Ministery of Higher Education
and Scientific Research

University of Mosul

College of Dentistry

Histological and Immunohistochemical Study of the Effect of Selenium on Rats' Submandibular Salivary Glands Exposed to Cyclophosphamide

A Thesis submitted to

Council of College of Dentistry / University of Mosul

in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science

in

Dental Pharmacology

By

Osamah Adnan Jasim

Supervised by

Professor	Assistant Professor
Jawnaa Khalid Mamdoh	Dr. Luma I. Al-Allaf

2023AD 1444 AH

ABSTRACT

Introduction: Cyclophosphamide is a chemotherapeutic agent, which is widely used for the treatment of various malignant diseases, in addition to being used in certain non-cancer diseases, but it causes toxicities in multiple organs and tissues; including the salivary glands. Selenium is a micronutrient incorporated in several selenoproteins and plays a major role as antioxidant to curb these toxicities in normal tissues and organs.

Aims of the Study: The study aims to examine the effect of cyclophosphamide on some physical, and histological parameters, and to study the expression of Bcl-2 anti-apoptotic protein in rats' submandibular salivary glands, jointetly with investigating the ameliorating role of Selenium on these parameters. In addition, it is to examine the role of selenium in mitigating the oxidative stress status by estimation of total antioxidant capacity and Malondialdehyde level and its role in the improvement of the histological structure of rats' submandibular salivary glands exposed to cyclophosphamide.

Materials and Methods: Twenty adult male albino rats, with an average weight of 300 to 400 grams, and ages about 3 to 4 months old were selected in this study for 14 days. All rats were randomly divided into four groups, each group including five rats; **group I** served as a control group and it includes rats that were gavaged with 2 ml/kg of distilled water orally for fourteen days and they were injected with 3 ml/kg of normal saline intraperitoneally only on the eighth day. **Group II** includes rats that were gavaged 0.2 mg /kg /day with Selenium orally for 14 days, and 3 ml/ kg of normal saline intraperitoneal on the eighth day. **Group III** includes rats that were gavaged with 2 ml/kg of distilled water orally for 14 days, and a single dose of (150mg/kg) of Cyclophosphamide injected intraperitoneal on the eighth day. **Group IV** includes rats that were gavaged 0.2 mg /kg /day with Selenium orally for 14 days, and a single dose of 150 mg/ kg of

Cyclophosphamide injected intraperitoneal on the eighth day. Body weight was measured, and blood samples were obtained for biochemical examination at end of the experiment, then rats were euthanized and the salivary glands were excised for histological and immunohistochemical examination.

Results: The present study of the Cyclophosphamide group reveals a statistically significant body weight loss in comparison with the control, Selenium, and Cyclophosphamide with selenium groups.

The biochemical analysis shows a significant decrease in the serum total antioxidant capacity level in the Cyclophosphamide groups in comparison with control, selenium, and Cyclophosphamide with Selenium groups, whereas, there was a statically significant elevation in the serum Malondialdehyde level of the Cyclophosphamide group in comparison with other groups.

Histological results of salivary glands of the Cyclophosphamide group reveals several histological changes: including features of necrosis, and atrophy of mucous acini, features of apoptosis and Vacuolization in the serous acini, necrosis, and degeneration in the epithelial cells of the granular convoluted tubules, and striated ducts with hyperplasia in the epithelial cells of striated ducts, and edema surrounding it. Whereas, Cyclophosphamide with Selenium group have a picture of intact serous, and mucous acini, intact striated duct, and intact granular convoluted tubules with atrophy and necrosis of a few of it.

The immune-histochemistry stained sections of the Bcl-2 protein of the Cyclophosphamide group demonstrated negative to mild cytoplasmic patterns expression in the stromal cells between the acini of the submandibular salivary glands, whereas the Control, Selenium, Cyclophosphamide with Selenium groups showed a moderate to strong cytoplasmic patterns expression in the stromal cells between acinar cells of the submandibular salivary glands.

Conclusion: Adminstration of a single intraperitoneal injection of Cyclophosphamide induces several changes in body weight, oxidative stress markers with histopathological changes of submandibular salivary glands, these changes were ameliorated by pre- and co- administration of 0.2 mg/kg/day of Selenium with Cyclophosphamide.

وزارة التعليم العالي
والبحث العلمي
جامعة الموصل
كلية طب الأسنان

دراسة نسيجية وكيميائية مناعية لتأثير السلينيوم على الغدد اللعابية تحت الفك السفلي للجرذان المعرضة للسايكلوفوسفاميد

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية طب الأسنان
جامعة الموصل
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير
في
أدوية الفم والاسنان
تقدم بها

أسامة عدنان جاسم

بإشراف

الأستاذ	الأستاذ المساعد
جوناء خالد ممدوح	**د. لمى ابراهيم العلاف**

١٤٤٤ هـ **٢٠٢٣ م**

الخلاصة

مقدمة: دواء السيكلوفوسفاميد هو دواء علاجي كيميائي يستخدم على نطاق واسع في علاج أنواع مختلفة من الامراض الخبيثة بالإضافة الى استخدامه في علاج أنواع معينة من الامراض غير السرطانية. رغم ذلك، فإنه قد يسبب اضراراً سميةً في أعضاء وأنسجة متعددة من ضمنها الغدد اللعابية. يعد السلينيوم من المغذيات الدقيقة المتضمنة في عدد من البروتينات التي يطلق عليها اسم (السلينوبروتينات) وله دور أساسي كمضاد للأكسدة للحد من التأثيرات السمَية على الأعضاء والانسجة السليمة.

اهداف الدراسة: تهدف هذه الدراسة الى فحص تأثير السايكلوفوسفاميد على بعض المؤشرات الجسدية والنسيجية، ودراسة ظهور البروتين **Bcl-2** المضاد للموت المبرمج لخلايا الغدد اللعابية تحت الفك السفلي للجرذان، مع استقصاء دور السلينيوم في تحسين تلك المؤشرات، بالإضافة الى دراسة دوره في تخفيف الاجهاد التأكسدي عن طريق حساب مستويات كل من القدرة الاجمالية المضادة للأكسدة **(TAC)** ومالونديالدهايد، وكذلك دور السلينيوم في تحسين البنية النسيجية للغدد اللعابية تحت الفك السفلي المعرضة للسيكلوفوسفاميد.

المواد وطرائق العمل: أختير عشرون من ذكور الجرذان البيضاء البالغة بمتوسط وزن يتراوح بين ٣٠٠ إلى ٤٠٠ جرام وأعمار تتراوح بين ٣ الى ٤ أشهر في هذه الدراسة. قسمت تلك الجرذان بطريقة عشوائية الى أربعة مجموعات، كل مجموعة تتكون خمسة جرذان: **المجموعة الأولى:** (مجموعة السيطرة) وتشمل الجرذان التي جرعت ب (٢ مل / كجم) من الماء المقطر عن طريق الفم لمدة أربعة عشر يوماً، وتم حقنها بمحلول الملح الفسيولوجي (٣ مل / كجم) داخل الصفاق في اليوم الثامن. **المجموعة الثانية:** وتشمل الجرذان التي جرعت ب (٠,٢ مجم / كجم / يوم) من السيلينيوم عن طريق الفم لمدة أربعة عشر يوماً، وحقنت بمحلول الملح الفسيولوجي (٣ مل / كجم) داخل الصفاق في اليوم الثامن. **المجموعة الثالثة:** وتشمل الجرذان التي جرعت ب (٢ مل / كجم) من الماء المقطر عن طريق الفم لمدة أربعة عشر يومًا وحقنت بجرعة واحدة من السيكلوفوسفاميد (١٥٠ مجم / كجم) داخل الصفاق في اليوم الثامن. **المجموعة الرابعة**: وتشمل الجرذان التي جرعت ب (٠,٢ مجم / كجم / يوم) من السيلينيوم عن طريق الفم لمدة ١٤ يومًا وحقنت بجرعة واحدة من السيكلوفوسفاميد (١٥٠ مجم / كجم) داخل الصفاق في اليوم الثامن. كذلك قيس وزن الجسم وفي نهاية التجربة جمعت عينات الدم للتحليل الكيميائي الحيوي ثم تم القتل الرحيم للجرذان بواسطة جرعة عالية من الايثر واستؤصلت الغدد اللعابية تحت الفك السفلي لتحضيرها للدراسة النسيجية والكيميائية المناعية.

النتائـــج: أظهرت الدراسة الحالية ان الجرذان في مجموعة السيكلوفوسفاميد اظهرت نقصا ملحوظاً في وزن الجسم ذو دلالة إحصائية مقارنة بالمجموعات الأخرى. كما ان نتائج التحليل الكيميائي الحياتي لمستوى القدرة الاجمالية المضادة للأكسدة **TAC** في المصل للجرذان في مجموعة السيكلوفوسفاميد

أظهرت نقصاً ذو دلالة إحصائية مقارنةً مع المجموعات الأخرى، بينما أظهرت نفس المجموعة ارتفاعا ملحوظاً في مستوى مالونديالدهايد في المصل مقارنةً مع المجموعات الأخرى.

كما أن نتائج الدراسة النسيجية للغدد اللعابية لمجموعة سيكلوفوسفاميد كشفت العديد من التغيرات النسيجية و التي تتمثل بسمات النخر والضمور في الأسني المخاطية مع سمات الإستماته الخليوية و فجوات في الأسني المصلية وعلامات النخر و التنكس في الخلايا الظهارية للنبيبات الحبيبية الملتوية و القنوات المخططة مع تضخم في الخلايا الظهارية للقنوات المخططة مع وذمة محيطة به.بينما اضهرت المقاطع النسيجية للغدد اللعابية تحت الفك السفلي للجرذان في المجموعة التي تم إعطائها السيكلوفوسفاميد مع السلينيوم سمات سليمة لكل من الأسني المخاطي و المصلي، والنبيبات المتعرجة الحبيبة والقنوات المخططة و النبيبات الحبيبية الملتوية ، مع سمات التنخر و التنكس في قليل منها.

أظهرت المقاطع المصبوغة بتقنية الكيمياء المناعية النسيجية لبروتين **Bcl-2** لمجموعة السيكلوفوسفاميد ظهوراً طفيفاً او يكاد معدوماً لبروتين **Bcl-2** في سيتوبلازم الخلايا الداعمة التي تقع بين العنيبات اللعابية المكونة للغدد اللعابية تحت الفك السفلي، في حين أظهرت المقاطع لمجموعات السيطرة، السيلينيوم والسيكلوفوسفاميد مع السيلينيوم ظهوراً متوسطاً إلى قوي لبروتين **Bcl-2** في سيتوبلازم الخلايا الداعمة التي تقع بين العنيبات اللعابية المكونة للغدد اللعابية تحت الفك السفلي

الاستنتاجات: ان إعطاء جرعة واحدة من السيكلوفوسفاميد (١٥٠ مجم / كجم) داخل الصفاق في اليوم الثامن من التجربة أدى الى العديد من التغيرات في وزن الجسم ومعلَمات الاجهاد التأكسدي والتغيرات في البنية النسيجية للغدد اللعابية تحت الفك السفلي، وحسنت هذه التغيرات عن طريق إعطاء (٠,٢ مجم/كغ/يوم) من السيلينيوم مع، السيكلوفوسفاميد.

.