilik ahlak komisyonu

Hayvan Deneyleri Kanunu gereği
hayvan deneyi uygulama izni 1988, BCB1-501/1989

1.) **Enstitü/Klinik:** Radyolojik onkoloji için tıbbi radyoterapiye yönelik

.....Radyoterapi & CDL Üniversite Kliniği

2.) **Hayvan deneylerinden sorumlu müdür:**

.....Prof. Dr. med. vet. et rer. medic. habil. Wolfgang Dörr.....

3.) **Hayvan deneyi başlık özeti:**

.....Mukositis / Heparin.....

4.) **Hayvan deneyi uygulama özeti:**

Mevcut deney çalışması vasıtasıyla baş ve boyun sahasında yer alan tümörlerde uygulanan radyoterapi kapsamında Heparin veya Darmatan sülfat verilmesi sonrası ağız mukozasında oluşan erken yan etkilerin klinik gelişiminin ne oranda azaltılabileceğinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu suretle hastaların maruz kaldığı olumsuzlukların azaltılmasının yanı sıra tedavinin anılan sebeplerden dolayı yarım bırakılmasının önüne geçilmesi suretiyle iyileşme ihtimalinin önemli ölçüde yükseltilmesi mümkün olacaktır.

Ağız mukozasının radyoterapiyle vermiş olduğu tepki, baş ve boyun sahasında uygulanan radyoterapiye (kemoterapiye) vermiş olduğu en önemli ve erken safhada meydana gelen tepkilerdendir. Bu olumsuzluk hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmekte ve ağrılar ve bunun neticesinde meydana gelen iletişim ve gıda alımı kısıtlaması sebebiyle sıklıkla tedavinin yarım bırakılması sonucunu doğurmaktadır. Bunun neticesinde iyileşme ihtimali önemli ölçüde azalmaktadır. Tedavinin yan etkilerinin sosyoekonomik sonuçları oldukça önemlidir.

Deneylerin tamamı yerleşmiş deneylerde olduğu haliyle farenin dilin alt kısmının mukozası üzerinde gerçekleştirilecektir. Klinik uygulamalara yakın şekilde ayrımlanan ışınım perkutan yolla yapılacaktır, bu suretle sadece ileri tedavi gerektirmeyecek hasarlar meydana getirilecektir. Yerleşik ışınım tepkisi dilin alt kısmındaki belli bir inceleme sahasının lokal ışınım tabi tutulması yoluyla meydana getirilecektir. Bu bağlamda gerekli dozun seviyesi ön hasara bağlı olacaktır. Klinik tepkinin süresi birkaç gün sınırları içerisinde bulunacaktır. Eşzamanlı meydana gelebilecek histolojik/immünohistokimyasal incelemeler öngörülmüştür.

Toplamda 1615 adet fare (C3H/Yeni inbred soy , biyotip araştırma bölümü) talebinde bulunmaktadır.

Hayvanlarda meydana gelen hasar derecesi önlemlerin ve meydana gelen değişikliklerin tamamının göz önünde bulundurulması altında düşük - (azami) orta arası (olumlu ışınım tepkisinin varlığı altında, sonra yaklaşık olarak 3 gün) olarak kabul edilecektir.

Görüş

Başvuru yapı ve metodik bağlamda bilimsel sorgulamaya uygundur ve ahlak komisyonunun tavsiyeleri doğrultusunda elden geçirilmiştir.

Meydana gelecek olan hasarlar azami orta dereceli olarak kademelendirilecektir, ancak kati yarıda kesme kıstasları suretiyle aşgariye düşürülmektedir.

Deneyler Viyana Tıp Üniversitesinin direktifleri (Good Scientific Practice) doğrultusunda uygulanmaktadır.

Üç yıllık izin süresi Onanmıştır.

(Kaşe)

Yürürlüğe giriş tarihi 13 Kasım 2013

(Kaşe)

Başvuru:
Onaylanmıştır
Reddedilmiştir

(İmza)

Üniv. Prof. Dr. U. M. Losert
Koordinator

(İmza)

Univ. Prof. Dr. W. Schütz
Rektör



8.2. Özgeçmiş (EK2)

NİLSU ÇİNİ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	15221421626
Doğum Tarihi	28/04/1987
İletişim Adresi	İstanbul Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi
Telefon	(554) 894 71 70
E-posta	nilsucini@gmail.com nilsucini@hotmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

10 Şubat 2014 - Şu Anda (5 yıl 6 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MEDİKAL FİZİK (DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.67 / 4.0

12 Eylül 2011 - 05 Şubat 2014 (2 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MEDİKAL FİZİK (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: 201400126
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.45 / 4.0

08 Eylül 2006 - 17 Ağustos 2010 (4 yıl)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, SAKARYA ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, FİZİK PR.
Diploma Numarası: 6078/02.728
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.79 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Eylül 2015 - Şu Anda (3 yıl 11 ay) (Tam Zamanlı)
UZMAN, SAĞLIK BAKANLIĞI TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU BAŞKANLIĞI
İSTANBUL İLİ ANADOLU GÜNEY BÖLGESİ TÜRKİYE KAMU HASTANE BİRLİĞİ
GENEL SEKRETERLİĞİ İSTANBUL KARTAL DR.LÜTFİ KIRDAR EĞİTİM VE
ARAŞTIRMA HASTANESİ

01 Haziran 2015 - 01 Mayıs 2018 (3 yıl) (Yarı Zamanlı)
ARAŞTIRMACI, VİYANA ÜNİVERSİTESİ

01 Kasım 2011 - 01 Ağustos 2015 (3 yıl 10 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DAHİLİ TIP BİLİMLERİ
BÖLÜMÜ RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- Radyasyon Onkolojisi

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyofizik -- Radyasyon Biyofiziği

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

G. S, A. M, N. ÇİNİ, D. W., G. V, H. S, R. A, K. LM, K. P, M. J, M. S & P. S, Radioprotective effects of dermatan sulfate in a preclinical model of oral mucositis : targeting inflammation, hypoxia and junction proteins without stimulating proliferation, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2018, 1422-0067, 19, 6, 1684.

S. GRUBER, N. ÇİNİ, K. LM, M. J, R. A, K. PETER & W. DÖRR, Upregulated epithelial junction expression represents a novel parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation in oral mucosa, STRAHLENTHERAPIE UND ONKOLOGIE, 2018, 0179-7158, 194, 8, 771-779.

C. UMay, N. ÇİNİ, O. ÖZDEMİR, İ. ALSAN ÇETİN, H. EPİK & A. N. DEMİRAL, Dosimetric comparison of anterior posterior-posterior anterior 2-field three-dimensional conformal radiotherapy, 4-field three-dimensional conformal radiotherapy and 'forward' plan intensity modulated radiotherapy techniques in female lymphoma patients irradiated to neck and mediastinum., JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND THERAPEUTICS, 2015, 0973-1482, 14, 6, 1389-1396.



N. ÇİNİ, S. GRUBER, L. Z. ARICAN ALICIKUŞ & W. DÖRR, FARELERDE RADYASYONA BAĞLI GELİŞEN ORAL MUKOZİTİN DERMATAN SÜLFAT İLE MODÜLASYONU: DİFERANSİYASYON SÜREÇLERİNE ETKİLERİ, Poster Sunumu, 23. Ulusal Kanser Kongresi, 17 Nisan 2019, 21 Nisan 2019.

N. ÇİNİ, S. S. NASIR, M. KANMAZ, E. ALGÜL & G. YAPRAK, Mesane Dolu-Pelvik Radyoterapi Alan Hastalarda, Mesane Dolum Eğitiminin, Tedavi Ve Yaşam Kalitesine Etkisini Belirlenmesi, Poster Sunumu, 13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 27 Nisan 2018, 01 Mayıs 2018.

S. GRUBER, N. ÇİNİ, L. KOWALD, J. MAYER, A. ROHORZKA, P. KUESS & W. DÖRR, Upregulated Epithelial Junction Expression After Fractionated Irradiation, The Epithelial Radiation Response, Poster Sunumu, 13. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 27 Nisan 2018, 01 Mayıs 2018.

S. S. NASIR, N. ÇİNİ, B. C. BIÇAKÇI, F. DEMİRCİOĞLU, M. KANMAZ & C. GEMİCİ, LARENKS KANSERLİ OLGULARDA CBCT VE KV-KV GÖRÜNTÜLEME TEKNİĞİ KULLANILARAK SET-UP GÜNÜNDEN İTİBAREN ALINAN GÖRÜNTÜLER ÜZERİNDE KAYMA DEĞERLERİNİN İNCELENMESİ, Poster Sunumu, 12. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 20 Nisan 2016, 24 Nisan 2016.

N. ÇİNİ, S. S. NASIR & C. GEMİCİ, Mide Kanserli Olguların Rapidarc Planlarında Doz Dağılımı Doğruluğunun Octavius 4D ve Elektronik Portal Dozimetri ile Karşılaştırılması, Poster Sunumu, 12. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 20 Nisan 2016, 24 Nisan 2016.

S. S. NASIR, N. ÇİNİ, D. GEDİK & C. GEMİCİ, PROSTAT KANSERLİ OLGULARIN VMAT PLANLARINDA KALİTE KONTROL SONUÇLARININ OCTAVIUS 4D VE ELEKTRONİK PORTAL GÖRÜNTÜLEME İLE KARŞILAŞTIRILMASI, Poster Sunumu, 12. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 20 Nisan 2016, 24 Nisan 2016.

N. ÇİNİ, S. S. NASIR, M. KANMAZ & C. GEMİCİ, Prostat Kanserli Olgularda İlk Set-up Günü ve Sonraki Günlerde Alınan CBCT Görüntülerin Kayma Değerlerinin İncelenmesi, Poster Sunumu, 12. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 20 Nisan 2016, 24 Nisan 2016.

N. ÇİNİ, A. S. OKTAY, A. YURT & P. BALCI, Dijital Mamografide Ortalama Glandüler Doz ile Görüntü Kalitesi Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, 15. Ulusal Medikal Fizik Kongresi, 16 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015, 182 - 182.

D. AKÇAY, B. AYDIN, N. ÇİNİ, O. ÖZDEMİR, N. DAĞDELEN, L. Z. ARICAN ALICIKUŞ, İ. GÖRKEN & F. AKMAN, Volümetrik Ark tTedavisi (VMAT) ve Düzleştirici Filtresiz (FFF) Enerji ile Stereotaktik Radyoterapi Deneyimimiz, Poster Sunumu, 15. Ulusal Medikal Fizik Kongresi, 16 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015, 104 - 105.

N. ÇİNİ, C. UMay, O. ÖZDEMİR, İ. ALSAN ÇETİN, H. EPIK & A. N. DEMİRAL, Boyun ve Mediastene Yönelik Radyoterapi Verilen Kadın Lenfoma Hastalarında AP-PA 2 Alan 3B-KRT, 4 Alan 3B-KRT ve 'Forward' Plan YART Tekniklerinin Hedef Volüm ve Normal Dokular Açısından Dozimetrik Karşılaştırılması, Poster Sunumu, 11. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 23 Nisan 2014, 27 Nisan 2014.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

109Y336, Kaz Dağları-Edremit Orman Topraklarının Doğal ve Yapay Radyoaktivite Düzeyinin Belirlenmesi ve Sonuçların Radyolojik Risk Açısından Değerlendirilmesi, 3501 - Kariyer, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, ÇAYDAG - Çevre, Atmosfer, Yer Ve Deniz Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.11.2012 - 01.05.2013, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.05.2010 - 01.05.2013.

1135069, Radyoterapide Implant Dozimetrelerin Üretilmesi ve Geliştirilmesi, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 16.09.2013 - 15.09.2016, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.09.2013 - 15.09.2016.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

8.3. Tez ve Tez ile İlişkili Konularda Yayımlanmış Makaleler (EK3)

8.3.1. Sylvia Gruber, **Nilsu Cini**, Lisa-Marie Kowald, JuliaMayer, Andreas Rohorzka, Peter Kuess, Wolfgang Dörr.

Upregulated epithelial junction expression represents a novel parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation in oral mucosa. Strahlenther Onkol. 2018; 194(8): 771-79.



Upregulated epithelial junction expression represents a novel parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation in oral mucosa

Sylvia Gruber¹ · Nilsu Cini² · Lisa-Marie Kowald¹ · Julia Mayer¹ · Andreas Rohorzka¹ · Peter Kuess¹ · Wolfgang Dörr¹

Received: 14 December 2017 / Accepted: 6 April 2018
© The Author(s) 2018

Abstract

Purpose During head and neck cancer treatment, the radiation response of the oral mucosa represents a frequent early side effect. Besides radiation-induced inhibition of proliferation, various other cellular responses occur. The radiation response of adherens and tight junction proteins was so far mostly investigated with large single-dose irradiation protocols, in vivo and in vitro. Therefore, the current study was initiated to investigate the impact of daily fractionated irradiation on the expression of adherens and tight junction proteins in vivo.

Materials and methods Fractionation with 5 × 3 Gy/week (days 0–4, 7–11) was given to the snouts of mice. Groups of 5 animals per day were euthanized every second day between day 0 (unirradiated controls) and day 14, and their tongues subjected to histological processing. Adherens junction marker (β-catenin and E-cadherin) and tight junction marker (claudin-1 and occludin) expression was analysed in the oral mucosa of unirradiated controls and during two weeks of fractionated irradiation.

Results Adherens as well as tight junction marker proteins were rapidly and consistently upregulated in both the germinal as well as the functional layer of the oral mucosa. This represents a previously unknown parameter of the epithelial radiation response to clinically relevant fractionation protocols.

Conclusion Fractionated irradiation significantly enhanced the expression of all proteins investigated. This study revealed a new parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation.

Keywords Fractionated irradiation · Oral mucositis · Adherens junctions · Tight junctions · Mouse model

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00066-018-1302-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sylvia Gruber
sylvia.gruber@meduniwien.ac.at

¹ Dept. Radiation Oncology/CD Lab. Med. Radiation Research for Radiation Oncology, Applied and Translational Radiobiology, Medical University/AKH Vienna, Währinger Gürtel 18–20, 1090 Vienna, Austria

² Department of Radiation Oncology, Kartal Dr. Lutfi Kırdar Training and Research Hospital, Health Science University, Istanbul, Turkey

Hochregulierung von Zellverbindungen repräsentiert einen neuen Parameter der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut auf fraktionierte Bestrahlung

Zusammenfassung

Zielsetzung Während der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren repräsentiert die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut eine häufige und frühe Nebenwirkung. Abgesehen von strahleninduzierter Inhibierung der Zellteilung finden zahlreiche andere zelluläre Reaktionen statt. Die Strahlenreaktion von Zellverbindungsproteinen wurde bisher größten Teils – sowohl in vivo als auch in vitro – mit großen Einzeldosisprotokollen untersucht. Daher wurde die vorliegende Studie initiiert, um den Einfluss täglicher fraktionierter Bestrahlung auf die Expression der Zellverbindungsproteine in vivo zu untersuchen.

Material und Methoden Täglich fraktionierte Bestrahlung mit 5×3 Gy/Woche (Tage 0–4, 7–11) wurde auf die Schnauzen der Mäuse appliziert. Gruppen von 5 Mäusen pro Tag wurden jeden zweiten Tag zwischen Tag 0 und Tag 14 euthanasiert und ihre Zungen histologische aufbereitet. Die Expression von Markern für Adherens Junctions (β -Catenin und E-Cadherin) sowie für Tight Junctions (Claudin-1 und Occludin) wurde in der Mundschleimhaut von nichtbestrahlten Kontrollen und über einen Fraktionierungszeitraum von 2 Wochen analysiert.

Ergebnisse Adherens- als auch Tight-Junction-Marker wurden sowohl in der germinativen als auch der funktionellen Schicht der oralen Schleimhaut rapide und beständig hochreguliert. Dies repräsentiert einen bisher unbekannten Parameter der epithelialen Strahlenreaktion auf klinisch relevante Fraktionierungsprotokolle.

Schlussfolgerung Fraktionierte Bestrahlung steigerte signifikant die Expression aller untersuchten Proteine. Diese Studie offenbarte einen neuen Parameter der epithelialen Strahlenreaktion nach fraktionierter Bestrahlung.

Schlüsselwörter Fraktionierte Bestrahlung · Orale Mukositis · Adherens Junctions · Tight Junctions · Mausmodell

Introduction

The epithelial radiation response often represents a dose-limiting early side effect, experienced by the majority of head and neck cancer (HNC) patients as confluent oral mucositis [1–3]. Oral mucositis is associated with severe pain, increased risk for local and systemic infections, and can necessitate unplanned treatment interruptions, thus negatively influencing tumour control probability. It has a major impact on the patient's quality of life. Hospitalizations for supportive care are an important socio-economic factor [4]. Despite its clinical relevance, no biology-based treatment strategy has been implemented into clinical routine so far [5]. This can be partly attributed to the fact that the exact molecular radiopathological mechanisms underlying oral mucositis are not yet fully understood.

Oral mucosa is a typical turnover tissue, with a precise equilibrium of continuous proliferation in the germinal tissue compartments and cell loss at the surface. Radiation abolishes epithelial proliferation but does not influence the rate of superficial cell shedding. This leads to epithelial hypoplasia and subsequently denudation, which represents the primary cause of oral mucositis [6]. Importantly, the radiation-induced epithelial hypoplasia leads to a loss of the tissue barrier function [7]. Mucosae such as the oral epithelium form a barrier against potentially harmful chemicals and microbiota [8]. Junctional complexes are critically involved in the integrity of the mucosal barrier [9]. They are composed of transmembrane proteins, which interact with multiple intracellular adaptor proteins. Tight junctions rep-

resent intercellular gates; their size and charge selectively regulate the transport of small molecules across the paracellular space. The main barrier function-related components of tight junctions are the proteins claudin and occludin. Adherens junctions act as paracellular anchors, regulating cell–cell and cell–matrix adhesion; thus, they are responsible for the integrity of the epithelial barrier. The main transmembrane component of the adherens junction complex is E-cadherin, which together with β -catenin and α -catenin forms a tertiary complex that binds to the actin cytoskeleton in a force-dependant manner [10–12]. Other than maintaining a polarized epithelial phenotype and stabilizing cell–cell interaction, β -catenin also functions as a key regulator of the canonical Wnt signalling network. Upon Wnt ligand stimulation, cytoplasmic β -catenin translocates to the nucleus and activates transcription factor-dependent expression of genes involved in embryonic development, tissue morphogenesis, cellular adhesion, and tumourigenesis [13–15]. Selectivity between adhesion or transcription is mutually exclusive and depends mainly on the structural configuration of β -catenin [16, 17]. E-cadherin appears to influence Wnt-dependent gene expression only via the availability of β -catenin. Knockout of E-cadherin in a cell line with active Wnt resulted in junctional disruption and augmented β -catenin-dependent transcriptional activity, without, however, change in the transcriptional program. No effects were found when the E-cadherin knockdown was introduced in a cell line that had no active Wnt signalling, hence loss of E-cadherin alone appears not to activate the Wnt/ β -catenin signalling axis [18]. A broad array of genes are ac-

tivated via the Wnt/ β -catenin pathway, including tight and adherens junction complex components. The tight junction proteins claudin and to a lesser extent occludin were shown to play pivotal roles in regulating the epithelial microenvironment, including proliferation [19]. Aberrant expression of both proteins in the membrane was associated with multiple malignancies and their clinicopathological significance, including oral squamous cell carcinoma [20–23]. In this study, the expression of tight junction markers (claudin-1, occludin) as well as adherens junction proteins (E-cadherin and β -catenin) was analysed over the course of 2 weeks of clinically relevant fractionated irradiation.

Methods

All experiments were performed according to the current animal welfare legislation with approval by the respective authorities (file no. BMWF 66.009/0039-II/3b/2014).

Animals and housing

For all experiments, mice of the inbred C3H/Neu strain from the breeding colony of the Department of Biomedical Research, MedUni Vienna, were used. Mice of both genders were included in the experiments, since earlier studies excluded gender effects on the mucosal radiation response [24]. Mice were housed in a conventional husbandry under controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) and a day/night rhythm of 12 h. The animals were housed in Makrolon® cages, 1284L Eurostandard Type II L with a floor area of 530 cm^2 (Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Germany), maximum 5 animals per cage, on aspen wood bedding (ABEDD-LAB & VET Service GmbH, Vienna, Austria). The mice had free access to standard maintenance diet (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) and fresh water from standard Perspex drinking bottles ad libitum. The age of the mice at the onset of the experiments ranged from 8 to 12 weeks.

Experimental design

Over the course of 14 days, animals received fractionated irradiation with $5 \times 3\text{ Gy}$ per week. Irradiation was administered daily between 10 and 12 am over a course of 2 weeks, Mondays to Fridays (days 0–4 and 7–11). On the weekends (days 5–6 and 12–13), no irradiation was given to the animals, similar to conventional patient protocols.

In 2-day intervals, groups of animals ($n=5$) were sacrificed and their tongues excised at the base for analyses of irradiation-induced epithelial marker expression changes. Five unirradiated mice served as a control group.

Irradiation technique

For all irradiation procedures, a YXLON Maxishot X-ray unit (Yxlon International X-ray GmbH, Hamburg, Germany) was used. Dosimetric commissioning was performed for all used set-ups [25]. Standard dosimetric quality assurance was performed regularly and the dose rate was found to be constant. Adjustment of the irradiation time thus defined the delivered dose.

Fractionated irradiation with 3 Gy per day was given to the whole snouts of the animals. Un-anaesthetized animals were guided into a set-up of plastic tubes (inner diameter 2 cm). The snouts were positioned in conical holes (10 mm $\rightarrow$ 6 mm) of a Perspex block at the front end of the tubes. The rear ends were closed to prevent withdrawal of the animals. The bodies of the mice were shielded caudally from a plane from the eyes to the throat with 12 mm of the Pb-Bi-Sn alloy MCP-96. The treatment volume thus included the snouts with the entire tongue. The set-up for simultaneous irradiation of 8 animals was positioned in a standardized way in the central beam of the irradiation device. For fractionated irradiation, the YXLON Maxishot device was operated at 200 kV with a tube current of 20 mA and a focus size of 5.5 mm. An additional 4 mm Al and 0.6 mm Cu beam filter was used, which resulted in a dose rate of ca. 1 Gy/min at the focus-to-skin distance of 45.5 cm. The dose homogeneity between the individual snout positions was $3.2 \pm 0.5\%$. The beam direction was vertical.

Immunohistochemistry

Histological preparation procedures have been reported in detail previously [26]. Stainings comprised 30 min incubation at 95°C , dewaxing with Leica Bond Dewax solution (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL; Cat no. AR9222), antigen retrieval with Bond Epitope Retrieval 1 solution (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL; Cat no. AR9961) and blocking of unspecific binding sites with 2% goat serum. Primary antibody binding was visualized with diaminobenzidine chromogen and a haematoxylin counterstain, using the Leica Bond Refine Detection kit (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL; Cat no. DS9800). Primary antibodies were diluted in the Leica Bond Antibody Diluent buffer (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL; USA, Cat no. AR9352) as follows: anti-claudin-1 1:200 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat no. 15098; rabbit polyclonal), anti-occludin 1:200 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat no. 222691; rabbit polyclonal), anti-E-cadherin 1:3000 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat no. 76055; rabbit polyclonal) and anti- β -catenin 1:700 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat no. 2365; rabbit polyclonal).

Histological analysis

Microscopic analyses were performed field by field with an Axio Lab.A1 HAL 35 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, USA) at 400× magnification. The lower mouse tongue epithelium was analysed from the tip to the end of the tongue. A minimum of five visual fields were evaluated. In each visual field the number of marker-positive cells was normalized to the total number of cells, visualized by haematoxylin nuclear staining. The fraction of marker-positive cells was evaluated separately for the germinal and the functional epithelial layer. Additionally, the staining intensity, corresponding to the amount of protein expressed, was assessed semi-quantitatively with an arbitrary score from 0 (no signal), 1 (weak signal), 2 (intermediate signal) to 3 (strong signal). Staining intensity was scored per visual field, not for each marker-positive cell individually. Staining homogeneity was good. Marker-positive cells and their respective staining intensity were evaluated by two independent and experienced researchers in a blinded fashion after extensive training. Intra-observer variability was found to be negligible. Inter-observer variability was low and results in good agreement.

Statistical analysis

For statistical analysis and graphical representation, the SPSS statistical software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA), respectively, were used. Mean values and standard deviation (SD) were calculated for each experimental group. The analysis of variance (one-way ANOVA) was

used to test for the significance of a difference between the mean values. A p -value of <0.05 was regarded as statistically significant.

Results

Representative histophotographs of immunohistochemical staining for β -catenin, E-cadherin, claudin-1 and occludin in untreated control mucosa and on day 14 after 10×3 Gy are presented in Fig. 1.

Adherens junctions— β -catenin and E-cadherin

Germinal layer

In control epithelia, approximately 85% of the germinal cells were positive for β -catenin and E-cadherin. With the onset of fractionation, the expression of both adherens junction marker proteins increased to levels between 94 and 98% within 2 days. A significant increase compared to the control values was found on all days investigated. From day 2 onwards, β -catenin expression levels increased to 98% ($p \leq 0.001$ for all days investigated). E-cadherin expression increased from 85 to 94% on day 2 ($p = 0.007$) and further to values between 96% on day 4 and 99% on day 14, resulting in $p \leq 0.001$ from day 4 onwards (Fig. 2a).

The β -catenin staining intensity increased from 2 a.u. in control specimen to a maximum of 2.7 a.u. on day 14 ($p \leq 0.001$). Likewise, E-cadherin staining intensity increased from 1.8 a.u. in untreated samples to values be-

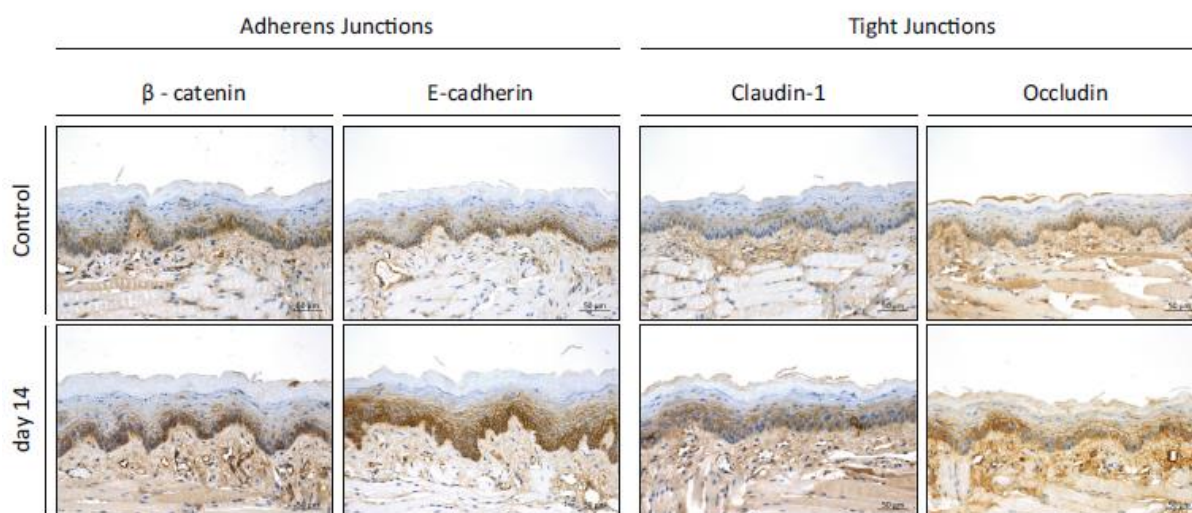
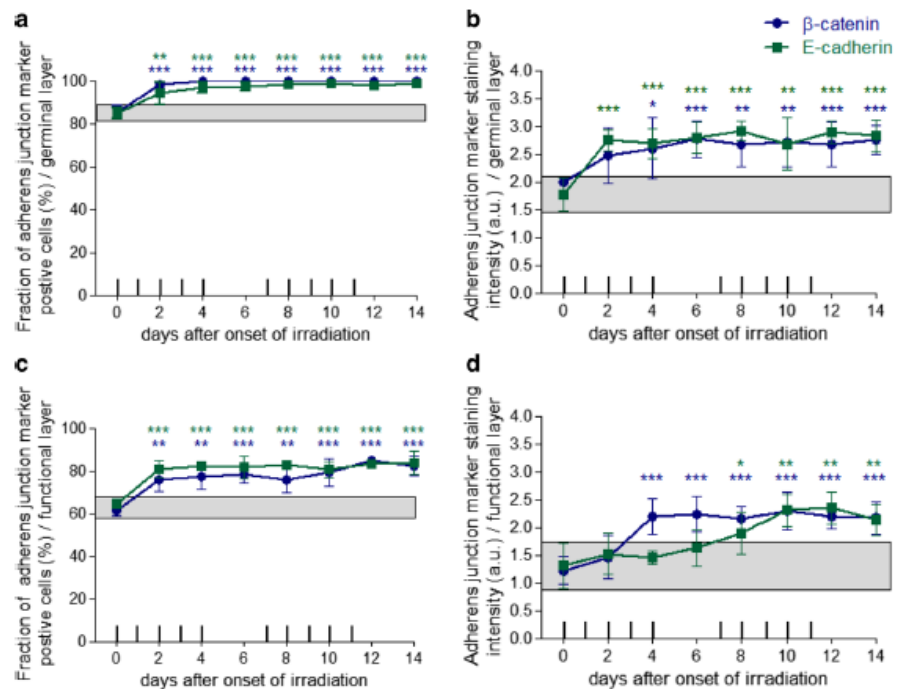


Fig. 1 Augmentation of adherens junction marker (β -catenin and E-cadherin) and tight junction marker (claudin-1 and occludin) expression during daily fractionated irradiation. Figures illustrate marker expression in unirradiated controls and on day 14 after fractionated irradiation with 10×3 Gy on days 0–4 and 7–11. All proteins increased significantly in both epithelial layers during the irradiation treatment. Scale bar: 50 μ m

Fig. 2 Effect of daily fractionated irradiation on adherens junction marker expression. The relative number of β -catenin- and E-cadherin-positive epithelial cells and their respective staining intensity were analysed, in the germinal (a, b) and functional compartments (c, d), respectively. The staining signal intensity was scored semi-quantitatively with an arbitrary score of 0 (no signal) to a maximum of 3 (strong). Adherens junction markers were analysed in unirradiated control samples and over the course of 14 days of fractionation with a daily dose of 3 Gy. Data points represent the mean of 5 animals, error bars indicate ± 1 standard deviation (SD). The shaded areas illustrate the mean (± 1 SD) from 5 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$



tween 2.7 a.u. on day 2 and 2.9 a.u. on day 14 ($p \leq 0.001$ for days 2–14; Fig. 2b).

Functional layer

In the functional tissue layer, β -catenin and E-cadherin were expressed by 62–65% of cells in unirradiated control specimen. During radiotherapy, the expression of both adherens junction markers increased to 85% until day 14. Compared to control epithelia, significantly increased β -catenin expression was found on day 2 ($p = 0.002$), day 4 ($p = 0.002$), day 6 ($p \leq 0.001$), day 8 ($p = 0.004$) and from day 10 to day 14 with $p \leq 0.000$. E-cadherin expression was significantly potentiated ($p \leq 0.001$) on days investigated (Fig. 2c).

The staining intensity for both adherens junction markers was 1.3 a.u. in control epithelia. With the onset of fractionation, the staining intensity of both proteins gradually increased. Significant staining intensity differences were found on all days investigated for β -catenin ($p \leq 0.001$) and on days 8 ($p = 0.047$), day 10 ($p = 0.003$), day 12 ($p = 0.002$) and day 14 ($p = 0.008$) for E-cadherin (Fig. 2c).

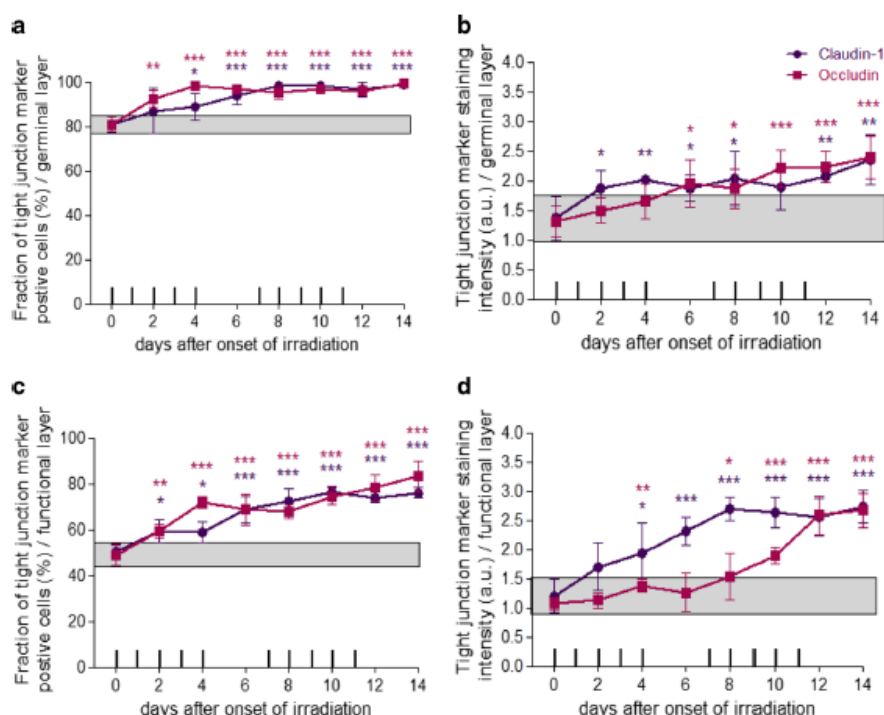
Tight junctions—claudin-1 and occludin

Germinal layer

In control specimen, 81% of the germinal epithelial cells expressed claudin-1 and occludin. With the onset of fractionation, the percentage increased gradually for both proteins. At the end of the study period, on day 14, a maximum of 99% of claudin-1- and occludin-positive cells were observed in the germinal epithelial compartment. Significant claudin-1 expression differences as compared to unirradiated epithelia occurred on day 4 ($p = 0.038$) and from day 6 with $p \leq 0.001$ until the end of the study period. Occludin expression was significantly upregulated from day 2 onwards ($p = 0.002$). From day 4 until day 14, occludin expression was observed in 95–99% of the germinal layer ($p \leq 0.001$; Fig. 3a).

A gradual increase in the staining intensity was noted for both tight junction markers during the irradiation treatment. From 1.3 a.u. in unirradiated specimen, the staining intensity for both claudin-1 and occludin increased to a maximum of 2.4 a.u. on day 14. Significant differences were noted on day 2 ($p = 0.048$), day 4 ($p = 0.005$), day 6 ($p = 0.037$), day 8 ($p = 0.033$), day 12 (0.004) and day 14 ($p = 0.005$) for claudin-1. For occludin, significant differences were found from day 6 onwards with $p = 0.017$ on day 6, $p = 0.02$ on day 8 and $p = 0.001$ on days 10 to 14 (Fig. 3b).

Fig. 3 Effect of daily fractionated irradiation on tight junction marker expression. The relative number of claudin-1- and occludin-positive epithelial cells and their respective staining intensity were analysed, in the germinal (a, b) and functional compartments (c, d), respectively. The staining signal intensity was scored semi-quantitatively with an arbitrary score of 0 (no signal) to a maximum of 3 (strong). Adherens junction markers were analysed in unirradiated control samples and over the course of 14 days of fractionation with a daily dose of 3 Gy. Data points represent the mean of 5 animals, error bars indicate ± 1 standard deviation (SD). The shaded areas illustrate the mean (± 1 SD) from 5 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$



Functional layer

In the functional compartment, 48% (occludin)–50% (claudin-1) of cells expressed the tight junction markers. During fractionation, the expression of both markers gradually increased until an expression maximum was observed for both proteins at the end of the study period. On day 14, 76% of functional epithelial cells expressed claudin-1 and 83% were occludin positive. Significantly increased claudin-1 expression was observed on all days (day 2: $p=0.014$, day 4: $p=0.011$, days 6–14: $p \leq 0.001$). Occludin expression was significantly enhanced on all days throughout the study period with $p=0.005$ on day 2 and $p \leq 0.001$ from day 4 (Fig. 3c).

Before the onset of irradiation, the staining intensity of both markers was relatively weak, with 1.2 a.u. for claudin-1 and 1.1 a.u. for occludin. Daily irradiation potentiated the staining intensity, corresponding to the amount of protein expressed per positive cell, substantially during the study period. A maximum of 2.7 a.u. was observed for both proteins at the end of the study period on day 14, with significant differences compared to control specimen for claudin-1 on days 4 ($p=0.031$) to 14 ($p \leq 0.001$) and for occludin on day 4 ($p=0.009$) and day 8 ($p=0.033$) and from day 10 to day 14 from day 10 to day 14 with $p \leq 0.001$ (Fig. 3d).

Discussion

Severe (early) normal tissue side effects occur frequently during curative radio(chemo)therapy. Although accepted for the benefit of an optimal tumour treatment, early normal tissue side effects are associated with substantially reduced quality of life [3]. Hence, molecular changes leading to the development of a normal tissue response are of significant interest. Key mediators identified during the development of side effects can offer new targets for a biologically optimized treatment strategy [27–29].

This study was initiated to characterize the role of epithelial junctions during the development of oral mucositis, which is the most frequently occurring early side effect during radio(chemo)therapy of head and neck tumours. Primarily, oral mucositis manifests as a response to radiation-induced inhibition of epithelial proliferation. As the physiological superficial cell loss in the epithelium, characteristic for turnover tissues, continues independent of the treatment, epithelial hypoplasia and denudation, i.e. ulcerative lesions, develop. These are associated with a breakdown of the epithelial barrier function and therefore an increased risk for local and systemic infections [30, 31]. Epithelial junction proteins play a pivotal role in the maintenance and integrity of the tissue barrier function. So far, data on the radiation response of epithelial junctions are limited. De Carvalho and colleagues investigated the response of colon

adenocarcinoma cells to irradiation and observed decreased transepithelial electrical resistance and disrupted junctional proteins after 2, 5 and 10 Gy. Notably, these effects were found to be reversible after 2 Gy, but persistent after higher doses [32]. Chai et al. report on structural alterations and tight junction protein degradation in mouse jejunum after single-dose whole-body irradiation with 6 Gy [33]. Similarly, Dublineau and colleagues concluded on epithelial disorganization characterized by tight junction disruption and accompanied by a loss of intestinal barrier function after irradiation with single doses between 6 and 12 Gy [34]. These findings were confirmed by Shukal et al., who reported on the radiosensitivity of junction proteins in a mouse model of gastrointestinal mucositis. A rapid disruption of occludin and claudin-1, E-cadherin and β -catenin occurred after total-body irradiation of 4 Gy [35]. Also, Thiagarajah et al. reported on a rapid loss of E-cadherin and β -catenin after 8 Gy total-body irradiation, which was associated with loss of mucosal barrier function in a rat model of irradiation-induced intestinal damage [36]. In summary, all in vivo studies yield a common conclusion of a rapid disruption of junction proteins after irradiation. The common denominator is irradiation doses equal to and higher than 4 Gy. A potential explanation for the discrepancy of the junction's radiation response to either small or large fraction sizes might therefore be dose dependency, as also indicated by the recovery of junction proteins in the 2-Gy dose group but not after 5 or 10 Gy in the in vitro study by De Carvalho et al.

While the physiological roles of E-cadherin, occludin and claudin-1 are based on their functions within junctional complexes [12, 37], β -catenin also exerts transcription factor activity as a key regulator of the canonical Wnt pathway. The Wnt/ β -catenin axis plays a crucial role in tissue homeostasis, regeneration and repair [38], and was therefore investigated in a model of radiation-induced oral mucositis by Zhao et al., who reported on the mucoprotective potential of Wnt activation [39]. Without stimulation, β -catenin expression, similarly to our results and in good agreement with other publications on normal mucosa [40, 41], remained membrane bound. Irradiation comprised one single high-dose fraction and Zhao et al. observed substantial membrane-bound β -catenin deterioration, in line with other studies reporting junctional degeneration after single high-dose irradiation, as discussed above. Considering its twofold mechanism, the cellular localization of β -catenin was focused on throughout our study period. No augmented nuclear translocation, hence activation of the Wnt/ β -catenin signalling axis, was observed (data not shown). We therefore conclude that the Wnt/ β -catenin signalling axis does not contribute to the radiation response of the oral epithelium to conventional fractionation doses and can be considered irrelevant for the interpretation of this study's results.

The radiation-induced upregulation of epithelial cell contacts described in this study has, to our knowledge, not been demonstrated before and appears to be a new parameter of epithelial tolerance to fractionated irradiation. In our model, fractionated irradiation progressively increased the expression of tight as well as adherens junction proteins. In contrast to large single doses, conventional fractionation doses, as used in this study, seem to trigger responses other than cell death, i.e. changes in cell function. Similar findings have been reported for the central nervous system and skin [42–44]. We hypothesize that the upregulation of epithelial junctions potentially represents a twofold mechanism. The upregulation of adherens junctions appears to be a response to the abolished proliferation, thus immediately counteracting superficial cell loss via strengthening the anchorage of cells already present within the tissue at the time of irradiation. The upregulation of tight junctions might therefore indicate a response to the barrier deterioration. It is likely that both strengthening of tissue architecture and counteracting barrier loss are the basis of enhanced junction expression during fractionated irradiation. The effect is most pronounced from the second treatment week onwards, when repopulation is already fully active. Repopulation occurs in all early reacting normal tissues and translates into reduced radiation sensitivity with increased treatment time, thus more dose is necessary to achieve the same biological effect when fractionation rather than single-dose irradiation is administered. The characteristic epithelial radiation response is based on a profound proliferative reorganisation [45]. The newly discovered augmentation of cellular conjunction in response to fractionated irradiation, as presented in this study, could be an additional parameter of repopulation, with the loss in radiosensitivity being additionally based on augmented and reinforced epithelial cell conjunction.

Our findings highlight the importance of choosing a biologically relevant irradiation scheme for the radiation response being investigated. Clearly the response to single-dose irradiation is highly relevant for multiple scenarios, e.g. accidental exposure or stereotactic radiosurgery. However, the response to large single-dose irradiation does not necessarily reflect the same tissue's response to clinically more relevant fractionation schemes.

Conclusion

This study demonstrated a previously unknown response of junction proteins to fractionated irradiation with conventional daily doses. The expression of adherens junction marker proteins β -catenin and E-cadherin as well as the tight junction marker proteins claudin-1 and occludin rapidly increased during the course of 2 weeks of fraction-

ation. The augmented expression was found in all epithelial layers and was highly significant for all proteins.

Acknowledgements The financial support by the Federal Ministry for Digital, Business and Enterprise and the National Foundation for Research, Technology and Development is gratefully acknowledged.

Funding Open access funding provided by Medical University of Vienna.

Compliance with ethical guidelines

Conflict of interest S. Gruber, N. Cini, L.-M. Kowald, J. Mayer, A. Rohozka, P. Kuess, and W. Dörr declare that they have no competing interests.

Ethical standards All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed. All experiments were performed with approval by the respective authorities (Federal Ministry of Science, Research and Economy, file no. 66.009/0039-II/3b/2014).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Kuhnt T, Schreiber A, Pirnasch A et al (2017) Hyperfractionated accelerated radiation therapy plus cetuximab plus cisplatin chemotherapy in locally advanced inoperable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Strahlenther Onkol* 193:733–741. <https://doi.org/10.1007/s00066-017-1145-6>
- Lalla RV, Saunders DP, Peterson DE (2014) Chemotherapy or radiation-induced oral mucositis. *Dent Clin North Am* 58:341–349. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.12.005>
- Elting LS, Keefe DM, Sonis ST et al (2008) Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer* 113:2704–2713. <https://doi.org/10.1002/cncr.23898>
- Murphy BA (2007) Clinical and economic consequences of mucositis induced by chemotherapy and/or radiation therapy. *J Support Oncol* 5:13–21
- Lalla RV, Bowen J, Barasch A et al (2014) MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer* 120:1453–1461. <https://doi.org/10.1002/cncr.28592>
- Sonis ST (2007) Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol* 5:3–11
- Gruber S, Dörr W (2016) Tissue reactions to ionizing radiation—oral mucosa. *Mutat Res Rev Mutat Res* 770:292–298. <https://doi.org/10.1016/j.mrev.2016.07.007>
- Vasconcelos RM, Sanfilippo N, Paster BJ et al (2016) Host-Microbiome cross-talk in oral mucositis. *J Dent Res*. <https://doi.org/10.1177/0022034516641890>
- Groeger S, Meyle J (2015) Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontology* 69:46–67. <https://doi.org/10.1111/prd.12094>
- Balda MS, Matter K (2016) Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Curr Opin Cell Biol* 42:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.05.006>
- Boivin FJ, Schmidt-ott KM (2017) Transcriptional mechanisms coordinating tight junction assembly during epithelial differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2:80–99. <https://doi.org/10.1111/nyas.13367>
- Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778:660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2007.07.012>
- Schüller U, Rowitch DH (2007) β -catenin function is required for cerebellar morphogenesis. *Brain Res* 1140:161–169. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.105>
- Heuberger J, Birchmeier W (2010) Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a2915. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002915>
- Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W (2008) Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of β -catenin in mice. *Genes Dev* 22:2308–2341. <https://doi.org/10.1101/gad.1686208>
- Cong F, Schweizer L, Chamorro M, Varmus H (2003) Requirement for a nuclear function of β -catenin in Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 23:8462–8470. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8462-8470.2003>
- Gottardi CJ, Gumbiner BM (2004) Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 167:339–349. <https://doi.org/10.1083/jcb.200402153>
- Kuphal F, Behrens J (2006) E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts. *Exp Cell Res* 312:457–467. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.007>
- Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T et al (2008) Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27:6930
- Rachow S, Zorn-Kruppa M, Ohnemus U et al (2013) Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca^{2+} -homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis. *PLoS ONE* 8:e55116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055116>
- Wang L, Jin X, Lin D et al (2013) Clinicopathologic significance of claudin-6, occludin, and matrix metalloproteinases-2 expression in ovarian carcinoma. *Diagn Pathol* 8:190. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-190>
- Sappayatosok K, Phattaratatip E (2015) Overexpression of claudin-1 is associated with advanced clinical stage and invasive pathologic characteristics of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 9:173–180. <https://doi.org/10.1007/s12105-014-0559-z>
- Phattaratatip E, Sappayatosok K (2016) Expression of claudin-5, claudin-7 and occludin in oral squamous cell carcinoma and their clinico-pathological significance. *J Clin Exp Dent* 8:e299–e306. <https://doi.org/10.4317/jced.52801>
- Dörr W, Brankovic K, Hartmann B (2000) Repopulation in mouse oral mucosa: changes in the effect of dose fractionation. *Int J Radiat Biol* 76:383–390
- Kuess P, Bozsaky E, Hopfgartner J et al (2014) Dosimetric challenges of small animal irradiation with a commercial X-ray unit. *Z Med Phys*. <https://doi.org/10.1016/j.zemedi.2014.08.005>
- Gruber S, Bozsaky E, Roitinger E et al (2017) Early inflammatory changes in radiation-induced oral mucositis effect of pentoxifylline in a mouse model. *Strahlenther Onkol* 193:499–507. <https://doi.org/10.1007/s00066-017-1119-8>
- Sonis ST (1998) Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol* 34:39–43

28. Barasch A, Epstein J (2011) Management of cancer therapy-induced oral mucositis. *Dermatol Ther* 24:424–431
29. Cinausero M, Aprile G, Ermacora P et al (2017) New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front Pharmacol* 8:1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00354>
30. Blijlevens NMA, Donnelly JP, DePauw BE (2005) Inflammatory response to mucosal barrier injury after myeloablative therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 36:703
31. Laheij AMGA, de Soet JJ, von dem Borne PA et al (2012) Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer* 20:3231–3240. <https://doi.org/10.1007/s00520-012-1463-2>
32. Carvalho DE, Souza WDE (2006) Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. *Int J Radiat Biol* 82:658–668. <https://doi.org/10.1080/09553000600930095>
33. Cai Y, Wang W, Liang H et al (2013) Keratinocyte growth factor pretreatment prevents radiation-induced intestinal damage in a mouse model. *Scand J Gastroenterol* 48:419–426. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.772227>
34. Dublineau I, Lebrun F, Grison S, Griffiths NM (2004) Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following. *Can J Physiol Pharmacol* 93:84–93. <https://doi.org/10.1139/Y03-129>
35. Shukla PK, Gangwar R, Manda B et al (2016) Rapid disruption of intestinal epithelial tight junction and barrier dysfunction by ionizing radiation in mouse colon in vivo: protection by. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 705–715. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00314.2015>
36. Thiagarajah JR, Gourmelon P, Gri NMY et al (2000) Radiation induced cytochrome c release causes loss of rat colonic fluid absorption by damage to crypts and pericryptal myofibroblasts. *Gut* 47(5):675–684. <https://doi.org/10.1136/gut.47.5.675>
37. Balda MS, Matter K (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1788:761–767. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2008.11.024>
38. Wang J-F, Liu C, Zhang Q, Huang G-H (2013) Research progress in the radioprotective effect of the canonical Wnt pathway. *Cancer Biol Med* 10:61–71. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2013.02.001>
39. Zhao J, Kim K-A, De Vera J et al (2009) R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/ β -catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2331–2336. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805159106>
40. Rosado P, Lequerica-Fernández P, Fernández S et al (2018) E-cadherin and β -catenin expression in well-differentiated and moderately-differentiated oral squamous cell carcinoma: relations with clinical variables. *Br J Oral Maxillofac Surg* 51:149–156. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.03.018>
41. Fujii M, Katase N, Lefevre M et al (2011) Dickkopf (Dkk)-3 and β -catenin expressions increased in the transition from normal oral mucosal to oral squamous cell carcinoma. *J Mol Histol* 42:499. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9357-z>
42. Betlazar C, Middleton RJ, Banati RB, Liu G (2016) The impact of high and low dose ionising radiation on the central nervous system. *Redox Biol* 9:144–156. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.002>
43. Greene-Schloesser D, Kooshki M, Payne V et al (2014) Cellular response of the rat brain to single doses of 137 Cs γ rays does not predict its response to prolonged “biologically equivalent” fractionated doses. *Int J Radiat Biol* 90:790–798. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.933915>
44. Lee E, Won J, Yoo H et al (2015) Single high-dose irradiation aggravates eosinophil-mediated fibrosis through IL-33 secreted from impaired vessels in the skin compared to fractionated irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 464:20–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.081>
45. Dörr W (1997) Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: asymmetry loss, acceleration of stem-cell divisions and abortive divisions. *Int J Radiat Biol* 72:635–643

8.3.2. Sylvia Gruber, Marlene Arnold, **Nilsu Cini**, Victoria Gernedl, Sabine Hetzendorfer, Lisa-Marie Kowald, Peter Kuess, Julia Mayer, Susanne Morava, Stephanie Pfaffinger, Andreas Rohorzka, Wolfgang Dörr.

Radioprotective effects of dermatan sulfate in a preclinical model of oral mucositis – targeting inflammation, hypoxia and junction proteins without stimulating proliferation. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6). pii: E1684.





Article

Radioprotective Effects of Dermatan Sulfate in a Preclinical Model of Oral Mucositis—Targeting Inflammation, Hypoxia and Junction Proteins without Stimulating Proliferation

Sylvia Gruber ^{1,2,*}, Marlene Arnold ², Nilsu Cini ³, Victoria Gernedl ², Sabine Hetzendorfer ², Lisa-Marie Kowald ², Peter Kuess ¹, Julia Mayer ², Susanne Morava ², Stephanie Pfaffinger ², Andreas Rohorzka ² and Wolfgang Dörr ²

¹ Christian Doppler Laboratory for Medical Radiation Research for Radiation Oncology, Medical University / AKH Vienna, 1090 Vienna, Austria; peter.kuess@meduniwien.ac.at

² Department of Radiation Oncology, Applied and Translational Radiobiology, Medical University Vienna, 1090 Vienna, Austria; marlene.arnold@meduniwien.ac.at (M.A.); victoria.gernedl@meduniwien.ac.at (V.G.); sabine.hetzendorfer@meduniwien.ac.at (S.H.); lisa_kowald@hotmail.com (L.-M.K.); julia_mayer92@gmx.at (J.M.); susanne.morava@meduniwien.ac.at (S.M.); stephanie.pfaffinger@meduniwien.ac.at (S.P.); andreasrohrzka@gmx.at (A.R.); wolfgang.doerr@meduniwien.ac.at (W.D.)

³ Department of Radiation Oncology, Kartal Dr. Lutfi Kırdar Training and Research Hospital, Health Science University, 34722 Istanbul, Turkey; nilsu.cini@gmail.com

* Correspondence: sylvia.gruber@meduniwien.ac.at

Received: 11 May 2018; Accepted: 23 May 2018; Published: 6 June 2018



Abstract: Oral mucositis is the most frequently occurring early side effect of head-and-neck cancer radiotherapy. Systemic dermatan sulfate (DS) treatment revealed a significant radioprotective potential in a preclinical model of oral mucositis. This study was initiated to elucidate the mechanistic effects of DS in the same model. Irradiation comprised daily fractionated irradiation (5×3 Gy/week) over two weeks, either alone (IR) or in combination with daily dermatan sulfate treatment of 4 mg/kg (IR + DS). Groups of mice ($n = 5$) were sacrificed every second day over the course of 14 days in both experimental arms, their tongues excised and evaluated. The response to irradiation with and without DS was analyzed on a morphological (cell numbers, epithelial thickness) as well as on a functional (proliferation and expression of inflammation, hypoxia and epithelial junction markers) level. The mucoprotective activity of DS can be attributed to a combination of various effects, comprising increased expression of epithelial junctions, reduced inflammation and reduced hypoxia. No DS-mediated effect on proliferation was observed. DS demonstrated a significant mucositis-ameliorating activity and could provide a promising strategy for mucositis treatment, based on targeting specific, radiation-induced, mucositis-associated signaling without stimulating proliferation.

Keywords: oral mucositis; mouse model; dermatan sulfate; fractionation; inflammation; hypoxia; cellular junctions

1. Introduction

Despite constant technological advances in conformal radiotherapy, normal tissue effects of radiotherapy cannot be avoided and remain a prominent clinical factor. During radiotherapy of the head-and-neck region, oral mucositis is the most frequently occurring early normal tissue complication. The mucosal radiation response, characterized by painful ulcerative lesions throughout the oral

cavity, occurs in the majority of patients and is associated with numerous debilitating effects [1]. The patient's quality of life is significantly reduced due to mucositis-associated pain, reduced speaking- and swallowing capabilities; the latter can necessitate parenteral nutrition. Furthermore, oral mucositis patients are at risk of local and systemic infections due to the mucosal barrier breakdown [2,3]. Up to date the treatment of oral mucositis solely relies on preventive strategies such as improvement of oral hygiene and mitigation of pain [4,5]. The only biology-based treatment option for oral mucositis so far is the recombinant human keratinocyte growth factor (KGF) palifermin. Administration is recommended only for patients undergoing myoablative irradiation regimes [6]. Due to palifermin being a mitogen for normal and some malignant epithelial cells, including those of the head-and-neck, tumor protection is a major concern. Despite studies indicating no proliferative stimulation of head-and-neck squamous cell carcinoma cells by exogenous KGF [7,8], the concern of tumor protection and the significant costs of palifermin so far hindered its recommendation for head-and-neck cancer patients [9,10]. Ideally, any mitigative approach to oral mucositis is not based on growth factor activity, but rather on other mucositis-relevant biological mechanisms. With recent advances in the field of molecular radiobiology, insights in the molecular events of mucositis development have been gained. The paradigm shifts from mucositis being based solely on radiation-induced inhibition of proliferation and cell death, with subsequent mucosal hypoplasia and ulceration to a multifactorial process [11].

Recently, we described the mucoprotective effect of systemic dermatan sulfate (DS) treatment in a preclinical model of oral mucositis [12]. DS belongs to the family of glycosaminoglycans (GAGs), complex polysaccharides composed of alternating units of uronic acid and hexosamines, with varying amounts of sulfate groups in different positions. Although the polysaccharide backbones of GAGs are linear and relatively simple, sulfation and epimerization give some GAGs, including DS, considerable structural variability, leading to a variety of biological activities that could form the basis of the observed mucoprotective effects [13]. DS exists either as a solute or linked to a protein core, constituting a proteoglycan. Both interact with a multitude of proteins, inducing profound effects on various physiological processes, such as inflammation, coagulation, extracellular matrix assembly and wound healing. DS has been shown to be released in high concentrations during wound repair, promoting cell proliferation and migration via basic fibroblast growth factor (FGF-2) and keratinocyte growth factor KGF [14]. Although being a promising candidate for multiple indications, clinical application of DS are scarce and so far only constitute wound healing and anti-coagulatory strategies. Recently, an in-vitro study demonstrated stimulation of wound repair for a DS containing glycosaminoglycan mixture, which was based on stimulated cell migration and reduced inflammation [15]. Furthermore, DS was evaluated as an anti-coagulation strategy for patients with bleeding disorders, yielding a predictable dose response and overall clinical safety [16,17]. Both, inflammation and hypoxia, as well as chemokine and cytokine release have recently been implicated in mucositis development and therefore present targeted treatment options [18–20]. Based these properties, DS was initially chosen to be tested as a mucositis mitigation strategy.

The present study was initiated to elucidate the mechanistic effects of DS in the preclinical mucositis mouse model with emphasis on mucositis-associated protein expression and signaling changes. Epithelial morphology, proliferation and signaling were assessed over the course of two weeks of fractionated irradiation with and without systemic DS administration. Interleukin-1 β (IL-1 β) is a potent cytokine and regulator of the innate immune response, released early during mucositis development [20,21], stimulating its own synthesis and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) activation via feedback loops. NF- κ B is an evolutionary conserved signaling module, inducible by either the canonical (classical) or the alternative pathway. Canonical NF- κ B signaling is activated by pro-inflammatory stimuli and appears to be crucial for mucositis development [22]. The five members of the mammalian NF- κ B family constitute p50, p52, RelA (p65), RelB and c-Rel, forming hetero- or homodimers, bound to inhibitory proteins in the cytoplasm [23]. Upon stimulation, the NF- κ B inhibitory complex is degraded and NF- κ B dimers translocate to the nucleus, where they bind target gene promoter or enhancer sequences and activate transcription.

Predominant complexes of the canonical pathway are p50:p65 and p50:c-Rel [24]. Hence, p50, being a component of both predominant dimers, was chosen to be evaluated as a NF- κ B marker in this study.

Early hypoxia during fractionated irradiation was recently described to be associated with mucositis development [19,25]. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and glucose transporter-1 (GLUT1) were analyzed as markers of hypoxia. An intricate interaction between hypoxia and inflammatory changes has been proposed for mucositis development [26,27]. Mucosal integrity is maintained via tight and adherens junction complexes. Tight junctions, composed of claudin and occludin proteins, regulate epithelial permeability and integrity. In adherens junctions, the transmembrane proteins e-cadherin and β -catenin together with α -catenin form complexes that bind the actin cytoskeleton force-dependently. This conditions the polarized epithelial phenotype, cell-cell and cell-matrix adhesion [28,29]. To evaluate the effect of DS on epithelial integrity, tight as well as adherens junction markers, claudin-1, occludin, e-cadherin and β -catenin were assessed in the present study.

2. Results

2.1. Epithelial Morphology and Proliferation

Epithelial cell numbers of untreated and unirradiated control specimen were normalized to 100%. Irradiation alone gradually reduced cell numbers until day 6. The onset of repopulation in the beginning of the second treatment week resulted in a stabilization of cell numbers throughout the rest of the treatment time (Figure 1a). Irradiation rapidly abolished proliferation, evident by a reduction of Bromodeoxyuridine BrdU-positive cell from 8% in control specimen to 0.5% on day 2. The onset of repopulation led to a recovery of normal proliferation from the second treatment week onwards (Figure 1b). Epithelial thickness, composed of the germinal-, the functional-, and the fully keratinized superficial layer (Figure 1d), was not affected by irradiation (Figure 1c). Additional DS application had no effect on epithelial BrdU incorporation but, however, increased epithelial cell numbers throughout the study period. Significantly higher cell numbers were found on day 0 ($p \leq 0.001$) after DS pretreatment from day-3 onwards, on day 4 ($p \leq 0.001$), day 6 ($p = 0.005$), day 10 ($p = 0.018$) and day 12 ($p = 0.007$). No significant effects of DS on epithelial thickness were observed throughout the study period.

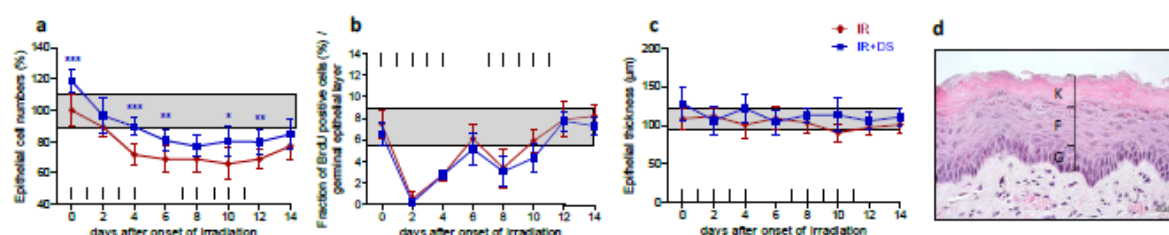


Figure 1. Effect of DS on irradiation-induced changes of epithelial morphology and proliferation. Epithelial cell numbers (a); proliferation (b) and epithelial thickness (c) were assessed over the course of 14 days of fractionation with a daily dose of 3 Gy without and with additional systemic DS treatment. The epithelium is composed of a germinal layer (G), a functional layer (F) and a fully keratinized superficial layer (K). Cell number and proliferation were assessed in the germinal and the functional layer. To evaluate the epithelial thickness, germinal, functional and keratinized layer dimensions were combined (d). Data points represent the mean of 5 animals, error bars indicate ± 1 standard deviation (SD). The shaded areas illustrate the mean (± 1 SD) from 5 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, Scale bar = 20 μ m.

2.2. Epithelial Cell Junctions

2.2.1. Adherens Junctions— β -Catenin and e-Cadherin

Control specimen displayed approximately 85% of germinal and 60% of functional epithelial cells positive for β -catenin and e-cadherin. With the onset of fractionation, the expression of both adherens junction marker proteins increased to roughly 100% in the germinal tissue compartment (Figure 2a,e) and to levels between 75% and 83% in the functional layer (Figure 2c,g). β -catenin staining intensity increased from 2 arbitrary units (a.u.) on day 0 to 2.7 a.u. (days 10 to 14) in the germinal compartment (Figure 2b) and from 1.2 a.u. (day 0) to 2.3 a.u. (day 10) in the functional layer (Figure 2d). E-cadherin staining intensity increased from 1.8 a.u. (day 0) to 2.8 a.u. (day 12) in the germinal layer (Figure 2f) and from 1.1 a.u. (day 0) to 2.4 a.u. on day 12 in the functional layer (Figure 2h).

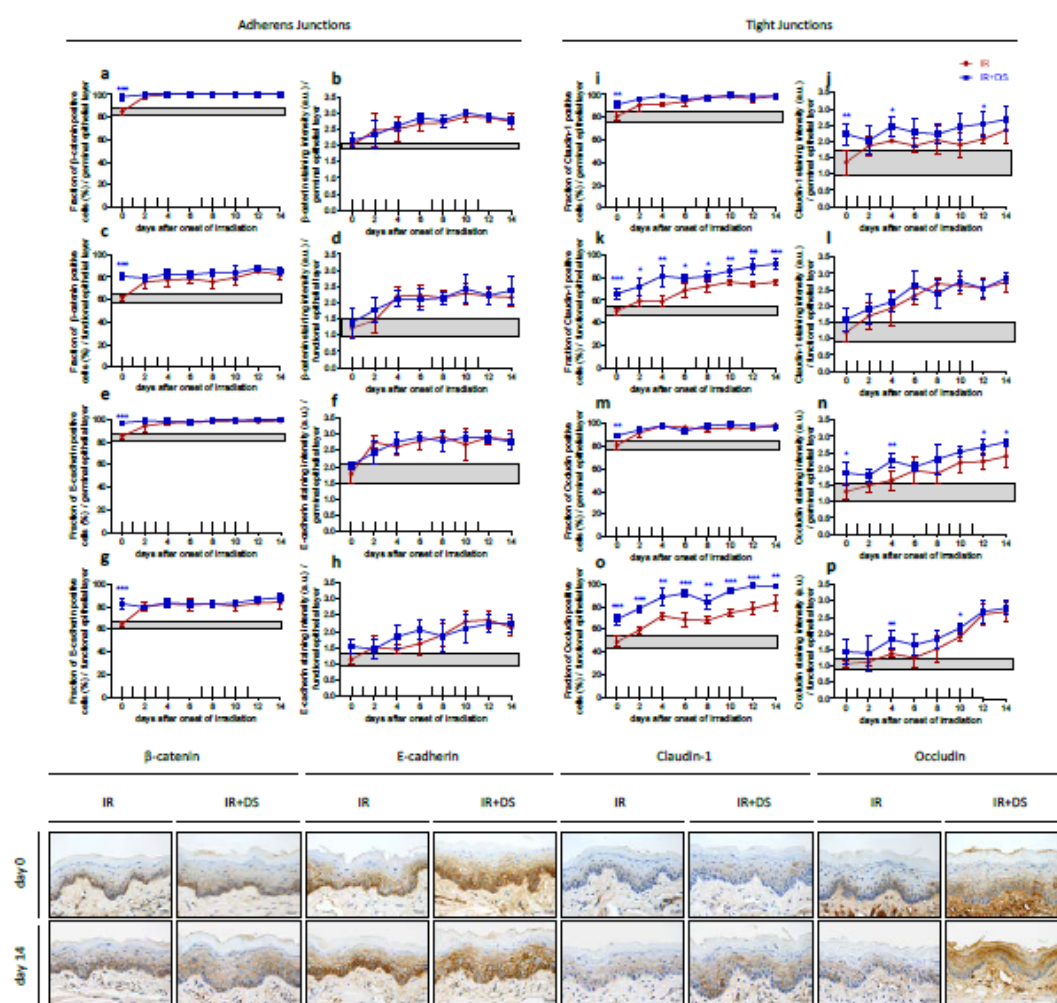


Figure 2. Effect of DS on irradiation-induced epithelial junctions. The relative number of adherens junction marker β -catenin and e-cadherin- (a–h) or tight junction marker claudin-1 and occludin positive epithelial cells (i–p) and their respective staining intensity were analyzed, in the germinal and functional compartments, respectively. Data points represent the mean of 5 animals, error bars indicate ± 1 SD. The shaded areas illustrate the mean (± 1 SD) from 5 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae. Histophotographs illustrate representative junction marker staining in on day 0 and after irradiation without and with DS on day 14 of the study period. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, Scale bar = 20 μ m.

Additional DS treatment increased the expression of β -catenin to 97% ($p \leq 0.001$) and e-cadherin to 98% ($p \leq 0.001$) in the germinal epithelial layer during the pretreatment period starting on day-3 before the first fraction. Afterwards, expression levels of about 100% were observed with no difference to irradiation alone. In the functional layer, DS treatment during day-3 and 0 increased the expression of both adherens junction markers to 81% (β -catenin, $p \leq 0.001$) and 83% (e-cadherin, $p \leq 0.001$), respectively. From day 2 onwards, β -catenin and e-cadherin expression levels between 79% (day 2) and 88% (day 12 and day 14, maxima), with no significant difference to irradiation alone. The irradiation-induced increase of the staining intensity was not influenced by additional DS treatment for both adherens marker proteins.

2.2.2. Tight Junctions—Claudin-1 and Occludin

In control specimen, 80% of germinal epithelial cells expressed claudin-1 and 81% expressed occludin. With the onset of fractionation, the percentage increased to roughly 95% for both proteins from day 4 onwards. In the functional compartment, 50% of cells expressed claudin-1 and 46% were found to be positive for occludin. During fractionation, claudin-1 expression increased to a maximum of 76% on day 10 (Figure 2i). Also occludin expression increased during irradiation treatment. A maximum of 83% was found on day 14 (Figure 2m). In the germinal layer, claudin-1 as well as occludin staining intensity increased from 1.4 a.u. on day 0 to 2.4 a.u. on day 14 (Figure 2j,n). In the functional tissue compartment, the staining intensity for both, claudin-1 and occludin, increased from 1.2 a.u. (day 0) to 2.7 a.u. (day 14) (Figure 2l,p).

Additional DS treatment led to an upregulation of both, claudin-1 and occludin in both tissue compartments already during the 3 days pretreatment. In the germinal epithelial layer, the only significant differences between radiation treatment alone and radiation plus DS were found on day 0 (claudin-1, $p = 0.008$ and occludin, $p = 0.006$).

In the functional epithelium, additional DS treatment significantly upregulated tight junction marker expression on every time point investigated. Both, claudin-1 and occludin were upregulated 15% (claudin-1, $p = 0.001$) and 20% (occludin, $p \leq 0.001$) on day 0 due to the three days DS pretreatment compared to radiotherapy alone. Afterwards, DS-mediated claudin-1 upregulation was most pronounced on days 10 to 14. On day 10, 86% of functional epithelial cells were claudin-1 positive compared to 76% in mice receiving irradiation treatment only ($p = 0.003$), 90% vs. 74% on day 12 ($p = 0.002$) and 92% vs. 76% on day 14 ($p = 0.0001$). The highest occludin expression levels were found likewise on days 10 to 14 with 94% (IR + DS) vs. 76% (IR) on day 10 ($p \leq 0.001$), 99% (IR + DS) vs. 78% (IR) on day 12 ($p \leq 0.001$) and 98% vs. 83% on day 14 ($p = 0.003$).

In the germinal epithelial layer, DS increased the staining intensity of claudin-1 significantly on day 0 ($p = 0.005$), day 4 ($p = 0.015$) and day 12 ($p = 0.043$). No significant staining intensity differences were observed in the functional layer. Occludin staining intensity was significantly increased in the DS-treated experimental arm on day 0 ($p = 0.022$), day 4 ($p = 0.008$), day 12 ($p = 0.023$) and 14 ($p = 0.0032$) in the germinal layer and on days 4 ($p = 0.008$) and 10 ($p = 0.032$) in the functional tissue compartment.

2.3. Inflammation

2.3.1. Epithelial NF- κ B Expression

In control specimen, 50% of germinal and 68% of functional cells were positive for NF- κ B p50. Expression increased during fractionation to a maximum of 89% in the germinal (Figure 3a) and to 93% in the functional epithelial layer on day 12 (Figure 3c). Additional DS administration reduced the NF- κ B expression in the germinal layer on days 8 to 12. Significant differences were found on days 10 ($p = 0.017$) and days 12 ($p = 0.015$). No significant effect of DS treatment on the functional epithelial NF- κ B expression was observed. The staining intensity stayed largely within control ranges throughout the study time in both epithelial compartments (Figure 3b,d).

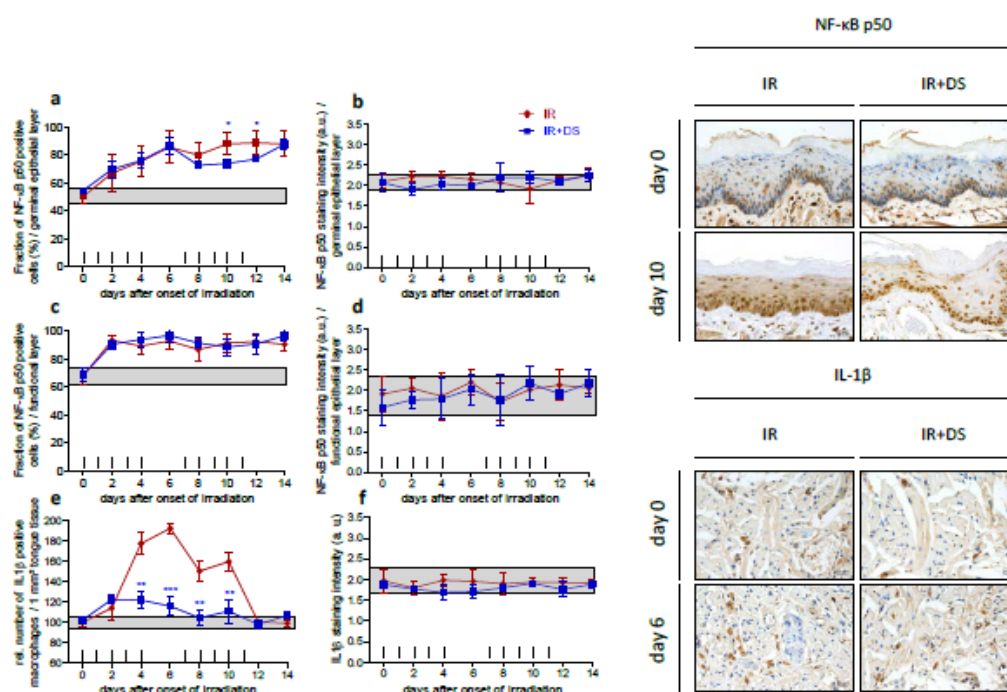


Figure 3. Effect of DS on irradiation-induced inflammatory changes. The relative number of NF- κ B p50 positive epithelial cells and their respective staining intensity were analyzed in the germinal (a,b) and functional compartments of the lower tongue epithelium, respectively (c,d); IL-1 β expression occurred exclusively in macrophages, which were scored in the deeper tongue tissue (e,f). Data points represent the mean of 5 animals, error bars indicate ± 1 SD. The shaded areas illustrate the mean (± 1 SD) from 5 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae. Histophotographs illustrate representative inflammatory marker staining on day 0 and after irradiation without and with DS without and with DS treatment on day 10 (NF- κ B) and day 6 (IL-1 β) of the study period. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, Scale bar = 20 μ m.

2.3.2. IL-1 β Positive Macrophages

The number of IL-1 β positive macrophages in control specimen was normalized to 100%. Within the first week of fractionation, the number of IL-1 β positive macrophages peaked on day 6 with 193% of the control value. The relative number of IL-1 β positive macrophages gradually decreased until normal values were restored on day 12. Additional DS application reduced the relative number of IL-1 β positive macrophages significantly on day 4 (178% IR vs. 122% IR + DS, $p = 0.003$, day 6 (193% IR vs. 116% IR + DS, $p \leq 0.001$), day 8 (151% IR vs. 105% IR + DS, $p = 0.004$) and day 10 (160% IR vs. 111% IR + DS, $p = 0.008$) (Figure 3e). The staining intensity of IL-1 β remained within the control range as well as for irradiation with additional DS administration (Figure 3f).

2.4. Hypoxia

2.4.1. HIF-1 α

Fractionated irradiation stimulated a rapid expression increase of HIF-1 α in both epithelial compartments from 40% in control specimen to a maximum of 87% on day 12 (germ. layer) and from 65% to 87% (funct. layer), on day 12 as well. Additional DS treatment reduced the expression significantly on day 10 ($p = 0.002$), day 12 ($p \leq 0.001$) and day 14 ($p = 0.001$) in the germinal epithelium (Figure 4a). A significant DS-mediated reduction of HIF-1 α in the functional layer was observed on day 10 ($p \leq 0.001$) and day 12 ($p \leq 0.001$) (Figure 4c). During fractionation, the HIF-1 α staining intensity increased from 1 a.u. in control specimen to a maximum of 2.4 a.u. in the germinal layer and

from 1.7 a.u. to 2.7 a.u. in the functional epithelium on day 8, respectively. Additional DS treatment reduced the HIF-1 α staining intensity significantly in the germinal epithelium, on day 4 ($p \leq 0.001$) day 6 ($p \leq 0.001$), day 8 ($p \leq 0.001$), day 10 ($p \leq 0.001$) and day 12 ($p = 0.002$) (Figure 4b). In the functional epithelial layer, the HIF-1 α staining intensity was reduced significantly after additional DS treatment on day 10 ($p = 0.002$), day 12 ($p = 0.006$) and day 14 ($p = 0.005$) (Figure 4d).

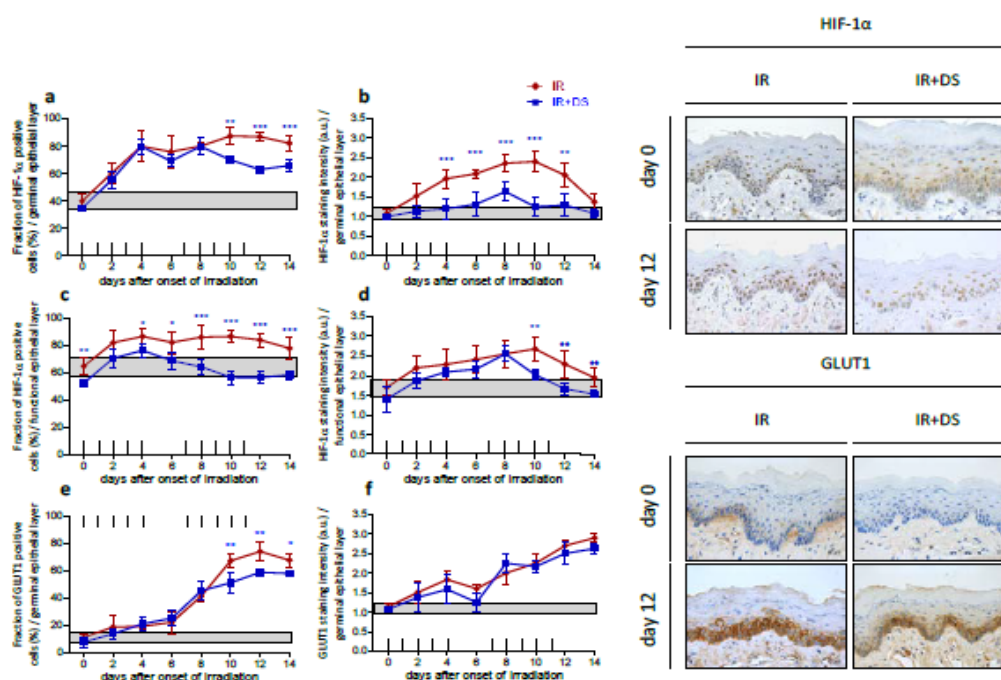


Figure 4. Effect of DS on irradiation-induced hypoxia. The relative number of HIF-1 α positive epithelial cells and their respective staining intensity were analyzed in the germinal (a,b) and functional compartments of the lower tongue epithelium, respectively (c,d); GLUT1 expression was limited to the germinal tissue layer (e,f). Data points represent the mean of 5 animals, error bars indicate ± 1 SD. The shaded areas illustrate the mean (± 1 SD) from 5 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae. Histophotographs illustrate representative HIF-1 α and GLUT1 staining on day 0 and after irradiation without and with DS treatment on day 12 of the study period. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, Scale bar = 20 μ m.

2.4.2. GLUT1

GLUT1 expression was limited to the germinal layer. Fractionation increased the expression from 11% in control specimen to a maximum of 78% on day 12 (Figure 4e). The staining intensity increased from 1.1 a.u. in control samples to 2.9 a.u. on day 12 (Figure 4f). DS treatment reduced the relative number of GLUT1 positive epithelial cells significantly on day 10 ($p = 0.005$), day 12 ($p = 0.005$) and day 14 ($p = 0.022$) but did not influence the GLUT1 staining intensity throughout the treatment time.

3. Discussion

Oral mucositis is the most frequently occurring and dose-limiting early side effect of head-and-neck cancer radio(chemo)therapy. To date, no effective biology-based treatment was implemented in clinical routine [4]. Previously, we have described the radioprotective potential of dermatan sulfate (DS) in a preclinical model of radiotherapy-induced oral mucositis [12]. Systemic administration of 4 mg/kg DS resulted in a significant reduction of mucositis incidence, reduced mucositis duration and prolonged latent times until onset of ulcerations. Multiple administration schedules over varying time intervals have been tested with single dose as well as fractionated

radiotherapy. The DS-associated mucoprotection was found to be most pronounced when DS was given over the longest time interval from day-3 before the onset of fractionation until the last day of two weeks of fractionated irradiation, i.e., day 11. This administration schedule was subsequently chosen for the present study, which was initiated to assess the DS-induced morphological and functional events underlying the observed radioprotective activity.

Fractionated irradiation rapidly and efficiently reduced epithelial proliferation, leading to subsequent mucosal hypoplasia, representing the primary cause of oral mucositis. Oral mucosa is a typical turnover tissue, characterized by proliferation in the germinal tissue compartments and continuous shedding of superficial cells. The equilibrium between proliferation and cell loss sustains a steady-state of the tissue. Radio(chemo)therapy interferes with proliferation in the germinal layer but, however, does not affect the differentiating cells in the functional layer and the rate of cell loss. Hence, ongoing cell shedding leads to epithelial hypoplasia and subsequently to mucosal lesions. Proliferative capacity recovered with the onset of the adaptive epithelial radiation response, repopulation [30], in the end of the first treatment week. Hence, cell numbers stabilized for the rest of the study period. This early phase of mucositis development was accompanied by inflammation and hypoxia, concordant to current literature [18–20,25,31,32]. We observed significant augmentation of epithelial junctions in the DS-treated experimental arm, indicating a DS-mediated reinforcement of epithelial integrity and cohesion. Likely, this presents the main parameter of the DS-mediated radioprotective effect in our preclinical model. Increased cellular conjunction presumably leads to a stronger anchorage within the epithelium, thus translating in increased cell numbers already prior to irradiation and during the treatment time without stimulating proliferation. Increased mucositis latency and shortened ulcer duration in the DS-treated experimental group, as reported previously [12], also indicate such a scenario. Likely, reduced irradiation-induced inflammation and DS-mitigated local hypoxia also contribute to these observations. However, while macrophage-associated IL-1 β expression was systemically reduced, epithelial inflammation was marginally influenced with a significant reduction on two days during the second treatment week only. Likewise, the most pronounced reduction of epithelial hypoxia occurred in the second treatment week. Although the mucositis-mitigating effects of DS could partially be based on reduced inflammation and reduced local hypoxia, the main mechanism appears to be the reinforcement of epithelial cell cohesion based on the upregulation of tight as well as adherens junctions, likely via syndecan-1 (Sdc 1). Sdc 1 is rapidly released after injury, increases DS side chain expression and mediates reepithelialization during wound healing, with DS stimulating KGF function [33,34]. Sdc 1 was recently linked to intestinal mucosal barrier protection via enhancing tight junction protein expression [35]. We hypothesize similar mechanistic events in our model of oral mucositis, with exogenous DS stimulating Sdc 1 activity, which directly activates the expression of junction proteins. The reduced lesion duration we have observed in our previous study could also be based on the DS-mediated stimulation of Sdc 1 and KGF. Furthermore, a DS-mediated inhibition of P-selectin has been shown [36], which could facilitate both, reduced inflammation and ameliorated hypoxia. The latter could in addition be attributed to the DS-mediated activation of antithrombin 3, inhibiting factor Xa, and heparin co-factor 2, selectively inhibiting thrombin [37,38]. It appears that a combination of DS-associated activities advantageously interacted to mitigate radiotherapy-induced oral mucositis. It has been shown that inflammation and hypoxia increase epithelial permeability via reduction of epithelial junction proteins. Suppression of inflammation and hypoxia in turn protected junction complexes [39,40]. Similar synergies are highly likely for DS-mediated effects. Reduced hypoxia and mitigation of inflammation could additionally potentiate DS-mediated junctional protection. Importantly, the mucoprotective effects of DS are not based on stimulation of proliferation.

4. Material and Methods

All experiments were performed according to the current animal welfare legislation with approval by the respective authorities (file No. BMWF 66.009/0039-II/3b/2014, 04/02/2014).

4.1. Animals and Housing

For all experiments, mice of the inbred C3H/Neu strain from the breeding colony of the Department of Biomedical Research, Medical University Vienna, were used. Mice of both genders were included in the experiments. Mice were housed in a conventional environment with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) and a day/night rhythm of 12 h. The animals were housed in Makrolon® cages, 1284L Eurostandard Type II L with a floor area of 530 cm^2 (Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Germany), maximum 5 animals per cage, on aspen wood bedding (ABEDD-LAB and VET Service GmbH, Vienna, Austria) and had free access to standard maintenance diet (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) and fresh water ad libitum from standard Perspex drinking bottles. The age of the mice at the onset of the experiments ranged from 8 to 12 weeks.

4.2. Irradiation

For all irradiation procedures, a YXLON Maxishot X-ray unit (Yxlon International X-ray GmbH, Hamburg, Germany) was used. Dosimetric commissioning was performed for the irradiation set-up. Standard dosimetric quality assurance was performed regularly and the dose-rate was found to be constant. Adjustment of the irradiation time thus defined the delivered dose.

Fractionated irradiation with 3 Gy per day was given to the whole snouts of the animals. Un-anaesthetized animals were guided into a set-up of plastic tubes (inner diameter 2 cm). The snouts were positioned in conical holes ($10\text{ mm} \rightarrow 6\text{ mm}$) of a Perspex block at the front end of the tubes. The rear ends were closed to prevent withdrawal of the animals. The bodies of the mice were shielded caudally from a plane from the eyes to the throat with 12 mm of the Pb-Bi-Sn alloy MCP-96. The treatment volume thus included the snouts with the entire tongue. The set-up for simultaneous irradiation of 8 animals was positioned in a standardized way in the central beam of the irradiation device. For fractionated irradiation, the YXLON Maxishot device was operated at 200 kV with a tube current of 20 mA and a focus size of 5.5 mm. A 4 mm Al and 0.6 mm Cu filter was used, which resulted in a dose rate of ca. 1 Gy/min at the focus-to-skin distance of 45.5 cm. The dose homogeneity between the individual snout positions was $3.2 \pm 0.5\%$. The beam direction was vertical.

4.3. Experimental Protocol

The study comprised two experimental arms: irradiation alone (IR) and irradiation in combination with DS administration (IR + DS). DS (Sigma Aldrich, MO, USA, Cat No. C3788), dissolved in saline at a concentration of 1 mg/mL, was administered subcutaneously at a dose of 4 mg/kg from day-3 until the day before sacrifice; on irradiation days, the drug was given two hours after irradiation in the IR + DS arm. In both arms, groups of animals ($n = 5$) were sacrificed every second day, and their tongues excised at the base for further investigations. On the day of sacrifice, neither irradiation nor DS treatment was given. Five untreated and unirradiated mice served as a control group. The experimental protocol is illustrated in Figure 5.

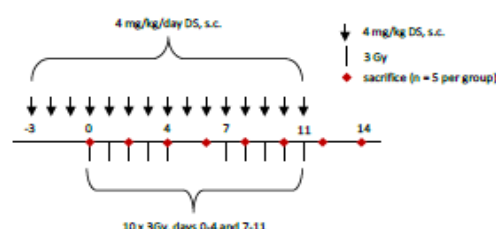


Figure 5. Experimental design. Daily fractionated irradiation was given in 10 fractions with 3 Gy per day over two weeks, including an irradiation-free weekend (days 5 and 6). Irradiation was either applied alone (group: IR) or in combination with daily 4 mg/kg dermatan sulfate (DS) treatment from day-3 before the start of irradiation (day 0) until sacrifice (group: IR + DS). 5 animals per experimental group were sacrificed in two days intervals.

4.4. Immunohistochemistry

Stainings were performed using the Leica Bond RX Automated Stainer (Leica Products/Equipment, Leica Microsystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA). The protocol used contained 30 min heating at 95 °C, dewaxing with the Leica Bond Dewax solution (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA; Cat No. AR9222), antigen retrieval with the Bond Epitope Retrieval 1 solution (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA; Cat No. AR9961) and blocking of unspecific binding sites with 2% goat serum. Primary antibody binding was visualized with diaminobenzidine chromogen and a hematoxylin counterstain, using the Leica Bond Refine Detection kit (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA; Cat No. DS9800). Primary antibodies were diluted in the Leica Bond Antibody Diluent buffer (Leica Biosystems, Inc., Buffalo Grove, IL, USA; Cat No. AR9352) as follows: Anti-BrdU (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 6671; rabbit polyclonal) 1:400, anti-Claudin-1 1:200 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 15098; rabbit polyclonal), anti-Occludin 1:200 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 222691; rabbit polyclonal), anti-E-cadherin 1:3000 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 76055; rabbit polyclonal), anti- β -catenin 1:700 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 2365; rabbit polyclonal), anti-IL-1 β (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; Cat No. NBP1-19775; rabbit polyclonal) 1:700, anti-NF- κ B p50 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 7971; rabbit polyclonal) 1:100, anti-GLUT-1 1:600 (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 652; rabbit polyclonal) and anti-Hif-1 α (Abcam, Cambridge, MA, USA; Cat No. 2185; rabbit polyclonal) 1:400.

4.5. Histological Analyses

Histological examination was performed with an Axio Lab.A1 HAL 35 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, USA) at a 400 $\times$ magnification using an optical grid. The number of nucleated cells in the germinal and the functional (postmitotic) epithelial layer were counted per microscopic field (500 μ m). Cellular morphology allowed a differentiation between germinal and functional tissue compartments. The total epithelial nucleated cell number was calculated as the sum of the germinal and functional values. Epithelial thickness was determined at two representative positions per section. Cell numbers and epithelial thickness of control specimen were set to 100%. Further values of irradiation-induced and/or DS-induced changes were calculated and are shown in relation to the control values. Epithelial cellularity, epithelial thickness and the fraction of cells positively stained for epithelial markers was determined in at least 5 microscopic fields, which corresponds to at least 2.5 mm epithelial length. BrdU incorporation, the expression of cell junction markers as well as hypoxia markers and NF- κ B was assessed in the epithelium of the lower mouse tongue. The fraction of marker positive cells was evaluated separately for the germinal and the functional epithelial layers. IL-1 β was not expressed by epithelial cells but in macrophages and hence was analyzed in the submucosal tongue tissue. Additionally, to the number of marker-positive cells, the respective staining intensity, corresponding to the amount of protein expressed, was assessed semiquantitatively with a score of arbitrary units (a.u.) from 0 (no signal), 1 (weak signal), 2 (intermediate signal) to 3 (strong signal). Epithelial morphology, marker-positive cells and their respective staining intensity were evaluated by 2 independent and experienced researchers in a blinded fashion after extensive training. Intra-observer variability was found to be negligible. Inter-observer variability was low and results in good agreement.

4.6. Statistical Analysis

For statistical analysis, the SPSS statistical software (IBM SPSS Statistics 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. Mean values and standard deviation (SD) were calculated for each animal, which then served to calculate the mean and standard error for each experimental group. The analysis of variance (one-way ANOVA) was used to test for the significance of a difference between the mean values. A p -value of ≤ 0.05 was regarded statistically significant.

5. Conclusions

Dermatan sulfate has a significant mucositis-ameliorating potential. The radioprotective effect appears to be based mainly on an augmentation of epithelial junctions and thus strengthened epithelial integrity and reduced cell loss. No DS-associated stimulation of proliferation was observed. DS-mediated reduction of inflammation and local hypoxia may contribute to the mucoprotective activity. However, the impact of systemic DS treatment on the tumor radiation response needs to be assessed before DS may be considered in clinical studies.

Author Contributions: S.G. and W.D. designed the experiments, S.G. supervised and coordinated the analyses of marker proteins, which were performed by M.A. and S.P. for inflammation, S.H. for proliferation, N.C., L.-M.K., A.R. and J.M. for junctions and V.G. and S.M. for hypoxia. P.K. commissioned the X-ray irradiation source and performed dosimetric procedures.

Compliance with Ethical Guidelines: All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed. All experiments were performed with approval by the respective authorities (Austrian Federal Ministry of Education, Science and Research, file No. 66.009/0039-II/3b/2014).

Acknowledgments: The financial support by the Federal Ministry for Digital and Economic Affairs and the National Foundation for Research, Technology and Development is gratefully acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Elting, L.S.; Keefe, D.M.; Sonis, S.T.; Garden, A.S.; Spijkervet, F.K.L.; Barasch, A.; Tishler, R.B.; Canty, T.P.; Kudrimoti, M.K.; Vera-Llonch, M.; et al. Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: Demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer* **2008**, *113*, 2704–2713. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Groeger, S.; Meyle, J. Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontology* **2015**, *69*, 46–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Laheij, A.M.G.A.; de Soet, J.J.; von dem Borne, P.A.; Kuijper, E.J.; Kraneveld, E.A.; van Loveren, C.; Raber-Durlacher, J.E. Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support. Care Cancer* **2012**, *20*, 3231–3240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Moslemi, D.; Mohammadi, A.; Taheri, M. Management of chemo/radiation-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer: A review of the current literature. *Radiother. Oncol.* **2016**, *120*, 13–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Ripamonti, C.I.; Murphy, B.A.; Russi, E.G. Pain management in head and neck cancer patients undergoing chemo-radiotherapy: Clinical practical recommendations. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2015**, *99*, 100–103. [\[CrossRef\]](#)
6. Stiff, P. Mucositis associated with stem cell transplantation: Current status and innovative approaches to management. *Bone Marrow Transpl.* **2001**, *27*, 3–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Ning, S.; Shui, C.; Khan, W.; Benson, W.; Lacey, D.; Knox, S. Effects of keratinocyte growth factor on the proliferation and radiation survival of human squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1998**, *40*, 177–187. [\[CrossRef\]](#)
8. Hille, A.; Gröger, S.; Christiansen, H.; Wolff, H.A.; Volkmer, B.; Lehmann, J.; Dörr, W.; Rave-Fränk, M. Effect of tumour-cell-derived or recombinant keratinocyte growth factor (KGF) on proliferation and radioresponse of human epithelial tumour cells (HNSCC) and normal keratinocytes in vitro. *Radiat. Environ. Biophys.* **2010**, *49*, 261–270. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Marshall, M.E.; Hinz, T.K.; Kono, S.A.; Singleton, K.R.; Bichon, B.; Ware, K.E.; Marek, L.; Frederick, B.A.; Raben, D.; Heasley, L.E. Fibroblast growth factor receptors are components of autocrine signaling networks in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 5016–5025. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Vadhan-Raj, S.; Goldberg, J.D.; Perales, M.-A.; Berger, D.P.; Brink, M.R.M. Clinical applications of palifermin: Amelioration of oral mucositis and other potential indications. *J. Cell. Mol. Med.* **2013**, *17*, 1371–1384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

11. Cinausero, M.; Aprile, G.; Ermacora, P.; Basile, D.; Vitale, M.G.; Fanotto, V.; Parisi, G.; Calvetti, L.; Sonis, S.T. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 354. [CrossRef] [PubMed]
12. Gruber, S.; Frings, K.; Kuess, P.; Dörr, W. Protective effects of systemic dermatan sulfate treatment in a preclinical model of radiation-induced oral mucositis. *Strahlenther. Onkol.* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
13. Yamada, S.; Sugahara, K.; Özbek, S. Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. *Commun. Integr. Biol.* **2011**, *4*, 150–158. [CrossRef] [PubMed]
14. Trowbridge, J.M.; Rudisill, J.A.; Ron, D.; Gallo, R.L. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7)*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 42815–42820. [CrossRef] [PubMed]
15. Belvedere, R.; Bizzarro, V.; Parente, L.; Petrella, F. The pharmaceutical Device Prisma[®] skin promotes in vitro angiogenesis through endothelial to mesenchymal transition during skin wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1614. [CrossRef] [PubMed]
16. Cofrancesco, E.; Boschetti, C.; Gianese, E.; Cortellaro, M. Dermatan sulfate for the treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) in acute leukaemia: A randomised heparin-controlled pilot study. *Thromb. Res.* **1994**, *74*, 65–75. [CrossRef]
17. Gabella, P.; Ordine, O.; Ordine, O.; Vitale, C.; Berutti, S.; Bagnis, C. Dermatan sulfate: An alternative to unfractionated heparin for anticoagulation in hemodialysis patients. *J. Nephrol.* **2013**, *26*, 158–163. [CrossRef]
18. Agholme, M.B.; Karlsson-sjö, J. Pretherapeutic plasma pro- and anti-inflammatory mediators are related to high risk of oral mucositis in pediatric patients with acute leukemia: A prospective cohort study. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64918. [CrossRef]
19. Gruber, S.; Hamedinger, D.; Bozsaky, E.; Schmidt, M.; Wolfram, K.; Haagen, J.; Habelt, B.; Puttrich, M.; Dörr, W. Local hypoxia in oral mucosa (mouse) during daily fractionated irradiation—Effect of pentoxifylline. *Radiother. Oncol.* **2015**, *116*, 404–408. [CrossRef] [PubMed]
20. Gruber, S.; Bozsaky, E.; Roitinger, E.; Schwarz, K.; Schmidt, M.; Dörr, W. Early inflammatory changes in radiation-induced oral mucositis Effect of pentoxifylline in a mouse model. *Strahlenther. Onkol.* **2017**, *193*, 499–507. [CrossRef] [PubMed]
21. Raber-Durlacher, J.; von Bültzingslöwen, I.; Logan, R.; Bowen, J.; Rahman, A.; Everaus, H. Systematic review of cytokines and growth factors for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support. Care Cancer* **2013**, *21*, 343–355. [CrossRef] [PubMed]
22. Logan, R.M.; Gibson, R.J.; Sonis, S.T.; Keefe, D.M.K. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol.* **2007**, *43*, 395–401. [CrossRef] [PubMed]
23. Hayden, M.S.; Ghosh, S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2195–2224. [CrossRef] [PubMed]
24. Park, M.H.; Hong, J.T. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* **2016**, *5*, 15. [CrossRef] [PubMed]
25. Feng, C.-J.; Guo, J.-B.; Jiang, H.-W.; Zhu, S.X.; Li, C.Y.; Cheng, B.; Chen, Y.; Wang, H.Y. Spatio-temporal localization of HIF-1 α and COX-2 during irradiation-induced oral mucositis in a rat model system. *Int. J. Radiat. Biol.* **2008**, *84*, 35–45. [CrossRef] [PubMed]
26. Balamurugan, K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 1058–1066. [CrossRef] [PubMed]
27. Eltzschig, H.K.; Carmeliet, P. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 656–665. [CrossRef] [PubMed]
28. Tian, X.; Liu, Z.; Niu, B.; Zhang, J.; Tan, T.K.; Lee, S.R.; Zhao, Y.; Harris, D.C.; Zheng, G. e-Cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, *2011*, 567305. [CrossRef] [PubMed]
29. Garcia, M.A.; Nelson, W.J.; Chavez, N. Cell-cell junctions organize structural and signaling networks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a029181. [CrossRef] [PubMed]
30. Dörr, W. Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: Asymmetry loss, Acceleration of stem-cell divisions and Abortive divisions. *Int. J. Radiat. Biol.* **1997**, *72*, 635–643. [CrossRef] [PubMed]
31. Williams, D.A. Inflammatory cytokines and mucosal injury. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2001**, 26–30. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694562> (accessed on 19 September 2014). [CrossRef]

32. Xanthinaki, A.; Nicolatou-galitis, O. Apoptotic and inflammation markers in oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: Preliminary report. *Support. Care Cancer* **2008**, *16*, 1025–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lee, P.H.A.; Trowbridge, J.M.; Taylor, K.R.; Morhenn, V.B.; Gallo, R.L. Dermatan sulfate proteoglycan and glycosaminoglycan synthesis is induced in fibroblasts by transfer to a three-dimensional extracellular environment. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48640–48646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yamaguchi, K.; Tamaki, H.; Fukui, S. Detection of oligosaccharide ligands for Hepatocyte growth factor/Scatter factor (HGF/SF), Keratinocyte growth factor (KGF/FGF-7), RANTES and Heparin cofactor II by neoglycolipid microarrays of glycosaminoglycan-derived oligosaccharide fragments. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 513–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Translocation, B.; Wang, Z.; Li, R.; Tan, J.; Peng, L.; Wang, P. Syndecan-1 acts in synergy with tight junction through STAT3 signaling to maintain intestinal mucosal barrier and prevent. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 1894–1907. [[CrossRef](#)]
36. Kozłowski, E.O.; Pavao, M.S.; Borsig, L. Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 1807–1815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Casu, B.; Guerrini, M.; Torri, G. Structural and conformational aspects of the anticoagulant and antithrombotic activity of heparin and dermatan sulfate. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 939–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pavão, M.S.G.; Aiello, K.R.M.; Werneck, C.C.; Silva, L.C.F.; Valente, A.P.; Mulloy, B.; Colwell, N.S.; Tollefsen, D.M.; Mourão, P.A. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians: Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27848–27857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wang, W.; Xia, T.; Yu, X. Wogonin suppresses inflammatory response and maintains intestinal barrier function via TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF- κ B pathway in vitro. *Inflamm. Res.* **2015**, *64*, 423–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hu, Y.; Yang, B.; Xu, Y.; Jiang, L.; Tsui, C.; Liang, X. FK506 suppresses hypoxia-induced inflammation and protects tight junction function via the CaN-NFATc1 signaling pathway in retinal microvascular epithelial cells. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 6974–6980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

8.4. Tez ile İlgili Konuda Yayımlanamak üzere Kabul Edilen Makale

8.4.1. Nilsu Çini, Sylvia Gruber, Zumre Arıcan Alicıküş, Wolfgang Dörr.

Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by dermatan sulfate: effects on differentiation processes. Strahlentherapie und Onkologie, 2019.

Strahlentherapie und Onkologie

Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by dermatan sulfate: effects on differentiation processes --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	SUON-D-19-00154R1
Full Title:	Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by dermatan sulfate: effects on differentiation processes
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Nilsu Cini, Msc Dokuz Eylül University Health and Science Institute Izmir, TURKEY
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Dokuz Eylül University Health and Science Institute
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Nilsu Cini, Msc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Nilsu Cini, Msc Sylvia Gruber Zumre Arıcan Alicıküş Wolfgang Doerr
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Purpose: During head and neck cancer radiotherapy, oral mucositis is the most frequent early side effect. Systemic dermatan sulfate (DS) administration has been shown to significantly decrease oral mucosal radiation reactions during daily fractionated irradiation (IR) in an established mouse model. The aim of this study was to investigate the mechanism of the oral epithelial differentiation process, during IR alone and in combination with DS treatment in the same mouse model. Methods: Fractionated IR 5x3Gy/week was given to the snouts of mice over two weeks, either alone IR or in combination with daily DS treatment of 4mg/kg (IR+DS). Groups of mice (n=3) were sacrificed every second day over the course of 14 days in both experimental arms. Their tongue was excised and subjected to immunohistochemical processing. Results: In the p16 analysis as a proliferation marker, the difference between IR alone and IR+DS in the germinal (proliferation) layer was not significant, not stimulating the proliferation process. For the p21 analysis as a differentiation marker on the functional (differentiation) layer, the difference between IR alone and IR+DS arms was significant, indicating that DS inhibited the differentiation process. In the cytokeratin (CK) analysis as the indicator of cellular skeletal integrity, the percentage of antibody positive cells was above the normal level in both experimental arms and significantly superior on the IR+DS arm. Conclusion: The mucosal protective activity of DS, instead of stimulating proliferation, is based on prevention of cell loss by a combination of effects leading to the inhibition of cellular differentiation and an increase in the expression of epithelial mechanical strength intercellular mechanical junctions. Keywords: oral mucositis, dermatan sulfate, fractionation, proliferation, differentiation, cellular junctions.

Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by dermatan sulfate: effects on differentiation processes

¹Nilsu Çini*, ²Sylvia Gruber, ³Zumre Arıcan Alıcıküş, ⁴Wolfgang Dörr

1 Department of Radiation Oncology, Kartal Dr. Lutfi Kırdar Training and Research Hospital, Istanbul, Şemsi Denizer Cad. E-5 Karayolu Cevizli Mevkii 34890, Kartal, Istanbul, Turkey. Telephone number: +90-554-8947170 e-mail: nilsucini@gmail.com* <https://orcid.org/0000-0001-6370-6535>

2 Department Radiation Oncology/CD Lab. Med. Radiation Research for Radiation Oncology, Applied and Translational Radiobiology, Medical University/AKH Vienna, Währinger Gürtel 18-20, 1090, Vienna, Austria. e-mail: sylvia.gruber@meduniwien.ac.at <https://orcid.org/0000-0001-5280-1676>

3 Department of Radiation Oncology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Inciralti, 35340, Izmir, Turkey. e-mail: zlarican@yahoo.com

4 Department Radiation Oncology/CD Lab. Med. Radiation Research for Radiation Oncology, Applied and Translational Radiobiology, Medical University/AKH Vienna, Währinger Gürtel 18-20, 1090, Vienna, Austria e-mail: wolfgang.doerr@meduniwien.ac.at <https://orcid.org/0000-0003-1477-6849>

e-mail: nilsucini@gmail.com*

Modulation of radiation-induced oral mucositis (mouse) by dermatan sulfate: effects on differentiation processes

ABSTRACT

Purpose: During head and neck cancer radiotherapy, oral mucositis is the most frequent early side effect. Systemic dermatan sulfate (DS) administration has been shown to significantly decrease oral mucosal radiation reactions during daily fractionated irradiation (IR) in an established mouse model. The aim of this study was to investigate the mechanism of the oral epithelial differentiation process, during IR alone and in combination with DS treatment in the same mouse model. **Methods:** Fractionated IR 5x3 Gy/week was given to the snouts of mice over two weeks, either alone IR or in combination with daily DS treatment of 4 mg/kg (IR+DS). Groups of mice (n=3) were sacrificed every second day over the course of 14 days in both experimental arms. Their tongue was excised and subjected to immunohistochemical processing. **Results:** In the p16 analysis as a proliferation marker, the difference between IR alone and IR+DS in the germinal (proliferation) layer was not significant, not stimulating the proliferation process. For the p21 analysis as a differentiation marker on the functional (differentiation) layer, the difference between IR alone and IR+DS arms was significant, indicating that DS inhibited the differentiation process. In the cytokeratin (CK) analysis as the indicator of cellular skeletal integrity, the percentage of antibody positive cells was above the normal level in both experimental arms and significantly superior on the IR+DS arm. **Conclusion:** The mucosal protective activity of DS, instead of stimulating proliferation, is based on prevention of cell loss by a combination of effects leading to the inhibition of cellular differentiation and an increase in the expression of epithelial mechanical strength intercellular mechanical junctions. **Keywords:** oral mucositis, dermatan sulfate, fractionation, proliferation, differentiation, cellular junctions.

Introduction Oral mucositis is a frequent, often dose-limiting early adverse effect of the head and neck cancer radio(chemo)therapy [1,2], especially when oral cavity and the major salivary glands are in the radiotherapy treatment field [3]. The epithelium of the oral cavity is well suited for its many unique functions, having regional differences in the keratinization of the mucosa [4]. Aside from differences in keratinization, there are regional differences in tissue thickness and cell turnover time. Epithelial homeostasis requires that the rate of cell production equals the rate of desquamation. This concept is known as turnover time [4]. Turnover time also dictates the rate of healing. The balance between epithelial cell production and desquamation has important implications for mucosal health and disease [5]. Proliferation is based on tissue-specific stem cells, which represent a fraction (of

unknown size) of the proliferating cells. Stem cells physiologically divide into one new stem cell (a self-renewing system) and one non-stem daughter cell. The latter can, as a transit cell, undergo a limited number of cell divisions before terminal differentiation and loss at the surface [6]. The cell production, either from stem cell proliferation or transit cell division is limited to the stratum basale and the deeper parts of stratum spinosum; these are depicted as a germinal layer (stratum germinativum). The functional epithelial layer contains the residual part of stratum spinosum and the stratum granulosum, which is characterized by basophilic keratohyalin containing granula [7]. During differentiation, cells increase in size and flatten towards the superficial layer. A finely regulated differentiation program process is characterized by the sequential expression of different proteins, coincident with the phenotypic evolution from basal cell to the mature, nonviable stratum [8]. The stratum superficiale is composed of the stratum corneum where the keratohyalin is converted in keratin and displays final differentiation with complete keratinization [9,10]. Murine oral mucosa presents as a multilayered squamous epithelium, composed of a germinal layer, a functional layer and a superficial layer, is largely comparable to human oral mucosa [11]. Taken together, the oral mucosa represents a perfectly suited model for studying proliferation and differentiation. However, the molecular mechanisms governing mucosal differentiation are still largely unknown [8]. Typical early IR effects are found in turnover tissues, where physiologically permanent cell loss from the differentiated, post-mitotic compartments of the tissue is well balanced by proliferation in the germinal parts of the tissue [12,13]. Following mechanical or chemical interactions, superficial cell loss triggers cell production in the germinal layer [14]. As a consequence of the proliferative impairment, the reduced cellular supply to the differentiated tissue layers results in progressive hypoplasia and, eventually, incomplete cell depletion [15]. The molecular pathogenesis of this ulcerative epithelial process is still unclear, but the involvement of changes in epithelial differentiation processes is highly likely. DS plays an important role in wound healing, like other glycosaminoglycans (GAG) and it binds to Fibroblast Growth Factor (FGF)-2, which stimulates cell proliferation in response to injury [16]. FGF-2 reported to be connected to DS and activated by DS [17] and it functions as a mitogen that signals mesenchymal cell migration, proliferation and differentiation [5]. Furthermore, the underlying mechanisms of DS' mucositis ameliorating action may include modulation of epithelial differentiation, which needs to be defined [16]. The aim of the present study, therefore, is to investigate and characterize oral epithelial differentiation process during daily fractionated IR alone and in combination with DS treatment in the well established same mouse model.

Methods

All underlying in-vivo experiments have been carried out according to the current animal welfare legislation with the approval of the respective authorities (approval no. BMWF66.009/0039-II/3b/2014).

Animals and Housing For all experiments, mice of the inbred C3H/Neu strain from the Department for Biomedical Research of the Medical University of Vienna have been used to acquire the tissue samples used in the present investigation. No gender-related differences have been found in the radiation response of the oral mucosa [18]. Therefore both male and female mice had been included in this study. Mice were housed in conventional environment with controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) and a day/night rhythm of 12/12 h. The animals were housed in Makrolon® cages, 1284 L Eurostandard Type III, with a floor area of 530cm^2 (Techniplast-GmbH, Hohenpeißenberg, Germany), maximum 5 animals per cage, on aspen wood bedding (ABEDD-LAB & VET-Service GmbH, Vienna, Austria) and had free access to standard diet (sniff-Spezialdiäten-GmbH, Soest, Germany) and freshwater ad libitum from standard perspex drinking bottles. The age of the mice at the onset of the experiments ranged from 8 to 12 weeks [11].

Irradiation Technique and Dermatan Sulfate Treatment The study comprises two experimental arms: daily fractionated IR alone and in combination with daily systemic administration of DS IR+DS arm. DS administered IR+DS group over two weeks, from day -3 to 11, IR started at day 0. In two days intervals, groups of animals ($n=3$) were immobilized with 60 mg/kg pentobarbitone sodium, injected intraperitoneally, and were sacrificed by neck dislocation. The experimental design is represented in Fig. 1.

Irradiation Snout IR with a dose of 3 Gy/day, 5 fx/week over 2 weeks, was performed without anaesthesia. IR was performed with an X-ray device (YXLON-Y.TU320-D03, YXLON-International GmbH Hamburg, Germany), with a voltage of 200 kV, a tube-current of 20 mA, a focus size of 5.5 mm and a beam filter of 3 mm Beryllium (Be) and 3 mm Aluminium (Al). The dose rate at the focus-object distance of 45.5 cm was 1.027 Gy/min. [19]. The unanesthetized animals were guided into plastic tubes (inner diameter 2 cm) and their snouts were positioned in the conical hole (10 mm $\rightarrow$ 6 mm) in a Perspex-block, which closed the front end of the tubes. The rear ends were closed to prevent withdrawal of the mice. Five to eight animals were irradiated simultaneously; the dose homogeneity between the individual snout positions was $3.2 \pm 0.5\%$. The beam direction was vertical. The set-up for simultaneous IR of animals was positioned in a standardized way in the central beam of the IR device. An additional 4 mm Al and 0.6 mm Cu beam filter was used. The bodies of the animals were shielded by a 12 mm thick

collimator plate,consisting of lead equivalent MCP-96(HEK-Medizintechnik,Lübeck,Germany).The treatment field encompassed the area from the eyes to the throat,thus including the entire tongue.The mice were irradiated between 10:00am and 1:00pm[20].

DermatanSulfate AdministrationA daily dose of 4mg/kg DS(Sigma-Aldrich,MO,USA,Cat.no.C3788),dissolved in saline at a concentration of 1mg/ml was administered subcutaneously over varying time intervals.On IR days,the drug was administered two hours after IR.

Immunohistochemical staining performed by Leica Biosystems BOND RX for formalin-fixed,paraffin-embedded and cut in 3µm thick tongue sections according to optimized(for the specific tissue)standard protocols.Histological preparation procedures have been reported in detail previously[21].Stainings comprised 30min-incubation at 95°C,dewaxing with Leica Bond Dewax solution(Leica-Biosystems,Inc.,Buffalo,Groove,IL;Cat.no.AR9222),antigen retrieval with BondEpitope Retrieval-1solution(Leica Biosystems,Inc.,Buffalo,Groove,IL;Cat.no.AR9961)and blocking of unspecific binding sites with 2% goat serum.Primary antibody binding was visualized with diaminobenzidinechromogen and a haematoxylin counterstain,using the Leica Bond Refine Detection kit(Leica-Biosystems,Inc.,Buffalo,Groove,IL;Cat no.DS9800).Primary antibodies were diluted in the Leica Bond Antibody Diluent buffer(Leica-Biosystems,Inc.,Buffalo,Groove,IL;USA,Catno.AR9352)as follows[20]:Anti-p16ARC antibody1:50(Abcam,Cambridge,MA,USA;Cat.no.51243;rabbit-monoclonal),Anti-p21Rasantibody1:100(Abcam,Cambridge,MA,USA;Cat.no.86696;mouse-monoclonal)and Anti-Cytokeratin5 antibody1:5000(Abcam,Cambridge,MA,USA;Cat.no.52635;rabbit-monoclonal).

Evaluation of Stained CellsMicroscopic analyses were performed field by the field with an Axio Lab.A1-HAL.35(Carl-Zeiss-Microscopy,LLC,Thornwood,NY,USA)at400×0.65magnification by using a square grid.The lower mouse tongue epithelium was analysed from the tip (field 1) to the end of the tongue.An average five visual fields was evaluated (from 3 to 8).In each visual field, the number of marker-positive cells was normalized to the total number of cells.The fraction of positive cells was evaluated separately for the germinal and the functional epithelial layer.Additionally,the staining intensity,corresponding to the amount of protein expressed,was assessed semi-quantitatively with an arbitrary score from 0(no signal),1(weak signal),2(intermediate signal) to 3(strong signal).Staining intensity was scored per visual

field, not for each marker-positive cell individually. Also epithelial thickness was measured for the germinal, functional and keratin layer of the epithelium measured at two representative positions of the ventral surface of the tongue. Marker-positive cells and their respective staining intensity were evaluated by two independent and experienced researchers in a blinded fashion after extensive training. Intra-observer variability was found to be negligible [20].

Statistics For statistical analysis the SPSS17 statistical software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), for graphical representation GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA), respectively, were used. Mean values and standard deviation (SD) were calculated for each experimental group. The analysis of variance (one-way-ANOVA) was used to test for the significance of a difference between the mean values of experimental arms. A p-value of <0.05 was regarded as statistically significant [20].

Results Representative histo-photographs of immunohistochemical staining for p16, p21 and CK in untreated control mucosa on day0 and on day14 are presented in Fig. 2.

p16 Labeling Index and Staining Intensity

Germinal Layer The percentage of positive cells of p16 within the control group range (91.2-98.2%) in both experimental arms. Significance between experimental arms was only at day12 $p=0.009$ (Fig. 3.A). The staining intensities were deviated from the control group interval (1.6-2.0 a.u.) for the IR only arm at 6th, 10th and 14th days; and for the IR+DS arm at 8th and 14th day. No significant difference (Fig. 3.B).

Functional Layer The percentage of p16 positive cells did not make a significant difference between IR only and IR+DS arms, except day14 $p=0.02$, control group range %89.5-91.2 (Fig. 3.C). The staining intensity was increased in the IR only arm at days 6th, 10th and 14th from the control group range (1-1.2 a.u.). No significant difference (Fig. 3.D).

p21 Labeling Index and Staining Intensity

Germinal Layer The percentage of p21 positive cells was in the control arm range (95.8-97.8%). The minimum value was; for the IR only arm 83.2% on day14 and for the IR+DS arm 89.5% on day0 and day14. Significance was $p=0.04$ (day0), $p=0.003$ (day2) (Fig. 4.A). The staining intensity significant difference between IR only and IR+DS arms was only at day6 $p=0.001$. For the IR+DS, the lowest level on day0, and increased to the control group interval (1.8-2.8 a.u.) at day4 and progressed by decreasing until day14 (Fig. 4.B).

Functional Layer The percentage of p21 positive cells is significantly lower in the IR+DS arm compared to the IR only arm until day10. From the day10 onwards, IR+DS arm proceeded at close values with IR only arm. Significance, between experimental arms was $p=0.001$ (day0), $p=0.002$ (day2), $p=0.016$ (day4), $p=0.001$ (day6), $p=0.008$ (day8). The control

group range was 95.8-97.7%(Fig.4.C).Staining intensity was significantly higher in the IR+DS arm until 10th day when compared with the IR only arm.It was observed that the values for the IR only arm varied within the control group range(1-1.40a.u.).Significance,between experimental arms wasp=0.04(day0),p=0.03(day2),p=0.01(day4),p=0.007(day6),p=0.03(day8)(Fig.4.D).

4.3. Cytokeratin Labeling Index and Staining Intensity

Germinal LayerThe percentage of CK positive cells did not fall below the control group interval(95.2-96.3%)in both arms.The IR+DS armwas significantly higher than the IR only arm except day4.Significance,between experimental arms wasp=0.011(day0),p=0.015(day2),p=0.034(day6),p=0.007(day8),p=0.021(day10),p=0.02(day12) and p=0.00(day14)(Fig.5.A).The staining intensity was significantly higher in the DS-appliedarm,p=0.025(day0),p=0.025(day2),p=0.003(day4),p=0.001(day6),p=0.035(day8),p=0.015(day10),p=0.004(day12).Control group range 1.67-1.33a.u.(Fig.5.B).

Functional Layer The percentage of CK positive cells were near the upper limit of the control group in the IR only arm,while the IR+DS arm did not fall below the control group range(91.9-92.9%).Significantly higher CK positive% was observed untilday14 on IR+DS arm,p=0.001(day0),p=0.028(day2),p=0.001(day4),p=0.002(day6),p=0.003(day8),p=0.04(day10),p=0.022(day12)(Fig.5.C).Also the staining intensity was significantly higher in the DS-applied arm and IR only arm observed in the control group range(1a.u.).The significance between experimental arms wasp=0.016(day2),p=0.024(day4),p=0.000(day6),p=0.000(day8),p=0.015(day10),p=0.000(day12)(Fig.5.D).

4.4. Epithelial Thicknessand Cell Numbers

Epithelial ThicknessThe average epithelial thicknessesfor the IR only arm were 57.5µm;3,59µm(p16);57.9µm(p21)and 55.2µm(CK);for the IR+DS arm were 63.15µm;3,63µm(p16);61µm(p21)and 65.33µm(CK).Significance between experimental arms was,for p16 p=0.04(day6)(Fig.6.A),for p21p=0.03(day14)(Fig.6.B)and for CK p=0.05(day6)(Fig.6.C).DS-applied arm average epithelial thicknesses were higher than the IR only arm for p16, p21 and CK.

Cell Numbers

Total The average total cell numbers for the IR only arm were 349,371 for p16;343 for p21 and 335 for CK;for the IR+DS arm were 328,325(p16);343(p21)and 316(CK).Significance between experimental arms only for p21 p=0,043(day6)(Fig.7.D).Germinal Epithelium The average number of cells in the IR only arm was 233,239(p16);232(p21)and 230(CK);for

1 IR+DS arm were 218,217(p16);226(p21)and 213(CK).Significance between experimental
2 arms only for p21 $p=0.028$ (day6)(Fig.7.E).Functional EpitheliumThe average number of cells
3 in the IR only arm were 116,132(p16);112(p21)and 105(CK);for the IR+DS arm
4 were110,108(p16);117(p21)and 103(CK).Significance between experimental arms only for
5 p16 $p=0.012$ (day6)(Fig.7.C).There is no strong significance between IR only and IR+DS
6 arms for total,germinal and functional cell numbers.
7
8

9
10 DiscussionOral mucositis refers to erythematous and painful ulcerative lesions of the oral
11 mucosa observed in patients with head and neck cancer,who are treated with
12 chemotherapy,and/or with radiotherapy[22].DS has been shown to significantly increase oral
13 mucosal radiation tolerance during daily fractionated IR in an established mouse
14 model[23].As the basis of the mucosal protective properties, with anticoagulant activity(this
15 feature increases blood support in areas where vascular structures are narrowed)is thought to
16 reduce inflammation[17].Gruber et al. find out the advantage and effect of daily fractionated
17 radiotherapy on adherent vs.tight junctions in the recovery of oral mucositis[20].As a
18 result,the effect of IR on the epithelial cell junctions significantly superior,and reduces the
19 probability of development of oral mucositis.Also, Gruber et al. observed the effect of DS on
20 the healing of oral mucositis,through the epithelial junction,hypoxia and inflammation
21 markers.The development of epithelial integrity and cohesion caused by DS prevents the loss
22 of quality cells[24].Our study,in order to observe effects of DS on radiation-induced oral
23 mucositis,planned on cell proliferation marker (p16),cell differentiation marker (p21) and
24 indicative of cellular skeletal integrity antibody (CK).The activity of p16 in the phases of the
25 cellular-cycle has been investigated,and it has been associated S-phase which indicates
26 proliferation[25].In our study, the p16 did not make a significant difference in the germinal
27 (proliferation) layer, when the experimental arms compared.This supports the knowledge
28 from Hertzendorfer et al. study that DS did not stimulate the proliferation process[19].p21 is
29 involved in the process of terminal differentiation[26]and inhibits the activity of cyclin-
30 dependent kinase which controls the transition from G1 to S-phase during the cell
31 cycle[27].In ourstudy the percentage of p21 positive cells decreased for the
32 functional(differentiation)layer in the DS-applied arm.The oral mucosal protective feature of
33 DS is considered to inhibit the differentiation process by stimulating the junction.In this
34 case,cells whose cellular differentiation is inhibited can not escape from the layer in which
35 they are located to the surface,and the cell loss and the number of cells before IR will be
36 prevented.Our study is one of the first study examining the epithelial differentiation
37 process.The main function of CK is to give mechanical strength to the epithelial
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61

cells[28]. Radiation induces damage on the epithelium, with the release of CK resulting in cell death and inhibition of basal cell proliferation[29-31]. These epithelial changes possibly lead to differential expression of CK in each phase[32,33]. Keratins are the predominant cytoskeletal protein of stratified keratinized epithelial cells and are the most sensitive markers of epithelial differentiation and proliferation[34-36] because their expression is both region-specific and differentiation-specific[37]. However, no previous study focused on CK expression in oral radiation-induced mucositis. Bonan et al. observed that increased CK expression can be associated with the reactive proliferation of the epithelium and increasing resistance of the oral mucosa during the initial phases of IR[38]. The results of our study for the percentage of CK positive cells in the DS-applied arm was superior to IR only arm in both germinal and functional layers, that shows DS supports mechanical strength at the cellular level. Besides, when the significance between germinal and functional layers is compared for each experimental arm, the effect of DS on the mechanism of inhibition of differentiation made a significant difference in the functional (differentiation) layer in favour of IR+DS arm. But still, the percentage of positive cells did not fall below the control group range of % positive cells for both experimental arms. This effect supports the positive activity of fractionated IR on junctions[20]. In this sense, our study is one of the leading studies examining the epithelial differentiation process of CK expression on radiation-induced oral mucositis.

Kozma et al. investigated the effect of DS on breast cancer tumour cell samples instead of normal tissues and shown that DS often causes adverse effects on breast cancer cells, and high doses DS lead to a decrease in breast cancer cell proliferation. The results of this study clearly demonstrated the complex role of DS in the cancer setting and revealed the anti-cancer potential of GAG[39].

Conclusion Dermatan Sulfate inhibits differentiation by stimulating the junctions and supports mechanical strength at the cellular level and creates the integrity of the epithelial layer, while does not stimulate the proliferation. Based on these curative effects of DS, protection of existing cells will reduce the possibility of clinical manifestation, duration and/or severity of oral mucositis. Our study is one of the first studies examining the epithelial differentiation process on radiation-induced oral mucositis by differentiation marker p21 and Cytokeratin expression. It is also observed in our study promising effect of DS on normal mucosal tissue, and its anti-cancer effect observed by Kozma et al. on breast cancer samples.

For further research the promising mechanism of DS with mucosa-protective activity, anti-cancer potential and inhibition of differentiation and not effecting the proliferation should examine on the head and neck tumour sections, via proliferation and differentiation markers.

References

1. Sonis ST. Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2013; 33: 236-40.
2. Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Robles-García M, et al. Cancer treatment-induced oral mucositis: a critical review. Int J Oral Maxillofac Surg. 2012; 41(2): 225-38.
3. Agbaje JO, Jacobs R, Michiels K, et al. Bone healing after dental extractions in irradiated patients: a pilot study on a novel technique for volume assessment of healing tooth sockets. Clin Oral Investig. 2009; 13(3): 257-61.
4. Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. J Natl Cancer Inst Monogr. 2001; 29: 7-15.
5. Qin R, Steel A, Fazel N. Oral mucosa biology and salivary biomarkers. Clin Dermatol. 2017; 35(5): 477-83.
6. Gruber S, Dörr W. Tissue reactions to ionizing radiation-Oral mucosa. Mutat Res. 2016; 770: 292-98.
7. Murase N, Fukui S, Mori M. Heterogeneity of keratin distribution in the oral mucosa and skin of mammals as determined using monoclonal antibodies. Histochemistry. 1986; 85(4): 265-76.
8. Ruiz S, Segrelles C, Bravo A, et al. Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. Development. 2003; 130(11): 2341-53.
9. Hume WJ, Moore JK. Sheet preparations of the stratum granulosum from mammalian skin and oral epithelium. J Anat. 1985; 140: 669-78.

10. Schroeder HE, Amstad-Jossi M. Type and variability of the stratum corneum in normal and diseased human oral stratified epithelia. *J Biol Buccale*. 1984; 12(2): 101-16.
11. Gruber S. Epithelial cell signaling in radiation-induced oral mucositis as a basis for biological targeting - preclinical studies. Vienna, Med Uni Vienna, PhD Thesis, 2016.
12. Dörr W. Time factors in normal tissue responses to irradiation. In: Joiner M, Van der Kogel A, editors. *Basic clinical radiobiology*. forth edition. London: CRC Press, Hodder Arnold, 2009; p. 149–57.
13. Dörr W, Schmidt M. Normal tissue radiobiology. In: Brahme A, Hendry JH, editors. *Comprehensive biomedical physics*. Seventh edition. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 75–95.
14. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(4): 277–84.
15. Dörr W. Radiobiology of tissue reactions. *Ann ICRP*. 2015; 44(1 Suppl): 58-68.
16. Penc SF, Pomahac B, Winkler T et al. All dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem*. 1998; 273, 28116-21.
17. Trowbridge JM, Gallo RL. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*. 2002; 12: 117-25.
18. Gruber S, Schmidt M, Bozsaky E, et al. Modulation of radiation-induced oral mucositis by pentoxifylline: Preclinical studies. *Strahlenther Onkol*. 2015; 191(3): 242-47.
19. Hetzendorfer S. Impact of Dermatan Sulfate on the Proliferative Activity of the Oral Epithelium in Mice. Vienna, Uni Vienna, Bachelor of Science thesis, 2015.
20. Gruber S, Cini N, Kowald LM, et al. Upregulated epithelial junction expression represents a novel parameter of the epithelial radiation response to fractionated irradiation in oral mucosa. *Strahlenther Onkol*. 2018; 194(8): 771-79.

21. Gruber S, Bozsaky E, Roitinger E, et al. Early inflammatory changes in radiation-induced oral mucositis effect of pentoxifylline in a mouse model. *Strahlenther Onkol.* 2017; 193: 499–507.
22. Lalla RV, Bowen J, Barasch A, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer.* 2014; 120(10): 1453-61.
23. Dörr W. et al. Untersuchung zur Strahlenreaktion des unbehandelten und stimulierten Zungenepithels der Maus, Diss. med. vet. 1987.
24. Gruber S, Arnold M, Cini N, et al. Radioprotective effects of dermatan sulfate in a preclinical model of oral mucositis – targeting inflammation, hypoxia and junction proteins without stimulating proliferation. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6). pii: E1684.
25. Kakei Y, Akashi M, Komatsubara H, et al. p16 overexpression in malignant and premalignant lesions of the oral and esophageal mucosa following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Head Neck Oncol.* 2012; 4: 38.
26. Kanavaros P, Stefanaki K, Rontogianni D, et al. Immunohistochemical expression of p53, p21 /waf1, Rb, p16, cyclin 01, p27, Ki67, c,yclin A, cyclin 81, bcl2, bax and bak proteins and apoptotic index in normal thymus. *Histol Histopathol.* 2001; 16(4): 1005-12.
27. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, et al. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(5): 593-600.
28. Chougule P, Sumitran-Holgersson S. Cytokeratins of the liver and intestine epithelial cells during development and diseases. In: Hamilton G, editor. *Cytokeratins - tools in oncology*. 1st edition. Croatia: Intech; 2012. p.15-32.
29. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.* 1998; 34(1): 39-43.
30. Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. *Oncologist.* 1998; 3: 446-51.

- 1 31. Scully C, Epstein JB. Oral health care for the cancer patient. *Eur J Cancer B Oral*
2 *Oncol.* 1996; 32B: 281-92.
- 3
4 32. Morgan PR, Shirlaw PJ, Johnson NW, et al. Potential applications on antikeratin
5 antibodies in oral diagnosis. *J Oral Pathol.* 1987; 16: 212-22.
- 6
7
8 33. Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, et al. Modulation of cell proliferation by
9 cytokeratins K10 and K16. *Moll Cell Biol.* 1999; 19: 3086-94.
- 10
11
12 34. Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity:
13 function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(4): 383-408.
- 14
15
16 35. Kirfel J, Magin TM, Reichelt J. Keratins: a structural scaffold with emerging
17 functions. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60(1): 56-71.
- 18
19
20 36. Gibbs S, Ponec M. Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis,
21 hard palate and buccal mucosa. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 149-58.
- 22
23
24 37. Dale BA, Salonen J, Jones AH. New approaches and concepts in the study of
25 differentiation of oral epithelia. Crit Rev Oral Biol Med. 1990; 1(3): 167-90.
- 26
27
28 38. Bonan PR, Kaminagakura E, Pires FR, et al. Cytokeratin expression in initial oral
29 mucositis of head and neck irradiated patients.
30 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 101(2): 205-11.
- 31
32
33 39. Koźma EM, Wisowski G, Latocha M, et al. Complex influence of dermatan sulphate
34 on breast cancer cells. Exp Biol Med (Maywood). 2014; 239(12): 1575-88.
- 35
36
37
38
39
40
41

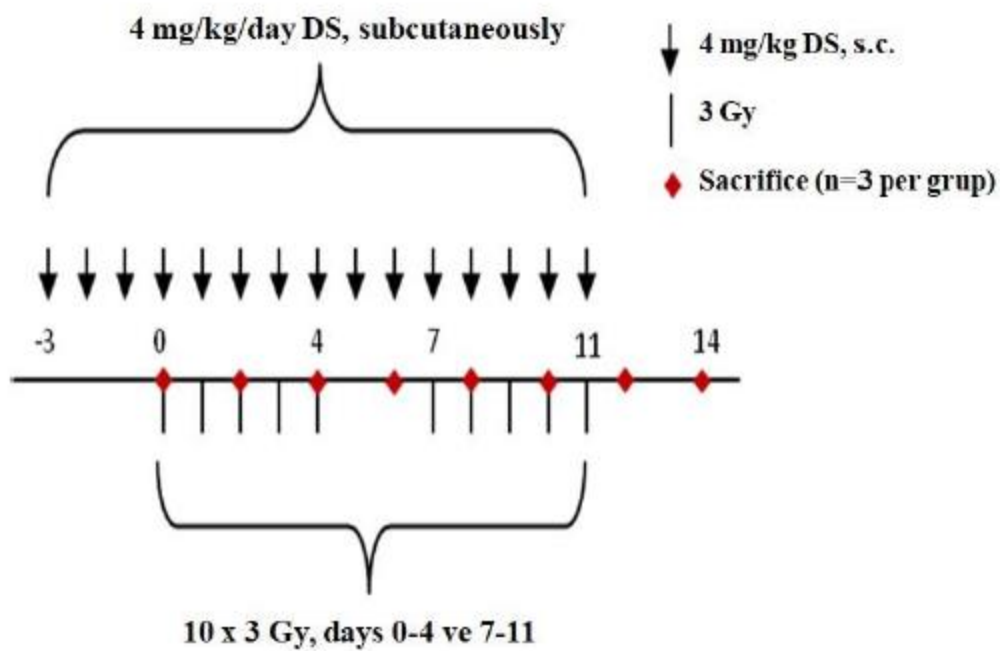


Fig.1.Experimental Design

Fig.1.Experimental Design.

IR comprised fractionated IR with 3Gy per day over two weeks.No IR was given on the weekend(days 5-6 and 12-13).IR was either applied alone or in combination with daily 4mg/kg DS treatment over 14 days. In two days intervals,3 animals were sacrificed per experimental group 3 untreated mice(day 0) served as controls.

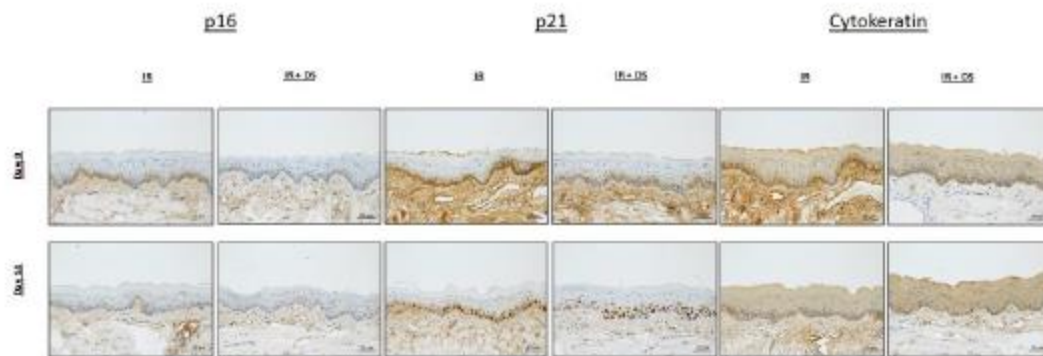


Fig.2.p16, p21 and CK expression during fractionated IR +/- DS

Fig.2.p16, p21 and CK expression during fractionated IR +/- DS

Representative histophotographs of p16, p21 and CK-stained lower mouse tongue epithelia were taken on day 0 (unirradiated and untreated controls), and day 14. Scale bar: 50µm

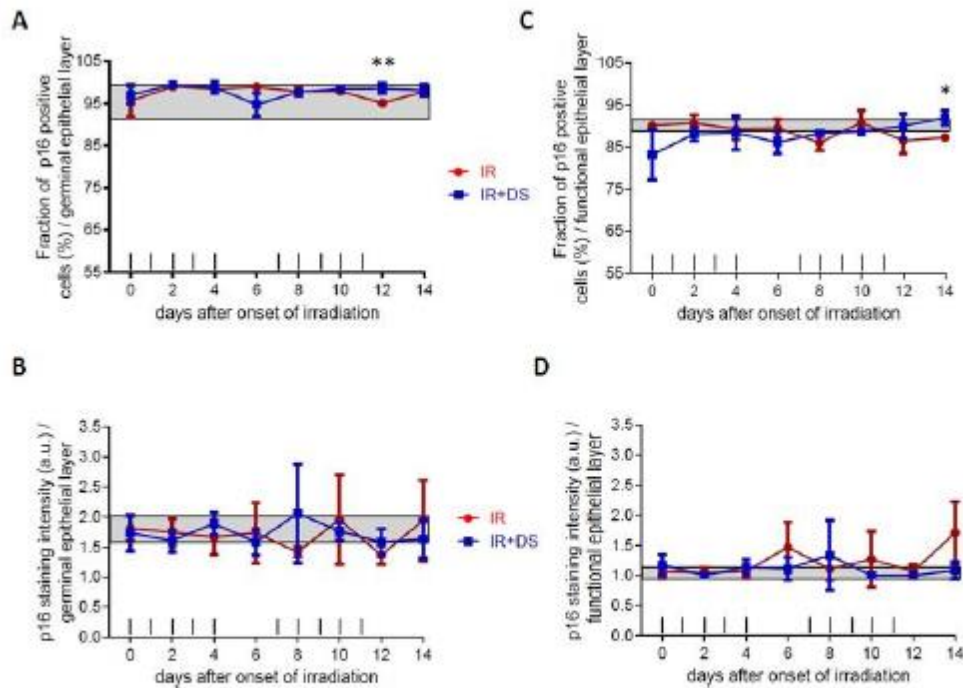


Fig.3.Effect of fractionated IR +/- DS number of cells immunohistochemically positive cell % and staining intensity for p16

Fig.3.Effect of fractionated IR +/- DS number of cells immunohistochemically positive cell % and staining intensity for p16

p16 expression changes were analysed in the germinal and the functional epithelial compartment. The staining signal intensity was scored semi-quantitatively with an arbitrary score of 0 (no signal), 1 (weak), 2 (intermediate) or a maximum of 3 (strong). The p 16 were analysed in 3 specimens per experimental arm, every second day over the course of 14 days. Data points represent the mean of 3 animals, error bars indicate +/- 1 SEM. The shaded areas illustrate the mean (+/- 1 SEM) from 3 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

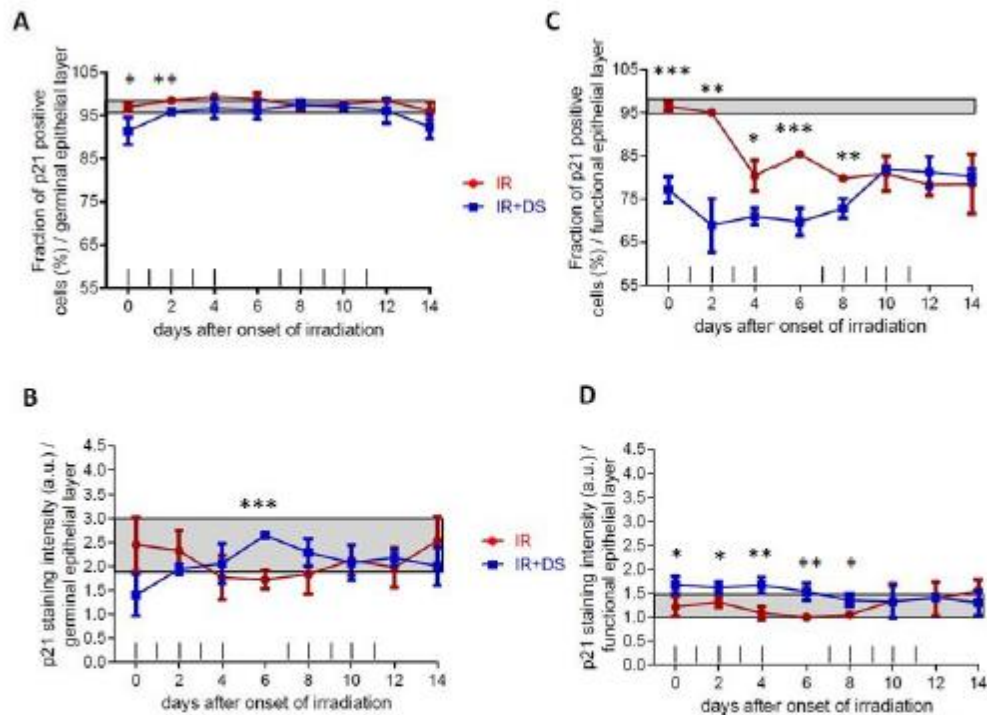


Fig.4.Effect of fractionated IR +/- DS number of cells immunohistochemically positive cell % and staining intensity for p21

Fig.4.Effect of fractionated IR +/- DS number of cells immunohistochemically positive cell % and staining intensity for p21

p21 expression changes were analysed in the germinal and the functional epithelial compartment. The staining signal intensity was scored semi-quantitatively with an arbitrary score of 0 (no signal), 1 (weak), 2 (intermediate) or a maximum of 3 (strong). The p 21 were analysed in 3 specimens per experimental arm, every second day over the course of 14 days. Data points represent the mean of 3 animals, error bars indicate +/- 1 SEM. The shaded areas illustrate the mean (+/- 1 SEM) from 3 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

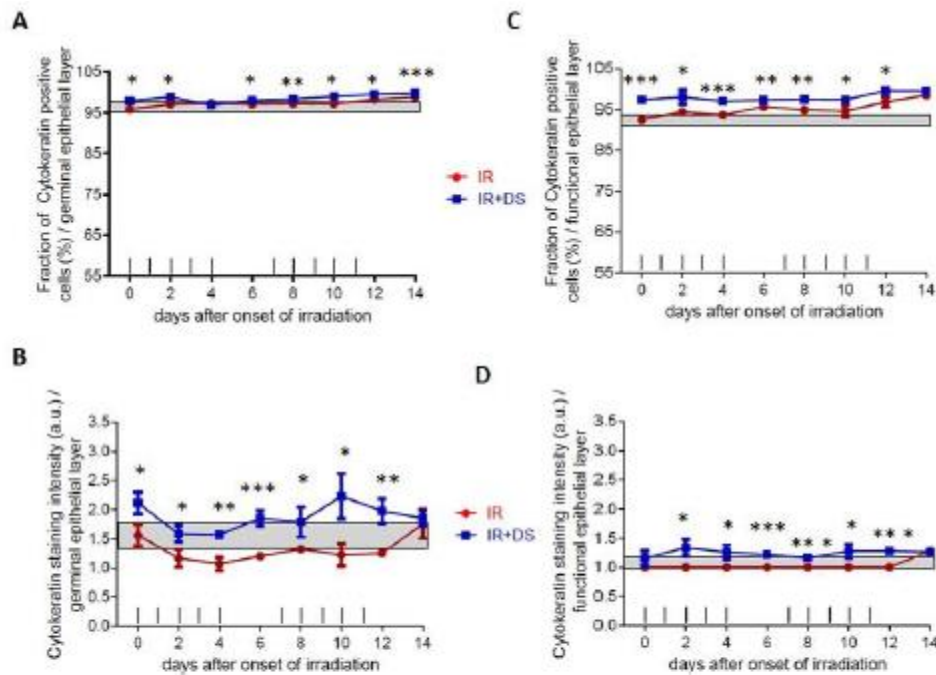


Fig.5.Effect of fractionated IR +/- DS number of cells immunohistochemically positive cell % and staining intensity for CK

Fig.5.Effect of fractionated IR +/- DS number of cells immunohistochemically positive cell % and staining intensity for CK

CK expression changes were analysed in the germinal and the functional epithelial compartment. The staining signal intensity was scored semi-quantitatively with an arbitrary score of 0 (no signal), 1 (weak), 2 (intermediate) or a maximum of 3 (strong). The CK were analysed in 3 specimens per experimental arm, every second day over the course of 14 days. Data points represent the mean of 3 animals, error bars indicate ± 1 SEM. The shaded areas illustrate the mean (± 1 SEM) from 3 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

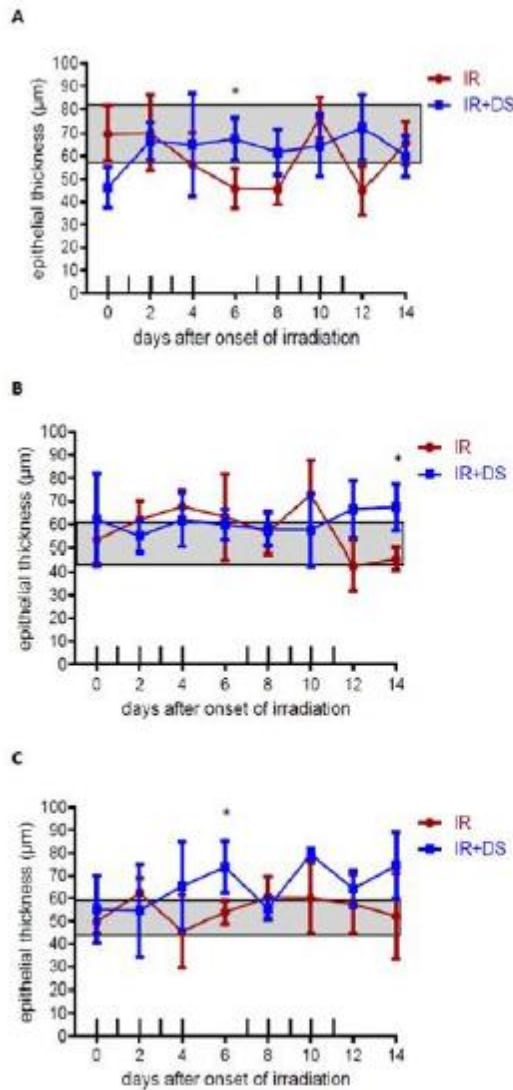


Fig.6.Relative epithelial thickness during daily fractionated IR +/- DS treatment on the epithelial expression of p16, p21 and CK

Fig.6.Relative epithelial thickness during daily fractionated IR +/- DS treatment on the epithelial expression of p16, p21 and CK

Epithelial thickness was determined at representative spots in each tongue section. The p16, p21 and CK were analysed in 3 specimens per experimental arm, every second day over the course of 14 days. Data points represent the mean of 3 animals, error bars indicate +/- 1 SEM. The shaded areas illustrate the mean (+/- 1 SEM) from 3 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae.

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

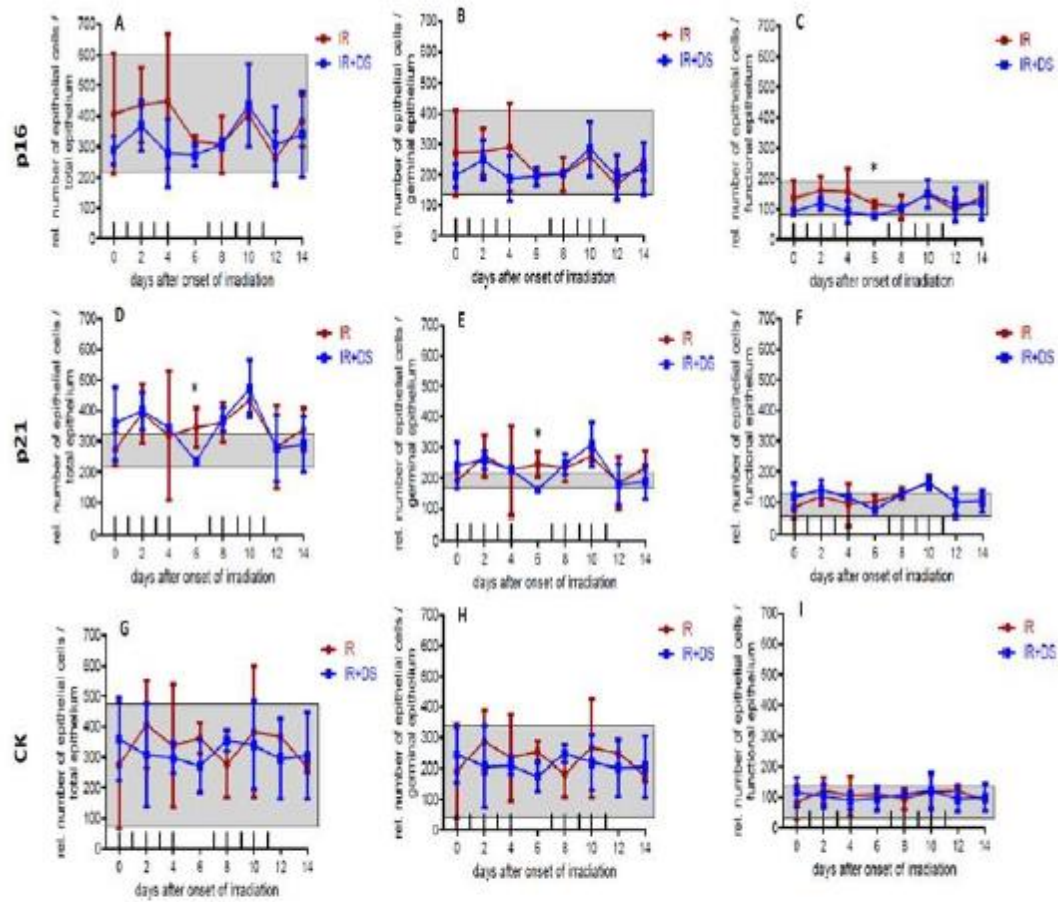


Fig.7.Relative number of epithelial cells during daily fractionated IR +/- DS treatment on the epithelial expression of p16, p21 and CK for total epithelium, germinal epithelium and functional epithelium

Fig.7.Relative epithelial cells during daily fractionated IR +/- DS treatment on the epithelial expression of p16, p21 and CK for total epithelium, germinal epithelium and functional epithelium

Cell numbers was determined at representative spots in each tongue section The p16, p21 and CK were analysed in 3 specimens per experimental arm, every second day over the course of 14 days. Data points represent the mean of 3 animals, error bars indicate +/- 1 SEM. The shaded areas illustrate the mean (+/- 1 SEM) from 3 control animals. The fractionation protocol is indicated on top of the abscissae.

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

Conflict of interest

Compliance with ethical guidelines

Conflict of interest N. Cini, S. Gruber, Z. ARICAN ALICIKUS and W. Dörr declare that they have no competing interests.

Ethical standards All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed. All experiments were performed with approval by the respective authorities (Federal Ministry of Science, Research and Economy, file no.66.009/0039-II/3b/2014).

