



**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ**

Бојан Сашо Попоски

**КЛИНИЧКА, БИОХЕМИСКА И ПАТОХИСТОЛОШКА ЕВАЛУАЦИЈА
НА ЕФЕКТОТ НА НЕЕНЗИМСКИТЕ АНТИОКСИДАНТИ КАЈ
ОРАЛЕН МУКОЗИТИС ИНДУЦИРАН СО
5-ФЛУОРОУРАЦИЛ - АНИМАЛЕН МОДЕЛ**

Докторски труд

Скопје, 2025



УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ
Катедра за болести на устата и пародонтот

Бојан Сашо Попоски

КЛИНИЧКА, БИОХЕМИСКА И ПАТОХИСТОЛОШКА ЕВАЛУАЦИЈА НА
ЕФЕКТОТ НА НЕЕНЗИМСКИТЕ АНТИОКСИДАНТИ КАЈ ОРАЛЕН
МУКОЗИТИС ИНДУЦИРАН СО
5-ФЛУОРОУРАЦИЛ - АНИМАЛЕН МОДЕЛ

Докторски труд

Скопје, 2025

Докторанд:
БОЈАН САШО ПОПОСКИ

Тема:
КЛИНИЧКА, БИОХЕМИСКА И ПАТОХИСТОЛОШКА ЕВАЛУАЦИЈА НА
ЕФЕКТОТ НА НЕЕНЗИМСКИТЕ АНТИОКСИДАНТИ КАЈ ОРАЛЕН
МУКОЗИТИС ИНДУЦИРАН СО 5-ФЛУОРОУРАЦИЛ - АНИМАЛЕН МОДЕЛ

Ментор:
проф. д-р ЌИРО ИВАНОВСКИ, редовен професор
Универзитет „Св. Кирил и Методиј” во Скопје,
Стоматолошки факултет – Скопје,
Катедра за болести на устата и пародонтот

Комисија за одбрана:
Проф.д-р ИМЕ И ПРЕЗИМЕ (претседател)
Установа од која доаѓа

Проф.д-р ИМЕ И ПРЕЗИМЕ,
Установа од која доаѓа

Проф.д-р ИМЕ И ПРЕЗИМЕ,
Установа од која доаѓа

Проф.д-р ИМЕ И ПРЕЗИМЕ,
Установа од која доаѓа

Проф.д-р ИМЕ И ПРЕЗИМЕ,
Установа од која доаѓа

Научна област:
ОРАЛНА МЕДИЦИНА И ПАРОДОНТОЛОГИЈА

Датум на одбрана:
(Ако датумот не е утврден, се додава дополнително рачно)

**КЛИНИЧКА, БИОХЕМИСКА И ПАТОХИСТОЛОШКА ЕВАЛУАЦИЈА НА
ЕФЕКТОТ НА НЕЕНЗИМСКИТЕ АНТИОКСИДАНТИ КАЈ ОРАЛЕН
МУКОЗИТИС ИНДУЦИРАН СО 5-ФЛУОРОУРАЦИЛ - АНИМАЛЕН МОДЕЛ**

– А п с т р а к т –

Вовед: Оралниот мукозитис (ОМ) претставува акутна, инфламаторна и улцеративна состојба на оралната лигавица, која е една од најзначајните и најнеспособувачки токсичности на современата онколошка терапија. Патогенезата на ОМ е комплексен, повеќефазен процес кој вклучува оксидативен стрес, активација на воспалителни медијатори и клеточна апоптоза, што резултира со оштетување на епителот. Врз основа на централната улога на оксидативниот стрес во патогенезата на ОМ, примената на антиоксиданти претставува логичен и биолошки насочен пристап за нивна превенција и третман.

Цел: Да се утврди ефектот на неензимските антиоксиданти, врз интензитетот на орален мукозитис предизвикан од 5-флуороурацил, преку евалуација на клинички, биохемиски и патохистолошки наоди.

Применети научни методи и начин на работа: Истражувањето беше спроведено врз 40 машки Wistar стаорци, користејќи анимален модел на ОМ индуциран со 5-FU и оцетна киселина. Животните беа поделени во пет групи: негативна и позитивна контролна група и три испитувани групи третирани поединечно или комбинирани со витамин Ц, глутатион и цинк сулфат. Антиоксидантите беа администрирани дневно со гаважа, 14 дена пред апликацијата на цитостатикот. 5-FU беше аплициран интраперитонеално во доза од 40 mg/kg на 15-тиот, 17-тиот и 19-тиот ден, а лезиите беа индуцирани на 20-тиот ден со 25% раствор на оцетна киселина. Епителизацијата на лезиите беше следена 14 дена, при што нивната големина беше мерена на секои два дена, од 21-от до 34-от ден, под краткотрајна анестезија. На крајот од експериментот животните беа пожртвувани и беа колекционирани серумски и ткивни примероци за биохемиска (TNF- α , IL-1 β , MDA, SOD, GR, CAT) и патохистолошка анализа (описна анализа на паротидната плунковна жлезда).

Резултати: Дијаметарот на лезиите значајно се намалуваше со текот на времето ($p < 0.001$), но без значајна во динамиката на епителизацијата помеѓу групите ($p = 0.537$). TNF- α и IL-1 β беа највисоки во позитивната контролна група (Г2) и значајно пониски во Г3 (Vit.C + GSH) и Г5 (Vit.C + GSH + Zn) (Kruskal–Wallis, $p < 0.001$; Dunn, $p < 0.05$) во споредба со Г2. MDA беше значајно повисок во Г2 во однос на останатите групи ($p < 0.001$). Антиоксидативните ензими (SOD, GR, CAT) покажаа највисока активност во групата третирана со сите антиоксиданти (Г5). Spearman's Rank Correlation регистрираше значајна поврзаност помеѓу сите биохемиски параметри ($p < 0.05$), со исклучок на корелацијата помеѓу TNF- α и MDA ($p = 0.061$). Помеѓу TNF- α , IL-1 β и MDA беше регистрирана позитивна корелација и истите беа значајно негативно корелирани со антиоксидативните ензими ($p < 0.05$). Меѓусебно, ензимите покажаа статистички значајна позитивна корелација. Патохистолошката анализа укажа на ограничени и слични морфолошки промени на паротидната плунковна жлезда во сите групи.

Заклучок: Суплементацијата со неензимски антиоксиданти има делумен ефект врз ОМ, остварен преку намалување на интензитетот и забрзување на епителизацијата на лезиите, при што најизразен ефект беше забележан при комбинираниот примена на витамин Ц, глутатион и цинк. Витаминот Ц и глутатионот покажаа поизразено дејство врз редукција на проинфламаторните медијатори и интензитетот на лезиите, додека цинкот се истакна како фактор што ја поттикнува реепителизацијата. Комбинираната терапија обезбеди најдобра сочуваност на ензимската активност и најниски нивоа на оксидативен стрес. Патохистолошката анализа не покажа јасни разлики меѓу групите. Овие наоди ја потврдуваат централната улога на оксидативниот стрес и инфламацијата во патогенезата на ОМ и ја поддржуваат хипотезата дека модулацијата на оксидоредуктивната рамнотежа преку антиоксиданти може да има потенцијална клиничка примена. Потребни се истражувања со поголем примерок, стандардизирани методи и клиничка верификација, со цел целосна процена на терапевтскиот потенцијал и безбедноста на антиоксидативната суплементација кај пациенти подложени на хемотерапија.

Клучни зборови: орален мукозитис, хемотерапија, оксидативен стрес, антиоксиданти, TNF- α , IL-1 β , SOD, CAT, GR, анимален модел

CLINICAL, BIOCHEMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF THE
EFFECT OF NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANTS ON ORAL MUCOSITIS INDUCED
BY 5-FLUOROURACIL - ANIMAL MODEL

– A b s t r a c t –

Introduction: Oral mucositis (OM) is an acute, inflammatory, and ulcerative condition of the oral mucosa, representing one of the most significant and debilitating toxicities of modern oncological therapy. The pathogenesis of OM is a complex, multistage process involving oxidative stress, activation of inflammatory mediators, and cellular apoptosis, resulting in epithelial damage. Considering the central role of oxidative stress in OM pathogenesis, the use of antioxidants represents a logical and biologically targeted approach for its prevention and treatment.

Aim: To determine the effect of non-enzymatic antioxidants on the intensity of oral mucositis induced by 5-fluorouracil, through evaluation of clinical, biochemical, and histopathological findings.

Materials and Methods: The study was conducted on 40 male Wistar rats using an animal model of OM induced by 5-FU and acetic acid. The animals were divided into five groups: a negative and a positive control group, and three experimental groups treated individually or in combination with vitamin C, glutathione, and zinc sulfate. Antioxidants were administered daily by gavage, starting 14 days before cytostatic application. 5-FU was administered intraperitoneally at a dose of 40 mg/kg on days 15, 17, and 19, and lesions were induced on day 20 using a 25% acetic acid solution. Epithelialization of the lesions was monitored for 14 days, with measurements performed every two days from day 21 to day 34 under short-term anesthesia. At the end of the experiment, animals were sacrificed, and serum and tissue samples were collected for biochemical (TNF- α , IL-1 β , MDA, SOD, GR, CAT) and histopathological analysis (descriptive evaluation of the parotid salivary gland).

Results: The lesion diameter significantly decreased over time ($p < 0.001$), with no significant differences in the dynamics of epithelialization between groups ($p = 0.537$). TNF- α and IL-1 β levels were highest in the positive control group (G2) and significantly lower in G3 (Vit. C + GSH) and G5 (Vit. C + GSH + Zn) (Kruskal–Wallis, $p < 0.001$; Dunn, $p < 0.05$) compared to G2. MDA levels were significantly higher in G2 compared to other groups ($p < 0.001$). Antioxidative enzymes (SOD, GR, CAT) showed the highest activity in the group treated with all antioxidants (G5). Spearman's Rank Correlation indicated significant associations among all biochemical parameters ($p < 0.05$), except between TNF- α and MDA ($p = 0.061$). TNF- α , IL-1 β , and MDA were positively correlated with each other and significantly negatively correlated with antioxidant enzymes ($p < 0.05$). The enzymes themselves showed significant positive intercorrelations. Histopathological analysis revealed limited and similar morphological changes in the parotid salivary gland across all groups.

Conclusion: Supplementation with non-enzymatic antioxidants exerted a partial protective effect on OM by reducing lesion intensity and accelerating epithelialization, with the most pronounced effect observed after combined administration of vitamin C, glutathione, and zinc. Vitamin C and glutathione showed greater efficacy in reducing proinflammatory mediators and lesion intensity, while zinc promoted re-epithelialization. The combined therapy provided the best preservation of enzymatic activity and the lowest oxidative stress levels. Histopathological analysis did not reveal clear differences between groups. These findings confirm the central role of oxidative stress and inflammation in OM pathogenesis and support the hypothesis that modulation of redox balance through antioxidants may have potential clinical applicability. Further studies with larger sample sizes, standardized methodologies, and clinical validation are needed to fully assess the therapeutic potential and safety of antioxidant supplementation in chemotherapy patients.

Keywords: oral mucositis, chemotherapy, oxidative stress, antioxidants, TNF- α , IL-1 β , SOD, CAT, GR, animal model

Благодарност – не е задолжително

XX

XX

XX

XX

XX

XX

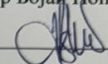
XX

XXXXXXXXXXXX

ИЗЈАВА

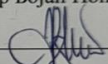
Изјавувам дека докторскиот труд го изработив самостојно, дека уредно ги цитирам сите користени извори и литература и дека трудот не е користен во рамките на други универзитетски студии или за стекнување на друго звање

ас. д-р Бојан Попоски

с.р. 

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

ас. д-р Бојан Попоски

с.р. 

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	9
1.1 Орален мукозитис (ОМ) и неговото значење	9
1.2 Патобиологија на оралниот мукозитис	11
1.3 Улогата на 5-флуороурацилот (5-FU) во етиопатогенезата на оралниот мукозитис	13
1.4 Антиоксидативен одбранбен систем	14
1.5 Превентивни и тераписки модалитети за ОМ	16
ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	18
ЗНАЧЕЊЕ НА ИЗБОРОТ И НА ОБРАБОТКАТА НА ТЕМАТА	18
ПРИЧИНА ЗА ИЗБОР НА ТЕМАТА	19
ОЧЕКУВАН НАУЧЕН ПРИДОНЕС	19
НАЦРТ НА СОДРЖИНАТА НА ТРУДОТ	20
2. ПРЕГЛЕД НА ДОСТИГНУВАЊАТА ВО ДАДЕНАТА НАУЧНА ОБЛАСТ, ПОВРЗАНИ СО ПРЕДМЕТОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕ	21
3. ОБРАЗЛОЖЕНИЕ НА РАБОТНИТЕ ХИПОТЕЗИ И ТЕЗИ	29
4. ПРИМЕНЕТИ НАУЧНИ МЕТОДИ И НАЧИН НА РАБОТА	30
5. ДОБИЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НИВНО ЗНАЧЕЊЕ	37
5.1 Анализа на општите здравствени индикатори	38
5.1.1 Анализа на телесната маса	38
5.1.2 Анализа на телесната температура	41
5.1.3 Анализа на имуносупресијата	44
5.2 Анализа на клиничките параметри	45
5.2.1 Анализа на големината на лезиите 24 часа по аплицирањето на оцетната киселина	45
5.2.2 Анализа на големината на лезиите 3 дена по аплицирањето на оцетната киселина	46
5.2.3 Анализа на големината на лезиите 5 дена по аплицирањето на оцетната киселина	48
5.2.4 Анализа на големината на лезиите 7 дена по аплицирањето на оцетната киселина	49

5.2.5 Анализа на големината на лезиите 9 дена по аплицирањето на оцетната киселина.....	51
5.2.6 Анализа на големината на лезиите 12 дена по аплицирањето на оцетната киселина.....	52
5.2.7 Анализа на големината на лезиите 14 дена по аплицирањето на оцетната киселина.....	54
5.2.8 Анализа на динамиката на заздравување на лезиите	55
5.3 Анализа на биохемиските параметри	57
5.3.1 Анализа на концентрацијата на $TNF-\alpha$ (pg/mL).....	57
5.3.2 Анализа на концентрацијата на $IL-1\beta$ (pg/mL).....	59
5.3.3 Анализа на концентрацијата на MDA (mmol/L)	61
5.3.4 Анализа на активноста на SOD (kU/mg протеини)	63
5.3.5 Анализа на активноста на GR (kU/mg протеини)	65
5.3.6 Анализа на активноста на CAT (kU/mg протеини)	67
5.3.7 Анализа на поврзаноста помеѓу биохемиските параметри	69
5.4 Анализа на патохистолошките резултати	78
6. ПРИМЕНА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО И МОЖНИ НАСОКИ ЗА НАТАМОШНО ИСТРАЖУВАЊЕ.....	98
7. ЗАКЛУЧОК.....	99
8. СПИСОК НА КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	100

СПИСОК НА СКРАТЕНИЦИ КОИ СЕ КОРИСТАТ ВО ТЕКСТОТ

ОМ – Орален мукозитис

ТХМК – Трансплантација на хематопоеетски матични клетки

КГВ – Карцином на глава и врат

5-FU – 5-флуороурацил

PKB – реактивни кислородни видови

SOD – супероксид дисмутаза

CAT – каталаза

GR – глутатион редуктаза

GPx – глутатион пероксидаза

MDA - малондиалдехид

GSH – глутатион

WBC – бели крвни клетки

РКИ – рандомизирано контролирано истражување

1. ВОВЕД

1.1 Орален мукозитис (ОМ) и неговото значење

Со подемот на хемотерапијата како тераписки модалитет во 1940-тите години, значително се зголемил бројот на несакани промени на оралната мукоза, генерално именувани како стоматитис. Поради недостатокот на ефикасни тераписки методи, како и превентивни насоки за стоматитисот, постојано се влошувале квалитетот на животот и прогнозата на овие пациенти [1]. Во минатото, терминот „стоматитис“ покрај тоа што се употребувал за промените кои настануваат како резултат на хемо- и/или радиотерапија, бил употребуван и за многу други заболувања кои ја зафаќаат оралната лигавица. Терминот „мукозитис“ т.е. „орален мукозитис“ започнал да се употребува во 1980-тите години како попрецизен термин кој ги опишува лезиите како резултат на цитотоксична терапија за канцер [2]. Комплексните патогенетски механизми на претходно наречениот стоматитис биле откриени во 2007-та година, а со тоа официјално бил усвоен и новиот термин „орален мукозитис“, кој ги опишувал лезиите кои настануваат како резултат на цитотоксичните ефекти од хемо- и/или радиотерапија. Истата година, за лезиите асоцирани со цитотоксична канцер терапија бил назначен ICD-9 кодот 528.0. ICD-10 кодот за оралниот мукозитис е K12.3 [3].

Оралниот мукозитис (ОМ) претставува акутна, инфламаторна и улцеративна состојба на оралната лигавица и е една од клинички најзначајните и најнеспособувачки токсичности на современата онколошка терапија [4]. Тој е поврзан со силна болка, нарушена исхрана, зголемен ризик од инфекција, како и со чести прекини или модификации на дозите во онколошкиот третман, што негативно влијае врз прогнозата и врз вкупниот исход на примарното заболување [5–8]. Се појавува кај приближно 40% од пациентите кои примаат стандардна доза хемотерапија, кај 80% од пациентите со трансплантација на хематопоеетски матични клетки (ТХМК), а речиси секогаш кај пациентите што подлежат на хеморадиотерапија за карцином на глава и врат (КГВ) [1,9]. И покрај напредокот во планирањето на радиотерапијата и протоколите за поддржувачка грижа, тешките форми на ОМ (степен ≥ 3) се чести и се појавуваат кај повеќе од 40% од пациентите што примаат конкомитантна хеморадиотерапија [10]. Мерките за исход пријавени од пациентите (PROMs) потврдуваат дека ОМ драматично го влошува квалитетот на живот, па дури и умерените лезии значително ја нарушуваат оралната функција, а силната болка често перзистира и покрај агресивна терапија со опиоидни аналгетици [11,12]. Овие улцерации не претставуваат само локална токсичност, туку и системска закана, бидејќи нарушувањето на мукозната бариера создава влезна врата за микробни патогени, што значително ја зголемува веројатноста за бактериемија и сепса, особено кај имуносупримирани пациенти [5,13,14].

Покрај влијанието врз квалитетот на животот на пациентите со КГВ, ОМ претставува и финансиски товар на здравствениот систем поради: зголемена употреба на ресурси, хоспитализација на пациентите и пролонгирање на хоспитализацијата, прекин на хемотерапијата, ангажирање експерти за консултации, како и поради трошоците поврзани со процедурите на апликација на назогастрична сонда или перкутана ендоскопска гастростома [15–20]. Дополнителното финансиско оптеретување на здравствениот систем за ОМ изнесувало приближно од 5000 до 30.000 американски долари кај пациенти што примале радиотерапија и околу 3700 долари по циклус кај пациенти на хемотерапија. Дополнителниот трошок за хоспитализација поврзана со ОМ кај пациенти со ТХМК

надминувал 70.000 долари [15]. Овие бројки јасно укажуваат дека ОМ е значителен придонесувач кон искористувањето на здравствени ресурси и економското оптоварување врз здравствениот систем.

Имајќи го предвид ова влијание на ОМ, меѓународните експерти развиле консензус-насоки за стандардизирана евалуација на ОМ. Во понов Делфи-процес биле препорачани скалата за токсичност на Светската здравствена организација (WHO toxicity scale) и Критериумите за заедничка терминологија на несакани настани (CTCAE) како најсоодветни алатки за оценување од страна на клиничарите, додека валидираните мерки за исходи пријавени од пациентите, како Oral Mucositis Daily Questionnaire (OMDQ), Oral Mucositis Weekly Questionnaire (OMWQ) и PRO-CTCAE, се препорачуваат за истражувања и за клинички мониторинг [4]. Овие алатки овозможуваат конзистентност во клиничката практика и споредливост на резултатите меѓу различни студии.

Иако е предвидлив несакан ефект од онколошката терапија, ОМ и понатаму најчесто се третира според протоколите за третирање на неговата симптоматологија, а не со терапии насочени кон механизмите на неговото настанување [5,21]. Стратегиите засновани врз докази вклучуваат орална криотерапија, која е силно препорачана за превенција на ОМ предизвикан од 5-флуороурацил (5-FU) и во одредени трансплантациски протоколи, како и фотобиомодулациска терапија и избрани антиинфламаторни лекови или фактори на раст кои покажуваат варијабилна ефикасност во зависност од контекстот на третманот [5,21].

Современата литература сè почесто нагласува дека ОМ не треба да се смета само за несакан ефект, туку за сериозна и превентивна компликација од онколошката терапија, која значително влијае врз преживувањето, придржувањето кон третманот и искористувањето на здравствените ресурси [21]. Опстојувањето на овој проблем и покрај децении истражувања, ја потенцира потребата за итно потребно воведување на иновативни, биолошки насочени интервенции, што всушност е и предмет на истражување во оваа дисертација.

1.2 Патобиологија на оралниот мукозитис

Патобиологијата на ОМ се дефинира како повеќефазен, комплексен и биолошки динамичен процес, а не како едноставна десквамација на оралниот епител предизвикана од хемо- и/или радиотерапија [22]. Според Sonis [23], настанувањето на ОМ се одвива во 5 последователни фази, кои се клучни за разбирање на молекуларната основа на ова заболување и тоа: фаза на иницијација; фаза на иницијален одговор на оштетувањето; фаза на амплификација на сигналот; фаза на улцерација и фаза на заздравување [[23,24].

Иницијалната фаза настанува многу брзо по започнување на хемо- и/или радиотерапијата, при што настанува оштетување на ДНК во клетките од базалниот слој, клетките од субмукозата, како и ендотелните клетки [22,24]. Вториот начин на клеточно оштетување е преку создавање на големо количество на реактивни кислородни видови (РКВ, *анг. ROS*) коишто доведуваат до појава на оксидативен стрес и како резултат на тоа до клеточно оштетување, но не преку директно оштетување на ДНК, туку преку оштетување на други клеточни компоненти (*non-DNA injury*) [25,26]. Бидејќи оваа фаза е основата за развој на ОМ, доколку се влијае на патобиолошките механизми поврзани со неа, може да дојде до спречување на понатамошно оштетување на мукозата [24].

Фазата на иницијален одговор на оштетувањето се карактеризира со активирање на транскрипциони фактори (p53, Wnt и NF-kb) од страна на РКВ, поради што се менува експресијата на различни инфламаторни медијатори, како што се: факторот на туморска некроза алфа (TNF- α), различни интерлеукини (IL-1 β , IL-6), циклооксигеназа 2 (COX-2) и други [24,27]. Поради промената во експресијата на инфламаторните медијатори, доаѓа до нивно зголемено создавање и нивна акумулација во епителот и сврзното ткиво, создавајќи зголемување на оксидативниот стрес, изумирање на клетките од базалниот слој и ткивно оштетување [24]. Зголеменото количество на РКВ ги активира сфингомиелиназата и церамид синтетазата, кои предизвикуваат хидролиза на сфингомиелинот од клеточната мембрана. Значајна улога во оваа фаза имаат и фибробластите, коишто создаваат матриксни металопроотеинази (MMP), особено MMP-1 и MMP-3, кои го нарушуваат интегритетот на базалната мембрана и овозможуваат проширување на инфламаторните медијатори во подлабоките делови на ткивото [24,28]. Сите овие случувања доведуваат до апоптоза и ткивно оштетување [29].

Во фазата на амплификација на сигналот, веќе создадените инфламаторни медијатори (TNF- α и IL-1 β) делуваат екстраклеточно на околните клетки, при што преку позитивна повратна спрега доведуваат до дополнително активирање на NF-kb, кој е клучен фактор за создавање на проинфламаторни медијатори [24,30]. Дополнително, TNF- α ја активира сфингомиелиназата, што доведува до апоптоза [29]. Како резултат на апоптотичното уништување на клетките, се создава постаптотичен дебрис, кој заедно со микроорганизмите коишто инфилтрираат помеѓу клетките кои веќе се слабо поврзани меѓу себе, го активираат имунолошкиот систем и повторно, NF-kb [24]. Во оваа фаза сè уште не постојат клинички знаци, но кај некои пациенти може да се појави еритем.

Фазата на улцерација се карактеризира со обемно оштетување на лигавицата, губење на интегритетот на епителот и појава на болни улцери [4,24,30,31]. Улцерите настануваат како резултат на зголеменото количество на проинфламаторни цитокини, поради кои оралната лигавица е инфилтрирана со големо количество на инфламаторни клетки (неутрофили, макрофаги и лимфоцити). Инфламаторните клетки ослободуваат цитокини,

хемокини и протеази, кои доведуваат до појава на улцерите [31]. Со создавањето на улцерите се изложуваат нервните завршетоци, што предизвикува значителна болка, отежната орална хигиена и тешкотии при јадење, голтање и зборување, а во потешки случаи може да има и потреба од ентерална или парентерална исхрана и хоспитализација на пациентите [30,32]. Површината на улцерите брзо се колонизира од патогени микроорганизми како *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*, чии компоненти од клеточниот сид навлегуваат во подлигавичното ткиво, засилувајќи го инфламаторниот одговор и зголемувајќи го ризикот од секундарни инфекции, особено кај неутропенични пациенти [24,31]. Инфилтрираните неутрофили, макрофаги и лимфоцити лачат проинфламаторни и проапоптотични медијатори, дополнително предизвикувајќи апоптоза, дезинтеграција на ткивото и ризик од системска инфекција во потешки случаи [24].

Фазата на заздравување започнува по смирување на воспалителниот одговор, што може да се случи спонтано или со терапија, а се карактеризира со пролиферација и диференцијација на епителните клетки, со што постепено се обновува интегритетот на лигавицата [31]. Овој процес може да трае неколку недели или месеци, во зависност од интензитетот на ОМ, а е потпомогнат од екстраклеточниот матрикс, различни цитокини и хемокини, како и оралниот микробиом (некои бактерии можат позитивно да влијаат врз епителната регенерација [31]. Дополнително, процесот на заздравување зависи од терапискиот протокол, дозата, времетраењето и истовремената примена на хемо- и радиотерапија [24]. Фазата завршува со реепителизација и целосна репарација на оштетените површини, со повторно воспоставување на нормалната структура и функција на лигавицата [33]. Значајно е дека новоформираната, регенерирана лигавица има променет геном, кој се разликува од првичниот, што може да доведе до намалена толеранција на ткивото кон идни циклуси на хемо- и/или радиотерапија [24].

1.3 Улогата на 5-флуороурацилот (5-FU) во етиопатогенезата на оралниот мукозитис

5-Флуороурацил (5-FU), пиримидински аналог синтетизиран во 1950-тите години врз основа на истражувања кои покажале дека туморските ткива го метаболизираат урацилот побрзо од нормалните ткива, е одобрен во 1962 година за третман на колоректален карцином и оттогаш претставува една од најшироко применуваните антиметаболитни хемотерапии за цврсти тумори, вклучувајќи карциноми на дебелото црево и ректумот, дојката, желудникот, панкреасот, хранопроводот, аналниот канал, грлото на матката, како и за КГВ [34,35]. Овој антиметаболит ја остварува својата антитуморска активност главно преку инхибиција на тимидилат синтазата (TS), што предизвикува дефицит на тимидин трифосфат и нарушена синтеза и репарација на ДНК, како и преку вградување на неговите активни метаболити во ДНК и РНК, што доведува до нарушување на процесите на репликација и процесирање на нуклеинските киселини [36,37]. Вградувањето на 5-FU во РНК е многукратно поголемо отколку во ДНК и значително го нарушува процесирањето на rRNA, tRNA и snRNA, со што се компромитира клеточниот метаболизам и опстанок [37]. Овие комбинирани, неселективни механизми резултираат со запирање на клеточниот циклус и апоптоза на клетките со висока стапка на пролиферација (како што се неопластичните клетки) и претставуваат основа за клиничката ефикасност на 5-FU, но и за неговата токсичност кон здравите ткива со висока пролиферативна активност [37].

Кај пациенти со КГВ, 5-FU се користи во протоколите како индукциона и конкурентна терапија [38,39]. Индукционата терапија се користи со цел да се намали големината на туморот и да се овозможи зачувување на што е можно поголем дел од здравото ткиво, при што за локално напреднат КГВ најкористени протоколи се PF протоколот (цисплатин-5-FU) и TPF протоколот (цисплатин-5-FU-docetaxel) [40]. При конкурентната терапија, хемотерапискиот агенс се користи во комбинација со друга терапија, најчесто радиотерапија (хеморадиотерапија), при што 5-FU се комбинира со цисплатин или карбоплатин [41]. Дополнително, 5-FU може да се користи и како палијативна хемотерапија за рекурентен/метастатски КГВ, при што се комбинира со цетуксимаб и платински агенс (EXTREME протокол) [42,43]. При примена на 5-FU, ОМ се јавува кај 40% од пациентите, од кои кај 10-15% се манифестира со интензитет од трет или четврт степен [44]. Ризикот за ОМ се зголемува при употреба на болус и континуирана терапија, во споредба со примената на ниски и пролонгирани дози на хемотерапискиот агенс [44].

Фармаколошки, околу 80% од 5-FU се метаболира од страна на ензимот дихидропиримидин дехидрогеназа (DPD) во неактивен дихидрофлуороурацил [45]. Постои интериндивидуална варијабилност во активноста на DPD, односно кај 3-5% од луѓето има делумен дефицит на DPD, додека околу 0.2% имаат целосен недостаток, што ги прави подложни за несакани ефекти од највисок степен при примена на 5-FU [45–47].

Анималните модели на ОМ кај глодари покажуваат дека системската примена на 5-FU ја репродуцира клиничката патологија која се манифестира кај луѓето, утврдувајќи го значењето на овие модели во транслационите истражувања и употребата на анимални модели и 5-FU за истражувања поврзани со ОМ [48–50].

1.4 Антиоксидативен одбранбен систем

Антиоксидативниот одбранбен систем претставува координиран систем од ензимски и неензимски компоненти кој го заштитува организмот од оштетувањата предизвикани од големото количество на слободните радикали, кои ги вклучуваат и РКВ [51]. Слободните радикали се молекули или атоми со непарен број електрони, кои поради својата висока реактивност лесно учествуваат во оксидативни реакции [52], додека пак антиоксидантите претставуваат молекули кои донираат електрон на слободните радикали, а притоа остануваат стабилни [53]. Слободните радикали најчесто потекнуваат од кислород, азот или сулфур и природно се создаваат во организмот за време на нормални метаболички процеси како што се дишењето, варењето, метаболизмот на липиди, лекови и алкохол [52,54]. Во физиолошки концентрации слободните радикали имаат значајна улога како сигнални молекули во редокс-сигнализацијата и во фагоцитната елиминација на патогени од страна на гранулоцитите и макрофагите, но нивната прекумерна акумулација предизвикува оштетување на клеточната мембрана, инактивација на ензими, пореметување на клеточните процеси кои се значајни за нормалното функционирање на клетките, инхибиција на клеточната делба, како и оштетување на ДНК, липидите и протеините [52]. Бидејќи слободните радикали се значајни за бројни физиолошки процеси, антиоксидативниот одбранбен систем треба да ги одржува слободните радикали на умерено, физиолошко ниво, а не комплетно да ги елиминира [51].

Овој одбранбен систем е сочинет од две групи на антиоксиданти – ензимски и неензимски [55,56].

Во ензимската група на антиоксиданти припаѓаат различни ензими, како што се супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион редуктаза (GR), глутатион пероксидаза (GPx), глутатион S-трансфераза (GST) и пероксиредоксини (Prxs) [55]. SOD ја сочинува првата линија на антиоксидативниот одбранбен систем, катализирајќи ја дисмутацијата на супероксидните анјони ($O_2^{\bullet-}$), при што се создава H_2O_2 , кој понатаму се детоксифицира до вода и кислород од страна на CAT, GPx и Prxs [55,57,58]. Втората линија на одбрана на овој систем ја сочинуваат ензимите коишто учествуваат во метаболизмот на глутатионот, меѓу кои е и GR [55,59], значаен ензим за постојано создавање на глутатион (GSH) кој учествува во клеточните антиоксидативни реакции [60].

Во неензимската група на антиоксиданти припаѓаат: витамините (Vit.C, Vit.E, Vit.A, Vit.K), органосулфурните соединенија (глутатион, алил сулфид и индоли) минералите (цинк и селен), кофакторите (Коензим Q10), каротеноидите (β -каротен, ликопен и лутеин), уричната киселина и фенолните киселини [61]. Во главен фокус на нашето истражување ќе бидат три неензимски антиоксиданти: Витамин Ц, глутатион (GSH) и цинк. Витаминот Ц е хидросолубилан антиоксидант што донира електрони и ги неутрализира реакциите иницирани од РКВ, ги регенерира другите антиоксиданти, ја модулира активноста на транскрипциските фактори што ја регулираат експресијата на антиоксидативните ензими и обезбедува заштита на клеточните компоненти во водена и масна средина [55,62,63]. Глутатионот (GSH) е доминантен клеточен антиоксидант кој ја одржува оксидоредуктивната хомеостаза и ја штити клетката од оксидативен стрес, ги регулира детоксикациските процеси, ја модулира функцијата на протеините, влијае врз клеточната сигнализација, а може да влијае и на експресијата на гени [64,65]. Тој е присутен во сите органи, особено во црниот дроб, во редуцирана (GSH) и оксидирана (GSSG) форма, при што интраклеточниот

сооднос GSH/GSSG потребно е да биде поголем од 100:1 за да се одржува оксидоредуктивната хомеостаза [66]. Значајна компонента на GSH е неговата сулфхидрилна група којашто може да ги неутрализира егзогените и ендогените штетни молекули, меѓу кои се и РКВ [67]. Цинкот исто така има голем удел за контрола на клеточните оксидоредуктивни процеси на повеќе начини: како кофактор на антиоксидативните ензими, особено на Cu/Zn супероксид дисмутаза (SOD1) [68], ги стабилизира клеточните мембрани, ја инхибира продукцијата на РКВ посредувана од NADPH оксидаза и ја индуцира синтезата на металотионини кои ги намалуваат хидроксилните радикали и ги неутрализираат РКВ создадени при оксидативен стрес [69]. Дополнително, цинкот функционира на повеќе нивоа на клеточна сигнализација, при што ја регулира меѓуклеточната комуникација, пролиферацијата, диференцијацијата и преживувањето на клетките [70].

1.5 Превентивни и тераписки модалитети за ОМ

ОМ останува значаен клинички предизвик во онкологијата, особено кај пациенти кои примаат високи дози хемотерапија, радиотерапија за КГВ или пациенти со ТХМК. И покрај децении истражувања, стратегиите за менаџирање се главно насочени кон поддржувачка грижа, а не кон лекување, со фокус на контрола на симптомите, одржување на оралната хигиена и превенција на секундарни инфекции [1,5,13,71].

Стандардната поддржувачка грижа вклучува плакнење на устата со солена раствор или натриум-бикарбонат, лесно сварлива исхрана (bland diet), криотерапија, контрола на болка (опиоиди, локални анестетици) и нутритивна поддршка [22,72–74]. Иако овие интервенции го намалуваат непријатното чувство во устата и ја одржуваат оралната функција, тие не ги „напаѓаат“ молекуларните механизми на оштетување на мукозата, поради што често се појавува тешка форма на ОМ [10].

Најшироко прифатените клинички насоки се оние од Меѓународната асоцијација за поддржувачка грижа кај пациенти со карцином (MASCC) и Меѓународното здружение за орална онкологија (ISOO), последен пат ажурирани во 2020 година [5]. Насоките се базирани на систематски прегледи и оценка на доказите, со препораки специфични за болеста и третманот. Според MASCC/ISOO, интервенциите за ОМ се поделени во 7 категории: основна орална хигиена, антиинфламаторна терапија, фотобиомодулација, орална криотерапија; антимикробни агенси, заштитни агенси, анестетици и аналгетици; фактори на раст и цитокини; природни и други агенси.

Основната орална хигиена (Basic oral care; BOC) ги вклучува сите рутински активности што ги спроведува пациентот или докторот, а се со цел намалување на бактериите во усната празнина, превенција на инфекции и обезбедување чувство на удобност. Ова вообичаено подразбира механичко чистење (четкање на забите, употреба на конец), плакнење со раствори за намалување на бактериска акумулација (неиритирачки раствори) и хидратација и подмачкување на оралната лигавица со навлажнувачки агенси [5].

Антиинфламаторна терапија: Бензидамин е еден од најкористените и најдобро научно поддржани антиинфламаторни агенси за превенција на ОМ кај пациенти со КГВ. MASCC/ISOO го препорачува при умерено-дозна радиотерапија и при конкомитантна хеморадиотерапија [5]. Како топичен нестероиден антиинфламаторен лек (НСАИЛ)/аналгетик, бензидамин го намалува нивото на TNF- α , IL-1 β и простагландините; ја инхибира интеракцијата помеѓу леукоцитите и ендотелот, ја блокира дегранулацијата на неутрофилите, ги неутрализира РКВ и ги намалува хистамин-посредуваната вазодилатација и васкуларната пропустливост [75]. Клиничките испитувања и мета-анализите потврдуваат дека плакнењето со бензидамин ја намалува инциденцата, тежината и болката на ОМ, помагајќи да се зачува оралната функција [5].

Фотобиомодулација (PBM): MASCC/ISOO ја препорачува за превенција на ОМ кај пациенти што подлежат на ТХМК и кај радиотерапија на глава и врат –самостојно и во комбинација со хемотерапија [5]. За оптимална ефикасност, клиничарите треба строго да се придржуваат до објавените PBM протокол-параметри, односно точна бранова должина, доза/енергетска густина и времетраење, прилагодени на клиничката индикација и терапевтскиот протокол [5,74]. Студиите покажуваат дека PBM е ефикасна во третманот на

ОМ, со намалување на воспалението и болката, како и поттикнување на репарација и регенерација на ткивото [76].

Орална криотерапија: Конвенционално се применува со ладна вода или мраз, но денес постојат и понови методи и комерцијални препарати за клиничка употреба [74]. Вазоконстрикцијата предизвикана од ниска температура го намалува транспортот на цитотоксични лекови до оралните ткива и со тоа спречува секундарни компликации [72]. Дополнително, ниската температура ја намалува метаболичката активност во базалниот слој, правејќи го епителот помалку чувствителен на цитотоксични агенси [77].

Антимикробни агенси, заштитни агенси, анестетици и аналгетици: Кандидијазата е честа орална инфекција кај пациенти со карцином и може секундарно да ги колонизира улцерите на ОМ, со што се влошуваат симптомите и се забавува репителизацијата. Оттука, се претпоставува дека профилакса со антимикотична терапија индиректно може да ги намали ризикот и тежината на ОМ, спречувајќи суперинфекција [73]. Оралните лекови за топикална примена мора често да се аплицираат поради динамиката во оралната средина, што ја отежнува соработката и придржувањето на пациентите [74]. Затоа, се применуваат алтернативи како мукоадхезивни таблети со миконазол, кои ја подобруваат адхеренцијата кога честата локална апликација е непрактична [78]. За заштита на оштетениот епител, се користат мукоадхезивни хидрогелови со цел да се намали механичката и хемиската иритација, иако доказите на ниво на насоки сè уште се во развој, поновите формулации како полимеризиран крос-линк сукралфат со висока потенција покажуваат рани ветувачки резултати [5]. Од оваа категорија, постојат докази што ја оправдуваат препораката за 0,2% топичен морфиум за контрола на болката кај пациенти со КГВ што примаат конкомитантна хеморадиотерапија [5].

Факторите на раст и цитокините можат да ја стимулираат регенерацијата на клетките на оралната мукоза, спречувајќи ОМ и намалувајќи ги неговите негативни ефекти [32]. Во литературата се изучени ефектите на различни фактори, како гранулоцит-колониестимулирачки фактор (G-CSF), гранулоцитно-макрофаген колониестимулирачки фактор (GM-CSF), епидермален фактор на раст (EGF), еритропоетин (EPO), како и групата на кератиноцитни фактори на раст (KGF), меѓу кои најчесто се спомнува палифермин (KGF-1). MASCC/ISOO препорачува интравенска апликација на KGF-1 (палифермин) за превенција на ОМ кај пациенти со хематолошки малигнитети кои подлежат на автологна трансплантација на матични клетки со кондиционирање со високи дози хемотерапија и тотално зрачење на телото [5].

Природните агенси генерално се сметаат за побезбедна алтернатива во споредба со синтетичките агенси, бидејќи предизвикуваат помалку несакани ефекти, лесно се достапни и покажуваат повеќе биолошки активни својства, вклучувајќи антиинфламаторно, антиоксидативно и антимикробно дејство [79]. Овие нивни карактеристики ја прават оваа група на агенси една од најперспективните превентивни стратегии за пациенти кои се подложени на терапија против карцином. Во категоријата на природни и други агенси спаѓаат различни витамини, минерали, нутритивни суплементи, мед, раствори и билни препарати [5]. Два агенси за кои MASCC/ISOO дава препорака за употреба се орален глутамин и мед (топикално и системски) за време на хеморадиотерапија на глава и врат [5]. За другите природни агенси, доказите остануваат недоволни.

ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Имајќи го предвид значењето на оралниот мукозитис, неговото негативно влијание врз квалитетот на живот на пациентите, ограничувањето на примарната онколошка терапија и дополнителното оптоварување на здравствениот систем со зголемени трошоци за лекување и поддржувачка грижа, се наметнува потребата од истражување на терапевтски модалитети за превенција или намалување на интензитетот на ова заболување.

Целта на истражувањето беше да се утврди ефектот на неензимските антиоксиданти, врз интензитетот на орален мукозитис предизвикан од 5-флуороурацил, преку евалуација на клинички, биохемиски и патохистолошки наоди.

ЗНАЧЕЊЕ НА ИЗБОРОТ И НА ОБРАБОТКАТА НА ТЕМАТА

Значењето на темата произлегува од фактот дека ОМ е една од најтешките и најчестите токсичности на современата хемо- и/или хеморадиотерапија. Тој ја нарушува исхраната, ја зголемува подложноста на инфекции и често предизвикува прекини на онколошкиот третман, со што директно влијае врз прогнозата на пациентите. Познато е дека централна улога во патогенезата на ОМ имаат РКВ и инфламаторните медијатори, што создаде простор за делување со терапија насочена кон редукција на оксидативниот стрес. Неензимските антиоксиданти, иако едноставни по природа, имаат моќен и комплементарен механизам на дејство, при што: витаминот Ц делува како директен „чистач“ на РКВ, глутатионот обезбедува интраклеточна редокс-рамнотежа, а цинкот ги стабилизира мембраните и го модифицира ензимскиот антиоксидативен систем. Оваа јасна биолошка поврзаност помеѓу неензимските антиоксиданти, оксидативниот стрес и ОМ, ја оправда идејата за неензимските антиоксиданти да бидат евалуирани во контролирани експериментални услови.

ПРИЧИНА ЗА ИЗБОР НА ТЕМАТА

Темата беше избрана затоа што ОМ претставува реален и нерешен проблем во клиничката практика. Најчесто се третира симптоматски, без да се интервенира во основните патогенетски механизми. Од друга страна, неензимските антиоксиданти се супстанции со добро познат безбедносен профил, со широк спектар на достапност и со ниска цена. Дополнително, преку докажување на нивна ефикасност, се придонесува во базата на докази врз чијашто основа се оформуваат официјалните клинички протоколи. Во рамки на истражувачкиот интерес, постоеше и желба да се продлабочи знаењето за влијанието на неензимските антиоксиданти врз оштетувањата на плунковните жлезди предизвикани од 5-FU, бидејќи преку саливарната секреција, тие директно учествуваат во одржувањето на оралната хомеостаза и одбранбената способност на усната празнина.

ОЧЕКУВАН НАУЧЕН ПРИДОНЕС

Од истражувањето се очекува да ги надополни постојните сознанија за патогенезата на ОМ. Очекуваме да се добие појасна слика за тоа како инфламаторните медијатори и редокс-системот, со вклучување на неензимските антиоксиданти и антиоксидативните ензими, влијаат врз динамиката на оксидативниот стрес и врз текот на ОМ.

Клиничката анализа на лезиите, преку процена на нивната големина, може да покаже дали суплементацијата со неензимски антиоксиданти е поврзана со помали оштетувања на оралната мукоза. Биохемиските и патохистолошки испитувања овозможуваат дополнителен увид, од една страна во промените на редокс-хомеостазата и воспалителниот одговор, а од друга страна во морфолошките последици врз паротидната жлезда. На овој начин, се отвора можност да се разгледа и потенцијалната заштитна улога на неензимските антиоксиданти врз жлезденото ткиво, што досега ретко е предмет на анализа.

Придонесот на трудот може да се согледа и во методолошка смисла, бидејќи се оценува соодветноста на избраниот анимален модел за проучување на ОМ. Преку неговата примена се добиваат сознанија за предностите (контролирана репродукција на клиничката слика и едноставност на употреба), но и за ограничувањата кои треба да се имаат предвид во идни експериментални и клинички истражувања.

Со тоа, очекуваниот придонес се состои во интеграција на клиничките, биохемиските и патохистолошките аспекти на проблемот, проширување на знаењата за заштитната улога на неензимските антиоксиданти врз штетното дејство на 5-FU врз оралната лигавица и плунковните жлезди, како и процена на експерименталниот модел како основа за понатамошни истражувачки пристапи.

НАЦРТ НА СОДРЖИНАТА НА ТРУДОТ

- АПСТРАКТ;
- ВОВЕД;
- ПРЕГЛЕД НА ДОСТИГНУВАЊАТА ВО ДАДЕНАТА НАУЧНА ОБЛАСТ,
ПОВРЗАНИ СО ПРЕДМЕТОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕ
- ОБРАЗЛОЖЕНИЕ НА РАБОТНИТЕ ХИПОТЕЗИ И ТЕЗИ;
- ПРИМЕНЕТИ НАУЧНИ МЕТОДИ И НАЧИН НА РАБОТА;
- ДОБИЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НИВНО ЗНАЧЕЊЕ;
- ПРИМЕНА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО И МОЖНИ НАСОКИ ЗА
НАТАМОШНО ИСТРАЖУВАЊЕ;
- ЗАКЛУЧОК;
- СПИСОК НА КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.

2. ПРЕГЛЕД НА ДОСТИГНУВАЊАТА ВО ДАДЕНАТА НАУЧНА ОБЛАСТ, ПОВРЗАНИ СО ПРЕДМЕТОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕ

ОМ одамна е препознаен како една од најонеспособувачките несакани појави од онколошката терапија, особено кај пациенти кои примаат антимаболити како 5-флуороурацил (5-FU), хемотерапија во високи дози или конкомитантна хеморадиотерапија за КГВ [80]. Најголем придонес за разбирањето на механизмот на настанување на ОМ имаат истражувањата на Sonis [23,81–84], кој го предложил и опишал петфазниот биолошки модел за патогенезата на ОМ [82]. Овој модел се смета како основа на експерименталната и клиничката работа, бидејќи покажува дека оксидативниот стрес и цитокинските каскади не се секундарни појави, туку главни двигатели на мукозното оштетување.

Паралелно со збогатувањето на сознанијата за патогенетските механизми на ОМ, MASCC/ISOO (Multinational Association of Supportive Care in Cancer/ International Society of Oral Oncology), почнувајќи од 2004 година [8], континуирано [85,86] ја обновуваат и консолидираат базата на докази поврзани со ОМ, објавувајќи формални препораки за менаџирање на ОМ врз основа на податоците од околу 1200 студии [5]. Според MASCC/ISOO, најновите препораки кои се основаат на највисоко ниво на докази, при строго определени протоколи и специфични групи на пациенти, се за употребата на: фотобиомодулациона терапија, палифермин (KGF-1), орална криотерапија, бензидамин раствор за плакнење на устата, основна орална хигиена, орално администриран глутамин и мед [5]. За симптоматска терапија, доволно докази има само за локална администрација на 0.2% раствор на морфиум за плакнење на устата [5]. За останатите агенсии и превентивни модалитети, вклучувајќи ја и употребата на антиоксиданти, сè уште нема доволно докази за формални препораки, нагласувајќи ја потребата од дополнителни подобро дизајнирани истражувања и рандомизирани контролирани истражувања (РКИ). Заедно, придонесот на Sonis [23,81–84] и работата на MASCC/ISOO [5,8,85,86] ја формираат теоретската и методолошката основа, на која што се втемелуваат бројни истражувања од оваа област.

Во однос на анималните модели, Logan и сор. [87] во своето истражување ги систематизирале анималните модели за мукозитис на алиментарниот тракт, истакнувајќи го значењето на моделот на Golden Syrian хрчаци со 5-флуороурацил (5-FU) како прв експериментален обид за истражување на мукозитис индуциран од хемотерапија на животни. Кај овој модел, клиничката и хистолошката евалуација покажале промени на мукозата кои биле слични на промените забележани кај ОМ кај луѓето, при што степенот на миелосупресија кај животните дополнително влијаел врз интензитетот на лезиите. Подоцнежните модифицирани варијанти на овој модел овозможиле проучување на патофизиологијата и третманот на мукозитисот, како и на мукотоксичноста на цитостатските лекови. Shimamura и сор. [88] развиле анимален модел на глумци за ОМ кој комбинира интраперитонеална апликација на 5-FU со локална апликација на 20% оцетна киселина во букалната лигавица. Ваквиот модел овозможил објективна проценка на терапевтските ефекти на нови лекови преку мерење на големината на улцерираната површина и времетраењето на заздравувањето на лезиите, како и евалуација на безбедноста на цитостатската терапија преку следење на бројот на леукоцити. Авторите потенцираат дека моделот се одликува со висока повторливост и практичност во примената, а дополнително овозможува детални хистолошки анализи за подетално разбирање на механизмите на заздравување на улцерациите. Слично на Shimamura и сор. [88], Takeuchi и сор. [48] создале

анимален модел во кој се употребува 5-FU 40mg/kg и 25% раствор на оцетна киселина, но на стаорци. Преку анималниот модел на стаорци создале лезии со доволна големина, коишто овозможуваат квантитативна анализа на улцерациите со помош на пародонтална сонда/фотографии, како и лезии чиешто времетраење е слично на времетраењето на лезиите на ОМ кај луѓето. Покрај овие модели каде што цитостатикот се ординира во повеќе дози, постои и анимален модел на стаорци за ОМ во којшто се користи една, поголема доза (200mg/kg) на цитостатик за репродукција на лезиите [89]. Значителен придонес има и двојниот анимален модел на глвци на Mohammed и сор. [90] кој истовремено репродуцира орални и интестинални лезии, при што оштетувањето предизвикано од 5-FU било проследено со зголемување на миелопероксидазната активност, како и зголемување на нивоата на IL-1 α , IL-1 β , IL-6 и TNF. Со употреба на овој анимален модел, лезиите на ОМ настанале на 8-от ден, со максимална големина на 14-от ден, проследени со дијареа, губиток на телесната маса, како и хистолошко оштетување на тенкото црево. Резултатите од нивното истражување [90] даваат биохемиска потврда за врската помеѓу оксидативниот стрес, проинфламаторните цитокини и мукозното оштетување. Бидејќи појавата на ОМ кај овој модел [90] е слична како појавата на хемотераписки индуциран ОМ кај луѓето, овој анимален модел [90] се смета за соодветен *in vivo* претклинички модел за хемотераписки индуциран мукозитис на алиментарниот тракт.

Во останатиот дел од прегледот на достигнувањата од научната област, поврзани со предметот во оваа докторска дисертација, резултатите ќе бидат прикажани според редоследот на категориите дефинирани во упатствата на MASCC/ISOO [5]. Единствено, поради методологијата и целта на истражувањето, најпрво и најдетално ќе бидат разработени природните и другите агенсии, со особен фокус на витамин Ц, глутатион и цинк, бидејќи овие антиоксиданти се употребени за изработка на оваа докторска дисертација. Потоа, последователно ќе бидат анализирани доказите за останатите категории, и тоа: основната орална хигиена, антиинфламаторната терапија, фотобиомодулацијата, оралната криотерапија, антимикробните агенсии, заштитните агенсии, анестетиците и аналгетиците, како и факторите на раст и цитокините.

Категоријата на природни и други агенсии вклучува: витамини, минерали, нутритивни суплементи, билни препарати, пчелни производи и други соединенија со природно или комбинирано потекло, кои се испитувани како потенцијални модалитети за превенција и третман на ОМ. Витаминот Ц (аскорбинска киселина) е интензивно проучуван поради неговиот силен редокс-капацитет и централната улога во синтезата на колаген и епителната репарација (како есенцијален кофактор за пролил- и лизил-хидроксилазите и стимулатор на експресијата на колагенските гени) [91]. Al-Asmari и сор. [92] утврдиле дека кај Sprague–Dawley стаорци, 5-FU предизвикува изразено оштетување на гастроинтестиналната лигавица (гастроинтестинален мукозитис) со зголемена липидна пероксидација (MDA) и инфламаторна сигнализација, додека преттретманот со витамин Ц значајно ги ублажил овие промени, со намалени вредности на MDA, намалена активација на NF- κ B и намалена експресијата на COX-2, како и патохистолошки докажано помало оштетување. Во последователна студија, Al-Asmari и сор. [93] докажале дека витаминот Ц ги намалува и системските токсичности од 5-FU, како хепатотоксичност, повторно придружени со редукција на оксидативниот стрес и инфламаторните параметри, поткрепени со патохистолошки наоди. Chaitanya и сор. [94] спровеле клиничка студија (NCT02868151) кај

59 пациенти со орофарингеален карцином и суплементација со орално администриран витамин Ц. Контролната група без суплементација ја споредиле со групи третирани со витамин Ц кои биле на радиотерапија и хеморадиотерапија, со дози на витамин Ц од 2, 3 или 4 g/ден, започната 48 часа пред третманот. Суплементацијата не ја намалила инциденцата на ОМ кај третираните групи, но значајно ја намалила тежината на ОМ, при што терапијата со 4 g/ден витамин Ц дала најдобар ефект (пониски средни вредности и поретка појава на 4-ти степен на ОМ според WHO), со подобри резултати во групата третирана со радиотерапија, во споредба со групата третирана со хеморадиотерапија. Успешните резултати од оваа клиничка студија го потврдуваат транслациониот потенцијал на витамин Ц од анималните модели во клиничките студии, но сепак бројот на истражувања кои ја евалуираат улогата на витамин Ц во превенцијата и третирањето на ОМ е многу мал, што се потврдува преку мета-анализа од 2025 година [95].

Благодарение на улогата во бројните ензимски системи и епителната репарација, цинкот се смета за неензимски антиоксидант, иако доказите за неговата клиничка ефикасност се неконзистентни. Во превенцијата на радиотераписки мукозитис кај пациенти со КГВ, РКИ на Ertekin и сор. [96] покажало понизок степен на ОМ, подоцнежен почеток и пократко траење во групата третирана со цинк сулфат, во споредба со плацебо. Спротивно на овие резултати, Sangthawan и сор. [97] во своето двојно слепо, плацебо контролирано истражување на поголем број на испитаници, не утврдиле значајни разлики во честотата на $\geq$ G2 ОМ помеѓу групата третирана со цинк сулфат и онаа третирана со плацебо. Кај пациенти третирани со хемотераписки индуциран ОМ, неколку испитувања ја потврдуваат делотворноста на третманот со цинк сулфат. Arbab-Kalati и сор. [98] забележале понизок степен на ОМ, помала ксеростомија и помала болка кај пациентите третирани со цинк сулфат. Rambod и сор. [99] регистрирале понизок интензитет и застапеност на хемотераписки индуцираниот ОМ кај пациентите со леукемија во групата третирана со цинк сулфат, во однос на плацебо. Според најновите мета-анализи [100,101], иако се истакнува дека цинк сулфатот има потенцијал во превенцијата и третирањето на ОМ, сепак студиите кои се вклучени во мета-анализите се хетерогени и направени на мал број на испитаници, поради што утврдувањето на оптималните дози и протоколи за употреба на овој препарат, ќе зависи од идните истражувања.

Глутатионот, заедно со неговиот прекурсор глутаминот, претставува значаен сегмент од неензимскиот антиоксидативен систем [67]. Овој трипептид е најраспространетиот интраклеточен антиоксидант и игра клучна улога во одржувањето на клеточната редокс-рамнотежа [102]. Познато е дека апликацијата на 5-FU доведува до исцрпување на редуцираниот глутатион (GSH) и до нарушување на односот GSH:GSSG, што дополнително го влошува оксидативниот стрес [103]. Leitaо и сор. [104] преку анимален модел на хрчаци за ОМ индуциран од 5-FU, докажале дека оралната суплементација со глутаминот или аланил-глутамин ја забрзува регенерацијата на мукозата преку зголемување на ткивните резерви на глутатион, намалување на воспалителните параметри и забрзување на реепителизацијата. Skeff и сор. [105] примениле топикална апликација на S-нитрозоглутатион (GSNO) со хидроксипропил метилцелулоза (HPMC) на модел на хрчак за ОМ индуциран од 5-FU. Тие констатирале дека третманот со 0.5 mM HPMC/GSNO го забрзува заздравувањето на лезиите на ОМ до 14-от ден, најверојатно како резултат на неговите антиинфламаторни, антимикробни, антиапоптоични и пролиферативни ефекти.

Дополнително, било утврдено дека топикалната примена на НРМС/GSNO покрај тоа што ја поттикнува регенерацијата на мукозата, ги намалува и воспалителните параметри, ја забрзува реепителизацијата и го редуцира нивото на пародонтопатогени бактерии во улцерациите. Во клинички услови, Tsujimoto и сор. [106] спровеле двојно слепо РКИ кај пациенти со локално напреднат КГВ, третирани со конкомитантна хеморадиотерапија. Резултатите покажале дека оралната суплементација со глутамин значајно ги намалува степенот на ОМ и болката, особено во периодот од четвртата до шестата недела од терапијата, во споредба со плацебо. Сличен ефект на глутаминот се потврдува и во други студии, при што значајно е да се напомене дека неговата ефикасност зависи од дозата, формулацијата и времетраењето на ординирање [107,108]. Во 2025 година, Nassanein и сор. [109] констатирале дека суплементацијата со аргинин, како и со глутамин, значително ги подобрува квалитетот на живот, степенот на ОМ и болката кај пациенти со КГВ, третирани со радиотерапија. Сепак, постојат и студии коишто го докажуваат спротивното, т.е. дека глутаминот нема позитивен ефект врз ОМ [110]. Спротивставените ставови за делотворноста на глутаминот во превенцијата и третманот на ОМ најдобро можат да се согледаат преку две понови мета анализи [111,112], што ја нагласува потребата од дополнителни клинички испитувања со ригорозна методологија и поголем број на испитаници, со цел да се зголеми квалитетот на доказите за овој модалитет.

Медот и други природни агенси се евалуирани како потенцијални модалитети за превенција и третман на орален мукозитис (ОМ) [113]. Медот, благодарение на антибактериските и заздравувачките својства, е најистражуван [113,114]. Неколку РКИ укажуваат дека комбинирана топикална и системска примена на мед може да го намали интензитетот на ОМ кај пациенти со КГВ третирани со радиотерапија или хеморадиотерапија, што резултирало со препорака [5] за негова примена при оваа клиничка состојба [115–119]. Првичните резултатите од нова пилот-студија [120] потврдуваат дека медот ефикасно го намалува интензитетот на ОМ индуциран од хемотерапија кај деца со карцином.

Другите истражувани агенси вклучуваат: прополис [121,122], хомеопатски препарати од билни екстракти [123], камилица [124] и пробиотици [125], но поради ограниченоста на достапните докази, официјални препораки во третирањето на ОМ постојат само за медот како природен агенс [5,113].

Основната орална хигиена претставува основна превентивна стратегија за ОМ, при што MASCC/ISOO препорачуваат примена на т.н. „мултиагентски“ протоколи (четкање, чистење со забен конец, испирање со неиритирачки раствори), врз основа на конзистентни докази [126,127] за намалување на инциденцата и тежината на ОМ [128]. Кај пациенти со КГВ, истражувањата покажале дека структурираните протоколи на основна орална хигиена значајно го намалуваат степенот и времетраењето на ОМ [129,130]. Слично, кај HSCT пациенти, Worowski и сор. [131] потврдиле редукција на настанувањето и интензитетот на ОМ, а други студии укажуваат и на подобра толеранција на третманот [132]. Кај деца на хемотерапија резултатите се варијабилни: додека едно РКИ не потврди значаен ефект [133], други покажале намалување на интензитетот на ОМ и препорачуваат ВОС кај педијатриски пациенти [134,135].

Анти-инфламаторните агенси се истражувани како потенцијални модалитети за превенција и третман на ОМ поради клучната улога на проинфламаторните цитокини (TNF- α , IL-1 β) и активацијата на COX-2/NF- κ B патеката во неговата патогенеза [136,137]. Најсилни докази постојат за употребата на бензидамин како средство за плакнење на устата [5,138]. Неколку РКИ потврдиле дека бензидаминот значајно ја редуцира инциденцата и тежината на радиотераписки индуциран ОМ кај пациенти со КГВ третирани со умерени дози на радијација (<50 Gy), што резултирало со препорака за негова примена [139–141]. Дополнително, студиите на Kazemian и сор. [142] и Prada и сор. [143] потврдиле дека бензидамин има превентивен ефект и кај пациенти третирани со конкомитантна хеморадиотерапија, иако поради ограничувањата на студиите, овие студии не се земаат предвид официјалните препораки на MASSC/ISOO [144]. Rastogi и сор. [145] докажале дека бензидаминот ја намалува појавата на ОМ и при дози >50 Gy кај пациенти третирани со радиотерапија, но не и кај оние со хеморадиотерапија. Chitapanarux и сор. [146] утврдиле дека употребата на бензидамин за превенција на ОМ предизвикан од хеморадиотерапија е поефикасна, во споредба со употребата на бикарбонатен раствор. Покрај бензидаминот, евалуирана е ефикасноста и на други анти-инфламаторни агенси за превенција и третман на ОМ, но резултатите се ограничени и неконзистентни [147–152].

Фотобиомодулацијата (PBM) е најистражуваниот нефармаколошки модалитет за превенција на ОМ, со конзистентни податоци од повеќе РКИ [153,154]. Кај пациенти со КГВ третирани со радиотерапија, терапијата со He-Ne ласер (632.8 nm) резултирала со значајно намалување на појавата и интензитетот на ОМ [155]. Слични резултати потврдуваат и други истражувања со употреба на диоден ласер на бранова должина од 660 nm, при што кај третираниите пациенти болката била значително помала и поретко се појавувал ОМ од трет и четврти степен [156]. Antunes и сор. [157,158] спровеле две големи РКИ кај пациенти со КГВ, третирани со конкомитантна хеморадиотерапија и докажале дека превентивната фотобиомодулација го намалува интензитетот на ОМ и го подобрува квалитетот на живот, а воедно, регистрирана е и поврзаност со степенот на преживување на пациентите со КГВ. Во друго истражување, кај пациенти подложени на HSCT, Antunes и сор. [159] користеле InGaAlP ласер (660 nm, 4 J/cm² по точка) и регистрирале значително намалување на ризикот за голем интензитет на ОМ, т.е. регистрирале ОМ ≤ 2 степен кај 94.7% од пациентите, од кои кај 63.2% интензитетот бил 0 или 1 според скалата на C3O. Ferreira и сор. [160] спровеле двојно слепо РКИ со 650 nm диоден ласер и утврдиле дека фотобиомодулацијата значајно ги намалува интензитетот на ОМ и болката, во споредба со групата третирана со плацебо ласер. Делотворноста на фотобиомодулацијата кај ОМ е потврдена и на анимален модел на хрчаци [161]. Врз основа на упатствата на MASCC/ISOO, постои јасна препорака за употребата на фотобиомодулација во превенција на ОМ кај три различни групи на пациенти: пациенти кај кои ќе се прави трансплантација на хематопоетски матични клетки (HSCT), пациенти со КГВ третирани со радиотерапија и пациенти со КГВ на конкомитантна хеморадиотерапија [5].

Оралната криотерапија претставува едноставен и евтин метод што делува преку вазоконстрикција и редукција на локалната температура, со што се ограничува акумулацијата на цитостатици во мукозата и се намалува клеточниот метаболизам [72]. Кај

пациенти подложени на автологна HSCT со висока доза мелфалан, неколку РКИ покажале значајно намалување на настанувањето, интензитетот и болката поврзана со ОМ [162–164]. Други истражувања утврдиле дека криотерапијата, во комбинација со или без специфичен протокол за орална хигиена значително ги намалува болката и интензитетот на ОМ, во споредба со контролната група третирана само со физиолошки раствор [165–169].

Кај пациенти со солидни тумори кои примаат болус 5-FU, постојат силни докази од повеќе РКИ дека 30-минутна криотерапија за време на инфузијата значајно ја намалува тежината на ОМ, особено на 7-миот и 14-тиот ден по апликацијата [170–175]. Студија која ги споредувала различните траења на криотерапија заклучила дека продолжената апликација од 60 минути не носи дополнителна корист во споредба со 30 минути [176].

Кај пациенти со H&N радиотерапија, достапните докази се ограничени. Едно РКИ не потврди редукција на ОМ, а пациентите во групата со криотерапија пријавиле и поголема непријатност и болка [177], што се потврдува и со докази од поновата литература [72,178].

Еден систематски преглед [72] и две мета-анализи [179,180], вклучувајќи и Cochrane преглед, ги потврдуваат овие наоди, заклучувајќи дека криотерапијата е ефикасна кај пациенти со HSCT со висока доза мелфалан и кај пациенти со болус 5-FU за цврсти тумори, со дополнителна корист во редукцијата на потребата за парентерална исхрана и должината на хоспитализација.

Сукралфатот е еден од првите агенси испитувани за ОМ, благодарение на неговите цитопротективни и заштитни својства за мукозата [181]. Сепак, повеќе РКИ кај пациенти со КГВ третирани со радиотерапија не покажале значајна редукција на настанувањето или интензитетот на ОМ [182–186]. Слични резултати се добиени и кај ОМ предизвикан од хемотерапија, вклучително 5-FU [187,188]. Иако постојат поединечни позитивни извештаи [189], релевантните извори не потврдуваат клиничка корист [5].

За разлика од сукралфатот, опиоидите за локална апликација покажуваат многу подобри резултати [190]. Cerchiatti и сор. [191] докажале дека исплакнување на устата со 0.2% раствор на морфиум, значајно ја намалува болката кај пациенти со хеморадиотерапија, што се потврдува и преку подоцнежни РКИ [192,193]. Всушност, MASCC/ISOO [5] препорачуваат 0.2% раствор на морфиум за третирање на болката предизвикана од ОМ.

Фентанилот исто така е проучуван во неколку студии кои покажуваат значајно намалување на болката предизвикана од ОМ [194,195]. Сепак, поради хетерогеноста на методологијата и малиот број на испитаници, доказите не се доволни за формална препорака.

Факторите на раст играат централна улога во модулацијата на воспалителните и регенеративните процеси во оралната мукоза [196]. Најдетално проучен е кератиноцитниот фактор на раст (KGF-1, палифермин), кој преку своето митогено дејство на епителните и ендотелните клетки, како и на фибробластите, го одржува интегритетот на мукозната бариера [197]. Неколку РКИ покажале дека интравенската примена на палифермин значајно ги намалува појавата и интензитетот на ОМ кај пациенти со хематолошки малигнитети, третирани со високи дози на хемотерапија и тотално зрачење на телото, следени со автологна трансплантација на хематопоетски матични клетки [198,199]. Дополнително, Lucchese и сор. преку две РКИ кај педијатриски пациенти потврдиле сличен превентивен ефект на палифермин [200,201]. Две РКИ ги анализирале ефектите на палифермин кај пациенти со КГВ, третирани со хеморадиотерапија, при што утврдиле статистички значајно

намалување на степенот на ОМ при третман со палифермин., но без клинички релевантни придобивки во поглед на болката, прекини на терапијата или самопријавени исходи [202,203]. Сепак, ефектот не е конзистентен во сите истражувања. Blijlevens и сор. [204] докажале дека палиферминот не ги намалува интензитетот и степенот на ОМ кај пациенти со мултипен миелом, третирани со висока доза мелфалан.

Други фактори на раст, како гранулоцитниот (G-CSF) и гранулоцит-макрофаг факторот (GM-CSF), иако биолошки промовираат пролиферација и заздравување на мукозата, покажуваат контрадикторни резултати. Кај G-CSF постојат мали РКИ со нејасни или негативни резултати во превенцијата на ОМ [205,206]. Кај GM-CSF, повеќе студии откриле дека топикалната апликација не ја намалува ниту фреквенцијата ниту времетраењето на ОМ кај пациенти подложени на трансплантација на матични клетки [207], што резултира со препорака против неговата примена во оваа клиничка поставка [196].

Епидермалниот фактор на раст (EGF) исто така е проучуван, со неколку РКИ коишто укажуваат на можен ефект во скратување на времетраењето или интензитетот на ОМ, но доказите се ограничени и без можност за официјални препораки [208,209]. Слично, топикалната примена на еритропоетин (EPO) во форма на раствор за плакнење на уста, значајно го намалила појавувањето и времетраењето на ОМ кај пациенти подложени на автологна HSCT [210], но поради недостиг на понатамошни студии, препорака сè уште не е можно да се даде [196].

Хистопатолошките истражувања обезбедуваат дополнителни и исклучително значајни докази кои се поткрепа на клиничките и биохемиските истражувања. Vomfin и сор. [211] индуцирале ОМ со 5-FU кај хрчаци, при што забележале изразена вакуолизација на паротидните ацинуси и перидуктален едем во субмандибуларната жлезда, придружени со зголемена инфилтрација на воспалителни клетки. Количеството на излачена стимулирана плунка значајно се намалило на четвртиот ден, а се зголемила активноста на SOD. Оксидативниот стрес бил најнагласен на 10-от ден, со претпоставка дека истиот придонесува за хипофункција на плунковните жлезди, како и промени во составот и количеството на излачена плунка. Кај модел на стаорци [212], 5-FU предизвикувал изразени хистолошки оштетувања во паротидната жлезда, како што се: спојување на серозните ацинуси, пикнотични јадра, вакуолизација, десквамација на епителот на вметнатите одводни каналчиња, конгестија на крвните садови, густа инфламаторна инфилтрација и широки простори помеѓу ацинусите. Овие промени биле поврзани со биохемиски нарушувања: зголемување на MDA, NOx, TNF- α и IL-1 β , како и намалување на SOD и GSH. Во ова истражување [212], групата третирана со фебуксостат и 5-FU го задржала нормалниот жлезден паренхим на паротидната плунковна жлезда, со парцијална васкуларна конгестија и вакуолизација. Harada и сор. [213] го евалуирале ефектот на елементална исхрана богата со глутамин во намалување на штетните ефекти на 5-FU врз плунковните жлезди, особено нивната атрофија. Резултатите покажале дека големината на плунковните жлезди била намалена во групите третирани само со 5-FU, при што била намалена и експресијата на субединицата 4 на цитохром ц оксидаза и епидермалниот фактор на раст и бил присутен поголем број на апоптотични клетки. Овие резултати укажуваат на тоа дека ординирањето на елементална исхрана богата со глутамин може да ја намали атрофијата на плунковните жлезди кај глумците, воедно намалувајќи ја ксеростомијата и интензитетот на ОМ. Ефектот на камилицата бил анализиран во истражувањата на Pavesi и сор. [214] и Curra и сор. [215] кои утврдиле поретка појава и хистолошки докажан помал интензитет на 5-FU индуциран ОМ кај хрчаци, со намалени нивоа на TNF- α и IL-1 β . Овие наоди укажуваат дека

оштетувањата на плунковните жлезди предизвикани од 5-FU се проследени и со промена во биохемиските параметри, т.е. зголемување на инфламаторните медијатори и MDA, како и намалување на активноста на одредени ензими. Оваа поврзаност ја оправдува комбинираната примена на хистолошки и биохемиски показатели во транслационите студии со цел подобра евалуација на терапевските модалитети за превенција на штетните ефекти на 5-FU врз плунковните жлезди.

3. ОБРАЗЛОЖЕНИЕ НА РАБОТНИТЕ ХИПОТЕЗИ И ТЕЗИ

Генерална (општа) хипотеза на истражувањето: Постои разлика, во интензитетот на оралниот мукозитис предизвикан од хемотерапија, кога таа е дополнета со антиоксиданти и интензитетот на оралниот мукозитис предизвикан од хемотерапијата без ординирање на антиоксиданти.

Дополнителни (или посебни) хипотези во истражувањето ќе бидат:

- Оралниот мукозитис се манифестира со помали лезии кога хемотерапијата е дополнета со давање на антиоксиданти;

- Инфламаторниот одговор како последица на оралниот мукозитис е со поголем интензитет кога хемотерапијата не е дополнета со антиоксиданти;

- Антиоксидативните ензими покажуваат поголема активност кога хемотерапијата е дополнета со антиоксиданти;

- Нивото на оксидативниот стрес е повисоко, кога хемотерапијата се ординира без дополнување со антиоксиданти;

- Патохистолошките промени во паренхимот на паротидната плунковна жлезда се со поголем интензитет, кога хемотерапијата се ординира без дополнување со антиоксиданти.

Образложението на работните хипотези и тези се темели на современите сознанија дека патогенезата на хемотераписки индуцираниот орален мукозитис е тесно поврзана со нарушување на рамнотежата на редокс-системот, прекумерна продукција на РКВ и последователна активација на инфламаторни каскади. Познато е дека неензимските антиоксиданти имаат потенцијал да ја стабилизираат редокс-хомеостазата преку директна неутрализација на РКВ, делување врз активноста на антиоксидативните ензими и модулација на клеточната сигнализација.

4. ПРИМЕНЕТИ НАУЧНИ МЕТОДИ И НАЧИН НА РАБОТА

Материјали кои беа употребени во истражувањето се:

- Wistar стаорци;
- Физиолошки раствор;
- Цитостатик (5-флуороурацил);
- Воден раствор на оцетна киселина;
- Витамин С;
- Глутатион;
- Цинк сулфат;
- Сонда за гаважа;
- Шприцеви и игли;
- Микроцентрифугални туби;
- Колекторни туби за серум и плазма со антикоагулант;
- Стерилни флакони;
- Пипетори и наставци за пипетори;
- Пародонтална сонда и стоматолошки лупи;
- Натриум пентобарбитал;
- Кетамин;
- Мидазолам;
- Хематолошки анализатор;
- ELISA китови и ELISA читач;
- Реагенси за биохемиски анализи и спектрофотометар;
- Скалпел и хируршки ретрактори;
- Формалин;
- Опрема за подготовка на хистолошки препарати (ткивен процесор, етанол, ксилен, парафин, водена бања, инкубатор, монтажен медиум);
- Микроскоп со камера и
- Компјутер и софтвер за статистичка анализа на податоците (IBM SPSS Statistics v24).

Етички аспекти

За реализација на поставената цел беше користен анимален модел на стаорци за орален мукозитис индуциран со 5-флуороурацил [48]. Овој модел овозможува создавање на орални лезии со соодветна големина и времетраење за целите на истражувањето. Овие карактеристики на анималниот модел, создаваат услови за едноставна евалуација на ефектот на употребените антиоксиданти врз интензитетот на оралниот мукозитис. Истражувањето беше спроведено на Институтот за биологија на Природно математичкиот факултет – Скопје, како и Лабораторијата за патологија и патохистологија на Ветеринарниот институт во состав на Факултетот за ветеринарна медицина – Скопје на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје. Експериментот траеше 34 дена, а истиот започна по одобрување од страна на Етичката комисија на Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Стоматолошки факултет – Скопје (02-284/2), како и по добивање на Одобрение за изведување на истражување со животни од страна на Агенцијата за храна и ветеринарство на Република Северна Македонија (10-3338/8), во согласност со Меѓународните водечки принципи за биомедицински истражувања кои вклучуваат животни, утврдени од Советот за меѓународни организации за медицински науки (ЕЕС директива од 1986; 86/609/ЕЕС).

Животни

Во истражувањето беа вклучени 40 машки Wistar стаорци (согласно концептот 3Rs – Replacement, Reduction, Refinement [216]), стари 9 недели, со тежина од 250 до 400g (300.4 ± 38.6 g) од Лабораторијата за одгледување на експериментални животни на Природно-математичкиот факултет – Скопје. Стаорците беа чувани во контролирани услови, вклучувајќи температура од $25 \pm 2^\circ\text{C}$, релативна влажност од $55 \pm 10\%$, како и 12-часовен деноноќен циклус. Стандардната исхрана на стаорците се состоеше од пелети кои се состојат од 20% протеини, 30% јаглехидрати, 9% масти, 2.5% целулоза и 10% вода, со енергетска вредност од 310kcal и слободен пристап до вода.

Цитостатик

Цитостатик кој се употреби во истражувањето беше 5-флуороурацил, 40mg/kg [$\geq 99\%$ (HPLC) 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO 63103, USA)], инјектиран интраперитонеално. Беше подготвен раствор на 5-FU со концентрација 40mg/ml, кој се аплицираше во волумен од 0.1ml на 100g телесна маса.

Средство за предизвикување на лезија

25 μL 25% воден раствор на оцетна киселина (Alkaloid AD Skopje, Skopje, Republic of North Macedonia), инјектиран во левата букална лигавица.

Неензимски антиоксиданти

Како неензимски антиоксиданти, поединечно или комбинирани, со гаважа беа ординирани: Vitamin C (8mg/kg телесна маса) (Galenika a.d., Belgrade, Serbia), плутатион (4mg/kg телесна маса) (NOW Sports – Nutrition and Wellness, Bloomingdale, Illinois 60108, USA) и цинк сулфат (40mg/kg телесна маса) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO 63103, USA).

Анестетици

За евалуација на големината на лезиите животните беа анестезирани со натриум пентобарбитал (50mg/kg i.p.) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). За пожртвување на животните беа употребени кетамин (80mg/kg i.p.) (VEM İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., Çerkezköy, Tekirdağ, Turkey) и мидазолам (5mg/kg i.p.) (AS Kalceks, Rīga, Latvia).

Биохемиски анализи

TNF- α - Серумските концентрации на тумор некротизирачки фактор-алфа (TNF- α) беа определени со сендвич ELISA метод, користејќи комерцијален кит (Human TNF- α ELISA Kit, RAB0476, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Методот се темели на специфична врзувачка реакција антиген–антитело и овозможува високосензитивна и репродуцибилна квантитативна анализа. Серумските примероци и стандардите со позната концентрација беа нанесени во микроплоча обложена со антитело против TNF- α , што овозможува селективно врзување на цитокинет од примерокот. По инкубација и миене за елиминација на неврзани молекули, беше додадено биотинилирано второ антитело за создавање на сендвич комплекс, а потоа HRP-стрептавидин. Во овој чекор ензимот horseradish пероксидаза (HRP) се врзува за комплексот преку биотинот и овозможува ензимска детекција. По дополнително миене се аплицираше ТМБ супстрат (HRP супстрат), кој под дејство на HRP се претвора во обоен продукт, пропорционален на количината на TNF- α . Реакцијата беше стопирана со стоп-раствор, а апсорбанцата беше измерена на 450 nm со читач на микроплочи. Концентрациите беа пресметани преку стандардна крива со сериски разредувања, изразени во pg/mL. Најниската концентрација којашто може да ја детектира овој кит е 30 pg/mL, со intra-assay варијабилност <10% и inter-assay варијабилност <12%, што гарантира висока прецизност и репродуцибилност. Точноста на методата е 94.5% за серум, а линеарноста е потврдена преку серија разредувања, со добиени резултати во рамките на очекуваните вредности, што обезбедува сигурна квантитативна анализа и кај ниски и кај високи концентрации. Специфичноста е верифицирана со тестирање на широк спектар други цитокини и хемокини, при што не е забележана вкрстена реактивност, што дополнително ја потврдува валидноста на методот за селективно мерење на TNF- α .

IL-1 β - Серумските концентрации на IL-1 β беа определени со идентична методологија како и TNF- α , користејќи комерцијален кит (Human IL-1 β ELISA Kit, RAB0273, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Овој кит е со значително повисока чувствителност, со минимално детекциско ниво од 0,3 pg/mL и опсег на стандардна крива од 0 до 100 pg/mL. Прецизноста е потврдена со intra-assay варијабилност <10% и inter-assay варијабилност <12%. Методот има докажана линеарност и паралелност на разредувањата, како и recovery во рамките на 85–115%, што обезбедува висока точност на мерењето. Специфичноста е потврдена со испитување на повеќе сродни цитокини и хемокини (IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , VEGF и други), без забележана вкрстена реактивност. Стабилноста на IL-1 β во примероците е задржана и по повеќекратно замрзнување и одмрзнување, што ја

гарантира валидноста на резултатите. Со овие карактеристики, методот е особено погоден за сигурна детекција на ниски концентрации на IL-1 β во серумот, што е од значење при анализа на хронични и субклинички воспалителни состојби.

MDA - Нивото на MDA, како показател за липидна пероксидација и оксидативен стрес, беше определено според модифицирана метода на Yagi [217]. Методата се заснова на реакцијата на MDA и сродни алдехиди со тиобарбитурна киселина (ТВА) во кисела средина, при што се формира розево обоен комплекс чиј интензитет е пропорционален на концентрацијата на MDA во примерокот. Серумските примероци најпрво беа обработени со трихлороцетна киселина (ТСА) за преципитација на протеините и елиминација на други интерферирачки супстанции. Потоа, добиените супернатанти беа инкубирани со ТВА во присуство на сулфурна киселина и инкубирани на 95°C, со што се формираше стабилен обоен продукт. Интензитетот на бојата беше спектрофотометриски измерен на 535nm. За изработка на стандардна крива беше користен стандардот 1,1,3,3-тетраетокси пропан (ТЕР), кој во кисела средина ослободува MDA. Резултатите беа изразени во mmol/L крвен серум.

SOD - Активноста на SOD беше определена според методата на Marklund и Marklund [218], која се заснова на инхибиторниот ефект на ензимот врз автооксидацијата на пирогалол. Во алкална средина пирогалолот лесно се автооксида, при што се создаваат супероксид радикали (O₂^{-•}), а реакцијата (создавањето на супероксидните радикали) се следи преку зголемување на апсорбанцата на 420nm. Присуството на SOD го катализира дисмутирањето на супероксидот во водород пероксид и кислород, со што се намалува брзината на автооксидацијата (побавен раст на апсорбанцата). За изведување на анализата беше користен Tris пуфер за одржување на алкална pH средина, додека диетилентриаминпентаоцетна киселина (DETA PAC) беше додадена како хелатор на метални јони со цел да се спречи нивното интерферирање во реакцијата. Автооксидацијата на пирогалолот беше иницирана со додавање на супстратот во реакциската смеса, а промената на апсорбанцата беше следена кинетички на бранова должина од 420 nm (25°C), во период од три минути. Една единица SOD активност беше дефинирана како количина на ензим што предизвикува 50% инхибиција на брзината на автооксидацијата на пирогалолот во дадените услови. Резултатите беа изразени во kU/mg протеин.

GR – Активноста на GR беше определена спектрофотометриски според методата на Racker [219], заснована на редукција на оксидираниот глутатион (GSSG) во присуство на NADPH. GR го катализира трансферот на водород од NADPH кон GSSG, при што се формира редуциран глутатион (GSH), а NADPH се оксидира во NADP⁺. Промената на реакцијата се следи преку намалување на апсорбанцата на NADPH на 340 nm, кое е пропорционално на активноста на GR. Реакциската смеса беше составена од 0,1 M фосфатен пуфер (pH 7,6), NADPH во концентрација 0,1 mM и GSSG како супстрат. По додавање на примерокот, апсорпцијата на 340 nm беше следена континуирано во тек на 3 минути на 30°C. Една единица на активност на GR беше дефинирана како количина на ензим што катализира оксидација на 1 μ mol NADPH во минута, при горенаведените услови. Резултатите беа изразени во kU/mg протеин.

CAT – Активноста на CAT беше определена спектрофотометриски според методата на Goth [220], која се заснова на разградбата на водород пероксид (H₂O₂) од страна на ензимот до вода и кислород. Најпрво, серумските примероци беа инкубирани со H₂O₂ во фосфатен пуфер, при што CAT од примерокот делумно го разгради H₂O₂. По 3 минути,

реакцијата беше прекината со додавање на амониум молибдат, кој веднаш реагира со преостанатиот H_2O_2 и формира жолтеникав стабилен комплекс. Интензитетот на бојата беше измерен спектрофотометриски на 405 nm и е обратно пропорционален на активноста на САТ, т.е. колку е повисока ензимската активност, толку помалку H_2O_2 останува за да реагира со молибдатот и апсорбанцата е послаба. Активноста на ензимот беше дефинирана како количина на каталаза која катализира разградба на 1 μmol H_2O_2 во минута при стандардни услови. Резултатите беа изразени во kU/mg протеин.

Патохистолошка анализа

Во рамките на истражувањето беа испитувани мостри од паротидната плунковна жлезда. Ткивата беа фиксирани најмалку 48 часа во 10% неутрален формалдехиден раствор (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), со цел зачувување на морфолошката структура. По фиксацијата, мострите беа исечени на соодветни делови за да бидат опфатени и серозниот паренхим и сврзното ткиво. Подготвените исечоци беа поставени во пластични корпици и автоматски процесирани (Leica TP1020; Leica Biosystems, Nussloch, Germany) преку серија на растечка концентрација на етанол ($\geq 99.8\%$; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), потопување во замена за ксилол (Neo-Clear®; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) и финално во стопен парафин (Paraplast Plus; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

По процесирањето, ткивата беа вградени во парафински блокови. Прво беше изведен триминг (6–9 μm) за отстранување на вишокот парафин и добивање на рамномерна површина, а потоа се добиваа пресеци со дебелина од 3 μm за хистолошка анализа. Пресеките беа распнувани во водена бања (Leica HI1210, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) на 50°C, поставувани на предметни стакленца и сушени еден час на 60°C во инкубатор (Heratherm™ incubator; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), за да се обезбеди нивно цврсто прилепување и да се спречи отпаѓање при бојење.

Бојењето беше изведено со хематоксилин и еозин (H&E). Постапката вклучуваше дехидратација преку серија алкохоли со опаѓачка концентрација, јадрено бојење со хематоксилин, испирање во проточна вода, контрастно бојење со еозин и последователна повторна дехидратација со алкохоли со растечка концентрација. На крај, препаратите беа прочистени во ксилен (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) и монтирани со покровни стакленца и NeoMount (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). По подготовка на препаратите беше направена нивна описна анализа.

Микроскопските анализи беа извршени со светлосен микроскоп (Leica DM500) опремен со дигитална камера (Leica ICC50 W; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Експериментален дизајн

Стаорците беа поделени во 5 групи:

1. Негативна контролна група која беше третирана само со физиолошки раствор (Г1);
2. Позитивна контролна група, кај која беше предизвикана лезија со 5-FU и оцетна киселина, меѓутоа не беше третирана со антиоксиданти (Г2);
3. Испитувана група кај која беше предизвикана лезија со 5-FU и оцетна киселина, а беше третирана со Vitamin C и глутатион (Г3);
4. Испитувана група кај која беше предизвикана лезија со 5-FU и оцетна киселина, а беше третирана со цинк сулфат (Г4) и
5. Испитувана група кај која беше предизвикана лезија со 5-FU и оцетна киселина, а беше третирана со комбинација од претходно наведените средства: Vitamin C, глутатион и цинк сулфат (Г5).

Пред почетокот на експериментот и на крајот од експериментот, беше измерена телесната маса и телесната температура (ректално) на животните.

Администрирањето на антиоксидантите (Г3-Г5) започна 14 дена пред аплицирањето на првата доза на цитостатик. Цитостатикот беше аплициран на 15-от, 17-от и 19-от ден од експериментот. Еден ден по аплицирањето на последната доза на 5-флуороурацилот, поточно на 20-от ден, под дејство на анестезија, беше аплициран воден раствор на оцетна киселина во левата букална лигавица на стаорците, со цел предизвикување на лезијата. На истиот ден беше утврдено постигнувањето на имуносупресија преку стандардна анализа на крв, земена од опашката на стаорецот, со помош на хематолошки анализатор (Sysmex KX-21N; Sysmex Corporation, Kobe, Japan), преку евалуација на нивото на леукоцитите во крвта. Според анималниот модел [48] кој го користевме, овие чекори беа неопходни со цел постигнување на имуносупресија и површинско оштетување на букалната лигавица, неопходно за создавање на лезиите потребни за целите на истражувањето. Улцерациите предизвикани на овој начин со 5-флуороурацил и раствор на оцетна киселина перзистираат од 13 до 16 дена, што е слично на перзистирањето на лезиите на ОМ, т.е. во просек 14 дена [48]. Под дејство на анестезија, лезиите беа следени од 21-от ден, сè до просечното време за комплетна епителизација на лезиите на ОМ, т.е. 14 дена. Анализата на лезиите беше направена со помош на пародонтална сонда и стоматолошки лупи, 24 часа по аплицирање на оцетната киселина, а потоа на секои 2 дена до крајот на експериментот. Експериментот траеше 34 дена, а на 34-от ден, животните беа пожртвувани под дејство на кетамин и мидазлам, со цел добивање доволно количество на крв за определување на биохемиските параметри (TNF- α , IL-1 β , MDA, SOD, GR и CAT), како и екстракција на паротидните жлезди со цел спроведување на патохистолошка анализа. Серумските примероци беа добиени со пункција на vena cava inferior кај анестезираните животни, по што крвта (0,4–1,0 mL по животно) беше центрифугирана, а изолираниот серум замрзнат на -20°C до денот на анализа. Непосредно по колекционирањето на крвта, од стаорците беше отстранета левата паротидна жлезда. Примероците од паротидните жлезди, презервирани во формалин, веднаш беа пренесени до Лабораторијата за патологија и патохистологија на Ветеринарниот институт во состав на Факултетот за ветеринарна медицина – Скопје, во состав на Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, каде беа процесирани и анализирани.

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.

Shapiro-Wilk W тестот беше употребен за определување на нормалноста на дистрибуцијата на фреквенциите на параметрите.

ANOVA тестот и Kruskal-Wallis тестот беа употребени за споредба на повеќе од две независни групи на примероци. При утврдување на статистички значајна разлика со овие тестови, како post-hoc тестови беа употребени Tukey и Dunn тестовите.

Repeated measures ANOVA тестот беше употребен за анализа на разликите во повеќекратни мерења кај истиот примерок, во различни временски интервали или услови.

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. ДОБИЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НИВНО ЗНАЧЕЊЕ

Истражувањето вклучи 40 машки стаорци од сојот Wistar, стари 9 недели, со тежина од 250 до 400g (300.4 ± 38.6 g). Во согласност со анималниот модел кој го користевме [48], стаорците беа третирани 14 дена со антиоксиданти. Потоа, на 15-от, 17-от и 19-от ден беше ординиран цитостатик, а на 20-от ден беше предизвикана лезија со помош на воден раствор на оцетна киселина.

Во рамките на истражувањето, анализираните параметри беа систематизирани во четири категории.

Првата категорија опфати општи здравствени индикатори, вклучувајќи телесна температура, телесна маса и имуносупресија, со цел следење на општата здравствена состојба на експерименталните животни.

Втората категорија се однесуваше на клиничките параметри, претставени преку мерењето на големината на лезијата како директен показател за текот на болеста.

Третата категорија ги опфати биохемиските параметри: TNF- α , IL-1 β , MDA, SOD, GR и CAT, со цел проценка на воспалителниот одговор, оксидативниот стрес и антиоксидативниот статус.

Четвртата категорија се однесуваше на патохистолошката анализа, која вклучуваше описна евалуација на ткивните промени на паротидната плунковна жлезда.

Оваа поделба овозможи резултатите да се прикажат систематски и понатаму да се дискутираат во согласност со нивната биолошка и клиничка релевантност. Во продолжение се презентирани наодите за секоја од категориите посебно.

5.1 Анализа на општите здравствени индикатори

Анализата на општите здравствени индикатори се однесуваше на телесната маса и телесната температура, пред започнување на експериментот (Т1) и на крајот од експериментот (Т2), како и на имуносупресијата, проследена преку белите крвни клетки, 5 дена по аплицирање на првата доза на цитостатик.

5.1.1 Анализа на телесната маса

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за телесната маса пред започнување на експериментот (Т1; $W=0.907$; $p=0.035$) укажа на постоење на правилна дистрибуција, додека на крајот од експериментот (Т2; $W=0.953$; $p=0.336$) укажа на постоење на неправилна дистрибуција. Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни параметарски и непараметарски тестови.

Табела 1: Анализа на телесната маса пред започнување на експериментот (Т1) и на крајот од експериментот (Т2)(g)

Група	Т1 (почеток)			Т2 (крај)		
	Mean $\pm$ SD (g)	Min-Max	Median (IQR)	Mean $\pm$ SD (g)	Min-Max	Median (IQR)
Г1	309 $\pm$ 16.88	284–332	313.50 (293.50–321.00)	313.25 $\pm$ 18.96	279–336	315.00 (303.00–327.50)
Г2	300.5 $\pm$ 35.22	265–372	294.00 (272.00–317.50)	306.88 $\pm$ 50.21	221–382	297.50 (288.00–340.50)
Г3	285.9 $\pm$ 22.11	260–320	281.50 (269.00–303.00)	308.38 $\pm$ 26.80	259–337	314.00 (294.00–327.50)
Г4	310.38 $\pm$ 44.9	247–385	305.00 (283.00–337.50)	320.00 $\pm$ 31.09	273–367	314.50 (301.00–344.50)
Г5	305 $\pm$ 49.74	254–406	284.50 (273–332.50)	319.38 $\pm$ 41.17	260–389	309.00 (295.50–348.50)
One-way ANOVA: $F(4, 35) = 0.6$, $p = 0.665$				Kruskal–Wallis test: $\chi^2(4) = 0.792$; $p = 0.939$		

Кај Г1, телесната тежина на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 309.00 ± 16.88 g, со најниска вредност од 284 g и највисока вредност од 332 g. Кај 50% од животните од Г1, телесната тежина пред експериментот беше помала од 313.50 g, за Median IQR = 313.50 (293.50–321.00) (Табела 1).

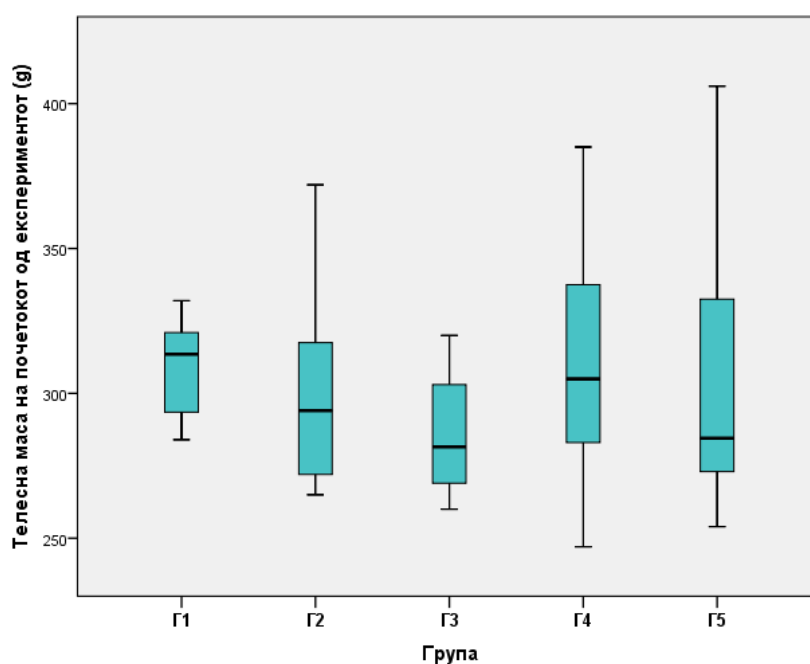
Кај Г2, телесната тежина на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 300.50 ± 35.22 g, со најниска вредност од 265 g и највисока вредност од 372 g. Кај 50% од животните од Г2, телесната тежина пред експериментот беше помала од 294.00 g, за Median IQR = 294.00 (272.00–317.50) (Табела 1).

Кај Г3, телесната тежина на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 285.88 ± 22.11 g, со најниска вредност од 260 g и највисока вредност од 320 g. Кај 50% од животните од Г3, телесната тежина пред експериментот беше помала од 281.50 g, за Median IQR = 281.50 (269.00–303.00) (Табела 1).

Кај Г4, телесната тежина на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 310.38 ± 44.90 g, со најниска вредност од 247 g и највисока вредност од 385 g. Кај 50% од животните од Г4, телесната тежина пред експериментот беше помала од 305.00 g, за Median IQR = 305.00 (283.00–337.50) (Табела 1).

Кај Г5, телесната тежина на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 305.00 ± 49.74 g, со најниска вредност од 254 g и највисока вредност од 406 g. Кај 50% од животните од Г5, телесната тежина пред експериментот беше помала од 284.50 g, за Median IQR = 284.50 (273.00–332.50) (Табела 1).

Согласно анализата направена со ANOVA, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во Т1 ($F(4, 35) = 0.6, p = 0.665$) (Табела 1, Графикон 1).



Графикон 1: Разлики во телесната маса пред започнување на експериментот (Т1) помеѓу групите

Кај Г1, телесната тежина на животните на крајот од експериментот изнесуваше 313.25 ± 18.96 g, со најниска вредност од 279 g и највисока вредност од 336 g. Кај 50% од животните од Г1, телесната тежина на крајот од експериментот беше помала од 315.00 g, за Median IQR = 315.00 (303.00–327.50) (Табела 1).

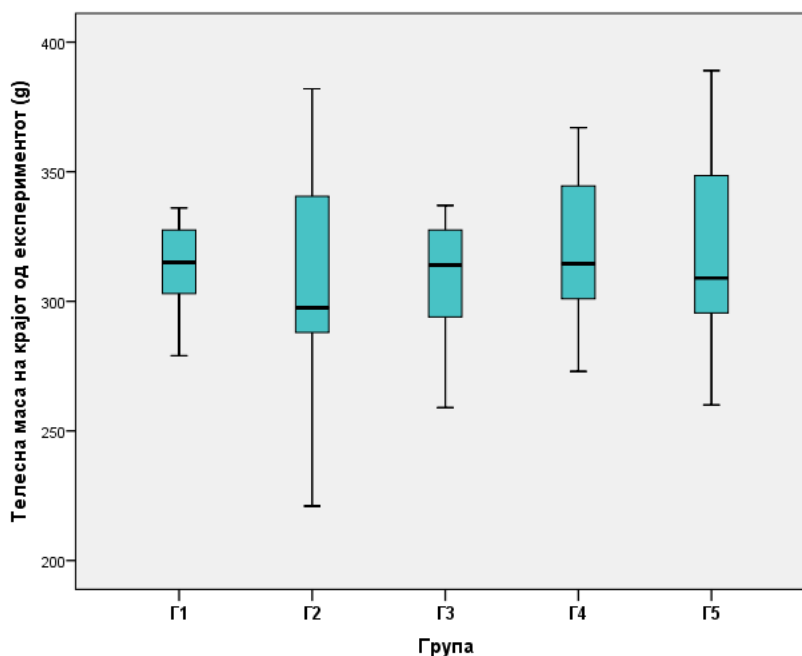
Кај Г2, телесната тежина на животните на крајот од експериментот изнесуваше 306.88 ± 50.21 g, со најниска вредност од 221 g и највисока вредност од 382 g. Кај 50% од животните од Г2, телесната тежина на крајот од експериментот беше помала од 297.50 g, за Median IQR = 297.50 (288.00–340.50) (Табела 1).

Кај Г3, телесната тежина на животните на крајот од експериментот изнесуваше 308.38 ± 26.80 g, со најниска вредност од 259 g и највисока вредност од 337 g. Кај 50% од животните од Г3, телесната тежина на крајот од експериментот беше помала од 314.00 g, за Median IQR = 314.00 (294.00–327.50) (Табела 1).

Кај Г4, телесната тежина на животните на крајот од експериментот изнесуваше 320.00 ± 31.09 g, со најниска вредност од 273 g и највисока вредност од 367 g. Кај 50% од животните од Г4, телесната тежина на крајот од експериментот беше помала од 314.50 g, за Median IQR = 314.50 (301.00–344.50) (Табела 1).

Кај Г5, телесната тежина на животните на крајот од експериментот изнесуваше 319.38 ± 41.17 g, со најниска вредност од 260 g и највисока вредност од 389 g. Кај 50% од животните од Г5, телесната тежина на крајот од експериментот беше помала од 309.00 g, за Median IQR = 309.00 (295.50–348.50) (Табела 1).

Согласно анализата направена со Kruskal–Wallis тестот, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во Т2 ($\chi^2(4) = 0.792$; $p = 0.939$) (Табела 1, Графикон 2).



Графикон 2: Разлики во телесната маса на крајот од експериментот (Т2) помеѓу групите

5.1.2 Анализа на телесната температура

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за телесната температура пред започнување на експериментот (T1; $W=0.946$; $p=0.238$) и на крајот од експериментот (T2; $W=0.969$; $p=0.672$) укажа на постоење на правилна дистрибуција. Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни параметарски тестови.

Табела 2: Анализа на телесната температура пред започнување на експериментот (T1) и на крајот од експериментот (T2) (°C)

Група	T1 (почеток)			T2 (крај)		
	Mean $\pm$ SD (°C)	Min-Max	Median (IQR)	Mean $\pm$ SD (°C)	Min-Max	Median (IQR)
Г1	37.0 $\pm$ 0.3	37.0–37.0	37.0 (36.9–37.3)	37.1 $\pm$ 0.1	37.0–37.0	37.1 (37.0–37.2)
Г2	37.0 $\pm$ 0.7	36.0–38.0	37.2 (36.3–37.6)	37.3 $\pm$ 0.3	37.0–38.0	37.4 (37.1–37.5)
Г3	37.1 $\pm$ 1.0	35.0–38.0	37.5 (36.3–37.9)	37.3 $\pm$ 0.4	37.0–38.0	37.3 (37.0–37.6)
Г4	37.7 $\pm$ 0.5	37.0–39.0	37.5 (37.5–37.9)	37.6 $\pm$ 0.3	37.0–38.0	37.5 (37.4–37.8)
Г5	37.6 $\pm$ 0.5	37.0–38.0	37.6 (37.2–38.0)	37.7 $\pm$ 0.3	37.0–38.0	37.6 (37.5–37.7)
One-way ANOVA: $F(4, 35) = 2.007$, $p = 0.115$				One-way ANOVA: $F(4, 35) = 4.208$, $p = 0.007$		

Кај Г1, телесната температура на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 37.0 ± 0.3 °C, со најниска и највисока вредност од 37.0 °C. Кај 50% од животните од Г1, температурата пред експериментот беше помала од 37.0 °C, за Median IQR = 37.0 (36.9–37.3) (Табела 2).

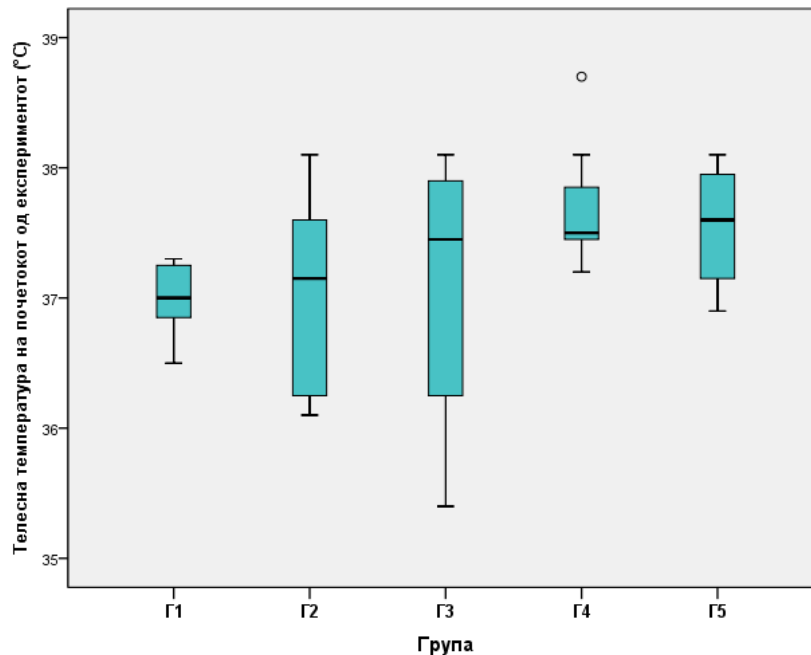
Кај Г2, телесната температура на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 37.0 ± 0.7 °C, со најниска вредност од 36.0 °C и највисока вредност од 38.0 °C. Кај 50% од животните од Г2, температурата пред експериментот беше помала од 37.2 °C, за Median IQR = 37.2 (36.3–37.6) (Табела 2).

Кај Г3, телесната температура на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 37.1 ± 1.0 °C, со најниска вредност од 35.0 °C и највисока вредност од 38.0 °C. Кај 50% од животните од Г3, температурата пред експериментот беше помала од 37.5 °C, за Median IQR = 37.5 (36.3–37.9) (Табела 2).

Кај Г4, телесната температура на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 37.7 ± 0.5 °C, со најниска вредност од 37.0 °C и највисока вредност од 39.0 °C. Кај 50% од животните од Г4, температурата пред експериментот беше помала од 37.5 °C, за Median IQR = 37.5 (37.5–37.9) (Табела 2).

Кај Г5, телесната температура на животните пред започнување на експериментот изнесуваше 37.6 ± 0.5 °C, со најниска вредност од 37.0 °C и највисока вредност од 38.0 °C. Кај 50% од животните од Г5, температурата пред експериментот беше помала од 37.6 °C, за Median IQR = 37.6 (37.2–38.0) (Табела 2).

Согласно анализата направена со ANOVA, не беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во T1 ($F(4, 35) = 2.007$, $p = 0.115$) (Табела 2, Графикон 3).



Графикон 3: Разлики во телесната температура пред започнување на експериментот (Г1) помеѓу групите

Кај Г1, телесната температура на животните на крајот од експериментот изнесуваше 37.1 ± 0.1 °C, со најниска и највисока вредност од 37.0 °C. Кај 50% од животните од Г1, температурата на крајот од експериментот беше помала од 37.1 °C, за Median IQR = 37.1 (37.0–37.2) (Табела 2).

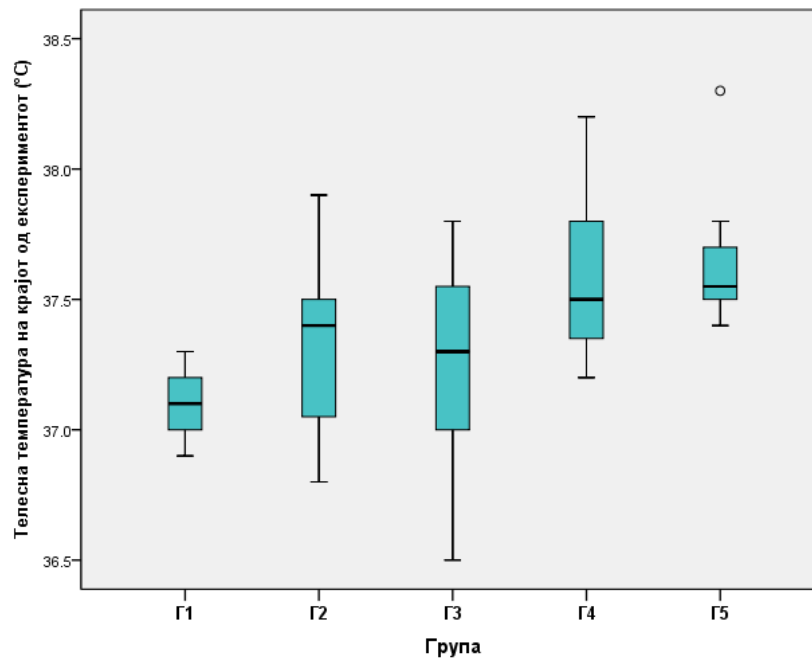
Кај Г2, телесната температура на животните на крајот од експериментот изнесуваше 37.3 ± 0.3 °C, со најниска вредност од 37.0 °C и највисока вредност од 38.0 °C. Кај 50% од животните од Г2, температурата на крајот од експериментот беше помала од 37.4 °C, за Median IQR = 37.4 (37.1–37.5) (Табела 2).

Кај Г3, телесната температура на животните на крајот од експериментот изнесуваше 37.3 ± 0.4 °C, со најниска вредност од 37.0 °C и највисока вредност од 38.0 °C. Кај 50% од животните од Г3, температурата на крајот од експериментот беше помала од 37.3 °C, за Median IQR = 37.3 (37.0–37.6) (Табела 2).

Кај Г4, телесната температура на животните на крајот од експериментот изнесуваше 37.6 ± 0.3 °C, со најниска вредност од 37.0 °C и највисока вредност од 38.0 °C. Кај 50% од животните од Г4, температурата на крајот од експериментот беше помала од 37.5 °C, за Median IQR = 37.5 (37.4–37.8) (Табела 2).

Кај Г5, телесната температура на животните на крајот од експериментот изнесуваше 37.7 ± 0.3 °C, со најниска вредност од 37.0 °C и највисока вредност од 38.0 °C. Кај 50% од животните од Г5, температурата на крајот од експериментот беше помала од 37.6 °C, за Median IQR = 37.6 (37.5–37.7) (Табела 2).

Согласно анализата направена со ANOVA, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во T2 ($F(4, 35) = 4.208, p = 0.007$) (Табела 2, Графикон 4). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Tukey post hoc тест и примена на Bonferroni корекција, при што беа утврдени следните разлики: Г1-Г4 ($p = 0.043$), Г1-Г5 ($p = 0.015$). Во Г4 и Г5 беше детектирана статистички значајно повисока телесна температура во T2 во споредба со Г1.



Графикон 4: Разлики во телесната температура на крајот од експериментот (T2) помеѓу групите

5.1.3 Анализа на имуносупресијата

Табела 3: Анализа на имуносупресијата, проследена преку бројот на белите крвни клетки, 5 дена по аплицирање на првиот цитостатик

WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Median	IQR
Г1	8	9.1 $\pm$ 1.6 ^a	6.5	11.8	9.25	8.15-9.85
Г2	8	11 $\pm$ 7	4.7	22.8	9.8	6.9-10.9
Г3	8	5 $\pm$ 2.4 ^a	3.2	9.2	4.4	3.6-4.7
Г4	8	5.9 $\pm$ 1.3	4.2	7.8	5.7	5.4-6.4
Г5	8	7.2 $\pm$ 2.3	5	10.6	6.2	5.8-8.3
Kruskal–Wallis test: $\chi^2(4) = 11.643$; $p = 0.020$ Статистички значајните разлики се означени со суперскрипт						

Во Табела 3 е прикажан бројот на белите крвни клетки (WBC), како индикатор на имуносупресијата во анималниот модел.

Кај Г1, бројот на WBC изнесуваше $9.1 \pm 1.6 \times 10^3/\mu\text{L}$, со најниска вредност од $6.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ и највисока вредност од $11.8 \times 10^3/\mu\text{L}$. Кај 50% од животните од Г1, бројот на WBC беше помал од $9.25 \times 10^3/\mu\text{L}$, за Median IQR = 9.25 (8.15–9.85) (Табела 3).

Кај Г2, бројот на WBC изнесуваше $11 \pm 7 \times 10^3/\mu\text{L}$, со најниска вредност од $4.7 \times 10^3/\mu\text{L}$ и највисока вредност од $22.8 \times 10^3/\mu\text{L}$. Кај 50% од животните од Г2, бројот на WBC беше помал од $9.8 \times 10^3/\mu\text{L}$, за Median IQR = 9.8 (6.9–10.9) (Табела 3).

Кај Г3, бројот на WBC изнесуваше $5 \pm 2.4 \times 10^3/\mu\text{L}$, со најниска вредност од $3.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ и највисока вредност од $9.2 \times 10^3/\mu\text{L}$. Кај 50% од животните од Г3, бројот на WBC беше помал од $4.4 \times 10^3/\mu\text{L}$, за Median IQR = 4.4 (3.6–4.7) (Табела 3).

Кај Г4, бројот на WBC изнесуваше $5.9 \pm 1.3 \times 10^3/\mu\text{L}$, со најниска вредност од $4.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ и највисока вредност од $7.8 \times 10^3/\mu\text{L}$. Кај 50% од животните од Г4, бројот на WBC беше помал од $5.7 \times 10^3/\mu\text{L}$, за Median IQR = 5.7 (5.4–6.4) (Табела 3).

Кај Г5, бројот на WBC изнесуваше $7.2 \pm 2.3 \times 10^3/\mu\text{L}$, со најниска вредност од $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ и највисока вредност од $10.6 \times 10^3/\mu\text{L}$. Кај 50% од животните од Г5, бројот на WBC беше помал од $6.2 \times 10^3/\mu\text{L}$, за Median IQR = 6.2 (5.8–8.3) (Табела 3).

Највисоки вредности на WBC беа регистрирани кај Г2, а најниски кај Г3.

Kruskal–Wallis тестот покажа постоење на статистички значајни разлики помеѓу групите ($\chi^2(4) = 11.643$; $p = 0.020$) (Табела 3). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Dunn's тест и примена на Bonferroni корекција. Анализата утврди статистички значајна разлика помеѓу Г1 и Г3 ($p=0.043$), што укажува на статистички значајна имуносупресија во Г3.

5.2 Анализа на клиничките параметри

Анализата на клиничките параметри се однесуваше на големината на лезиите се однесуваше на 7 временски интервали по аплицирањето на оцетната киселина во букалната лигавица на животните: 24 часа (t0), 3 дена (t1), 5 дена (t2), 7 дена (t3), 9 дена (t4), 12 дена (t5) и 14 дена (t6).

5.2.1 Анализа на големината на лезиите 24 часа по аплицирањето на оцетната киселина

Табела 4: Анализа на големината на лезиите 24 часа по аплицирањето на оцетната киселина

mm	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Median (IQR)
Г2	8	4.5 $\pm$ 2.7	1.2–8.0	4.1 (2.5–6.0)
Г3	8	3.6 $\pm$ 3.0	0.8–7.5	3.2 (1.5–5.5)
Г4	8	4.4 $\pm$ 1.9	2.0–7.0	4.3 (3.0–5.8)
Г5	8	3.1 $\pm$ 3.0	0.5–7.0	2.8 (1.3–4.5)

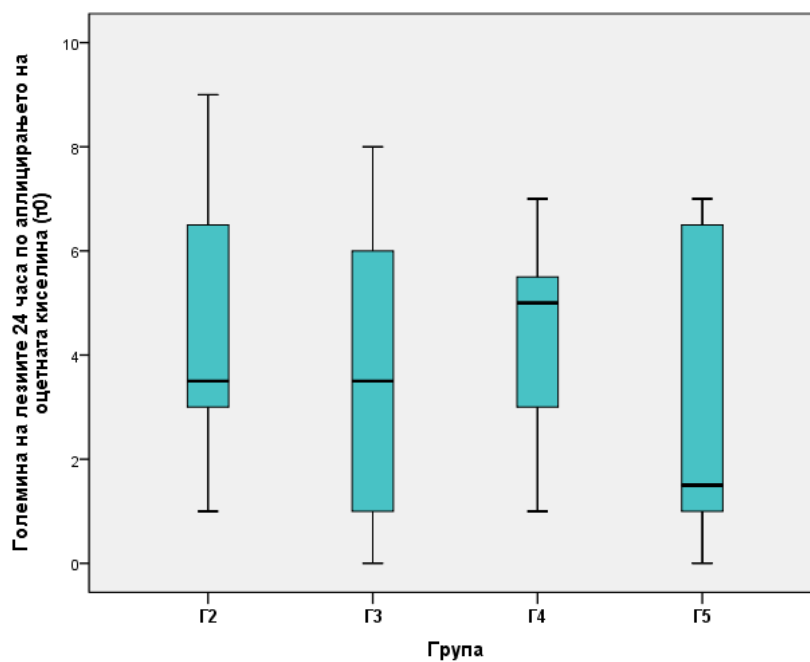
Кај Г2, дијаметарот на лезиите по 24 часа (t0) изнесуваше 4.5 $\pm$ 2.7 mm, со најниска вредност од 1.2 mm и највисока вредност од 8.0 mm. Кај 50% од животните од Г2, дијаметарот беше помал од 4.1 mm, за Median IQR = 4.1 (2.5–6.0) (Табела 4).

Кај Г3, дијаметарот на лезиите по 24 часа (t0) изнесуваше 3.6 $\pm$ 3.0 mm, со најниска вредност од 0.8 mm и највисока вредност од 7.5 mm. Кај 50% од животните од Г3, дијаметарот беше помал од 3.2 mm, за Median IQR = 3.2 (1.5–5.5) (Табела 4).

Кај Г4, дијаметарот на лезиите по 24 часа (t0) изнесуваше 4.4 $\pm$ 1.9 mm, со најниска вредност од 2.0 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г4, дијаметарот беше помал од 4.3 mm, за Median IQR = 4.3 (3.0–5.8) (Табела 4).

Кај Г5, дијаметарот на лезиите по 24 часа (t0) изнесуваше 3.1 $\pm$ 3.0 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г5, дијаметарот беше помал од 2.8 mm, за Median IQR = 2.8 (1.3–4.5) (Табела 4).

Највисоки вредности за дијаметарот на лезиите во t0 имаше во Г2, а најмали во Г5 (Табела 4, Графикон 5).



Графикон 5: Разлики помеѓу групите во големината на лезиите 24 часа по аплицирањето на оцетната киселина (t0)

5.2.2 Анализа на големината на лезиите 3 дена по аплицирањето на оцетната киселина

Табела 5: Анализа на големината на лезиите 3 дена по аплицирањето на оцетната киселина

mm	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Median (IQR)
Г2	8	3.5 $\pm$ 3.0	0.5–8.0	3.2 (1.3–5.5)
Г3	8	2.9 $\pm$ 3.1	0.5–7.0	2.3 (1.0–4.5)
Г4	8	3.8 $\pm$ 2.7	0.5–7.0	3.5 (2.0–6.0)
Г5	8	2.5 $\pm$ 3.5	0.5–8.0	2.0 (0.8–4.5)

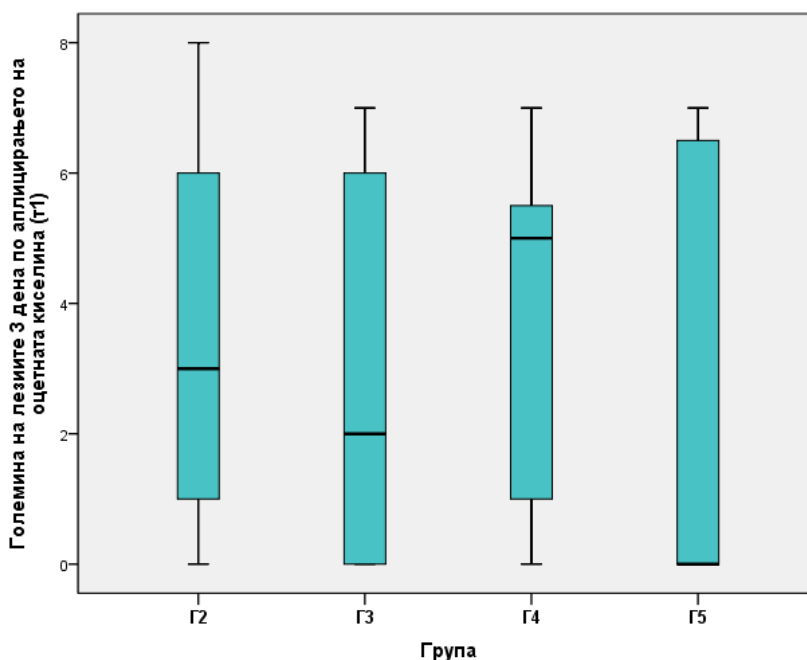
Кај Г2, дијаметарот на лезиите по 3 дена (т1) изнесуваше 3.5 ± 3.0 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 8.0 mm. Кај 50% од животните од Г2, дијаметарот беше помал од 3.2 mm, за Median IQR = 3.2 (1.3–5.5) (Табела 5).

Кај Г3, дијаметарот на лезиите по 3 дена (т1) изнесуваше 2.9 ± 3.1 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г3, дијаметарот беше помал од 2.3 mm, за Median IQR = 2.3 (1.0–4.5) (Табела 5).

Кај Г4, дијаметарот на лезиите по 3 дена (т1) изнесуваше 3.8 ± 2.7 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г4, дијаметарот беше помал од 3.5 mm, за Median IQR = 3.5 (2.0–6.0) (Табела 5).

Кај Г5, дијаметарот на лезиите по 3 дена (т1) изнесуваше 2.5 ± 3.5 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 8.0 mm. Кај 50% од животните од Г5, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (0.8–4.5) (Табела 5).

Највисоки вредности за дијаметарот на лезиите во т1 имаше во Г4, а најмали во Г5 (Табела 5, Графикон 6).



Графикон 6: Разлики помеѓу групите во големината на лезиите 3 дена по аплицирањето на оцетната киселина (т1)

5.2.3 Анализа на големината на лезиите 5 дена по аплицирањето на оцетната киселина

Табела 6: Анализа на големината на лезиите 5 дена по аплицирањето на оцетната киселина

mm	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Median (IQR)
Г2	8	2.2 $\pm$ 3.2	0.5–8.0	2.0 (0.8–3.5)
Г3	8	2.5 $\pm$ 2.9	0.5–7.0	2.0 (1.0–3.8)
Г4	8	3.8 $\pm$ 2.7	0.5–7.0	3.5 (2.0–6.0)
Г5	8	2.4 $\pm$ 3.3	0.5–8.0	2.0 (0.8–4.5)

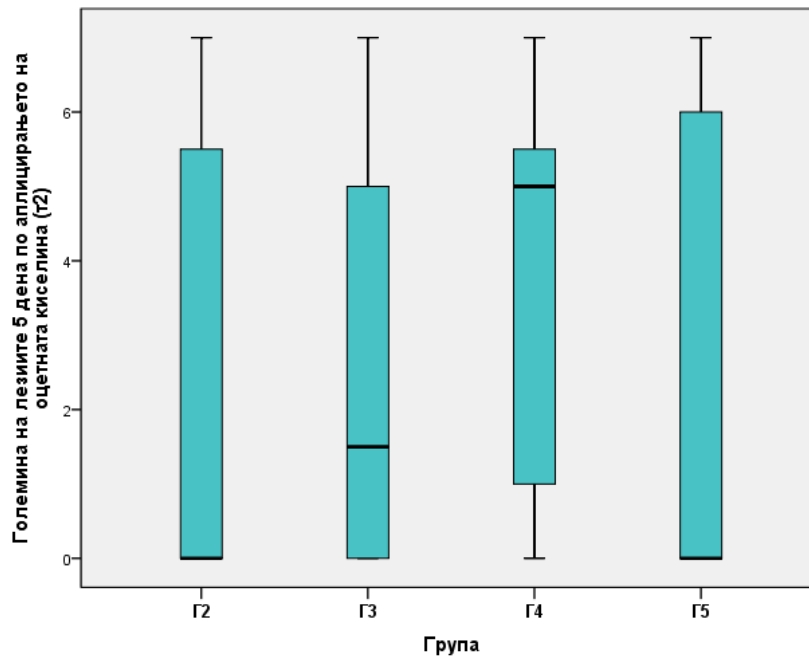
Кај Г2, дијаметарот на лезиите по 5 дена (т2) изнесуваше 2.2 $\pm$ 3.2 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 8.0 mm. Кај 50% од животните од Г2, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (0.8–3.5) (Табела 6).

Кај Г3, дијаметарот на лезиите по 5 дена (т2) изнесуваше 2.5 $\pm$ 2.9 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г3, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (1.0–3.8) (Табела 6).

Кај Г4, дијаметарот на лезиите по 5 дена (т2) изнесуваше 3.8 $\pm$ 2.7 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г4, дијаметарот беше помал од 3.5 mm, за Median IQR = 3.5 (2.0–6.0) (Табела 6).

Кај Г5, дијаметарот на лезиите по 5 дена (т2) изнесуваше 2.4 $\pm$ 3.3 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 8.0 mm. Кај 50% од животните од Г5, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (0.8–4.5) (Табела 6).

Највисоки вредности за дијаметарот на лезиите во т2 имаше во Г4, а најмали во Г2. Димензиите во Г4 остануваат исти во т2, во споредба со т1, што укажува на стагнација во процесот на заздравување во оваа група (Табела 6, Графикон 7).



Графикон 7: Разлики помеѓу групите во големината на лезиите 5 дена по аплицирањето на оцетната киселина (г2)

5.2.4 Анализа на големината на лезиите 7 дена по аплицирањето на оцетната киселина

Табела 7: Анализа на големината на лезиите 7 дена по аплицирањето на оцетната киселина

mm	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Median (IQR)
Г2	8	2.1 $\pm$ 3.0	0.5–8.0	2.0 (0.8–3.0)
Г3	8	2.3 $\pm$ 2.7	0.5–7.0	2.0 (1.0–3.0)
Г4	8	2.4 $\pm$ 2.2	0.5–6.0	2.0 (1.3–3.3)
Г5	8	1.9 $\pm$ 2.6	0.5–7.0	1.5 (0.8–2.8)

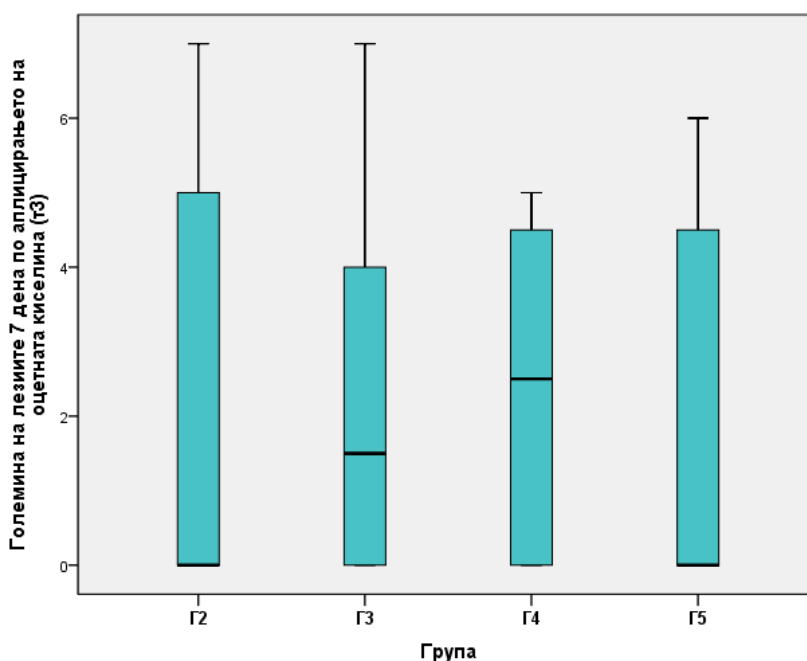
Кај Г2, дијаметарот на лезиите по 7 дена (т3) изнесуваше 2.1 ± 3.0 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 8.0 mm. Кај 50% од животните од Г2, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (0.8–3.0) (Табела 7).

Кај Г3, дијаметарот на лезиите по 7 дена (т3) изнесуваше 2.3 ± 2.7 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г3, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (1.0–3.0) (Табела 7).

Кај Г4, дијаметарот на лезиите по 7 дена (т3) изнесуваше 2.4 ± 2.2 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 6.0 mm. Кај 50% од животните од Г4, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (1.3–3.3) (Табела 7).

Кај Г5, дијаметарот на лезиите по 7 дена (т3) изнесуваше 1.9 ± 2.6 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г5, дијаметарот беше помал од 1.5 mm, за Median IQR = 1.5 (0.8–2.8) (Табела 7).

Највисоки вредности за дијаметарот на лезиите во т3 имаше во Г4, а најмали во Г5 (Табела 7, Графикон 8).



Графикон 8: Разлики помеѓу групите во големината на лезиите 7 дена по аплицирањето на оцетната киселина (т3)

5.2.5 Анализа на големината на лезиите 9 дена по аплицирањето на оцетната киселина

Табела 8: Анализа на големината на лезиите 9 дена по аплицирањето на оцетната киселина

mm	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Median (IQR)
Г2	8	2.1 $\pm$ 3.0	0.5–8.0	2.0 (0.8–3.0)
Г3	8	2.3 $\pm$ 2.7	0.5–7.0	2.0 (1.0–3.0)
Г4	8	2.3 $\pm$ 2.1	0.5–6.0	2.0 (1.3–3.0)
Г5	8	1.6 $\pm$ 2.3	0.5–7.0	1.5 (0.8–2.0)

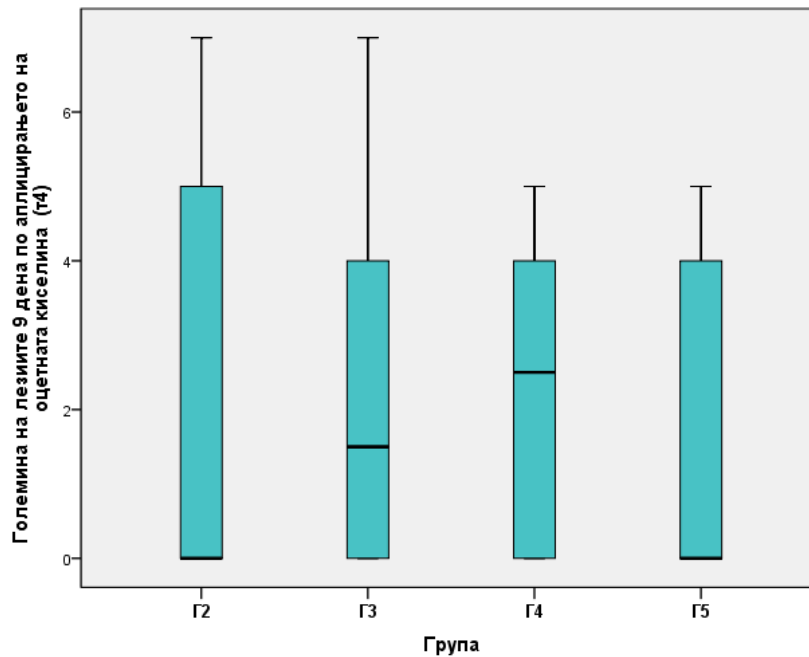
Кај Г2, дијаметарот на лезиите по 9 дена (т4) изнесуваше 2.1 $\pm$ 3.0 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 8.0 mm. Кај 50% од животните од Г2, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (0.8–3.0) (Табела 8).

Кај Г3, дијаметарот на лезиите по 9 дена (т4) изнесуваше 2.3 $\pm$ 2.7 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г3, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (1.0–3.0) (Табела 8).

Кај Г4, дијаметарот на лезиите по 9 дена (т4) изнесуваше 2.3 $\pm$ 2.1 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 6.0 mm. Кај 50% од животните од Г4, дијаметарот беше помал од 2.0 mm, за Median IQR = 2.0 (1.3–3.0) (Табела 8).

Кај Г5, дијаметарот на лезиите по 9 дена (т4) изнесуваше 1.6 $\pm$ 2.3 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 7.0 mm. Кај 50% од животните од Г5, дијаметарот беше помал од 1.5 mm, за Median IQR = 1.5 (0.8–2.0) (Табела 8).

Највисоки вредности за дијаметарот на лезиите во т4 имаше во Г3 и Г4, но истите се слични со вредностите во Г2, а најмали во Г5 (Табела 8, Графикон 9).



Графикон 9: Разлики помеѓу групите во големината на лезиите 9 дена по аплицирањето на оцетната киселина (t4)

5.2.6 Анализа на големината на лезиите 12 дена по аплицирањето на оцетната киселина

Табела 9: Анализа на големината на лезиите 12 дена по аплицирањето на оцетната киселина

mm	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Median (IQR)
Г2	8	1.0 $\pm$ 1.4	0.5–5.0	1.0 (0.5–1.3)
Г3	8	1.3 $\pm$ 1.8	0.5–6.0	1.0 (0.5–1.8)
Г4	8	1.3 $\pm$ 1.4	0.5–5.0	1.0 (0.5–1.3)
Г5	8	1.0 $\pm$ 1.9	0.5–6.0	1.0 (0.5–1.3)

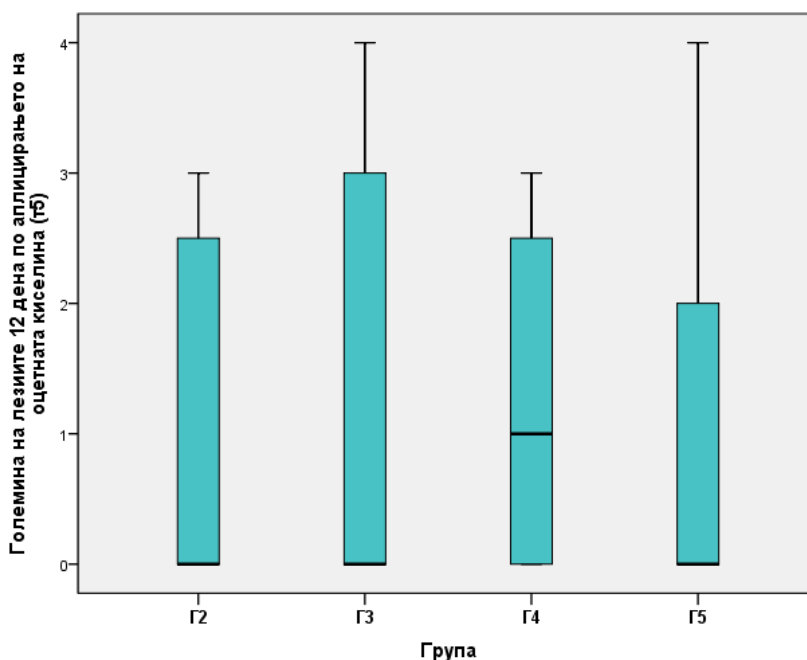
Кај Г2, дијаметарот на лезиите по 12 дена (т5) изнесуваше 1.0 ± 1.4 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 5.0 mm. Кај 50% од животните од Г2, дијаметарот беше помал од 1.0 mm, за Median IQR = 1.0 (0.5–1.3) (Табела 9).

Кај Г3, дијаметарот на лезиите по 12 дена (т5) изнесуваше 1.3 ± 1.8 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 6.0 mm. Кај 50% од животните од Г3, дијаметарот беше помал од 1.0 mm, за Median IQR = 1.0 (0.5–1.8) (Табела 9).

Кај Г4, дијаметарот на лезиите по 12 дена (т5) изнесуваше 1.3 ± 1.4 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 5.0 mm. Кај 50% од животните од Г4, дијаметарот беше помал од 1.0 mm, за Median IQR = 1.0 (0.5–1.3) (Табела 9).

Кај Г5, дијаметарот на лезиите по 12 дена (т5) изнесуваше 1.0 ± 1.9 mm, со најниска вредност од 0.5 mm и највисока вредност од 6.0 mm. Кај 50% од животните од Г5, дијаметарот беше помал од 1.0 mm, за Median IQR = 1.0 (0.5–1.3) (Табела 9).

Највисоки вредности за дијаметарот на лезиите во т5 имаше во Г3 и Г4, а најмали во Г2 и Г5 (Табела 9, Графикон 10).



Графикон 10: Разлики помеѓу групите во големината на лезиите 12 дена по аплицирањето на оцетната киселина (т5)

5.2.7 Анализа на големината на лезиите 14 дена по аплицирањето на оцетната киселина

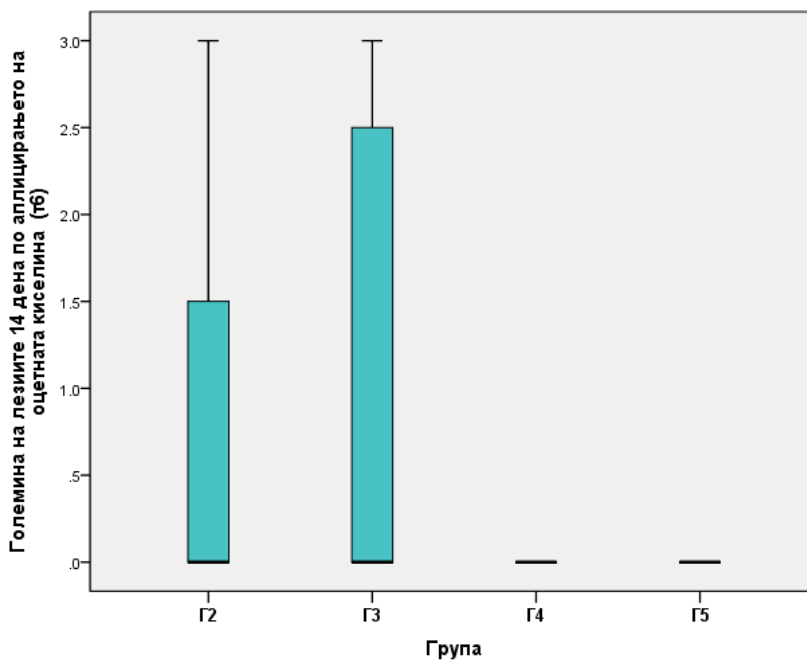
Табела 10: Анализа на големината на лезиите 14 дена по аплицирањето на оцетната киселина

mm	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Median (IQR)
Г2	8	0.8 $\pm$ 1.4	0.0–5.0	0.5 (0.0–1.3)
Г3	8	1.0 $\pm$ 1.4	0.0–5.0	0.5 (0.0–1.3)
Г4	8	0.0 $\pm$ 0.0	0.0–0.0	0.0 (0.0–0.0)
Г5	8	0.0 $\pm$ 0.0	0.0–0.0	0.0 (0.0–0.0)

Кај Г2, дијаметарот на лезиите по 14 дена (т6) изнесуваше 0.8 ± 1.4 mm, со најниска вредност од 0.0 mm и највисока вредност од 5.0 mm. Кај 50% од животните од Г2, дијаметарот беше помал од 0.5 mm, за Median IQR = 0.5 (0.0–1.3) (Табела 10).

Кај Г3, дијаметарот на лезиите по 14 дена (т6) изнесуваше 1.0 ± 1.4 mm, со најниска вредност од 0.0 mm и највисока вредност од 5.0 mm. Кај 50% од животните од Г3, дијаметарот беше помал од 0.5 mm, за Median IQR = 0.5 (0.0–1.3) (Табела 10).

Кај Г4 и Г5 целосно беа епителизирани лезиите кај сите животни во т6, што не беше забележано кај Г2 и Г3 (Табела 10, Графикон 11).

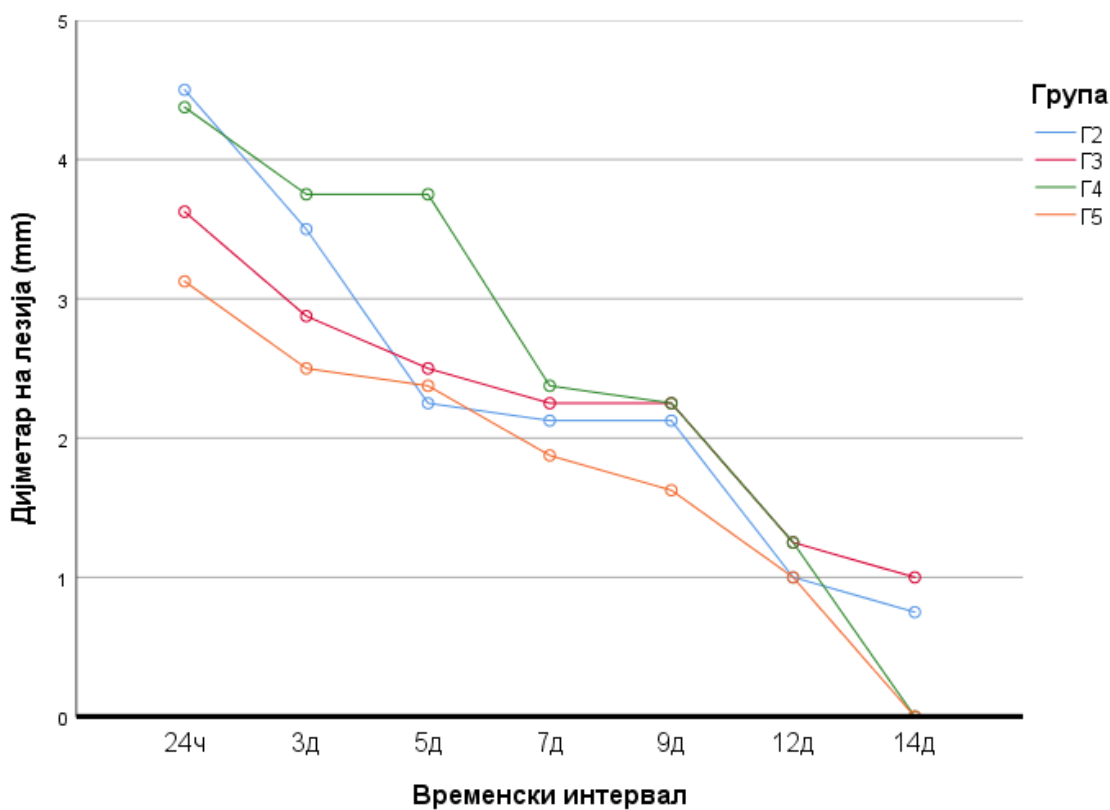


Графикон 11: Разлики помеѓу групите во големината на лезиите 14 дена по аплицирањето на оцетната киселина (т6)

5.2.8 Анализа на динамиката на заздравување на лезиите

Табела 11: Анализа на динамиката на заздравување на лезиите

Група/Интервал (време)	Mean $\pm$ SD (mm)						
	τ_0 (24ч)	τ_1 (3д)	τ_2 (5д)	τ_3 (7д)	τ_4 (9д)	τ_5 (12д)	τ_6 (14д)
Г2	4.5 $\pm$ 2.7	3.5 $\pm$ 3.0	2.2 $\pm$ 3.2	2.1 $\pm$ 3.0	2.1 $\pm$ 3.0	1.0 $\pm$ 1.4	0.8 $\pm$ 1.4
Г3	3.6 $\pm$ 3.0	2.9 $\pm$ 3.1	2.5 $\pm$ 2.9	2.3 $\pm$ 2.7	2.3 $\pm$ 2.7	1.3 $\pm$ 1.8	1.0 $\pm$ 1.4
Г4	4.4 $\pm$ 1.9	3.8 $\pm$ 2.7	3.8 $\pm$ 2.7	2.4 $\pm$ 2.2	2.3 $\pm$ 2.1	1.3 $\pm$ 1.4	0.0 $\pm$ 0.0
Г5	3.1 $\pm$ 3.0	2.5 $\pm$ 3.5	2.4 $\pm$ 3.3	1.9 $\pm$ 2.6	1.6 $\pm$ 2.3	1.0 $\pm$ 1.9	0.0 $\pm$ 0.0
Repeated measures ANOVA – ефект на време: $F(6,168)=32.90$, $p<0.001$, $\eta^2=.540$ Repeated measures ANOVA - ефект на група: $F(3,28)=0.16$, $p=.922$, $\eta^2=.017$ Repeated measures ANOVA – интеракција време-група: $F(18,168)=0.94$, $p=.537$, $\eta^2=.091$							



Графикон 12: Динамика на заздравување (епителизација на лезиите) во период од 14 дена

Со цел да се определи влијанието на различните третмани врз динамиката (брзината) на епителизација на лезиите, беше спроведен тестот Repeated Measures ANOVA со фактори интервал, т.е. време (седум нивоа: $t_0=24\text{ч}$, $t_1=3\text{д}$, $t_2=5\text{д}$, $t_3=7\text{д}$, $t_4=9\text{д}$, $t_5=12\text{д}$, $t_6=14\text{д}$) и група (четири групи: Г2, Г3, Г4 и Г5). Анализата беше направена врз податоци за дијаметарот на лезиите (во mm) кај сите испитувани животни од Г2-Г5, измерен во сите предвидени временски точки (Табела 11, Графикон 12).

Резултатите покажаа статистички значен ефект на времето, $F(6,168)=32.90$, $p<0.001$, $\eta^2=.540$, што укажува на тоа дека големината на лезиите значително се менува со текот на времето (Табела 11, Графикон 12).

Ефектот на група, кој ја оценува разликата меѓу третираните групи независно од времето, не беше статистички значаен, $F(3,28)=0.16$, $p=.922$, $\eta^2=.017$. Поточно, не се забележани значајни разлики во просечната големина на лезиите меѓу групите низ сите мерења, што сугерира дека ниту еден третман не обезбедил статистички потврдена супериорност во однос на останатите (Табела 11, Графикон 12).

Дополнително, интеракцијата време-група исто така не беше статистички значајна, $F(18,168)=0.94$, $p=.537$, $\eta^2=.091$, што укажува дека трендот на намалување на големината на лезиите е сличен во сите групи и динамиката на заздравување не зависи статистички значајно од применетиот третман во рамките на ова истражување (Табела 11, Графикон 12).

Анализата потврди дека времето има статистички значајно влијание врз заздравувањето на лезиите, но нема статистички докази за разлика меѓу ефектите на различните третмани во дадениот примерок. Иако некои групи покажаа видлив тренд кон побрзо заздравување, разликите не се статистички значајни (Табела 11, Графикон 12).

5.3 Анализа на биохемиските параметри

Анализата на биохемиските параметри се однесуваше на нивната концентрацијата (TNF- α , IL-1 β и MDA), активноста (SOD, GR и CAT)

5.3.1 Анализа на концентрацијата на TNF- α (pg/mL)

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за концентрацијата на TNF- α укажа на постоење неправилна дистрибуција ($W=0.848$; $p=0.002$). Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни непараметарски тестови.

Табела 12: Анализа на концентрацијата на TNF- α (pg/mL)

TNF- α (pg/mL)	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Median	IQR
Г1	8	116.26 $\pm$ 8.55	99.93	124.47	117.83	111.80–123.20
Г2	8	197.47 $\pm$ 21.09	168.05	231.08	198.85	183.84–208.34
Г3	8	101.37 $\pm$ 5.29	92.27	106.05	103.24	98.29–105.10
Г4	8	132.34 $\pm$ 6.71	123.09	140.11	131.18	129.83–137.47
Г5	8	106.49 $\pm$ 4.76	99.05	111.68	108.29	105.10–108.32
Kruskal–Wallis test: $\chi^2(4) = 31.567$; $p < 0.001$						

Кај Г1, концентрацијата на TNF- α во крвен серум изнесуваше 116.26 $\pm$ 8.55 pg/mL, со најниска вредност од 99.93 pg/mL и највисока вредност од 124.47 pg/mL. Кај 50% од животните од Г1, концентрацијата беше помала од 117.83 pg/mL, за Median IQR = 117.83 (111.80–123.20) (Табела 12).

Кај Г2, концентрацијата на TNF- α во крвен серум изнесуваше 197.47 $\pm$ 21.09 pg/mL, со најниска вредност од 168.05 pg/mL и највисока вредност од 231.08 pg/mL. Кај 50% од животните од Г2, концентрацијата беше помала од 198.85 pg/mL, за Median IQR = 198.85 (183.84–208.34) (Табела 12).

Кај Г3, концентрацијата на TNF- α во крвен серум изнесуваше 101.37 $\pm$ 5.29 pg/mL, со најниска вредност од 92.27 pg/mL и највисока вредност од 106.05 pg/mL. Кај 50% од животните од Г3, концентрацијата беше помала од 103.24 pg/mL, за Median IQR = 103.24 (98.29–105.10) (Табела 12).

Кај Г4, концентрацијата на TNF- α во крвен серум изнесуваше 132.34 $\pm$ 6.71 pg/mL, со најниска вредност од 123.09 pg/mL и највисока вредност од 140.11 pg/mL. Кај 50% од животните од Г4, концентрацијата беше помала од 131.18 pg/mL, за Median IQR = 131.18 (129.83–137.47) (Табела 12).

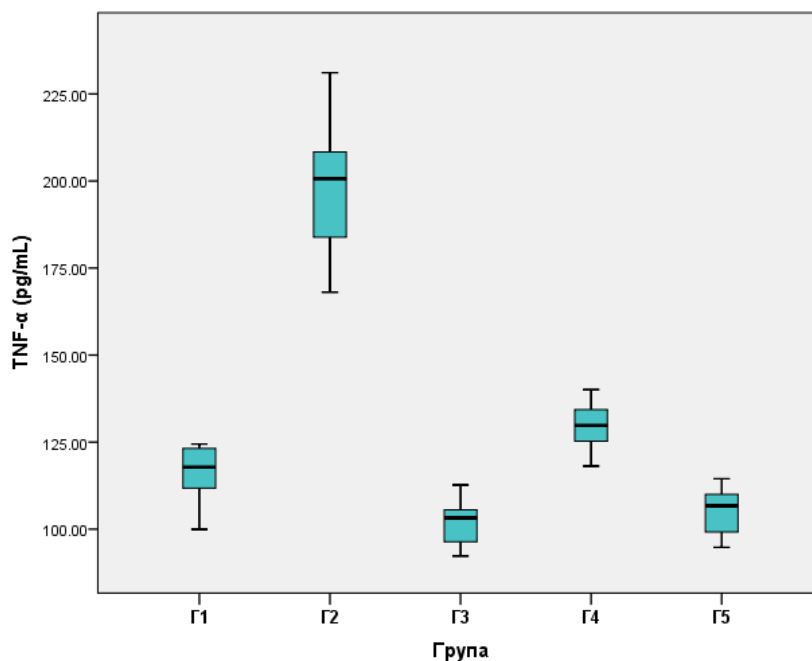
Кај Г5, концентрацијата на TNF- α во крвен серум изнесуваше 106.49 $\pm$ 4.76 pg/mL, со најниска вредност од 99.05 pg/mL и највисока вредност од 111.68 pg/mL. Кај 50% од животните од Г5, концентрацијата беше помала од 108.29 pg/mL, за Median IQR = 108.29 (105.10–108.32) (Табела 12).

Највисоки вредности на TNF- α имаше во Г2, а најниски во Г3 (Табела 12).

Согласно анализата направена со Kruskal–Wallis тестот, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во однос на концентрацијата на TNF- α ($\chi^2(4) = 31.567$; $p < 0.001$) (Табела 12). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Dunn’s тест и примена на Bonferroni корекција (Табела 13).

Табела 13: Post hoc анализа на концентрацијата на TNF- α (pg/mL)

Споредба на групи	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.	Статистичка значајност
Г1 – Г2	-16.125	5.701	-2.829	0.005	0.005	Да
Г1 – Г3	11.438	5.701	2.006	0.045	0.045	Да
Г1 – Г4	7.768	5.901	1.316	0.188	0.188	Не
Г1 – Г5	8.438	5.701	1.480	0.139	0.139	Не
Г2 – Г3	27.562	5.701	4.835	0.000	0.000	Да
Г2 – Г4	8.357	5.901	1.416	0.157	0.157	Не
Г2 – Г5	24.562	5.701	4.305	0.000	0.000	Да
Г3 – Г4	19.205	5.901	3.255	0.001	0.001	Да
Г3 – Г5	-3.000	5.701	-0.526	0.599	1.000	Не
Г4 – Г5	-16.205	5.901	-2.746	0.006	0.006	Да



Графикон 13: Разлики во концентрацијата на TNF- α (pg/mL) помеѓу групите

Анализата покажа дека Г2 имаше значајно повисоки вредности во однос на Г1 ($p = 0.005$), Г3 ($p < 0.001$) и Г5 ($p < 0.001$), при што разликата со Г3 беше најизразена. Дополнително, Г3 имаше значајно пониски вредности во споредба со Г1 ($p = 0.045$) и Г4 ($p = 0.001$), додека Г4 имаше значајно повисоки вредности од Г5 ($p = 0.006$). Меѓу останатите групи немаше значајни разлики (Табела 13, Графикон 13).

5.3.2 Анализа на концентрацијата на IL-1 β (pg/mL)

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за концентрацијата на IL-1 β укажа на постоење неправилна дистрибуција ($W=0.863$; $p=0.005$). Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни непараметарски тестови.

Табела 14: Анализа на концентрацијата на IL-1 β (pg/mL)

IL-1 β (pg/mL)	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Median	IQR
Г1	8	101.51 $\pm$ 5.62	95.57	113.53	101.03	97.53–102.94
Г2	8	213.76 $\pm$ 13.04	198.85	231.08	211.66	204.13–223.24
Г3	8	111.03 $\pm$ 6.53	104.80	119.68	108.66	106.10–118.29
Г4	8	139.82 $\pm$ 13.32	124.01	157.68	135.99	132.81–148.60
Г5	8	94.73 $\pm$ 7.89	81.44	102.08	97.20	94.72–98.19
Kruskal–Wallis test: $\chi^2(4) = 33.443$; $p < 0.001$						

Кај Г1, концентрацијата на IL-1 β во крвен серум изнесуваше 101.51 $\pm$ 5.62 pg/mL, со најниска вредност од 95.57 pg/mL и највисока вредност од 113.53 pg/mL. Кај 50% од животните од Г1, концентрацијата беше помала од 101.03 pg/mL, за Median IQR = 101.03 (97.53–102.94) (Табела 14).

Кај Г2, концентрацијата на IL-1 β во крвен серум изнесуваше 213.76 $\pm$ 13.04 pg/mL, со најниска вредност од 198.85 pg/mL и највисока вредност од 231.08 pg/mL. Кај 50% од животните од Г2, концентрацијата беше помала од 211.66 pg/mL, за Median IQR = 211.66 (204.13–223.24) (Табела 14).

Кај Г3, концентрацијата на IL-1 β во крвен серум изнесуваше 111.03 $\pm$ 6.53 pg/mL, со најниска вредност од 104.80 pg/mL и највисока вредност од 119.68 pg/mL. Кај 50% од животните од Г3, концентрацијата беше помала од 108.66 pg/mL, за Median IQR = 108.66 (106.10–118.29) (Табела 14).

Кај Г4, концентрацијата на IL-1 β во крвен серум изнесуваше 139.82 $\pm$ 13.32 pg/mL, со најниска вредност од 124.01 pg/mL и највисока вредност од 157.68 pg/mL. Кај 50% од животните од Г4, концентрацијата беше помала од 135.99 pg/mL, за Median IQR = 135.99 (132.81–148.60) (Табела 14).

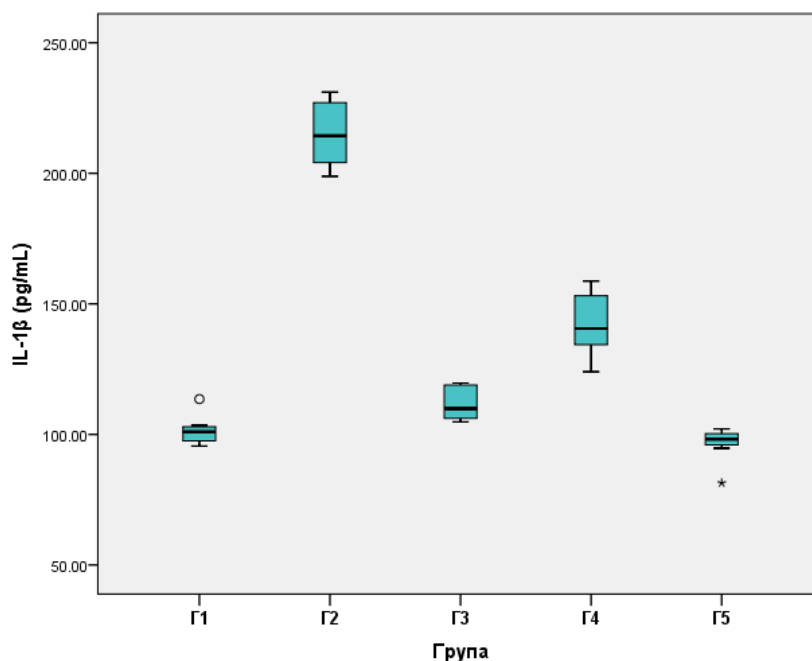
Кај Г5, концентрацијата на IL-1 β во крвен серум изнесуваше 94.73 $\pm$ 7.89 pg/mL, со најниска вредност од 81.44 pg/mL и највисока вредност од 102.08 pg/mL. Кај 50% од животните од Г5, концентрацијата беше помала од 97.20 pg/mL, за Median IQR = 97.20 (94.72–98.19) (Табела 14).

Највисоки вредности на IL-1 β имаше во Г2, а најниски во Г5 (Табела 14).

Согласно анализата направена со Kruskal–Wallis тестот, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во однос на концентрацијата на IL-1 β ($\chi^2(4) = 33.443$; $p < 0.001$) (Табела 14). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Dunn’s тест и примена на Bonferroni корекција (Табела 15).

Табела 15: Post hoc анализа на концентрацијата на IL-1 β (pg/mL)

Споредба на групи	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.	Статистичка значајност
Г1 – Г2	-24.250	5.557	-4.365	0.000	0.000	Да
Г1 – Г3	-8.625	5.557	-1.552	0.121	1.000	Не
Г1 – Г4	-16.750	5.752	-2.912	0.004	0.036	Да
Г1 – Г5	4.107	5.752	0.714	0.475	1.000	Не
Г2 – Г3	15.625	5.557	2.812	0.005	0.049	Да
Г2 – Г4	7.500	5.752	1.304	0.192	1.000	Не
Г2 – Г5	28.357	5.752	4.930	0.000	0.000	Да
Г3 – Г4	-8.125	5.752	-1.413	0.158	1.000	Не
Г3 – Г5	12.732	5.752	2.214	0.027	0.269	Не
Г4 – Г5	20.857	5.940	3.511	0.000	0.004	Да



Графикон 14: Разлики во концентрацијата на IL-1 β (pg/mL) помеѓу групите

Анализата покажа дека Г2 имаше значајно повисоки вредности во споредба со Г1 ($p < 0.001$), Г3 ($p = 0.049$) и Г5 ($p < 0.001$). Дополнително, Г4 имаше значајно повисоки вредности во споредба со Г1 ($p = 0.036$) и Г5 ($p = 0.004$). Меѓу останатите групи немаше детектирани значајни разлики (Табела 15, Графикон 14).

5.3.3 Анализа на концентрацијата на MDA (mmol/L)

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за концентрацијата на MDA укажа на постоење правилна дистрибуција ($W=0.958$; $p=0.433$). Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни параметарски тестови.

Табела 16: Анализа на концентрацијата на MDA (mmol/L)

MDA (mmol/L)	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Median	IQR
Г1	8	2.91 $\pm$ 0.56	1.99	3.60	3.01	2.54–3.31
Г2	8	5.27 $\pm$ 1.10	4.01	7.11	5.05	4.52–5.84
Г3	8	3.81 $\pm$ 1.00	1.89	4.84	4.04	3.87–4.19
Г4	8	3.34 $\pm$ 0.51	2.80	4.14	3.14	3.09–3.51
Г5	8	3.70 $\pm$ 0.72	2.91	4.51	4.01	2.98–4.11
One-way ANOVA: $F(4, 35) = 11.08$, $p < 0.001$						

Кај Г1, концентрацијата на MDA во крвен серум изнесуваше 2.91 ± 0.56 mmol/L, со најниска вредност од 1.99 mmol/L и највисока вредност од 3.60 mmol/L. Кај 50% од животните од Г1, концентрацијата беше помала од 3.01 mmol/L, за Median IQR = 3.01 (2.54–3.31) (Табела 16).

Кај Г2, концентрацијата на MDA во крвен серум изнесуваше 5.27 ± 1.10 mmol/L, со најниска вредност од 4.01 mmol/L и највисока вредност од 7.11 mmol/L. Кај 50% од животните од Г2, концентрацијата беше помала од 5.05 mmol/L, за Median IQR = 5.05 (4.52–5.84) (Табела 16).

Кај Г3, концентрацијата на MDA во крвен серум изнесуваше 3.81 ± 1.00 mmol/L, со најниска вредност од 1.89 mmol/L и највисока вредност од 4.84 mmol/L. Кај 50% од животните од Г3, концентрацијата беше помала од 4.04 mmol/L, за Median IQR = 4.04 (3.87–4.19) (Табела 16).

Кај Г4, концентрацијата на MDA во крвен серум изнесуваше 3.34 ± 0.51 mmol/L, со најниска вредност од 2.80 mmol/L и највисока вредност од 4.14 mmol/L. Кај 50% од животните од Г4, концентрацијата беше помала од 3.14 mmol/L, за Median IQR = 3.14 (3.09–3.51) (Табела 16).

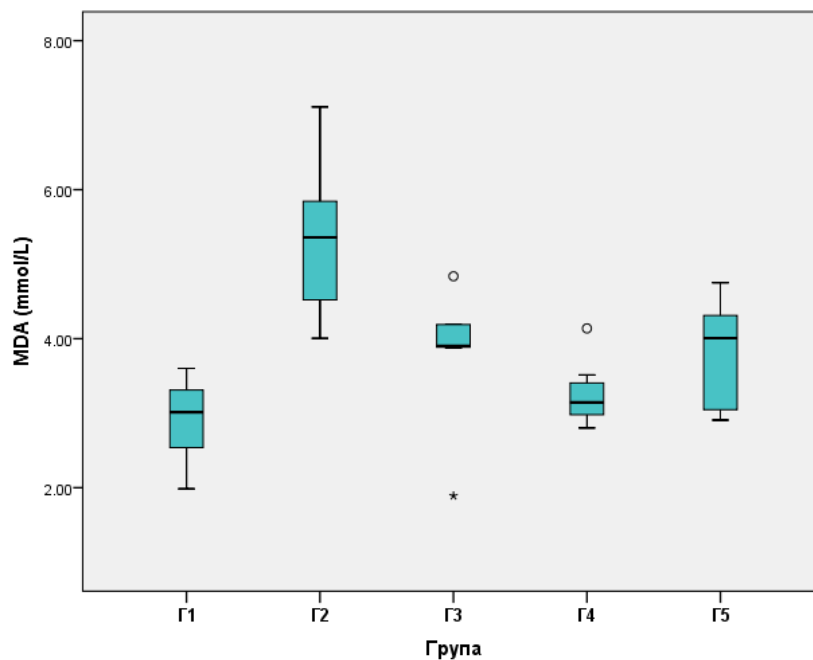
Кај Г5, концентрацијата на MDA во крвен серум изнесуваше 3.70 ± 0.72 mmol/L, со најниска вредност од 2.91 mmol/L и највисока вредност од 4.51 mmol/L. Кај 50% од животните од Г5, концентрацијата беше помала од 4.01 mmol/L, за Median IQR = 4.01 (2.98–4.11) (Табела 16).

Највисоки вредности на MDA имаше во Г2, а најниски во Г1 (Табела 16).

Согласно анализата направена со ANOVA, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во однос на концентрацијата на MDA ($F(4, 35) = 11.08$, $p < 0.001$) (Табела 16). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Tukey post hoc тест и примена на Bonferroni корекција (Табела 17).

Табела 17: Post hoc анализа на концентрацијата на MDA (mmol/L)

Споредба на групи	Mean difference	Std. Error	Adj. Sig.	Статистичка значајност
Г1 – Г2	-2.40738	0.38850	0.000	Да
Г1 – Г3	-0.91239	0.40214	0.302	Не
Г1 – Г4	-0.35068	0.40214	1.000	Не
Г1 – Г5	-0.85554	0.40214	0.412	Не
Г2 – Г3	1.49498	0.40214	0.008	Да
Г2 – Г4	2.05670	0.40214	0.000	Да
Г2 – Г5	1.55184	0.40214	0.005	Да
Г3 – Г4	0.56171	0.41533	1.000	Не
Г3 – Г5	0.05686	0.41533	1.000	Не
Г4 – Г5	-0.50486	0.41533	1.000	Не



Графикон 15: Разлики во концентрацијата на MDA (mmol/L) помеѓу групите

Анализата покажа дека Г2 имаше значајно повисоки вредности во споредба со Г1 ($p < 0.001$), Г3 ($p = 0.008$), Г4 ($p < 0.001$) и Г5 ($p = 0.005$). Меѓу останатите групи немаше детектирани значајни разлики (Табела 17, Графикон 15).

5.3.4 Анализа на активноста на SOD (kU/mg протеини)

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за активноста на SOD укажа на постоење неправилна дистрибуција ($W=0.898$; $p=0.023$). Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни непараметарски тестови.

Табела 18: Анализа на активноста на SOD (kU/mg протеини)

SOD (kU/mg протеини)	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Median	IQR
Г1	8	1756.14 $\pm$ 256.70	1299.93	2180.13	1759.52	1637.03–1887.97
Г2	8	798.84 $\pm$ 233.50	597.66	1309.46	731.08	698.45–778.41
Г3	8	1124.37 $\pm$ 153.90	965.10	1376.05	1109.48	987.81–1198.29
Г4	8	1377.97 $\pm$ 173.93	1191.97	1578.57	1443.30	1198.88–1477.12
Г5	8	2096.34 $\pm$ 494.91	1590.05	2681.81	1832.68	1805.10–2572.05
Kruskal–Wallis test: $\chi^2(4) = 29.443$; $p < 0.001$						

Кај Г1, активноста на SOD во крвен серум изнесуваше 1756.14 $\pm$ 256.70 kU/mg протеини, со најниска вредност од 1299.93 kU/mg протеини и највисока вредност од 2180.13 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г1, активноста беше помала од 1759.52 kU/mg протеини, за Median IQR = 1759.52 (1637.03–1887.97) (Табела 18).

Кај Г2, активноста на SOD во крвен серум изнесуваше 798.84 $\pm$ 233.50 kU/mg протеини, со најниска вредност од 597.66 kU/mg протеини и највисока вредност од 1309.46 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г2, активноста беше помала од 731.08 kU/mg протеини, за Median IQR = 731.08 (698.45–778.41) (Табела 18).

Кај Г3, активноста на SOD во крвен серум изнесуваше 1124.37 $\pm$ 153.90 kU/mg протеини, со најниска вредност од 965.10 kU/mg протеини и највисока вредност од 1376.05 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г3, активноста беше помала од 1109.48 kU/mg протеини, за Median IQR = 1109.48 (987.81–1198.29) (Табела 18).

Кај Г4, активноста на SOD во крвен серум изнесуваше 1377.97 $\pm$ 173.93 kU/mg протеини, со најниска вредност од 1191.97 kU/mg протеини и највисока вредност од 1578.57 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г4, активноста беше помала од 1443.30 kU/mg протеини, за Median IQR = 1443.30 (1198.88–1477.12) (Табела 18).

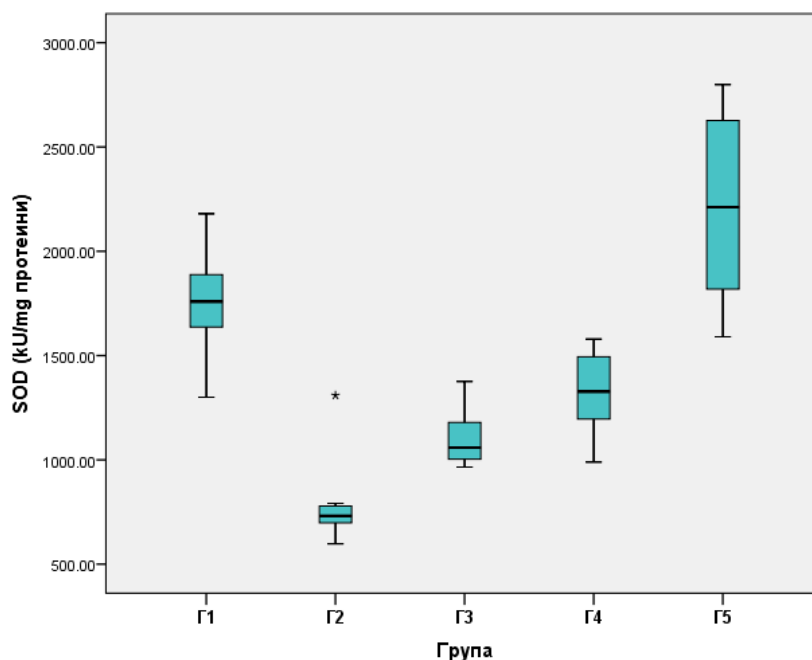
Кај Г5, активноста на SOD во крвен серум изнесуваше 2096.34 $\pm$ 494.91 kU/mg протеини, со најниска вредност од 1590.05 kU/mg протеини и највисока вредност од 2681.81 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г5, активноста беше помала од 1832.68 kU/mg протеини, за Median IQR = 1832.68 (1805.10–2572.05) (Табела 18).

Највисоки вредности на активноста на SOD имаше во Г5, а најниски во Г2 (Табела 18).

Согласно анализата направена со Kruskal–Wallis тестот, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во однос на активноста на SOD ($\chi^2(4) = 29.443$; $p < 0.001$) (Табела 18). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Dunn's тест и примена на Bonferroni корекција (Табела 19).

Табела 19: Post hoc анализа на активноста на SOD (kU/mg протеини)

Споредба на групи	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.	Статистичка значајност
Г1 – Г2	21.679	5.602	3.870	0.000	0.001	Да
Г1 – Г3	15.679	5.602	2.799	0.005	0.051	Не
Г1 – Г4	9.875	5.412	1.825	0.068	0.681	Не
Г1 – Г5	-5.036	5.602	-0.899	0.369	1.000	Не
Г2 – Г3	-6.000	5.786	-1.037	0.300	1.000	Не
Г2 – Г4	-11.804	5.602	-2.107	0.035	0.351	Не
Г2 – Г5	-26.714	5.786	-4.617	0.000	0.000	Да
Г3 – Г4	-5.804	5.602	-1.036	0.300	1.000	Не
Г3 – Г5	-20.714	5.786	-3.580	0.000	0.003	Да
Г4 – Г5	-14.911	5.602	-2.662	0.008	0.078	Не



Графикон 16: Разлики во активноста на SOD (kU/mg протеини) помеѓу групите

Анализата покажа дека Г1 имаше значајно повисоки вредности во однос на Г2 ($p = 0.001$), а Г5 имаше значајно повисоки вредности во споредба со Г2 ($p < 0.001$) и со Г3 ($p = 0.003$). Меѓу останатите групи немаше статистички значајни разлики (Табела 19, Графикон 16).

5.3.5 Анализа на активноста на GR (kU/mg протеини)

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за активноста на GR укажа на постоење правилна дистрибуција ($W=0.927$; $p=0.093$). Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни параметарски тестови.

Табела 20: Анализа на активноста на GR (kU/mg протеини)

GR (kU/mg протеини)	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Median	IQR
Г1	8	9.03 $\pm$ 1.88	6.11	11.82	8.74	7.83–10.60
Г2	8	3.13 $\pm$ 0.63	2.25	3.88	2.94	2.73–3.69
Г3	8	6.58 $\pm$ 1.68	4.09	9.19	6.56	5.98–7.13
Г4	8	5.74 $\pm$ 2.30	2.92	8.49	6.25	3.88–7.14
Г5	8	9.30 $\pm$ 1.40	8.13	10.99	8.44	8.29–10.64
One-way ANOVA: $F(4, 35) = 20.80$, $p < 0.001$						

Кај Г1, активноста на GR во крвен серум изнесуваше 9.03 ± 1.88 kU/mg протеини, со најниска вредност од 6.11 kU/mg протеини и највисока вредност од 11.82 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г1, активноста беше помала од 8.74 kU/mg протеини, за Median IQR = 8.74 (7.83–10.60) (Табела 20).

Кај Г2, активноста на GR во крвен серум изнесуваше 3.13 ± 0.63 kU/mg протеини, со најниска вредност од 2.25 kU/mg протеини и највисока вредност од 3.88 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г2, активноста беше помала од 2.94 kU/mg протеини, за Median IQR = 2.94 (2.73–3.69) (Табела 20).

Кај Г3, активноста на GR во крвен серум изнесуваше 6.58 ± 1.68 kU/mg протеини, со најниска вредност од 4.09 kU/mg протеини и највисока вредност од 9.19 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г3, активноста беше помала од 6.56 kU/mg протеини, за Median IQR = 6.56 (5.98–7.13) (Табела 20).

Кај Г4, активноста на GR во крвен серум изнесуваше 5.74 ± 2.30 kU/mg протеини, со најниска вредност од 2.92 kU/mg протеини и највисока вредност од 8.49 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г4, активноста беше помала од 6.25 kU/mg протеини, за Median IQR = 6.25 (3.88–7.14) (Табела 20).

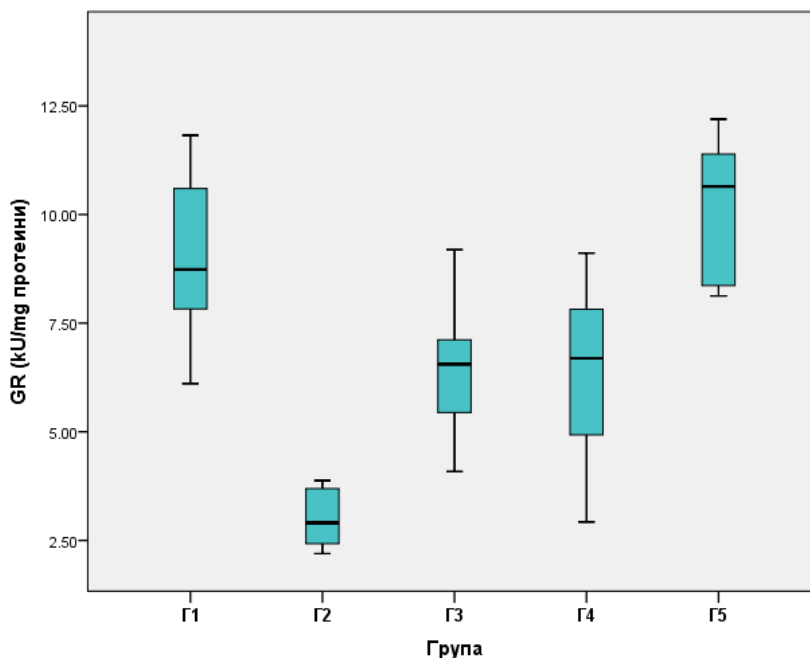
Кај Г5, активноста на GR во крвен серум изнесуваше 9.30 ± 1.40 kU/mg протеини, со најниска вредност од 8.13 kU/mg протеини и највисока вредност од 10.99 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г5, активноста беше помала од 8.44 kU/mg протеини, за Median IQR = 8.44 (8.29–10.64) (Табела 20).

Највисоки вредности на активноста на GR имаше во Г5, а најниски во Г2 (Табела 20).

Согласно анализата направена со ANOVA, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во однос на активноста на GR ($F(4, 35) = 20.80, p < 0.001$) (Табела 20). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Tukey post hoc тест и примена на Bonferroni корекција (Табела 21).

Табела 21: Post hoc анализа на активноста на GR (kU/mg протеини)

Споредба на групи	Mean difference	Std. Error	Adj. Sig.	Статистичка значајност
Г1 – Г2	6.01605	0.83373	0.000	Да
Г1 – Г3	2.59192	0.83373	0.038	Да
Г1 – Г4	2.66780	0.83373	0.030	Да
Г1 – Г5	-1.03599	0.86299	1.000	Не
Г2 – Г3	-3.42413	0.83373	0.002	Да
Г2 – Г4	-3.34825	0.83373	0.003	Да
Г2 – Г5	-7.05203	0.86299	0.000	Да
Г3 – Г4	0.07588	0.83373	1.000	Не
Г3 – Г5	-3.62791	0.86299	0.002	Да
Г4 – Г5	-3.70378	0.86299	0.001	Да



Графикон 17: Разлики во активноста на GR (kU/mg протеини) помеѓу групите

Анализата покажа дека Г1 имаше значајно повисоки вредности во споредба со Г2 ($p < 0.001$), Г3 ($p = 0.038$) и Г4 ($p = 0.030$). Дополнително, Г2 имаше значајно пониски вредности во споредба со Г3 ($p = 0.002$), Г4 ($p = 0.003$) и Г5 ($p < 0.001$). Г5 имаше статистички значајно повисоки вредности од Г3 ($p = 0.002$) и Г4 ($p = 0.001$). Меѓу останатите групи (Г1-Г5 и Г3-Г4) немаше детектирани значајни разлики (Табела 21, Графикон 17).

5.3.6 Анализа на активноста на CAT (kU/mg протеини)

Анализата на дистрибуцијата на вредностите за активноста на CAT укажа на постоење правилна дистрибуција ($W=0.974$; $p=0.873$). Согласно дистрибуцијата, во понатамошните анализи беа користени соодветни параметарски тестови.

Табела 22: Анализа на активноста на CAT (kU/mg протеини)

CAT (kU/mg протеини)	Бр. (N)	Mean $\pm$ SD	Min	Max	Median	IQR
Г1	8	3356.53 $\pm$ 292.34	2900.13	3700.35	3362.03	3144.59–3619.26
Г2	8	1662.65 $\pm$ 460.84	980.09	2189.05	1736.15	1348.14–2018.50
Г3	8	2902.89 $\pm$ 146.89	2679.70	3090.09	2890.14	2832.13–3035.12
Г4	8	2530.94 $\pm$ 347.42	2254.30	3121.27	2454.35	2303.24–2521.56
Г5	8	3888.46 $\pm$ 250.83	3490.09	4135.12	3992.86	3811.83–4012.39
One-way ANOVA: $F(4, 35) = 64.37$, $p < 0.001$						

Кај Г1, активноста на CAT во крвен серум изнесуваше 3356.53 ± 292.34 kU/mg протеини, со најниска вредност од 2900.13 kU/mg протеини и највисока вредност од 3700.35 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г1, активноста беше помала од 3362.03 kU/mg протеини, за Median IQR = 3362.03 (3144.59–3619.26) (Табела 22).

Кај Г2, активноста на CAT во крвен серум изнесуваше 1662.65 ± 460.84 kU/mg протеини, со најниска вредност од 980.09 kU/mg протеини и највисока вредност од 2189.05 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г2, активноста беше помала од 1736.15 kU/mg протеини, за Median IQR = 1736.15 (1348.14–2018.50) (Табела 22).

Кај Г3, активноста на CAT во крвен серум изнесуваше 2902.89 ± 146.89 kU/mg протеини, со најниска вредност од 2679.70 kU/mg протеини и највисока вредност од 3090.09 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г3, активноста беше помала од 2890.14 kU/mg протеини, за Median IQR = 2890.14 (2832.13–3035.12) (Табела 22).

Кај Г4, активноста на CAT во крвен серум изнесуваше 2530.94 ± 347.42 kU/mg протеини, со најниска вредност од 2254.30 kU/mg протеини и највисока вредност од 3121.27 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г4, активноста беше помала од 2454.35 kU/mg протеини, за Median IQR = 2454.35 (2303.24–2521.56) (Табела 22).

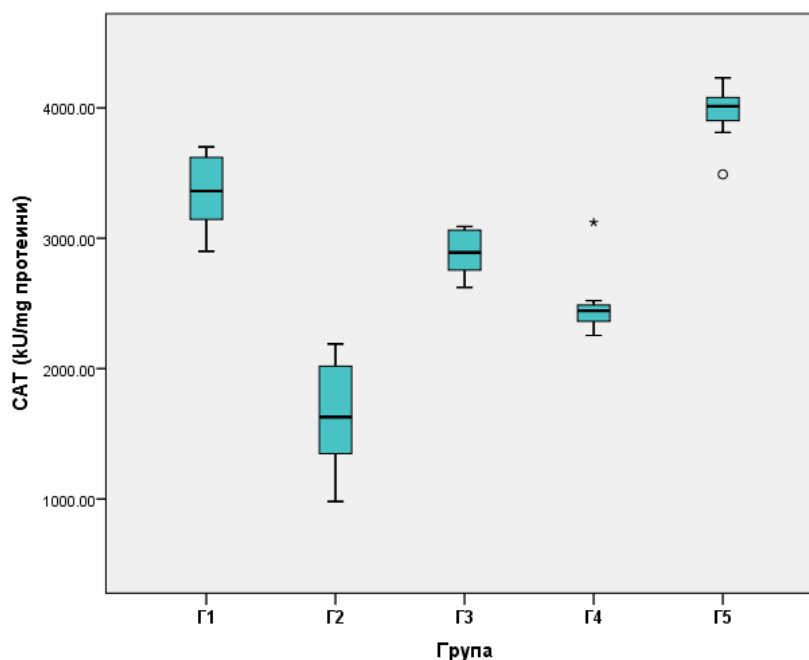
Кај Г5, активноста на CAT во крвен серум изнесуваше 3888.46 ± 250.83 kU/mg протеини, со најниска вредност од 3490.09 kU/mg протеини и највисока вредност од 4135.12 kU/mg протеини. Кај 50% од животните од Г5, активноста беше помала од 3992.86 kU/mg протеини, за Median IQR = 3992.86 (3811.83–4012.39) (Табела 22).

Највисоки вредности на активноста на CAT имаше во Г5, а најниски во Г2 (Табела 22).

Согласно анализата направена со ANOVA, беше утврдена статистички значајна разлика помеѓу групите во однос на активноста на CAT ($F(4, 35) = 64.37, p < 0.001$) (Табела 22). Со цел да се идентификуваат групите меѓу кои постојат статистички значајни разлики, беше спроведена post hoc анализа со Tukey post hoc тест и примена на Bonferroni корекција (Табела 23).

Табела 23: Post hoc анализа на активноста на CAT (kU/mg протеини)

Споредба на групи	Mean difference	Std. Error	Adj. Sig.	Статистичка значајност
Г1 – Г2	1711.56205	149.74878	0.000	Да
Г1 – Г3	465.50132	149.74878	0.039	Да
Г1 – Г4	853.72188	155.00471	0.000	Да
Г1 – Г5	-599.90377	155.00471	0.005	Да
Г2 – Г3	-1246.06073	149.74878	0.000	Да
Г2 – Г4	-857.84016	155.00471	0.000	Да
Г2 – Г5	-2311.46582	155.00471	0.000	Да
Г3 – Г4	388.22057	155.00471	0.174	Не
Г3 – Г5	-1065.40509	155.00471	0.000	Да
Г4 – Г5	-1453.62566	160.08818	0.000	Да



Графикон 18: Разлики во активноста на CAT (kU/mg протеини) помеѓу групите

Анализата покажа дека Г5 имаше значајно повисоки вредности во споредба со сите останати групи: Г1 ($p = 0.005$), Г2 ($p < 0.001$), Г3 ($p < 0.001$) и Г4 ($p < 0.001$). Г1 имаше значајно повисоки вредности во споредба со Г2 ($p < 0.001$), Г3 ($p = 0.039$) и Г4 ($p < 0.001$). Г2 имаше значајно пониски вредности во споредба со Г3 ($p < 0.001$), Г4 ($p < 0.001$) и Г5 ($p < 0.001$). Немаше детектирана статистички значајна разлика меѓу Г3-Г4 (Табела 23, Графикон 18).

5.3.7 Анализа на поврзаноста помеѓу биохемиските параметри

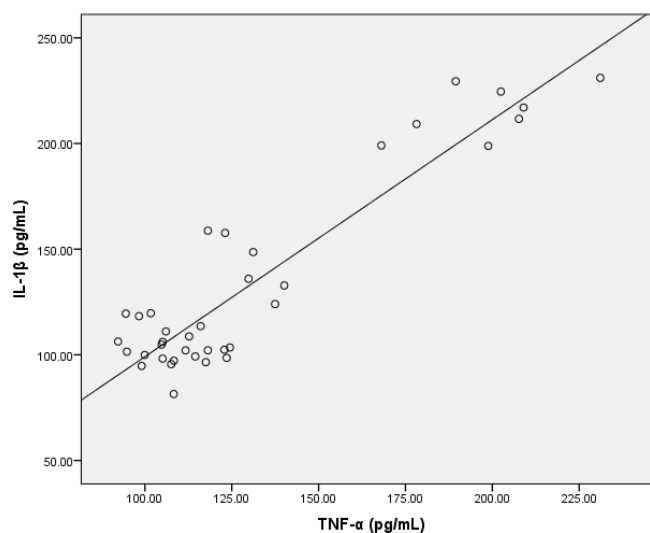
Во овој дел беше направена анализа на поврзаноста помеѓу биохемиските параметри (TNF- α , IL-1 β , MDA, SOD, GR и CAT) со помош на Spearman's Rank Correlation.

Табела 24: Корелација помеѓу испитуваните параметри

			TNF- α	IL-1 β	MDA	SOD	GR	CAT
Spearman	TNF- α	r	1.000	.666	.311	-.336	-.538	-.676
		p	.	.000	.061	.045	.000	.000
		n	40	40	40	40	40	40
	IL-1 β	r	.666	1.000	.415	-.738	-.750	-.892
		p	.000	.	.012	.000	.000	.000
		n	40	40	40	40	40	40
	MDA	r	.311	.415	1.000	-.470	-.405	-.534
		p	.061	.012	.	.004	.014	.001
		n	40	40	40	40	40	40
	SOD	r	-.336	-.738	-.470	1.000	.673	.819
		p	.045	.000	.004	.	.000	.000
		n	40	40	40	40	40	40
	GR	r	-.538	-.750	-.405	.673	1.000	.747
		p	.000	.000	.014	.000	.	.000
		n	40	40	40	40	40	40
	CAT	r	-.676	-.892	-.534	.819	.747	1.000
		p	.000	.000	.001	.000	.000	.
		n	40	40	40	40	40	40

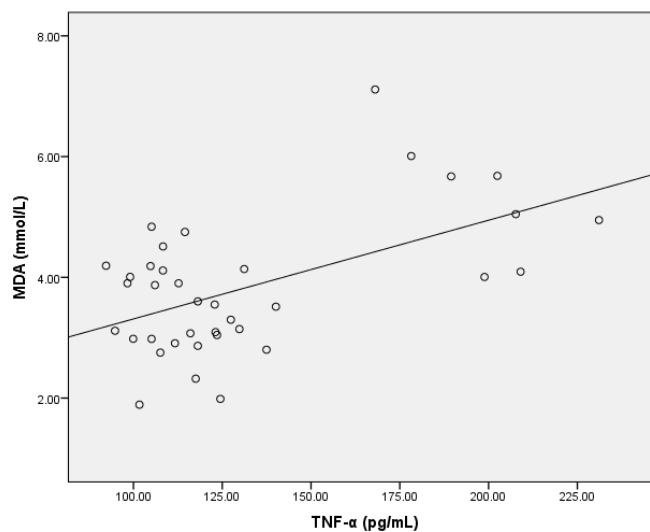
TNF- α = тумор-некрозен фактор α ; IL-1 β = интерлеукин-1 β ; MDA = малондиалдехид; SOD = супероксид дисмутаза; GR = глутатион редуктаза; CAT = каталаза

Согласно Spearman's Rank Correlation анализата, за $p < 0.05$ беше утврдена статистички значајна корелација помеѓу сите испитувани параметри, со исклучок на анализата помеѓу TNF- α и MDA ($r = 0.311$, $p = 0.061$) (Табела 24). Корелациите прикажани во табелата ќе бидат разгледани и интерпретирани во продолжение на овој дел.



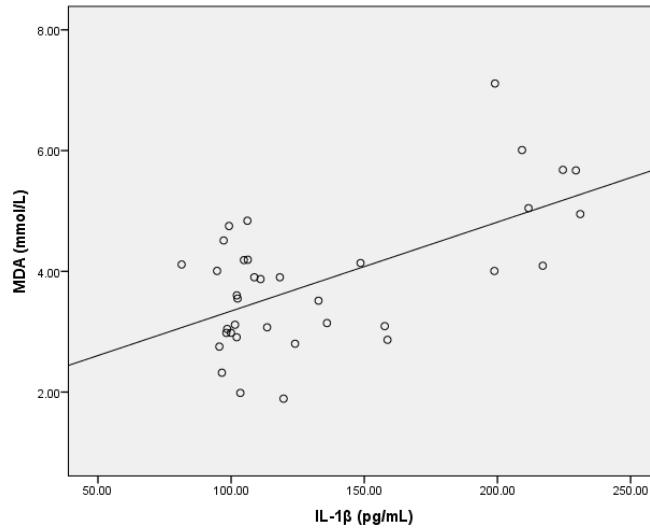
Графикон 19: Корелација помеѓу TNF- α и IL-1 β

За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна позитивна корелација помеѓу TNF- α и IL-1 β ($r = 0.666$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 19). Со зголемување на нивото на TNF- α , значајно се зголемуваа и нивото на IL-1 β , т.е. инфламаторните медијатори истовремено се зголемуваа.



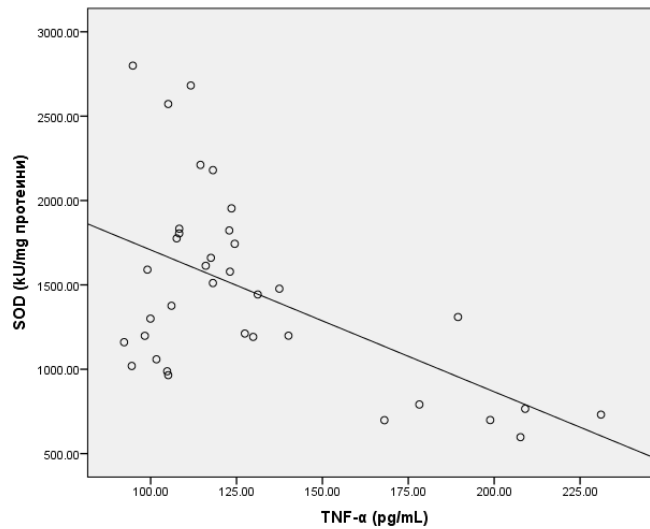
Графикон 20: Корелација помеѓу TNF- α и MDA

За $p > 0.05$, не беше утврдена статистички значајна корелација помеѓу TNF- α и MDA ($r = 0.311$; $p = 0.061$) (Табела 24, Графикон 20)



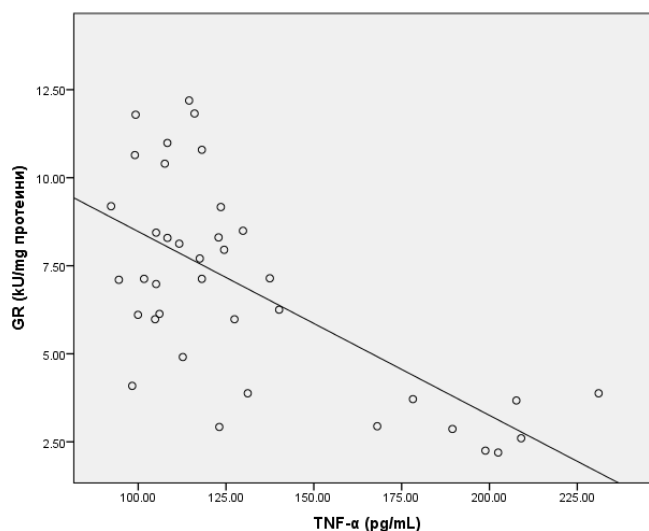
Графикон 21: Корелација помеѓу IL-1 β и MDA

За $p < 0.05$, беше утврдена статистички значајна позитивна корелација помеѓу IL-1 β и MDA ($r = 0.415$; $p = 0.012$) (Табела 24, Графикон 21). Со пораст на IL-1 β , се зголемувахе и концентрацијата на MDA.



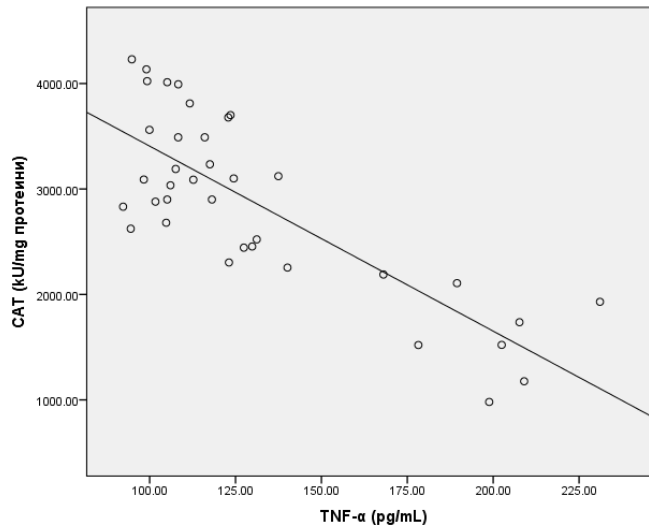
Графикон 22: Корелација помеѓу TNF- α и SOD

За $p < 0.05$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу TNF- α и SOD активност ($r = -0.336$; $p = 0.045$) (Табела 24, Графикон 22). Со зголемување на TNF- α , активност на SOD значајно се намалувахе.



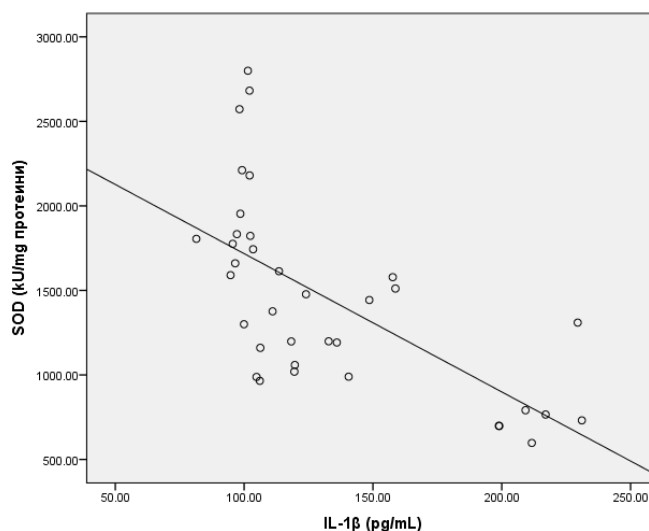
Графикон 23: Корелација помеѓу TNF- α и GR

За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу TNF- α и GR ($r = -0.538$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 23). Повисоките нивоа на TNF- α беа придружени со пониска активност на GR.



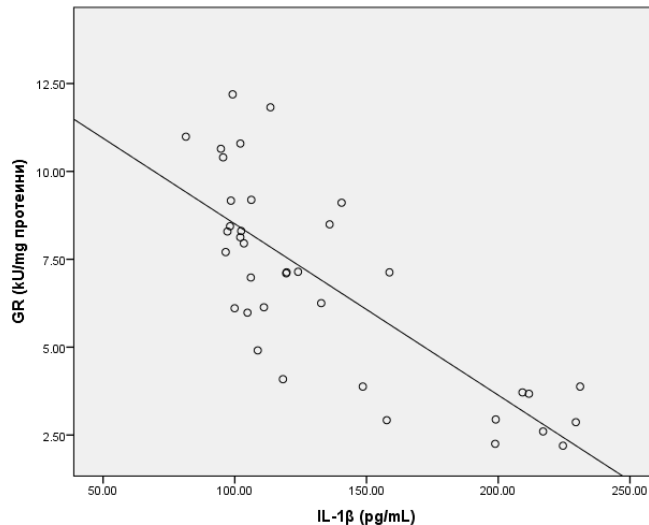
Графикон 24: Корелација помеѓу TNF- α и CAT

За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу TNF- α и CAT ($r = -0.676$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 24). Со зголемување на TNF- α , активноста на CAT значајно се намалуваше.



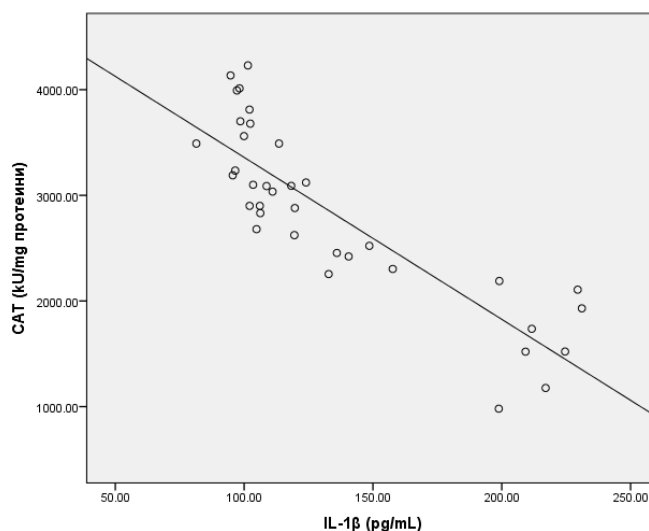
Графикон 25: Корелација помеѓу IL-1 β и SOD

За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу IL-1 β и SOD ($r = -0.738$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 25). Со пораст на IL-1 β , активноста на SOD значајно се намалуваше.



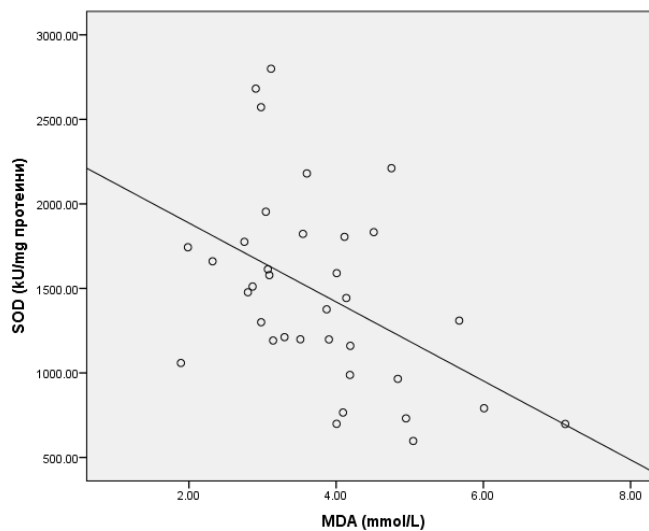
Графикон 26: Корелација помеѓу IL-1 β и GR

За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу IL-1 β и GR ($r = -0.750$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 26). Поголемите вредности на IL-1 β беа поврзани со намалена активност на GR.



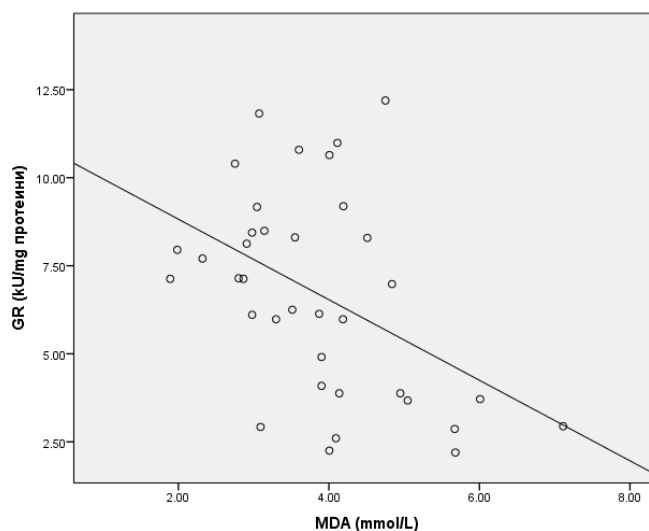
Графикон 27: Корелација помеѓу IL-1 β и CAT

За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна многу силна негативна корелација помеѓу IL-1 β и CAT ($r = -0.892$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 27). Со зголемување на IL-1 β , активноста на CAT значајно се намалуваше.



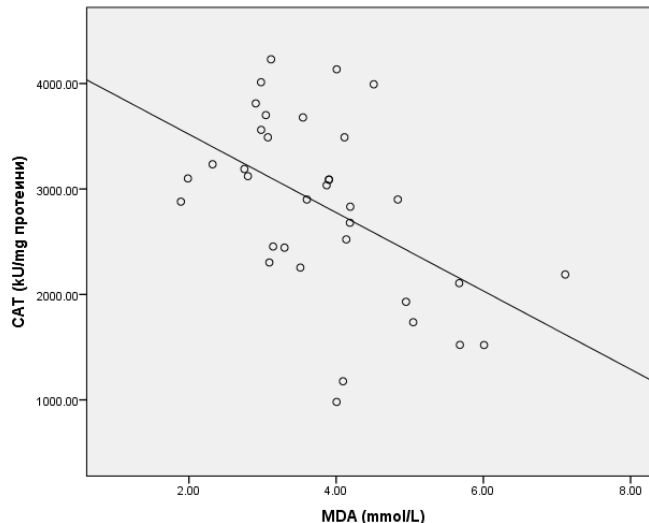
Графикон 28: Корелација помеѓу MDA и SOD

За $p < 0.01$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу MDA и SOD ($r = -0.470$; $p = 0.004$) (Табела 24, Графикон 28). Со зголемување на концентрацијата на MDA, активноста на SOD значајно се намалуваше.



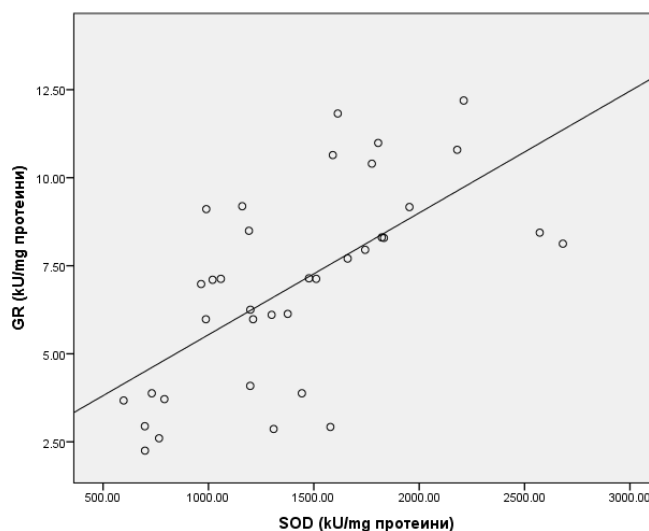
Графикон 29: Корелација помеѓу MDA и GR

За $p < 0.05$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу MDA и GR ($r = -0.405$; $p = 0.014$) (Табела 24, Графикон 29). Поголемите вредности на MDA беа поврзани со пониска активност на GR.



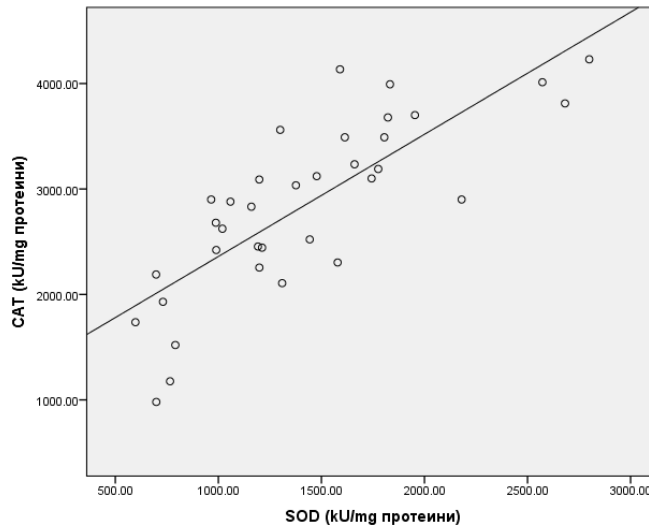
Графикон 30: Корелација помеѓу MDA и CAT

За $p < 0.01$, беше утврдена статистички значајна негативна корелација помеѓу MDA и CAT ($r = -0.534$; $p = 0.001$) (Табела 24, Графикон 30). Со пораст на MDA, активноста на CAT значајно се намалуваше.



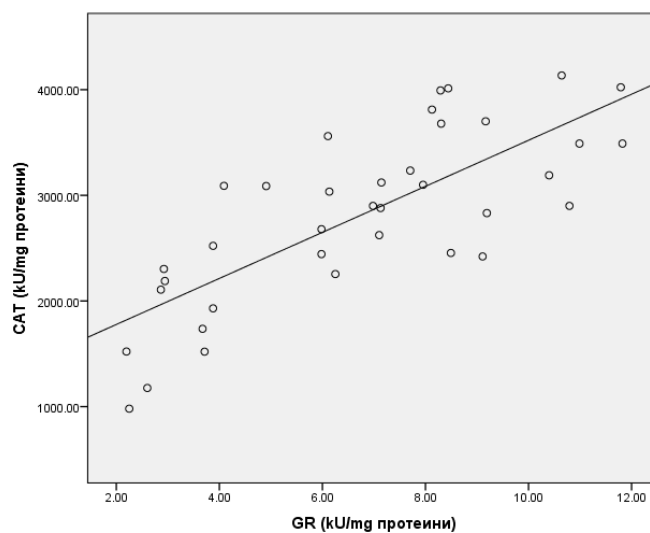
Графикон 31: Корелација помеѓу SOD и GR

За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна позитивна корелација помеѓу SOD и GR ($r = 0.673$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 31). Со зголемување на активноста на SOD, паралелно се зголемуваше и активноста на GR.



Графикон 32: Корелација помеѓу SOD и CAT

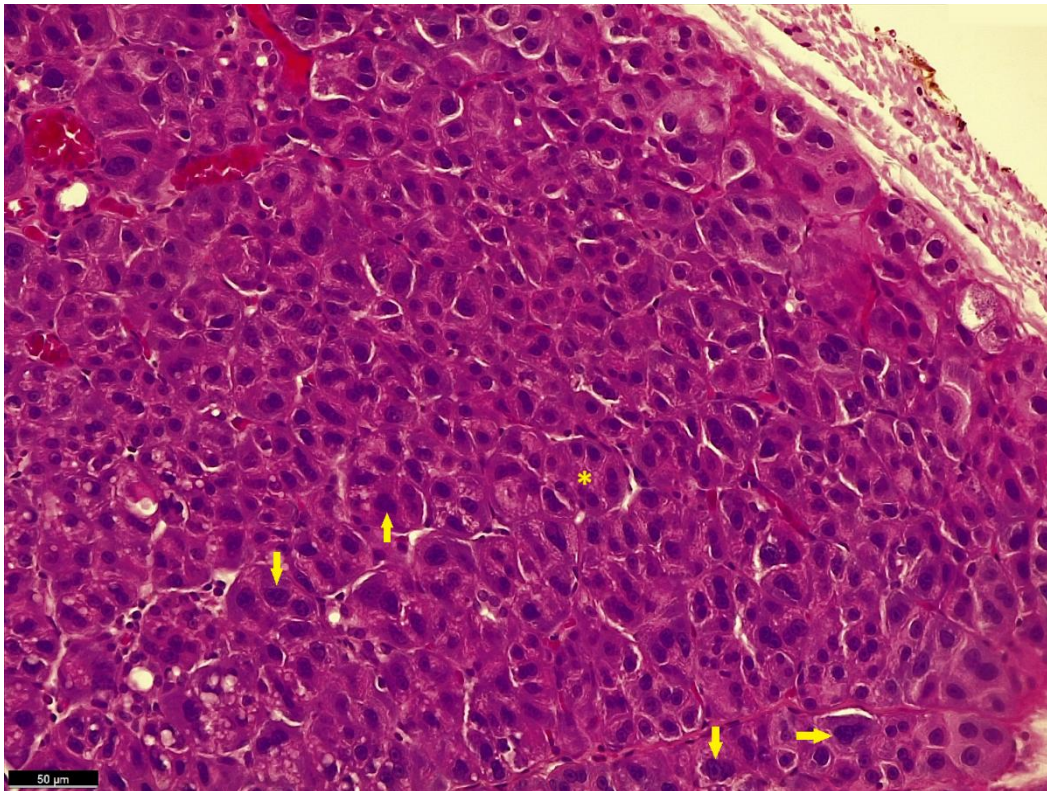
За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна многу силна позитивна корелација помеѓу SOD и CAT ($r = 0.819$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 32). Повисоката активност на SOD беше проследена со значајно зголемување на активноста на CAT.



Графикон 33: Корелација помеѓу GR и CAT

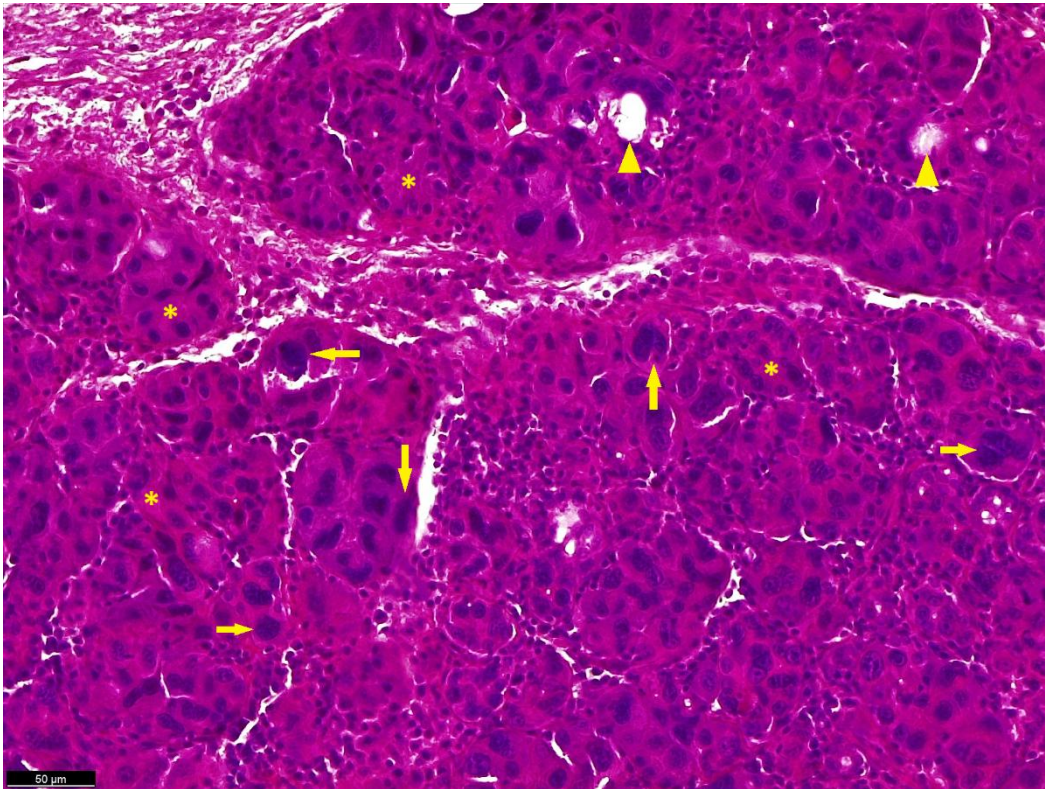
За $p < 0.001$, беше утврдена статистички значајна позитивна корелација помеѓу GR и CAT ($r = 0.747$; $p < 0.001$) (Табела 24, Графикон 33). Со зголемување на GR, активноста на CAT значајно се зголемуваше.

5.4 Анализа на патохистолошките резултати



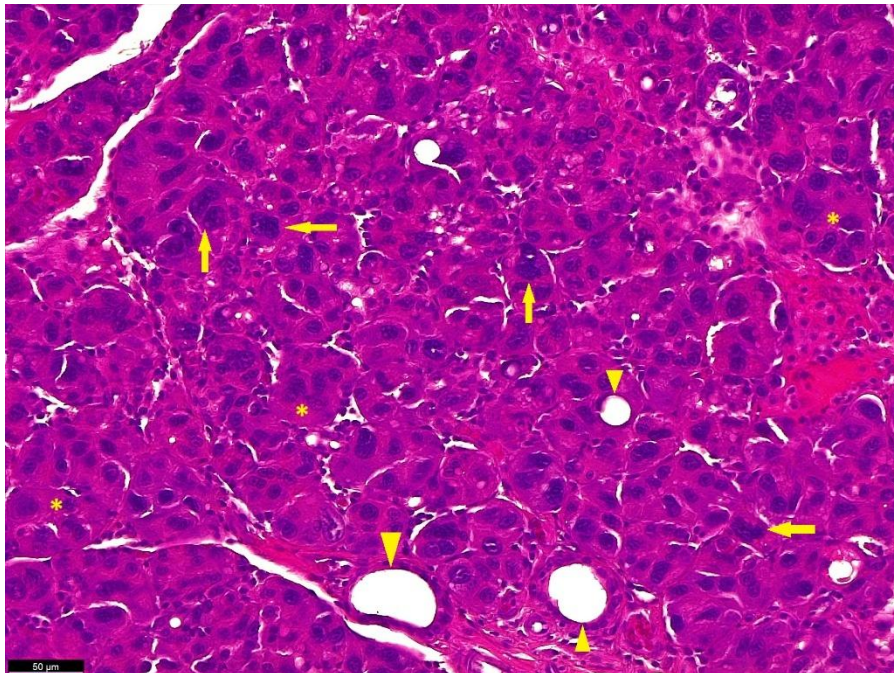
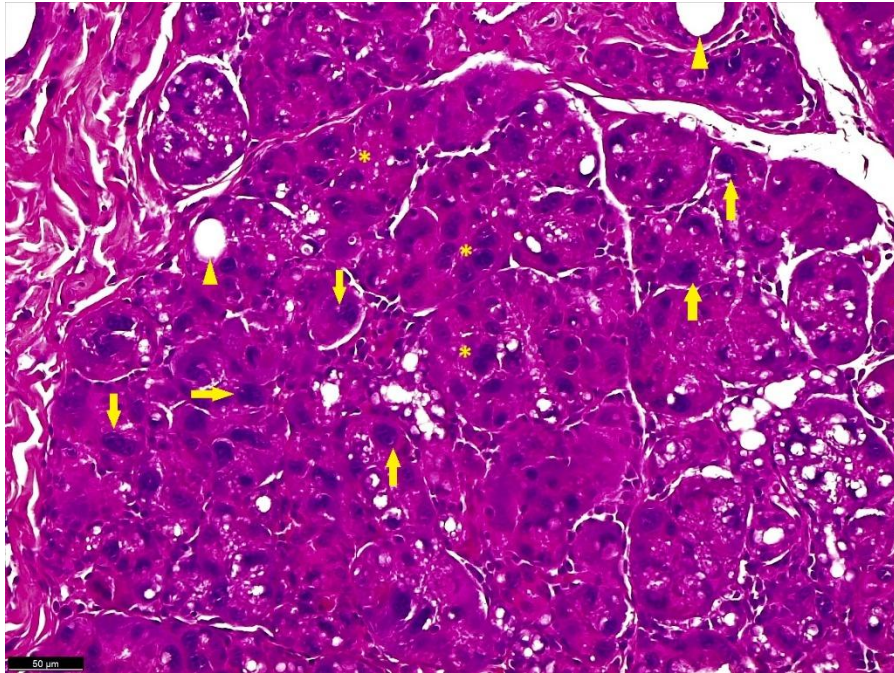
Слика 1: Патохистолошка анализа на паротидната плунковна жлезда (Г1). Зголемување: 400×; скала = 50 μm

На Слика 1 е прикажан Н&Е патохистолошки препарат на паротидна плунковна жлезда (Г1) со зголемени и неправилни јадра (стрелки), кои сепак покажуваат релативно рамномерна дистрибуција во паренхимот (*).



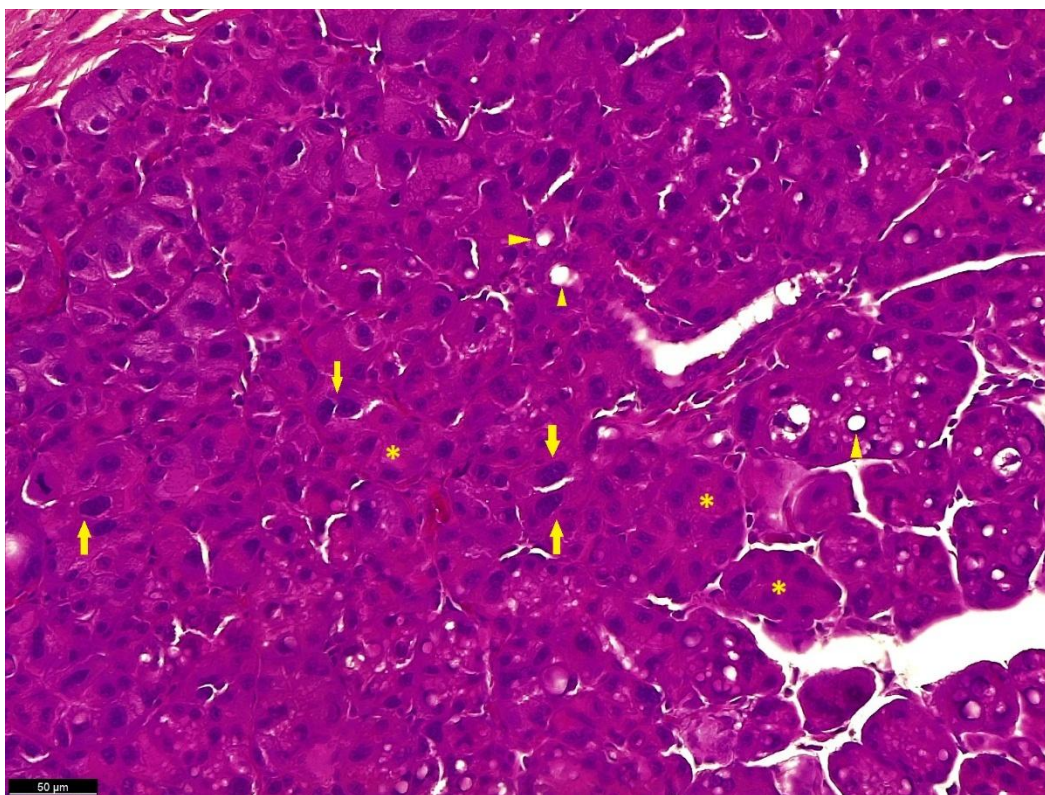
Слика 2: Патохистолошка анализа на паротидната плунковна жлезда (Г2). Зголемување: 400×; скала = 50 µm

На Слика 2 е прикажан Н&Е препарат на паротидна плунковна жлезда (Г2) со изразена нуклеарна атипичност со бројни „монструозни“ јадра (стрелки), нерамномерна дистрибуција на јадрата (*) и појава на интрацитоплазматски вакуоли (триаголници), кои може да претставуваат артефакт.



Слика 3 и 4: Патохистолошка анализа на паротидната плунковна жлезда (Г3 и Г4).
Зголемување: 400×; скала = 50 μm

На Слика 3 и 4 е прикажан Н&Е препарат на паротидна плунковна жлезда (Г3 и Г4) со присутни неправилни јадра (стрелки) кои имаат умерено нерамномерна дистрибуција (*) и појава на интрацитоплазматски вакуоли (триаголници), кои може да претставуваат артефакт со морфолошки промени интермедијарни помеѓу Г1 и Г2.



Слика 5: Патохистолошка анализа на паротидната плунковна жлезда (Г5).
Зголемување: 400×; скала = 50 μm

На Слика 5 е прикажан Н&Е препарат на паротидна плунковна жлезда (Г5) со присутни неправилни јадра (стрелки) кои имаат умерено нерамномерна дистрибуција (*) и појава на интрацитоплазматски вакуоли (триаголници), кои може да претставуваат артефакт со морфолошки промени интермедијарни помеѓу Г1 и Г2.

Цитотоксичните ефекти на хемотерапијата доведуваат до создавање на РКВ, кои предизвикуваат воспалителен одговор на оралната лигавица, што резултира со нарушување на интегритетот на оралниот епител и појава на орален мукозитис [1]. Пациентите со ОМ се соочуваат со значително намалување на квалитетот на животот, при што состојбата може истовремено да наметне и прекин или прилагодување на онколошкиот третман, како и финансиски да го оптовари здравствениот систем [6,221,222]. Современите модели и прегледи на литературата го истакнуваат создавањето на оксидативен стрес како иницијален настан во патогенезата на ОМ, проследен со зголемување на MDA и инхибиција на антиоксидативниот одбранбен систем [25]. Суштински елемент во изучувањето на овие патогенетски механизми се претклиничките студии на анимални модели, кои овозможуваат валидирање на механизми и потенцијални терапии во контролирани услови, пред нивна примена во идните клинички истражувања. Во нашето истражување употребивме валидиран анимален модел на стаорци [48], според чија методологија ОМ се предизвикува со интраперитонеална администрација на 5-FU и вбригување на оцетна киселина во букалната лигавица на стаорците. Улцерациите индуцирани на овој начин покажуваат клинички тек сличен на ОМ кај пациентите и имаат соодветна големина за квантитативна анализа, што го прави избраниот анимален модел особено применлив. Покрај морфолошките промени на мукозата, значајно е да се следи и општата состојба на животните со цел комплетна евалуација на применливоста на анималниот модел.

Следењето на телесната маса и телесната температура овозможува проценка на општата состојба и толеранцијата на интервенциите на животните во анималните модели. Во нашето истражување, телесната маса остана стабилна во текот на експериментот, без значајни разлики ниту помеѓу групите ниту во рамките на групите од почеток до крај (Табела 1, Графикон 1 и 2). Ова укажува дека избраниот протокол на 5-FU (40 mg/kg во три дози) комбиниран со локална апликација на оцетна киселина довел до очекувани улцеративни промени, погодни за квантитативна анализа, но без изразена системска кахексија. Спротивно на тоа, кај анимални модели со повисоки единечни дози на 5-FU е утврден значаен губиток на телесна маса [89]. Кај пациенти со КГВ, губењето на телесна маса и саркопенијата се чести и клинички значајни појави за време на хеморадиотерапија, со негативно влијание врз исходот на заболувањето [223].

Слични резултати добивме и за телесната температура. На почетокот не постоеја значајни разлики, но на крајот од експериментот беше утврдено умерено и статистички значајно покачување во групите третирани со цинк (Г4) и со комбинација од витамин С, глутатион и цинк (Г5), во споредба со негативната контрола (Табела 2, Графикон 3 и 4). Сите вредности останаа во рамки на физиолошкиот опсег, што укажува на добра толеранција, но дискретното покачување може да одразува имуно-метаболичка активација. Кај пациентите на хемотерапија, фебрилните епизоди обично се поврзани со неутропенија и инфекции, а не директно со антиоксидативна интервенција, па стабилноста на температурата во нашиот модел може да се смета како индиректен индикатор за безбедност [224]. Во целина, податоците за телесна маса и температура потврдуваат дека животните го толерираа применетиот протокол на 5-FU и дека третманот со неензимски антиоксиданти не доведе до несакани ефекти на системско ниво.

Варијабилноста во бројот на белите крвни клетки (WBC), како индикатор на имunosупресијата, укажува дека кај позитивната контролна група (Г2), оштетувањето на букалната мукоза и системската инфламаторна реакција веројатно предизвикале

компензаторна леукоцитоза, која делумно го замаглува миелосупресивниот ефект на 5-FU (Табела 3). Наспроти тоа, кај групите третирани со антиоксиданти (Г3–Г5) забележаните пониски и постабилни вредности на WBC (Табела 3), најверојатно одразуваат редуцирана воспалителна реакција и ткивно оштетување, при што не дошло до дополнителна леукоцитоза. Во отсуство на изразена инфламација, вредностите на WBC попрецизно ја рефлектираат имуносупресијата предизвикана од 5-FU. Ова укажува дека антиоксидантите имаат потенцијал да придонесат за намалување на цитотоксичното оштетување и воспалителниот одговор, со што се стабилизира системскиот имунолошки одговор. Ваквото толкување е во согласност со наодите на Al-Asmari и сор. [92], кои при третман на ткиво од тенко црево со 5-FU забележале зголемена активност на миелопероксидаза (MPO; ензим кој го лачат инфламаторните клетки, кој е познат маркер на воспалението) и зголемена експресија на NF- κ B и COX-2, додека при третман со витамин Ц, значајно се намалиле овие параметри. Овие резултати укажуваат на редуцирана инфламаторна инфилтрација од страна на неутрофилите во групата третирана со витамин Ц. Врз основа на ова, пониските и постабилни вредности на WBC кај групите третирани со антиоксиданти во нашиот модел, може да се толкуваат како последица на намалена воспалителна реакција, без дополнителна леукоцитоза која би го маскирала миелосупресивниот ефект на 5-FU.

Во периодот од 14 дена (седум временски интервали; t_0 – t_6) по апликацијата на оцетната киселина, сите групи покажаа прогресивно намалување на големината на лезиите (Repeated measures ANOVA – ефект на време: $F(6,168)=32.90$, $p<0.001$, $\eta^2=.540$), со целосна епителизација до 14-от ден кај сите животни од Г4 (Zn) и Г5 (Vit.C+GSH+Zn), додека кај дел од животните од Г2 (ПК) и Г3 (Vit.C+GSH) останаа неепителизирани лезии (средни вредности 0.8–1.4 mm, опсег 0-5mm) (Табела 11, Графикон 12). Резултатите на комплетна епителизација на лезиите кај скоро сите животни во Г2 укажува на тоа дека иако во оваа група иницијалните лезии беа најголеми ($t_{0,24ч}$; 4.5 ± 2.7), по прекин на хемотерапискиот инсулт, лезиите, побавно, но спонтано епителизираат скоро слично како кај третираните групи (Г3–Г5), нагласувајќи го самолимитирачкиот карактер на ОМ (Табела 4 и 11, Графикон 5 и 12). Нашите резултати се слични на резултатите добиени во истражувањето на Yoshino и сор. [26], каде што промените кај ОМ индуциран од 5-FU на хрчаци со доза 60mg/kg и 10% оцетна киселина, скоро комплетно епителизирале на 16-от ден.

Доколку ја анализираме ефикасноста на различните третмани, можеме да забележиме дека резултатите укажуваат на поголема ефикасност во Г5 во повеќе временски точки (најмал просечен дијаметар од t_0 до t_4 , т.е. од 24ч до 9д), но вкупниот ефект на група и интеракцијата време-група не беа статистички значајни (Repeated measures ANOVA – ефект на група: $F(3,28)=0.16$, $p=.922$, $\eta^2=.017$; Repeated measures ANOVA – интеракција време-група: $F(18,168)=0.94$, $p=.537$, $\eta^2=.091$), што укажува на тоа дека динамиката на заздравување не зависи статистички значајно од применетиот третман во рамките на ова истражување (Табела 11, Графикон 12). Но, сепак, иако анализите не детектираа статистички значајна разлика, можеме да забележиме дека постојат разлики во големината на лезиите и динамиката на заздравување во различните групи, што наметнува две значајни прашања:

- 1) На кој начин би можеле антиоксидантите да влијаат на овие разлики?
- 2) Кои фактори би можеле да придонесат за отсуството на статистички значајна разлика?

За да добиеме одговор на овие прашања, потребно е да ги анализираме лезиите и нивното заздравување во целиот период, да ги утврдиме биолошките механизми преку коишто различните антиоксиданти би можеле да влијаат на резултатите, како и да ја разгледаме методологијата на анималниот модел којашто исто така би можела да придонесе за отсуството на статистички значајна разлика помеѓу групите, во однос на ефикасноста на третманот.

Во првиот временски интервал, 24 часа по апликацијата на оцетната киселина (t_0), лезиите беа најмали во Г5 ($3.1 \pm 3.0 \text{ mm}$), најголеми во Г2 ($4.5 \pm 2.7 \text{ mm}$), со слични димензии и во Г4 (Г4: $4.4 \pm 1.9 \text{ mm}$), додека Г3 ($3.6 \pm 3.0 \text{ mm}$) имаше помали лезии од Г4, но поголеми од Г5 (Табела 4, Графикон 5). Во фазата на инцијалниот одговор на оштетување на ОМ според моделот на Sonis [82], РКВ предизвикани од хемотерапијата доведуваат до активирање на транскрипциони фактори, како што е NF- κ B, кој ја зголемува концентрацијата на инфламаторните медијатори, меѓу кои и TNF- α и IL-1 β , како и нивна акумулација во ткивата, изумирање на клетките од базалниот слој и ткивно оштетување [24]. Овој патогенетски механизам била истражуван од страна на Du и сор. [225], кои ја потврдиле улогата на витамин Ц, потпомогната од страна на глутатионот, во инхибиција на NF- κ B преку создавање на физиолошки концентрации на РКВ. Од друга страна, цинкот не го инхибира создавањето на инфламаторните медијатори, туку ја стимулира реепителизацијата и овозможува побрзо заздравување на лезиите [226–228]. Овие податоци за цинкот се потврдуваат и во истражувањето на Katayama и сор. [229], кои го евалуирале ефектот на цинк кај стоматитис предизвикан од оцетна киселина на хрчаци, при што утврдиле корисен ефект од употреба на цинкот во реепителизација на лезиите. Сепак, цинкот влијае врз РКВ преку создавање на металотионеини, кои ги отстрануваат РКВ [69]. На овој начин цинкот би можел да доведе до индиректна инхибиција на NF- κ B, преку намалувањето на РКВ, но не во толку голема мера како витамин Ц и глутатион. Најмалата големина на лезиите во Г5 во t_0 може да се опише како синергистички ефект на трите антиоксиданти. Дополнително, концентрацијата на TNF- α и IL-1 β во нашето истражување покажа статистички значајно повисоки вредности на овие параметри во Г4, во споредба со Г3 (TNF- α , $p = 0.001$) и Г5 (TNF- α , $p = 0.006$, IL-1 β , $p = 0.004$), со исклучок на IL-1 β меѓу Г3-Г4, каде концентрациите на Г4 беа повисоки, но не и статистички значајни (Табела 12-15, Графикон 13 и 14). Опишаните механизми, како и резултатите за инфламаторните медијатори од нашето истражување, ја објаснуваат разликата помеѓу ефектот на витамин Ц и глутатион, наспроти цинкот, како и причината, зошто големината на лезиите на Г4 во t_0 е слична на Г2 (Табела 4, Графикон 5).

Во периодот кој следуваше (t_1 до t_2 , 3-ти до 5-ти ден), во сите групи беше забележано постепено намалување на лезиите, со исклучок на Г4, која покажа стагнација во периодот од 3-от до 5-от ден (3.8 ± 2.7) (Табела 5 и 6, Графикон 6 и 7). Дури на седмиот ден (t_3) (Табела 7, Графикон 8), регистриравме намалување на лезиите и во Г4 (2.4 ± 2.2), што е во согласност со резултатите на Katayama и сор. [229] кои во нивното истражување на хрчаци, утврдиле статистички значаен ефект на цинкот дури на 7-от ден од создавањето на лезиите. Слична стагнација во заздравувањето забележавме и во Г2 и Г3 помеѓу 7-от и 9-от ден (t_3 - t_4) (Табела 7 и 8, Графикон 8 и 9). Во периодот до крајот на истражувањето (t_4 - t_6 , 9-ти до 14-ти ден), продолжи епителизацијата на лезиите во сите групи (Табела 8-10, Графикон 9-11). На последниот ден (t_6 , 14-ти ден), комплетно епителизираа лезиите само во оние групи каде што беше употребен цинкот (Г4 и Г5) (Табела 10, Графикон 11).

Всушност, комплетно не епителизираа сите промени во оние групи кај кои забележавме стагнација во периодот т3-т4 (7-ми до 9-ти ден), т.е. во Г2 и Г3 (Табела 7 и 8, Графикон 8 и 9). Овие податоци укажуваат на тоа дека иако цинкот не влијаеше врз интензитетот на лезиите од ОМ на почетокот од испитуваниот период, сепак, преку стимулација на реепителизацијата, на крајот се покажа како поефикасен во однос на заздравувањето на лезиите, додека витамин Ц и глутатион се покажаа како поефикасни во однос на интензитетот на лезиите. Сепак, иако разликите помеѓу ефикасноста на антиоксидантите е биолошки поткрепена и објаснета, статистичките тестови ја регистрираа оваа разлика како статистички незначајна.

Дел од нашите резултати се во согласност со резултатите добиени во истражувањето на Chaitanya и сор. [230], кои кај пациенти со орален и орофарингеален карцином, третирани со хеморадиотерапија, утврдиле статистички значаен позитивен ефект на цинкот во намалување на интензитетот на ОМ, додека витамин Ц го поврзале со намалување на интензитетот на болката. Како и во нашето истражување, најдобар ефект постигнале кога ординирале витамин Ц и цинк во комбинација, што резултирало со намалување на болката и интензитетот на ОМ, како и сочувување на вкусовната перцепција.

Al-Asmari и сор. [92] исто така го евалуирале ефектот на витамин Ц, но кај 5-FU индуциран интестинален мукозитис на стаорци. Слично како и нас, Al-Asmari и сор. утврдиле намалено оштетување на интестиналната лигавица при третман со витамин Ц.

Skeff и сор. [105] го употребиле глутатионот во форма на S-нитрозоглутатион кај 5-FU индуциран орален мукозитис на хрчаци. Методолошката разлика со нашето истражување е во тоа што ние ги употребивме антиоксидантите 14 дена пред ординирање на 5-FU, додека Skeff и сор. [105] употребиле топикална форма, која ја нанесувале двапати на букалната лигавица, по настанување на лезиите. Тие ја евалуирале ефикасноста на третманот во два временски интервали, на 10-от и 14-от ден, при што не утврдиле статистички значајна ефикасност на терапијата со глутатион на 10-от ден. Во нашето истражување, всушност, забележавме стагнација во терапијата со глутатион од 7-от до 9-от ден.

Mitsuhashi и сор. [231] го евалуирале ефектот на употребата на суспензија од полапрецинк, натриум и алгинат кај 5-FU индуциран ОМ на хрчаци, чии резултати се во согласност со нашите наоди. Тие [231] утврдиле статистички значајна побрза реепителизација кај хрчаците третирани со суспензијата на цинк. Дополнително, во друга испитувана група, употребиле и 0.12% масло на дексаметазон, кој ги егзацербирал промените на ОМ. Позитивните ефекти на цинк кај ОМ, се потврдени и од страна на клинички студии [232] и мета-анализи [101], при што се нагласени хетерогеноста и малиот број на студии.

Откако ги разгледавме можните механизми преку коишто антиоксидантите можат да влијаат врз добиените резултати, останува да образложиме кои други биолошки и методолошки фактори би можеле да придонесат за отсуството на статистички значајна разлика помеѓу групите. Најпрво, биолошките карактеристики на анималниот модел ја маскираат потенцијалната разлика меѓу групите. Во нашето истражување употребивме 25% раствор на оцетна киселина, а податоците од литературата [233] укажуваат дека во 75% од анималните модели за хемотераписки индуциран ОМ, се употребува дополнителна механичка или хемиска дразба, со цел да се појават лезии. Поради тоа, постои веројатност за настанување на потенцијална хетерогеност во почетната големина на лезиите и покрај

употребата на стандардизирана техника, што би можело да ги направи првичните резултати помалку воочливи и статистички незначајни. Второ, динамиката на заздравување е нелинеарна и истата е биолошки зависна, т.е. зависи од големината на лезиите. Биолошки, помалите лезии побрзо заздравуваат, додека на поголемите лезии им треба повеќе време за да заздрават, па влијанието на хемиската дразба и анималниот модел во создавањето на првичните лезии (t0, 24 часа), може да влијае и на вредностите во останатите периоди (t1-t6). Трето, мерењето на лезиите во нашето истражување беше направено со помош на пародонтална сонда преку определување на најголемиот пречник (дијаметар) на промената. Ваквото мерење е помалку прецизно, т.е. дава помалку податоци за опсежноста на промените во споредба со компјутерска анализа на површината на лезиите (т.н. дигитална планиметрија) [234]. Yoshino и сор. [26] го употребиле софтверот ImageJ за дигитална планиметрија со цел да направат анализа на површината на лезиите кај ОМ индуциран од 5-FU и оцетна киселина кај хрчац. Дополнително, малиот број на животни по група во нашето истражување (n=8), кој е условен од страна на етичкиот концепт 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) [216], би можел да ја ограничи моќта на статистичките тестови и поради тоа да не биде забележана статистички значајна разлика помеѓу групите, дури и во случај на нејзино постоење.

Нашите резултати јасно покажуваат дека со текот на времето, лезиите се намалуваат во сите групи, но сепак, во реален клиничен контекст мора да се има предвид една важна контрадикторност. Дали системската суплементација со антиоксиданти може да делува протективно врз неопластичните клетки, на истиот начин како што делува на здравите клетки и дали истата може да придонесе за рецидиви на карциномот? Современите прегледи на литературата [235] укажуваат дека рутинската суплементација со антиоксиданти за време на хемотерапија, не би требала да се препорачува, бидејќи антиоксидантите можат да обезбедат цитопротективен ефект не само врз здравите клетки, туку и врз туморските. Дополнително, проспективни податоци од пациенти на хемотерапија укажуваат на повисок ризик од рецидив кога антиоксидантите се земаат пред и за време на терапијата [236]. Ова не ги оспорува нашите наоди за позитивниот ефект на антиоксидантите кај ОМ, туку ја нагласува потребата од прецизирање на нивната примена, поточно се поставува прашањето дали да се преферира локална/топикална употреба, бидејќи постојат докази за позитивен ефект на локалната примена на антиоксиданти без притоа да влијаат врз ефикасноста на радиотерапијата [237].

Покрај клиничкото следење на епителизацијата на лезиите, серумскиот TNF- α ни даде јасен увид во воспалителната активност кај 5-FU-индуцираниот ОМ. Во позитивната контролна група (Г2; 5-FU + оцетна киселина без антиоксиданти) вредностите беа највисоки (197.47 ± 21.09 pg/mL), со статистички значајни разлики меѓу групите (Kruskal-Wallis $\chi^2(4)=31.567$; $p<0.001$) (Табела 12). Post-hoc анализата потврди дека вредностите во Г2 се статистички значајно повисоки во споредба со вредностите во Г1, Г3 и Г5 (Табела 13, Графикон 13). Овие резултати се во согласност со петфазниот модел на ОМ, кој опишува дека првично настанатиот оксидативен стрес и NF- κ B ја поттикнуваат експресијата на проинфламаторни цитокини (TNF- α , IL-1 β , IL-6), што е причина за настанување и прогресија на улцерациите [82]. Поновите прегледи на литературата го потврдуваат централното место на NF- κ B како врска меѓу РКВ, цитокинската продукција и епителната апоптоза [1].

Значајно е и тоа што TNF- α во Г2 беше повисок и од негативната контролна група (Г1: 116.26 ± 8.55 pg/mL; $p=0.005$), што укажува на системски проинфламаторен одговор, а не само локална мукозна повреда (Табела 12 и 13, Графикон 13). Слично зголемување на системските цитокини е опишано и кај интестинален мукозитис предизвикан од 5-FU, при што серумските концентрации на TNF- α и IL-1 β се зголемиле, а NF- κ B се истакнува како централна врска во инфламаторниот одговор [238]. Клинички, кај пациенти со КГВ на хеморадиотерапија, регистрирано е зголемување на саливарните концентрации на TNF- α , IL-1 β и IL-6, при што овие промени корелирале со интензитетот на мукозитисот [239].

Во групите со антиоксиданти резултатите беа поинакви. Г3 (Vit.C+GSH, 101.37 ± 5.29 pg/mL) и Г5 (Vit.C+GSH+Zn, 106.49 ± 4.76 pg/mL) имаа значајно пониски TNF- α концентрации во споредба со Г2 ($p<0.001$), а кај Г3, концентрацијата беше пониска дури и од Г1 ($p=0.045$) (Табела 12 и 13, Графикон 13). Овој податок укажува на тоа дека антиоксидантите не само што го неутрализираат инфламаторниот одговор предизвикан од 5-FU, туку можат привремено да ги потиснат инфламаторните медијатори дури и под физиолошките граници. Доколку го разгледаме механизмот на делување на витамин Ц и глутатион, ова е всушност и очекувано. Витамин Ц и глутатион го намалуваат оксидативниот стрес и ја инхибираат NF- κ B активацијата, со последователно намалување на TNF- α [92,225]. Во 5-FU модел кај стаорци антиоксидативниот третман ги намалил NF- κ B и TNF- α и го намалил оштетувањето, докажано патохистолошки [240]. Овој биолошки механизам всушност објаснува зошто во Г3 и Г5 иницијалната големина на лезиите беше и најмала.

Групата третирана со цинк (Г4), покажа серумска концентрација на TNF- α (132.34 ± 6.71 pg/mL) статистички значајно поголема од Г3 и Г5, но сепак помала од Г2 (Табела 12 и 13, Графикон 13). Овие резултати се всушност рефлексја на специфичната улога на цинкот во биологијата на оралната лигавица. За разлика од витамин Ц и глутатион, кои делуваат како отстранувачи на РКВ, примарниот ефект на цинкот вклучува стабилизација на епителните мембрани, стимулација на реепителизација и цитопротекција против РКВ-индуцирана апоптоза [226]. Клинички, РКИ укажуваат дека суплементацијата со цинк сулфат значајно го намалува интензитетот на ОМ, како и интензитетот на болката, кај пациенти со КГВ на хеморадиотерапија [232]. Овие наоди се во согласност со нашите резултати дека иако TNF- α беше релативно зголемен во Г4 во споредба со другите третирани групи (Табела 12, Графикон 13), сепак на 14-от ден беа епителизирани лезиите кај сите животни од оваа група (Табела 10, Графикон 11), нагласувајќи ја комплементарната функција на цинкот во одржувањето на интегритетот на мукозните мембрани.

Исто како и TNF- α , анализата на серумските концентрации на IL-1 β ги дополни нашите сознанија за инфламаторниот одговор кај ОМ индуциран од 5-FU. Позитивната контролна група Г2 (213.76 ± 13.04 pg/mL) имаше повисока концентрација на IL-1 β во споредба со сите други групи (Kruskal-Wallis $\chi^2(4)=33.443$; $p<0.001$) (Табела 14). Post-hoc анализата утврди статистички значајно повисоки вредности на IL-1 β помеѓу Г2 и Г1 ($p<0.001$), Г3 ($p=0.049$) и Г5 ($p<0.001$) (Табела 15, Графикон 14). Овој образец е во согласност со канонската каскада на ОМ, каде хемотераписки предизвиканиот оксидативен стрес ги активира NF- κ B и инфламаторните патишта, ја зголемува продукцијата на IL-1 β и го поттикнува настанувањето на улцерациите [1,82].

Во Г2, концентрацијата на IL-1 β беше дуplo поголема од Г1 (101.51 ± 5.62 pg/mL; $p < 0.001$) (Табела 14 и 15, Графикон 14), што повторно потврдува дека системската хемотерапија и локалната траума доведуваат до системска цитокинска активација. Овие резултати се во согласност со анималните и клиничките студии. На 5-FU индуциран интестинален мукозитис кај стаорци, зголемените вредности на серумски и мукозен IL-1 β биле одраз на степенот на оштетување и активација на NF- κ B [238].

Претклиничките модели на 5-FU индуциран ОМ кај хрчаци покажуваат мукозно зголемување на IL-1 β што опаѓа со ефективен третман, вклучувајќи дексаметазон [241] и други интервенции со сличен ефект [215]. Според Bossi и сор. [239], IL-1 β и IL-6 се зголемуваат за време на хеморадиотерапија на глава и врат, а зголеменото ниво се поврзува со интензитетот на ОМ. Зголемените вредности на овие инфламаторни медијатори 3 недели по започнување на хеморадиотерапијата можат да послужат како предиктор за настанување на потежок степен на ОМ, нагласувајќи ја неговата релевантност како потенцијална алатка за идентификација на пациентите со зголемен ризик за ОМ [239].

Најниски концентрации на IL-1 β регистриравме во Г5 (Vit.C+GSH+Zn; 94.73 ± 7.89 pg/mL), а потоа кај Г3 (Vit.C+GSH; 111.03 ± 6.53 pg/mL) (Табела 14 и 15, Графикон 14). Двете групи имаа статистички значајно пониски конценетрации во споредба со Г2 ($p < 0.001$), додека Г5 имаше и статистички значајно пониски вредности од Г4 ($p = 0.004$) (Табела 15, Графикон 14). Според механизмот на дејство, витамин Ц и GSH веројатно го потиснуваат IL-1 β преку дејство врз NF- κ B и каспаза-1/NLRP3 [242]. Во истражувањето на Pizzicannella и сор. [242] витаминот Ц ја супримира оската TLR4/MyD88/NF- κ B/NLRP3/каспаза-1/IL-1 β во орални стромални клетки, што е во согласност со докази дека витаминот Ц ја намалува активацијата на NLRP3 и кај други заболувања [243]. Иако податоците укажуваат дека намалената концентрација на цинк доведува до создавање IL-1 β [244], неговата улога повеќе се поврзува со интегритетот на мукозата, стабилизацијата и реепителизација на епителните мембрани [226].

Липидната пероксидација исто така го одразуваше интензитетот на ОМ во нашето истражување. Г2 имаше значајно повисока серумска концентрација на MDA (5.27 ± 1.10 nmol/L) во споредба со сите групи третирани со антиоксиданти [One-way ANOVA: $F(4, 35) = 11.08$, $p < 0.001$; Tukey: Г2 > Г3 ($p = 0.008$) / Г4 ($p < 0.001$) / Г5 ($p = 0.005$)], како и во споредба со негативната контролна група Г1 ($p < 0.001$) (Табела 16 и 17, Графикон 15).

Нашите резултати се кохерентни со претклиничките резултати од истражувања на хрчаци и стаорци, каде 5-FU-индуцираниот ОМ значајно го зголемува мукозниот и/или системскиот MDA, додека антиоксидативните интервенции го намалуваат MDA со истовремено клиничко и хистолошко подобрување [26,245]. Според скорешен преглед на литературата што анализира 89 студии за ОМ (анимални модели и клинички студии на пациенти), намалениот интензитет на ОМ е прилично конзистентно поврзан со пониски концентрации на PKB/MDA и повисока активност на ендогените антиоксиданти (GSH, SOD), што ги прави нашите резултати за намалените концентрации на MDA во третираните групи споредливи со поширока база на докази [25].

Клинички, саливараниот MDA се зголемува со тежината на радијационо-индуцираниот ОМ за време на радиотерапија на КГВ, поддржувајќи ја транслациската значајност на системскиот MDA како биомаркер на активност на болеста [246].

Намалената концентрација на серумскиот MDA во Г3 (VitC+GSH; $3.81 \pm 1.00 \text{ mmol/L}$) и Г5 (VitC+GSH+Zn; $3.70 \pm 0.72 \text{ mmol/L}$) (Табела 16) може да се опише како намалување на сигнализацијата во оската PKB–NF-κB, при што антиоксидативната терапија ги намалува MDA, TNF-α и NF-κB, паралелно со епителна репарација [92,225]. Во истражувањето на Al-Asmari и сор. [92] суплементацијата со витамин Ц довела до намалување на 5-FU индуцираната липидна пероксидација (MDA), намалување на миелопероксидазната активност и намалена активација на NF-κB и COX-2. Sá и сор. [247] употребиле N-ацетилцистеин, прекурсор на GSH во 5-FU индуциран ОМ кај хрчаци, при што третираната група покажала намалување на липидната пероксидација (MDA), како и подобра превенција на структурното оштетување на оралната мукоза од 5-FU.

Во Г4, концентрацијата на серумскиот MDA ($3.34 \pm 0.51 \text{ mmol/L}$) беше незначајно пониска од Г3 ($3.81 \pm 1.00 \text{ mmol/L}$) и Г5 ($3.70 \pm 0.72 \text{ mmol/L}$), но статистички значајно пониска од Г2 (MDA ($5.27 \pm 1.10 \text{ mmol/L}$, $p < 0.001$)) (Табела 16 и 17, Графикон 15). Всушност, Doi и сор. [237] го споменуваат намалувањето на липидната пероксидација како еден од цитопротективните механизми на полапрецинк (препарат кој е комбинација од цинк и L-карнозин).

Значајно е да се напомене дека TBARS методата за евалуација на MDA не е специфична само за MDA, туку може да реагира и со други соединенија, што може да доведе до пренагласено утврдување за зголемување на оксидативниот стрес [248].

Според клиничките студии, третманот со SOD-миметици клинички значајно ги намалува појавата, времетраењето и интензитетот на ОМ, што укажува на поврзаноста помеѓу SOD и ОМ [249]. Во нашето истражување, активната на SOD беше статистички значајно намалена во позитивната контролна група (Г2), при што активната на ензимот во серум беше $798.84 \pm 233.50 \text{ kU/mg}$ протеини, во споредба со $1756.14 \pm 256.70 \text{ kU/mg}$ протеини во негативната контролна група (Г1) ($p = 0.001$) (Табела 18 и 19, Графикон 16). Ова намалување од >50% во Г2 е во согласност со веќе познатото нарушување на редокс рамнотежата предизвикано од хемотерапија преку PKB–NF-κB оската [1]. Rtibi и сор. [250] го евалуирале влијанието на оксидативниот стрес предизвикан од 5-FU кај акутен интестинален мукозитис на анимален модел на стаорци, при што утврдиле значајно зголемување на MDA и H_2O_2 во ткивото, како и статистички значајно намалување, т.е. исцрпување на антиоксидативните ензими SOD, CAT и GPx. При анализа на ефикасноста на 20% јџумба гел на ОМ предизвикан од 5-FU, Koohi-Hosseiniabadi и сор. [251] утврдиле статистички значајно пониски вредности на активната на SOD во групата третирана со 5-FU, во споредба со останатите групи.

Суплементацијата со антиоксиданти ја модулира активната на SOD. Во Г3 (Vit.C+GSH), делумно е сочувана активната на ензимот ($1124.37 \pm 153.90 \text{ kU/mg}$ протеини) и е незначајно пониска од Г1 ($1756.14 \pm 256.70 \text{ kU/mg}$ протеини) ($p = 0.051$) (Табела 18 и 19, Графикон 16). Витамин Ц е познат антиоксидант, отстранувач (*анг.* scavenger) на бројни слободни радикали, меѓу кои и супероксидниот анјон ($\text{O}_2^{\cdot -}$) [252], додека глутатионот (GSH) како значаен супстрат за GPx и нејзината активност, може индиректно да го намали „трошењето“ на SOD, преку штедење на нејзините резерви [67,253]. Разликата помеѓу Г3 и Г1 може да се објасни преку слободниот радикал азотен оксид (NO), значаен медијатор за бројни физиолошки процеси, кој може да биде инактивиран од страна на супероксидниот анјон ($\text{O}_2^{\cdot -}$), што доведува до создавањето на високопотентен слободен радикал – пероксинитрит [254]. Пероксинитритот се поврзува со настанувањето и прогресијата на

бројни акутни и хронични заболувања [254]. Преку конвертирање на супероксидниот анјон ($O_2^{\cdot -}$) до молекуларен кислород и водороден пероксид од страна на SOD, се намалува неговата концентрација, што придонесува и за негова помала интеракција со азотниот оксид (NO) [255]. Претклиничките студии укажуваат на тоа дека високите дози на витамин Ц го намалуваат создавањето на пероксинитрит преку директно отстранување на супероксидниот анјон ($O_2^{\cdot -}$) [256].

За споредба, во Г4 (Zn), активноста беше 1377.97 ± 173.93 kU/mg, т.е. поголема од Г2 ($p=0.351$) и Г3 ($p=1.000$), но помала од Г1 ($p=0.685$) (Табела 18 и 19, Графикон 16). Цинкот е значаен кофактор за стабилноста на Cu/Zn-SOD, што овозможува поефикасно делување на SOD во случаи на оксидативен стрес, како и зголемување на активноста на овој ензим по суплементација со цинк [257–259]. Друг механизам преку којшто цинкот може индиректно да влијае врз зголемување на активноста на SOD е преку намалување на нејзиното трошење од страна на слободните радикали, преку синтеза на металотионеини кои ги отстрануваат слободните радикали [69]. Faghfouri и сор. [260] направиле мета-анализа, вклучувајќи 23 клинички истражувања со цел евалуација на клиничката ефикасност на суплементацијата со цинк преку зајакнување на антиоксидативниот одбранбен систем. Резултатите на оваа мета-анализа [260] покажале дека цинкот, не само што ја зголемува активноста на SOD, туку влијае и на зголемување на глутатионот (GSH) и вкупниот антиоксидативен капацитет (TAC), без значаен ефект врз активноста на глутатион пероксидаза. Клинички, употребата на формулации на цинк во форма на пасти (polaprezinc) ги намалува појавата и интензитетот на ОМ кај пациенти на хеморадиотерапија за КГВ, како и кај пациенти со високи дози на хемотерапија со ТХМК [261,262]. Позитивниот ефект на цинкот врз симптоматологијата и текот на ОМ се утврдени и во постари клинички студии кај пациенти со КГВ третирани со радиотерапија [96,263]. Имајќи ги предвид овие сознанија за ефектите на цинкот, како и нашите резултати, сметаме дека активноста на SOD е поголема во Г4 (Zn) во споредба со Г3 (Vit.C+GSH) поради неговата директна поврзаност со овој ензим, но и поради неговата индиректна улога во заштитувањето на активноста на SOD.

Најголема сочуваност на функцијата на SOD, т.е. нејзина најголема серумска активност беше забележана во Г5 (Vit.C+GSH+Zn) со вредности 2096.34 ± 494.91 kU/mg протеини (Табела 18). Активноста на SOD во Г5 (Vit.C+GSH+Zn) беше статистички значајно повисока во споредба со Г2 ($p<0.001$) и Г3 (Vit.C+GSH) ($p=0.003$). Иако нумерички, активноста на SOD во Г5 (Vit.C+GSH+Zn) беше повисока од Г1 (1756.14 ± 256.70 kU/mg протеини), оваа разлика не беше статистички значајна ($p=1.000$) (Табела 18 и 19, Графикон 16). Значајно повисоките вредности на SOD во Г5, во споредба со Г3, укажуваат на потенцијална комплементарна интеракција помеѓу антиоксидантите и нивниот кумулативен (квази-синергистички), позитивен ефект врз активноста на SOD. Во достапната литература, не најдовме податоци за синергистичкиот ефект помеѓу витамин Ц, глутатион и цинк врз активноста на SOD кај ОМ, но постојат податоци кои укажуваат дека цинк аскорбатот кај пациенти со акни, покажува статистички значајна поголема активност слична на SOD, во споредба со други деривати на аскорбинска киселина и цинк посебно, што може да се толкува како потенцијална интеракција помеѓу овие два антиоксиданти [264]. Терминот „синергистички ефект“ во контекст на оваа студија се однесува на комплементарното дејство на витамин Ц, глутатион и цинк, при што секој од нив делува преку различни, но меѓусебно поврзани механизми: директно неутрализирање на РКВ, регулација на

оксидоредуктивната рамнотежа, активација на антиоксидативните ензими и стабилизација на клеточните структури.

Глутатионот (редуцирана форма, GSH) е значаен неензимски антиоксидант во клетките на цицачите, кој директно може да делува како антиоксидант и да ги заштити клетките од РКВ, како кофактор на бројни антиоксидативни ензими, како што е глутатион пероксидазата (GPx) [265]. Постојат два начини на создавање на глутатионот во организмот - *de novo* и преку негово рециклирање од страна на глутатион редуктаза (GR). Создавањето на глутатионот *de novo* од неговите аминокиселински компоненти (глутамин, цистеин и глицин) зависи од два АТР-зависни ензимски чекори: создавање на γ -глутамилцистеин од глутамин и цистеин, како и создавање на GSH од γ -глутамилцистеин и глицин [266]. Вториот начин на создавање на GSH е преку GR. Кога GSH стапува во реакција со РКВ, доаѓа до негова оксидација и формирање на оксидираната форма на глутатион (GSSG) [267]. GR со помош на NADPH го редуцира GSSG до две молекули на GSH, рециклирајќи го на овој начин GSH во организмот [268,269].

Активноста на GR во нашето истражување, јасно ја рефлектираше оксидативната оптеретеност во нетретираните групи, како и ефикасноста на антиоксидативниот третман. Во Г2 (3.13 ± 0.63 kU/mg протеини), активноста на ензимот беше статистички значајно пониска во споредба со активноста во Г1 (9.03 ± 1.88 kU/mg протеини), со изразена меѓугрупна хетерогеност и потврда преку Tukey тестот дека Г1 > Г2 ($p < 0.001$) (Табела 20 и 21, Графикон 17). Можен механизам за намалувањето на активноста на GR во Г2 е преку намалување на глукозо-6-фосфат дехидрогеназа (G6PD) од страна на РКВ, која е одговорна за одржување на нивоата на NADPH, кој е значаен кофактор за активноста на GR и рециклирањето на GSH [270–272]. Ortiz и сор. [273] ја евалуирале активноста на GR кај ОМ предизвикан од радијација на Wistar стаорци, при што утврдиле намалување на нејзината активност при ирадијација на стаорците, но не најдовме податоци за 5-FU индуциран ОМ, каде била евалуирана активноста на GR.

Антиоксидативниот третман делумно ја сочувва активноста на GR во Г3 (VitC+GSH: 6.58 ± 1.68 kU/mg протеини) и Г4 (Zn: 5.74 ± 2.30 kU/mg протеини), во споредба со Г2 ($p \leq 0.003$), но двете групи имаа помала активност од Г1 (Г1 > Г3, $p = 0.038$; Г1 > Г4, $p = 0.030$) (Табела 20 и 21, Графикон 17). Можеме да претпоставиме дека витамин Ц и глутатион го намалуваат оксидативното оптеретување на GR преку неутрализација на РКВ и активација на GPx од страна на глутатион. За споредба, цинкот ја зголемува функцијата на Nrf2, кој во литературата се поврзува со регулација на GR и заштита на клетките при оксидативен стрес [274].

Во Г5 (9.30 ± 1.40 kU/mg протеини), активноста на GR беше скоро идентична на активноста во физиолошки услови (9.03 ± 1.88 kU/mg протеини) и статистички значајно повисока од активноста во Г3 ($p = 0.002$) и Г4 ($p = 0.001$) (Табела 20 и 21, Графикон 17). Овие резултати се уште еден доказ за потенцијалната интеракција помеѓу трите антиоксиданти во регулирање на антиоксидативниот одговор. Недостатокот на достапна литература за активноста на GR во модели на ОМ индуциран од 5-FU ни го отежнува директното споредување на нашите резултати со други истражувања, но воедно укажува дека станува збор за релативно неистражено поле во кое нашето истражување придонесува со нови сознанија.

Резултатите за активноста на CAT беа слични со резултатите за активноста на SOD, односно, активноста на ензимот беше значајно намалена во позитивната контролна група (Г2: 1662.65 ± 460.84 kU/mg протеини), во споредба со здравите животните од негативната контролна група (Г1: 3356.53 ± 292.34 kU/mg протеини; ANOVA $F(4,35)=64.37$, $p<0.001$) (Табела 22 и 23, Графикон 18). Намалувањето на активноста за ~50% во Г2 е во согласност со нарушувањето на оксидоредуктивната рамнотежа предизвикано од 5-FU. Имено, хемотерапискиот агенс предизвикува создавање на РКВ, за чие отстранување се одговорни различни антиоксиданти како витамин Ц и глутатион, како и антиоксидативни ензими, меѓу кои се и SOD и CAT [26]. Улогата на CAT е да го разгради H_2O_2 до молекуларен кислород и вода [275], но во случај на создавање на прекумерно количество на H_2O_2 (РКВ), CAT може реверзибилно да се инхибира и иреверзибилно да се инактивира [276], што е потврдено и кај хемотераписки индуциран интестинален мукозитис [250]. Имено, при хемотерапија, може да дојде до создавање на поголемо количество на РКВ, меѓу кои и H_2O_2 , кој би можел да ја инактивира CAT. Во однос на ОМ, da Cruz и сор. [277] примениле антибактериска фотодинамска терапија кај 5-FU индуциран ОМ на хрчаци, при што регистрирале зголемување на активноста на CAT и SOD во третираните групи. Caba и сор. [278] го евалуирале ефектот на канабидиол, докажан антиоксидант, кај 5-FU индуциран ОМ на глвци при што утврдиле статистички значајно повисока активност на CAT и повисоки концентрации на GSH во третираните групи, во споредба со позитивната контролна група.

Во нашето истражување, суплементацијата со антиоксиданти ја модулираше активноста на CAT. Во Г3 (Vit.C+GSH) делумно беше сочувана активноста на ензимот (2902.89 ± 146.89 kU/mg протеини) но сепак беше значајно пониска во споредба со Г1 ($p=0.039$) (Табела 22 и 23, Графикон 18), што е во согласност со улогата на витамин Ц [252] и глутатионот [279] да го намалат оптеретувањето на антиоксидативниот систем од страна на H_2O_2 , штедејќи ги резервите на CAT.

Во Г4, активноста на CAT (2530.94 ± 347.42 kU/mg) беше исто така статистички значајно пониска во споредба со Г1 (3356.53 ± 292.34 kU/mg протеини; $p < 0.001$), но не беше поголема од активноста во Г3 (2902.89 ± 146.89 kU/mg протеини) (Табела 22 и 23, Графикон 18). Кога ги толкувавме резултатите за активноста на SOD, активноста на овој ензим беше поголема кај Г4 (Zn), во споредба со Г3 (Vit.C+GSH), со претпоставка дека таа разлика најмногу се должи на фактот дека цинкот е значаен кофактор за стабилноста и функционирањето на Cu/Zn-SOD. Меѓутоа, цинкот не е кофактор за CAT, па оттука би можела да потекне поголемата активност во Г3 (Vit.C+GSH), во споредба со Г4 (Zn). Сепак, цинкот со помош на различни механизми (заштита на протеинските сулфхидрилни групи од оксидација, антагонизам спрема бакарот и железото во реакции кои можат оксидативно оштетување) [280] ја зголемува активноста на CAT, но можеби не во толку голема мера како кај SOD.

Најголема активност на CAT регистриравме во Г5 (Vit.C+GSH+Zn: 3888.46 ± 250.83 kU/mg протеини) (Табела 22), каде што вредностите беа статистички значајно повисоки од физиолошките вредности во Г1 ($p=0.005$) (Табела 23, Графикон 18), што повторно би можело да биде опишано како кумулативен, синергистички ефект на сите употребени антиоксиданти.

Анализата на корелациите помеѓу испитуваните параметри во ова истражување обезбедува суштински увид во меѓусебната поврзаност помеѓу воспалението и оксидоредуктивната хомеостаза кај ОМ индуциран од 5-FU. Резултатите покажуваат дека системските проинфламаторни цитокини, односно TNF- α и IL-1 β позитивно корелираат меѓусебе (Табела 24, Графикон 19), имаат позитивни корелации (TNF- α статистички незначајна, но близу $p < 0.05$) со маркерот на липидна пероксидација малондиалдеhid (MDA) (Табела 24, Графикон 20 и 21). Дополнително, TNF- α , IL-1 β и MDA покажуваат изразени негативни корелации со антиоксидативните ензими SOD, GR и CAT (Табела 24, Графикони 22-27), што укажува дека со зголемување на интензитетот на инфламацијата се намалува активноста на овие ензими, но и обратно. Утврдената поврзаност е во согласност со хипотезата дека интензитетот на ОМ кај пациенти на хеморадиотерапија со КГВ, произлегува од нерамнотежа помеѓу оштетувањето на ткивото посредувано од РКВ и недоволната физиолошка одбрана на организмот преку ендегените механизми за заштита [84].

Наодот дека TNF- α и IL-1 β позитивно корелираат меѓусебе и со MDA не е изненадувачки, имајќи ја предвид нивната утврдена улога како засилувачи на оксидативниот стрес (Табела 24, Графикон 19-21). И двата цитокини ја активираат NF- κ B сигнализацијата во фазата на амплификација на сигналот на ОМ [24,30,281], што предизвикува дополнително создавање на РКВ [282] кое ја одржува липидната пероксидација [283]. Во согласност со нашите резултати, de Araújo и сор. [284] утврдиле намалување на TNF- α , IL-1 β и MDA на 5-FU индуциран ОМ кај Syrian хрчаци, по третман со azilsartan (антихипертензивен агенс), во споредба со контролните групи. Идентични резултати на оние од истражувањето на de Araújo и сор. [284] добиле и Mafra и сор. [245] кои користеле gliclazide (антидијабетичен агенс) во нивното истражување, наместо azilsartan.

Иако корелацијата помеѓу TNF- α и MDA не достигна статистичка значајност ($r = 0.311$, $p = 0.061$) во споредба со IL-1 β ($r = 0.415$, $p = 0.012$), сепак p -вредноста е во непосредна близина до прагот на значајност ($p < 0.05$) (Табела 24, Графикон 20 и 21). Ова може да укаже на потенцијална поврзаност помеѓу параметрите, која не може со сигурност да се утврди поради ограничувањата на истражувањето, т.е. малата големина на примерокот.

Важен наод од нашата анализа е дека антиоксидативните ензими покажаа многу силни позитивни меѓусебни корелации (SOD-GR: $r = 0,673$; SOD-CAT: $r = 0,819$; GR-CAT: $r = 0,747$; сите $p < 0,001$) (Табела 24, Графикон 31-33). Тоа укажува дека ензимскиот антиоксидативен систем во овој модел не функционира изолирано, туку како координирана одбранбена мрежа. Martins и сор. [285] многу едноставно ја објаснуваат оваа поврзаност: SOD ги конвертира супероксидните радикали во H_2O_2 , кој потоа го неутрализираат CAT и GPx. GPx го оксидира GSH до GSSG, а GR го редуцира GSSH до GSH [285]. Статистички значајните корелации, покрај тоа што укажуваат на функционална зависност на ензимите, можат да сугерираат дека станува збор и за заеднички регулаторни механизми, а не случајна поврзаност. Веројатен заеднички регулаторен механизам е транскрипциската регулација преку патеката на Nrf2, кој според Ngo и Duennwald [286] е одговорен за регулацијата на широк спектар на антиоксидативни ензими вклучени во детоксификација и елиминација на оксидативниот стрес.

Дополнително, антиоксидативните ензими покажаа и статистички значајна негативна корелација со TNF- α , IL-1 β и MDA (Табела 24, Графикон 22-30), што укажува дека во групите со зголемена активност на овие ензими се регистрирани пониски

концентрации на инфламаторните медијатори и маркерот на липидна пероксидација. da Cruz и сор. [277] утврдиле зголемување на SOD и CAT истовремено со зголемување на инфламацијата кај 5-FU индуциран ОМ на хрчаци. Lotfi и сор. [287] детектирале зголемени вредности на MDA, како и намалена активност на SOD и CAT по администрација на 5-FU кај глвци, додека Bomfin и сор. [211] добиле ист наод во паротидната плунковна жлезда при предизвикување на ОМ со 5-FU. Слично на нашите резултати, во истражувањето на de Araújo и сор. [288] употребата на екстракт од *Curcuma longa* кај ОМ предизвикан од 5-FU на хрчаци, довела до статистички значајно зголемување на GSH, како и намалување на концентрациите на TNF- α , IL-1 β , MDA и активността на SOD. Од сите антиоксидативни ензими, CAT покажа најсилна поврзаност со TNF- α , IL-1 β и MDA (Табела 24, Графикон 24, 27, 30). Всушност, во истражувањето на Bauer и сор. [289], докажано е дека продуктите на липидната пероксидација можат директно да ја инактивираат CAT.

Поврзано со други орални заболувања, нашите резултати се во согласност и со резултатите на Trivedi и сор. [290], кои исто така докажале значајна негативна корелација помеѓу антиоксидативните ензими (SOD, CAT и GR) и MDA, но кај пациенти со хронична пародонтопатија. Мета-анализата на Surboyo и сор. [291] потврдила зголемени вредности на MDA и намалени вредности на GSH, SOD и GPx кај пациенти со орална субмукозна фиброза.

Во целина, резултатите ја потврдуваат меѓусебната поврзаност помеѓу инфламаторните медијатори, липидната пероксидација и активността на антиоксидативните ензими, при што CAT се издвојува како најсилно поврзан ензим со инфламаторните промени во овие процеси. Сепак, истражувањето има одредени ограничувања: примерокот е релативно мал, биохемиските анализи беа направени во серум, а не во ткиво од оралната лигавица или пак во плунка, а мерењата се вршеа само во еден временски момент, т.е. по епителизацијата. Овие фактори можат да ја намалат прецизноста во евалуацијата на промените на оралната лигавица и динамиката на оксидативниот одговор. Идните истражувања би можеле да се подобрат преку комбинирање на серумски, саливарни и ткивни анализи, следење на повеќе временски точки за да се добие динамична слика на воспалителниот и антиоксидативниот одговор, како и употреба на методи за детекција на специфични оксидативни модификации на ензимите. На овој начин би се надминале ограничувањата и би се добило подлабоко разбирање за патогенезата и потенцијалните терапевтски можности.

Анализата на хистолошките препарати на паротидната плунковна жлезда беше ограничена поради прекумерната дебелина на сечењата, што ја отежнуваше визуелизацијата на нормалната ацинарна и дуктална морфологија и воведуваше можни артефакти. Дури и кај негативната контролна група (Г1), ткивото не ја прикажуваше очекуваната хистоархитектура на здрава плунковна жлезда, односно, јадрата често беа зголемени и со неправилни контури, но во целина покажуваа релативно рамномерна дистрибуција во паренхимот (Слика 1).

Кај позитивната контролна група (Г2), нуклеарната атипичност беше поизразена. Се забележаа бројни расфрлани хиперхроматични, неправилно обликувани јадра („монструозни јадра“), придружени со појава на интрацитоплазматски вакуоли (Слика 2). Вакуолите изгледаа како оптички празни кружни простори, но нивното значење не може со сигурност да се утврди, бидејќи може да претставуваат артефакт од техниката на сечење, а не вистинска дегенеративна промена.

Кај групите третирани со антиоксиданти (Г3–Г5), нуклеарните промени беа интермедијарни, односно помеѓу оние кај Г1 и Г2. Иако беа помалку изразени отколку во Г2, јадрата изгледаа понерамномерно распоредени и поатипични отколку во Г1 (Слика 3 и 4). Кај ниту една група не беа забележани конзистентни инфламаторни инфилтрати или цитоплазматска дегенерација.

Паротидната плунковна жлезда кај сите групи отстапуваше од очекуваната морфологија на здрава жлезда, при што Г2 покажа најизразена атипичност, а групите третирани со антиоксиданти имаа промени повеќе слични со Г2 отколку со Г1 (Слика 5). Толкувањето на овие наоди треба да се земе со голема претпазливост поради ограничувањата во однос на квалитетот на сечењата, како и малиот број на вклучени животни во истражувањето.

Спротивно на нашите наоди, достапната литература конзистентно укажува на тоа дека 5-FU предизвикува значајни структурни и функционални нарушувања на плунковните жлезди. Vomfin и сор. [211] демонстрираат дека системската апликација на 5-FU кај хрчаци доведува до инфламација и оксидативен стрес во сите големи плунковни жлезди, со намалување на количеството на излачена плунка и промени во нејзиниот состав. Овие ефекти се придружени со зголемена липидна пероксидација, вакуолизација и инфилтрација на инфламаторни клетки во жлезденото ткиво. Слично, Yurdabakan и сор. [292] покажуваат дека повеќе хемотераписки агенси (5-FU, цисплатин, метотрексат и адриамицин) предизвикуваат дегенеративни промени во субмандибуларните жлезди на стаорци, но дека 5-FU е најтоксичен. Тој резултира со најизразено намалување на тежината на жлездите и нивната протеинска содржина, како и со редукција на ацинарните области, што укажува на сериозно нарушување на секреторната функција.

Покрај морфолошките промени, Elmansy и Hegazy [293] опишуваат и молекуларни механизми. Третманот со 5-FU води до дегенеративни и апоптотични промени во субмандибуларните жлезди, со зголемена експресија на проапоптотичните маркери Вах и Caspase-3, и намалување на PCNA, маркер на клеточна пролиферација. Ова ја потврдува улогата на 5-FU во активација на апоптозата и инхибиција на регенеративниот потенцијал на жлездите.

Најновите истражувања ги прошируваат овие сознанија и предлагаат потенцијални терапевтски стратегии. Abdelzaher и сор. [212] прикажуваат дека предтретман со фебуксостат, моќен инхибитор на ксантин оксидаза, значително го намалува оксидативниот стрес (MDA, NOx), инфламаторните цитокини (TNF- α , IL-1 β) и експресијата на CHOP, а ја зголемува антиоксидативната активност (SOD, GSH) и нивото на TRPC1 во паротидните жлезди. На овој начин, фебуксостат обезбедува мултифакторна заштита, не само преку антиоксидативен и антиинфламаторен ефект, туку и преку модулација на TRPC1/CHOP сигналниот пат.

Резимирано, резултатите од нашето истражување укажуваат на ограничени и слични морфолошки промени во сите групи, кои сепак не можат да се толкуваат како отсутност на токсичен ефект. Ова толкување е условено од значајни методолошки ограничувања, особено дебелината на хистолошките сечења и малата бројност на примерокот. Спротивно на тоа, во постојната литература доследно се укажува дека 5-FU предизвикува изразени структурни, функционални и молекуларни нарушувања во плунковните жлезди, вклучувајќи инфламација, оксидативен стрес и активација на апоптоза. Оттука, нашите наоди веројатно ја одразуваат техничката варијабилност, а не реалната биолошка реакција на ткивото. Понатамошни истражувања со методолошки прецизни пристапи и поголем примерок се

неопходни за реална проценка на потенцијалот на антиоксидантите како заштитна стратегија против оштетувањата на плунковните жлезди индуцирани од хемотерапија.

Главната хипотеза во нашето истражување беше: Постои разлика во интензитетот на оралниот мукозитис предизвикан од хемотерапија кога таа е дополнета со антиоксиданти, во споредба со хемотерапија без антиоксиданти.

Хипотезата ја потврдуваме делумно. Нашите резултати покажаа дека лезиите постепено се намалуваа со тек на времето кај сите испитувани групи (Repeated measures ANOVA: $F(6,168)=32.90$, $p<0.001$, $\eta^2=.540$). Сепак, не се забележаа значајни разлики во динамиката на намалувањето на лезиите меѓу групите ($F(3,28)=0.16$, $p=.922$), односно антиоксидативниот третман не доведе до статистички потврдено побрзо подобрување ($F(18,168)=0.94$, $p=.537$). Покрај тоа, клинички релевантна разлика се појави на крајот: до 14-от ден (t_6) целосна епителизација беше постигната кај сите животни во групите со цинк (Γ_4 и Γ_5), додека во Γ_2 и Γ_3 останаа поединечни неепителизирани лезии. Ова укажува дека употребата на антиоксидантите, особено кога се вклучува цинк, може да придонесе во процесот на заздравување, иако разликите не беа статистички потврдени во рамките на нашето истражување.

Првата дополнителна хипотеза беше: Оралниот мукозитис се манифестира со помали лезии кога хемотерапијата е дополнета со антиоксиданти.

Хипотезата ја потврдуваме делумно. Во повеќе временски интервали од раната фаза (t_0 – t_4 ; 24ч–9д), групата со комбиниран третман VitC+GSH+Zn (Γ_5) имаше најмали средни дијаметри на лезиите, а во t_6 (14д) комплетна епителизација беше постигната кај сите животни во Γ_4 и Γ_5 (групите кои вклучуваат цинк). И покрај овие трендови, вкупниот ефект на група и интеракцијата со време не беа значајни ($p=.922$ и $p=.537$), што ја ограничува статистичката потврда на разликите. Наодите сугерираат дека цинкот веројатно придонесува за побрза/поконзистентна реепителизација, додека VitC+GSH потенцијално придонесуваат за помал иницијален интензитет на лезиите. Сепак, потребни се повеќе истражувања, на поголем број на животни со различна методологија (употреба на дигитална планиметрија) со цел попрецизно да се евалуира клиничкиот ефект на антиоксидантите.

Втората дополнителна хипотеза во нашето истражување беше: Инфламаторниот одговор како последица на оралниот мукозитис е со поголем интензитет кога хемотерапијата не е дополнета со антиоксиданти.

Хипотезата ја потврдуваме. Ова го потврдуваат резултатите од серумските концентрации на TNF- α и IL-1 β . Во позитивната контролна група беа регистрирани највисоки вредности на двата цитокини. Kruskal–Wallis тестот покажа статистички значајни разлики помеѓу групите, а post hoc Dunn–Bonferroni анализата потврди дека Γ_2 има значајно повисоки вредности во однос на групите третирани со антиоксиданти (Γ_3 и Γ_5). Најниски вредности на TNF- α и IL-1 β беа забележани во групата третирана со Vit.C+GSH+Zn (Γ_5), што дополнително ја потврдува антиинфламаторната улога на антиоксидантите. Важно е да се нагласи дека дури и во однос на Γ_1 , Γ_2 имаше повисоки вредности, што укажува на тоа дека хемотерапијата со 5-FU во комбинација со локална траума предизвикува системски инфламаторен одговор. Со тоа, резултатите јасно го поддржуваат тврдењето дека отсуството на антиоксидантна терапија е поврзано со поизразен инфламаторен одговор.

Третата дополнителна хипотеза во нашето истражување беше: Антиоксидативните ензими покажуваат поголема активност кога хемотерапијата е дополнета со антиоксиданти.

Хипотезата ја потврдуваме. Ова го потврдуваат активностите на SOD, GR и CAT во групите третирани со антиоксиданти во споредба со позитивната контролна група (Г2). SOD покажа значајни меѓугрупни разлики, при што Г5 (VitC+GSH+Zn) имаше највисока активност и беше значајно повисока од Г2 и Г3. GR исто така варираше значајно, со највисоки вредности во Г5 (VitC+GSH+Zn) во споредба со сите други групи, додека Г3 (VitC+GSH) и Г4 (Zn) беа повисоки од Г2. CAT покажа слични резултати, со значајно повисока активност во Г5 (VitC+GSH+Zn) во споредба со сите останати групи, вклучително и од негативната контролна група (Г1), додека во Г2 активноста беше значајно пониска од сите групи третирани со антиоксиданти (Г3-Г5). Антиоксидативната суплементација го нормализира (Г3/Г4) или максимизира (Г5) ензимскиот антиоксидативен капацитет во споредба со нетретираниот 5-FU група, со најконзистентна предност на комбинираниот третман VitC+GSH+Zn (Г5).

Четвртата дополнителна хипотеза во нашето истражување беше: Нивото на оксидативниот стрес е повисоко кога хемотерапијата се ординира без дополнување со антиоксиданти.

Хипотезата ја потврдуваме. Ова го потврдува серумскиот MDA како маркер на липидна пероксидација (оксидативен стрес). Во позитивната контрола група без антиоксиданти (Г2), концентрацијата на MDA беше статистички значајно повисока во споредба со сите други групи (Г1, Г3-Г5). Помеѓу групите третирани со антиоксиданти, немаше статистички значајна разлика. Антиоксидативната суплементација е поврзана со пониска концентрација на MDA во однос на групата нетретирани со антиоксиданти (Г2), што укажува на редукција на оксидативниот стрес. Биолошки, ова е конзистентно со очекуваното намалување на РКВ и потиснување на NF-κB-сигнализацијата при третман со витамин Ц и глутатион, а при третман со цинк, преку потенцијално ограничување на липидната пероксидација преку мембранска стабилизација и металотионеини.

Петтата дополнителна хипотеза во нашето истражување беше: Антиоксидативната суплементација ги намалува патохистолошките оштетувања на плунковните жлезди предизвикани од хемотерапија.

Хипотезата ја отфрламе. Иако се очекуваше антиоксидативната терапија да ја намали хистолошката атипија, резултатите не покажаа конзистентна заштита. Кај групите третирани со антиоксиданти (Г3-Г5) патохистолошките промени беа повеќе слични со Г2, отколку со Г1, без конзистентен доказ за редукција на оштетувањата. Дополнително, треба да се истакне дека квалитетот на препаратите беше ограничувачки фактор. Дебелината на сечењата и можните артефакти (вакуоли) го отежнуваа толкувањето. Затоа, иако постојната литература јасно укажува на тоа дека 5-FU индуцира значајни структурни и функционални нарушувања на плунковните жлезди, а антиоксидантите имаат потенцијална заштитна улога, нашите податоци не ја рефлектираат таа разлика. Веројатно е дека наодите одразуваат технички ограничувања, а не вистинска биолошка отсуност на ефект.

6. ПРИМЕНА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО И МОЖНИ НАСОКИ ЗА НАТАМОШНО ИСТРАЖУВАЊЕ

Резултатите од ова истражување даваат значајни сознанија за улогата на антиоксидативната суплементација во контекст на хемотераписки индуцираните оштетувања на оралната мукоза и системските промени поврзани со воспаление и оксидативен стрес. Клиничките и биохемиските параметри покажаа дека комбинациите со витамин Ц и глутатион имаат потенцијал да редуцираат дел од негативните ефекти предизвикани од 5-FU, особено преку намалување на концентрациите на проинфламаторните цитокини (TNF- α и IL-1 β) и MDA, како маркер на липидната пероксидација. Овие податоци имаат практична вредност бидејќи отвораат можност за примена на антиоксидативна суплементација како адјувантна стратегија во клиничката онкологија со цел подобрување на толеранцијата на пациентите кон терапијата.

Од клинички аспект, ваквите резултати би можеле да се применат при дизајнирање на протоколи за превенција или редукција на интензитетот на ОМ. Подобрувањето на антиоксидативниот капацитет на организмот може да придонесе кон побрза епителизација на лезиите, редукција на болката и подобрување на квалитетот на живот на пациентите. Дополнително, редукцијата на системскиот оксидативен стрес и воспалението, потенцијално може да влијае и на намалување на секундарните компликации поврзани со имуносупресијата и оштетувањето на органи чувствителни на РКВ.

Од друга страна, патохистолошките анализи во ова истражување не покажаа јасни разлики меѓу групите, што укажува дека нивната примена како единствен критериум за проценка на ефектот е ограничена, особено ако постојат технички ограничувања. Ова ја нагласува потребата за идни студии со поголема прецизност во методологијата, вклучувајќи стандардизирана подготовка на ткивните примероци и употреба на дополнителни имунохистохемиски маркери за попрецизна проценка на промените на плунковните жлезди.

Идните истражувања треба да внимаваат на неколку аспекти. Прво, потребни се студии со поголем примерок за да се добие статистички појасна слика за ефектите на антиоксидантите, но сепак поради етичките аспекти, тоа е ограничено во анималните студии. Второ, треба да се испитаат различни дози и комбинации на антиоксидативни супстанции со цел да се утврди оптимален протокол за заштита на ткивата без нарушување на антиканцерогената ефикасност на 5-FU. Трето, важно е да се спроведат клинички студии кај пациенти со ОМ за да се утврди дали овие експериментални резултати се преносливи во реална клиничка пракса.

Исто така, може да се разгледа и примена на дополнителни биомаркери на оксидативен стрес и воспаление, за поцелосна слика на биохемиските процеси.

Резимирано, иако нашето истражување има методолошки ограничувања, добиените резултати јасно укажуваат дека антиоксидативната суплементација има потенцијал за клиничка примена. Нашите резултати отвораат пат кон нови превентивни и терапевтски стратегии кои би можеле да ја подобрат грижата за пациентите подложени на хемотерапија, а идните студии ќе бидат клучни за да се валидираат и прецизираат овие стратегии.

7. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на резултатите од нашето истражување и податоците од литературата, можеме да заклучиме:

1.Хемотерапијата со 5-FU и употребата на овој анимален модел, доведува до изразен орален мукозитис, карактеризиран со формирање на лезии, нарушување на антиоксидативниот одбранбен систем и зголемен оксидативен стрес.

2.Суплементацијата со неензимски антиоксиданти придонесува за делумна заштита од овие ефекти, преку намалување на интензитетот и побрза епителизација на лезиите, особено кога се комбинира витамин Ц со глутатион и цинк.

3.Витаминот Ц и глутатионот покажаа поголемо влијание врз намалување на интензитетот на лезиите и редукција на проинфламаторните медијатори, додека цинкот се покажа поефикасен во стимулирање на реепителизацијата.

4.Комбинираната примена на витамин Ц, глутатион и цинк даде најизразен позитивен ефект врз антиоксидативниот статус, со најголема сочуваност на активноста на антиоксидативните ензими и најниски нивоа на оксидативниот стрес, определено преку концентрацијата на MDA, како маркер на липидната пероксидација.

5.Иако разликите меѓу групите не секогаш беа статистички значајни, биолошките механизми на дејствување укажуваат на потенцијална комплементарност и кумулативен ефект на антиоксидантите.

6.Патохистолошките анализи не прикажаа јасна разлика меѓу групите, што најверојатно се должи на методолошки ограничувања, а не на отсуство на биолошки ефект.

7.Резултатите ја потврдуваат централната улога на оксидативниот стрес и инфламацијата во патогенезата на оралниот мукозитис и ја поддржуваат хипотезата дека модулацијата на оксидоредуктивната рамнотежата со антиоксиданти може да има клиничка примена.

8.Потребни се понатамошни истражувања со поголем примерок, стандардизирани методи и клиничка верификација за да се процени реалниот терапевтски потенцијал и безбедност на антиоксидативната суплементација кај пациенти подложени на хемотерапија.

8. СПИСОК НА КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Pulito C, Cristaudo A, Porta C La, et al. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1). doi:10.1186/S13046-020-01715-7
2. Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis - Complicating the treatment of cancer. *Neoplasia.* 2004;6(5):423-431. doi:10.1593/neo.04169
3. Shankar A, Roy S, Bhandari M, et al. Current Trends in Management of Oral Mucositis in Cancer Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(8):2019-2026. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2019
4. Abdalla-Aslan R, Keegan R, Zadik Y, Yarom N, Elad S. Recent advances in cancer therapy-associated oral mucositis. *Oral Dis.* Published online 2024. doi:10.1111/ODI.14999
5. Elad S, Cheng KKF, Lalla R V., et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer.* 2020;126(19):4423-4431. doi:10.1002/CNCR.33100
6. Elad S, Yarom N, Zadik Y, Kuten-Shorrer M, Sonis ST. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):57-77. doi:10.3322/CAAC.21704
7. Panahi Y, Ala S, Saeedi M, Okhovatian A, Bazzaz N, Naghizadeh MM. Allopurinol mouth rinse for prophylaxis of fluorouracil-induced mucositis. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2010;19(3):308-312. doi:10.1111/J.1365-2354.2008.01042.X
8. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer.* 2004;100(9 Suppl):2026-2046. doi:10.1002/CNCR.20163
9. Eichhorn S, Rudin L, Ramasamy C, et al. Elevated Likelihood of Infectious Complications Related to Oral Mucositis After Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Outcomes and Risk Factors. *Cancers (Basel).* 2025;17(16). doi:10.3390/CANCERS17162657
10. Judge LF, Farrugia MK, Singh AK. Narrative review of the management of oral mucositis during chemoradiation for head and neck cancer. *Ann Transl Med.* 2021;9(10):916-916. doi:10.21037/ATM-20-3931
11. Elting LS, Keefe DM, Sonis ST, et al. Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer.* 2008;113(10):2704-2713. doi:10.1002/CNCR.23898
12. Epstein JB, Miaskowski C. Oral Pain in the Cancer Patient. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019;2019(53). doi:10.1093/JNCIMONOGRAPHS/LGZ003
13. Lalla R V., Brennan MT, Gordon SM, Sonis ST, Rosenthal DI, Keefe DM. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and/or Head and Neck Radiation Therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019;2019(53). doi:10.1093/JNCIMONOGRAPHS/LGZ011
14. Mirabile A, Numico G, Russi EG, et al. Sepsis in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Literature review and consensus. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;95(2):191-213. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.03.003

15. Elting LS, Chang YC. Costs of Oral Complications of Cancer Therapies: Estimates and a Blueprint for Future Study. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019;2019(53). doi:10.1093/JNCIMONOGRAPHS/LGZ010
16. Rodrigues-Oliveira L, Kowalski LP, Santos M, et al. Direct costs associated with the management of mucositis: A systematic review. *Oral Oncol.* 2021;118. doi:10.1016/j.oraloncology.2021.105296
17. Volpato LER, Silva TC, Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM. Radiation therapy and chemotherapy-induced oral mucositis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007;73(4):562-568. doi:10.1016/S1808-8694(15)30110-5
18. Iovoli AJ, Turecki L, Qiu ML, et al. Severe Oral Mucositis After Intensity-Modulated Radiation Therapy for Head and Neck Cancer. *JAMA Netw Open.* 2023;6(10):E2337265. doi:10.1001/JAMANETWORKOPEN.2023.37265
19. Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, Sonis S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer.* 2006;106(2):329-336. doi:10.1002/CNCR.21622
20. Murphy BA, Beaumont JL, Isitt J, et al. Mucositis-Related Morbidity and Resource Utilization in Head and Neck Cancer Patients Receiving Radiation Therapy With or Without Chemotherapy. *J Pain Symptom Manage.* 2009;38(4):522-532. doi:10.1016/j.jpainsymman.2008.12.004
21. Colella G, Boschetti CE, Vitagliano R, et al. Interventions for the Prevention of Oral Mucositis in Patients Receiving Cancer Treatment: Evidence from Randomised Controlled Trials. *Curr Oncol.* 2023;30(1):967-980. doi:10.3390/CURRONCOL30010074
22. Bell A, Kasi A. *Oral Mucositis*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
23. Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol.* 2007;5(9 Suppl 4):3-11. Accessed October 6, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18046993/>
24. Xia J, Tao X, Hu Q, et al. Expert consensus on the prevention and treatment of radiochemotherapy-induced oral mucositis. *Int J Oral Sci.* 2025;17(1). doi:10.1038/S41368-025-00382-8
25. Nguyen H, Sangha S, Pan M, et al. 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). doi:10.3390/IJMS23094863
26. Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi S, Lee MC II. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One.* 2013;8(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0082834
27. Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, et al. Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer.* 2013;21(7):2075-2083. doi:10.1007/S00520-013-1810-Y
28. Ramírez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Labardini-Méndez J, Ponce de León-Rosales S. Double-blind placebo-controlled randomized clinical trial evaluating doxycycline effects on chemotherapy-induced oral mucositis. *J Clin Pharm Ther.* 2018;43(2):202-208. doi:10.1111/JCPT.12633
29. Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. *Front Oncol.* 2017;7(MAY). doi:10.3389/FONC.2017.00089
30. Cardoso LM, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA, Basso FG. Chemotherapy drugs and inflammatory cytokines enhance matrix metalloproteinases expression by oral mucosa cells. *Arch Oral Biol.* 2021;127. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105159
31. R S, Pandiyan I. Unveiling the Multifaceted Management of Oral Mucositis in Cancer Patients: A Narrative Review. *Cureus.* 2024;16(2). doi:10.7759/CUREUS.55213

32. Riley P, Glenny AM, Worthington H V., et al. Interventions for preventing oral mucositis in patients with cancer receiving treatment: cytokines and growth factors. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;11(11). doi:10.1002/14651858.CD011990.PUB2
33. Villa JF, Strang A, Owolabi A, Ramirez MF. Addressing Pain in Oral Mucositis: Narrative Review of Current Practices and Emerging Treatments. *J Pain Res.* 2025;18:3723-3741. doi:10.2147/JPR.S533351
34. Chalabi-Dchar M, Fenouil T, Machon C, et al. A novel view on an old drug, 5-fluorouracil: an unexpected RNA modifier with intriguing impact on cancer cell fate. *NAR Cancer.* 2021;3(3). doi:10.1093/NARCAN/ZCAB032
35. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.* 1957;179(4561):663-666. doi:10.1038/179663A0
36. Ghafouri-Fard S, Abak A, Tondro Anamag F, et al. 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent. *Front Oncol.* 2021;11. doi:10.3389/FONC.2021.658636
37. Naren G, Li D, Xing D, et al. Smug1 alleviates the reproductive toxicity of 5-FU through functioning in rRNA quality control. *Sci Rep.* 2025;15(1). doi:10.1038/S41598-025-90330-7
38. Karabajakian A, Gau M, Reverdy T, Neidhardt EM, Fayette J. Induction Chemotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Question of Belief. *Cancers (Basel).* 2018;11(1). doi:10.3390/CANCERS11010015
39. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(17):1705-1715. doi:10.1056/NEJMOA070956
40. Bernadach M, Lapeyre M, Dillies AF, et al. Predictive factors of toxicity of TPF induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancers. *BMC Cancer.* 2021;21(1). doi:10.1186/S12885-021-08128-5
41. Hanemaaijer SH, Kok IC, Fehrmann RSN, et al. Comparison of Carboplatin With 5-Fluorouracil vs. Cisplatin as Concomitant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2020;10. doi:10.3389/FONC.2020.00761
42. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1116-1127. doi:10.1056/NEJMOA0802656
43. Fukuda N, Yunokawa M, Fujiwara Y, et al. Comparison of the efficacy and safety of the EXTREME regimen for treating recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma in older and younger adult patients. *Cancer Rep (Hoboken).* 2021;4(2). doi:10.1002/CNR2.1322
44. D'Hondt L, Lonchay C, André M, Canon JL. Oral mucositis induced by anticancer treatments: physiopathology and treatments. *Ther Clin Risk Manag.* 2006;2(2):159-168. doi:10.2147/TCRM.2006.2.2.159
45. de Moraes FCA, de Almeida Barbosa AB, Sano VKT, Kelly FA, Burbano RMR. Pharmacogenetics of DPYD and treatment-related mortality on fluoropyrimidine chemotherapy for cancer patients: a meta-analysis and trial sequential analysis. *BMC Cancer.* 2024;24(1). doi:10.1186/S12885-024-12981-5
46. Schneider JJ, Galettis P, Martin JH. Overcoming barriers to implementing precision dosing with 5-fluorouracil and capecitabine. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(2):317-325. doi:10.1111/BCP.14723

47. Diasio RB, Offer SM. Testing for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency to Individualize 5-Fluorouracil Therapy. *Cancers (Basel)*. 2022;14(13). doi:10.3390/CANCERS14133207
48. Takeuchi I, Kawamata R, Makino K. A Rat Model of Oral Mucositis Induced by Cancer Chemotherapy for Quantitative Experiments. *Anticancer Res*. 2020;40(5):2701-2706. doi:10.21873/ANTICANRES.14241
49. Morvan FO, Baroukh B, Ledoux D, et al. An Engineered Biopolymer Prevents Mucositis Induced by 5-Fluorouracil in Hamsters. *American Journal of Pathology*. 2004;164(2):739-746. doi:10.1016/S0002-9440(10)63161-6
50. Astuti AK, Samsul, Louisa M, Wimardhani YS, Yasmon A, Wuyung PE. Clinical and histopathological evaluation of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in a rat model. *Open Vet J*. 2025;15(5):1958-1968. doi:10.5455/OVJ.2025.V15.I5.10
51. Liu J, Han X, Zhang T, Tian K, Li Z, Luo F. Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy. *J Hematol Oncol*. 2023;16(1). doi:10.1186/S13045-023-01512-7
52. Čižmarová B, Tomečková V, Hubková B, Hurajtová A, Ohlasová J, Birková A. Salivary Redox Homeostasis in Human Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17). doi:10.3390/IJMS231710076
53. Tretter V, Hochreiter B, Zach ML, Krenn K, Klein KU. Understanding Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1). doi:10.3390/IJMS23010106
54. Sharifi-Rad M, Anil Kumar N V., Zucca P, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020;11. doi:10.3389/FPHYS.2020.00694
55. Hong Y, Boiti A, Vallone D, Foulkes NS. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(3). doi:10.3390/ANTIOX13030312
56. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
57. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38388-38393. doi:10.1074/JBC.M105395200
58. Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E. Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. *Methods Cell Biol*. 2007;80:379-393. doi:10.1016/S0091-679X(06)80019-1
59. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Van Zanden J, Van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2001;10(4):141-152. doi:10.1016/S1382-6689(01)00077-1
60. Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*. 1995;251(C):3-7. doi:10.1016/0076-6879(95)51106-7
61. Mehta SK, Gowder SJT, Mehta SK, Gowder SJT. Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. Published online November 11, 2015. doi:10.5772/61884
62. Kaźmierczak-Barańska J, Boguszevska K, Adamus-Grabicka A, Karwowski BT. Two Faces of Vitamin C- Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*. 2020;12(5). doi:10.3390/NU12051501

63. Shakeri M, Oskoueian E, Le HH, Shakeri M. Strategies to Combat Heat Stress in Broiler Chickens: Unveiling the Roles of Selenium, Vitamin E and Vitamin C. *Vet Sci.* 2020;7(2). doi:10.3390/VETSCI7020071
64. Lin H, Wang L, Jiang X, Wang J. Glutathione dynamics in subcellular compartments and implications for drug development. *Curr Opin Chem Biol.* 2024;81. doi:10.1016/j.cbpa.2024.102505
65. Ivanovski K, Pesevska S, Dirjanska K, Ristoska S. *Орална Биохемија и Физиологија*. Faculty of Dentistry - Skopje; 2022.
66. Federici L, Masulli M, De Laurenzi V, Allocati N. The Role of S-Glutathionylation in Health and Disease: A Bird's Eye View. *Nutrients.* 2024;16(16). doi:10.3390/NU16162753
67. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol.* 2014;5. doi:10.3389/FPHAR.2014.00196
68. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol.* 2024;98(5):1323-1367. doi:10.1007/S00204-024-03696-4
69. Marreiro D do N, Cruz KJC, Morais JBS, Beserra JB, Severo JS, Soares de Oliveira AR. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants (Basel).* 2017;6(2). doi:10.3390/ANTIOX6020024
70. Bonaventura P, Benedetti G, Albarède F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev.* 2015;14(4):277-285. doi:10.1016/j.autrev.2014.11.008
71. Elad S, Raber-Durlacher JE, Brennan MT, et al. Basic oral care for hematology-oncology patients and hematopoietic stem cell transplantation recipients: a position paper from the joint task force of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO) and the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Support Care Cancer.* 2015;23(1):223-236. doi:10.1007/S00520-014-2378-X
72. Correa MEP, Cheng KKF, Chiang K, et al. Systematic review of oral cryotherapy for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2020;28(5):2449-2456. doi:10.1007/S00520-019-05217-X
73. Saunders DP, Rouleau T, Cheng K, et al. Systematic review of antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, and analgesics for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2020;28(5):2473-2484. doi:10.1007/S00520-019-05181-6
74. Poposki B, Ivanovski K, Pejčić A, Kokolanski V, Stanković I. Up-to-date Modalities in the Prevention of Oral Mucositis: A Literature Review. *Acta Facultatis Medicae Naissensis.* 2025;42(1):13-26. doi:10.5937/AFMNAI42-50548
75. Nicolatou-Galitis O, Bossi P, Orlandi E, René-Jean Bensadoun. The role of benzydamine in prevention and treatment of chemoradiotherapy-induced mucositis. *Support Care Cancer.* 2021;29(10):5701-5709. doi:10.1007/S00520-021-06048-5
76. Cruz AR, Minicucci EM, Betini M, Almeida-Lopes L, Tieghi Neto V, Cataneo AJM. Efficacy of photobiomodulation in the treatment of oral mucositis in patients undergoing antineoplastic therapy: systematic review and meta-analysis. *Support Care Cancer.* 2023;31(12). doi:10.1007/S00520-023-08105-7
77. Walladbegi J, Smith SA, Grayson AK, Murdoch C, Jontell M, Colley HE. Cooling of the oral mucosa to prevent adverse effects of chemotherapeutic agents: An in vitro study. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(5):477-483. doi:10.1111/JOP.12696

78. Orvain C, Moles-Moreau MP, François S, et al. Miconazole mucoadhesive buccal tablet in high-dose therapy with autologous stem cell transplantation (HDT/ASCT)-induced mucositis. *Support Care Cancer*. 2015;23(2):359-364. doi:10.1007/S00520-014-2365-2
79. Ferreira AS, Macedo C, Silva AM, Delerue-Matos C, Costa P, Rodrigues F. Natural Products for the Prevention and Treatment of Oral Mucositis-A Review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8). doi:10.3390/IJMS23084385
80. Belfiore E, Di Prima G, Angellotti G, Panzarella V, De Caro V. Plant-Derived Polyphenols to Prevent and Treat Oral Mucositis Induced by Chemo- and Radiotherapy in Head and Neck Cancers Management. *Cancers (Basel)*. 2024;16(2). doi:10.3390/CANCERS16020260
81. Sonis ST. Mucositis as a biological process: A new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol*. 1998;34(1):39-43. doi:10.1016/S1368-8375(97)00053-5
82. Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004;20(1):11-15. doi:10.1053/j.soncn.2003.10.003
83. Sonis ST. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral Dis*. 2010;16(7):597-600. doi:10.1111/J.1601-0825.2010.01681.X
84. Sonis ST. A hypothesis for the pathogenesis of radiation-induced oral mucositis: when biological challenges exceed physiologic protective mechanisms. Implications for pharmacological prevention and treatment. *Support Care Cancer*. 2021;29(9):4939-4947. doi:10.1007/S00520-021-06108-W
85. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*. 2007;109(5):820-831. doi:10.1002/CNCR.22484
86. Lalla R V., Bowen J, Barasch A, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014;120(10):1453-1461. doi:10.1002/CNCR.28592
87. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(5):448-460. doi:10.1016/j.ctrv.2007.03.001
88. Shimamura Y, Takeuchi I, Terada H, Makino K. A Mouse Model for Oral Mucositis Induced by Cancer Chemotherapy. *Anticancer Res*. 2018;38(1):307-312. doi:10.21873/ANTICANRES.12223
89. Kim DH, Choi J, Lim YS, Huh HJ, Cho CG, Kim BH. A Rat Model for Oral Mucositis Induced by a Single Administration of 5-Fluorouracil. *In Vivo*. 2023;37(1):218-224. doi:10.21873/INVIVO.13070
90. Mohammed AI, Celentano A, Paolini R, et al. Characterization of a novel dual murine model of chemotherapy-induced oral and intestinal mucositis. *Sci Rep*. 2023;13(1). doi:10.1038/S41598-023-28486-3
91. Boo YC. Ascorbic Acid (Vitamin C) as a Cosmeceutical to Increase Dermal Collagen for Skin Antiaging Purposes: Emerging Combination Therapies. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(9). doi:10.3390/ANTIOX11091663
92. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Qasim AM, Al-Yousef Y. Ascorbic acid attenuates antineoplastic drug 5-fluorouracil induced gastrointestinal toxicity in rats by modulating the expression of inflammatory mediators. *Toxicol Rep*. 2015;2:908-916. doi:10.1016/j.toxrep.2015.06.006
93. Al-Asmari AK, Khan AQ, Al-Masri N. Mitigation of 5-fluorouracil-induced liver damage in rats by vitamin C via targeting redox-sensitive transcription factors. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35(11):1203-1213. doi:10.1177/0960327115626583

94. Chaitanya NCSK, Muthukrishnan A, Rao KP, et al. Oral Mucositis Severity Assessment by Supplementation of High Dose Ascorbic Acid During Chemo and/or Radiotherapy of Oro-Pharyngeal Cancers – A Pilot Project. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2018;52(3):532-539. doi:10.5530/ijper.52.3.61
95. Limbrunner J, Doerfler J, Pietschmann K, Buentzel J, Scharpenberg M, Huebner J. The influence of antioxidant supplementation on adverse effects and tumor interaction during radiotherapy: a systematic review. *Clin Exp Med*. 2025;25(1). doi:10.1007/S10238-025-01804-X
96. Ertekin MV, Koç M, Karslioğlu I, Sezen O. Zinc sulfate in the prevention of radiation-induced oropharyngeal mucositis: A prospective, placebo-controlled, randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(1):167-174. doi:10.1016/S0360-3016(03)01562-1
97. Sangthawan D, Phunggrassami T, Sinkitjarurnchai W. A randomized double-blind, placebo-controlled trial of zinc sulfate supplementation for alleviation of radiation-induced oral mucositis and pharyngitis in head and neck cancer patients. *J Med Assoc Thai*. 2013;96(1):69-76. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720981/>
98. Arbabi-kalati F, Arbabi-kalati F, Deghatipour M, Moghaddam AA. Evaluation of the efficacy of zinc sulfate in the prevention of chemotherapy-induced mucositis: a double-blind randomized clinical trial. *Arch Iran Med*. 2012;15(7):413-417. doi:012157/AIM.008
99. Rambod M, Pasyar N, Ramzi M. The effect of zinc sulfate on prevention, incidence, and severity of mucositis in leukemia patients undergoing chemotherapy. *European Journal of Oncology Nursing*. 2018;33:14-21. doi:10.1016/j.ejon.2018.01.007
100. Agare GI, Chidike Ezeorba TP, 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. doi:10.1016/j.clnesp.2025.02.011
101. Liu X, Zhang W, Chen Y, Rastogi S, Choudhury R. Effectiveness of zinc supplementation on the incidence of oral mucositis during chemotherapy and radiation: A meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2023;26(1). doi:10.3892/ETM.2023.12046
102. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):1-12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
103. Yoneda J, Nishikawa S, Kurihara S. Oral administration of cystine and theanine attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and diarrhea by suppressing both glutathione level decrease and ROS production in the small intestine of mucositis mouse model. *BMC Cancer*. 2021;21(1). doi:10.1186/S12885-021-09057-Z
104. Leitão RFC, Ribeiro RA, Lira AMS, et al. Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61(2):215-222. doi:10.1007/S00280-007-0463-2
105. Skeff MA, Brito GAC, De Oliveira MG, et al. S-nitrosoglutathione accelerates recovery from 5-fluorouracil-induced oral mucositis. *PLoS One*. 2014;9(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0113378
106. Tsujimoto T, Yamamoto Y, Wasa M, et al. L-glutamine decreases the severity of mucositis induced by chemoradiotherapy in patients with locally advanced head and neck cancer: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Oncol Rep*. 2015;33(1):33-39. doi:10.3892/OR.2014.3564

107. Pattanayak L, Panda N, Dash MK, Mohanty S, Samantaray S. Management of Chemoradiation-Induced Mucositis in Head and Neck Cancers With Oral Glutamine. *J Glob Oncol.* 2016;2(4):200-206. doi:10.1200/JGO.2015.000786
108. Lopez-Vaquero D, Gutierrez-Bayard L, Rodriguez-Ruiz JA, Saldaña-Valderas M, Infante-Cossio P. Double-blind randomized study of oral glutamine on the management of radio/chemotherapy-induced mucositis and dermatitis in head and neck cancer. *Mol Clin Oncol.* 2017;6(6):931-936. doi:10.3892/MCO.2017.1238
109. Hassanein FEA, Mikhail C, Elkot S, Abou-Bakr A. L-arginine vs. L-glutamine oral suspensions for radiation-induced oral mucositis: a triple-blind randomized trial. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2025;151(7). doi:10.1007/S00432-025-06213-X
110. Huang CJ, Huang MY, Fang PT, et al. Randomized double-blind, placebo-controlled trial evaluating oral glutamine on radiation-induced oral mucositis and dermatitis in head and neck cancer patients. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2019;109(3):615-625. doi:10.1093/ajcn/nqy329
111. Shuai T, Tian X, Xu LL, et al. Oral Glutamine May Have No Clinical Benefits to Prevent Radiation-Induced Oral Mucositis in Adult Patients With Head and Neck Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Nutr.* 2020;7. doi:10.3389/FNUT.2020.00049
112. Alsubaie HM, Alsini AY, Alsubaie KM, et al. Glutamine for prevention and alleviation of radiation-induced oral mucositis in patients with head and neck squamous cell cancer: Systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Head Neck.* 2021;43(10):3199-3213. doi:10.1002/HED.26798
113. Yarom N, Hovan A, Bossi P, et al. Systematic review of natural and miscellaneous agents, for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines - part 2: honey, herbal compounds, saliva stimulants, probiotics, and miscellaneous agents. *Support Care Cancer.* 2020;28(5):2457-2472. doi:10.1007/S00520-019-05256-4
114. Molan PC. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2006;5(1):40-54. doi:10.1177/1534734605286014
115. Biswal BM, Zakaria A, Ahmad NM. Topical application of honey in the management of radiation mucositis: a preliminary study. *Support Care Cancer.* 2003;11(4):242-248. doi:10.1007/S00520-003-0443-Y
116. Motallebnejad M, Akram S, Moghadamnia A, Moulana Z, Omid S. The effect of topical application of pure honey on radiation-induced mucositis: a randomized clinical trial. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9(3):040-047. doi:10.5005/jcdp-9-3-40
117. Rashad UM, Al-Gezawy SM, El-Gezawy E, Azzaz AN. Honey as topical prophylaxis against radiochemotherapy-induced mucositis in head and neck cancer. *J Laryngol Otol.* 2009;123(2):223-228. doi:10.1017/S0022215108002478
118. Samdariya S, Lewis S, Kauser H, Ahmed I, Kumar D. A Randomized Controlled Trial Evaluating the Role of Honey in Reducing Pain Due to Radiation Induced Mucositis in Head and Neck Cancer Patients. *Indian J Palliat Care.* 2015;21(3):268-273. doi:10.4103/0973-1075.164892
119. Anshasi H, Abufarsakh B, Alkhawaldeh JM, Halalmeh S Al. Honey for managing oral mucositis induced by cancer therapies: An overview of systematic reviews. *Complement Ther Med.* 2025;92. doi:10.1016/j.ctim.2025.103197

120. Nurhidayah I, Rustina Y, Hastono SP, Mediani HS. The effect of honey in oral care intervention against chemotherapy-induced mucositis in pediatric cancer patients: a pilot study. *BMC Complement Med Ther.* 2024;24(1). doi:10.1186/S12906-024-04710-Z
121. Bolouri AJ, Pakfetrat A, Tonkaboni A, et al. Preventing and Therapeutic Effect of Propolis in Radiotherapy Induced Mucositis of Head and Neck Cancers: A Triple-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Iran J Cancer Prev.* 2015;8(5). doi:10.17795/IJCP-4019
122. Akhavan-Karbassi MH, Yazdi MF, Ahadian H, Sadr-Abad MJ. Randomized DoubleBlind PlaceboControlled Trial of Propolis for Oral Mucositis in Patients Receiving Chemotherapy for Head and Neck Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(7):3611-3614. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27510017/>
123. Sencer SF, Zhou T, Freedman LS, et al. Traumeel S in preventing and treating mucositis in young patients undergoing SCT: a report of the Children's Oncology Group. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(11):1409-1414. doi:10.1038/BMT.2012.30
124. dos Reis PED, Ciol MA, de Melo NS, Figueiredo PT de S, Leite AF, Manzi N de M. Chamomile infusion cryotherapy to prevent oral mucositis induced by chemotherapy: a pilot study. *Support Care Cancer.* 2016;24(10):4393-4398. doi:10.1007/S00520-016-3279-Y
125. Sharma A, Rath GK, Chaudhary SP, Thakar A, Mohanti BK, Bahadur S. Lactobacillus brevis CD2 lozenges reduce radiation- and chemotherapy-induced mucositis in patients with head and neck cancer: A randomized double-blind placebo-controlled study. *Eur J Cancer.* 2012;48(6):875-881. doi:10.1016/j.ejca.2011.06.010
126. Pai RR, Banerjee S, George LS, George A, Ongole R. Impact of an oral care intervention protocol on oral health outcomes in head and neck cancer patients undergoing radiation or chemoradiation therapy. *BMC Oral Health.* 2025;25(1). doi:10.1186/S12903-025-05877-8
127. Farivar Z, Salehiniya H, Alizadeh L. Oral care interventions for the prevention and management of anticancer therapy-induced oral mucositis: A systematic review. *Oral Oncology Reports.* 2025;15:100759. doi:10.1016/J.OOR.2025.100759
128. Hong CHL, Gueiros LA, Fulton JS, et al. Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2019;27(10):3949-3967. doi:10.1007/S00520-019-04848-4
129. Shieh SH, Wang ST, Tsai ST, Tseng CC. Mouth care for nasopharyngeal cancer patients undergoing radiotherapy. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1997;33(1):36-41. doi:10.1016/S0964-1955(96)00053-X
130. Kartin PT, Tasci S, Soyuer S, Elmali F. Effect of an oral mucositis protocol on quality of life of patients with head and neck cancer treated with radiation therapy. *Clin J Oncol Nurs.* 2014;18(6):E118-E125. doi:10.1188/14.CJON.E118-E125
131. Borowski B, Benhamou E, Pico JL, Laplanche A, Margainaud JP, Hayat M. Prevention of oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation: a randomised controlled trial comparing two protocols of dental care. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994;30B(2):93-97. doi:10.1016/0964-1955(94)90059-0
132. Bhatt V, Vendrell N, Nau K, Crumb D, Roy V. Implementation of a standardized protocol for prevention and management of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. *J Oncol Pharm Pract.* 2010;16(3):195-204. doi:10.1177/1078155209348721

133. Rojas de Morales T, Zambrano O, Rivera L, et al. Oral-disease prevention in children with cancer: testing preventive protocol effectiveness. *Med Oral*. 2001;6(5):326-334. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11694865/>
134. MP LP, P S, NL P. Incidence of oral complications and application of a preventive protocol in children with acute leukemia. *Spec Care Dentist*. 1998;18(5):189-193. doi:10.1111/J.1754-4505.1998.TB01738.X
135. Cheng KKF, Molassiotis A, Chang AM, Wai WC, Cheung SS. Evaluation of an oral care protocol intervention in the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in paediatric cancer patients. *Eur J Cancer*. 2001;37(16):2056-2063. doi:10.1016/S0959-8049(01)00098-3
136. Kwon Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. *Onco Targets Ther*. 2016;9:2007-2016. doi:10.2147/OTT.S96899
137. Logan RM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DMK. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. *Oral Oncol*. 2007;43(4):395-401. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.04.011
138. Coppini M, Caponio VCA, Mauceri R, et al. Efficacy of topical agents in oral mucositis prevention: Systematic review and network meta-analysis. *Oral Dis*. 2024;30(7):4126-4144. doi:10.1111/ODI.15046
139. Epstein JB, Stevenson-Moore P. Benzydamine hydrochloride in prevention and management of pain in oral mucositis associated with radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1986;62(2):145-148. doi:10.1016/0030-4220(86)90035-6
140. Epstein JB, Stevenson-Moore P, Jackson S, Mohamed JH, Spinelli JJ. Prevention of oral mucositis in radiation therapy: a controlled study with benzydamine hydrochloride rinse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;16(6):1571-1575. doi:10.1016/0360-3016(89)90964-4
141. Epstein JB, Silverman S, Paggiarino DA, et al. Benzydamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis: results from a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Cancer*. 2001;92(4):875-885. doi:10.1002/1097-0142(20010815)92:4<875::aid-cnrcr1396>3.0.co;2-1
142. Kazemian A, Kamian S, Aghili M, Hashemi FA, Haddad P. Benzydamine for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis in head and neck cancers: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2009;18(2):174-178. doi:10.1111/J.1365-2354.2008.00943.X
143. Prada A, Chiesa F. Effects of benzydamine on the oral mucositis during antineoplastic radiotherapy and/or intra-arterial chemotherapy. *Int J Tissue React*. 1987;9(2):115-119. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3610509/>
144. Ariyawardana A, Cheng KKF, Kandwal A, et al. Systematic review of anti-inflammatory agents for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*. 2019;27(10):3985-3995. doi:10.1007/S00520-019-04888-W
145. Rastogi M, Khurana R, Revannasiddaiah S, et al. Role of benzydamine hydrochloride in the prevention of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy (>50 Gy) with or without chemotherapy. *Support Care Cancer*. 2017;25(5):1439-1443. doi:10.1007/S00520-016-3548-9
146. Chitapanarux I, Tungkasamit T, Petsuksiri J, et al. Randomized control trial of benzydamine HCl versus sodium bicarbonate for prophylaxis of concurrent chemoradiation-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2018;26(3):879-886. doi:10.1007/S00520-017-3904-4

147. Lalla R V., Choquette LE, Curley KF, et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of celecoxib for oral mucositis in patients receiving radiation therapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014;50(11):1098-1103. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.08.001
148. Nomura M, Kamata M, Kojima H, Hayashi K, Sawada S. Irsogladine maleate reduces the incidence of fluorouracil-based chemotherapy-induced oral mucositis. *Annals of Oncology.* 2013;24(4):1062-1066. doi:10.1093/annonc/mds584
149. Dueñas-Gonzalez A, Sobrevilla-Calvo P, Frias-Mendivil M, et al. Misoprostol prophylaxis for high-dose chemotherapy-induced mucositis: a randomized double-blind study. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17(5):809-812. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8733702/>
150. Yasuda T, Chiba H, Satomi T, et al. Preventive effect of rebamipide gargle on chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral cancer: a pilot study. *J Oral Maxillofac Res.* 2012;2(4). doi:10.5037/JOMR.2011.2403
151. Chaitanya B, Pai KM, Yathiraj PH, Fernandes D, Chhaparwal Y. Rebamipide gargle in preventive management of chemo-radiotherapy induced oral mucositis. *Oral Oncol.* 2017;72:179-182. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.07.024
152. Yokota T, Ogawa T, Takahashi S, et al. Efficacy and safety of rebamipide liquid for chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with head and neck cancer: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase II study. *BMC Cancer.* 2017;17(1). doi:10.1186/S12885-017-3295-4
153. Parra-Rojas S, Velázquez-Cayón RT, Ciortan-Pop ME, Martins MD, Cassol Spanemberg J. Preventive Photobiomodulation for Chemotherapy-Induced Oral Mucositis: A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Biomedicines.* 2025;13(2):268. doi:10.3390/BIOMEDICINES13020268/S1
154. Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, et al. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2019;27(10):3969-3983. doi:10.1007/S00520-019-04890-2
155. Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer.* 1999;7(4):244-252. doi:10.1007/S005200050256
156. Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG, Vadhira BM. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients - A triple blinded randomized controlled trial. *Radiotherapy and Oncology.* 2012;104(3):349-354. doi:10.1016/j.radonc.2012.06.011
157. Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, et al. Phase III trial of low-level laser therapy to prevent oral mucositis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiation. *Radiotherapy and Oncology.* 2013;109(2):297-302. doi:10.1016/j.radonc.2013.08.010
158. Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, et al. Long-term survival of a randomized phase III trial of head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation therapy with or without low-level laser therapy (LLLT) to prevent oral mucositis. *Oral Oncol.* 2017;71:11-15. doi:10.1016/j.oraloncology.2017.05.018
159. Antunes HS, De Azevedo AM, Bouzas LFDS, et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. *Blood.* 2007;109(5):2250-2255. doi:10.1182/BLOOD-2006-07-035022

160. Ferreira B, da Motta Silveira FM, de Orange FA. Low-level laser therapy prevents severe oral mucositis in patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation: a randomized clinical trial. *Support Care Cancer*. 2016;24(3):1035-1042. doi:10.1007/S00520-015-2881-8
161. Cotomacio CC, Calarga CC, Yshikawa BK, Arana-Chavez VE, Simões A. Wound healing process with different photobiomodulation therapy protocols to treat 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *Arch Oral Biol*. 2021;131. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105250
162. Svanberg A, Birgegård G, Öhrn K. Oral cryotherapy reduces mucositis and opioid use after myeloablative therapy--a randomized controlled trial. *Support Care Cancer*. 2007;15(10):1155-1161. doi:10.1007/S00520-007-0245-8
163. Svanberg A, Öhrn K, Birgegård G. Oral cryotherapy reduces mucositis and improves nutrition - a randomised controlled trial. *J Clin Nurs*. 2010;19(15-16):2146-2151. doi:10.1111/J.1365-2702.2010.03255.X
164. Lilleby K, Garcia P, Gooley T, et al. A prospective, randomized study of cryotherapy during administration of high-dose melphalan to decrease the severity and duration of oral mucositis in patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(11):1031-1035. doi:10.1038/SJ.BMT.1705384
165. Askarifar M, Lakdizaji S, Ramzi M, Rahmani A, Jabbarzadeh F. The Effects of Oral Cryotherapy on Chemotherapy-Induced Oral Mucositis in Patients Undergoing Autologous Transplantation of Blood Stem Cells: A Clinical Trial. *Iran Red Crescent Med J*. 2016;18(4). doi:10.5812/IRCMJ.24775
166. Salvador P, Azusano C, Wang L, Howell D. A pilot randomized controlled trial of an oral care intervention to reduce mucositis severity in stem cell transplant patients. *J Pain Symptom Manage*. 2012;44(1):64-73. doi:10.1016/j.jpainsymman.2011.08.012
167. Batlle M, Morgades M, Vives S, et al. Usefulness and safety of oral cryotherapy in the prevention of oral mucositis after conditioning regimens with high-dose melphalan for autologous stem cell transplantation for lymphoma and myeloma. *Eur J Haematol*. 2014;93(6):487-491. doi:10.1111/EJH.12386
168. Chen J, Seabrook J, Fulford A, Rajakumar I. Icing oral mucositis: Oral cryotherapy in multiple myeloma patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplant. *J Oncol Pharm Pract*. 2017;23(2):116-120. doi:10.1177/1078155215620920
169. Banat K, Al-Haja H, Ananbeh M, Abdullah E, Alloubani A. Effectiveness of cryotherapy in preventing oral mucositis in pediatric cancer patients in Jordan: a randomized controlled trial. *Child health nursing research*. 2024;30(4):245-254. doi:10.4094/CHNR.2024.004
170. Mahood DJ, Dose AM, Loprinzi CL, et al. Inhibition of fluorouracil-induced stomatitis by oral cryotherapy. *J Clin Oncol*. 1991;9(3):449-452. doi:10.1200/JCO.1991.9.3.449
171. Cascinu S, Fedeli A, Fedeli SL, Catalano G. Oral cooling (cryotherapy), an effective treatment for the prevention of 5-fluorouracil-induced stomatitis. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994;30B(4):234-236. doi:10.1016/0964-1955(94)90003-5
172. Baydar M, Dikilitas M, Sevinc A, Aydogdu I. Prevention of oral mucositis due to 5-fluorouracil treatment with oral cryotherapy. *J Natl Med Assoc*. 2005;97(8):1161-1164. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16173332/>

173. Papadeas E, Naxakis S, Riga M, Kalofonos C. Prevention of 5-fluorouracil-related stomatitis by oral cryotherapy: A randomized controlled study. *European Journal of Oncology Nursing*. 2007;11(1):60-65. doi:10.1016/j.ejon.2006.05.002
174. Sorensen JB, Skovsgaard T, Bork E, Damstrup L, Ingeberg S. Double-blind, placebo-controlled, randomized study of chlorhexidine prophylaxis for 5-fluorouracil-based chemotherapy-induced oral mucositis with nonblinded randomized comparison to oral cooling (cryotherapy) in gastrointestinal malignancies. *Cancer*. 2008;112(7):1600-1606. doi:10.1002/CNCR.23328
175. Katranci N, Ovayolu N, Ovayolu O, Sevinc A. Evaluation of the effect of cryotherapy in preventing oral mucositis associated with chemotherapy - A randomized controlled trial. *European Journal of Oncology Nursing*. 2012;16(4):339-344. doi:10.1016/j.ejon.2011.07.008
176. Rocke LK, Loprinzi CL, Lee JK, et al. A randomized clinical trial of two different durations of oral cryotherapy for prevention of 5-fluorouracil-related stomatitis. *Cancer*. 1993;72(7):2234-2238. doi:10.1002/1097-0142(19931001)72:7<2234::aid-cncr2820720728>3.0.co;2-n
177. Kakoei S, Ghassemi A, Nakhaee N. Effect of cryotherapy on oral mucositis in patients with head and neck cancers receiving radiotherapy. *International Journal of Radiation Research*. 2013;11(2):117-120. doi:10.18869/ACADPUB.IJRR
178. Menon NS, Patil VM, Noronha V, et al. A randomized trial to assess the effect of oral cryotherapy in the prevention of mucositis in patients with head and neck cancer receiving chemo-radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2024;42(17_suppl):LBA12134-LBA12134. doi:10.1200/JCO.2024.42.17_SUPPL.LBA12134
179. Wang L, Gu Z, Zhai R, et al. Efficacy of oral cryotherapy on oral mucositis prevention in patients with hematological malignancies undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2015;10(5). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0128763
180. Riley P, Glenny AM, Worthington H V., Littlewood A, Clarkson JE, McCabe MG. Interventions for preventing oral mucositis in patients with cancer receiving treatment: oral cryotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015(12). doi:10.1002/14651858.CD011552.PUB2
181. Szabo S, Hollander D. Pathways of gastrointestinal protection and repair: Mechanisms of action of sucralfate. *Am J Med*. 1989;86(6 SUPPL. 1):23-31. doi:10.1016/0002-9343(89)90153-8
182. Epstein JB, Wong FLW. The efficacy of sucralfate suspension in the prevention of oral mucositis due to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;28(3):693-698. doi:10.1016/0360-3016(94)90195-3
183. Makkonen TA, Boström P, Vilja P, Joensuu H. Sucralfate mouth washing in the prevention of radiation-induced mucositis: a placebo-controlled double-blind randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;30(1):177-182. doi:10.1016/0360-3016(94)90533-9
184. Cengiz M, Özyar E, Öztürk D, Akyol F, Atahan IL, Hayran M. Sucralfate in the prevention of radiation-induced oral mucositis. *J Clin Gastroenterol*. 1999;28(1):40-43. doi:10.1097/00004836-199901000-00009
185. Carter DL, Hebert ME, Smink K, Leopold KA, Clough RL, Brizel DM. Double blind randomized trial of sucralfate vs placebo during radical radiotherapy for head and neck cancers. *Head Neck*. 1999;21(8):760-766. doi:10.1002/(sici)1097-0347(199912)21:8<760::aid-hed12>3.0.co;2-#

186. Evensen JF, Bjordal K, Jacobsen AB, Løkkevik E, Tausjø JE. Effects of Na-sucrose octasulfate on skin and mucosa reactions during radiotherapy of head and neck cancers--a randomized prospective study. *Acta Oncol.* 2001;40(6):751-755. doi:10.1080/02841860152619188
187. Nottage M, McLachlan SA, Brittain MA, et al. Sucralfate mouthwash for prevention and treatment of 5-fluorouracil-induced mucositis: a randomized, placebo-controlled trial. *Support Care Cancer.* 2003;11(1):41-47. doi:10.1007/S00520-002-0378-8
188. Chiara S, Nobile MT, Vincenti M, et al. Sucralfate in the treatment of chemotherapy-induced stomatitis: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *Anticancer Res.* 2001;21(5):3707-3710. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11848548/>
189. Ala S, Saeedi M, Janbabai G, Ganji R, Azhdari E, Shiva A. Efficacy of Sucralfate Mouth Wash in Prevention of 5-fluorouracil Induced Oral Mucositis: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Nutr Cancer.* 2016;68(3):456-463. doi:10.1080/01635581.2016.1153666
190. Suhaimi N, Abdul Razak NAH, Ramli R. Pain Control in Oral Mucositis According to the Severity Scale: A Narrative Literature Review. *J Clin Med.* 2025;14(13):4478. doi:10.3390/JCM14134478
191. Cerchietti LCA, Navigante AH, Bonomi MR, et al. Effect of topical morphine for mucositis-associated pain following concomitant chemoradiotherapy for head and neck carcinoma. *Cancer.* 2002;95(10):2230-2236. doi:10.1002/CNCR.10938
192. Vayne-Bossert P, Escher M, de Vautibault CG, et al. Effect of topical morphine (mouthwash) on oral pain due to chemotherapy- and/or radiotherapy-induced mucositis: a randomized double-blinded study. *J Palliat Med.* 2010;13(2):125-128. doi:10.1089/JPM.2009.0195
193. Sarvizadeh M, Hemati S, Meidani M, Ashouri M, Roayaei M, Shahsanai A. Morphine mouthwash for the management of oral mucositis in patients with head and neck cancer. *Adv Biomed Res.* 2015;4(1):44. doi:10.4103/2277-9175.151254
194. He ZY, Zhou J, Wu SG, et al. Transdermal fentanyl for pain due to chemoradiotherapy-induced oral mucositis in nasopharyngeal cancer patients: evaluating efficacy, safety, and improvement in quality of life. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8:497. doi:10.2147/DDDT.S60187
195. Xing SZ, Zhang Y. Efficacy and safety of transdermal fentanyl for the treatment of oral mucositis pain caused by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Support Care Cancer.* 2015;23(3):753-759. doi:10.1007/S00520-014-2419-5
196. Logan RM, Al-Azri AR, Bossi P, et al. Systematic review of growth factors and cytokines for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2020;28(5):2485-2498. doi:10.1007/S00520-019-05170-9
197. Farrell CL, Rex KL, Chen JN, et al. The effects of keratinocyte growth factor in preclinical models of mucositis. *Cell Prolif.* 2002;35 Suppl 1(Suppl 1):78-85. doi:10.1046/J.1365-2184.35.S1.8.X
198. Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2004;351(25):2590-2598. doi:10.1056/NEJMOA040125
199. Blazar BR, Weisdorf DJ, DeFor T, et al. Phase 1/2 randomized, placebo-control trial of palifermin to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Blood.* 2006;108(9):3216-3222. doi:10.1182/BLOOD-2006-04-017780

200. Lucchese A, Matarese G, Ghislanzoni LH, Gastaldi G, Manuelli M, Gherlone E. Efficacy and effects of palifermin for the treatment of oral mucositis in patients affected by acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(4):820-827. doi:10.3109/10428194.2015.1081192
201. Lucchese A, Matarese G, Manuelli M, et al. Reliability and efficacy of palifermin in prevention and management of oral mucositis in patients with acute lymphoblastic leukemia: a randomized, double-blind controlled clinical trial. *Minerva Stomatol*. 2016;65(1):43-53. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26862696/>
202. Henke M, Alfonsi M, Foa P, et al. Palifermin decreases severe oral mucositis of patients undergoing postoperative radiochemotherapy for head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2815-2820. doi:10.1200/JCO.2010.32.4103
203. Le QT, Kim HE, Schneider CJ, et al. Palifermin reduces severe mucositis in definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2808-2814. doi:10.1200/JCO.2010.32.4095
204. Blijlevens N, De Chateau M, Krivan G, et al. In a high-dose melphalan setting, palifermin compared with placebo had no effect on oral mucositis or related patient's burden. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(7):966-971. doi:10.1038/BMT.2012.257
205. Schneider SB, Nishimura RD, Zimmerman RP, et al. Filgrastim (r-metHuG-CSF) and its potential use in the reduction of radiation-induced oropharyngeal mucositis: an interim look at a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1999;5(3):175-180. Accessed October 7, 2025. <https://europepmc.org/article/med/10641576>
206. Su YB, Vickers AJ, Zelefsky MJ, et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized trial of granulocyte-colony stimulating factor during postoperative radiotherapy for squamous head and neck cancer. *Cancer J*. 2006;12(3):182-188. doi:10.1097/00130404-200605000-00005
207. Dazzi C, Cariello A, Giovanis P, et al. Prophylaxis with GM-CSF mouthwashes does not reduce frequency and duration of severe oral mucositis in patients with solid tumors undergoing high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation rescue: A double blind, randomized, placebo-controlled study. *Annals of Oncology*. 2003;14(4):559-563. doi:10.1093/annonc/mdg177
208. Hong GW, Si YS, Yeon SK, et al. Therapeutic effect of recombinant human epidermal growth factor (RhEGF) on mucositis in patients undergoing radiotherapy, with or without chemotherapy, for head and neck cancer: a double-blind placebo-controlled prospective phase 2 multi-institutional clinical trial. *Cancer*. 2009;115(16):3699-3708. doi:10.1002/CNCR.24414
209. Kim KI, Kim JW, Lee HJ, et al. Recombinant human epidermal growth factor on oral mucositis induced by intensive chemotherapy with stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2013;88(2):107-112. doi:10.1002/AJH.23359
210. Hosseinjani H, Hadjibabaie M, Gholami K, et al. The efficacy of erythropoietin mouthwash in prevention of oral mucositis in patients undergoing autologous hematopoietic SCT: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hematol Oncol*. 2017;35(1):106-112. doi:10.1002/HON.2250
211. Bomfin LE, Braga CM, Oliveira TA, et al. 5-Fluorouracil induces inflammation and oxidative stress in the major salivary glands affecting salivary flow and saliva composition. *Biochem Pharmacol*. 2017;145:34-45. doi:10.1016/j.bcp.2017.08.024

212. Abdelzaher WY, Nassan MA, Ahmed SM, Welson NN, Batiha GES, Khalaf HM. Xanthine Oxidase Inhibitor, Febuxostat Is Effective against 5-Fluorouracil-Induced Parotid Salivary Gland Injury in Rats Via Inhibition of Oxidative Stress, Inflammation and Targeting TRPC1/CHOP Signalling Pathway. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(2). doi:10.3390/PH15020232
213. Harada K, Ferdous T, Fujiwara R, Watanabe K, Mizukami Y, Mishima K. An elemental diet protects mouse salivary glands from 5-fluorouracil-induced atrophy. *Oncol Lett*. 2022;23(6). doi:10.3892/OL.2022.13298
214. Pavesi VCS, Lopez TCC, Martins MAT, et al. Healing action of topical chamomile on 5-fluoracil induced oral mucositis in hamster. *Support Care Cancer*. 2011;19(5):639-646. doi:10.1007/S00520-010-0875-0
215. Curra M, Martins MAT, Lauxen IS, et al. Effect of topical chamomile on immunohistochemical levels of IL-1 β and TNF- α in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(2):293-299. doi:10.1007/S00280-012-2013-9
216. Lewis DI. Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci*. 2019;3(6):675-679. doi:10.1042/ETLS20190061
217. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*. 1998;108:101-106. doi:10.1385/0-89603-472-0:101
218. 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;47(3):469-474. doi:10.1111/J.1432-1033.1974.TB03714.X
219. RACKER E. Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J Biol Chem*. 1955;217(2):855-865. doi:10.1016/s0021-9258(18)65950-2
220. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*. 1991;196(2-3):143-151. doi:10.1016/0009-8981(91)90067-M
221. Joseph B, Mauramo M, Vijayakumary BK, Waltimo T, Anil S, Sorsa T. Photodynamic therapy for oral mucositis in cancer patients- a systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2024;50. doi:10.1016/j.pdpdt.2024.104424
222. Zheng H, Zhang M, Xiao T, et al. Risk factors for chemotherapy-induced oral mucositis in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Support Care Cancer*. 2025;33(7). doi:10.1007/S00520-025-09629-W
223. Baxi SS, Schwitzer E, Jones LW. A review of weight loss and sarcopenia in patients with head and neck cancer treated with chemoradiation. *Cancers Head Neck*. 2016;1(1). doi:10.1186/S41199-016-0010-0
224. Takenaka Y, Cho H, Yamamoto M, Nakahara S, Yamamoto Y, Inohara H. Incidence and predictors of febrile neutropenia during chemotherapy in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 2013;21(10):2861-2868. doi:10.1007/S00520-013-1873-9
225. Du YT, Long Y, Tang W, Liu XF, Dai F, Zhou B. Prooxidative inhibition against NF- κ B-mediated inflammation by pharmacological vitamin C. *Free Radic Biol Med*. 2022;180:85-94. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.01.007
226. Lansdown ABG, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Ågren MS. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen*. 2007;15(1):2-16. doi:10.1111/J.1524-475X.2006.00179.X

227. Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Exp Dermatol*. 2000;9(6):407-416. doi:10.1034/J.1600-0625.2000.009006407.X
228. Lin PH, Sermersheim M, Li H, Lee PHU, Steinberg SM, Ma J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*. 2017;10(1). doi:10.3390/NU10010016
229. Katayama S, Nishizawa K, Hirano M, Yamamura S, Momose Y. Effect of polaprezinc on healing of acetic acid-induced stomatitis in hamsters. *J Pharm Pharm Sci*. 2000;3(1):114-117. Accessed October 7, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10954680/>
230. Chaitanya NCSK, Muthukrishnan A, Kondapaneni J, et al. Comparative study on the efficacy of high-dose oral ascorbic acid with/without zinc in reducing the severity of oral mucositis during cancer chemoradiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020;129(1):e191-e192. doi:10.1016/j.oooo.2019.07.041
231. Mitsuhashi H, Suemaru K, Li B, Cui R, Araki H. Evaluation of topical external medicine for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Eur J Pharmacol*. 2006;551(1-3):152-155. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.005
232. Sahebnaasagh M, Aksi V, Eslami F, et al. Prevention of radiotherapy-related oral mucositis with zinc and polyherbal mouthwash: a double-blind, randomized clinical trial. *Eur J Med Res*. 2023;28(1). doi:10.1186/S40001-023-01015-8
233. Huang J, Hwang AYM, Jia Y, et al. Experimental Chemotherapy-Induced Mucositis: A Scoping Review Guiding the Design of Suitable Preclinical Models. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23). doi:10.3390/IJMS232315434
234. Foltynski P, Ladyzynski P, Ciechanowska A, Migalska-Musial K, Judzewicz G, Sabalinska S. Wound Area Measurement with Digital Planimetry: Improved Accuracy and Precision with Calibration Based on 2 Rulers. *PLoS One*. 2015;10(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0134622
235. Woldeselassie M, Tamene A. Therapeutic controversies over use of antioxidant supplements during cancer treatment: a scoping review. *Front Nutr*. 2024;11. doi:10.3389/FNUT.2024.1480780/PDF
236. Ambrosone CB, Zirpoli GR, Hutson AD, et al. Dietary Supplement Use During Chemotherapy and Survival Outcomes of Patients With Breast Cancer Enrolled in a Cooperative Group Clinical Trial (SWOG S0221). *J Clin Oncol*. 2020;38(8):804-814. doi:10.1200/JCO.19.01203
237. DOI H, FUJIWARA M, SUZUKI H, et al. Polaprezinc reduces the severity of radiation-induced mucositis in head and neck cancer patients. *Mol Clin Oncol*. 2015;3(2):381-386. doi:10.3892/MCO.2014.479
238. Chang CT, Ho TY, Lin H, et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One*. 2012;7(3). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0031808
239. Bossi P, Bergamini C, Miceli R, et al. Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated With Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;96(5):959-966. doi:10.1016/j.ijrobp.2016.08.047
240. Kim DR, Kim J, Oh JY, Kim HY, Kim YJ, Chang MS. Protective effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge on 5-fluorouracil-induced oral mucositis. *Int J Mol Med*. 2017;40(1):39-46. doi:10.3892/IJMM.2017.2999
241. Ribeiro SB, De Araújo AA, De Araújo Júnior RF, et al. Protective effect of dexamethasone on 5-FU-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One*. 2017;12(10). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0186511

242. Pizzicannella J, Fonticoli L, Guarnieri S, et al. Antioxidant Ascorbic Acid Modulates NLRP3 Inflammasome in LPS-G Treated Oral Stem Cells through NFκB/Caspase-1/IL-1β Pathway. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(5). doi:10.3390/ANTIOX10050797
243. De Nuccio F, Cianciulli A, Porro C, et al. Inflammatory Response Modulation by Vitamin C in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Biology (Basel)*. 2021;10(11). doi:10.3390/BIOLOGY10111155
244. Summersgill H, England H, Lopez-Castejon G, et al. Zinc depletion regulates the processing and secretion of IL-1β. *Cell Death Dis*. 2014;5(1). doi:10.1038/CDDIS.2013.547
245. Da Costa Cunha Mafra CA, Vasconcelos RC, De Medeiros CACX, et al. Gliclazide Prevents 5-FU-Induced Oral Mucositis by Reducing Oxidative Stress, Inflammation, and P-Selectin Adhesion Molecules. *Front Physiol*. 2019;10(MAR). doi:10.3389/FPHYS.2019.00327
246. Ayuningtyas NF, Basalamah FF, Brahmanikanya GL, et al. Correlation between Salivary Oxidative Stress Biomarkers and Clinical Severity of Radiation-Induced Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients. *Eur J Dent*. 2025;19(4). doi:10.1055/S-0045-1809184
247. Sá OM de S, Lopes NNF, Alves MTS, Oliva MLV, Caran EMM, Carvalhaes JT. Effects of N-Acetyl-Cysteine in the Prevention of 5-Fluorouracil Induced-Oral Mucositis Hamsters. *Open J Stomatol*. 2025;15(5):85-97. doi:10.4236/OJST.2025.155008
248. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(3). doi:10.3390/ANTIOX8030072
249. Anderson CM, Lee CM, Saunders DP, et al. Phase IIb, Randomized, Double-Blind Trial of GC4419 Versus Placebo to Reduce Severe Oral Mucositis Due to Concurrent Radiotherapy and Cisplatin For Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(34):3256-3265. doi:10.1200/JCO.19.01507
250. Rtibi K, Selmi S, Grami D, Amri M, Sebai H, Marzouki L. Contribution of oxidative stress in acute intestinal mucositis induced by 5 fluorouracil (5-FU) and its pro-drug capecitabine in rats. *Toxicol Mech Methods*. 2018;28(4):262-267. doi:10.1080/15376516.2017.1402976
251. Koohi-Hosseiniabadi O, Andisheh-Tadbir A, Bahadori P, Sepehrimanesh M, Mardani M, Tanideh N. Comparison of the therapeutic effects of the dietary and topical forms of Zizyphus jujuba extract on oral mucositis induced by 5-fluorouracil: A golden hamster model. *J Clin Exp Dent*. 2015;7(2):e304-e309. doi:10.4317/JCED.52198
252. Zheng H, Xu Y, Liehn EA, Rusu M. Vitamin C as Scavenger of Reactive Oxygen Species during Healing after Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci*. 2024;25(6). doi:10.3390/IJMS25063114
253. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation. *Front Pharmacol*. 2023;14. doi:10.3389/FPHAR.2023.1147414
254. Piacenza L, Zeida A, Trujillo M, Radi R. The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite. *Physiol Rev*. 2022;102(4):1881-1906. doi:10.1152/PHYSREV.00005.2022
255. Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney JF. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res*. 1998;83(9):916-922. doi:10.1161/01.RES.83.9.916
256. Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AME, de Waard MC. Vitamin C revisited. *Crit Care*. 2014;18(4). doi:10.1186/S13054-014-0460-X

257. Zheng M, Liu Y, Zhang G, Yang Z, Xu W, Chen Q. The Applications and Mechanisms of Superoxide Dismutase in Medicine, Food, and Cosmetics. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(9). doi:10.3390/ANTIOX12091675
258. Mariani E, Mangialasche F, Feliziani FT, et al. Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. *Exp Gerontol*. 2008;43(5):445-451. doi:10.1016/j.exger.2007.10.012
259. Kayatekin C, Zitzewitz JA, Matthews CR. Zinc Binding Modulates the Entire Folding Free Energy Surface of Human Cu,Zn Superoxide Dismutase. *J Mol Biol*. 2008;384(2):540-555. doi:10.1016/j.jmb.2008.09.045
260. Faghfour AH, Zarezadeh M, Aghapour B, et al. Clinical efficacy of zinc supplementation in improving antioxidant defense system: A comprehensive systematic review and time-response meta-analysis of controlled clinical trials. *Eur J Pharmacol*. 2021;907. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174243
261. Kitagawa J, Kobayashi R, Nagata Y, et al. Polaprezinc for prevention of oral mucositis in patients receiving chemotherapy followed by hematopoietic stem cell transplantation: A multi-institutional randomized controlled trial. *Int J Cancer*. 2021;148(6):1462-1469. doi:10.1002/IJC.33316
262. Hayashi H, Kobayashi R, Suzuki A, et al. Polaprezinc prevents oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy followed by hematopoietic stem cell transplantation. *Anticancer Res*. 2014;34(12):7271-7277. Accessed October 8, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25503160/>
263. Lin LC, Que J, Lin LK, Lin FC. Zinc supplementation to improve mucositis and dermatitis in patients after radiotherapy for head-and-neck cancers: A double-blind, randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65(3):745-750. doi:10.1016/j.ijrobp.2006.01.015
264. Iinuma K, Tsuboi I. Zinc ascorbate has superoxide dismutase-like activity and in vitro antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2012;5:135-140. doi:10.2147/CCID.S36214
265. Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*. 2023;121:109-141. doi:10.1016/bs.vh.2022.09.002
266. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2013;1830(5):3143-3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008
267. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol*. 2014;5. doi:10.3389/FPHAR.2014.00151
268. Vašková J, Kočan L, Vaško L, Perjési P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*. 2023;28(3). doi:10.3390/MOLECULES28031447
269. Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot*. 2002;53(372):1283-1304. doi:10.1093/JEXBOT/53.372.1283
270. Filosa S, Fico A, Paglialunga F, et al. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J*. 2003;370(Pt 3):935-943. doi:10.1042/BJ20021614
271. Ju HQ, Lin JF, Tian T, Xie D, Xu RH. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1). doi:10.1038/S41392-020-00326-0

272. Ting KKY, Floro E, Dow R, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI, Rocheleau J V. Measuring the rate of NADPH consumption by glutathione reductase in the cytosol and mitochondria. *PLoS One*. 2024;19(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0309886
273. Ortiz F, Acuña-Castroviejo D, Doerrier C, et al. Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *J Pineal Res*. 2015;58(1):34-49. doi:10.1111/JPI.12191
274. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(4):443-453. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.040
275. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/9613090
276. Lardinois OM, Mestdagh MM, Rouxhet PG. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1996;1295(2):222-238. doi:10.1016/0167-4838(96)00043-X
277. Cruz É de P da, Campos L, Pereira F da S, et al. Clinical, biochemical and histological study of the effect of antimicrobial photodynamic therapy on oral mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(2):298-309. doi:10.1016/j.pdpdt.2014.12.007
278. Cuba L de F, Salum FG, Guimarães FS, Cherubini K, Borghetti RL, de Figueiredo MAZ. Cannabidiol on 5-FU-induced oral mucositis in mice. *Oral Dis*. 2020;26(7):1483-1493. doi:10.1111/ODI.13413
279. Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem*. 2023;11. doi:10.3389/FCHEM.2023.1158198
280. Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-κB signaling. *Inflammopharmacology*. 2017;25(1):11-24. doi:10.1007/S10787-017-0309-4
281. Chen C, Zhang Q, Yu W, Chang B, Le AD. Oral Mucositis: An Update on Innate Immunity and New Interventional Targets. *J Dent Res*. 2020;99(10):1122-1130. doi:10.1177/0022034520925421
282. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):103-115. doi:10.1038/CR.2010.178
283. Song Y, Shin JO. Chemotherapy-Induced Mucositis: A Comprehensive Review of ROS, Inflammasome Activation, and Therapeutic Interventions. *Anatomy & Biological Anthropology*. 2025;38(1):21-35. doi:10.11637/ABA.2025.38.1.21
284. De Araujo AA, Varela H, De Medeiros CACX, et al. Azilsartan reduced TNF-α and IL-1β levels, increased IL-10 levels and upregulated VEGF, FGF, KGF, and TGF-α in an oral mucositis model. *PLoS One*. 2015;10(2). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0116799
285. Martinc B, Grabnar I, Milosheska D, Lorber B, Vovk T. A Cross-Sectional Study Comparing Oxidative Stress in Patients with Epilepsy Treated with Old and New Generation Antiseizure Medications. *Medicina (Kaunas)*. 2024;60(8). doi:10.3390/MEDICINA60081299
286. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(12). doi:10.3390/ANTIOX11122345

287. Lotfi M, Kazemi S, Ebrahimpour A, et al. Protective Effect of Quercetin Nanoemulsion on 5-Fluorouracil-Induced Oral Mucositis in Mice. *J Oncol*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/5598230
288. de Araújo AA, Silva EM, Mafra CA da CC, et al. Curcuma longa extract protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;58. doi:10.1590/S2175-97902022000XE20114
289. Bauer G, Zarkovic N. Revealing mechanisms of selective, concentration-dependent potentials of 4-hydroxy-2-nonenal to induce apoptosis in cancer cells through inactivation of membrane-associated catalase. *Free Radic Biol Med*. 2015;81:128-144. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.010
290. Trivedi S, Lal N, Mahdi A, Singh B, Pandey S. Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2015;35(2):e14-e19. doi:10.11607/PRD.2079
291. Surboy MDC, Merdietio Boedi R, Mahdani FY, et al. Alteration of salivary LPO, MDA, LDH, glutathione, GPx, SOD and vitamins in oral submucous fibrosis: A three-level meta-analysis study. *Clin Biochem*. 2024;130. doi:10.1016/j.clinbiochem.2024.110790
292. Yurdabakan ZZ, Ozcan I, Solakoğlu S. Effects of chemo-therapeutic drugs used in head and neck cancers on submandibular glands of rats. *Journal of Stomatology*. 2022;75(2):61-71. doi:10.5114/JOS.2022.117327
293. Elmansy MN, Hegazy EM. Evaluation of the Apoptotic changes induced by 5-Fluorouracil on the Lingual Mucosa and Salivary glands of male albino rats (Histological, Histomorphometric and Immunohistochemical Study). *Egypt Dent J*. 2020;66(Issue 4-October (Oral Medicine, X-Ray, Oral Biology & Oral Pathology)):2353-2363. doi:10.21608/EDJ.2020.41503.1240