



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ – СКОПЈЕ
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ
КАТЕДРА ЗА МАКСИЛОФАЦИЈАЛНА ХИРУРГИЈА



Д-Р МАРТИНА АНАСТАСОВСКА

**ЕВАЛУАЦИЈА НА ОКСИДАТИВНИОТ СТРЕС ПРЕКУ САЛИВАРНИТЕ
БИОМАРКЕРИ: FRAS, MDA И SOD КАЈ ПАЦИЕНТИ СО ОРАЛЕН
ПЛАНОЦЕЛУЛАРЕН КАРЦИНОМ (OSCC) ПРЕД И ПО ХИРУРШКИ
ТРЕТМАН И ПО РАДИОТЕРАПИЈА НА ГЛАВАТА И ВРАТОТ**

- МАГИСТЕРСКИ ТРУД-

МЕНТОР

ПРОФ. Д-Р ДАНИЦА ПОПОВИЌ-МОНЕВСКА

КОМЕНТОР

ПРОФ. Д-Р КИРО ИВАНОВСКИ

Скопје, 2025



SS. CYRIL AND METHODIUS UNIVERSITY – SKOPJE

FACULTY OF DENTISTRY – SKOPJE

DEPARTMENT OF MAXILLOFACIAL SURGERY



DR. MARTINA ANASTASOVSKA

**EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS THROUGH SALIVARY
BIOMARKERS: FRAS, MDA, AND SOD IN PATIENTS WITH ORAL
SQUAMOUS CELL CARCINOMA (OSCC) BEFORE AND AFTER
SURGICAL TREATMENT AND AFTER HEAD AND NECK
RADIOTHERAPY**

- MASTER'S THESIS -

MENTOR

PROF. DANICA POPOVIKJ – MONEVSKA, PhD

COMENTOR

PROF. KJIRO IVANOVSKI, PhD

Skopje, 2025

Комисија за одбрана:

Претседател: проф. д-р Сузана Двојакоска Божовиќ

Универзитет „св. Кирил и Методиј“ – Скопје,

Стоматолошки факултет – Скопје,

Катедра за максилофацијална хирургија

Член: проф. д-р Ќиро Ивановски

Универзитет „св. Кирил и Методиј“ – Скопје,

Стоматолошки факултет – Скопје,

Катедра за болести на уста и пародонтот

Член: проф. д-р Даница Поповиќ Моневска

Универзитет „св. Кирил и Методиј“ – Скопје,

Стоматолошки факултет – Скопје,

Катедра за максилофацијална хирургија

Научно поле: Стоматологија

Научна област: Максилофацијална хирургија

БЛАГОДАРНОСТ

Со најдлабока почит и искрена благодарност, пред сè им се обраќам на моите најблиски — моето семејство, чија љубов, трпение и безрезервна поддршка беа темелот врз кој ја градев секоја своја мисла, секој чекор и секој успех. Ваша верба во мене, беше мојата најсилна мотивација, мојот мир во немирот и мојата сила во најтешките денови.

На моите професори, им упатувам длабока благодарност за нивната мудрост, посветеност, поддршка и несебично пренесено знаење. Ви благодарам што ме насочивте не само кон научна и професионална прецизност, туку и кон човечка чувствителност и достоинство во професијата. Вашиот пример и совети ќе останат водилка во мојата понатамошна кариера.

Посебна благодарност упатувам до моите пријатели и колеги, кои со своето охрабрување, разбирање и искрена поддршка ми дадоа сила да истраам и кога патот беше тежок.

Постојат личности чие присуство тивко го менува целиот пат — со збор, со поглед, со верба во тебе кога и самата се двоумиш, со безусловна љубов и лојалност која никогаш не изневерува.

На сите вас — со срце исполнето со благодарност — ви должам дел од секој успех што ќе следи.

АПСТРАКТ

Вовед: Оралниот планоцелуларен карцином (OSCC) е една од најчестите малигни неоплазми во регијата на главата и вратот. Стандардниот терапевтски пристап најчесто вклучува комбинирана примена на хируршка интервенција и адјувантна радиотерапија, кои, иако неопходни, можат значајно да ја нарушат функцијата на плунковните жлезди и редокс рамнотежата во усната празнина, што е клучно за оралното здравје и процесот на посттерапевско заздравување.

Цел: Главната цел на нашето истражување беше да се процени ефектот на радиотерапијата врз квантитетот и квалитетот на плунката, евалуиран преку саливарните биомаркери: FRAS, MDA и SOD, кај пациенти со орален планоцелуларен карцином, хируршки третирани и подложени на радиотерапија на главата и вратот. Исто така имавме цел да ги евалуираме истите параметри пред и по хируршкиот третман на OSCC.

Материјал и методи: За реализација на поставената цел во истражувањето беа вклучени 40 испитаници, од двата пола, на возраст од 41 до 76 години поделени во две групи: испитаници со патохистолошки потврден OSCC, хируршки третирани и подложени на радиотерапија на главата и вратот (20) и здрави испитаници, без орални или системски заболувања кои може да влијаат на оксидативниот стрес во плунката, како контролна група (20). Од испитаниците од првата група беше колекционирана нестимулирана плунка во три временски интервали: пред хируршкиот третман, по хируршкиот третман и по радиотерапијата. По колекцијата беше одредено количеството излачена плунка, а по обработката на плунката, спектрофотометриски беа определувани: железоредуцирачкиот капацитет на плунката (FRAS), малондиалдеhidот (MDA) и активноста на ензимот SOD.

Резултати: Количеството излачена плунка беше статистички значајно зголемено кај пациентите со OSCC, а потоа намалено по секоја терапевтска фаза, со најниски вредности по радиотерапијата. Кај пациентите со OSCC, беа детектирани статистички значајно пониски вредности на FRAS и SOD и статистички значајно повисоки вредности на MDA во споредба со контролната група. По хируршкиот третман беше утврдено статистички значајно зголемување на FRAS и SOD и намалување на MDA. По радиотерапијата, FRAS повторно статистички значајно се намали, MDA се зголеми, а активноста на SOD беше статистички незначајно намалена.

Заклучок: Резултатите од нашата студијата потврдуваат дека радиотерапијата значајно го зголемува оксидативниот стрес и го намалува антиоксидативниот капацитет на плунката, додека хируршкиот третман привремено го подобрува овој баланс. Иако потенцијално антиоксидансите би можеле да ги заштитат здравите ткива, нивната примена за време и веднаш по радиотерапијата бара внимателност поради можноста за заштита и на туморските клетки, резултирајќи со компромитиран онколошки третман.

Клучни зборови: OSCC, радиотерапија, оксидативен стрес, плунка, FRAS, MDA, SOD.

ABSTRACT

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common malignant neoplasms in the head and neck region. The standard therapeutic approach usually involves a combination of surgical intervention and adjuvant radiotherapy which, while essential, can significantly impair salivary gland function and redox balance in the oral cavity—factors crucial for oral health and post-therapy recovery.

Objective: The main aim of our study was to assess the effect of radiotherapy on the quantity and quality of saliva, evaluated through salivary biomarkers FRAS, MDA, and SOD, in patients with oral squamous cell carcinoma who underwent surgical treatment followed by head and neck radiotherapy. Additionally, we aimed to evaluate the same parameters before and after surgical treatment of OSCC.

Materials and Methods: The study included 40 participants of both sexes, aged 41–76 years, divided into two groups: patients with histopathologically confirmed OSCC who underwent surgery and adjuvant head and neck radiotherapy (20), and healthy controls without oral or systemic diseases that could affect oxidative stress in saliva (20). Unstimulated saliva was collected from the first group at three time points: before surgery, after surgery, and after radiotherapy. Following collection, the volume of saliva was measured, and after processing, spectrophotometric analyses were performed to determine the ferric reducing antioxidant power of saliva (FRAS), malondialdehyde (MDA), and the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD).

Results: The amount of secreted saliva was significantly increased in patients with OSCC and subsequently decreased after each therapeutic phase, with the lowest values recorded after radiotherapy. Compared to the control group, patients with OSCC exhibited significantly lower FRAS and SOD values and significantly higher MDA values. After surgical treatment, there was a statistically significant increase in FRAS and SOD and a decrease in MDA. Following radiotherapy, FRAS significantly decreased again, MDA increased, and SOD activity showed a non-significant decrease.

Conclusion: Our study confirms that radiotherapy significantly increases oxidative stress and reduces the antioxidant capacity of saliva, whereas surgical treatment temporarily improves this balance. Although antioxidants could potentially protect healthy tissues, their use during and immediately after radiotherapy should be approached cautiously due to the possibility of also protecting tumor cells, potentially compromising oncological treatment effectiveness.

Key words: OSCC, radiotherapy, oxidative stress, saliva, FRAS, MDA, SOD.

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	8
1.1. Орален планоцелуларен карцином	8
1.2. Оксидативен стрес	8
1.3. Радиотерапијата како третмански модалитет и нејзиниот ефект во продукција на ROS	10
1.4. Орални компликации при радиотерапија на главата и вратот	13
1.4.1. Орален мукозитис	13
1.4.2. Радијациски индуцирано оштетување на плунковните жлезди/хипосаливација	14
1.5. Плунката како дијагностички медиум	14
1.5.1. Саливарни маркери за оксидативен стрес	15
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА	18
3. ЦЕЛ НА ТРУДОТ	25
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	26
5. РЕЗУЛТАТИ	32
5.1. Општи карактеристики	32
5.1.1. Анализа на примерокот според пол	32
5.1.2. Анализа на примерокот според возраст	33
5.2. Анализа на примерокот според локализација на карциномот	35
5.3. Анализа на саливарните параметри	36
5.3.1. Анализа на количеството излучена плунка	37
5.3.2. Анализа на железоредуцирачкиот антиоксидативен капацитет на плунката (FRAS)	44
5.3.3. Анализа на малондиалдехидот (MDA)	50
5.3.4. Анализа на активноста на супероксид дисмутаза (SOD) во плунка	57
6. ДИСКУСИЈА	63
7. ЗАКЛУЧОЦИ	73
8. КОРИСТЕНИ СКРАТЕНИЦИ	75
9. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	77

1. ВОВЕД

1.1. Орален планоцелуларен карцином

Карциномот на главата и вратот (HNC) претставува 3 % од сите малигни тумори. Тој е шестата најчеста малигна неоплазма во светот^[1]. Околу 48 % од карциномите на главата и вратот се во усната празнина и 90 % од овие случаи се орален планоцелуларен карцином (OSCC), кој може да се појави на сите локализации во усната празнина, но најчесто на задната третина од латералните рабови на јазикот, што опфаќа околу 50 % од сите случаи на OSCC, проследено со подот на усната празнина, мекото непце, гингивата, букалната слузница и тврдото непце^[2]. Бројот на новодијагностицирани случаи на карцином на усната и оралната празнина на глобално ниво изнесува 389 846 случаи, а бројот на смртни случаи е 188 438^[3]. И покрај подобрувањата во дијагностиката и примената на нови терапевтски пристапи во последните децении, прогнозата кај пациентите со планоцелуларен карцином на главата и вратот останува лоша, со петгодишна стапка на преживување под 50 %^[4]. Високата смртност се должи на релапсот на болеста, пред сè заради локални/локорегионални рецидиви и метастазирањето на карциномот во регионалните лимфни јазли на вратот и далечните органи^[5]. Познато е дека различни фактори учествуваат во етиопатогенезата на оралниот планоцелуларен карцином. Канцерогенезата може да биде резултат на интеракција помеѓу социоекономските и етиолошките фактори како што се навиката на пушење или цвакање тутун, алкохол, онкогени вирусни инфекции, онкогени и мутација на гените за тумор-супресија^[6].

Како ризик-фактор се споменува и оксидативниот стрес кој има значајна улога во прогресијата и развојот на болеста^[7]. Оксидативниот стрес значајно придонесува за појава и развој на OSCC. Реактивните кислородни соединенија (ROS) предизвикуваат директно оштетување на ДНК и липидите, што води до мутации во иницијалната фаза на канцерогенезата^[8]. Во фазите на промоција и прогресија на карциномот, ROS поттикнуваат неконтролиран клеточен раст преку активирање на сигналните патеки и инхибирање на апоптозата. Исто така, преку активирање на транскрипциските фактори, ROS ја зголемуваат ангиогенезата и инвазивноста на карциномските клетки. Дополнително здружената употреба на цигари и алкохол доведува до зголемено генерирање на ROS во оралната слузница, што ја интензивира канцерогенезата^[9].

1.2. Оксидативен стрес

Оксидативниот стрес настанува кога постои нерамнотежа помеѓу производството на реактивни кислородни соединенија (ROS) и способноста на организмот да ги неутрализира или детоксифицира нивните штетни ефекти со помош на антиоксиданси. Слободните радикали се молекули кои имаат неспарен електрон во нивната надворешна орбита и заради тоа се извонредно реактивни молекули и реагираат со различни биомолекули како протеини, липиди, липопротеини и други^[8]. При таа реакција настанува оксидација на биомолекулите и нивно оштетување. На овој начин можат да бидат оштетени

различни биолошки структури како: клеточни мембрани, сидови на крвните садови и ДНК. Овие оксидативни модификации може да резултираат со трансформација на нормалните клетки во малигни^[9]. Супероксидните радикали ($O_2^{\bullet-}$), водородниот пероксид (H_2O_2), хидроксилните радикали ($\bullet OH$) и синглетниот кислород (1O_2) се најчесто дефинирани како реактивни кислородни соединенија (ROS); тие се генерираат како метаболички нуспроизводи во биолошките системи^[10].

Во физиолошки услови, реактивните кислородни соединенија (ROS) се нормални продукти на метаболизмот – главно се создаваат во митохондриите (преку електронскиот транспортен ланец), но и во ендоплазматскиот ретикулум и пероксизомите^[11]. Имено, $O_2^{\bullet-}$ може да се формира преку клеточното дишење, преку липооксигеназите (LOX) и циклооксигеназите (COX) за време на метаболизмот на арахидонската киселина, како и од ендотелните и инфламаторните клетки^[12].

Слободните радикали, како форма на реактивни кислородни соединенија (ROS), се создаваат од различни ендогени и егзогени извори. Од ендеген аспект, физиолошките процеси (како активација на имуните клетки, воспаление, исхемија, инфекции, туморски раст, интензивна физичка активност, психолошки стрес и процесот на стареење) придонесуваат за зголемено создавање на слободни радикали во организмот^[13, 14, 15, 16]. Од друга страна, егзогените извори на слободни радикали вклучуваат изложеност на еколошки загадувачи, тешки метали (како кадмиум, жива, олово, железо и арсен), одредени фармаколошки агенси (циклоспорин, такролимус, гентамицин и блеомицин), хемиски растворувачи, како и некои навики на исхрана (како консумација на чадено месо, прегреано масло и заситени масти). Исто така, пушењето, алкохолот и јонизирачкото зрачење претставуваат силни прооксиданси што стимулираат егзогена продукција на ROS^[13, 16, 17, 18]. Откако овие супстанции ќе навлезат во телото, тие се разградуваат или метаболизираат од страна на хепаталните и периферните ензими, при што како нуспроизводи на тие реакции се создаваат различни слободни радикали. Долготрајната изложеност на вакви агенси ја надминува природната антиоксидативна одбрана на организмот, доведувајќи до состојба на хроничен оксидативен стрес и потенцијални патолошки трансформации на клетките^[16]. Кога се одржуваат на ниски или умерени концентрации, слободните радикали играат значајна физиолошка улога во организмот. Тие учествуваат во имуниот одговор преку активноста на фагоцитите (неутрофили и макрофаги), кои ги синтетизираат и складираат за подоцнежнo ослободување при елиминација на инвазивните патогени микроорганизми. Исто така, слободните радикали се вклучени во регулацијата на васкуларниот тонус, модулација на невронската активност, како и во интрацелуларната сигнализација, каде што учествуваат во преносот на сигнали во различни типови клетки^[16, 19, 20].

Кога продукцијата на ROS се зголемува, тие почнуваат да ги покажуваат штетните ефекти врз важните клеточни структури како што се протеините, липидите и нуклеинските киселини^[21]. Голем број истражувања укажуваат дека оксидативниот стрес може да биде одговорен, со различен степен на значајност, за појава и/или прогресија на бројни заболувања (на пример: карцином, дијабетес, метаболички нарушувања, атеросклероза и кардиоваскуларни болести)^[22].

Човечкиот организам располага со широк спектар на антиоксиданси чија примарна улога е да ги неутрализираат ефектите на оксидативните агенси. Од функционален аспект, овие антиоксидативни системи можат да се класифицираат во две основни категории: **ензимски** и **неензимски** антиоксиданси.

Во групата на **ензимски антиоксиданси** спаѓаат: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPx), глутатион редуктаза (GR) и глутатион S-трансфераза (GST)^[21, 22, 23, 24, 25,].

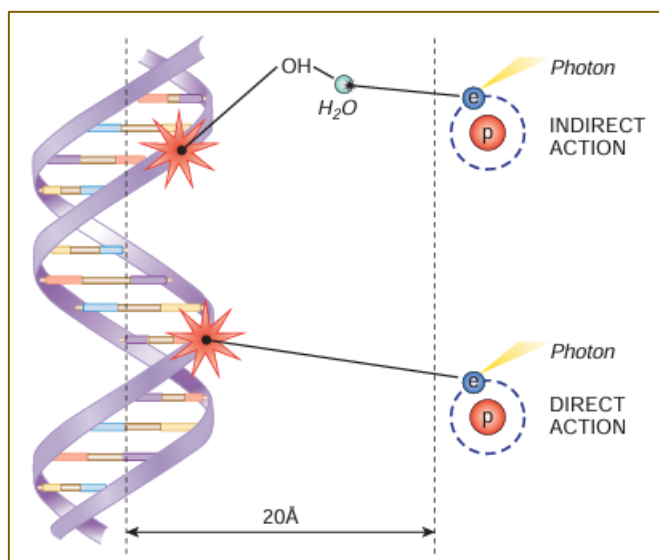
Во групата на **неензимски антиоксиданси** се вбројуваат: витамин Ц (аскорбинска киселина), витамин Е (алфа-токоферол), β-каротен, селен, цинк, мелатонин, урична киселина, куркумин, силимарин, прополис, епигалокатехин-3-галат (EGCG) и коензим Q10 (убихинон)^[21, 22, 23, 24, 25,].

Антиоксидансите, покрај класификацијата според нивниот механизам на дејство, можат да се поделат и според нивното потекло, и тоа на ендогени и егзогени. Во групата ендогени антиоксиданси се вклучуваат сите ензимски антиоксиданси, како и одредени неензимски соединенија како што се тиолните антиоксиданси (на пример глутатион) и коензим Q10, кои се биосинтетизираат во организмот. Наспроти нив, егзогените антиоксиданси мора да се внесуваат преку исхраната, бидејќи еукариотските клетки немаат способност самостојно да ги синтетизираат, што ја прави оваа група антиоксиданси особено значајна и непредвидлива во одржувањето на редокс рамнотежата^[26]. Биолошките последици од оксидативниот стрес директно зависат од нарушената рамнотежа меѓу продукцијата на оксидантни молекули и ефикасноста на антиоксидативниот одбранбен систем.

1.3. Радиотерапијата како третмански модалитет и нејзиниот ефект во продукција на ROS

Радиотерапијата се користи како самостоен третман, во комбинација со хируршкиот третман, со или без хемотерапија, но може и како палијативен третман при терминалниот стадиум на карцином на главата и вратот. Постоперативната радиотерапија е индицирана кај пациентите со орален планоцелуларен карцином на главата и вратот кога патохистолошките наоди по хируршкото отстранување на карциномот, укажуваат на висок ризик од локорегионален рецидив^[27]. Радијацијата се аплицира на клетките во форма на **фотони** (X-зраци и гама-зраци) или **честички** (протони, неутрони и

електрони). Кога фотоните или честичките стапуваат во интеракција со биолошките молекули, тие предизвикуваат јонизација, што може **директно** да дејствува врз супклеточните структури или **индиректно**, преку јонизација на водата, која е главна состојка на клетките, притоа создавајќи слободни радикали, кои потоа можат да дејствуваат врз супклеточните структури (слика 1)^[28].



Слика 1: Директни и индиректни ефекти на јонизирачкото зрачење врз ДНК. Преземено од: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, ур. Cancer: Principles & Practice of Oncology. 10-то изд. Филадельфија: Lippincott Williams & Wilkins; 2015.

Клеточната смрт предизвикана од радијација може да се одвива преку различни механизми:

- **брза апоптоза**, зависна од p53;
- **подоцнежна апоптоза**, независна од p53, често резултат на митотичка катастрофа (кога клетката не може правилно да се подели и изумира);
- **автофагија**, која може да биде заштитна или придружна на клеточната смрт;
- **некроза**, која е клинички проблем што се јавува месеци по радиотерапијата и предизвикува воспаление.

Механизмот на оштетување на ДНК при радиотерапијата може да биде директен и индиректен.

Директниот механизам се базира на директна апсорпција на енергијата на ДНК во хромозомите и нејзина јонизација. Ова е главниот механизам на оштетување на ДНК предизвикано од наелектризирани јадра

(како што е јаглеродното јадро) и неутрони и се нарекува *високо линеарен пренос на енергија (high LET)*.

Индиректниот механизам се базира на интеракција на фотоните со други молекули, како што е водата, и тоа резултира со производство на ROS, од кои некои имаат доволно долг полуживот за да дифундираат во јадрото на клетките и да интерферираат со ДНК. Овој механизам на оштетување на ДНК и протеините е *наречен низок линеарен пренос на енергија (low LET)*.

Слободните радикали генерирани при интеракцијата на фотоните со другите молекули што поседуваат неспарен електрон во својата надворешна обвивка (на пример хидроксилните радикали) можат да одделат молекула на водород од ДНК и на тој начин предизвикуваат нејзино оштетување. Клетките што поседуваат повисоко количество антиоксиданси, ќе имаат помало индиректно оштетување на ДНК, но исто директно оштетување. Исто така, ниската снабденост со кислород во нивното опкружување би ги намалила ефектите од индиректното оштетување поради помала застапеност на радикали во отсуство на кислород, но оваа средина би имала мало влијание врз оштетувањето на ДНК од јаглеродните јадра. Околу две третини од штетата предизвикана од ниско LET зрачење се должи на индиректното дејство на зрачење. Бидејќи хидроксилниот радикал е многу реактивен, полуживотот му е 9-10 секунди. Поради ова тој не дифундира повеќе од неколку нанометри откако ќе се формира пред да реагира со други молекули, и затоа, само радикалите формирани во непосредна близина на целната молекула ќе придонесат за нејзино оштетување. Но исто така се формира H_2O_2 , кој пак може да произведе хидроксилни радикали во подоцна фаза преку реакцијата на фентон, во која железото (Fe^{2+}) реагира со водородниот пероксид (H_2O_2), притоа создавајќи многу реактивни хидроксилни радикали ($\bullet OH$) и железо во повисока оксидациона состојба (Fe^{3+}). Бидејќи H_2O_2 не е многу реактивен, може да дифузира на долги растојанија од почетната локација на таложење на енергијата.

Антиоксидансите кои вообичаено се присутни во клетките, како што е глутатион, можат да ги заштитат целните молекули со реакција со хидроксилниот радикал. Дури и откако целната молекула е погодена и јонизирана, глутатионот може да придонесе за заштита на клетките со донирање на атом на водород на радикалот, дозволувајќи му на неспарениот електрон присутен во радикалот да се спари со електронот од атомот на водород. Ова се смета за наједноставно од сите видови поправки и се нарекува **хемиска поправка**. Меѓутоа, ако се присутни молекули на кислород, тие ќе се натпреваруваат со антиоксидансите, и ако кислородот реагира со јонизираната целна молекула пред да се случи донирањето на водород, штетата ќе се зацврсти како пероксидна, што не може да се поправи со хемиска поправка. Наместо тоа, потребна е **ензимска поправка** на ДНК. Овој зголемен биолошки ефект на кислородот се нарекува ефект на кислород и се смета за важен фактор за

ефикасноста на терапијата со зрачење. Според сето наведено, јонизирачкото зрачење ја зголемува продукцијата на ROS, што ја надминува природната антиоксидантна заштита на телото и ги изложува сите клетки во засегнатото поле на високи нивоа на оксидативен стрес, што резултира со зголемено оштетување на ДНК и на крајот води до клеточна смрт. Ова резултира со оштетувања на оралната мукоза, хипосаливација, мукозитис и други несакани ефекти кои се поврзани со оксидативното оштетување на ткивата^[29].

1.4. Орални компликации при радиотерапија на главата и вратот

Радиотерапијата применета во регионот на главата и вратот неизбежно доведува до оштетувања на здравите ткива во ирадијационото поле. Особено сензитивни структури во овој контекст се оралната мукоза и плунковните жлезди, чија изложеност на јонизирачко зрачење резултира со спектар од акутни и хронични компликации.

Повеќе од половина од пациентите подложени на радиотерапија развиваат хронична ксеростомија, додека скоро сите искусуваат изразена форма на орален мукозитис^[30, 31]. Ова значително ја компромитира способноста за исхрана и негативно влијае врз квалитетот на живот на пациентите. Честопати резултира и со прекин или пролонгирање на планираната терапија.

1.4.1. Орален мукозитис

Оралниот мукозитис (ОМ) претставува акутно инфламаторно и улцеративно нарушување на мукозата на усната празнина, кое се развива како резултат на оштетување предизвикано од цитостатска терапија или радиотерапија кај онколошки пациенти^[30, 32]. Клиничките манифестации вклучуваат еритем, болни улцерации и формирање на псевдомембранозни лезии, што значително го компромитираат говорот, исхраната и оралната хигиена^[30]. Кај пациентите со HNSCC кои се изложени на високи дози радијација, инциденцата на орален мукозитис надминува 90 %^[31]. Патогенетскиот механизам на ОМ обично се опишува низ пет последователни фази, според моделот на Сонс: иницијална фаза, примарен ткивен одговор, сигнална амплификација, улцеративна фаза и фаза на заздравување^[30]. Првичниот патофизиолошки процес е резултат на ендотелна и епителна клеточна повреда од радијацијата, при што клучна улога има создавањето на реактивни кислородни видови, како што се водородниот пероксид (H_2O_2), супероксидниот анјон (O_2^-) и хидроксилниот радикал ($\bullet OH$), кои настануваат преку радиолитичка деградација на водата во клеточната средина. Овие ROS директно предизвикуваат двојни прекини во ДНК и промовираат апоптоза на базалните епителни клетки, што значително ја редуцира регенеративната способност на оралниот епител и ја влошува тежината на мукозитисот^[31, 32]. Следствено, доаѓа до изразен воспалителен одговор кој се карактеризира со активација на транскрипцискиот фактор NF- κB и последователна каскада на провоспалителните цитокини, што резултира со нарушување на интегритетот на

епителната бариера и создавање улцеративни лезии^[31, 32]. Понатамошните дефекти во регенеративната способност на мукозата, условени од загубата на базални матични клетки и деградацијата на екстрацелуларниот матрикс, дополнително го влошуваат и продолжуваат клиничкиот тек на болеста. Овие патофизиолошки процеси, вклучително: зголемената продукција на ROS, нарушувањето на антиоксидантната заштита, силната воспалителна каскада и компромитираните механизми на ткивна регенерација, ја сочинуваат клучната основа за појавата на орален мукозитис кај пациенти со малигни заболувања во регијата на главата и вратот третирани со радиотерапија^[31, 32]. Во текот на оралниот мукозитис, забележано е покачување на ткивните концентрации на биохемиските маркери за оксидативен стрес, како што се малондиалдехид (MDA) и миелопероксидаза (MPO)^[32], истовремено проследено со намалување на нивото на клучните антиоксидантни ензими, како глутатион и супероксид дисмутаза (SOD)^[33]. Овие биохемиски промени укажуваат дека оксидативниот стрес претставува централен патофизиолошки механизам во развојот на радиотерапски индуциран орален мукозитис^[32, 33].

1.4.2. Радијациски индуцирано оштетување на плунковните жлезди/хипосаливација

Експонирањето на плунковните жлезди на јонизирачко зрачење, предизвикува значајно зголемување на интрацелуларната продукција на реактивни кислородни соединенија (ROS), надминувајќи ги нивните природни антиоксидативни капацитети. Овој вишок ROS иницира состојба на оксидативен стрес, која го компромитира дејството на клеточните антиоксидантни механизми и предизвикува силно електрохемиско оптоварување во клеточната средина. Како директна последица, ROS целат на структурните компоненти на жлездените клетки, вклучувајќи ја ДНК, липидните двослоеве и протеините, што резултира со хемиска модификација и структурно оштетување, особено на ацинусните и дуктусните епителни клетки. Овие молекуларни оштетувања ја активираат апоптотичката сигнализација, вклучително преку p53/вах патеката и активација на каспазите, што доведува до масивна програмирана клеточна смрт^[34, 35]. Паралелно, оштетувањето на митохондриите (загуба на мембранскиот потенцијал и нарушено производство на АТФ) ја зголемува апоптотичката сигнализација и предизвикува дополнителна клеточна смрт^[34, 35]. Исто така, зрачењето предизвикува микроваскуларни оштетувања: значително се намалува густината на капиларите и се нарушува микроциркулацијата во жлезденото ткиво. Овие феномени, во комбинација со оптоварувањето на ROS, значително го поттикнуваат прогресивното нарушување на секреторната функција^[36]. Крајниот исход е хронично намалена продукција на плунка (ксеростомија) и комплетно нарушување на секреторната способност на плунковните жлезди.

1.5. Плунката како дијагностички медиум

Во последната деценија плунката предизвикува голем интерес како медиум за откривање биомолекули кои би се поврзале со различни состојби на здравје и болест кај човекот. Добриот дијагностички метод треба да е функционален, специфичен, сензитивен, евтин и да има клиничка примена. Во тој поглед, саливарната дијагностика е ветувачка постапка која изобилува со голем број биомаркери за неинвазивна проценка на состојбата на организмот, вклучувајќи ги и оние поврзани со оксидативниот стрес и антиоксидативните системи.

Меѓу најзначајните саливарни биомаркери за евалуација на оксидативниот стрес, кои се користат во современата дијагностика, се издвојуваат малондиалдеhidот (MDA), кој служи како сензитивен индикатор за липидната пероксидација и 8-хидрокси-2'-деоксигванозинот (8-OHdG), кој се употребува како веродостоен маркер за оксидативно оштетување на ДНК. Дополнително, широко се анализираат и биомаркери што ја одразуваат антиоксидативната способност на организмот, како што се вкупниот антиоксидативен капацитет (TAC), редуцираниот глутатион (GSH), ензимите супероксид дисмутаза (SOD) и каталаза [37, 38]. Според бројните истражувања, концентрациите на овие саливарни биомолекули покажуваат висока корелација со соодветните вредности во крвната плазма, што ја потврдува нивната валидност како неинвазивни и доверливи индикатори на системскиот оксидативен статус [37, 38]. Ваквата саливарна дијагностика се применува во широк спектар на клинички и експериментални истражувања, особено во контекст на оралниот карцином, пародонталната болест, дијабетес мелитус, ревматоидниот артритис, хроничната бубрежна болест, цереброваскуларен инсулт, како и други состојби што се карактеризираат со нарушен баланс помеѓу прооксидативните и антиоксидативните процеси во организмот [37-41]. Од овие причини, човековата плунка претставува ветувачки и сè пошироко применуван биофлуид за неинвазивна проценка и следење на голем број физиолошки и патолошки состојби, преку идентификација на промените во нивоата на различни специфични оксидативни и антиоксидативни биомаркери.

1.5.1. Саливарни маркери за оксидативен стрес

Едни од клучните биомаркери што се користат за евалуација на оксидативниот стрес во плунката се:

Железоредуцирачка способност на плунката – FRAS

Железоредуцирачкиот антиоксидативен капацитет на плунката се определува со методот FRAS. Овој метод се користи за проценување на способноста на плунката да ги редуцира железните јони од тровалентна (Fe^{3+}) во двовалентна форма (Fe^{2+}). Методот претставува мерка за антиоксидативниот капацитет на овој биолошки флуид и е модифициран од анализата FRAP (железоредуцирачка способност на плазмата), развиена во 1996 година од Benzie и Strain [42], за мерење на антиоксидативната моќ на човечката плазма.

Редукцијата на железото во FRAS-тестот се одвива во благо-кисела средина (pH околу 3,6). Во овие услови, антиоксидансите присутни во плунката донираат електрони на Fe^{3+} јоните, редуцирајќи ги во Fe^{2+} јони. Овие двовалентни железни јони понатаму реагираат со специјален реагенс 2,4,6-трипиридил-S-триазин (TPTZ), формирајќи карактеристичен комплекс со сина боја, чија интензивност се мери спектрофотометриски на 593 nm. Колку повеќе антиоксиданси се присутни толку е посилна редукцијата, што резултира со поголем интензитет на бојата^[42].

Овој метод го овозможува проценувањето на антиоксидативниот статус на плунката, а со тоа и индиректно на оксидативниот стрес.

Малондиалдехид (MDA)

Малондиалдехидот (MDA) е соединение од три јаглеродни диалдехиди, кое се појавува во крвта, плунката, серумот, ткивата и урината како продукт на липидната пероксидација. Претставува маркер за степенот на оксидативно оштетување на клеточната мембрана, што го прави корисен индикатор за нивото на оксидативниот стрес^[41].

Липидите, особено полинезаситените масни киселини (PUFAs), кои содржат повеќе двојни врски помеѓу јаглеродните атоми, се најподложни на оштетувања предизвикани од оксидативен стрес. Оксидансите дејствуваат преку одземање на водороден атом од липидите, при што настануваат нестабилни липидни радикали (L $\cdot$). Потоа овие радикали се комбинираат со кислород, формирајќи липидни пероксилни радикали (LOO $\cdot$), кои земаат уште еден водород од друга липидна молекула. На тој начин реакцијата продолжува и резултира со формирање на постабилни соединенија познати како липидни хидропероксиди (LOOHs). Овој процес се нарекува липидна пероксидација, при што липидните пероксиди и радикали можат дополнително да подлежат на циклизација и деградација, со што настануваат секундарни продукти^[43].

Најзначајниот и најдобро проучен продукт од липидната пероксидација е малондиалдехидот (MDA). Тој е важен маркер за проценка на оксидативниот стрес, познат по неговите токсични и мутагени ефекти.

Откако ќе биде формиран, малондиалдехидот (MDA) подлежи на ензимска биотрансформација, првенствено на митохондријално ниво преку дејството на алдехид-дехидрогеназата. Сепак, во услови на засилен оксидативен стрес, тој може ковалентно да се врзува за протеините и нуклеинските киселини, при што се формираат стабилни ДНК-протеински вкрстени комплекси и адукти што доведува до значајни оштетувања на клеточните биомолекули^[44].

Понатаму, еден дел од MDA се излачува преку урината^[44]. Како резултат на овие интеракции, настануваат дополнителни модификации што резултираат со формирање на различни MDA-епитопи, кои стапуваат во интеракција со вродениот имунолошки систем и кои се поврзани со експресија на

проинфламаторните гени и активација на сигналните патишта поврзани со воспалителни реакции^[44, 45].

Како краен продукт на липидната пероксидација, MDA се користи како биомаркер за мерење на оксидативниот стрес во разни биолошки примероци, како крв, урина и плунка кај пациентите заболени од широк спектар на болести, вклучувајќи и OSCC ^[6].

Супероксид дисмутаза (SOD)

Супероксид дисмутазата (SOD), еден од најважните ензимски антиоксиданси, ги неутрализира супероксидните анјони и го штити ткивото од оксидативно оштетување^[46].

Супероксид дисмутазите (SOD) се група металопротеински ензими присутни во сите живи организми и имаат клучна улога во одбраната од оксидативното оштетување предизвикано од ROS. Овие ензими го катализираат процесот на дисмутација, односно конверзијата на супероксидниот анјонски радикал (O_2^-) во молекуларен кислород (O_2) и водород пероксид (H_2O_2). Со овој механизам, SOD ја намалува концентрацијата на супероксидните радикали, кои во високи концентрации може да ги оштетат клетките.

Оваа ензимска реакција се одвива преку алтернативна оксидација и редукција на металните јони кои се наоѓаат во активниот центар на ензимот^[47].

Ензимската деградација на супероксидниот радикал се одвива во два чекора: прво, дисмутација на $O_2^{\bullet-}$ во водород пероксид (H_2O_2) и молекуларен кислород (O_2), што е посредувано од SOD, и второ, конверзија на H_2O_2 од други ензими. Сепак, супероксидните радикали индуцирани од зрачење претставуваат необичен и голем товар што може да ги преоптовари овие механизми^[48].

Кај човекот, најчесто се застапени три вида SOD: цитоплазматска Cu,Zn-SOD (SOD1), митохондријална Mn-SOD (SOD2) и екстрацелуларна Cu,Zn-SOD (SOD3), додека никел содржинската форма е главно присутна кај микроорганизмите и некои растенија ^[47].

Поради нивната централна улога во клеточната антиоксидативна заштита, ензимите од типот на SOD се интензивно проучувани како потенцијални биомаркери за различни заболувања поврзани со оксидативниот стрес.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

Во современите онколошки истражувања, сè повеќе се потенцира значењето на оксидативниот стрес и неговата улога во развојот и прогресијата на различни типови карциноми, вклучувајќи го и оралниот планоцелуларен карцином. Оксидативниот стрес, предизвикан од дисбалансот помеѓу продукцијата на ROS и капацитетот на антиоксидативните механизми, доведува до оштетување на ДНК и клеточните мембрани, што може да ја зголеми генетската нестабилност. Овој процес е особено важен кога се разгледува ефектот на радиотерапијата, која иако е ефикасна во уништувањето на туморските клетки, може дополнително да ја зголеми продукцијата на ROS, создавајќи потенцијални ризици за здравите ткива. На пример, последните истражувања укажуваат дека прекумерната продукција на ROS може да стимулира клеточна пролиферација, мутагенеза и хронично воспаление, кои се основа на малигната трансформација на околните здрави клетки^[49].

Исто така, според најновите истражувања, кај пациентите со OSCC се детектираат повисоки нивоа на маркерите за оксидативно оштетување и нарушена антиоксидативна одбрана во однос на здравите индивидуи ^[6, 50].

Во мета-анализата на Mohideen et al.^[6] се наведени зголемена концентрација на MDA и намалена концентрација на ендогените антиоксиданси во серум, плазма и плунка кај пациентите со орален планоцелуларен карцином, споредбено со контролната група на здравите индивидуи, што укажува на зголемен оксидативен стрес и намален антиоксидативен потенцијал кај овие пациенти. Ваквата состојба на нарушена рамнотежа помеѓу слободните радикали и антиоксидативните одбранбени системи сугерира на улогата на оксидативниот стрес во патогенезата и прогресијата на оралниот карцином.

По хируршката ексцизија на карциномот се очекува редукација на оксидативниот стрес, бидејќи отстранувањето на туморската маса придонесува за обновување на редокс рамнотежата. Тоа го потврдуваат Sawai et al.^[51], кои забележале значајно намалување на нивото на d-ROMs (деривати на реактивни кислородни метаболити) во крвта – маркер за системски оксидативен стрес – кај пациентите по хируршко отстранување на колоректалниот карцином.

Во последниве години, оксидативниот стрес се смета за важен биомаркер за ефектот и исходот од третманот на OSCC. Reinema et al.^[52] во својата студија укажуваат дека поинтензивниот антиоксидативен одговор на пациентот – искажано преку зголемување на вкупниот антиоксидативен капацитет (TAC) во серумот и изразувањето на транскрипцискиот фактор NRF2 за време на радиотерапија кај пациентите со HNSCC – се поврзува со полоша контрола на туморот и често корелира со помалку успешен третман. Овие наоди укажуваат дека мерењето на промените во нивото на ROS/антиоксиданси може да служи како предиктор за одговорот на терапијата. Исто така, во современите истражувања се изучуваат саливарните биомаркери MDA, SOD и глутатион како

индикатори за локалниот оксидативен статус. Некои студии покажуваат дека зголемените вредности на овие маркери по радиотерапија, корелираат со сериозноста на компликациите од неа, што ја потенцира нивната биомедицинска важност^[53].

Со оглед на овие аспекти, неодамнешните истражувања се насочени кон мерење на оксидативниот стрес како важен индикатор за биолошките ефекти на радиотерапијата. Разбирањето на промените на нивото на саливарните биомаркери поврзани со оксидативниот стрес, како што се FRAS, MDA и SOD, може да понуди нови информации за влијанието на радиотерапијата врз оксидативниот и антиоксидативниот статус на плунката.

Голем број истражувања укажуваат на промените во антиоксидативниот статус и нивото на оксидативен стрес кај пациентите подложени на радиотерапија. Студијата на Derindağ et al.^[54] имала цел да ги испита овие промени преку мерење на нивото на малондиалдехид (MDA), глутатион (GSH) и глутатион пероксидаза (GSH-Px) во плунка, пред и по радиотерапија кај пациенти со карцином на главата и вратот. Кај пациентите што биле подложени на радиотерапија е забележано статистички значајно зголемување на нивото на MDA, што укажува на зголемена липидна пероксидација и оксидативен стрес. Од друга страна, нивото на антиоксидансите GSH и GSH-Px се намалило, но без статистички значајна разлика, што сугерира дека радиотерапијата предизвикува намалување на антиоксидантниот капацитет на организмот. Авторите сугерираат дека ова зголемување на MDA е показател на зголемена липидна пероксидација, предизвикана од недоволна блокада на слободните радикали од страна на антиоксидансите, како резултат на намалените нивоа на GSH и GSH-Px. Ова е важно бидејќи MDA, како краен продукт на липидната пероксидација, е поврзан со оштетување на ДНК, мутагенеза и карциногенеза, што игра клучна улога во патогенезата и прогресијата на различни карциноми.

Vinay et al.^[55] во својата студија, кај пациенти со карцином на главата и вратот ги анализирале саливарните нивоа на малондиалдехид (MDA), глутатион пероксидаза (GPx) и миелопероксидаза (MPO), пред и по радиотерапијата. Резултатите покажале дека нивото на MDA значајно се намалило по радиотерапијата, што укажува на редукција на липидната пероксидација. Наспроти тоа, иако е забележано намалување на GPx и MPO по радиотерапијата, овие промени не биле статистички значајни. Овие наоди сугерираат дека и покрај намалувањето на некои биохемиски параметри поврзани со оксидативниот стрес, како MDA, радиотерапијата не доведува до значајно подобрување на вкупниот антиоксидативен капацитет. Дополнително, мерењето на вкупниот антиоксидативен капацитет (TAC) покажало зголемување по радиотерапијата, но ова зголемување не било статистички значајно. Ваквиот ефект е документиран и во студијата на Malathi et al.^[56] во која пред радиотерапијата кај пациентите со карцином на главата и вратот, во плазмата биле присутни повисоки нивоа на MDA и пониски нивоа на SOD, витамин А,

витамин Ц и церулоплазмин, споредено со контролната група. По радиотерапијата, овие параметри значително се промениле, со статистички значајно намалување на MDA и зголемување на нивоата на антиоксидансите (SOD, витамин А, витамин Ц и церулоплазмин), што укажува на редукција на липидната пероксидација и подобрување на антиоксидативниот статус, односно позитивен ефект на радиотерапијата во однос на намалувањето на оксидативниот стрес и подобрувањето на антиоксидативната одбрана.

Улогата на радиотерапијата во оксидативното оштетување кај пациентите со планоцелуларен карцином на главата и вратот (HNSCC) ја потврдиле Gupta et al. [57]. Во нивната студија се проценува активноста на супероксид дисмутаза (SOD) и каталаза (CAT) во еритроцитите, како и нивоата на тоталните тиоли (T-SH) и малондиалдехидот (MDA) како маркер на липидната пероксидација. Нивните резултати демонстрираат дека активноста на SOD и CAT биле намалени кај пациентите пред радиотерапијата, но значително зголемени по радиотерапијата. Исто така, нивото на T-SH било намалено кај нетретираниите пациенти и покажало благо зголемување по радиотерапијата. Нивото на MDA покажало значително зголемување и кај нетретираниите пациенти и кај пациентите по радиотерапијата, во споредба со контролната група на здрави испитаници. Овие резултати укажуваат дека има зголемување на оксидативниот стрес кај пациентите со HNSCC, особено по радиотерапијата, како последица на зголемената продукција на ROS. Од нивните резултати произлегол и заклучокот дека оштетувањата предизвикани од слободните радикали се влошуваат кај пациентите со HNSCC поради зголемениот оксидативен стрес за време на радиотерапијата. Иако нивото на антиоксидансите се враќа на почетното ниво по третманот, системот останува нецелосно ефикасен во борбата против слободните радикали.

Поврзаноста на оксидативниот стрес и радиотерапијата исто така била интензивно истражувана и од Sabitha et al.[58] кои укажале на статистички значајно зголемување на нивото на MDA кај пациентите со орален карцином, и пред и по радиотерапијата, споредено со здравите испитаници и статистички значајно намалување на активноста на антиоксидативните ензими: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GPX), глутатион редуктаза (GR), глутатион-S-трансфераза (GST) и глукоза-6-фосфат дехидрогеназа (G6PDH) во хемолизат од црвени крвни клетки.

Ayuningtyas et al.[53] во својата судија утврдиле дека кај пациентите со HNSCC, кои развиваат потешка форма на мукозитис, за време на РТ доаѓа до значајно намалување на антиоксидативните ензими и пораст на оксидативните маркери, што укажува на нарушен редокс баланс. Овие наоди потврдуваат дека радиотерапијата, генерално, ја поместува рамнотежата кон оксидативен стрес.

Радијацијата може да предизвика структурно и функционално оштетување на ацинарните и дукталните клетки, нервите, крвните и лимфните садови на плунковните жлезди, што на крајот резултира со намалено лачење на

плунка и ксеростомија^[59]. Традиционалните техники на зрачна терапија предизвикуваат умерена до тешка ксеростомија кај околу две третини од пациентите, со трајно оштетување на плунковните жлезди^[60]. Напредните техники, како што е интензитет-модулираната радиотерапија (IMRT), значајно ја редуцираат појавата на хронична ксеростомија. Во својата мета-анализа, De Felice et al. утврдиле дека IMRT доведува до над 70 % намалување на долгорочната преваленција на ксеростомија во споредба со конвенционалната 3D-конформална радиотерапија^[61]. Сепак, и покрај технолошкиот напредок, радијациски индуцираната ксеростомија останува честа и тешка компликација што сериозно го нарушува квалитетот на живот на пациентите.

За да се корелираат зголемениот оксидативен стрес со оштетувањето на плунковните жлезди и протективното дејство на антиоксидансите, Ren et al.^[62] спровеле експериментална студија во која користеле локален модел на радијација на плунковните жлезди кај лабораториски глувци, поделени во четири групи: контролна група, група изложена само на радијација, група третирана со HL-003 пред радијацијата и група третирана со амифостин како компаративен антиоксиданс со последователно мерење на нивоата на вкупната антиоксидативна способност (T-AOC) преку FRAP-тест, MDA и SOD2. Резултатите укажале на значително намалување на T-AOC во групата изложена на радијација, значително зголемување на MDA и значително намалување на SOD2 во истата група, што укажува на зголемен оксидативен стрес и ослабена антиоксидативна заштита во третираниот дел. За да го превенираат оксидативното оштетување на плунковните жлезди, авторите користеле антиоксидативни средства, како што е HL-003, кој покажал значителен заштитен ефект. Нивните резултати го наметнале заклучокот дека HL-003 има потенцијал како ефикасен радиопротектор кој ги ублажува несаканите ефекти од радиотерапијата врз плунковните жлезди.

Употребата на антиоксиданси, како адјувантната терапија, при радиотерапија на главата и вратот се заснова на стремежот за заштита на околните здрави ткива од зрачно индуцираното оксидативно оштетување. Со тоа, се настојува да се редуцираат акутните и доцните компликации од третманот, како што се мукозитис, дерматитис и ксеростомија. Некои клинички истражувања укажуваат дека одредени антиоксидативни супстанции можат да ги ублажат несаканите ефекти од радиотерапијата, без значително да го нарушат терапевтскиот ефект врз малигното ткиво. Така, Sayyed et al.^[63] спровеле рандомизирана контролирана студија во која кај пациенти со карцином на главата и вратот бил администриран комбиниран третман со витамин Е (α -токоферол) и пентоксифилин за време на радиотерапијата. Резултатите покажале дека испитуваната група имала статистички значајно пониска инциденција на тежок орален мукозитис и дисфагија од степен 3–4, во споредба со контролна група, која не примала антиоксиданси. Дополнително, времетраењето на мукозитисот и нарушеното голтање било скратено за приближно 4 до 5 недели кај пациентите во испитуваната група. Значајно е што

не била утврдена разлика во локорегионалната контрола на туморот помеѓу двете групи, што укажува дека примената на оваа антиоксидативна комбинација овозможува ефективно намалување на штетните ефекти од радиотерапијата врз здравите ткива без да се наруши онколошкиот ефект на третманот. Слично на тоа, мета-анализата на Gu et al.^[64], вклучувајќи 17 рандомизирани студии кај пациентите со HNSCC, покажала дека амифостинот, кој е радиопротективна супстанција со изразено антиоксидативно дејство, значајно ги намалува тешките облици на мукозитис, ксеростомија и дисфагија, без да влијае на туморскиот одговор кон радиотерапијата, односно стапките на комплетен и парцијален одговор на туморот кон радиотерапијата биле еднакви во групите со и без амифостин. Овие истражувања укажуваат дека рационалната примена на одредени антиоксиданси или радиопротектори може да ги заштити нормалните ткива од радијациското оштетување, без притоа да се наруши примарниот цитотоксичен ефект врз малигните клетки.

Сепак, примената на антиоксиданси за време на радиотерапијата останува контроверзна, бидејќи дел од студиите укажуваат на потенцијален ризик од компромитирање на терапевтската ефикасност. Проблемот произлегува од неселективната природа на антиоксидансите, кои, покрај заштитата на нормалните клетки, потенцијално можат да обезбедат и заштита на туморските клетки од оксидативното оштетување предизвикано од радиотерапијата, со што може да се намали нејзината онколошка ефикасност.

Bairati et al.^[65] спровеле рандомизирана студија кај пациенти со карцином на главата и вратот, во која високи дози α -токоферол и β -каротен биле администрирани за време и по радиотерапијата, со цел да се превенираат секундарни малигнитети. Испитуваната група имала речиси тројно зголемен ризик за втор примарен тумор (HR = 2,88) и повисока стапка на рецидиви (HR = 1,86) во споредба со контролната група. По прекинување на суплементацијата, ризикот се нормализирал. Авторите предупредуваат дека антиоксидансите можат да го нарушат онколошкиот исход и не се препорачуваат за рутинска употреба за време на терапијата.

Meliante et al.^[66] во својот ревијален труд заклучиле дека ниту еден од истражуваните антиоксиданси – вклучително и α -токоферол, β -каротен, N-ацетилцистеин и витамини А и Е – не покажал докажана ефикасност во превенцијата на секундарни тумори кај пациентите со HNSCC. Нивната улога, според авторите, засега останува ограничена на ублажување на компликациите од радиотерапијата врз здравите ткива. Исто така, потенцираат дека влијанието на овие суплементи врз онколошкиот исход и преживувањето сè уште не е доволно разјаснето, поради што се потребни дополнителни студии пред тие да се препорачаат за рутинска клиничка примена.

Активацијата на NRF2-патекаата, позната по својата улога во модулација на антиоксидативниот одговор, е идентификувана како механизам што придонесува за радиорезистенција кај оралниот планоцелуларен карцином.

Студијата на Matsuoka et al.^[67] покажала дека NRF2 ја засилува клеточната одбрана и метаболичката адаптација на туморот, со што се намалува чувствителноста на клетките на радиотерапија. Овие наоди укажуваат дека екстерната примена на антиоксиданси може неселективно да го поддржи истиот механизам, потенцијално компромитирајќи ја ефикасноста на терапијата. Оттаму, нивната употреба во онколошки контекст бара прецизна, индивидуализирана проценка.

Во настојувањето да се намалат штетните ефекти од радиотерапијата врз здравите ткива, истражени се повеќе агенци со радиопротективни својства. Радиопротекторите претставуваат класа на агенци развиени за редукција на цитотоксичните ефекти од радиотерапијата, која главно ги посредува своите штетни ефекти преку индукција на ROS.

Во таа насока, King et al.^[68], во својот ревијален труд, ја анализирале улогата на амифостинот како селективен радиопротектор кај пациентите со HNC, подложени на радиотерапија. Авторите заклучиле дека амифостинот значајно ја редуцира инциденцијата на умерена до тешка ксеростомија, без да влијае негативно врз туморскиот одговор или стапката на преживување, што го позиционира како безбеден и ефективен радиопротектор за зачувување на функцијата на плунковните жлезди.

Значајно место во современите препораки за радиопротекција има и бензидаминот. Nicolatou-Galitis et al.^[69], во својата студија, го разгледуваат бензидаминот како терапевтска опција за превенција на мукозитисот индуциран од хеморадиотерапија. Авторите укажуваат дека бензидаминот значајно ја намалува тежината, зачестеноста и времетраењето на оралниот мукозитис, особено кај пациентите со HNC. Врз основа на резултатите од повеќе клинички испитувања и мета-анализи, водичите на MASCC/ISOO (Multinational Association of Supportive Care in Cancer / International Society of Oral Oncology) го вклучуваат бензидаминот како стандардна препорака за профилакса на орален мукозитис кај пациентите подложени на радиотерапија во регијата на главата и вратот, со или без хемотерапија^[69].

Покрај бензидаминот, во превенцијата и третманот на радијациски-индуцираниот мукозитис сè поинтензивно се истражуваат и различни антиоксидативни супстанции и нутритивни адјуванси кои се одликуваат со висок безбедносен профил и добра подносливост кај пациентите.

Sio et al.^[70], во рамките на двојно слепа, плацебо контролирана клиничка студија, ја испитувале ефикасноста и безбедноста на 10-процентни раствори за гаргара од N-ацетилцистеин (NAC) кај пациентите подложени на хеморадиотерапија за HNC. Нивните резултати укажале на значајно намалување на тежината на радијацискиот мукозитис, особено во однос на сувоста во устата, болката и густите орални секрети, при што не се евидентирани сериозни несакани ефекти.

Во согласност со овие наоди, Kim et al. [33] на претклинички *in vitro* и *in vivo* модели демонстрирале дека NAC значајно го редуцира оксидативниот стрес и радијациски индуцираната автофагија во клетките на оралната мукоза. Овие резултати го потврдуваат потенцијалот на NAC како сигурен и ефективен радиопротективен адјуванс, со можност за вклучување во идните протоколи за превенција на мукозитис кај пациентите подложени на зрачна терапија[33].

Современите истражувања документираат дека природните антиоксиданси и витамини како: куркумин, мелатонин, витамин Д, витамин Е, цинк и пчелин мед, можат значајно да ги ублажат несаканите ефекти од радиотерапијата кај пациентите со карцином на главата и вратот, особено мукозитисот, болката, дисфагијата и ксеростомијата, без да ја нарушат ефикасноста на онколошкиот третман^[71-76]. Локалната или системската примена соодветно на агенсот, водат до подобра толеранција на терапијата и повисок квалитет на живот. Сепак, за прецизни препораки се потребни дополнителни опсежни клинички испитувања ^[71, 74-77].

МОТИВ ЗА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Мотивирани од спротивставените ставови и резултати во различни студии за ефектот на радиотерапијата врз квалитативните и квантитативните промени на плунката, ја поставивме целта на нашата студија.

3. ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Целта на нашето истражување е да се процени ефектот на радиотерапијата врз квантитетот и квалитетот на плунката, евалуиран преку саливарните биомаркери FRAS, MDA и SOD, кај пациентите со орален планоцелуларен карцином, хируршки третирани и подложени на радиотерапија на главата и вратот.

Покрај главната цел ќе имаме и три специфични цели:

- **Специфична цел 1.** Евалуација на нивото на FRAS, MDA и SOD во плунката кај пациенти со OSCC, пред и по хируршко отстранување на карциномот.
- **Специфична цел 2.** Евалуација на нивото на FRAS, MDA и SOD во плунката кај пациенти со OSCC, по хируршко отстранување на карциномот со нивото на истите по радиотерапија.
- **Специфична цел 3.** Евалуација на количествотосаливарна секреција кај пациенти со OSCC пред и по хируршки третман и по радиотерапија.

РАБОТНА ХИПОТЕЗА

Радиотерапијата, применета како третман кај пациенти со орален планоцелуларен карцином, влијае на промена на нивото на саливарните биомаркери FRAS, MDA и SOD.

ДОПОЛНИТЕЛНА ХИПОТЕЗА

По хируршкото отстранување на карциномот доаѓа до промена на нивото на саливарните биомаркери FRAS, MDA и SOD.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

За реализација на поставената цел во истражувањето беа вклучени 40 испитаници, поделени во две групи: испитаници со патохистолошки потврден OSCC, хируршки третирани и подложени на радиотерапија на главата и вратот (20) и здрави испитаници без орални или системски заболувања кои може да влијаат на оксидативниот стрес во плунката, како контролна група (20). Сите испитаници претходно потпишаа писмена согласност за вклучување во студијата.

Критериуми за вклучување на испитаниците во студијата:

- Испитаници со патохистолошки потврден OSCC
- Испитаници подложени на радиотерапија по хируршкиот третман на OSCC.

Критериуми за исклучување на испитаниците од студијата:

- Испитаници што претходно биле подложени на радиотерапија
- Испитаници што починале во текот на третманот
- Испитаници со орални или системски заболувања кои може да влијаат на оксидативниот стрес во плунката.

Испитувањето беше спроведено на УК за хирургија на лице, вилици и врат – максилофацијална хирургија во Скопје „Академик Илија Васков“ и во Центарот за НИР – Биохемиска и микробиолошка лабораторија на Стоматолошкиот факултет – Скопје, при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје.

Материјалите што беа употребени во ова истражување се:

1. Стерилни чашки за колекционирање плунка
2. Лабораториски стерилни епрувети
3. Лабораториски тиквички
4. Лабораториски чашки
5. Епрувети епендорф од 2 ml
6. Пипетори и продолжетоци за пипетори
7. Ракавици и маски за еднократна употреба
8. Вортекс апарат – Dragon lab MX-S
9. pH-метар LLG Labware
10. Магнетна мешалка Guardian™ 2000
11. Центрифуга со ладење – Biobase

12. Водена бања – Memmert
13. Спектрофотометар - Specord 50 plus
14. Компјутер и софтвер за спектрофотометриски анализи – Aspect UV
15. Microsoft excel
16. Ацетатен пуфер
17. Железо (III) хлорид – FeCl_3
18. TPTZ – 2, 4, 6 – Tris (2 – pyridyl) – s – triazine
19. Витамин Ц
20. Трихлороцетна киселина
21. Тиобарбитурна киселина
22. TEP – 1, 1, 3, 3 – Tetraethoxypropane
23. Tris assay пуфер
24. DETAPAC – Diethylene triamine pentaacetic acid
25. Пирогалол

Сите користени реагенси се со степен на чистота за биохемиска анализа.

Методологија на работа

Колекција на нестимулирана плунка

Од сите испитаниците беше колекционирана нестимулирана плунка со методот на исплукување (spitting method) според Navazesh ^[78].

Колекцијата се вршеше во утринските часови, од 08:00 до 11:00 часот, со цел да се минимизираат дневните варијации во продукција на плунката. На испитаниците им беше посочено да не консумираат храна и пијалаци, да не пушат цигари и да не ги четкаат забите минимум 60 минути пред колекцијата на плунка. Пред колекционирањето на плунката, секој испитаник ја плакнеше устата со дестилирана (дејонизирана) вода.

Колекцијата на плунка се одвиваше на Клиниката за максилофацијална хирургија во Скопје и во Биохемиската лабораторија на Катедрата за болести на уста и пародонт, каде што на природна дневна светлина, испитаниците седеа удобно во исправена положба, со благо инклинирана глава кон напред со цел плунката да се акумулира на подот на усната празнина, со отворени очи и без зборување и со минимални орофацијални движења во текот на колекцијата. Вака акумулираната плунка беше исплукувана во пластична градуирана епрувета, во времетраење од 10 минути.

Кај испитаниците од првата група на УК за максилеофацијална хирургија во Скопје беше колекционирана плунка во три временски интервали: пред хируршкиот третман на OSCC, 14 дена по хируршкиот третман на OSCC и од 0 до 4 недели по завршената радиотерапија (чиј вкупен број на фракции беше од 17 до 30 дена, со дневна доза на зрачење од 2Gy/fx и вкупна доза на зрачење од 34 до 60 Gy), додека од контролната група, еднократно.

Колекционираната плунка со ладен синцир веднаш беше транспортирана во Биохемиската лабораторија.

Одредување на количеството излачена плунка

Пред фазата на обработка на колекционираната плунка беше одредувано количеството излачена плунка преку директно визуелно отчитување на волуменот на плунката во градуирани пластични епрувети. Вкупниот волумен беше измерен по завршувањето на 10-минутната колекција, а добиените вредности беа изразени како волумен на излачена плунка во милилитри по минута (ml/min).

Обработка на колекционираната плунка

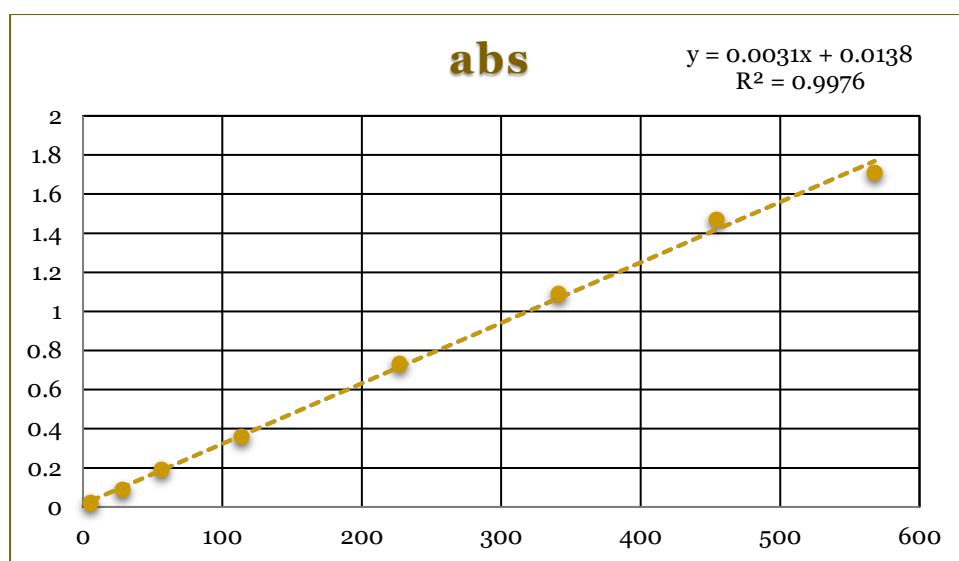
Колекционираната плунка беше вортексирана со помош на вортекс апарат (Dragon Lab MX-S, Кина). По обработката на плунката на овој начин, беше земен примерок со микропипетор кој беше префрлен во мали пластични епрувети од 2 ml (Епендорф епрувети) за замрзнување на примероците. Примероците беа замрзнувани на -20 °C, не подолго од 45 дена. Примероците на замрзнатата плунка, пред спектрофотометриската анализа брзо беа одмрзнати со потопување на малите епрувети со смрзната плунка во топла вода. Потоа примероците беа центрифугирани во центрифуга со ладење (BIOBASE – High Speed Refrigerated Centrifuge) 10 минути, на +4 °C, на 4000 rcf.

На денот на анализа, од добиениот супернатант по центрифугирањето, спектрофотометриски (SPECORD 50 PLUS, Analytik Jena, Germany) беа определувани: саливарните параметри (железоредуцирачкиот капацитет на плунката - FRAS, концентрацијата на малондиалдехид - MDA и активноста на супероксид дисмутаза - SOD).

Определување на железоредуцирачкиот капацитет на плунката

Железоредуцирачкиот капацитет на плунката (ferric reduction ability of saliva – FRAS) беше определен со модифицирана верзија на FRAP методот според Benzie и Strain ^[42], а резултатите беа изразени во $\mu\text{mol AAE/l}$ (AAE – еквиваленти на аскорбинска киселина). Овој колориметриски метод се заснова на способноста на антиоксидантите во примерокот на плунка во кисела средина да го редуцираат тривалентното железо (Fe^{3+}) во комплекс со 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) до двовалентно железо (Fe^{2+}), при што се формира интензивно син Fe^{2+} -TPTZ комплекс чија апсорбанца се читаше на 593 nm.

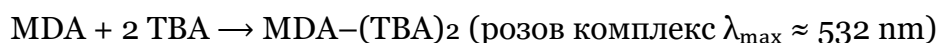
Овој метод беше валидиран во Биохемиската лабораторија на Катедрата за болести на устата и пародонтот, според стандардните упатства за валидација на аналитичките методи. Во лабораторијата, според препораките на **ICH** за валидација на аналитичките методи беа вклучени следните параметри за валидација: линеарност ($R^2=0.9976$ во опсег од $5.68 - 567.8 \mu\text{mol AAE/l}$); граница на детекција ($\text{LoD}=19.63 \mu\text{mol AAE/l}$); граница на квантификација ($\text{LoQ}=59.47 \mu\text{mol AAE/l}$); прецизност (коефициент на варијација($\text{CV}=3.5\%$) и Recovery-точност (99% повторливост). Овие резултати ја потврдуваат соодветноста на методот за анализа на железоредуирачкиот капацитет на плунката.



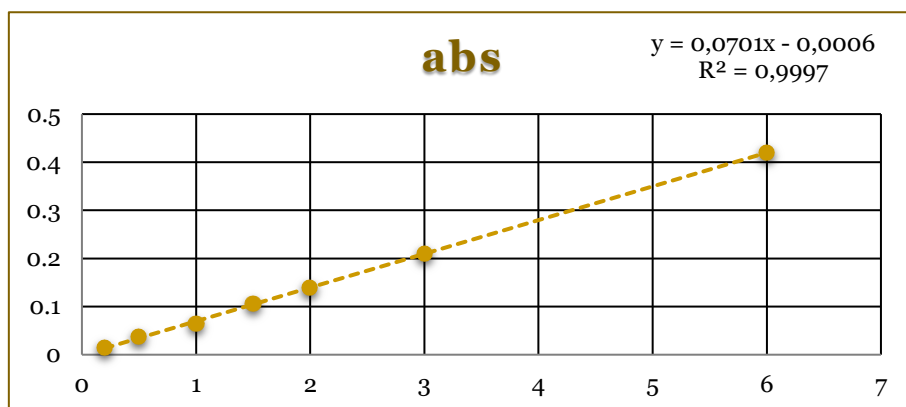
Графикон 1: Корелација помеѓу концентрацијата на стандардите на витамин Ц и апсорбанцата на бранова должина 593 nm
($R^2 = 0.9976$)

Одредување на липидна пероксидација

Степенот на липидна пероксидација беше оценет преку определување на концентрацијата на малондиалдехид (MDA) во примероците од плунка, применувајќи го методот на Buege и Aust ^[79], при што примероците на плунка беа разредени 1:2 со двојно дејонизирана вода и пресметани според факторот на разредување, а резултатите беа изразени во nmol/ml . Методот се заснова на реакцијата на MDA со тиобарбитурната киселина (TBA) во кисела средина и при покачена температура, при што се одвива кондензација на една молекула MDA со две молекули TBA, резултирајќи со формирање на стабилен розово-црвен MDA-(TBA)₂ адукт, чија апсорбанца се читаше на 532nm.



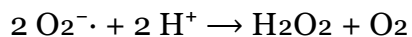
Како и предходната метода така оваа метода беше валидирана со следните параметри за валидација: линеарност $R^2=0.9997$; опсег од 0.2 –6 nmol/ml; граница на детекција ($LoD=0.06$ nmol/ml); граница на квантификација ($LoQ=0.2$ nmol/ml); прецизност (коефициент на варијација ($CV=5.5\%$)) и Recovery-точност (95% повторливост) (графикон 1) Овие резултати ја потврдуваат соодветноста на методот за анализа на степенот на липидна пероксидација во плунката.



Графикон 2: Корелација помеѓу концентрацијата на стандардите на ТВА и апсорбанцата на бранова должина 532 nm ($R^2 = 0.9997$)

Одредување на активноста на SOD

Активноста на ензимот супероксид дисмутаза (SOD) во плунката беше определена според методот на Marklund и Marklund^[80], која се базира на способноста на SOD да ја инхибира автооксидативната реакција на пирогалолот во алкална средина. SOD го катализира дисмутирањето на супероксидните радикали ($O_2^{\cdot-}$) во молекуларен кислород и водород пероксид, со што се намалува брзината на формирање на обоени оксидациони продукти. Со распаѓањето на пирогалолот, растворот добива жолтеникава боја, апсорбанцата треба да расте како што одминува времето.



Апсорбанцата беше измерена на 420 nm во нулта минута, прва минута, втора минута и трета минута, при што резултатите беа изразени во U/ml. Една единица на ензимска активност U, претставува количество на ензим потребно да предизвика 50% инхибиција на автооксидација на пирогалол, а истата се пресметуваше со следната формула^[81]:

$$\%IPA = \Delta AT / \Delta AC * 100\%$$

$$SOD \text{ U/ml} = \%IPA / 50\%$$

%IPA- на инхибиција на автооксидација на пирогалол

Δ AT- промена на абсорбанцата на анализата

Δ AC - промена на абсорбанцата на контролата (примерок во кој не е присутна плунка)

Статистичка анализа:

Податоците беа статистички обработени со помош на софтверот IBM SPSS Statistics 24, а резултатите беа прикажани табеларно и графички.

Анализата на квалитативните податоци беше направена преку определување на фреквенции и проценти.

Анализата на квантитативните податоци беше направена со мерките на централна тенденција (просек, медијана, минимални и максимални вредности), како и стандардна девијација како мерка на дисперзија.

Шапиро-Вилковиот тест (Shapiro-Wilk W test) беше употребен за определување на нормалноста на дистрибуцијата на фреквенциите на параметрите.

Разликата на пропорции беше определена со Хи-квадрат тест (Chi-Square test (χ^2)).

Студентов т-тест (Student's t-test) и Мен-Витниев У-тест (Mann-Whitney U test) беа употребени за споредба на две независни групи примероци.

Ранг-тестот на Вилкоксон (Wilcoxon Signed-Rank test) беше употребен за споредба на две групи на зависни примероци.

Фридмановиот тест (Friedman's test) беше употребен за споредба на повеќе од две групи зависни примероци.

Спирмановиот коефициент на корелација (Spearman's Rank Correlation) тестот беше употребен за определување на корелацијата помеѓу испитуваните параметри.

За CI (confidence interval) точност е земено $p < 0,05$.

5. РЕЗУЛТАТИ

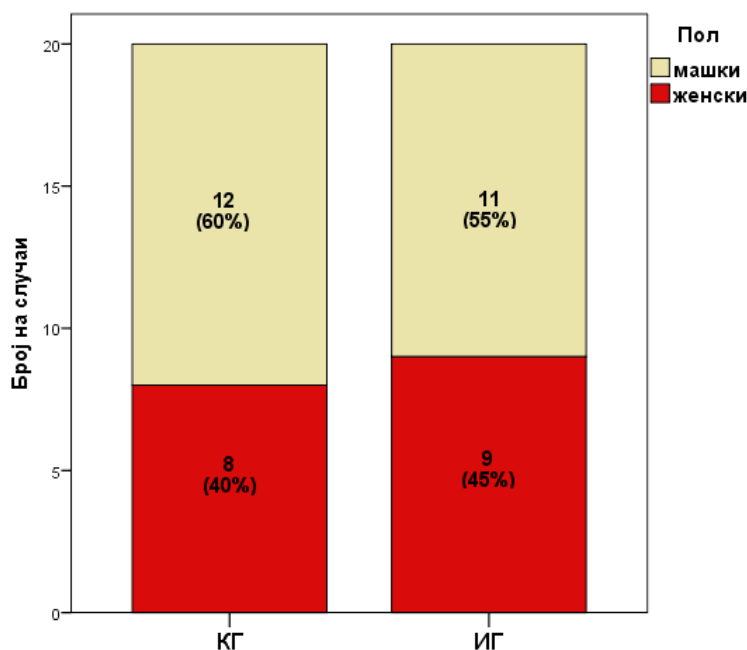
5.1. Општи карактеристики

Анализата според општите карактеристики на примерокот од 40 испитаници се однесуваше на полот и возраста на испитаниците вклучени во истражувањето.

5.1.1. Анализа на примерокот според пол

Табела 1: Дескриптивна анализа на примерокот според пол

Пол	n	групи		p-value
		КГ	ИГ	
Машки	23 (57,5 %)	12 (60 %)	11 (55 %)	$\chi^2=0,900$; df=1; p=0,343)
Женски	17 (42,5 %)	8 (40 %)	9 (45 %)	



Графикон 1: Дистрибуција на примерокот според пол

Во истражувањето, согласно со критериумите за вклучување и исклучување на испитаниците, беа вклучени вкупно 40 (100 %) испитаници, од кои 23 (57,5 %) беа мажи, а 17 (42,5 %) беа жени. Испитаниците беа поделени во две групи и тоа: 20 (50 %) беа категоризирани како контролна група (КГ), а 20 (50 %) како испитувана група (ИГ). Според полот, во КГ беа вклучени 12 машки испитаници (60 %) и 8 женски испитаници (40 %), додека во ИГ беа вклучени 11

машки испитаници (55 %) и 9 женски испитаници (45 %) (табела 1 и графикон 1).

Анализата на разликата помеѓу застапеноста на испитаниците од двата пола во примерокот, за $p > 0,05$ беше статистички несигнификантна ($\chi^2 = 0,900$; $df = 1$; $p = 0,343$), што укажува на хомогеност на испитуваниот примерок во однос на полот (табела 1).

5.1.2. Анализа на примерокот според возраст

Табела 2: Дескриптивна анализа на примерокот според возраст

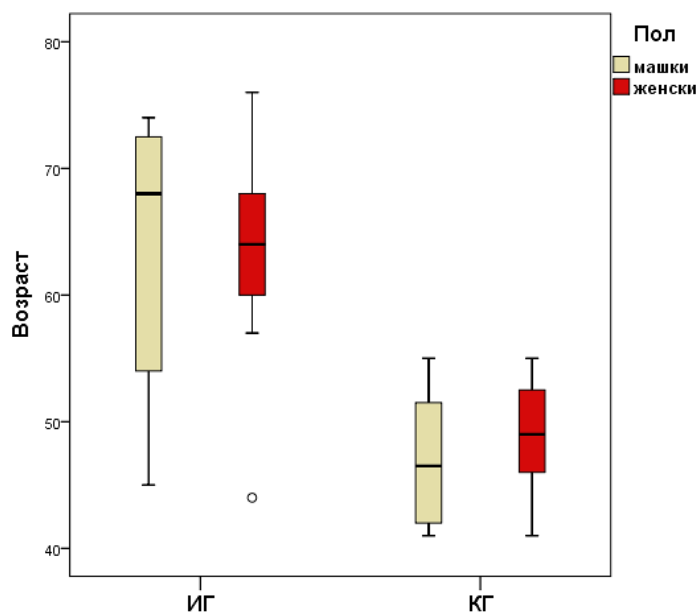
	Бр. (N)	Mean	Std.Dev.	Min	Max
КГ					
Мажи	12	47	4,9	41	55
Жени	8	48,8	4,5	41	55
Вкупно КГ	20	47,7	4,7	41	55
(Student's t-test: $t = -0.858$; $p = 0.402$)					
ИГ					
Мажи	11	62,4	11,5	45	74
Жени	9	63,2	9,1	44	76
Вкупно ИГ	20	62,8	10,2	44	76
(Mann-Whitney U Test: $Z = -0,152$; $p = 0.879$)					
Вкупен примерок					
Вкупно	40	55,2	10,9	41	76
(Student's t-test: $t = 5,941$; $p < 0.001$)					

Просечната возраст на испитаниците во примерокот изнесуваше $55,2 \pm 10,9$ години, со минимална возраст од 41 година и максимална возраст од 76 години (табела 2). Во КГ, просечната возраст на испитаниците беше $47,7 \pm 4,7$ години, со минимална возраст од 41 година и максимална возраст од 55 години. Во ИГ, просечната возраст на испитаниците беше $62,8 \pm 10,2$ години, со минимална возраст од 44 година и максимална возраст од 76 години, што е во согласност со податокот дека оралниот карцином е карактеристичен за повозрасната популација.

Во КГ, кај испитаниците од машки пол, просечната возраст изнесуваше $47,11 \pm 4,9$ години, а кај испитаниците од женски пол, просечната возраст изнесуваше $48,8 \pm 4,5$ години. Минималната возраст кај испитаниците од машки и женски пол беше 41 година, а максималната 55 години (табела 2). За $p > 0,05$ немаше статистички значајна разлика во возраста помеѓу машките и женските испитаници во КГ (Student's t-test: $t = -0,858$; $p = 0,402$) (графикон 2).

Во ИГ, кај испитаниците од машки пол, просечната возраст изнесуваше $62,4 \pm 11,5$ години, а кај испитаниците од женски пол, просечната возраст изнесуваше $63,2 \pm 9,1$ години. Минималната возраст кај испитаниците од машки пол беше 45 години, а максималната 74 години, додека кај испитаниците од женскиот пол, минималната возраст беше 44 години, а максималната возраст 76 години (табела 2). За $p > 0,05$ немаше статистички значајна разлика во возраста помеѓу машките и женските испитаници во ИГ (Mann-Whitney U Test: $Z = -0,152$; $p = 0,879$) (графикон 2).

За $p < 0,05$, согласно со направената анализа, беше утврдена сигнификантна разлика помеѓу двете групи во однос на возраста (Student's t-test: $t = 5,941$; $p < 0,001$). Испитаниците од ИГ се статистички значајно постари во споредба со испитаниците од КГ.



Графикон 2: Анализа на примерокот според пол и возраст

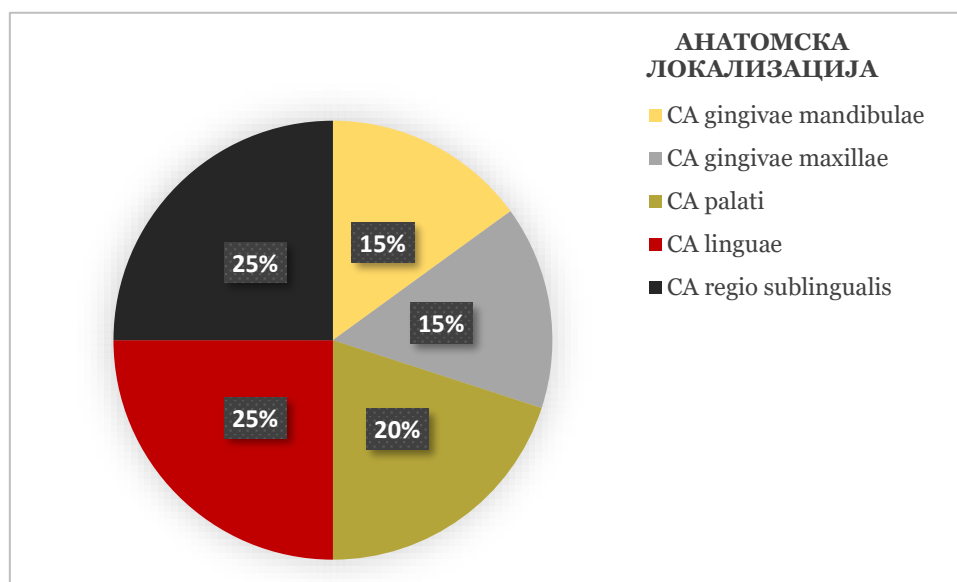
5.2. Анализа на примерокот според локализацијата на карциномот

Во овој дел беше направена анализа на оралниот карцином според анатомската локализација на карциномот во усната празнина. Според карактеристиките на примерокот, карциномот беше поделен во пет категории: CA gingivae mandibulae, CA gingivae maxillae, CA palati, CA linguae и CA regio sublingualis (табела 3, графикон 3).

Табела 3: Дескриптивна анализа на примерокот според локализацијата на карциномот

Локализација	N	%
CA gingivae mandibulae	3	15
CA gingivae maxillae	3	15
CA palati	4	20
CA linguae	5	25
CA regio sublingualis	5	25

($\chi^2=1.000$; df=4; p=0.910)



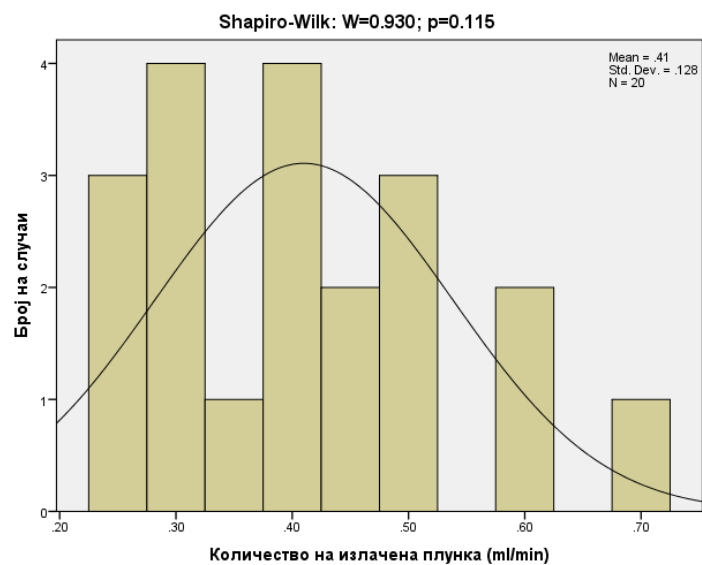
Графикон 3: Графички приказ на примерокот според локализацијата на карциномот

Половина од карциномите во примерокот беа локализирани на јазикот (CA linguae; n=5, 25 %) и во подјазичниот предел (CA linguae; n=5, 25 %). Од останатите карциноми, 4 беа локализирани на максилата (CA palati; n=4, 20 %), 3 беа локализирани на максиларната гингива (CA gingivae maxillae; n=3, 15 %), а 3 беа локализирани на мандибуларната гингива (CA gingivae mandibulae; n=3, 15 %). Не беше регистрирана статистички значајна разлика во застапеноста на оралниот карцином на одредена анатомска локација, во споредба со другите анатомски локации (Chi-square: $\chi^2=1,000$; df=4; p=0,910) (табела 3, графикон 3).

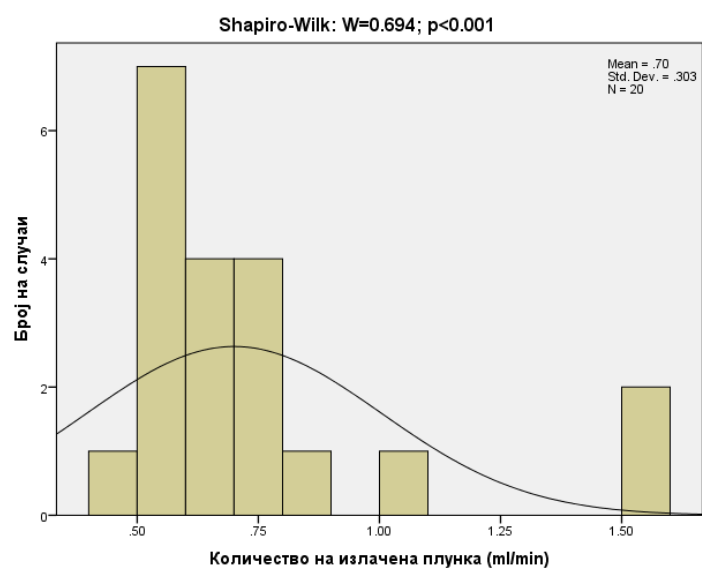
5.3. Анализа на саливарните параметри

Анализата според плунковните параметри се однесуваше на: количеството излучена плунка, железоредуцирачкиот антиоксидативен капацитет на плунката (FRAS), плунковната концентрација на малондиалдехидот (MDA), како и активноста на супероксид дисмутаза (SOD) во плунка.

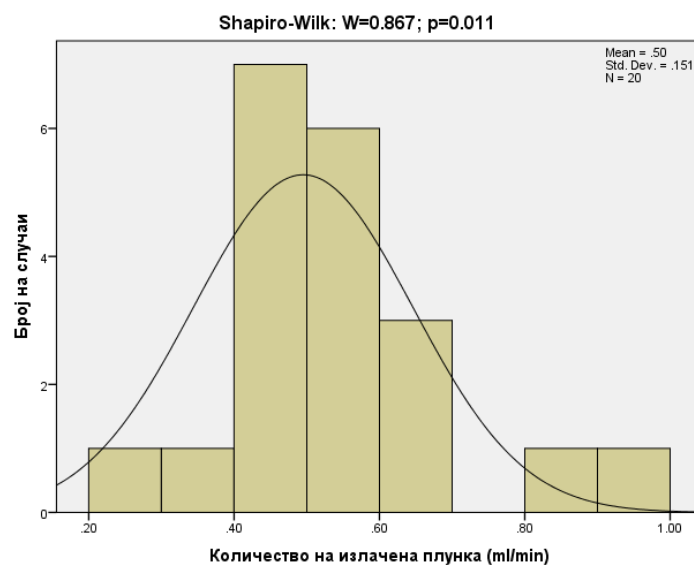
5.3.1 Анализа на количеството излучена плунка



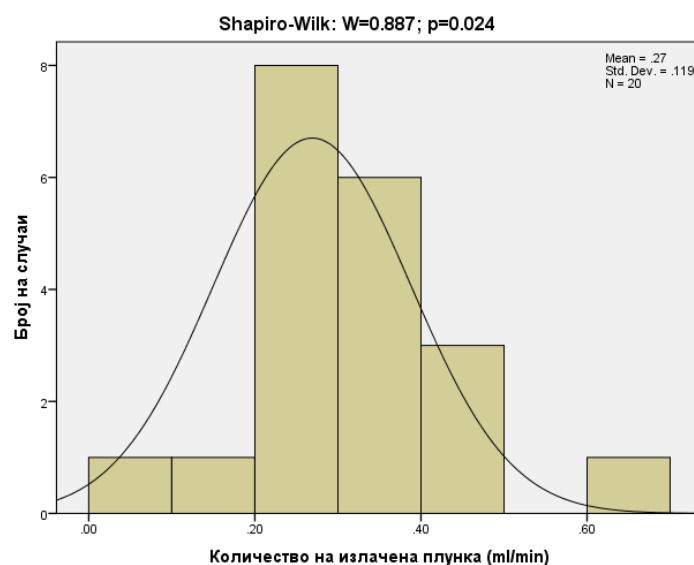
Графикон 4: Дистрибуција на фреквенциите на количеството излучена плунка за КГ



Графикон 5: Дистрибуција на фреквенциите на количеството излучена плунка за ИГ-пред



Графикон 6: Дистрибуција на фреквенциите на количеството излачена плунка за ИГ-по



Графикон 7: Дистрибуција на фреквенциите на количеството излачена плунка за ИГ-рт

Количеството излучена плунка беше анализирано кај КГ, како и кај три подгрупи на ИГ: пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред), по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), како и по спроведување на радиотерапија (ИГ-рт) (графикони 4-7).

Анализата на дистрибуцијата на вредностите на количеството излучена плунка укажа на постоење на:

Правилна дистрибуција во КГ: $W=0,930$; $p=0,115$

Неправилна дистрибуција во ИГ-пред: $W=0,694$; $p<0,001$

Неправилна дистрибуција во ИГ-по: $W=0,867$; $p=0,011$

Неправилна дистрибуција во ИГ-рт: $W=0,887$; $p=0,024$

Согласно со дистрибуцијата на примерокот, во понатамошните анализи ќе бидат користени соодветни параметарски и непараметарски тестови.

Табела 4: Анализа на количеството излучена плунка во КГ и трите подгрупи на ИГ

ml/min	Бр. (N)	Mean	Std.Dev.	Min	Max	Percentiles		
						25 th	50 th	75 th
КГ	20	0,41	0,12	0,25	0,7	0,3	0,4	0,5
ИГ-пред	20	0,7	0,3	0,45	1,5	0,5	0,6	0,7
(Mann–Whitney U test: $Z=-4,179$; $p<0,001$)								
ИГ-пред	20	0,7	0,3	0,45	1,5	0,5	0,6	0,7
ИГ-по	20	0,49	0,15	0,25	0,9	0,4	0,5	0,55
(Wilcoxon test: $Z=-3,290$; $p<0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-по	20	0,49	0,15	0,25	0,9	0,4	0,5	0,55
ИГ-рт	20	0,26	0,11	0,08	0,6	0,2	0,25	0,3
(Wilcoxon test: $Z=-3,859$; $p<0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-пред	20	0,7	0,3	0,45	1,5	0,5	0,6	0,7
ИГ-рт	20	0,26	0,11	0,08	0,6	0,2	0,25	0,3
(Wilcoxon test: $Z=-3,935$; $p<0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								

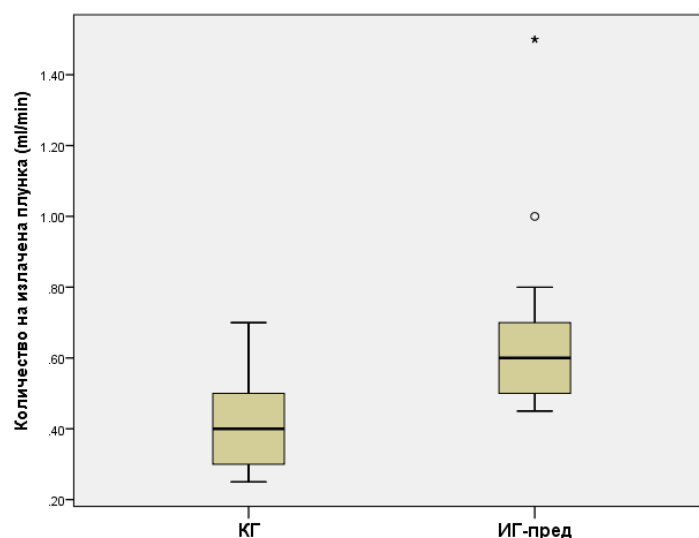
Кај КГ, количеството излучена плунка изнесуваше $0,41 \pm 0,12 \text{ ml/min}$, со најниска вредност од $0,25 \text{ ml/min}$ и највисока вредност од $0,7 \text{ ml/min}$. Кај 50 % од испитаниците од КГ, количеството излучена плунка беше помало од $0,4 \text{ ml/min}$ за Median IQR = $0,4 (0,3-0,5)$ (табела 4).

Кај ИГ-пред, количеството излучена плунка изнесуваше $0,7 \pm 0,3 \text{ ml/min}$, со најниска вредност од $0,45 \text{ ml/min}$ и највисока вредност од $1,5 \text{ ml/min}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-пред, количеството излучена плунка беше помало од $0,6 \text{ ml/min}$ за Median IQR = $0,6 (0,5-0,7)$ (табела 4).

Кај ИГ-по, количеството излучена плунка изнесуваше $0,49 \pm 0,15 \text{ ml/min}$, со најниска вредност од $0,25 \text{ ml/min}$ и највисока вредност од $0,9 \text{ ml/min}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-по, количеството излучена плунка беше помало од $0,5 \text{ ml/min}$ за Median IQR = $0,5 (0,4-0,55)$ (табела 4).

Кај ИГ-рт, количеството излучена плунка изнесуваше $0,26 \pm 0,11 \text{ ml/min}$, со најниска вредност од $0,08 \text{ ml/min}$ и највисока вредност од $0,6 \text{ ml/min}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-рт, количеството излучена плунка беше помало од $0,25 \text{ ml/min}$ за Median IQR = $0,25 (0,2-0,3)$ (табела 4).

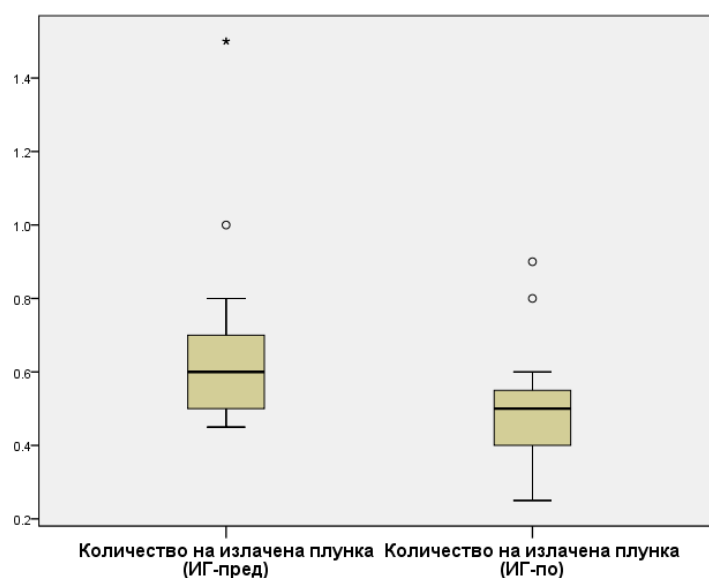
Беше направена споредба на количеството излучена плунка помеѓу КГ и ИГ-пред, како и помеѓу трите подгрупи на ИГ.



Графикон 8: Разлика во количеството излучена плунка помеѓу КГ и ИГ-пред

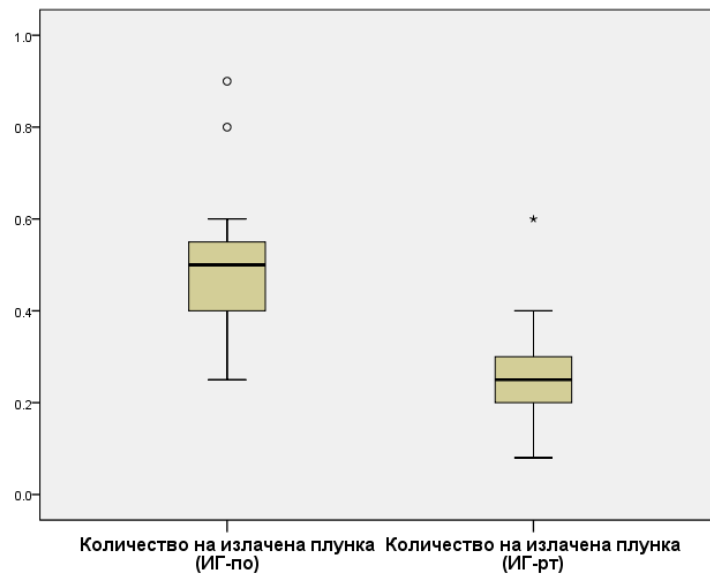
За $p < 0,05$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу количеството излучена плунка кај КГ и ИГ-пред (Mann–Whitney U test: $Z = -4,179$; $p < 0,001$) (табела 4, графикон 8). Количеството излучена плунка беше статистички значајно повисоко кај испитаниците од ИГ-пред, во споредба со оние од КГ.

Согласно со анализата направена со Фридмановиот тест беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу количеството излачена плунка во трите испитувани периоди во ИГ (пред хируршкото отстранување на карциномот, по хируршкото отстранување на карциномот и по спроведената радиотерапија) ($\chi^2=35,620$; $df=2$; $p<0,001$). Со цел да се определи меѓу кои од подгрупите на ИГ постои статистички значајна разлика во количеството излачена плунка, беше направен тестот на Вилкоксон со Бонферони корекција (Bonferroni correction)(приспособено $p<0,0167$).



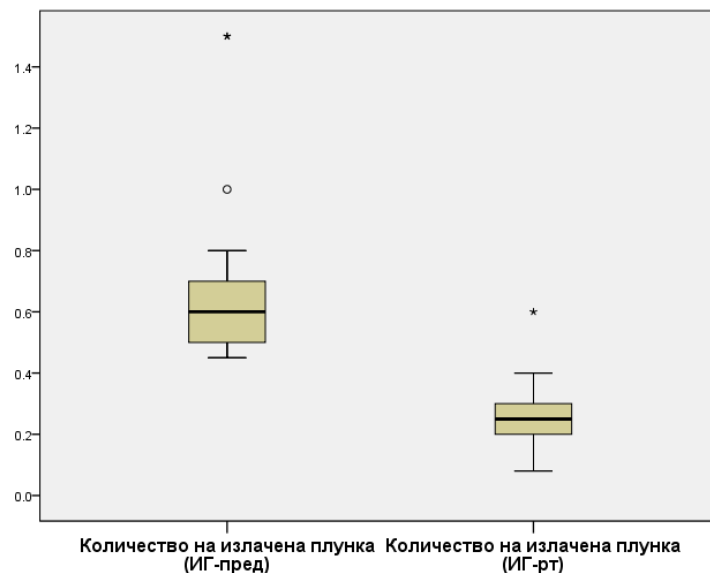
Графикон 9: Разлика во количеството излачена плунка помеѓу ИГ-пред и ИГ-по

За $p<0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу количеството излачена плунка кај ИГ-пред и ИГ-по (Wilcoxon test: $Z=-3,290$; $p=0,001$) (табела 4, графикон 9). Количеството излачена плунка беше статистички значајно пониско по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), во споредба со вредностите пред интервенцијата (ИГ-пред).



Графикон 10: Разлика во количеството излучена плунка помеѓу ИГ-по и ИГ-рт

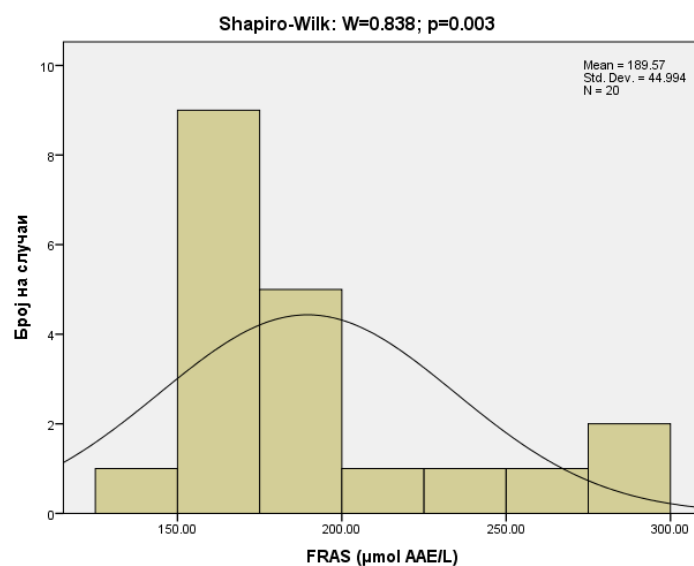
За $p < 0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу количеството излучена плунка кај ИГ-по и ИГ-рт (Wilcoxon test: $Z = -3,859$; $p < 0,001$) (табела 4, графикон 10). Количеството излучена плунка беше статистички значајно пониско по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со вредностите по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по).



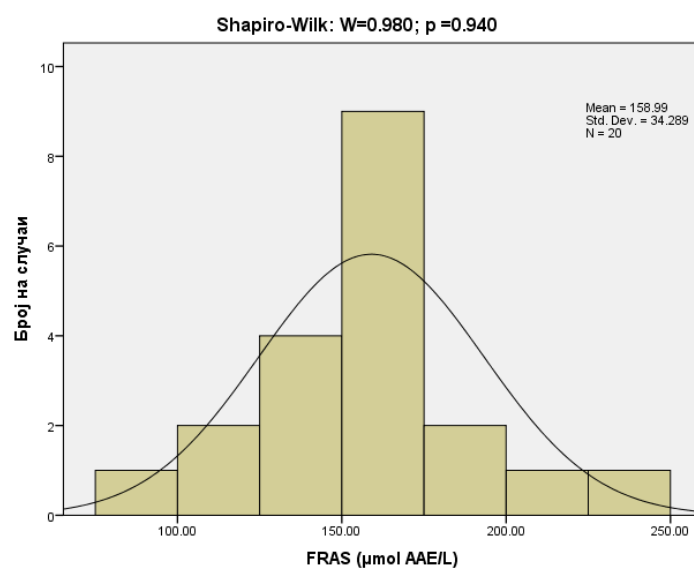
Графикон 11: Разлика во количеството излучена плунка помеѓу ИГ-пред и ИГ-рт

За $p < 0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу количеството излучена плунка кај ИГ-пред и ИГ-рт (Wilcoxon test: $Z = -3,935$; $p < 0,001$) (табела 4, графикон 11). Количеството излучена плунка беше статистички значајно пониско по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со вредностите пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред).

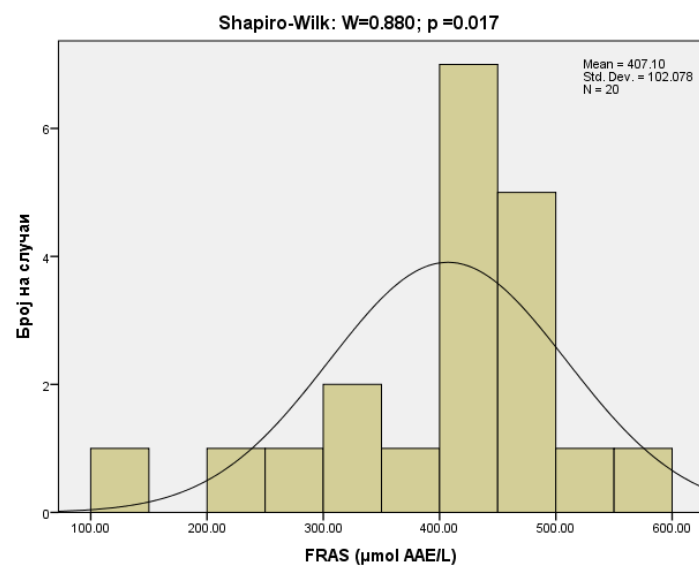
5.3.2 Анализа на жлезоредуцирачкиот антиоксидативен капацитет на плунката (FRAS)



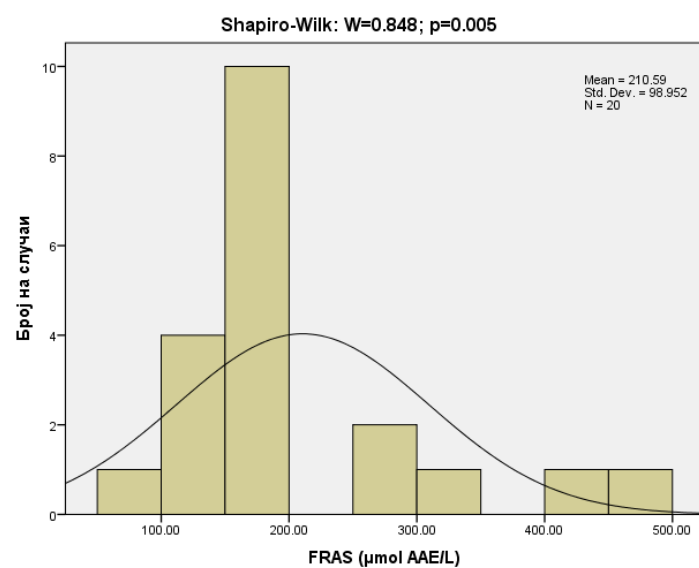
Графикон 15: Дистрибуција на фреквенциите на FRAS за КГ



Графикон 16: Дистрибуција на фреквенциите на FRAS за ИГ-пред



Графикон 17: Дистрибуција на фреквенциите на FRAS за ИГ-по



Графикон 18: Дистрибуција на фреквенциите на FRAS за ИГ-рт

Вредностите на FRAS беа анализирани кај КГ, како и кај трите подгрупи на ИГ: пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред), по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), како и по спроведување на радиотерапија (ИГ-рт) (графикони 15-18).

Анализата на дистрибуцијата на вредностите на FRAS укажа на постоење на:

Неправилна дистрибуција во КГ: $W=0,838$; $p=0,003$

Правилна дистрибуција во ИГ-пред: $W=0,980$; $p=0,940$

Неправилна дистрибуција во ИГ-по: $W=0,880$; $p=0,017$

Неправилна дистрибуција во ИГ-рт: $W=0,848$; $p=0,005$

Согласно со дистрибуцијата на примерокот, во понатамошните анализи ќе бидат користени соодветни параметарски и непараметарски тестови.

Табела 5: Анализа на FRAS во КГ и трите подгрупи на ИГ

μmol AAE/L	Бр. (N)	Mean	Std.Dev.	Min	Max	Percentiles		
						25 th	50 th	75 th
КГ	20	189,56	44,99	130,88	288,48	161,1	173,17	209,28
ИГ-пред	20	158,98	34,28	88,89	235,62	137,64	163,24	173,08
(Mann–Whitney U test: $Z=-2,056$; $p=0,040$)								
ИГ-пред	20	158,98	34,28	88,89	235,62	137,64	163,24	173,08
ИГ-по	20	407,1	102,07	133,68	578,98	371,93	433,88	463,71
(Wilcoxon test: $Z=-3,883$; $p<0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-по	20	407,1	102,07	133,68	578,98	371,93	433,88	463,71
ИГ-рт	20	210,59	98,95	60,45	450,08	158,97	187,3	234,21
(Wilcoxon test: $Z=-3,659$; $p<0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-пред	20	158,98	34,28	88,89	235,62	137,64	163,24	173,08
ИГ-рт	20	210,59	98,95	60,45	450,08	158,97	187,3	234,21
(Wilcoxon test: $Z=-2,016$; $p=0,044$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								

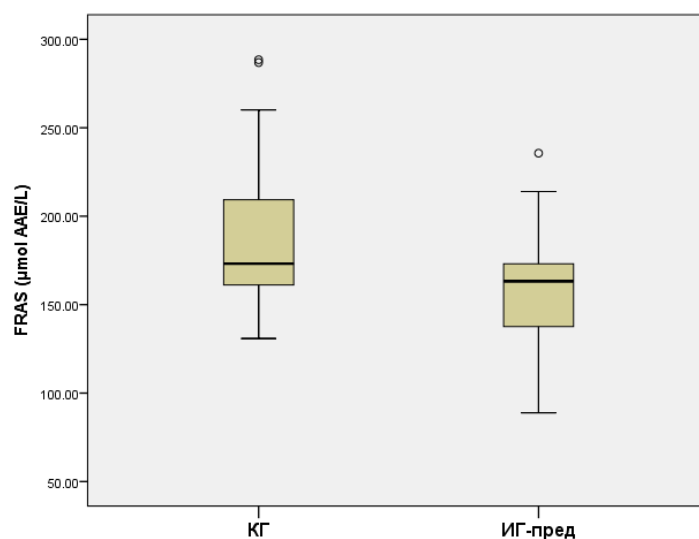
Кај КГ, FRAS-вредностите изнесуваа $189,56 \pm 44,99 \mu\text{mol AAE/L}$, со најниска вредност од $130,88 \mu\text{mol AAE/L}$ и највисока вредност од $288,48 \mu\text{mol AAE/L}$. Кај 50 % од испитаниците од КГ, вредноста беше помала од $173,17 \mu\text{mol AAE/L}$ за Median IQR = 173,17 (161,1-209,28) (табела 5).

Кај ИГ-пред, FRAS-вредностите изнесуваа $158,98 \pm 34,28 \mu\text{mol AAE/L}$, со најниска вредност од $88,89 \mu\text{mol AAE/L}$ и највисока вредност од $235,62 \mu\text{mol AAE/L}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-пред, вредноста беше помала од $163,24 \mu\text{mol AAE/L}$ за Median IQR = 163,24 (137,64–173,08) (табела 5).

Кај ИГ-по, FRAS-вредностите изнесуваа $407,1 \pm 102,07 \mu\text{mol AAE/L}$, со најниска вредност од $133,68 \mu\text{mol AAE/L}$ и највисока вредност од $578,98 \mu\text{mol AAE/L}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-по, вредноста беше помала од $433,88 \mu\text{mol AAE/L}$ за Median IQR = 433,88 (371,93–463,71) (табела 5).

Кај ИГ-рт, FRAS-вредностите изнесуваа $210,59 \pm 98,95 \mu\text{mol AAE/L}$, со најниска вредност од $60,45 \mu\text{mol AAE/L}$ и највисока вредност од $450,08 \mu\text{mol AAE/L}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-рт, вредноста беше помала од $187,30 \mu\text{mol AAE/L}$ за Median IQR = 187,30 (158,97–234,21) (табела 5).

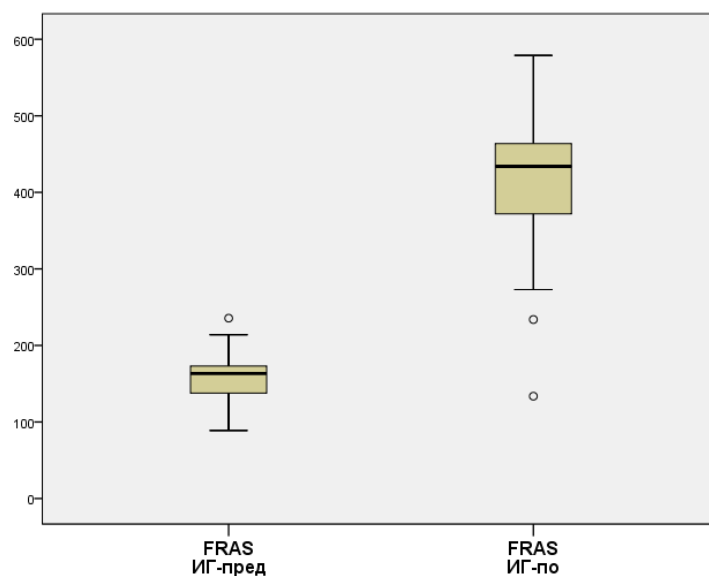
Беше направена споредба на FRAS-вредностите во плунката помеѓу КГ и ИГ-пред, како и помеѓу трите подгрупи на ИГ.



Графикон 19: Разлика во FRAS-концентрациите помеѓу КГ и ИГ-пред

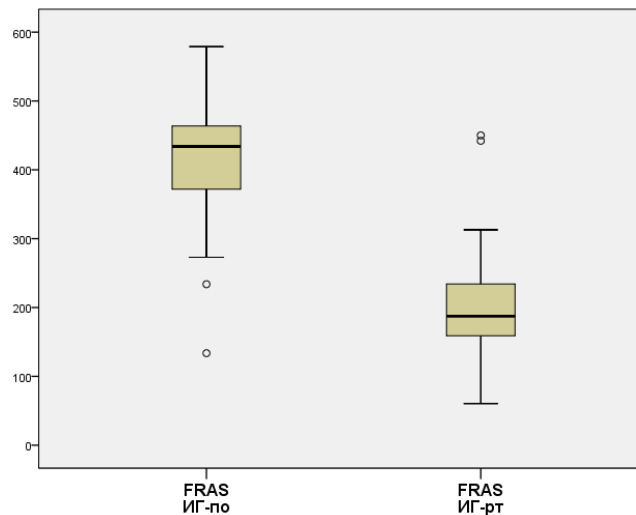
За $p < 0,05$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу FRAS-вредностите кај КГ и ИГ-пред (Mann–Whitney U test: $Z = -2,056$; $p = 0,040$) (табела 5, графикон 19). FRAS-вредностите беа статистички значајно повисоки кај испитаниците од КГ, во споредба со оние од ИГ-пред.

Согласно со анализата направена со Фридмановиот тест беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу вредностите на FRAS во трите испитувани периоди во ИГ (пред хируршкото отстранување на карциномот, по хируршкото отстранување на карциномот и по спроведената радиотерапија) ($\chi^2=24,700$; $df=2$; $p<0,001$). Со цел да се определи меѓу кои од подгрупите на ИГ постои статистички значајна разлика во концентрацијата на FRAS, беше направен тестот на Вилкоксон со Бонферони корекција (приспособено $p<0,0167$).



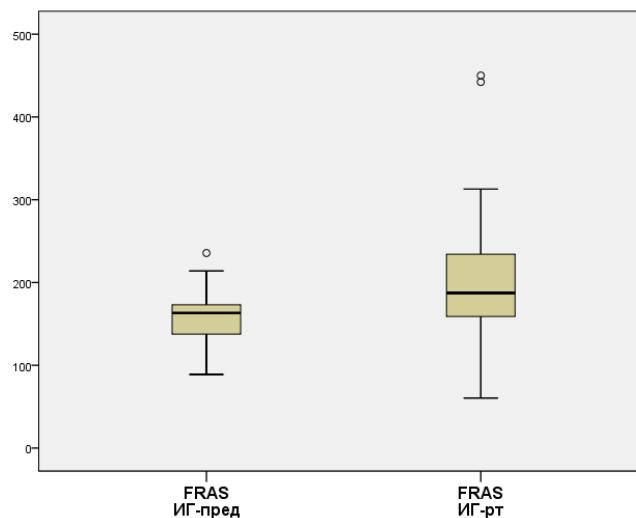
Графикон 20: Разлика во FRAS-концентрациите помеѓу ИГ-пред и ИГ-по

За $p<0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу FRAS-вредностите кај ИГ-пред и ИГ-по (Wilcoxon test: $Z=-3,883$; $p<0,001$) (табела 5, графикон 20). FRAS-вредностите беа статистички значајно повисоки по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), во споредба со вредностите пред интервенцијата (ИГ-пред).



Графикон 21: Разлика во FRAS-концентрациите помеѓу ИГ-по и ИГ-рт

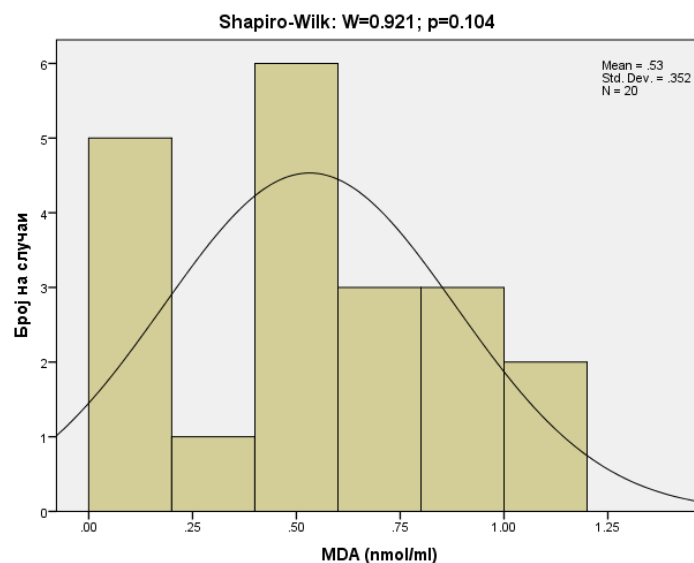
За $p < 0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу FRAS-вредностите кај ИГ-по и ИГ-рт (Wilcoxon test: $Z = -3,659$; $p < 0,001$) (табела 5, графикон 21). FRAS-вредностите беа статистички значајно пониски по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со вредностите по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по).



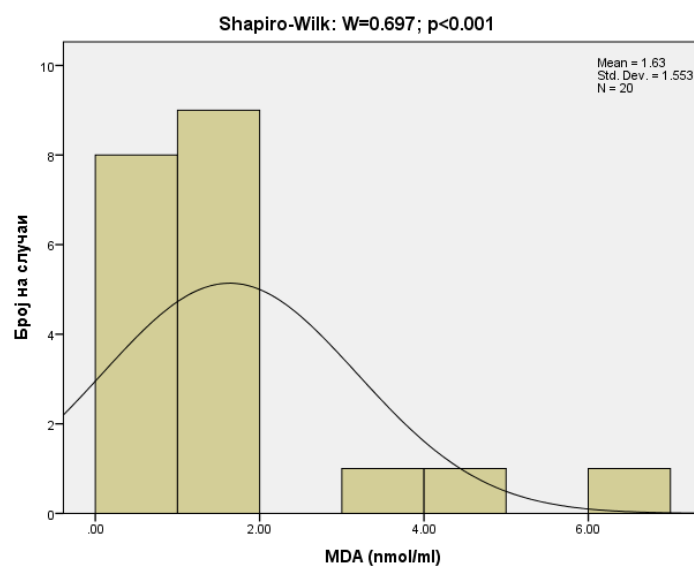
Графикон 22: Разлика во FRAS-концентрациите помеѓу ИГ-пред и ИГ-рт

За $p > 0,0167$, согласно со направената анализа, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу FRAS-вредностите кај ИГ-пред и ИГ-рт (Wilcoxon test: $Z = -2,016$; $p = 0,044$) (табела 5, графикон 22). FRAS-вредностите беа статистички незначајно повисоки по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со почетните вредности пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред).

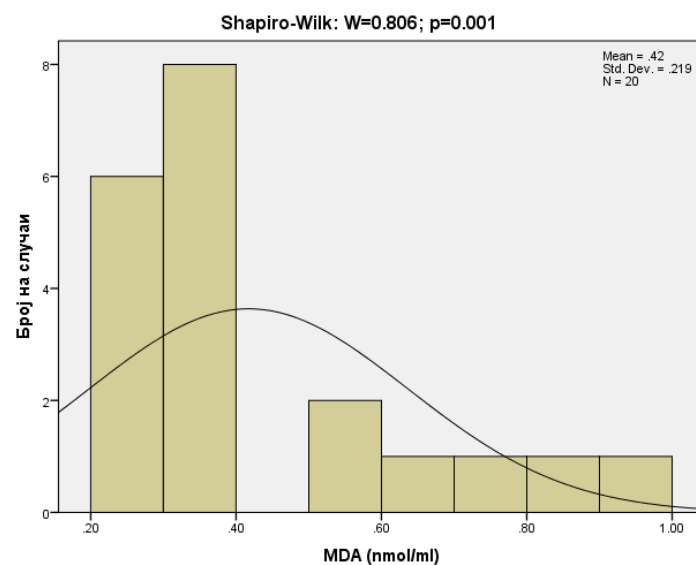
5.3.3. Анализа на малондиалдехидот (MDA)



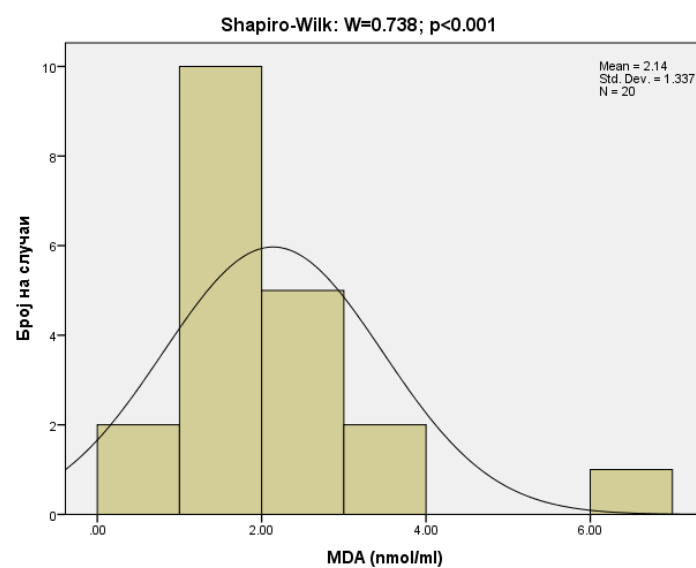
Графикон 23: Дистрибуција на фреквенциите на MDA за КТ



Графикон 24: Дистрибуција на фреквенциите на MDA за ИГ-пред



Графикон 25: Дистрибуција на фреквенциите на MDA за ИГ-по



Графикон 26: Дистрибуција на фреквенциите на MDA за ИГ-рт

Вредностите на MDA беа анализирани кај КГ, како и кај три подгрупи на ИГ: пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред), по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), како и по спроведување на радиотерапија (ИГ-рт) (графикони 23-26).

Анализата на дистрибуцијата на вредностите на MDA укажа на постоење на:

Правилна дистрибуција во КГ: $W=0,921$; $p=0,104$

Неправилна дистрибуција во ИГ-пред: $W=0,697$; $p<0,001$

Неправилна дистрибуција во ИГ-по: $W=0,806$; $p=0,001$

Неправилна дистрибуција во ИГ-рт: $W=0,738$; $p<0,001$

Согласно со дистрибуцијата на примерокот, во понатамошните анализи ќе бидат користени соодветни параметарски и непараметарски тестови.

Табела 6: Анализа на MDA во КГ и трите подгрупи на ИГ

nmol/ml	Бр. (N)	Mean	Std.Dev.	Min	Max	Percentiles		
						25th	50th	75th
КГ	20	0,53	0,35	0,01	1,05	0,24	0,58	0,80
ИГ-пред	20	1,63	1,55	0,42	6,54	0,75	1,18	1,64
(Mann–Whitney U test: $Z=-3,572$; $p<0,001$)								
ИГ-пред	20	1,63	1,55	0,42	6,54	0,75	1,18	1,64
ИГ-по	20	0,41	0,21	0,22	0,99	0,27	0,34	0,50
(Wilcoxon test: $Z=-3,845$; $p<0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-по	20	0,41	0,21	0,22	0,99	0,27	0,34	0,50
ИГ-рт	20	2,13	1,33	0,85	6,9	1,40	1,78	2,44
(Wilcoxon test: $Z=-3,920$; $p<0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-пред	20	1,63	1,55	0,42	6,54	0,75	1,18	1,64
ИГ-рт	20	2,13	1,33	0,85	6,9	1,40	1,78	2,44
(Wilcoxon test: $Z=-2,464$; $p=0,014$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								

Кај КГ, плунковната концентрација на MDA изнесуваше $0,53 \pm 0,35$ nmol/ml, со најниска вредност од $0,01$ nmol/ml и највисока вредност од

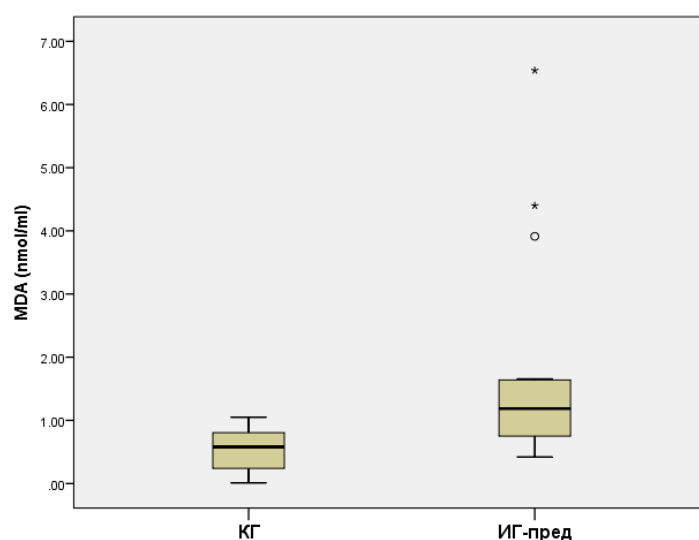
1,05nmol/ml. Кај 50 % од испитаниците од КГ, концентрацијата беше помала од 0,58nmol/ml за Median IQR = 0,58 (0,24–0,80) (табела 6).

Кај ИГ-пред, плунковната концентрација на MDA изнесуваше $1,63 \pm 1,55$ nmol/ml, со најниска вредност од 0,42nmol/ml и највисока вредност од 6,54nmol/ml. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-пред, концентрацијата беше помала од 1,18nmol/ml за Median IQR = 1,18 (0,75–1,64) (табела 6).

Кај ИГ-по, плунковната концентрација на MDA изнесуваше $0,41 \pm 0,21$ nmol/ml, со најниска вредност од 0,22nmol/ml и највисока вредност од 0,99nmol/ml. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-по, концентрацијата беше помала од 0,34nmol/ml за Median IQR = 0,34 (0,27–0,50) (табела 6).

Кај ИГ-рт, плунковната концентрација на MDA изнесуваше $2,13 \pm 1,33$ nmol/ml, со најниска вредност од 0,85nmol/ml и највисока вредност од 6,9nmol/ml. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-рт, концентрацијата беше помала од 1,78nmol/ml за Median IQR = 1,78 (1,40–2,44) (табела 6).

Беше направена споредба на MDA-вредностите во плунката помеѓу КГ и ИГ-пред, како и помеѓу трите подгрупи на ИГ.

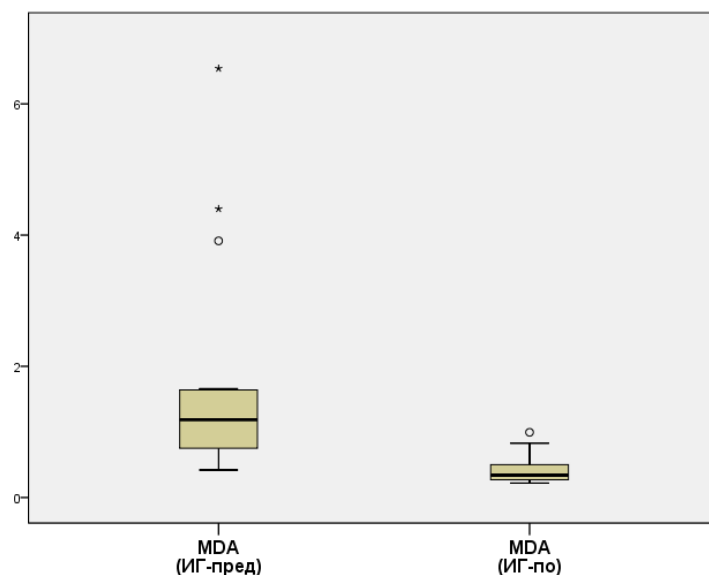


Графикон 27: Разлика во MDA-концентрациите помеѓу КГ и ИГ-пред

За $p < 0,05$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу концентрацијата на MDA во плунката кај КГ и ИГ-пред (Mann–Whitney U test: $Z = -3,572$; $p < 0,001$) (табела 6, графикон 27). Концентрацијата на MDA во плунката беше статистички значајно повисока кај испитаниците од ИГ-пред, во споредба со оние од КГ.

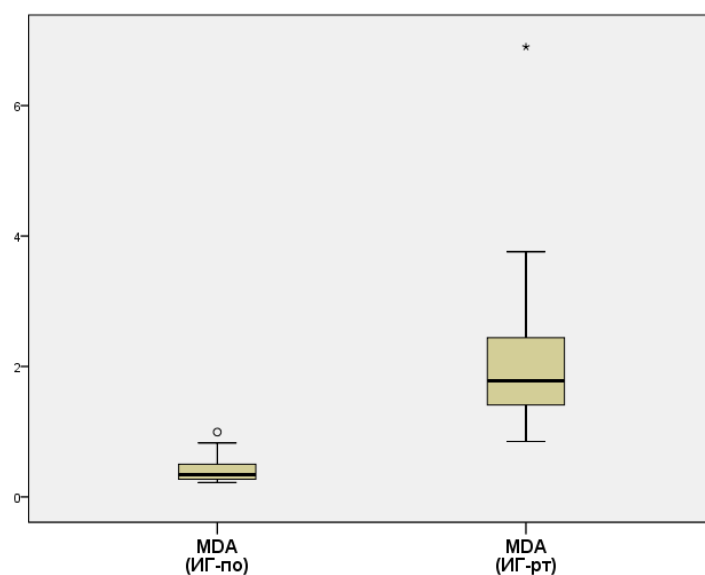
Согласно со анализата направена со Фридмановиот тест беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу вредностите на MDA во трите испитувани

периоди во ИГ (пред хируршкото отстранување на карциномот, по хируршкото отстранување на карциномот и по спроведената радиотерапија) ($\chi^2=32,700$; $df=2$; $p<0,001$). Со цел да се определи помеѓу кои од подгрупите на ИГ постои статистички значајна разлика во концентрацијата на MDA, беше направен тестот на Вилкоксон со Бонферони корекција (приспособено $p<0,0167$).



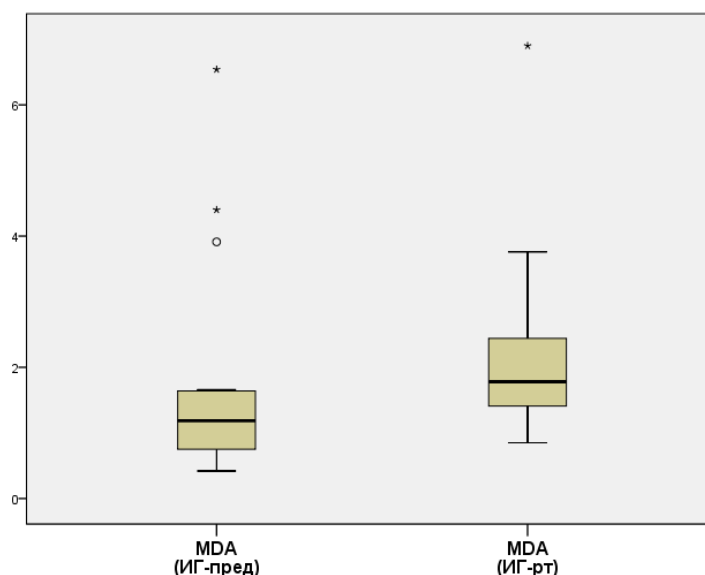
Графикон 28: Разлика во MDA-концентрациите помеѓу ИГ-пред и ИГ-по

За $p<0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу концентрацијата на MDA во плунката кај ИГ-пред и ИГ-по (Wilcoxon test: $Z=-3,845$; $p<0,001$) (табела 6, графикон 28). Концентрацијата на MDA во плунката беше статистички значајно пониска по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), во споредба со вредностите пред интервенцијата (ИГ-пред).



Графикон 29: Разлика во MDA-концентрациите помеѓу ИГ-по и ИГ-рт

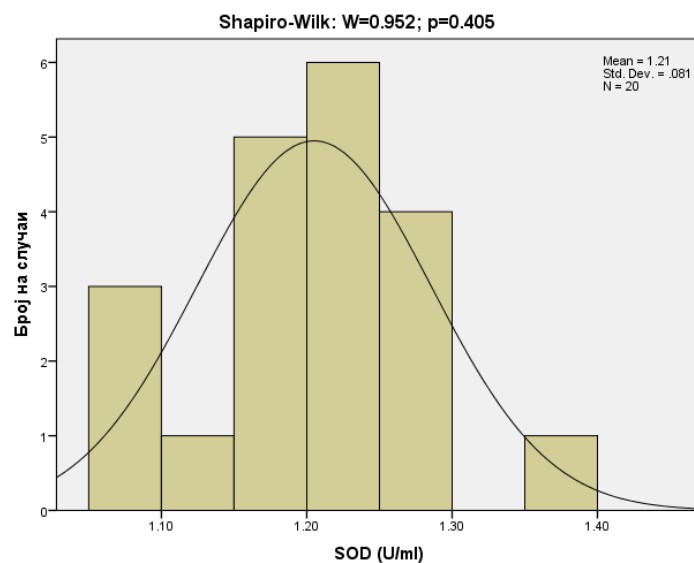
За $p < 0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу концентрацијата на MDA во плунката кај ИГ-по и ИГ-рт (Wilcoxon test: $Z = -3,920$; $p < 0,001$) (табела 6, графикон 29). Концентрацијата на MDA во плунката беше статистички значајно повисока по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со вредностите по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по).



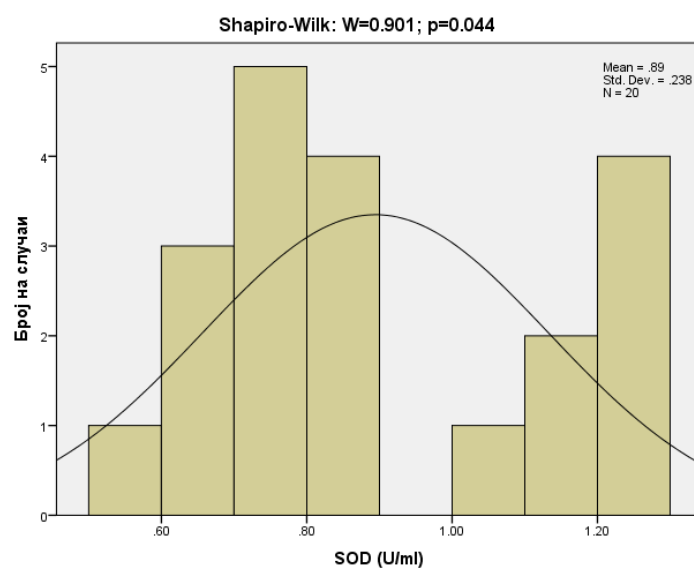
Графикон 30: Разлика во MDA-концентрациите помеѓу ИГ-пред и ИГ-рт

За $p < 0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу концентрацијата на MDA во плунката кај ИГ-пред и ИГ-рт (Wilcoxon test: $Z = -2,464$; $p = 0,014$) (табела 6, графикон 30). Концентрацијата на MDA во плунката беше статистички значајно повисока по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со почетните вредности пред хирургијата (ИГ-пред).

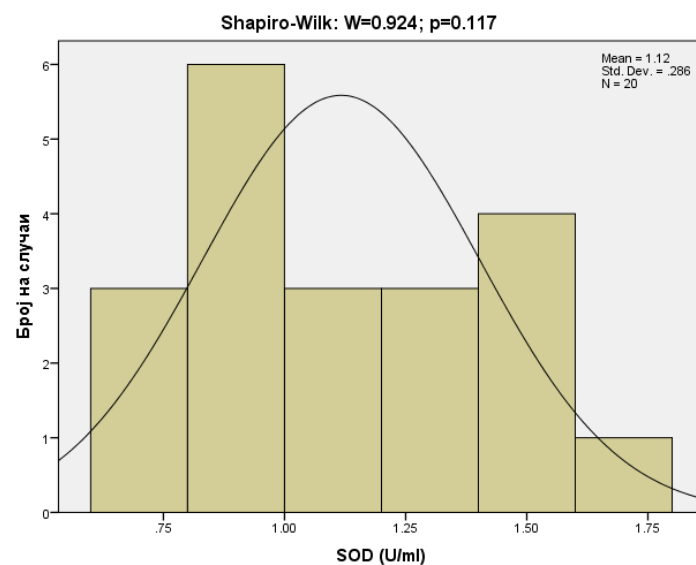
5.3.4. Анализа на активноста на супероксид дисмутазата (SOD) во плунка



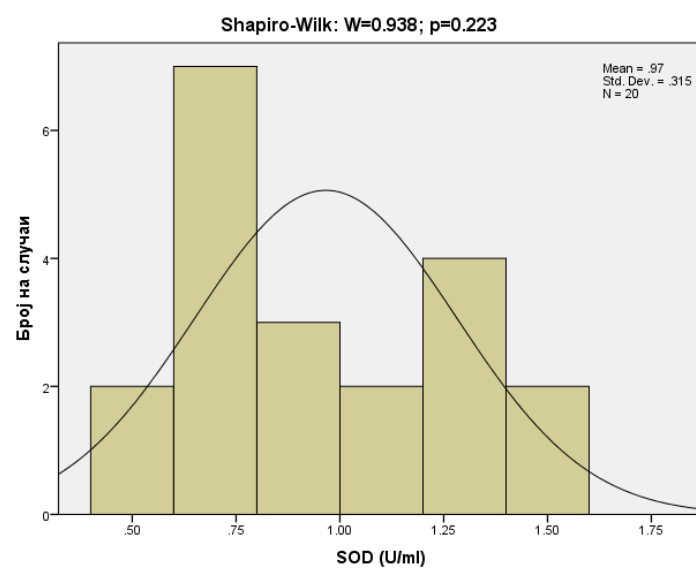
Графикон 31: Дистрибуција на фреквенциите на SOD за КГ



Графикон 32: Дистрибуција на фреквенциите на SOD за ИГ-пред



Графикон 33: Дистрибуција на фреквенциите на SOD за ИГ-по



Графикон 34: Дистрибуција на фреквенциите на SOD за ИГ-рт

Вредностите на SOD беа анализирани кај КГ, како и кај трите подгрупи на ИГ: пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред), по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), како и по спроведувањето на радиотерапија (ИГ-рт) (графикони 31-34).

Анализата на дистрибуцијата на вредностите на SOD укажа на постоење на:

Правилна дистрибуција во КГ: $W=0,952$; $p=0,405$

Неправилна дистрибуција во ИГ–пред: $W=0,901$; $p=0,044$

Правилна дистрибуција во ИГ-по: $W=0,924$; $p=0,117$

Правилна дистрибуција во ИГ-рт: $W=0,938$; $p=0,223$

Согласно со дистрибуцијата на примерокот, во понатамошните анализи ќе бидат користени соодветни параметарски и непараметарски тестови.

Табела 7: Анализа на SOD во КГ и трите подгрупи на ИГ

U/ml	Бр. (N)	Mean	Std.Dev.	Min	Max	Percentiles		
						25 th	50 th	75 th
КГ	20	1,20	0,08	1,06	1,38	1,16	1,21	1,24
ИГ-пред	20	0,89	0,23	0,53	1,28	0,73	0,81	1,17
(Mann–Whitney U test: $Z=-3,760$; $p<0,001$)								
ИГ-пред	20	0,89	0,23	0,53	1,28	0,73	0,81	1,17
ИГ-по	20	1,11	0,28	0,75	1,67	0,89	1,05	1,36
(Wilcoxon test: $Z=-3,435$; $p=0,001$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-по	20	1,11	0,28	0,75	1,67	0,89	1,05	1,36
ИГ-рт	20	0,96	0,31	0,47	1,46	0,71	0,95	1,25
(Wilcoxon test: $Z=-1,792$; $p=0,073$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								
ИГ-пред	20	0,89	0,23	0,53	1,28	0,73	0,81	1,17
ИГ-рт	20	0,96	0,31	0,47	1,46	0,71	0,95	1,25
(Wilcoxon test: $Z=-0,784$; $p=0,433$); Bonferroni correction ($p<0,0167$)								

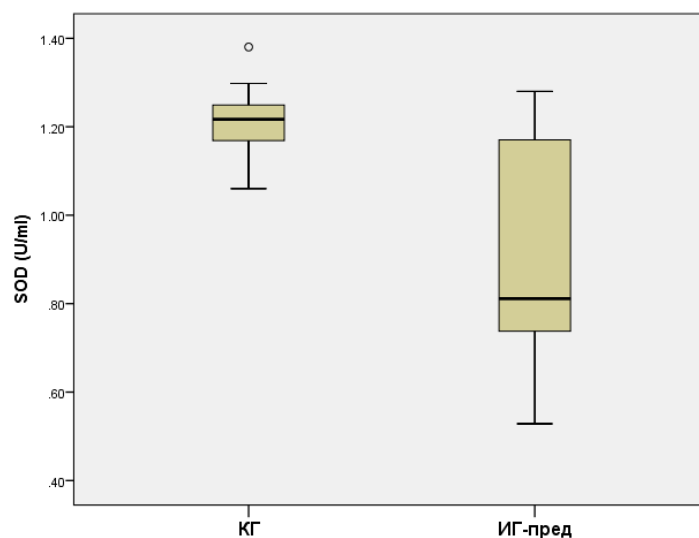
Кај КГ, SOD-вредностите изнесуваа $1,2 \pm 0,08 \text{ U/ml}$, со најниска вредност од $1,06 \text{ U/ml}$ и највисока вредност од $1,38 \text{ U/ml}$. Кај 50 % од испитаниците од КГ, вредноста беше помала од $1,21 \text{ U/ml}$ за Median IQR = 1,21 (1,16-1,24) (табела 7).

Кај ИГ-пред, SOD-вредностите изнесуваа $0,89 \pm 0,23 \text{ U/ml}$, со најниска вредност од $0,53 \text{ U/ml}$ и највисока вредност од $1,28 \text{ U/ml}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-пред, вредноста беше помала од $0,81 \text{ U/ml}$ за Median IQR = 0,81 (0,73-1,17) (табела 7).

Кај ИГ-по, SOD-вредностите изнесуваа $1,11 \pm 0,28 \text{ U/ml}$, со најниска вредност од $0,75 \text{ U/ml}$ и највисока вредност од $1,67 \text{ U/ml}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-по, вредноста беше помала од $1,05 \text{ U/ml}$ за Median IQR = 1,05 (0,89-1,36) (табела 7).

Кај ИГ-рт, SOD-вредностите изнесуваа $0,96 \pm 0,31 \text{ U/ml}$, со најниска вредност од $0,47 \text{ U/ml}$ и највисока вредност од $1,46 \text{ U/ml}$. Кај 50 % од испитаниците од ИГ-рт, вредноста беше помала од $0,95 \text{ U/ml}$ за Median IQR = 0,95 U/ml (0,71-1,25) (табела 7).

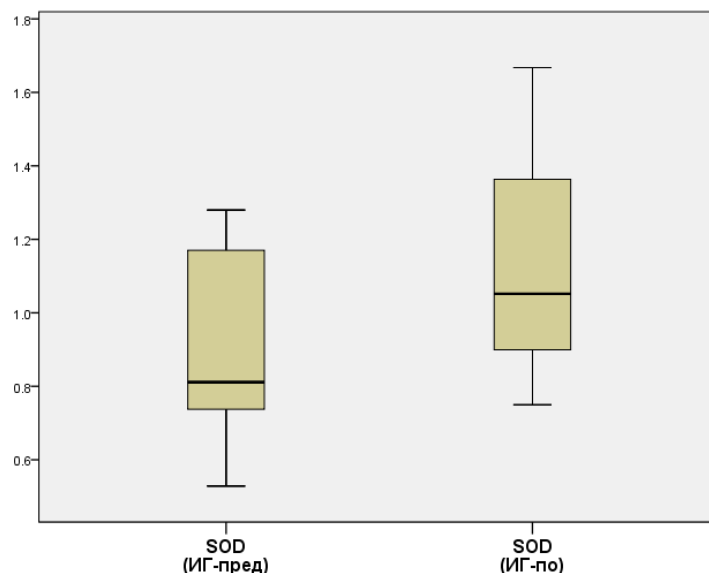
Беше направена споредба на активноста на SOD во плунката помеѓу КГ и ИГ-пред, како и помеѓу трите подгрупи на ИГ.



Графикон 35: Разлика во SOD-концентрациите помеѓу КГ и ИГ-пред

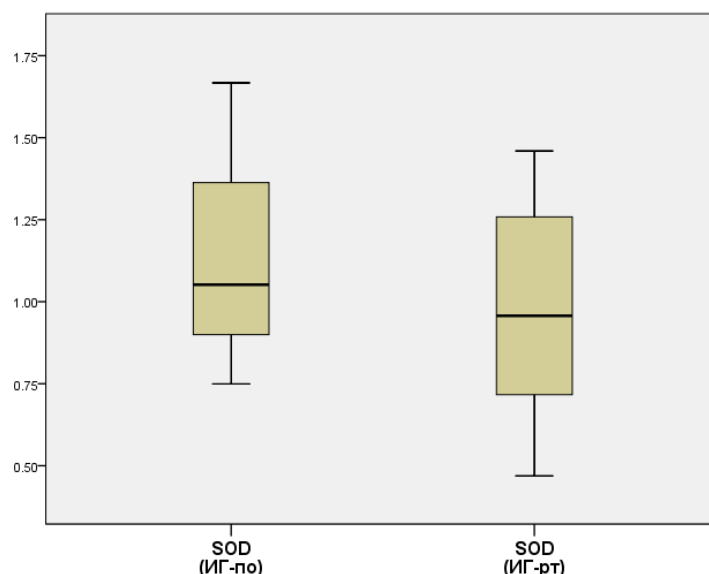
За $p < 0,05$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу SOD-вредностите кај КГ и ИГ-пред (Mann–Whitney U тест: $Z = -3,760$; $p = 0,040$) (табела 7, графикон 35). SOD -вредностите беа статистички значајно повисоки кај испитаниците од КГ, во споредба со оние од ИГ-пред.

Согласно со анализата направена со Фридмановиот тест беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу вредностите на SOD во трите испитувани периоди во ИГ (пред хируршкото отстранување на карциномот, по хируршкото отстранување на карциномот и по спроведената радиотерапија) ($\chi^2=7,900$; $df=2$; $p=0,019$). Со цел да се определи помеѓу кои од подгрупите на ИГ постои статистички значајна разлика во концентрацијата на FRAS, беше направен тестот на Вилкоксон со Бонферони корекција (приспособено $p<0,0167$).



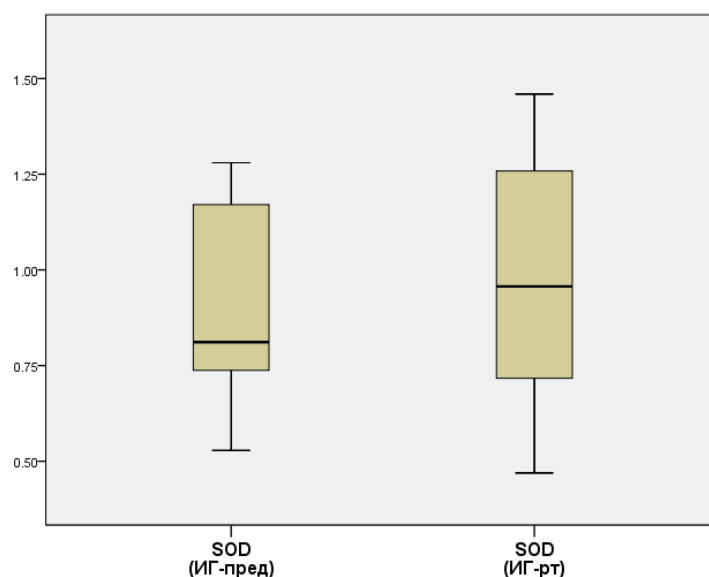
Графикон 36: Разлика во SOD-концентрациите помеѓу ИГ-пред и ИГ-по

За $p<0,0167$, согласно со направената анализа, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу SOD-вредностите кај ИГ-пред и ИГ-по (Wilcoxon test: $Z=-3,435$; $p=0,001$) (табела 7, графикон 36). SOD- вредностите беа статистички значајно повисоки по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), во споредба со вредностите пред интервенцијата (ИГ-пред).



Графикон 37: Разлика во SOD-концентрациите помеѓу ИГ-по и ИГ-рт

За $p > 0,0167$, согласно со направената анализа, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу SOD-вредностите кај ИГ-по и ИГ-рт (Wilcoxon test: $Z = -1,792$; $p = 0,073$) (табела 7, графикон 37). SOD-вредностите беа незначајно повисоки по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), во споредба со вредностите по радиотерапијата (ИГ-рт).



Графикон 38: Разлика во SOD-концентрациите помеѓу ИГ-пред и ИГ-рт

За $p > 0,0167$, согласно со направената анализа, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу SOD-вредностите кај ИГ-пред и ИГрт (Wilcoxon test: $Z = -0,784$; $p = 0,433$) (табела 7, графикон 38). SOD-вредностите беа незначајно повисоки по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со почетните вредности пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред).

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Општи карактеристики

Анализата според општите карактеристики на примерокот од 40 испитаници се однесуваше на полот и возраста на испитаниците вклучени во истражувањето.

6.1.1. Анализа на примерокот според пол

Анализата на примерокот според пол, во нашата студија беше статистички неситиѓнификантна, што укажува на хомогеност на испитуваниот примерок во однос на полот. Овие наоди се во согласност со едно истражување во нашата популација, но се разликува од останатите резултати во литературата каде што се забележуваат дури значителни дискрапанци на соодносот во корист на мажите^[5]. Оваа разлика може да се интерпретира како последица на ограничената големина на испитуваниот примерок, како и на методологијата на селекција заснована на случаен избор, што веројатно придонело за порамномерна родова застапеност во однос на онаа што е типично евидентирана во поголеми епидемиолошки истражувања. Дополнително, можна причина за ваквата разлика може да биде и регионално варијабилната изложеност на ризик-фактори, бидејќи според повеќе студии, мажите, генерално, почесто се изложени на тутун, алкохол и други етиолошки фактори поврзани со оралниот карцином, што може да ја објасни повисоката застапеност на машки пациенти во меѓународните популациски анализи^[82, 83].

6.1.2. Анализа на примерокот според возраст

Во ИГ во нашата студија, просечната возраст на испитаниците беше $62,8 \pm 10,2$ години, со минимална возраст од 44 година и максимална возраст од 76 години, без статистички значајна разлика во возраста помеѓу машкиот и женскиот пол, што е во согласност со податокот дека оралниот карцином е карактеристичен за повозрасната популација^[84]. Овој очекуван епидемиолошки наод може да се интерпретира како резултат на повеќе кумулативни и биолошки фактори, меѓу кои: продолжена изложеност на ризик-фактори; прогресивно слабеење на имунолошкиот систем; акумулација на ДНК оштетувања поради намалена ефикасност на механизмите за поправка; намалена регенеративна способност и нарушена клеточна хомеостаза на оралната мукоза^[85, 86]. На пример, Leung et al.^[86] објавиле дека старите лица имаат повисок ризик од орален карцином поради помалку резистентната и повеќе пропустлива орална мукоза.

6.2. Анализа на примерокот според локализацијата на карциномот

Во нашата студија, најчеста локализација на оралниот карцином беше јазикот и подјазичната регија. Овој наод е во согласност со литературните податоци, според кои овие две регии се најзасегнати од орален планоцелуларен карцином^[2].

Тоа се објаснува со нивната анатомска и физиолошка подложност: тенок неорожнет епител, редуциран проток на слюнка и со тоа продолжена изложеност на канцерогени материи. На пример, при пушење или консумација на алкохол, канцерогените материи во слюнката се собираат (pooling) во подјазичниот простор и продолжено го изложуваат нежниот, некератинизиран епител на подот на усната празнина на нивното штетно дејство. Наспроти тоа, другите делови од усната празнина со подебел или орожен епител, на пример гингивата, поретко страдаат од карцином кај пушачите, веројатно затоа што кератинизираниот слој обезбедува поголема заштита од продорот на канцерогените. Дополнително, јазикот е во директен контакт со тутунот, алкохолот и други канцерогени, па близината до овие агенсии ја зголемува веројатноста токму таму да се иницира малигна трансформација^[87].

6.3. Анализа на саливарните параметри

Анализата според слюнковните параметри се однесуваше на: количеството излучена слюнка, железоредуцирачкиот антиоксидативен капацитет на слюнката (FRAS), слюнковната концентрација на малондиалдехидот (MDA), како и активноста на супероксид дисмутаза (SOD) во слюнка.

Слюнката претставува сложен биофлуид чии квантитативни и квалитативни карактеристики може да подлежат на значителни промени под влијание на различни патолошки состојби и медицински третмани. Оралниот карцином и радиотерапијата предизвикуваат значителни промени во слюнковната секреција, како и во нејзиниот состав. Овие промени се манифестираат краткорочно, по завршувањето на радиотерапијата, но во многу случаи продолжуваат да перзистираат и подолг временски период, доведувајќи до ксеростомија^[88].

6.3.1. Анализа на количеството излучена слюнка

Во нашата студија количеството излучена слюнка беше статистички значајно повисоко кај испитаниците од ИГ-пред, во споредба со оние од КГ.

Иако во литературата речиси и да нема студии кои директно го евалуираат количеството излучена плунка во присуство на орален планоцелуларен карцином, добиените вредности во нашето истражување, кои укажуваат на зголемено лачење пред хируршкото отстранување на карциномот, може да се интерпретираат во контекст на познатите механизми што водат кон хиперсаливација. Иако нема многу студии фокусирани исклучиво на хиперсаливацијата кај оралниот карцином, во литературата се спомнува дека зголеменото лачење на плунка (сиалореја) може да се појави кај малигнитети на главата и вратот^[89]. Така, патофизиолошки гледано, хроничната иритација од туморот и воспалителната реакција би можеле да го објаснат ова зголемено лачење на плунка. Постоенето на туѓо тело во усната празнина, заедно со локалната воспалителна компонента, може рефлексно да ја стимулира плунковната секреција преку активирање на сензорни и парасимпатички патишта, особено доколку е локализиран во сублинглавната регија. Така, Vistose et. al.^[90] во својата студија наведуваат дека дисфагијата, одинофагијата, и локалната орална иритација кај пациентите со орален карцином може да придонесе до хиперсаливација.

Ова објаснување, би можеле да го потврдат и нашите резултати за количеството излучена плунка пред и по хируршки третман, што беше статистички значајно пониско по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по), во споредба со вредностите пред хируршката интервенција (ИГ-пред).

Анализата за количеството излучена плунка утврди статистички значајно пониско количество плунка по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со вредностите по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по) и вредностите пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред). Идентичен резултат објавиле најголем број од истражувањата, при што се доаѓа до заклучок дека радиотерапијата предизвикува директно оштетување на плунковните жлезди, што резултира со трајно намалување на саливацијата и клинички изразена ксеростомија ^[34, 35, 91].

6.3.2. Анализа на железоредуцирачкиот антиоксидативен капацитет на плунката (FRAS)

Вклучувањето на FRAS како параметар во истражувања, укажува на значајноста на нарушената рамнотежа помеѓу антиоксидансите и оксидативните процеси во патогенезата на голем број орални и системски болести.

Утврдивме статистички значајно повисоки **вредности на FRAS** кај испитаниците од КГ, во споредба со оние од ИГ-пред хируршки третман. Овие наоди се во согласност со достапната литература. Како индикатор за вкупниот антиоксидативен капацитет на плунката, FRAS го рефлектира балансот помеѓу прооксидативните и антиоксидативните механизми во усната празнина. Кај

пациентите со орален планоцелуларен карцином, овој баланс е нарушен поради зголеменото формирање на реактивни кислородни соединенија (ROS) и засилена липидна пероксидација, што резултира со исцрпување на локалните антиоксидативни резерви. Поради тоа, кај овие пациенти се забележува намален FRAS во споредба со здравите лица, што е потврдено и во повеќе студии кои укажуваат на компромитиран антиоксидативен одговор кај онколошките пациенти уште пред започнување на третманот^[92, 93].

Najafi et al.^[94] утврдиле повисоко ниво на тотални антиоксиданси во плунката кај пациентите со орален карцином во однос на здравите лица, веројатно како резултат на засилената компензациона антиоксидативна акција на организмот. Разликите во наодите може да произлегуваат од варијациите во стадиумот и биолошките карактеристики на туморот, животните навики и применетата методологија. Во раните стадиуми е можен привремен пораст на антиоксидативниот капацитет како адаптивен одговор на ROS, додека во напреднатите, преовладува негово исцрпување. Ова наметнува потреба од прецизна интерпретација и методолошка стандардизација.

По хируршкиот третман утврдивме статистички значајно повисоки вредности на FRAS во групата по хируршка интервенција (ИГ-по), во споредба со вредностите пред интервенцијата (ИГ-пред). Овој наод може да се објасни со елиминацијата на туморската маса како хроничен извор на оксидативен стрес, што овозможува возобновување на локалниот антиоксидативен капацитет^[51, 95].

Треба да се напомене дека некои студии не нашле статистички значајна разлика во антиоксидативните параметри пред и по операцијата, што сугерира дека степенот на заздравување може да зависи од големината на туморот, времето на мерење по операцијата и од тоа дали постоеле останати микроскопски остатоци од карциномот кои сè уште генерираат оксидативен стрес^[96].

Вредностите на FRAS беа статистички значајно пониски по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со вредностите по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по). Овој наод, евидентиран и во досегашните истражување, е очекуван и укажува на засилен оксидативен стрес поради радиотерапијата, која, за разлика од хируршката интервенција која го елиминира изворот на ROS, дополнително ги оштетува околните здрави ткива и генерира ROS. Тоа резултира со намалување на вкупниот антиоксидативен капацитет, што се одразува преку пониски FRAS -вредности^[56, 97].

Во литературата постојат и спротивставени ставови, кои укажуваат на зголемено ниво на антиоксиданси по радиотерапија. На пример, Pang et al.^[98] ја анализираше динамиката на маркерите за оксидативен стрес и антиоксидативен капацитет кај пациентите на радиотерапија за назофарингеален карцином, покажувајќи дека вредностите на T-AOC и GSH-PX се зголемуваат во почетните фази (T1, T2), но значајно опаѓаат на крајот од третманот (T3) кај пациентите со

мукозитис. Истовремено, AOPP останува покачен низ целиот третман. Овие наоди сугерираат дека времето на мерење е критично за интерпретација на маркерите и може да објасни зошто студиите пријавуваат спротивставени резултати за антиоксидансите по радиотерапија.

Не утврдивме статистички значајна разлика помеѓу вредностите на FRAS во групата по радиотерапија и групата пред хируршки третман.

6.3.3. Анализа на малондиалдехидот (MDA)

Малондиалдехидот (MDA) е еден од најзастапените и најпроучувани маркери за оксидативен стрес, кој настанува како краен продукт при пероксидација на липидите во клеточните мембрани. Поради релативната стабилност и лесната детекција, MDA се користи како индикатор за степенот на липидна пероксидација и оксидативно оштетување во различни биолошките течности. Во плунката, концентрацијата на MDA често се определува за да се процени локалниот оксидативен стрес, при што бројни истражувања покажуваат промени во нивоата на MDA кај различни заболувања проследени со хронично воспаление и оксидативни оштетувања [41].

Добивме статистички значајно повисоки вредности на MDA во плунката кај испитаниците од ИГ-пред, во споредба со контролната група (КГ), и тие се во согласност со наодите од достапните истражувања[54, 57, 58, 99]. Кај пациентите со орален планоцелуларен карцином, зголеменото производство на реактивни кислородни соединенија (ROS) доведува до оштетување на липидните мембрани и зголемена продукција на MDA. Тоа го забележале Shetty et al.[100] кои детектирале значително повисоко ниво на MDA кај пациентите со PMD (potentially malignant disorders) и OSCC во однос на контролната група. Salzman et al.[101] утврдиле дека пациентите со помала големина на туморот имаат пониски вредности на плазматски MDA од оние со поголема големина на туморот, односно, во понапреднат стадиум, се зголемува и нивото на плазматски MDA.

Значајно намалување на концентрацијата на MDA, регистриравме по хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-по) во споредба со предоперативните вредности (ИГ-пред), што е во согласност со достапната литература и укажува на намален оксидативен стрес. Кај пациентите со орален карцином, туморот сам по себе е извор на ROS, а неговото отстранување доведува до елиминирање на изворот. Sawai et al.[51] во својата студија за ресекција на колоректалниот карцином, потврдуваат дека хируршкото отстранување на туморската маса, резултира со намалување на маркерите на оксидативен стрес, како индиректен показател за успешно елиминирање на изворот на ROS. Herrera et al.[102] известуваат дека кај оперираните пациентки со карцином на дојка дошло до значајно намалување на MDA и на провоспалителните цитокини, што имплицира обнова на нормалниот редокс хомеостазен капацитет по елиминацијата на туморот.

Регистрираното статистички значајно зголемување на MDA по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со вредностите по хируршката интервенција (ИГ-по) во нашата студија, е исто така во согласност со познатите биолошки ефекти на радиотерапијата. Радиотерапијата предизвикува директно оштетување на клеточните мембрани и митохондрии преку зголемено создавање на ROS, што води до интензивна липидна пероксидација и акумулација на MDA. Во повеќе студии е потврдено дека радиотерапијата кај пациентите со HNSCC предизвикува значаен пораст на маркерите на оксидативен стрес, особено во плунката и серумот^[54, 57, 58].

Но треба да се напомене дека постојат и истражувања каде е верификувано намалување на вредностите на MDA по спроведена радиотерапија^[55, 103].

Различните резултати во поглед на MDA по радиотерапија произлегуваат од навидум мали методолошки разлики: временскиот интервал на мерење е клучен фактор. Доколку MDA се мери во текот на самата терапија или веднаш по неа, честопати е покачен поради акутниот оксидативен удар. Но ако се мери по подолг интервал по завршувањето на RT, можно е MDA да опадне доколку туморот значајно се смалил или елиминирал^[104].

Затоа, во литературните извештаи има разлики, но општиот консензус е дека радиотерапијата го зголемува MDA во акутната фаза на третманот, додека подоцна може да дојде до нормализација или пад на MDA ако туморот е успешно ставен под контрола и антиоксидативните механизми закрепнат. Ова објаснување ги помирува привидно конфликтните податоци во различни студии.

Утврдениот пораст на MDA-вредностите по радиотерапијата (ИГ-рт) во споредба со предоперативните вредности (ИГ-пред) укажува дека оксидативниот стрес индуциран од зрачењето е посилен дури и од оној предизвикан од самата туморска маса. Иако и самото постоење на туморот е извор на ROS, радиотерапијата го надминува тој ефект преку генерирање на дополнителен, акутен оксидативен одговор во здравите и опкружувачките ткива. Овој наод е потврден во студиите каде што MDA-вредностите значително се зголемуваат по радиотерапија^[54].

6.3.4. Анализа на активноста на супероксид дисмутазата (SOD) во плунка

Супероксид дисмутазата (SOD) е клучен ензим од антиоксидативниот систем во плунката, кој ги неутрализира супероксидните радикали и на тој начин ја штити оралната ткивна средина од оксидативни оштетувања. Активноста на SOD во плунката се проучува како индикатор за антиоксидативниот капацитет и редокс рамнотежата кај многу заболувања и медицински состојби.

Анализата на активноста на SOD во плунка, кај контролната и испитуваните групи во нашата студија укажа на:

Статистички значајно повисоки вредности на SOD кај контролната група (КГ) во однос на испитаниците пред хируршко отстранување на карциномот (ИГ-пред) соодејствува со поголем број од истражувањата^[105, 106]. Кај пациентите со орален планоцелуларен карцином, зголемениот оксидативен стрес и прекумерната продукција на реактивни кислородни соединенија (ROS) доведуваат до исцрпување на антиоксидативните ензими, меѓу кои и SOD. Пониските нивоа на SOD кај онколошките пациенти укажуваат на намалена способност за неутрализирање на супероксидниот анјон, што е карактеристично за канцерогените услови пред тераписката фаза^[58]. Иако на прв поглед може да изгледа парадоксално, во мета-анализата на Mohiden et al.^[24] е наведено дека три од испитуваните студии укажале на зголемување на SOD во плунката кај пациентите со OSCC, споредено со контролната група.

Зголеменото ниво на SOD кај туморските клетки, кај некои пациенти може да се објасни преку концептот на „редокс адаптација“. Имено, поради хронично повишени нивоа на ROS, резултат на забрзан метаболизам, хипоксија и воспалителни процеси, канцерозните клетки развиваат механизми за преживување, меѓу кои е засилената експресија на антиоксидативни ензими како SOD. Со тоа, клетките избегнуваат оксидативна апоптоза, при што истовремено ја користат сигнализацијата на ROS за да го поддржат сопствениот раст и прогресија. Ова претставува нова редокс рамнотежа која го олеснува туморското преживување во оксидативно-агресивна средина^[107].

Значајното зголемување на SOD-вредностите по хирурското отстранување на туморот (ИГ-по) во однос на претходните вредности (ИГ-пред) укажува на намалување на прооксидативниот притисок и делумно обновување на антиоксидативниот одговор. Со елиминирањето на туморската маса како хроничен извор на ROS, организмот може подобро да го активира ендогеното антиоксидативно одбранбено дејствување, што резултира со повисоки вредности на SOD. Овој наод е конзистентен со студиите кои покажуваат реверзибилност на некои оксидативни параметри по хируршки третман^[57, 108]. Резултатите на Gupta et al.^[57] по успешен третман на OSCC со радиотерапија, покажуваат дека нивото на антиоксидативните ензими SOD и каталаза по терапијата се вратил речиси до нормални вредности како кај здравите испитаници. Иако тие пациенти не биле подложени на хируршка ресекција на карциномот, резултатот е аналоген бидејќи елиминирањето на туморот, во нивниов случај преку радиотерапија, довело до нормализирање на антиоксидативниот систем.

Недостатокот на статистички значајна разлика меѓу вредностите по хируршки третман и по радиотерапија, иако SOD беше нешто повисок по хируршката интервенција, укажува дека ефектот од радиотерапијата врз овој ензим може да биде варијабилан. Во некои случаи, радијацијата предизвикува

исцрпување на SOD, додека во други активира адаптивна регулација преку NRF2 сигнални патишта, што може да доведе до стабилни или благо зголемени вредности. Разликата може да зависи од временскиот момент на мерење, индивидуалниот одговор и опфатот на зрачната терапија^[58, 109].

Вредностите на SOD беа незначајно повисоки по спроведената радиотерапија (ИГ-рт), во споредба со почетните вредности пред хируршкото отстранување на карциномот (ИГ-пред). Сличен резултат забележале Kushwaha et al.^[110], каде зрачењето не довело до значајна промена во SOD, особено без дополнителна терапија со антиоксиданси. Спротивно на ова, некои студии покажуваат значајни разлики. Malathi et al.^[56] утврдиле зголемување на SOD и намалување на MDA по зрачењето, што укажува на подобрен антиоксидативен статус. Manasaveena et al.^[111] пак, пријавиле намалување на SOD по радиотерапија, особено без хемотерапија. Rasheed et al.^[112] откриле значајно зголемување на SOD по хируршко отстранување на туморот.

Варијациите во резултатите за нивото на SOD по радиотерапија кај пациентите со орален планоцелуларен карцином може да се објаснат преку неколку фактори. Примарно, видот на третманот: самостојна радиотерапија наспроти хеморадиотерапија, која генерира поголем оксидативен стрес^[113]. Дополнително, изборот на биолошкиот примерок, серум или плунка, носи разлики, при што во плунката често се бележи редукција на SOD, поради локално присутниот карцином, а во серумот понекогаш се забележува компензациски пораст^[114]. Времето на мерење исто така има клучна улога, со оглед дека вредностите на антиоксидативните ензими варираат во различни фази од третманот^[115]. Индивидуалниот оксидативен профил, клиничкиот стадиум на болеста, како и употребата на антиоксидативна суплементација, дополнително придонесуваат кон различните наоди пријавени во литературата^[113, 114].

АНАЛИЗА И ОБРАЗЛОЖЕНИЕ НА ПОСТАВЕНИТЕ ХИПОТЕЗИ ВО ИСТРАЖУВАЊЕТО

Главна хипотеза на нашето истражување беше: Радиотерапијата, применета како третман кај пациенти со орален планоцелуларен карцином, влијае врз промената на нивото на саливарните биомаркери FRAS, MDA и SOD. Според добиените резултати, оваа хипотеза делумно ја потврдуваме. Статистичките анализи покажаа дека по спроведената радиотерапија доаѓа до значајни промени кај два од трите испитувани биомаркери, FRAS и MDA. Конкретно, преку споредбената анализа направена со тестот на Вилкоксон, концентрацијата на FRAS во плунката статистички значајно опаѓа по завршената радиотерапија во споредба со истата по хируршкото отстранување на карциномот. Истовремено, нивото на MDA статистички значајно се зголемува по радиотерапијата во однос на постхируршките вредности. Овие промени сугерираат дека радиотерапијата индуцира оксидативен стрес – се забележува пораст на маркерот за липидна пероксидација (MDA) и пад на антиоксидативниот капацитет измерен со FRAS. Од друга страна, активноста на ензимот SOD не покажува статистички значајна разлика пред и по радиотерапијата. Овој резултат укажува дека радиотерапијата нема истакнат ефект врз нивото на SOD, за разлика од другите два биомаркери. Свкупно, присуството на значајни промени кај FRAS и MDA потврдува дека радиотерапијата влијае на саливарните оксидативни биомаркери, со што главната хипотеза во поголем дел е потврдена. Притоа, незначајно пониските вредности на SOD по радиотерапијата сугерираат дека ефектот на радиотерапијата врз овој антиоксидативен ензим е ограничен, но не го негира општиот заклучок дека радиотерапијата значајно го менува оксидативниот статус кај пациентите.

Дополнителна хипотеза во нашето истражување беше: По хируршкото отстранување на карциномот доаѓа до промена на нивото на саливарните биомаркери FRAS, MDA и SOD. Добиеените резултати ја потврдуваат оваа хипотеза. Според Фридмановиот тест, постои статистички значајна разлика во вредностите на сите три биомаркери во трите испитувани периоди (пред операција, по операција, по радиотерапија) во рамките на испитуваната група. Посебно, според тестот на Вилкоксон со Бонферони корекција, јасно се гледа ефектот на хируршката интервенција. Вредностите на FRAS беа статистички значајно пониски по хируршкото отстранување на туморот во споредба со предоперативните вредности, додека концентрацијата на MDA во плунка, исто така опаѓа значајно по хируршката интервенција. Наспроти тоа, активноста на SOD значајно се зголемува по операцијата во однос на почетните вредности. Овие резултати укажуваат дека отстранувањето на примарниот тумор доведува до намален оксидативен стрес кај пациентите, потврдено преку падот на MDA и преку снижениот FRAS, додека истовремено доаѓа до активација на антиоксидативните механизми, видлива преку порастот на активноста на SOD. Со оглед на тоа што сите три биомаркери претрпуваат

значајни промени по хируршкиот третман, дополнителната хипотеза е целосно потврдена. Оваа констатација е конзистентна со очекувањето дека отстранувањето на туморот ги намалува изворите на оксидативен стрес и дозволува парцијална нормализација на оксидативно-антиоксидативната рамнотежа кај пациентите.

Постоењето на статистички значајни разлики во нивоата на FRAS, MDA и SOD по различните фази на третманот, поткрепено со соодветните непараметарски тестови (Мен-Витниев У-тест за споредба со контролната група, Фридманов тест за повторени мерки, тестот на Вилкоксон за парни споредби со Бонферони корекција), овозможува научно образложение на поставените хипотези. Добиените наоди заеднички сугерираат дека терапевтските интервенции кај оралниот планоцелуларен карцином имаат мерлив ефект врз системските показатели на оксидативен стрес во плунката, при што отстранувањето на туморот носи подобрување, а последователната радиотерапија внесува дополнителен оксидативен товар, рефлектиран во профилот на биомаркерите.

Во целина, добиените докази ја поддржуваат тезата дека применетиот онколошки третман влијае врз динамиката на саливарните оксидативни биомаркери, при што хируршката интервенција и радиотерапијата имаат различни, но кумулативно значајни ефекти врз FRAS, MDA, SOD и количеството излучена плунка.

7. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на добиените резултати од истражувањето ги донесовме следниве заклучоци:

1. Вредностите на FRAS-во плунката се статистички значајно пониски кај пациентите со OSCC пред хируршкиот третман во споредба со здравите испитаници. Хируршкото отстранување на туморот е проследено со статистички значајно зголемување на FRAS-вредностите, додека радиотерапијата е поврзана со повторно статистички значајно намалување. Најниски вредности на FRAS се регистрираат по радиотерапијата.
2. Вредностите на MDA- во плунката се статистички значајно повисоки кај пациентите со OSCC пред хируршкиот третман во споредба со здравите испитаници. По хируршкиот третман тие статистички значајно се намалуваат, а потоа повторно статистички значајно се зголемуваат по радиотерапијата.
3. Активноста на SOD во плунката, е статистички значајно пониска кај пациентите со OSCC пред хируршки третман во однос на здравите испитаници. По хируршкиот третман, активноста на SOD значајно се зголемува.
По спроведената радиотерапија нема статистички значајна разлика во активноста на SOD во споредба со постхируршките вредности.
-Вредностите на SOD се незначајно повисоки по спроведената радиотерапија, во споредба со оние кај OSCC.
4. Количеството излучена плунка е статистички значајно поголемо кај пациентите со OSCC во споредба со здравите испитаници. По хируршкото отстранување на карциномот, има статистички значајно намалување на плунковната секреција споредбено со вредностите пред третманот, а по спроведената радиотерапија количеството плунка дополнително статистички значајно се намалува. Најниски вредности на плунковна секреција се регистрираат по радиотерапијата.

Резултатите од нашата студија го потврдуваат влијанието на радиотерапијата на квантитетот и квалитетот на плунката. Утврдивме евидентно зголемен оксидативен стрес и намален антиоксидативен капацитет, проследено со значајно намалување на плунковната секреција, по завршувањето на третманот. Иако ова укажува на можна корист од употребата на антиоксиданси за заштита на околните здрави ткива од штетните последици од зголемен оксидативен стрес и нарушен антиоксидативен капацитет при радиотерапијата, нивната примена за време на и непосредно по радиотерапијата бара исклучителна внимателност. Според современите научни сознанија,

антиоксидансите можат да понудат заштита не само здравите ткива, туку и малигните клетки, со што потенцијално се намалува ефикасноста на онколошкиот третман. Несоодветната или неконтролирана суплементација може да го зголеми ризикот од преживување на туморските клетки и да доведе до рецидив или појава на секундарни тумори. Затоа, клиничката примена на антиоксиданси кај пациентите подложени на радиотерапија треба да биде стриктно стручно индицирана и индивидуално приспособена.

КОРИСТЕНИ СКРАТЕНИЦИ

HNC – карцином на главата и вратот

OSCC – орален планоцелуларен карцином

HNSCC – планоцелуларен карцином на главата и вратот

ROS – реактивни кислородни соединенија

RNS – реактивни азотни соединенија

FRAS – железоредуцирачка способност на плунката

MDA – малон диалдехид

SOD – супероксид дисмутаза

GSH – глутатион

GSH-Px – глутатион пероксидаза

MPO – миелопероксидаза

TAC – вкупен антиоксидативен капацитет

CAT – каталаза

T-SH – тотални тиоли

GST – глутатион-S-трансфераза

G6PDH – глюкоза-6-фосфат дехидрогеназа

TPTZ – 2, 4, 6 – Tris (2 – pyridyl) – s – triazine

TEP – 1, 1, 3, 3 – Tetraethoxypropane

O₂•⁻ – супероксиден радикал

H₂O₂ – водороден пероксид

•OH – хидроксилан радикал

¹O₂ – синглетан кислород

High LET – високо линеаран пренос на енергија

Low LET – низок линеаран пренос на енергија

OM – орален мукозитис

NF-κB – нуклеаран фактор капа-лесан синџир-засилувач на активираните Б-клетки

Fe³⁺ – тровалентно железо

Fe²⁺ – двовалентно желязо

PUFAs – полинезаситени масни киселини

L- – липидни радикали

LOO- – липидни пероксилни радикали

LOOHs – липидни хидроперокси

d-ROMs – деривати на реактивните кислородни метаболити

NRF2 – нуклеарен фактор поврзан со еритроид 2 фактор 2

NAC – N – ацетилцистеин

РЕФЕРЕНЦИ

1. Mitra D, Malkoski SP, Wang XJ. Cancer stem cells in head and neck cancer. *Cancers (Basel)* 2011;3:415- 427.
2. Tan, Y., Wang, Z., Xu, M. *et al.* Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *Int J Oral Sci* **15**, 44 (2023).
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Soerjomataram I. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–263.
4. Berner J, Miebach L, Kordt M, Seebauer C, Schmidt A, Lalk M, Vollmar B, Metelmann HR, Bekeschus S. Chronic oxidative stress adaptation in head and neck cancer cells generates slow-cyclers with decreased tumour growth in vivo. *Br J Cancer.* 2023 Sep;129(5):869-883.
5. Idoska, S. S., Popovic Monevska, D. A., Pepić, S. S., Kirkov, A. L., Pančevski, G. T., Božovic, S. D., Ilijev, A. T., Trambulova, J. N., Stamatovski, A. C., & Koneski, F. L. (2023). Asocijacija fibroplasta povezanih sa karcinomom sa kliničko-patološkim parametrima oralnog karcinoma skvamoznih ćelija - imunohistemijska studija. *Acta stomatologica Naissi*, 39(87), 2555-2568.
6. Mohideen K, Sudhakar U, Balakrishnan T, Almasri MA, Al-Ahmari MM, Al Dira HS, Suhluli M, Dubey A, Mujoo S, Khurshid Z, Raj AT, Patil S. Malondialdehyde, an Oxidative Stress Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Issues Mol Biol.* 2021 Aug 28;43(2):1019-1035.
7. Dewenter I, Kumbrink J, Poxleitner P, Smolka W, Liokatis P, Fliefel R, Otto S, Obermeier KT. New insights into redox-related risk factors and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2023;147:106573.
8. Ionescu, C.; Kamal, F.Z.; Ciobica, A.; Halitchi, G.; Burlui, V.; Petroaie, A.D. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Oral Cancer. *Biomedicines* 2024, *12*, 1150.
9. Kesarwala AH, Krishna MC, Mitchell JB. Oxidative stress in oral diseases. *Oral Dis.* 2016 Jan;22(1):9-18.
10. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* **5**, 9–19 (2012).
11. García-Sánchez A, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Jul 23;2020:2082145.
12. Herb M, Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants.* 2021; 10(2):313.
13. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, Rajkovic J, Tsouh Fokou PV, Azzini E, Peluso I, Prakash Mishra A, Nigam M, El Rayess Y, Beyrouthy ME, Polito L, Iriti M, Martins N, Martorell M, Docea AO, Setzer WN, Calina D, Cho WC, Sharifi-Rad J. Lifestyle, Oxidative Stress,

- and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol.* 2020 Jul 2;11:694.
14. Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, Calina D, Sharifi-Rad J. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem.* 2023 May 10;11:1158198.
 15. Warraich UE, Hussain F, Kayani HUR. Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon.* 2020 May 31;6(5):e04107.
 16. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
 17. Miller MR. Oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Free Radic Biol Med.* 2020 May 1;151:69-87.
 18. Seo YS, Park JM, Kim JH, Lee MY. Cigarette Smoke-Induced Reactive Oxygen Species Formation: A Concise Review. *Antioxidants (Basel).* 2023 Sep 7;12(9):1732.
 19. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews.* 2002;82:47–95.
 20. Young I., Woodside J. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology.* 2001;54:176–186.
 21. Raza A, Karimyan N, Watters A, Emperumal CP, Al-Eryani K, Enciso R. Efficacy of oral and topical antioxidants in the prevention and management of oral mucositis in head and neck cancer patients: a systematic review and meta-analyses. *Support Care Cancer.* 2022;30:8689–703.
 22. Li Y, Cheng L, Li M. Effects of green tea extract epigallocatechin-3-gallate on oral diseases: a narrative review. *Pathogens.* 2024;13(8):634.
 23. Mohideen K, Jeddy N, Krithika C, Faizee SH, Dhungel S, Ghosh S. Assessment of glutathione peroxidase enzyme response and total antioxidant status in oral cancer - Systematic review and meta-analysis. *Cancer Rep (Hoboken).* 2023 Aug;6(8):e1842.
 24. Mohideen K, Chandrasekaran K, Kareema M, Jeyanthikumari T, Dhungel S, Ghosh S. Assessment of antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) in oral cancer: systematic review and meta-analysis. *Disease Markers.* 2024;2024:1–14.
 25. Ionescu C, Kamal FZ, Ciobica A, Halitchi G, Burlui V, Petroaie AD. Oxidative stress in the pathogenesis of oral cancer. *Biomedicines.* 2024;12(6):1150.
 26. Krishnamurthy HK, Pereira M, Rajavelu I, Jayaraman V, Krishna K, Wang T, et al. Oxidative stress: fundamentals and advances in quantification techniques. *Front Chem.* 2024;12:1470458.
 27. Fan, KH., Chen, YC., Lin, CY. *et al.* Postoperative radiotherapy with or without concurrent chemotherapy for oral squamous cell carcinoma in patients with

- three or more minor risk factors: a propensity score matching analysis. *Radiat Oncol* **12**, 184 (2017).
28. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2015. p. 95, 136, 251-262.
 29. Sakhi AK, Russnes KM, Thoresen M, Bastani NE, Karlsen A, Sme-land S, Blomhoff R. Pre-radiotherapy plasma carotenoids and markers of oxidative stress are associated with survival in head and neck squamous cell carcinoma patients: a prospective study. *BMC Cancer* 2009;9:458-62.
 30. Nguyen H, Sangha S, Pan M, Shin DH, Park H, Mohammed AI, Cirillo N. Oxidative Stress and Chemoradiation-Induced Oral Mucositis: A Scoping Review of In Vitro, In Vivo and Clinical Studies. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9):4863.
 31. Liu S, Zhao Q, Zheng Z, Liu Z, Meng L, Xin Y, Dong L, Jiang X. Status of Treatment and Prophylaxis for Radiation-Induced Oral Mucositis in Patients With Head and Neck Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:642575.
 32. Mohammed AI, Sangha S, Nguyen H, Shin DH, Pan M, Park H, et al. Assessment of Oxidative Stress-Induced Oral Epithelial Toxicity. *Biomolecules*. 2023;13(8):1239.
 33. Kim HJ, Kang SU, Lee YS, Jang JY, Kang H, Kim CH. Protective Effects of N-Acetylcysteine against Radiation-Induced Oral Mucositis In Vitro and In Vivo. *Cancer Res Treat*. 2020;52(4):1019-1030.
 34. Ren J, Huang R, Li Y, Chen R, Tian H, Liu C, et al. Radioprotective effects and mechanism of HL-003 on radiation-induced salivary gland damage in mice. *Sci Rep*. 2022;12:8419.
 35. Sun Y-M, Wang X-Y, Zhou X-R, Zhang C, Liu K-J, Zhang F-Y, et al. Salidroside ameliorates radiation damage by reducing mitochondrial oxidative stress in the submandibular gland. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(7):1414.
 36. Wu Q, Wang S, Hu Y, Xu G, Zhang Z, Hu Z, et al. Intragland expression of Shh gene alleviates irradiation-induced salivary gland injury through microvessel protection and regulation of oxidative stress. *Antioxidants*. 2024;13(8):904.
 37. Maciejczyk M, Bielas M, Zalewska A, Gerreth K. Salivary biomarkers of oxidative stress and inflammation in stroke patients: from basic research to clinical practice. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:5545330.
 38. Wang J, Schipper HM, Velly AM, Mohit S, Gornitsky M. Salivary biomarkers of oxidative stress: a critical review. *Free Radic Biol Med*. 2015;85:95-104.
 39. Buczek P, Zalewska A, Szarmach I. Saliva and oxidative stress in oral cavity and in some systemic disorders. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(1):3-9.
 40. Çanakçı CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Çanakçı V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. *Eur J Dent*. 2009;3(2):100-106.

41. Tóthová L, Kamodyová N, Červenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:73.
42. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.
43. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
44. Cordiano R, Di Gioacchino M, Mangifesta R, Panzera C, Gangemi S, Minciullo PL. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: An update. *Molecules.* 2023;28(16):5979.
45. Busch, C.J.; Binder, C.J. Malondialdehyde Epitopes as Mediators of Sterile Inflammation. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids* **2017**, *1862*, 398–406.
46. Babiuch K, Bednarczyk A, Gawlik K, Pawlica-Gosiewska D, Kęsek B, Darczuk D, Stępień P, Chomyszyn-Gajewska M, Kaczmarzyk T. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia: a pilot study. *Acta Odontol Scand.* 2019 Aug;77(6):408-418.
47. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim).* 2018 May-Jun;12(3):88-93.
48. Sonis ST. Superoxide Dismutase as an Intervention for Radiation Therapy-Associated Toxicities: Review and Profile of Avasopasem Manganese as a Treatment Option for Radiation-Induced Mucositis. *Drug Des Devel Ther.* 2021 Mar 5;15:1021-1029.
49. An X, Yu W, Liu J, Zhang Y, Wang L, Chen Y, et al. Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Dis.* 2024;15:556.
50. Zhou Q, Ye F, Zhou Y. Oxidative stress-related biomarkers in oral squamous cell carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis. *Biomark Med.* 2023;17(6):337-347.
51. Sawai K, Goi T, Kimura Y, Koneri K. Reduction of blood oxidative stress following colorectal cancer resection. *Cancers (Basel).* 2024;16(20):3550.
52. Reinema FV, Kaanders JHAM, Peeters WJM, Adema GJ, Sweep FCGJ, Bussink J, Span PN. Radiotherapy induces an increase in serum antioxidant capacity reflecting tumor response. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2024 Jan 11;45:100726.
53. Ayuningtyas NF, Basalamah FF, Brahmanikanya GL, Mahdani FY, Parmadiati AE, Radithia D, Ernawati DS, Shrestha M, Pasaribu UP, Wicaksono S. Correlation between Salivary Oxidative Stress Biomarkers and Clinical Severity of Radiation-Induced Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients. *Eur J Dent.* 2025 May 27.
54. Derindağ G, Akgül HM, Kızıltunç A, Özkan Hİ, Kızıltunç Özmen H, Akgül N. Evaluation of saliva glutathione, glutathione peroxidase, and malondialdehyde

- levels in head-neck radiotherapy patients. *Turk J Med Sci.* 2021 Apr 30;51(2):644-649.
55. Vinay Kumar. V. salivary antioxidant status following radiotherapy in patients with head and neck cancer. *Int J Anat Res* 2019;7(3.2):6793-6799.
 56. Malathi M, Vijay M, Shivashankara A R. The Role Of Oxidative Stress And The Effect Of Radiotherapy On The Plasma Oxidant-Antioxidant Status In Head And Neck Cancer. *J Clin of Diagn Res.* 2011; 5(2):249-251.
 57. Gupta A, Bhatt ML, Misra MK. Assessment of free radical-mediated damage in head and neck squamous cell carcinoma patients and after treatment with radiotherapy. *Indian J Biochem Biophys.* 2010 Apr;47(2):96-9.
 58. Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol* 1999; 35: 272-77.
 59. Strojan, P. et al. Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer. *Cancer Treat. Rev.* 59, 79–92 (2017).
 60. Hosseini MS, Sanaie S, Mahmoodpoor A, Rikhtehgaran S, Hamishehkar H, Saghaleini SH, et al. Cancer treatment-related xerostomia: basics, therapeutics, and future perspectives. *Eur J Med Res.* 2024;29:571.
 61. De Felice F, Pranno N, Papi P, Brugnoletti O, Tombolini V, Polimeni A. Xerostomia and clinical outcomes in definitive intensity modulated radiotherapy (IMRT) versus three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT) for head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *In vivo* (Athens, Greece). 2020;34(2):623–9.
 62. Ren, J., Huang, R., Li, Y. *et al.* Radioprotective effects and mechanism of HL-003 on radiation-induced salivary gland damage in mice. *Sci Rep* **12**, 8419 (2022).
 63. Sayed R, El Wakeel L, Saad AS, Kelany M, El-Hamamsy M. Pentoxifylline and vitamin E reduce the severity of radiotherapy-induced oral mucositis and dysphagia in head and neck cancer patients: a randomized, controlled study. *Med Oncol.* 2019 Nov 21;37(1):8.
 64. Gu J, Zhu S, Li X, Wu H, Li Y, Hua F. Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. *PLoS One.* 2014 May 2;9(5):e95968.
 65. Bairati I, Meyer F, G  linas M, Fortin A, Nabid A, Brochet F, Mercier JP, T  tu B, Harel F, M  sse B, Vigneault E, Vass S, del Vecchio P, Roy J. A randomized trial of antioxidant vitamins to prevent second primary cancers in head and neck cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Apr 6;97(7):481-8.
 66. Meliante PG, Petrella C, Fiore M, Minni A, Barbato C. Antioxidant Use after Diagnosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC): A Systematic Review of Application during Radiotherapy and in Second Primary Cancer Prevention. *Antioxidants* (Basel). 2023 Sep 12;12(9):1753.

67. Matsuoka Y, Yoshida R, Kawahara K, Okamoto M, Okada N, Ishida H, et al. The antioxidative stress regulator Nrf2 potentiates radioresistance of oral squamous cell carcinoma accompanied with metabolic modulation. *Lab Invest.* 2022;102(8):896–907.
68. King M, Joseph S, Albert A, et al. Use of amifostine for cytoprotection during radiation therapy: A review. *Oncology.* 2020;98(2):61-80.
69. Nicolatou-Galitis O, Bossi P, Orlandi E, Bensadoun RJ. The role of benzydamine in prevention and treatment of chemoradiotherapy-induced mucositis. *Support Care Cancer.* 2021;29(10):5701–5709.
70. Sio TT, Blanchard MJ, Novotny PJ, et al. N-Acetylcysteine rinse for thick secretion and mucositis of head and neck chemoradiotherapy (Alliance MC13C2): A double-blind randomized trial. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(9):1814–1824.
71. Sayed R, El Wakeel L, Saad AS, Kelany M, El-Hamamsy M, Abo-Zeid M, et al. Pentoxifylline and vitamin E reduce the severity of radiotherapy-induced oral mucositis and dysphagia in head and neck cancer patients: a randomized, controlled study. *Med Oncol.* 2020;37(1):8.
72. Ramezani V, Ghadirian S, Shabani M, Boroumand MA, Daneshvar R, Saghafi F. Efficacy of curcumin for amelioration of radiotherapy-induced oral mucositis: a preliminary randomized controlled trial. *BMC Cancer.* 2023;23:354.
73. Bakr IS, Zaki AM, El-Moslemany RM, Elsaka RO. Vitamin D oral gel for prevention of radiation-induced oral mucositis: a randomized clinical trial. *Oral Dis.* 2021;27(5):1197-1204.
74. Elsabagh HH, Moussa E, Mahmoud SA, Elsaka RO, Abdelrahman H. Efficacy of melatonin in prevention of radiation-induced oral mucositis: a randomized clinical trial. *Oral Dis.* 2020;26(3):566-572.
75. Agare GI, Ezeorba TPC, Michael DC, Agbamu E, Aghoja OC, Alalor CA. Zinc supplementation for mitigating oral mucositis in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy and chemoradiotherapy: a systematic review. *Clin Nutr ESPEN.* 2025;67:8-24.
76. Zhang W, Fan L, Xie Y, Gao T, Zeng J, Clement YN. Clinical efficacy and applicability of natural products in the treatment and prevention of radiotherapy-induced oral mucositis: a systematic review. *PLoS One.* 2024;19(5):e0303988.
77. Münstedt K, Momm F, Hübner J. Honey in the management of radiotherapy-induced oral mucositis. *Complement Ther Clin Pract.* 2019;34:145–152.
78. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Sep 20;694:72-7.
79. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.

80. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 Sep 16;47(3):469-74.
81. Jambalsuren B, Dondog P. Screening for superoxide dismutase activity in certain food and medicinal plants of Mongolia. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Chemical Investigation and Utilization of Natural Resource (ICCIUNR-2021)*. Atlantis Highlights in Chemistry and Pharmaceutical Sciences. Vol. 2. Atlantis Press International B.V.; 2021. p. 28-31.
82. Lin NC, Hsu JT, Tsai KY. Difference between Female and Male Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma: A Single-Center Retrospective Study in Taiwan. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Jun 4;17(11):3978.
83. Ranjbar P, Vassiliou DA, Gkouveris I, et al. *Evolving trends in oral cavity cancer burden in Europe: a systematic review*. *Front Oncol* 2024;14:1234506
84. Szewczyk M, Pazdrowski J, Golusiński P, Więckowska B, Golusiński W. Oral cancer in young adults: should we approach these patients differently? *Front Oncol.* 2024 Apr 5;14:1297752.
85. Berben L, Floris G, Wildiers H, Hatse S. Cancer and Aging: Two Tightly Interconnected Biological Processes. *Cancers.* 2021; 13(6):1400.
86. Leung KC, Chu CH. Dental Care for Older Adults. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Dec 23;20(1):214.
87. Eloranta R, Vilén S-T, Keinänen A, Salo T, Qannam A, Snäll J. Oral squamous cell carcinoma: Effect of tobacco and alcohol on cancer location. *Tob Induc Dis.* 2024;22:1–9.
88. Paz C, Glassey A, Frick A, Sattar S, Zaorsky NG, Blitzer GC, Kimple RJ. Cancer therapy-related salivary dysfunction. *J Clin Invest.* 2024 Sep 3;134(17):e182661. doi: 10.1172/JCI182661. PMID: 39225092; PMCID: PMC11364403.
89. Paine CC 2nd, Snider JW 3rd. When saliva becomes a problem: the challenges and palliative care for patients with sialorrhea. *Ann Palliat Med.* 2020 May;9(3):1333-1339.
90. Vistoso Monreal A, Polonsky G, Shiboski C, Sankar V, Villa A. Salivary gland dysfunction secondary to cancer treatment. *Front Oral Health.* 2022;3:907778.
91. Likhterov I, Ru M, Ganz C, Urken ML, Chai R, Okay D, Liu J, Stewart R, Culliney B, Palacios D, Lazarus CL. Objective and subjective hyposalivation after treatment for head and neck cancer: Long-term outcomes. *Laryngoscope.* 2018 Dec;128(12):2732-2739.
92. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer.* 2007 Jan 1;109(1):54-9.
93. Rao, A., Suma, H., Prabhu, K., Shenoy, R., Annaswamy, R., & Rao, S. (2010). Estimation of salivary protein thiols and total antioxidant power of saliva in brain tumor patients. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 6(3), 278.

94. Najafi SH, Gholizadeh N, Manifar S, Rajabzadeh S, Kharazi Fard MJ. *Salivary Antioxidant Level in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Iran J Blood Cancer. 2015;7(2):57-60.
95. Acevedo-León D, Gómez-Abril SÁ, Sanz-García P, Estañ-Capell N, Bañuls C, Sáez G. The role of oxidative stress, tumor and inflammatory markers in colorectal cancer patients: A one-year follow-up study. Redox Biol. 2023 Jun;62:102662.
96. Rathan Shetty KS, Kali A, Rachan Shetty KS. Serum total antioxidant capacity in oral carcinoma patients. Pharmacognosy Res. 2015 Apr-Jun;7(2):184-7.
97. Dahiya K, Dhankhar R, Madaan H, Singh V, Arora K. Nitric oxide and antioxidant status in head and neck carcinoma before and after radiotherapy. Ann Clin Lab Sci. 2012 Winter;42(1):94-7.
98. Pang H, Li S, Fu X, Wen S, Chen D, Sun X, Chen Y, Yang S. Effect of blood oxidative stress indicators on oral mucositis in patients undergoing radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. Eur J Med Res. 2024 Nov 30;29(1):573.
99. Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A, Nagler RM. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. Cancer. 2007 Jan 1;109(1):54-9.
100. Shetty SR, Babu S, Kumari S, Shetty P, Hegde S, Castelino R. Status of salivary lipid peroxidation in oral cancer and precancer. Indian J Med Paediatr Oncol. 2014 Apr;35(2):156-8.
101. Salzman R, Pácal L, Tomandl J, Kanková K, Tóthová E, Gál B, Kostrica R, Salzman P. Elevated malondialdehyde correlates with the extent of primary tumor and predicts poor prognosis of oropharyngeal cancer. Anticancer Res. 2009 Oct;29(10):4227-31.
102. Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Verenitach BD, Lemos LT, Aranome AM, Oliveira SR, Cecchini AL, Simão AN, Abdelhay E, Panis C, Cecchini R. Impact of tumor removal on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation at diagnosis as a putative marker of disease recurrence. Clin Breast Cancer. 2014 Dec;14(6):451-9.
103. Alizadeh M, Pouramir M, Ghasemi N, Gholinia H, Hedayati M, Jenabian N. Evaluation of Oxidative Stress in Patients With Oral Cancer in Comparison With Healthy Subjects. J Arch Mil Med. 2021;9(2):e20843.
104. **Buïret G, Thomas-Danguin T, Feron G.** Exploring the role of oxidative stress in metallic taste during head and neck cancer treatment: A study of salivary malondialdehyde and therapeutic interventions [preprint]. 2025 Apr 30.
105. Shahi, Y.; Samadi, F.M.; Mukherjee, S. Plasma lipid peroxidation and antioxidant status in patients with oral precancerous lesions and oral cancer. *Oral Sci. Int.* **2020**, *17*, 86–93.
106. Nyamati, S.B.; Annapoorna, H.B.; Tripathi, J.; Sinha, N.; Roy, S.; Agrawal, R. Evaluation of serum antioxidant enzymes in oral submucous

- fibrosis and oral squamous cell carcinoma: A clinical and biochemical study. *J. Adv. Med. Dent. Sci. Res.* **2016**, 4, 83–87.
107. Bułdak R, Bułdak Ł, Kukla M, Gabriel A, Żwirska-Korczala K. Review paper Significance of selected antioxidant enzymes in cancer cell progression. *Polish Journal of Pathology*. 2014;65(3):167-175.
 108. Salehi SS, Mirmiranpour H, Rabizadeh S, Esteghamati A, Tomasello G, Alibakhshi A, Najafi N, Rajab A, Nakhjavani M. Improvement in Redox Homeostasis after Cytoreductive Surgery in Colorectal Adenocarcinoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Jul 31;2021:8864905.
 109. Cameron BD, Sekhar KR, Ofori M, Freeman ML. The Role of Nrf2 in the Response to Normal Tissue Radiation Injury. *Radiat Res*. 2018 Aug;190(2):99-106.
 110. Kushwaha V, Sahani K, Sharma V, Saeed S, Barman SK. Role of free radical scavengers in oral malignancies treated with radiotherapy. *Int J Basic Clin Pharmacol*. 2013;2(6):735-741.
 111. Manasaveena V, Akula KK, Sangram V. A comparative evaluation of enzymatic antioxidant levels in pre and post therapy patients with oral cancer. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(11):52-56.
 112. Rasheed MH, Beevi SS, Rajaraman R, Bose SJC. Alleviation of oxidative and nitrosative stress following curative resection in patient with oral cavity cancer. *J Surg Oncol*. 2007;96(3):194-199.
 113. Chitra P, Shyamaladevi CS. Antioxidant efficacy of vitamin E and its effect on the antioxidant system in oral cancer patients treated with radiotherapy. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2008;52(2):171–176.
 114. Babiuch K, Bednarczyk A, Gawlik K, et al. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia: a pilot study. *Acta Odontol Scand*. 2019;77(6):408–418.
 115. Yan W, Wang T, Fan L, et al. Temporal oxidative stress responses in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma during radiotherapy. *Dis Markers*. 2017;2017:4212034.