

*На правах рукописи*

**ЯРЦЕВА**

**Анна Александровна**

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДИСУЛЬФИДОВ  
ГЛУТАТИОНА В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ  
ХИМИОЛУЧЕВЫХ ОРАЛЬНЫХ МУКОЗИТОВ  
У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ  
(клинико-экспериментальное исследование)**

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Санкт-Петербург  
2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук профессор **Гребенюк Александр Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Николаев Валентин Иванович** – доктор медицинских наук профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»

**Повзун Сергей Андреевич** – доктор медицинских наук профессор, руководитель отдела патоморфологии и клинической экспертизы ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»

**Балин Виктор Николаевич** – доктор медицинских наук профессор, заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии Института усовершенствования врачей ФГУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова»

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «12» мая 2015 года в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 215.002.03 при ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ и на официальном сайте <http://www.vmeda.org>.

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук профессор



**Дергунов Анатолий Владимирович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** В общей структуре онкологической заболеваемости злокачественные опухоли области головы и шеи составляют около 20% [Пачес А.И., 2000]. Несмотря на заметный прогресс в изучении патогенеза, разработке новых методов диагностики и лечения опухолевых процессов различной локализации, в последние десятилетия онкологическая заболеваемость продолжает неуклонно возрастать [Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2010; Чиссов В.И. и др., 2012]. Ежегодно в России регистрируется более 80 тысяч больных с данной патологией. Плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта является одним из наиболее распространенных среди злокачественных опухолей головы и шеи, а по частоте возникновения занимает второе место после рака гортани. За последнее десятилетие прирост заболеваемости в Российской Федерации составляет 16,3% [Чиссов В.И. и др., 2012].

Отличительными особенностями новообразований органов полости рта и ротоглотки являются быстрый темп роста, раннее лимфогенное и гематогенное метастазирование, резистентность к различным видам лечения, высокая смертность, достигающая 60-70% [Красноперова Л.Д., 2007]. Несмотря на доступность опухолей полости рта и ротоглотки для визуального осмотра и совершенствование методов диагностики, более 2/3 больных к моменту установления диагноза имеют распространенный опухолевый процесс [Канаев С.В., 2003; Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2010]. У 50% больных к моменту начала лечения определяются метастазы в регионарных лимфатических узлах.

Основным методом противоопухолевого лечения злокачественных новообразований полости рта и ротоглотки в большинстве случаев (около 80%) считается одновременная химиолучевая терапия [Pignon J.P. et al., 2000; Langendijk J.A. et al. 2004]. Наиболее частым и ранним токсическим осложнением химиолучевого лечения, ограничивающим его эффективность, являются тяжелые оральные мукозиты III-IV степени, частота развития которых достигает 70% и более [Keefe D.M. et al., 2007; Mortensen H.R. et al., 2012]. Развитие орального мукозита при химио- или химиолучевой терапии приводит к вынужденному изменению (уменьшению) дозы цитостатиков и режима лучевой нагрузки, а также к приостановке терапии основного заболевания, что, в конечном счете, влияет на качество лечения [Sonis S.T. et al., 2009].

Оральный мукозит III и IV степени встречается у 70-80% больных раком головы и шеи, получающих химиолучевую терапию, и у 40-90% пациентов онкогематологического профиля, перенесших высокодозную химиотерапию и трансплантацию гемопоэтических клеток [Раджапова М.У. и др., 2011; Fawcett J.N., McQueen A., 2011]. В связи с этим, возникает необходимость в поиске и разработке высокоэффективных средств профилактики и/или лечения тяжелых

форм орального мукозита с целью повышения качества химио- и химиолучевой терапии рака головы и шеи [Keil F. et al., 2013].

При проведении химиолучевой терапии больным злокачественными опухолями потенциально возможны две проблемы: неполная регрессия опухоли и повреждение окружающих здоровых тканей. Характерной чертой лучевых повреждений слизистой оболочки полости рта является длительное, прогрессирующее течение, присоединение инфекционных осложнений, нарушение микроциркуляции, трофических и обменных процессов в облученных тканях [Канаев С.В., Гершанович М.Л., 2004; Иорданишвили А.К. и др., 2013].

Основной причиной развития токсических эффектов химиолучевой терапии является общность мишеней цитостатической терапии в опухоли и в нормальных тканях. Развивающаяся при применении цитостатиков и радиационного воздействия токсичность является фактически продолжением их терапевтической активности. Она реализуется через различные механизмы повреждения клетки: повреждения генетического аппарата клетки; активация процессов свободно-радикального окисления; повреждения клеточных мембран; нарушения процессов синтеза белка и клеточного деления; нарушения энергетического обмена [Кашуро В.А., 2009; Гребенюк А.Н. и др., 2012; Airoidi M. et al., 2004].

Тем не менее, патогенез побочного действия химиолучевой терапии, несмотря на кажущуюся полноту проведенных ранее исследований, изучен не достаточно для успешной профилактики и лечения оральных мукозитов. Успехи последних десятилетий, достигнутые в изучении опухолевых заболеваний и их лечении, открыли новые грани химиолучевой токсичности, обусловленные дисрегуляторными изменениями в клетке, а не только прямым поражением ионизирующими излучениями и цитостатиками биологически значимых структур [Быков В.Л., Леонтьева И.В., 2011; Sonis S.T. et al., 2004]. В частности, дисрегуляторные расстройства могут быть связаны с нарушениями тиолдисульфидного статуса, потерей чувствительности рецепторов к специфичным лигандам, развитием общей и метаболической иммунодепрессии [Антонов В.Г., Козлов В.К., 2004; Булова Е.Б. и др., 2005; Крутецкая З.И. и др., 2007, 2011].

Однако устоявшиеся представления о ключевых звеньях патогенеза орального мукозита, воздействуя на которые с помощью фармакологических средств можно было бы предупредить или существенно ослабить клинические проявления данного заболевания, в настоящее время отсутствуют [Саржевский В.О., Смирнова Е.Г., 2012; Sonis S.T., 2004, 2011]. Все вышеизложенное свидетельствует о высокой актуальности проблемы химиолучевых повреждений слизистой оболочки полости рта и ротоглотки у онкологических больных и необходимости разработки новых средств коррекции этих нежелательных эффектов на основе изучения ключевых звеньев патогенеза этого состояния.

**Степень разработанности темы исследования.** По мнению большинства отечественных и зарубежных ученых, химиолучевая терапия рака oroфарингеальной области является методом выбора в противоопухолевом лечении [Алиева С.Б., 2008; Канаев С.В., 2008; Раджапова М.У. и др., 2011, Langendijk J.A. et al., 2004; Al-Mamgani A. et al., 2013]. Однако при использовании одновременной химиолучевой терапии количество оральных мукозитов III-IV степени возрастает до 60-100%. В связи с этим, коррекция мукозита как патогенетического фактора, лимитирующего токсичность лечения рака oroфарингеальной области, является важной задачей не только онкологии и стоматологии, но и патологической физиологии.

Терапия данного осложнения включает как локальное влияние на слизистую оболочку, так и системное фармакологическое воздействие [Иорданишвили А.К. и др., 2013; Barasch, A. et al., 2009]. При этом выделяют несколько групп средств профилактики и лечения орального мукозита: противовоспалительные препараты, антимикробные средства, модификаторы биологического ответа, антиоксиданты, нефармакологические методы терапии [Сокуренок В.П. и др. 2008; Светицкий П.В., 2012]. Однако, по мнению S.T. Sonis и соавторов (2009, 2011), все предлагаемые средства и методы профилактики и лечения данной патологии не отличаются достаточной эффективностью.

Для успешного поиска эффективных фармакологических средств коррекции этого состояния требуется разработка экспериментальных моделей лучевого и химиолучевого мукозита, применение которых позволило бы оценить воздействие повреждающих факторов химиолучевой терапии на организм экспериментальных животных системно и на слизистую оболочку полости рта локально, а также уточнить некоторые патофизиологические механизмы формирования данного заболевания. Необходимо также с помощью радиоизотопных, биохимических, иммунологических, микробиологических и фармакологических методов изучить основные звенья патогенеза оральных мукозитов, индуцированных химиолучевым воздействием на организм, что позволит обосновать новые подходы к лечению этого состояния [Rezvani M., Ross G.A., 2004; Bowen J.M., 2012; Viet C.T. et al., 2014].

В этой связи пристальное внимание патофизиологов было обращено на универсальную систему редокс-регуляции, являющейся одним из фундаментальных регуляторных механизмов передачи сигналов и экспрессии генов [Meister A., 1988; Tew K.D., 2006]. Особую роль в редокс-регулируемых сигнальных путях играют эндогенные системы тиоредоксина и глутатиона – универсального трипептида, присутствующего в большинстве растений, микроорганизмов и во всех тканях млекопитающих [Jenderny S. et al., 2010].

Восстановленный глутатион (GSH) существует в клетке в равновесии с дисульфидом глутатиона (GSSG), и отношение концентраций GSH/GSSG служит показателем редокс-состояния клетки [Кулинский В.И., 2009; Lu S.C., 1999]. Именно система глутатиона предотвращает окисление SH-групп или восстанавливает S—S-связи, индуцированные окислительным стрессом, инактивирует свободные радикалы и участвует в детоксикации ксенобиотиков (в том числе лекарственных веществ и канцерогенов) [Jenderny S. et al., 2010]. Этот и другие механизмы действия позволили препаратам глутатиона найти клиническое применение в качестве иммуномодуляторов и гемостимуляторов в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний [Жуков О.Б. и др., 2004], псориаза [Корсунская И.М. и др., 2003; Чермошенцев А.А., 2003], некоторых других состояний [Бурова Е.Б. и др., 2005; Filomeni G. et al., 2005].

Однако данные о возможности повышения эффективности химиолучевой терапии рака oroфарингеальной области (ОФО) с помощью дисульфидов глутатиона отсутствуют. Такого рода данные позволили бы разработать новые подходы к повышению эффективности профилактики и лечения орального мукозита, индуцированного химиолучевой терапией, и повысить, тем самым, качество противоопухолевого лечения. С учетом актуальности проблемы и нерешенности вопросов патогенеза воспалительных и эрозивно-язвенных осложнений в ротовой полости у больных раком oroфарингеальной области (ОФО) и необходимости их коррекции на фоне химиолучевой терапии были определены цель и задачи настоящего исследования.

**Цель работы:** патогенетическое обоснование применения дисульфидов глутатиона в качестве средств профилактики и лечения оральных мукозитов у больных раком oroфарингеальной области.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Разработать экспериментальную модель орального мукозита при комбинированном химиолучевом воздействии, позволяющую адекватно воспроизводить основные клинические, микробиологические, иммунологические и биохимические нарушения в тканях ротовой полости онкологических больных при развитии у них химиолучевого орального мукозита.

2. Изучить особенности патогенеза и клинических проявлений химиолучевого орального мукозита у экспериментальных животных в условиях комбинированного радиационного и химического воздействия.

3. Исследовать возможность профилактики и лечения химиолучевых мукозитов у экспериментальных животных с помощью дисульфидов глутатиона.

4. В экспериментах *in vitro* на клеточных культурах и *in vivo* на животных исследовать возможные патофизиологические механизмы фармакологической

активности дисульфидов глутатиона, в частности, органической соли дисульфида глутатиона и инозина, в профилактике и лечении орального мукозита.

5. Разработать патогенетически обоснованную схему коррекции орального мукозита у больных раком оротфарингеальной области с помощью дисульфидов глутатиона на фоне химиолучевой терапии и изучить ее эффективность.

6. Изучить стоматологический статус больных местнораспространенным раком оротфарингеальной области в процессе химиолучевой терапии без фармакологической коррекции оральных мукозитов и на фоне их профилактики и лечения.

7. Провести анализ непосредственных результатов химиолучевой терапии, качества жизни, частоты и тяжести ранних побочных осложнений у больных раком оротфарингеальной области, получавших в качестве сопроводительной терапии препараты дисульфида глутатиона.

**Научная новизна исследований.** Разработаны экспериментальные модели лучевого и химиолучевого орального мукозита у мелких лабораторных животных, адекватно воспроизводящие основные клинические проявления этого заболевания у человека при воздействии повреждающих факторов химиолучевой терапии.

Выявлены особенности нарушений микробиоценоза ротовой полости экспериментальных животных и установлена их взаимосвязь с изменениями содержания эффекторов врожденного иммунитета  $\alpha$ -дефензина (HNP 1-3),  $\beta$ -дефензина (hBD-3) и кателицидина LL-37, а также баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , EGF и IL-4 при воздействии на организм факторов химиолучевой терапии (химического и радиационного) на пике развития орального мукозита.

Сформулированы и научно обоснованы возможные механизмы действия дисульфидов глутатиона в качестве средств коррекции воспалительных и эрозивно-язвенных процессов в слизистой оболочке полости рта в условиях химиолучевой терапии больных раком ОФО.

Обоснована возможность восстановления чувствительности поверхностно-клеточных рецепторов клеток кроветворной ткани и слизистой оболочки полости рта к регуляторным цитокинам с помощью препаратов, содержащих дисульфиды глутатиона. Установлено, что нормализация с помощью препаратов дисульфидов глутатиона функциональной активности (чувствительности) поверхностно-клеточных рецепторов к эпидермальному фактору роста и лиганд-рецепторного взаимодействия обеспечивает способность эндогенных цитокинов ускорять восстановление пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга и слизистой оболочки полости рта.

Показано, что тяжесть клинических проявлений орального мукозита при химиолучевой терапии рака ОФО во многом связана с наличием в организме онкологического больного (клетках слизистой оболочки полости рта) вирусной инфекции, вызываемой вирусом простого герпеса HSV-1.

Установлено, что применение органической соли дисульфида глутатиона и инозина – препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин (моликсан) приводит к восстановлению баланса про- и противовоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α и IL-4, а также иммуноглобулинов IgA и sIgA в крови и слюнной жидкости больных раком ОФО, получавших химиолучевую терапию. Показано, что включение в схему комплексной терапии химиолучевого орального мукозита у больных раком ОФО препаратов, содержащих дисульфиды глутатиона, способствует улучшению стоматологического статуса и баланса про- и антиоксидантной активности, восстанавливает содержание эффекторов врожденного иммунитета кателицидина LL-37, α-дефензина (HNP 1-3) и β-дефензина (hBD-3), а также улучшает состояние микробиоценоза полости рта.

Патогенетически обоснована и оценена клиническая эффективность применения органической соли дисульфида глутатиона и инозина в качестве средства профилактики и лечения орального мукозита при химиолучевой терапии больных местнораспространенным плоскоклеточным раком ОФО.

**Теоретическая и практическая значимость результатов исследования.** На основании результатов изучения патогенетических звеньев химиолучевых оральных мукозитов (стоматитов) и гемодепрессии разработана методика профилактики и лечения выявленных осложнений с использованием препаратов, содержащих дисульфиды глутатиона.

Доказано, что возникновение и развитие осложнений химиолучевой терапии рака орофарингеальной области (оральный мукозит и гемодепрессия) зависят не только от дозовой нагрузки лучевого воздействия, но и от дополнительного влияния химиотерапии – цитостатического фактора. Показана эффективность и безопасность применения органической соли дисульфида глутатиона и инозина препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин (моликсан) при проведении одновременной химиолучевой терапии больных раком орофарингеальной области.

Установлено, что применение в качестве средства сопровождения химиолучевой терапии (ХЛТ) органической соли дисульфида глутатиона и инозина индуцирует синтез антимикробных пептидов кателицидина LL-37, α-дефензина (HNP 1-3) и β-дефензина (hBD-3), а это, в свою очередь, способствует восстановлению микробного баланса в слизистой оболочке полости рта. Обоснована возможность применения препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин для лечения химиолучевого орального мукозита, осложненного герпесвирусной инфекцией, вызываемой вирусами простого герпеса 1 типа (HSV-1).



Результаты оценки герпесвирусной нагрузки в крови онкологических больных до проведения химиолучевого лечения позволяют прогнозировать возможную (I-II или III-IV степень) тяжесть химиолучевых оральных мукозитов и подобрать адекватную терапию сопровождения. Выявлено, что использование органической соли дисульфида глутатиона и инозина препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин в качестве средства сопровождения химиолучевого лечения местнораспространенного рака ОФО III и IV стадии достоверно улучшает непосредственные результаты проводимого противоопухолевого лечения, по сравнению со стандартной химиолучевой терапией, уменьшая при этом частоту и тяжесть побочных эффектов (орального мукозита и гемодепрессии), при сохранении высокого качества жизни онкологических больных.

Проведена подробная оценка стоматологического статуса больных местнораспространенным раком орофарингеальной области по критериям гигиены полости рта и состоянию пародонта на фоне клинических проявлений оральных мукозитов у больных раком ОФО, получающих химиолучевую терапию. Показано, что профилактика и лечение с помощью препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин способствует улучшению стоматологического статуса онкологических больных.

Доказано, что применение дисульфидов глутатиона в качестве средств сопровождения химиолучевой терапии рака ОФО обеспечивает улучшение непосредственных результатов лечения при сохранении высокого качества жизни больных, подвергшихся химиолучевому воздействию.

**Методология и методы исследований.** В ходе выполнения диссертационной работы были проведены экспериментальные и клинические исследования.

Выполнение экспериментального раздела работы было направлено на патофизиологическое обоснование возможности применения дисульфидов глутатиона в качестве средств профилактики и лечения экспериментального орального химиолучевого мукозита. При выполнении клинического этапа работы проводили оценку эффективности дисульфида глутатиона препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин в качестве средства профилактики и лечения химиолучевых оральных мукозитов у больных раком орофарингеальной области.

Использованная в работе методология базируется на теоретических и практических основах патофизиологии и стоматологии, включает основные принципы формирования и обоснования патогенетических подходов к поиску и разработке средств профилактики и лечения оральных мукозитов (стоматитов) в условиях воздействия на организм химиолучевых повреждающих факторов.

В исследовании использовались основные клинические и лабораторные (биохимические, микробиологические, иммунологические и молекулярно-биологические) методы определения степени выраженности патологического

процесса – орального мукозита как в эксперименте, так и в клинической практике онкологического стационара.

Объектом экспериментального раздела исследования явились мелкие лабораторные животные с лучевым и химиолучевым оральным мукозитом, развивающимся при изолированном и комбинированном воздействии. Предметом исследования служили клинические и лабораторные признаки экспериментального лучевого и химиолучевого орофарингеального синдрома.

Объектом клинического раздела исследования служили пациенты с признаками орального химиолучевого мукозита различной степени тяжести. Предметом исследования явились клинические и лабораторные проявления воспалительных и эрозивно-язвенных процессов в слизистой оболочке полости рта (СОПР) при химиолучевой терапии больных раком орофарингеальной области.

Работа выполнена в соответствии с принципами доказательной медицины с использованием современных биохимических, иммунологических, микробиологических, радиоизотопных и молекулярно-биологических методов исследования и обработки данных. Исследование проведено с соблюдением принципов и правил математико-статистического моделирования и исследования (отбор, рандомизация, формирование референтных групп, контроль, статистическая обработка результатов). Экспериментальный и клинический разделы работы выполнены в дизайне рандомизированного контролируемого открытого сравнительного исследования.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработанные экспериментальные модели химиолучевого орального мукозита у мелких лабораторных животных адекватно воспроизводят основные клинические, биохимические, микробиологические и иммунологические проявления орофарингеального синдрома у онкологических больных, подвергающихся комбинированной химиолучевой терапии.

2. В патогенезе химиолучевого орального мукозита важную роль играет нарушение микробиоценоза в слизистой оболочке полости рта, обусловленное угнетением синтеза антимикробных пептидов – эффекторов врожденного иммунитета. Развитию воспалительных и эрозивно-язвенных процессов в слизистой оболочке полости рта также способствуют: активация свободно-радикальных реакций, повышение уровня провоспалительных цитокинов, десенситизация рецепторов эпидермального фактора роста и угнетение тем самым пролиферации клеток слизистой оболочки полости рта и костного мозга.

3. Применение в схемах профилактики и лечения химиолучевого орального мукозита препаратов, содержащих дисульфиды глутатиона, приводит к улучшению стоматологического статуса за счет снижения активности воспаления в слизистой оболочке полости рта, индукции антимикробных пептидов, нормали-

зации микробиоценоза полости рта, восстановления структурно-функциональной целостности секреторных иммуноглобулинов А и рецепторов эпидермального фактора роста.

4. Органическая соль дисульфида глутатиона и инозина препарат  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин (фармакопейный препарат моликсан) является эффективным лекарственным средством сопровождения одновременной химиолучевой терапии рака орофарингеальной области. Применение моликсана улучшает непосредственные результаты противоопухолевого лечения, предупреждает и/или ослабляет выраженность клинических проявлений химиолучевого орального мукозита (стоматита) и синдрома гемодепрессии.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** Результаты получены на современном сертифицированном оборудовании: биохимический анализатор «BS-120» (Mindray, Германия), жидкостно-сцинтилляционный счетчик «RackBeta» (LKB, Швеция), анализатор «Immulite 2000» (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., США), анализатор «EVOLIS Twin Plus» (BIO RAD, США).

Степень достоверности полученных результатов определяется: достаточным количеством экспериментальных животных (680 белых беспородных крыс-самцов; 520 белых беспородных мышей-самцов и 140 мышей-самцов линии BALB/c), использованных в исследовании; достаточной выборкой больных раком орофарингеальной области (75 пациентов); рандомизацией и формированием групп сравнения и контроля; адекватными экспериментальными моделями лучевого и химиолучевого орального мукозита; применением современных высокочувствительных и информативных биохимических, иммунологических, микробиологических и молекулярно-биологических методик в экспериментальных и клинических исследованиях; корректными методами статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на III съезде фармакологов России (Санкт-Петербург, 2007), международной научной конференции «Экспериментальная и клиническая фармакология» (Минск, 2007), международной научно-практической конференции «Отдаленные последствия воздействия ионизирующего излучения» (Киев, 2007), Российской научной конференции с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиологии» (Санкт-Петербург, 2011), Российской научной конференции «Острые проблемы разработки противолучевых средств: консерватизм или модернизация» (Москва, 2012), II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), Юбилейной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития средств медицинской защиты от экстремальных факторов», посвя-

щенной 20-летию НПЦ «Фармзащита» ФМБА России (Москва, 2012), Российской научной конференции «VI Невский радиологический форум» (Санкт-Петербург, 2013), Международной научной конференции «Радиобиологические основы лучевой терапии опухолей» (Москва, 2013), VII съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2014).

Апробация диссертации проведена 14 июня 2014 года на расширенном заседании кафедр патологической физиологии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии, военной токсикологии и медицинской защиты, военно-полевой терапии, НИЛ военной терапии НИО (экспериментальной медицины) НИЦ, НИЛ медицинский регистр НИО (экспериментальной медицины) НИЦ Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (протокол № 4).

**Реализация результатов исследования.** Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр патологической физиологии, военной токсикологии и медицинской защиты, рентгенологии и радиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, кафедры терапевтической стоматологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, а также используются в научно-исследовательской работе НИИЦ (медико-биологической защиты) НИИИ военной медицины Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. Разработанная схема лечения химиолучевого орального мукозита с помощью дисульфидов глутатиона апробирована и применяется в клинической практике Санкт-Петербургского клинического онкодиспансера и городской клинической больницы № 8.

По результатам исследований получен патент на изобретение «Способ профилактики и лечения химиолучевых стоматитов при химиолучевой терапии рака орофарингеальной области» (изобретение №2519164 по заявке № 201249718, зарегистрировано в Гос. реестре изобретений РФ 14 апреля 2014 г.).

**Связь темы диссертации с плановой тематикой научно-исследовательской работы учреждения.** Исследования выполнялись в соответствии с плановой тематикой научно-исследовательских работ Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова: тема НИР № VMA.02.04.02.0405/0219 (шифр «Новсолит») «Экспериментальная оценка эффективности литиевой соли глутатиона в качестве стимулятора кроветворения при гемодепрессиях радиационной и химической этиологии» и тема НИР № VMA.02.04.03.084/0091 (шифр «Новсолит-2») «Клинико-экспериментальное обоснование подходов к совершенствованию терапии гемодепрессивного и орофарингеального синдромов при изолированном и комбинированном радиационном поражении».

**Публикации.** По теме диссертационного исследования опубликована 31 научная работа, в том числе 11 статей в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных

научных результатов диссертации на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук, а также получен патент на изобретение.

**Личный вклад автора.** Автор лично провела анализ литературных данных по теме диссертации, разработала и обосновала методические подходы к созданию моделей экспериментального орального мукозита, приняла личное участие в планировании, организации и проведении экспериментальных и клинических исследований. Ею лично были обследованы 75 пациентов с раком орофарингеальной области, среди них 36 больных, получавших химиолучевую терапию и лечение орального мукозита органической солью дисульфида глутатиона и инозина. Автор лично осуществляла сбор и систематизацию первичных экспериментальных и клинических материалов, статистическую обработку полученных данных, их анализ и интерпретацию, написание диссертации.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 261 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. В диссертации приведены 41 таблица и 6 рисунков. Список литературы содержит 344 библиографических источника, в том числе 126 отечественных и 218 иностранных публикаций.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Экспериментальный раздел.** Экспериментальные исследования выполнены на 680 белых беспородных крысах-самцах, 520 белых беспородных мышак-самцах и 140 мышак-самцах линии BALB/c разводки питомника лабораторных животных «Рапполово» (пос. Рапполово Ленинградской обл.). Исследования проводили на кафедре военной токсикологии и медицинской защиты и в Научно-исследовательском испытательном центре (медико-биологической защиты) Научно-исследовательского испытательного института военной медицины Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ, а также в ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России. При проведении экспериментальных исследований соблюдали требования и рекомендации по работе с лабораторными животными, в том числе по гуманному отношению к ним [Директива 2010/63/EU, 2012; Миронов А.Н. и др., 2013]. На проведение экспериментального исследования получено разрешение Комиссии по биоэтике при ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России (Заключение № Д/1 от 22.10.2012 г).

В ходе разработки экспериментальной модели химиолучевого орального мукозита белых беспородных крыс подвергали воздействию повреждающих факторов лучевой и химической (цитостатики) природы, а в отдельной серии экспериментов – дополнительной вирусной нагрузке.

При моделировании лучевого орального мукозита белых беспородных крыс с помощью исследовательской гамма-установки ИГУР-1 с источником гамма-квантов  $^{137}\text{Cs}$  подвергали кранио-каудальному облучению в дозах 10 Гр, 15 Гр и 20 Гр при мощности дозы 21,07 Гр/мин.

Моделирование орального мукозита химической этиологии осуществляли путем однократного подкожного введения цитостатических препаратов в максимально переносимых дозах для данного вида животных: цисплатин (Teva, Таро Интернейшнл, Израиль) – в дозе 7 мг/кг или циклофосфамид (Baxter Oncology, Германия) – в дозе 70 мг/кг. Комбинированное химиолучевое воздействие моделировали однократным подкожным введением экспериментальным животным цитостатиков (цисплатин или циклофосфамид) с последующим (через 24 ч) кранио-каудальным облучением крыс в дозе 10 Гр.

Моделирование экспериментального химиолучевого орального мукозита с дополнительной вирусной нагрузкой проводили путем введения белым беспородным крысам вируса герпеса простого 1 типа (HSV-1) патогенный штамм УС (исходный титр вируса  $10^2$ - $10^3$  ЛД<sub>50</sub>/мл). Через 5 сут после вирусной нагрузки однократно подкожно вводили цисплатин или циклофосфамид, а еще через 24 ч крыс подвергали кранио-каудальному облучению в дозе 10 Гр.

В качестве средств профилактики и терапии экспериментального химиолучевого мукозита использовали препараты, содержащие дисульфиды глутатиона: фармакологический аналог окисленного глутатиона – препарат глутоксим ( $\text{Na}_2\text{GSSG}$ ), органическую соль дисульфида глутатиона и инозина – препарат моликсан ( $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин), композицию литиевой соли дисульфида глутатиона и комплексного соединения палладия и меди – препарат литан. Все изучаемые препараты дисульфидов глутатиона вводили лабораторным животным внутрибрюшинно или подкожно в дозе 30 мг/кг сразу после облучения и далее курсом в течение 15 сут (глутоксим и моликсан) или 3 сут (литан).

Оценку клинической картины орального мукозита у животных проводили по наличию и выраженности таких признаков как гиперемия, отечность слизистой оболочки полости рта, атрофические и язвенно-некротические процессы.

Состояние микробиоценоза СОПР белых беспородных крыс оценивали с помощью традиционных бактериологических методов. Мазок с поверхности слизистой оболочки полости рта (языка и десен) делали до лучевого или химиолучевого воздействия и на 15 сутки после облучения. Результаты микробиологических исследований выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ), а именно в десятичном логарифме, взятом от количества КОЕ.

Оценку врожденного иммунитета проводили по динамике уровня антимикробных пептидов: кателицидина LL-37,  $\alpha$ -дефензина (HNP 1-3) и  $\beta$ -дефензина (hBD-3) в сыворотке крови лабораторных животных методом твердофазного им-

муноферментного анализа с помощью диагностических наборов (Nucult Vyotechnology, Нидерланды) согласно прилагаемым инструкциям.

Выраженность процессов перекисного окисления липидов оценивали по содержанию про- и антиоксидантов в СОПР и подлежащих тканях. Содержание малонового диальдегида определяли по методу М. Michara, М. Uchiyama (1978), диеновых конъюгатов – по методу И.Д. Стальной (1977). В тех же тканях изучали активность ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы [Костюк В.А. и др., 1990], каталазы [Королук М.А. и др., 1988], глутатионпероксидазы [Гаврилова А.Р., 1986].

Об интенсивности пролиферации клеток костного мозга судили по уровню биосинтеза ДНК – по включению <sup>3</sup>H-тимидина. ДНК выделяли из костного мозга бедренных костей по методу Г.И. Козинец, В.А. Макарова (1997). Количество ДНК определяли на 3, 9 и 12 сут после химиолучевого воздействия методом R. Burton (1956). Измерение радиоактивности ДНК производили на жидкостно-сцинтилляционном счетчике «RackBeta» (ЛКВ, Швеция). Показателем дифференцировки клеток костного мозга служил уровень эндогенного колониеобразования на селезенке облученных мышей-самцов линии BALB/c.

Оценку интерферогенных свойств препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин проводили методом титрования IFN-α в сыворотке крови животных, получавших однократно внутрибрюшинно препарат в дозе 30 мг/кг.

Изучение иммунотропных эффектов препарата Na<sub>2</sub>GSSG-инозин проводили путем определения в сыворотке крови концентрации лизоцима [Бухарин О.В., 1974], миелопероксидазы [Page R.C. et al., 1978; Миронов А.Н. и др., 2013], а также поглотительной и переваривающей активности гранулярных лейкоцитов периферической крови [Маянский А.Н. и др., 1993]. Исследования собственной антимикробной активности препарата, содержащего дисульфид глутатиона, проводили с использованием классического метода серийных разведений в жидкой питательной среде [Методические указания МУК 4.2.1890–04, 2004].

Содержание эпидермального фактора роста (EGF), провоспалительных и противовоспалительных цитокинов IL-1β, IL-4 в крови экспериментальных животных определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа ELISA (Endogen, США) по прилагаемым описаниям процедуры.

Оценка состояния поверхностно-клеточных рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) и внутриклеточных сигнальных систем MAP-киназы, ERK 1,2 выполнена на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 по методике, описанной в работе [Бурова Е.Б. и др., 2003].

**Клинический раздел.** В исследование были включены 75 больных плоскоклеточным раком орофарингеальной области III-IV стадии в возрасте от 30 до 80 лет (57 мужчин, 18 женщин). Средний возраст больных составил 56,0±12,3

года. На выполнение клинических исследований с участием человека получено разрешение Этического комитета при городском клиническом онкологическом диспансере Санкт-Петербурга (протокол № 04/14 от 01.04.2014 г.).

В ходе исследования под наблюдением находились 2 группы пациентов:

- I группа (основная) состояла из 36 больных (средний возраст  $54,0 \pm 11,6$  года), которые на фоне проведения одновременной химиолучевой терапии получали органическую соль дисульфида глутатиона и инозина препарат  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин (моликсан). Препарат вводили внутримышечно в дозе 60 мг через 30-60 мин после очередной фракции облучения на 1, 3 и 5 сут каждой недели на протяжении всего периода химиолучевой терапии (ХЛТ). Недельная доза препарата составила 180 мг, длительность терапии – 6-7 недель.

- II группа (контрольная) состояла из 39 пациентов (средний возраст  $52,4 \pm 10,8$  года), которым курс одновременной химиолучевой терапии проводили традиционными методами без введения  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина (моликсана).

Пациенты обеих групп получали стандартную поддерживающую и симптоматическую терапию, а также местное лечение орального мукозита с помощью обезболивающих и противовоспалительных препаратов.

В обеих группах преобладали мужчины (75 и 77% соответственно). Морфологическая характеристика опухолей в обеих группах была сходная: плоскоклеточный рак разной степени дифференцировки. Абсолютному большинству больных была установлена стадия заболевания T3N0M0, T3NxM0 либо T3-4N1M0. У большинства пациентов было выявлено одно- или двухстороннее метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов: в I группе у 23 из 36 (63,9%), во II группе – у 26 из 39 пациентов (66,7%). Более часто опухоли локализовались в ротоглотке (I группа – 58,3%, II группа – 56,4%), реже – в гортани и языке (41,7 и 43,6% соответственно). Таким образом, больные I и II групп практически не различались между собой и могли быть сравнимы.

Комплексной химиолучевой терапии подвергались больные III и IV стадией опухолевого процесса (III – 41,7 и 48,7%, IV – 58,3 и 51,2%, соответственно). На фоне проводимого курса химиотерапии (цисплатин в дозе  $40 \text{ мг/м}^2$  один раз в неделю до суммарной дозы 200-300 мг в течение 6-7 недель) больные получали непрерывный курс гамма-терапии в статическом режиме на аппарате «РОКУС-АМ». Разовая очаговая доза (РОД) облучения составила 2 Гр, недельная – 10 Гр (по 2 Гр x 5 раз в неделю), а суммарная очаговая доза (СОД) достигала 66-70 Гр. Кроме того, проводили радикальный курс дистанционной гамма-терапии метастатически пораженных лимфоузлов с двух боковых полей (8-10 x 8-10 см) под углом  $90-100^\circ$  и с расстояния 75-85 см; при этом РОД равнялась 2 Гр, а СОД на лимфатические узлы 30-48 Гр. Лучевая топометрия и клиническая дозиметрия не отличались от общепринятых методик.



Оценку эффективности противоопухолевого лечения проводили с помощью критериев, характеризующих непосредственные результаты специфической химиолучевой терапии: полная резорбция опухоли; частичная резорбция опухоли; стабилизация болезни; прогрессирование болезни.

Эффективность применения  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина (препарата моликсан) в качестве средства сопровождения химиолучевой терапии оценивали по непосредственным результатам основного противоопухолевого лечения, частоте возникновения ранних химиолучевых реакций в виде орального мукозита и гемодепрессии, по качеству жизни пациентов (индекс Карновского) [Ионова Т.Н. и др., 2000]. Также фиксировали длительность перерыва, в течение которого происходила регенерация слизистой оболочки, и величину СОД, которая была подведена к первичной опухоли до вынужденного перерыва. Токсичность химиолучевой терапии оценивали по выраженности постлучевой гемодепрессии.

Степень тяжести химиолучевого орального мукозита определяли согласно классификации, предложенной World Health Organization (2003). Клиническую оценку состояния слизистой оболочки полости рта и ротоглотки проводили в соответствии со шкалой RTOG/EORTC [Trotti A. et al., 2000]. Степень тяжести и эффективность лечения химиолучевого орального мукозита уточняли способом, предложенным А.К. Иорданишвили и соавт. (2013).

Оценку гигиенического состояния полости рта проводили с помощью упрощенного гигиенического индекса ОНI-S (Oral Hygiene Index Simplified), предложенного J. Green, J. Wermillion (1964). Для количественного определения интенсивности и распространенности воспалительной реакции тканей десны был применен папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА), разработанный I. Shour, M. Massier (1948), в модификации С. Parma (1960). Степень выраженности воспаления в межзубных сосочках определяли методом зондовой пробы кровоточивости десневой бороздки по индексу кровоточивости десен (ИДК), предложенному Н. Mulemann (1971), I. Cowell (1975). Для изучения распространенности и интенсивности поражения тканей пародонта использовали пародонтальный индекс (PI), разработанный J. Russel (1956).

Определение содержания IL-1, IL-6, IL-4, TNF- $\alpha$  и эпидермального фактора роста (EGF) в сыворотке крови больных выполняли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов «Bender Medsystems» (Австрия) и «Endogen» (США) на анализаторе «EVOLIS TwinPlus» (BIORAD, США). Определение IgA в слюнной (ротовой) жидкости и в периферической крови выполняли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов sIgA(IgA)-ИФА-БЕСТ производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Обследование больных проводили до начала курса химиолучевой терапии, через 2, 4 и 6-7 недель (при наборе СОД 20, 40 и 60 Гр).

Микробный спектр слизистой полости рта анализировали до начала химиолучевого лечения и при наборе СОД 40 Гр методом полимеразной цепной реакции. Набор инфектов включал грибы рода *Candida* и вирусы герпеса HSV-1

Полученные в ходе экспериментальных исследований данные были подвергнуты стандартной статистической обработке с расчетом среднего значения, ошибки средней и среднего квадратического отклонения [Платонов А.Е., 2000; Петри А., 2009]. С целью выбора метода анализа взаимосвязи показателей (параметрические или непараметрические методы) исходные количественные характеристики были проверены на соответствие нормальному распределению с использованием тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Среднюю величину относительных показателей и ее ошибку определяли с помощью таблиц В.С. Генеса (1967), достоверность различий – по точному критерию Фишера. Оценку различий средних значений данных при распределениях, близких нормальным, проводили параметрическим методом с использованием t-критерия Стьюдента. Оценку различий данных, полученных при анализе выборок малого объема, проводили непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни. Вероятность  $p \leq 0,05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Экспериментальный раздел.** Моделирование химиолучевого орофарингеального синдрома (ОФС) проводили с помощью оригинальной методики путем однократного подкожного введения цитостатиков алкилирующего действия циклофосамида или цисплатина в дозах, максимально переносимых для данного вида животных, с последующим воздействием гамма-лучей при краниокаудальном облучении крыс в дозе 10 Гр на область головы. Оценку степени тяжести развивающегося после воздействия цитостатиков и радиации орального мукозита проводили по показателям общего состояния животных (двигательная активность, пищевая возбудимость, изменение массы тела) и клиническим признакам стоматита (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние облучения и/или цитостатиков на частоту развития клинических проявлений орального мукозита у белых беспородных крыс, %

Показатель (симптом)	Группы опытов	Сроки исследования после облучения, сут			
		3	5	10	15
Снижение двигательной активности	Контроль	0+8	0+8	0+8	0+8
	Облучение 10 Гр	0+8	10±10	40±12*	10±10
	ЦП 7 мг/кг	0+8	10±10	20±10	10±10
	ЦФ 70 мг/кг	0+8	10±10	20±10	10±10
	ЦП + облучение	60±13*	60±13*	100–20*	60±13*
	ЦФ + облучение	70±15*	70±15*	95±19*	70±15*

Снижение пищевой возбудимости	Контроль	0+8	0+8	0+8	0+8
	Облучение 10 Гр	0+8	20±10	30±11	30±11
	ЦП 7 мг/кг	0+8	10±10	10±10	10±10
	ЦФ 70 мг/кг	0+8	10±10	10±10	10±10
	ЦП + облучение	25±10	100–20*	95±19*	80±17*
	ЦФ + облучение	20±10	90±18*	100–20*	85±18*
Снижение массы тела	Контроль	0+8	0+8	0+8	0+8
	Облучение 10 Гр	0+8	10±10	30±11	10±10
	ЦП 7 мг/кг	0+8	10±10	20±10	10±10
	ЦФ 70 мг/кг	0+8	10±10	20±10	10±10
	ЦП + облучение	20±10	40±12*	80±17*	100–20*
	ЦФ + облучение	15±9	35±11	80±17*	100–20*
Петехии	Контроль	0+8	0+8	0+8	0+8
	Облучение 10 Гр	30±11	10±10	10±10	0+8
	ЦП 7 мг/кг	10±10	10±10	10±10	0+8
	ЦФ 70 мг/кг	10±10	15±6	10±10	0+8
	ЦП + облучение	50±12*	50±12*	40±12*	30±11
	ЦФ + облучение	55±12*	45±12*	50±12*	20±10
Эрозии	Контроль	0+8	0+8	0+8	0+8
	Облучение 10 Гр	10±10	20±10	10±10	10±10
	ЦП 7 мг/кг	0+8	10±10	10±10	10±10
	ЦФ 70 мг/кг	0+8	10±10	10±10	10±10
	ЦП + облучение	40±12*	50±12*	50±12*	40±12*
	ЦФ + облучение	40±12*	45±12*	50±12*	40±12*
Очаговый и сливной эпителиит	Контроль	0+8	0+8	0+8	0+8
	Облучение 10 Гр	0+8	10±10	30±11	10±10
	ЦП 7 мг/кг	0+8	10±10	10±10	10±10
	ЦФ 70 мг/кг	10±10	10±10	15±9	10±10
	ЦП + облучение	20±10	70±5*	80±17*	60±13*
	ЦФ + облучение	15±9	65±13*	70±15*	60±13*
Язвы	Контроль	0+8	0+8	0+8	0+8
	Облучение 10 Гр	10±10	20±7	30±11	10±10
	ЦП 7 мг/кг	10±10	10±10	10±10	10±10
	ЦФ 70 мг/кг	0+8	10±10	10±10	10±10
	ЦП + облучение	20±10	60±13*	80±17*	60±13*
	ЦФ + облучение	20±10	60±13*	80±17*	65±14*

Примечание: \*  $p < 0,05$  – по сравнению с облучением (по критерию Фишера); количество животных в группе  $n=20$ .

У крыс, подвергавшихся только облучению в дозе 10 Гр, развивался ораль- ный мукозит легкой степени тяжести, характеризующийся появлением гиперемии, единичных или сливных петехий, сухости и отечности слизистой оболоч- ки полости рта. Описанные клинические проявления стихали к 10-15 сут, тогда же наблюдалось восстановление целостности эпителия слизистой оболочки. У

животных, получивших однократно цисплатин в дозе 7 мг/кг или циклофосфамид в дозе 70 мг/кг, мукозит практически не развивался, выраженных изменений в слизистой оболочке ротовой полости не наблюдалось. При комбинированном воздействии оба цитостатика способствовали снижению дозового порога радиационного воздействия для развития у крыс выраженной клинической картины лучевого орального мукозита с 15 Гр до 10 Гр.

К 5 сут наблюдения эрозивно-язвенное поражение слизистой оболочки выявлено у 60-100% экспериментальных животных. Слизистая оболочка десен и щек бледная, отечная, рыхлая, отделяемая слюна вязкая. Клиническая картина выраженного эрозивно-язвенного стоматита сохранялась у 50-60% крыс до 15 сут наблюдения, явления деэпителизации нарастали. Выраженность клинических проявлений стоматита уменьшилась лишь к 20 сут после комбинированного воздействия, когда наступило улучшение общего состояния, пищевой возбудимости, появилась тенденция к увеличению массы тела.

Таким образом, на этом этапе исследования были разработаны экспериментальные модели лучевого и химиолучевого орального мукозита, являющегося аналогом орофарингеального синдрома, развивающегося у людей при проведении им лучевой и комбинированной химиолучевой терапии. Учитывая, что оба цитостатика в равной степени вызывали усиление повреждающего действия кранио-каудального облучения, в дальнейших исследованиях был использован цисплатин, так как он чаще применяется в клинической практике.

Таблица 2 – Влияние повреждающих факторов химиолучевой терапии и вирусной инфекции на характер течения воспалительных процессов в слизистой оболочке полости рта белых беспородных крыс

Группы опытов	Показатель		
	Проба Шиллера-Писарева	Показатель кровоточивости, ед.	Количество десневой жидкости, мг
Контроль	0,17±0,06	0	0,47 ± 0,08
Облучение 15 Гр	1,5±0,13*	1,1±0,21*	0,03±0,002*
ЦП + облучение 10 Гр	2,1±0,17*	1,7±0,18*	0,02±0,002*
ЦП + облучение 10 Гр + HSV-1	2,7±0,14*	1,8±0,13*	0,01±0,002*

Примечание: \*  $p < 0,05$  – по сравнению с контролем (по критерию Стьюдента); количество животных в группе  $n=20$ .

У инфицированных вирусом герпеса простого 1 типа (HSV-1) животных на фоне введения цисплатина и последующего кранио-каудального облучения развивалась яркая клиническая картина орофарингеального синдрома (табл. 2). Явления орального мукозита проявлялись уже через 1 сут после комбинированного (герпесвирусного, химического и радиационного) воздействия. Около 80% животных были малоподвижны и отказывались от приема пищи. На 3 сут

выраженное угнетение двигательной активности и пищевой возбудимости наблюдалось у 100% крыс, у 80% при осмотре полости рта фиксировали глубокие эрозии и язвы. К 5 сут явления орального мукозита в виде эрозий и язв были выявлены у 100% животных. До 15 сут наблюдения явления деэпителизации нарастали, проявляясь в виде сливного эпителиита и язвенно-некротического мукозита, а также ксеростомии (табл. 2). Развитие химиолучевого орального мукозита III–IV степени тяжести привело к гибели 40% крыс.

При изучении патогенеза орального мукозита также установлено, что химиолучевое воздействие способствует активации процессов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке полости рта белых беспородных крыс. Так, уже на 3 сут после воздействия на организм цитостатиков и облучения выявлено повышение содержания диеновых конъюгатов (в 1,46 раза) и малонового диальдегида (в 1,57 раза) по сравнению с контролем. Избыточная пероксидация липидов явилась одной из возможных причин формирования воспалительных процессов в слизистой оболочке полости рта. Подтверждением тому является рост индексных показателей (проба Шиллера-Писарева), повышенная кровоточивость десен и развитие ксеростомии у лабораторных животных (табл. 2).

Формирование химиолучевого орального мукозита как при изолированном гамма-облучении, так и при комбинированном химиолучевом воздействии сопровождалось значительным повышением уровня микробной обсемененности слизистой оболочки полости рта. В период разгара химиолучевого стоматита (15 сут после облучения) количество колоний негемолитического стрептококка, стафилококка, энтеробактерий возросло, по сравнению с группой интактных животных, более чем в 3-4 раза. Наибольший рост (более чем в 5 раз) выявлен у кандид: *C. albicans* и *C. Glabrata* высевались практически у 90% животных, подвергнутых комбинированному химиолучевому воздействию. Количество колониеобразующих единиц в группе «цисплатин + облучение» возросло по сравнению с группой «облучение» в среднем на 1-2 логарифма.

Химиолучевое воздействие оказывало выраженное ингибирующее влияние на синтез антимикробных пептидов (табл. 3). Гамма-облучение вызывало снижение в крови крыс количества  $\alpha$ -дефензина (HNP 1-3) в среднем на 30% и кателицидина LL-37 в 1,4 раза по сравнению с группой интактных животных. Еще более выраженный характер носили изменения в уровне этих пептидов при комбинированном химиолучевом воздействии: концентрация  $\alpha$ -дефензина уменьшилась у животных группы «цисплатин + облучение» в среднем в 1,8 раза, а кателицидина LL-37 – почти вдвое (табл. 3). Выявленный параллелизм между ростом микробного инфицирования слизистой оболочки полости рта и уменьшением уровня антимикробных пептидов в крови лабораторных животных может свидетельствовать о патогенетической значимости постлучевого

нарушения микробиоценоза в развитии химиолучевого орального мукозита.

Таблица 3 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на содержание α-дефензина (HNP 1-3), β-дефензина (hBD-3) и кателицидина (LL-37) в сыворотке крови белых беспородных крыс с химиолучевым оральным мукозитом, нг/мл

Антимикробный пептид	До воздействия (интактные животные)	Облучение	Облучение + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	Облучение + ЦП	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин
HNP 1-3	49,2±5,7	37,1±2,5*	42,3±4,8 <sup>#</sup>	26,4±2,1*	41,1±4,7 <sup>##</sup>
hBD-3	38,5±4,9	41,8±3,9*	46,6±5,2	64,4±6,8*	40,2±3,8 <sup>##</sup>
LL-37	4,5±0,6	3,2±0,7*	3,8±0,5 <sup>#</sup>	2,3±0,2*	3,4±0,7 <sup>##</sup>

Примечание: ЦП – цисплатин, \* p<0,05 – по сравнению с исходным уровнем; <sup>#</sup> p<0,05 – по сравнению с облучением; <sup>##</sup> p<0,05 – по сравнению с облучением + ЦП (по критерию Стьюдента); количество животных в группе n=10.

Лечебное применение изученных дисульфидов глутатиона в дозе 30 мг/кг сразу после облучения и далее курсом в течение 15 сут после химиолучевого воздействия нормализовало уровень антимикробных пептидов, способствовало уменьшению частоты выявления дисбактериоза слизистой оболочки полости рта и выраженности клинических проявлений орофарингеального синдрома, что позволяло сохранить жизнь всем животным опытной группы (табл. 3, 4).

Таблица 4 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на микробиоценоз слизистой оболочки полости рта белых беспородных крыс с химиолучевым оральным мукозитом

Виды микроорганизмов	Количество микроорганизмов, выявляемых на слизистой полости рта крыс до и после лучевого и химиолучевого воздействия, lg КОЕ				
	До воздействия (интактные животные)	Облучение	Облучение + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	Облучение + ЦП	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин
β-гемолитический стрептококк	2,4±0,25	4,6±0,15*	1,9±0,2 <sup>#</sup>	6,5±0,3*	2,5±0,1 <sup>##</sup>
Негемолитический стрептококк	1,9±0,1	4,2±0,2*	2,0±0,2 <sup>#</sup>	5,6±0,2*	2,4±0,2 <sup>##</sup>
Стафилококк	2,0±0,1	4,2±0,1*	2,0±0,1 <sup>#</sup>	6,2±0,2*	2,1±0,2 <sup>##</sup>
Энтеробактерии	70 клеток в мазке	3,6±0,15*	1,4±0,1 <sup>#</sup>	4,8±0,2*	2,7±0,2 <sup>##</sup>
Кандиды (C. albicans и C. glabrata)	Не определяют	3,1±0,1*	1,4±0,2 <sup>#</sup>	5,4±0,2*	1,8±0,1 <sup>##</sup>
Анаэробы	60-80 клеток в мазке	3,4±0,2*	1,2±0,15 <sup>#</sup>	4,4±0,2*	2,6±0,2 <sup>##</sup>

Примечание: \* p<0,05 – по сравнению с исходным уровнем; <sup>#</sup> p<0,05 – по сравнению с облучением; <sup>##</sup> p<0,05 – по сравнению с облучением + ЦП (по критерию Стьюдента); количество животных в группе n=20.

В ходе дальнейших экспериментальных исследований показано, что дисульфиды глутатиона обладают гемостимулирующей активностью, что может лежать в основе возможных патофизиологических механизмов фармакологической активности изученных препаратов при их использовании в качестве средств профилактики и лечения орального мукозита (табл. 5).

Таблица 5 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на морфологический состав крови у белых беспородных крыс с химиолучевым оральным мукозитом

Показатель (исходный уровень)	Группы опытов	Сроки исследования после облучения, сут			
		3	5	10	15
Число лейкоцитов, х 10 <sup>9</sup> /л (12,1±0,5)	Облучение + ЦП (контроль)	5,2±0,2 <sup>#</sup>	3,0±0,2 <sup>#</sup>	3,6±0,3 <sup>#</sup>	4,4±0,5 <sup>#</sup>
	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	6,8±0,6	4,7±0,5*	5,0±1,0*	7,9±1,2*
Число лимфоцитов, х 10 <sup>9</sup> /л (9,7±0,6)	Облучение + ЦП (контроль)	3,4±0,3 <sup>#</sup>	2,0±0,3 <sup>#</sup>	3,2±0,3 <sup>#</sup>	4,6±0,4 <sup>#</sup>
	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	3,6±0,5	5,6±0,4*	5,8±0,6*	7,1±0,6*
Число нейтрофилов, х 10 <sup>9</sup> /л (1,6±0,2)	Облучение + ЦП (контроль)	1,0±0,2	0,6±0,2 <sup>#</sup>	0,9±0,3 <sup>#</sup>	1,3±0,3
	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	1,2±0,3	1,0±0,2*	1,1±0,4	1,5±0,3
Число эритроцитов, х 10 <sup>12</sup> /л (12,9±0,8)	Облучение + ЦП (контроль)	11,9±0,6	11,3±0,9	11,8±0,6	12,0±0,8
	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	11,6±0,8	11,4±1,0	12,0±0,8	12,4±2,8
Число ретикулоцитов, % (1,8±0,2)	Облучение + ЦП (контроль)	0,06±0,01 <sup>#</sup>	0,08±0,01 <sup>#</sup>	0,09±0,01 <sup>#</sup>	1,0±0,1 <sup>#</sup>
	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	0,2±0,1*	0,2±0,01*	1,4±0,1*	1,2±0,2
Число тромбоцитов 10 <sup>9</sup> /л (368±22)	Облучение + ЦП (контроль)	358±46	330±32	243±27	129±36
	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	364±42	398±48	348±46	389±45
Содержание гемоглобина, г/л (13,9±1,6)	Облучение + ЦП (контроль)	13,0±1,2	13,5±1,0	14,3±1,1	13,2±1,1
	Облучение + ЦП + Na <sub>2</sub> GSSG-инозин	14,6±1,5	14,0±1,8	13,9±1,1	15,0±1,0

Примечание: <sup>#</sup> p<0,05 – по сравнению с исходным уровнем; \* p<0,05 – по сравнению с контролем: облучение + ЦП (по критерию Стьюдента); количество животных в группе n=20.

Установлено также, что курсовое введение Na<sub>2</sub>GSSG-инозина сопровождалось уменьшением содержания в крови диеновых конъюгатов и малонового диальдегида к 3-м и 15-м сут наблюдения в среднем 1,5 раза по сравнению с животными контрольной группы. В результате содержание продуктов перекис-

ной деградации липидов в гомогенатах СОПР крыс, подвергнутых комбинированному химиолучевому воздействию и лечению  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозином, практически не отличалось от показателей интактных животных (до воздействия).

Введение  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина способствовало также активации ферментов антиоксидантной защиты. Так, активность супероксиддисмутазы у получавших  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин крыс на 3-и сут наблюдения была выше на 20%, а на 15-е сут – на 30% по сравнению с животными контрольной группы. Активность каталазы под влиянием  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина к 3-м сут наблюдения увеличивалась на 55%, а к 15-м сут – на 45% и практически не отличалась от значения этого показателя у интактных крыс.  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин также способствовал существенной активации глутатион-пероксидазы: ее активность динамично нарастала и к 15-м сут практически в два раза превышала показатели контроля.

Полученные данные могут служить подтверждением антиоксидантной активности  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина. Существенно снижая выраженность и продолжительность активации процессов ПОЛ при действии химиолучевых факторов, препарат оказал стабилизирующее действие на состояние клеточных мембран и, тем самым, повысил эффективность ряда мембранных функций этих клеток, в том числе предотвращая их гибель [Filomeni G. et al., 2005; Tew K.D., 2006].

Показано, что химиолучевое воздействие на животных контрольной группы сопровождалось увеличением содержания в крови EGF, IL-1 $\beta$  и IL-4, а применение  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина снижало выраженность этого процесса.

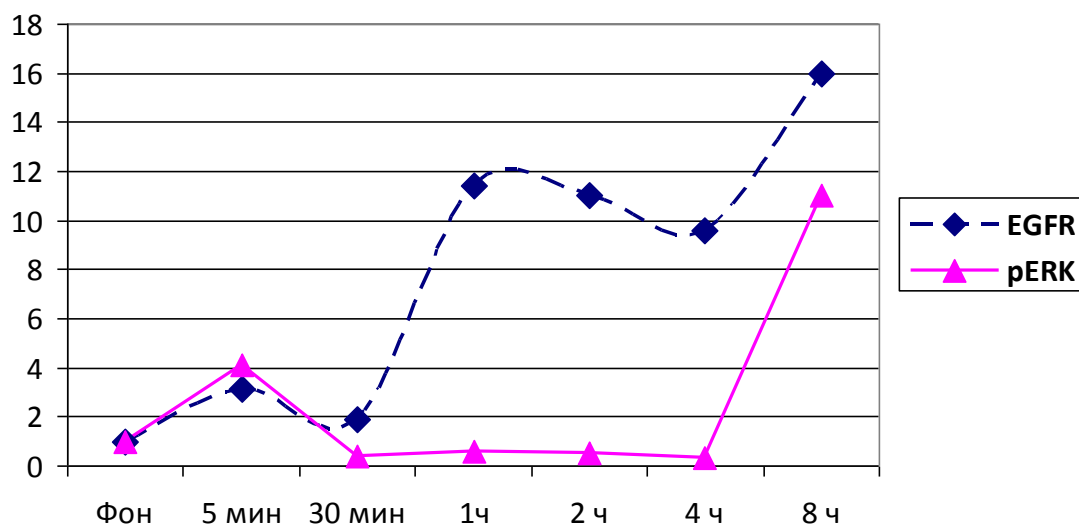


Рисунок 1 – Влияние  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина на активность фосфорилирования рецептора EGF и активность MAP-киназ pERK 1,2 в клетках A 431, усл. ед.

Как видно из рисунка 1, изученный дисульфид глутатиона предотвращал десенситизацию и способствовал восстановлению чувствительности рецепторов EGF: активность фосфорилирования EGFR клеток A431 эпидермоидной



карциномы в опытах *in vitro* возрастала уже в первые минуты и сохранялась на высоком уровне (в 10-12 раз выше контроля) в течение 8 ч инкубации. Активация экстраклеточно регулируемых киназ 1,2 (pERK 1,2) в клетках A431 при действии Na<sub>2</sub>GSSG-инозина регистрировалась через 5 мин, а затем через 4-8 ч после начала инкубации. Таким образом, Na<sub>2</sub>GSSG-инозин оказывал стимулирующее влияние на рецепторы EGF, что проявилось в активации процессов фосфорилирования сигнал-передающих белков, в частности, митогенактивируемых протеинкиназ (MAP-киназ pERK1), которые используются клеткой для регуляции транскрипционных генов [Шурыгина И.А. и др., 2009]. Полученные результаты указывают на способность дисульфидов глутатиона восстанавливать функционально активную конформацию рецепторов цитокинов и, соответственно, чувствительность клеток к их воздействию, что позволяет объяснить ряд фармакологических эффектов этих препаратов действием эндогенных цитокинов. Это в конечном итоге и приводит к активации пролиферации и дифференцировки в клетках костного мозга и слизистой оболочки полости рта.

Подтверждением активации процессов пролиферации и дифференцировки под влиянием дисульфидов глутатиона могут служить результаты экспериментов с мышами линии BALB/c, облученными в дозе 7,3 Гр. Выявлено, что через 9 сут после облучения количество эндогенных колоний на селезенках мышей, леченых литиевой солью дисульфида глутатиона и комплексного соединения палладия и меди (литаном), возросло по сравнению с контролем более чем в 2,5 раза. Применение литана способствовало также устранению пострадиационного блока митоза гемопоэтических клеток у облученных мышей: интенсивность включения <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток костного мозга к 3 сут возросла по сравнению с контролем почти в 3 раза, а 12 сут – более чем в 2 раза.

Установлено также, что дисульфиды глутатиона можно рассматривать как индукторы интерферона, обладающие стимулирующим эффектом в отношении фагоцитов крови и гуморальных звеньев неспецифической иммунологической резистентности. Так, уровень IFN-α уже через 2 ч после однократного введения Na<sub>2</sub>GSSG-инозина увеличивался в 5-6 раз, а через 16-24 ч достигал максимума, превышая фоновые значения в 20-25 раз. Кроме того, препарат оказывал активирующее влияние на функциональное состояние фагоцитов крови, а также на процессы синтеза и секреции в кровь лизоцима и миелопероксидазы.

Анализ результатов экспериментальных исследований и данных литературы позволяет заключить, что оптимальной схемой применения Na<sub>2</sub>GSSG-инозина в качестве средства сопровождения химиолучевой терапии рака oroфарингеальной области для профилактики и лечения оральных мукозитов является введение препарата 1 раз в сутки через день на протяжении всего периода противоопухолевой терапии. Наиболее эффективным сроком введения Na<sub>2</sub>GSSG-

инозина в условиях лучевой или химиолучевой терапии является 30-60 мин после радиационного воздействия. Этот период выбран в связи с тем, что постлучевой блок митозов в быстро пролиферирующих тканях (костный мозг и слизистая оболочка полости рта) обычно развивается в первые часы и сохраняется на протяжении 24 ч после облучения [Бутомо Н.В. и др., 2004; Гребенюк А.Н. и др., 2012].

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований разработана патофизиологически обоснованная схема профилактики и лечения лучевых и химиолучевых (неосложненных и осложненных герпесвирусной инфекцией) оральных мукозитов с помощью препаратов, содержащих дисульфиды глутатиона –  $\text{Na}_2\text{GSSG}$  (глутоксим),  $\text{Li}_2\text{GSSG}$  (литан) и  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин (моликсан). Для человека вводимая доза фармакопейных препаратов дисульфидов глутатиона глутоксима и моликсана составляет 60 мг в сутки.

**Клинический раздел.** Клинические исследования были выполнены с привлечением больных местнораспространенным раком орофарингеальной области, получавших химиолучевую терапию.

Установлено, что к числу наиболее ранних субъективных симптомов, возникающих при проведении химиолучевой терапии уже после облучения орофарингеальной области в суммарной дозе 20 Гр, относились: першение в горле, сухость во рту, боль при глотании и повышенная нервная возбудимость. К моменту завершения курса лучевой терапии (СОД 60 Гр) такие симптомы как першение в горле, изменения вкуса и консистенции слюны, сухость во рту и боль при глотании, отмечались у 90-100% пациентов. Применение  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина способствовало значительному (в 2-3 раза по сравнению с контролем) снижению выраженности субъективных проявлений орального мукозита. Наиболее существенно это проявлялось в отношении таких симптомов, как боль при глотании, изменение вкуса и повышенная возбудимость: они отмечались у 30-34 пациентов из 39 в контрольной группе и практически отсутствовали у пациентов, получавших  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин.

Объективные проявления орального мукозита у пациентов, получавших химиолучевую терапию, выражались в виде гиперемии и отека слизистой оболочки полости рта, кровоточивости десен, очагового или сливного эпителиита, эрозивных и язвенно-некротических процессов. При применении  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозина (моликсана) существенно снижалась частота развития кровоточивости десен, эрозий и язв слизистой оболочки полости рта. Так, геморрагические проявления химиолучевого орального мукозита у больных основной группы (получавших  $\text{Na}_2\text{GSSG}$ -инозин) наблюдались в 3–4 раза реже, чем в контрольной. При этом эрозии, язвы, некрозы и сливной эпителиит не возникли ни у одного

из леченых Na<sub>2</sub>GSSG-инозином (моликсаном) пациентов.

Индукцированный химиолучевой терапией оральный мукозит у больных раком ОФО сопровождался нарушением стоматологического статуса. В таблице 6 приведены данные об ухудшении гигиены полости рта (IG повышался в 1,4-1,9 раза), активации воспалительных процессов в слизистой оболочке полости рта (РМА возрастал в 1,6-2,3 раза), увеличении кровоточивости десен (индекс Мюллемана увеличивался в 1,6-2,2 раза), повышении подвижности зубов, а также об увеличении глубины пародонтальных карманов (PI вырос в 1,7 раза).

Таблица 6 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на стоматологический статус больных раком орофарингеальной области, получавших химиолучевую терапию

Показатель	Группы пациентов	Сроки исследования		
		До ХЛТ	СОД 40 Гр	СОД 60 Гр
Индекс гигиены (IG), баллы	Контрольная	1,33±0,11	1,91±0,07*	2,48±0,10*
	Основная	1,30±0,12	1,47±0,10 <sup>#</sup>	1,59±0,10 <sup>#</sup>
Индекс РМА, %	Контрольная	30,37±2,50	48,01±1,52*	69,42±2,18*
	Основная	30,08±2,74	34,05±1,15 <sup>#</sup>	41,03±1,90 <sup>#</sup>
Индекс кровоточивости (IM), баллы	Контрольная	1,22±0,10	1,98±0,08*	2,64±0,11*
	Основная	1,19±0,10	1,41±0,17 <sup>#</sup>	1,62±0,15 <sup>#</sup>
Пародонтальный индекс (PI), баллы	Контрольная	3,50±0,27	4,60±0,36	5,84±0,42*
	Основная	3,49±0,35	3,74±0,36 <sup>#</sup>	3,94±0,38 <sup>#</sup>

Примечание: \* p<0,05 – по сравнению с уровнем до химиолучевой терапии; <sup>#</sup> p<0,05 – по сравнению с соответствующей группой облучения (по критерию Фишера)

У больных основной группы, получавших в качестве средства профилактики и лечения химиолучевого орального мукозита препарат Na<sub>2</sub>GSSG-инозин, изучаемые показатели на максимуме лучевой реакции (при СОД в 60 Гр) были в среднем в 1,5-2 раза меньше, чем у пациентов контрольной группы.

Необходимо напомнить, что к важным патогенетическим механизмам развития не только воспаления, но и опухолевой прогрессии относится дисбаланс цитокинового профиля с преимущественной гиперпродукцией провоспалительных цитокинов [Антонов В.Г., Козлов В.К., 2004; Бережная Н.М., Чехун В.Ф., 2005; Melo M.L. et al., 2008]. При проведении клинических исследований было установлено, что химиолучевая терапия больных раком ОФО сопровождается дозозависимым ростом количества провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в крови (табл. 7). При достижении суммарной очаговой дозы облучения в 60 Гр концентрация IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  достигла величин, превышающих исходный уровень в 3-8 раз. Концентрация противовоспалительного IL-4 изменялась в меньшей степени. Такого рода сдвиги в цитокиновом балансе могут свидетельствовать о развитии у онкологических больных оксидативного стресса с

последующим формированием химиолучевого орального мукозита.

Таблица 7 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на содержание цитокинов в периферической крови больных раком оротфарингеальной области, получавших химиолучевую терапию, пг/мл

Показатель	Группы пациентов	До ХЛТ	Величина показателя при суммарной очаговой дозе облучения, Гр	
			40 Гр	60 Гр
IL-1β	Контрольная	62,5±6,6	186,3±18,9*	248,9±25,1*
	Основная	60,4±7,4	75,7±8,1 <sup>#</sup>	92,1±10,3 <sup>#</sup>
IL-6	Контрольная	28,8±2,9	69,2±7,5*	86,7±9,3*
	Основная	24,2±2,5	35,3±3,7 <sup>#</sup>	46,1±3,7 <sup>#</sup>
TNF-α	Контрольная	32,9±5,7	189,2±23,3*	264,5±27,4*
	Основная	29,3±4,2	71,2±8,3 <sup>#</sup>	94,22±7,15 <sup>#</sup>
IL-4	Контрольная	22,4±3,8	41,6±5,3*	58,5±6,5*
	Основная	28,3±2,7	80,9±9,5 <sup>#</sup>	78,9±8,4 <sup>#</sup>
EGF	Контрольная	6,3±0,84	14,8±1,6*	15,7±1,7*
	Основная	6,5±0,79	8,4±1,01 <sup>#</sup>	8,9±0,89 <sup>#</sup>

Примечание: \* p<0,05 – по сравнению с уровнем до химиолучевой терапии; <sup>#</sup> p<0,05 – по сравнению с контрольной группой (по U-критерию Манна-Уитни).

Лечебное применение Na<sub>2</sub>GSSG-инозина способствовало ингибированию развивающегося цитокинового взрыва и сохранению содержания большинства изученных цитокинов на уровне показателей до начала ХЛТ, а также оказало нормализующее влияние на концентрацию EGF в периферической крови онкологических больных раком ротоглотки на фоне проводимой ХЛТ (табл. 7).

Таблица 8 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на содержание иммуноглобулина А в слюнной жидкости и периферической крови больных раком оротфарингеальной области, подвергавшихся химиолучевой терапии, г/л

Показатель	Группы пациентов	До ХЛТ	Величина показателя после ХЛТ с набором СОД 60 Гр	
			Мукозиты I – II степени тяжести	Мукозиты III – IV степени тяжести
sIgA в слюнной жидкости	Контрольная	0,81±0,05	0,59±0,06*	0,44±0,07*
	Основная	0,79±0,04	0,80±0,03 <sup>#</sup>	0,78±0,03 <sup>#</sup>
IgA в сыворотке крови	Контрольная	0,31±0,02	0,21±0,03*	0,16±0,02*
	Основная	0,29±0,01	0,28±0,03	0,28±0,03 <sup>#</sup>

Примечание: \* p<0,05 – по сравнению с уровнем до химиолучевой терапии; <sup>#</sup> p<0,05 – по сравнению с контрольной группой (по U-критерию Манна-Уитни).

Как видно из таблицы 8, восстановление цитокинового баланса при приме-

нении иммуномодулирующей терапии препаратом Na<sub>2</sub>GSSG-инозин нашло свое отражение и в нормализации показателей местного иммунитета в слюнной жидкости. Так, при достижении СОД в 60 Гр концентрация sIgA у пациентов контрольной группы с оральными мукозитами I–II степени тяжести понизилась в среднем на 30% по сравнению с величиной показателя до начала химиолучевой терапии. У больных с мукозитами III–IV степени тяжести количество секреторного иммуноглобулина уменьшилось по сравнению с исходным уровнем в 2 раза. Применение Na<sub>2</sub>GSSG-инозина в качестве средства профилактики и лечения химиолучевых оральных мукозитов способствовало восстановлению уровня секреторного иммуноглобулина в слюнной жидкости обследованных пациентов вне зависимости от степени выраженности орального мукозита, а также позволяло нормализовать уровень IgA в сыворотке крови (табл. 8).

Лечебное применение Na<sub>2</sub>GSSG-инозина также способствовало восстановлению до исходного уровня (до ХЛТ) содержания антимикробных пептидов кателицидина LL-37, α-дефензина (HNP 1-3) и β-дефензина (hBD-3) в периферической крови больных раком ОФО, получавших химиолучевую терапию. Кроме того, Na<sub>2</sub>GSSG-инозин оказывал позитивное влияние на выраженность процессов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах периферической крови (табл. 9).

Таблица 9 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на интенсивность процессов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах периферической крови больных раком орофарингеальной области, получавших химиолучевую терапию

Показатель	Группы пациентов	До ХЛТ	Величина показателя при суммарной очаговой дозе облучения, Гр		
			20	40	60
МДА, нмоль/г Нб	Контрольная	6,84±0,47	9,21±0, 21*	12,19±0, 81*	14,80±0,51*
	Основная	6,48±0,29	5,74±0, 28 <sup>#</sup>	6,71±0, 39 <sup>#</sup>	7,09±0,35 <sup>#</sup>
ДК, нмоль/г Нб	Контрольная	0,74±0, 05	0,96±0,05*	1,42±0,13*	0,94±0,04*
	Основная	0,70±0,04	0,62±0,03 <sup>#</sup>	0,87±0,04 <sup>#</sup>	0,74±0,03 <sup>#</sup>
Каталаза, нмоль/мин · г Нб	Контрольная	0,79±0, 05	0,69 ±0,06	1,07±0,09*	1,14±0,13
	Основная	0,70±0,04	0,96±0,05 <sup>#</sup>	1,42±0,13 <sup>#</sup>	1,94±0,14 <sup>#</sup>
Глутатион- пероксидаза, нмоль/мин · г Нб	Контрольная	1,67±0, 06	1,72±0,03	1,68±0,02	1,74±0,03
	Основная	1,78±0,07	2,01±0,03 <sup>#</sup>	2,48±0,03 <sup>#</sup>	2,69±0,18 <sup>#</sup>
Глутатион-S- трансфераза, нмоль/мин · г Нб	Контрольная	305,7±18, 5	298,3±23,0	369,9±39,8	421,9±43,5*
	Основная	309,7±34,4	410,9±35,6 <sup>#</sup>	586,4±50,6 <sup>#</sup>	659,9±70,3 <sup>#</sup>

Примечание: \* p<0,05 – по сравнению с уровнем до химиолучевой терапии; <sup>#</sup> p<0,05 – по сравнению с контрольной группой (по U-критерию Манна-Уитни).

Таким образом, включение в комплексную терапию оральных мукозитов у больных раком ОФО, получающих химиолучевую терапию, дисульфидов глутатиона сопровождается уменьшением активности воспалительных и эрозивно-язвенных процессов в слизистой оболочке полости рта и улучшением стоматологического статуса. Позитивный эффект от применения Na<sub>2</sub>GSSG-инозина достигается за счет восстановления баланса про- и антиоксидантной активности, уменьшения уровня провоспалительных (IL-1, IL-6, TNF-α) и повышения содержания противовоспалительных цитокинов (в частности, IL-4), восстановления количества антимикробных пептидов (α-дефензина HNP 1-3 и кателицидина LL-37) и иммуноглобулина А (как в слюнной жидкости, так и в крови). Все эти механизмы могут лежать в основе способности Na<sub>2</sub>GSSG-инозина нормализовать микробиоценоз в полости рта пациентов, получающих химиолучевую терапию. Показано, в частности, что применение Na<sub>2</sub>GSSG-инозина в качестве средства сопровождения ХЛТ сопровождалось существенным (в 4 раза) снижением инфицированности больных вирусом HSV-1 и уменьшением (в среднем в 2 раза) количества пациентов с кандидозом, вызываемым *Candida albicans*.

Все вышеперечисленные механизмы позволяли с помощью лечебного применения Na<sub>2</sub>GSSG-инозина снизить тяжесть орального мукозита (с III-IV степени до I-II степени) и провести запланированное противоопухолевое лечение в полном объеме при сохранении высокого качества жизни пациентов. Так, уже при достижении суммарной очаговой дозы облучения опухоли в 20 Гр величина индекса Карновского у больных основной группы возрастает до 70% (при уровне данного показателя в контроле в 50-60%). К концу химиолучевой терапии и достижении СОД в опухоли 60 Гр, Na<sub>2</sub>GSSG-инозин способствовал восстановлению (сохранению) высокого качества жизни онкологических больных. При этом индекс Карновского возрастал до 90% (в контрольной группе его величина была равна 60%).

Как видно из данных, приведенных в таблице 10, наиболее ранние проявления осложнений химиолучевой терапии в виде орального мукозита I-II степени тяжести после облучения в дозе 20 Гр были выявлены более чем у 65% пациентов контрольной группы. При достижении СОД облучения орофарингеальной области в 30-35 Гр на фоне применения цисплатина практически у 100% больных развивался оральный мукозит, в основном III-IV степени тяжести (в 69,2% случаев), значительно реже – I-II степени тяжести (у 30,2% больных). Появление этого осложнения у 14 из 39 пациентов контрольной группы при наборе суммарной очаговой дозы 32,4±5,5 Гр потребовало назначения перерыва в проведении ХЛТ, длительность которого составила 12,4±4,6 сут.

Применение Na<sub>2</sub>GSSG-инозина позволило снизить тяжесть орального мукозита с III-IV степени до I-II степени и провести запланированное лечение в пол-

ном объеме без перерывов (табл. 10). У больных основной группы клинические проявления химиолучевого мукозита слизистой оболочки полости рта III-IV степени наблюдались лишь в 15,6% случаев. Обращает на себя внимание, что потребность в прерывании ХЛТ пациентам основной группы не возникала.

Таблица 10 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на степень тяжести орального мукозита и особенности лечения у больных раком оротофарингеальной области, получавших химиолучевую терапию

Показатель	Количество наблюдений в группах			
	Контрольная группа		Основная группа	
	Абсолютное число пациентов, чел.	Относительное число пациентов, %	Абсолютное число пациентов, чел.	Относительное число пациентов, %
I-II степень тяжести мукозита	12	30,8±5,3	30	84,4±7,8*
III-IV степень тяжести мукозита	27	69,2±7,1	6	15,6±2,9*
Нуждаемость в перерыве химиолучевой терапии	14	35,8±3,2	0	0+4*
Всего больных	39	100	36	100

Примечание: \* p<0,05 – по сравнению с контрольной группой (по критерию Фишера)

У больных основной группы клинические проявления химиолучевого мукозита слизистой оболочки полости рта III-IV степени наблюдались лишь в 15,6% случаев. Обращает на себя внимание тот факт, что потребность в прерывании ХЛТ у пациентов основной группы не возникала.

Подтверждение обнаруженной закономерности было получено также при расчете индексов степени тяжести орального мукозита и оценки эффективности его лечения по методу А.К. Иорданишвили и соавторов (2013). Проведенные исследования показали, что при наборе СОД в 40 Гр индекс тяжести орального мукозита у больных контрольной группы составил в среднем 14,4 ± 2,6 баллов, а при СОД в 60 Гр – 17,9 ± 3,1. Применение Na<sub>2</sub>GSSG-инозина способствовало значительному снижению индекса тяжести орального мукозита до 2,7 ± 0,8 баллов при 40 Гр и до 2,5 ± 1,1 баллов при 60 Гр, соответственно.

Эффективность лечения орального мукозита с помощью Na<sub>2</sub>GSSG-инозина составляла в среднем 81,3% при 40 Гр и около 86% при достижении СОД 60 Гр в условиях химиолучевой терапии рака ОФО. Такого рода данные могут свидетельствовать о высокой эффективности лечения оральных мукозитов с помощью органической соли дисульфида глутатиона и инозина препарата моликсан.

В результате проведенных исследований также установлено, что использование дисульфидов глутатиона в качестве средства профилактики и лечения орального мукозита при проведении одновременной химиолучевой терапии у больных с местнораспространенным раком орофарингеальной области позволяет улучшить непосредственные результаты противоопухолевого лечения. Как видно из таблицы 11, количество пациентов с полным регрессом рака ОФО при применении Na<sub>2</sub>GSSG-инозина возрастает с 60 до 80%.

Таблица 11 – Влияние Na<sub>2</sub>GSSG-инозина на непосредственные результаты химиолучевой терапии у больных раком орофарингеальной области

Результат лечения	Количество наблюдений в группах			
	Контрольная группа		Основная группа	
	Абсолютное число пациентов, чел.	Относительное число пациентов, %	Абсолютное число пациентов, чел.	Относительное число пациентов, %
Полный регресс	24	61,5±5,8	29	80,5±5,7*
Частичный регресс	8	20,5±4,1	5	13,9±3,2
Стабилизация	5	12,8±3,8	2	5,6±2,2
Прогрессирование	2	5,1±2,9	0	0+4
Всего больных	39	100	36	100

Примечание: \*  $p < 0,05$  – по сравнению с контрольной группой (по критерию Фишера)

Подводя итог проделанной работе можно заключить, что в ее экспериментальном разделе созданы модели лучевых и химиолучевых оральных мукозитов, которые могут использоваться для изучения патогенеза этого состояния и оценки эффективности лекарственных средств, предназначенных для их профилактики и лечения. Кроме того, установлены патофизиологические основы применения дисульфидов глутатиона в качестве средств сопровождения химиолучевой терапии для лечения оральных мукозитов. Показано, что фармакологическое действие дисульфидов глутатиона направлено на восстановление функциональной активности поверхностно-клеточных рецепторов различных семейств, внеклеточных регуляторных и транспортных молекул, что приводит к повышению активности пролиферативных процессов в поврежденных радиочувствительных тканях и восстановлению целостности слизистой оболочки полости рта. В клиническом разделе работы обоснована эффективность использования препаратов дисульфидов глутатиона, в частности органической соли дисульфида глутатиона и инозина препарата моликсан в качестве средства сопровождения химиолучевой терапии у больных раком ОФО, действие которого направлено на профилактику и лечение оральных мукозитов и гемодепрессии.



## ВЫВОДЫ

1. Кранио-каудальное облучение крыс в дозе 10 Гр в комбинации с предварительным (за 1 сут до облучения) введением цисплатина в дозе 7 мг/кг (максимально переносимой для данного вида животных) вызывает развитие яркой симптоматики орофарингеального синдрома в виде угнетения у 60% животных двигательной активности, снижения у 80% особей пищевой возбудимости, появления местных воспалительных процессов, ксеростомии и эрозивно-язвенного поражения слизистой оболочки полости рта более чем у 60% крыс. Дополнительное (перед химиолучевым воздействием) инфицирование крыс герпесвирусом HSV-1 способствует значительному утяжелению орального мукозита и приводит к гибели около 40% особей.

2. Важным звеном патогенеза химиолучевого орального мукозита у экспериментальных животных в условиях комбинированного радиационного и химического воздействия является нарушение микробиоценоза полости рта. В период разгара химиолучевого орального мукозита количество колоний негемолитического стрептококка, стафилококка, энтеробактерий в слизистой оболочке полости рта экспериментальных животных возрастает по сравнению с группой контроля в среднем в 3 раза, при этом наибольший рост (в 5 раз) отмечается у дрожжевых грибов *Candida albicans* и *Candida glabrata*.

3. Химиолучевое воздействие оказывает выраженное ингибирующее влияние на синтез антимикробных пептидов – эффекторов врожденного иммунитета. Количество  $\alpha$ -дефензина (HNP 1-3) и кателицидина LL-37 на пике развития химиолучевого орального мукозита в периферической крови экспериментальных животных снижается в 1,8-2 раза, что является одной из причин нарушений микробиоценоза в слизистой оболочке полости рта.

4. Лечебное применение дисульфида глутатиона препарата глутоксим и органической соли дисульфида глутатиона с инозином препарата моликсан на протяжении 15 сут после комбинированного химиолучевого воздействия нормализует уровень антимикробных пептидов, способствует уменьшению (в 2–3 раза) частоты дисбактериоза слизистой оболочки полости рта и выраженности клинических проявлений орофарингеального синдрома, что позволяет сохранить жизнь всем животным опытной группы.

5. Возможные патофизиологические механизмы фармакологической активности дисульфидов глутатиона в профилактике и лечении орального мукозита связаны с наличием у изученных препаратов гемостимулирующей активности и способности снижать выраженность процессов перекисного окисления липидов. Кроме того, дисульфиды глутатиона предотвращают десенситизацию и способствуют восстановлению чувствительности рецепторов

эпидермального фактора роста: активность фосфорилирования белков рецептора EGFR клеток A431 эпидермоидной карциномы в опытах *in vitro* возрастает в первые минуты и через 8 ч инкубации в среднем в 10-12 раз по сравнению с контролем. Лигандзависимая активация рецепторов под влиянием органической соли дисульфида глутатиона и инозина сопровождается стимуляцией внутриклеточных сигнал-передающих систем (активность митоген-активируемых белков MAP-киназ ERK 1,2 к 8 ч наблюдения возрастает почти в 16-30 раз), что приводит к активации пролиферации и дифференцировки в клетках костного мозга и слизистой оболочки полости рта.

6. Индуцированный химиолучевой терапией оральный мукозит у больных раком орфарингеальной области сопровождается нарушением стоматологического статуса, которое проявляется в ухудшении гигиены полости рта (величина IG повышается в 1,4-1,9 раза), активации воспалительных процессов в слизистой оболочке полости рта (индекс РМА возрастает в 1,6-2,3 раза), увеличении кровоточивости десен (величина индекса Мюллемана возрастает в 1,6-2,2 раза), повышении подвижности зубов, а также в увеличении глубины пародонтальных карманов (уровень PI возрастает в 1,7 раза).

7. У больных раком орфарингеальной области, получающих химиолучевую терапию, в периферической крови нарушается баланс про- и противовоспалительных цитокинов (за счет повышения в 4-7,5 раз содержания IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ ) и иммуноглобулинов sIgA и IgA, что является следствием развития воспалительного процесса и компенсаторных реакций организма на системном и местном уровне. При этом концентрация иммуноглобулина sIgA в слюнной жидкости уменьшается в среднем на 30-40% у больных с мукозитами I-II степени и более чем в 2 раза – у пациентов с оральными мукозитами III-IV степени, что является одной из причин развития дисбактериоза (с преобладанием кандидоза) в полости рта.

8. Включение в комплексную терапию оральных мукозитов у больных раком орфарингеальной области дисульфидов глутатиона на фоне проводимой химиолучевой терапии сопровождается уменьшением активности воспалительных и эрозивно-язвенных процессов в слизистой оболочке полости рта и улучшением стоматологического статуса. Позитивный эффект от применения органической соли дисульфида глутатиона с инозином препарата моликсан достигается за счет восстановления баланса про- и антиоксидантной активности, уменьшения уровня провоспалительных (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и повышения содержания противовоспалительных цитокинов (IL-4), восстановления количества антимикробных пептидов ( $\alpha$ -дефензина HNP 1-3, и кателицидина LL-37) и секреторного иммуноглобулина А, что способствует нормализации микробиоценоза в полости рта. Кроме того, лечебное действие Na<sub>2</sub>GSSG-инозина проявляется в

восстановлении лиганд-рецепторного взаимодействия эпидермального фактора роста (EGFR), стимуляции процессов пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга и слизистой оболочки полости рта.

9. Применение органической соли дисульфида глутатиона и инозина препарата моликсан в качестве средства сопровождения химиолучевой терапии пациентов с раком oroфарингеальной области позволяет снизить тяжесть орального мукозита (с III-IV степени до I-II степени) и провести запланированное противоопухолевое лечение в полном объеме при высоком качестве жизни пациентов (индекс Карновского повышается с 60 до 90%). У больных, получавших терапию дисульфидами глутатиона, клинические проявления химиолучевого орального мукозита III-IV степени наблюдаются лишь в 15,6% случаев при 69,2% в группе сравнения.

10. Обоснованная и апробированная методика профилактики и лечения орального мукозита с использованием препаратов дисульфидов глутатиона (внутримышечно в дозе 60 мг, через день, через 30-60 мин после очередной фракции облучения) при проведении одновременной химиолучевой терапии у больных с местнораспространенным раком oroфарингеальной области позволяет улучшить непосредственные результаты противоопухолевого лечения. Количество пациентов с полным регрессом рака oroфарингеальной области при применении органической соли дисульфида глутатиона с инозином препарата моликсан возрастает с 60 до 80%.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Применение дисульфидов глутатиона, в частности органической соли дисульфида глутатиона и инозина препарата моликсан, может быть рекомендовано с целью повышения эффективности лечения орального химиолучевого мукозита и улучшения качества жизни у онкологических больных, подвергающихся комбинированной химиолучевой терапии.

Препарат рекомендуется вводить внутримышечно в дозе 60 мг (2 мл раствора) через 30-60 мин после очередной фракции облучения через день (3 раза в неделю) на протяжении всего периода комбинированной химиолучевой терапии (15-18 инъекций в течение 2-х месяцев).

2. В методику лабораторного обследования больных раком oroфарингеальной области перед проведением химиолучевой терапии целесообразно включить оценку выраженности герпесвирусного (HSV-1) инфицирования слизистой оболочки полости рта с целью прогнозирования степени тяжести орального мукозита и подбора адекватного противоопухолевого лечения.

3. Разработанные экспериментальные модели лучевого и химиолучевого орального мукозита у мелких лабораторных животных позволяют адекватно

воспроизводить основные клинические проявления этого заболевания у человека при воздействии на организм повреждающих факторов химиолучевой терапии. Целесообразно рекомендовать данные модели экспериментального химиолучевого орального мукозита для изучения патогенеза этого состояния и оценки эффективности разрабатываемых фармакологических препаратов, предназначенных для использования в качестве средств профилактики и терапии оральных мукозитов у больных раком oroфарингеальной области, получающих лучевую или химиолучевую терапию.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** На основании анализа результатов проведенных исследований можно заключить, что одним из перспективных направлений в разработке новых высокоэффективных средств профилактики и лечения лучевых и химиолучевых оральных мукозитов является поиск препаратов в ряду индукторов антимикробных пептидов:  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефензинов, кателицидина LL-37. Перспективным представляется расширение показаний к применению изученных дисульфидов глутатиона путем патогенетического обоснования их применения в качестве средств профилактики и лечения побочных эффектов химиолучевой терапии злокачественных новообразований других локализаций и стадий опухолевого процесса.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Антушевич, А.А. Изучение эффективности препарата глутоксим в качестве средства раннего лечения лучевых поражений / А.А. Антушевич // Отдаленные последствия воздействия ионизирующего излучения: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Киев, 2007. – С. 222-223.
2. Антонов, В.Г. Применение препарата глутоксим в комплексной терапии и профилактике лучевых стоматитов / В.Г. Антонов, А.А. Антушевич, Т.В. Ладанова // Матер. III съезда фармакологов России. – Ч. 1. – СПб., 2007. – С. 1587.
3. Антушевич, А.Е. Изучение возможности применения глутоксима в качестве средства сопровождения лучевой терапии опухолей полости рта / А.Е. Антушевич, В.Г. Антонов, Т.В. Ладанова, А.А. Антушевич // Материалы III съезда фармакологов России. – Ч. 1. – СПб., 2007. – С. 1588.
4. Антонов, В.Г. Модулирующее влияние препарата глутоксим на регуляторное действие цитокинов / В.Г. Антонов, Е.Б. Бурова, К.П. Василенко, А.А. Антушевич / Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы междунар. науч. конф. – Минск, 2007. – С. 137.
5. Гребенюк, А.Н. Эффективность препарата глутоксим в качестве средства сопровождения лучевой терапии / А.Н. Гребенюк, В.Г. Антонов, А.А. Антушевич // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы междунар. науч. конф. – Минск, 2007. – С. 138.

6. Антушевич, А.А. Патогенетические основы эффективности глутоксима при лучевой терапии рака ротоглотки / А.А. Антушевич, Е.Б. Бурова, К.П. Василенко, В.Г. Антонов, Г.Е. Труфанов, А.Г. Климов // Клиническая патофизиология. – 2007. – № 1-2. – С. 104-105.

7. Гребенюк, А.Н. Современные подходы к фармакологической коррекции токсической нейтропении / А.Н. Гребенюк, С.М. Алексеев, Н.В. Станчева, Ю.В. Шилов, А.А. Антушевич // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2008. – № 1 (21), прил. – С. 193-198.

8. Антушевич, А.А. Сравнительная оценка эффективности беталейкина, бестима и препаратов глутатиона в качестве средств ранней терапии радиационных поражений / А.А. Антушевич, А.С. Воронова, В.В. Зацепин, А.В. Петров // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2008. – № 3 (23), прил. – С. 207-208.

9. Антонов, В.Г. Влияние препарата глутоксим на регуляторное действие цитокинов / В.Г. Антонов, А.Е. Антушевич, А.А. Антушевич // Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии: тез. докл. Рос. науч. конф. с междунар. участием. – СПб., 2011. – С. 190.

10. Антушевич, А.Е. Влияние препарата глутоксим на активность Р-гликопротеина / А.Е. Антушевич, А.А. Антушевич, В.Г. Антонов // Там же. – СПб., 2011. – С. 190-191.

11. Антушевич, А.А. Влияние глутоксима на пролиферативную активность клеток костного мозга облученных животных / А.А. Антушевич, А.Н. Гребенюк, А.Е. Антушевич // Там же. – С. 214-215.

12. Антушевич, А.А. Гемостимулирующая активность литиевой соли окисленного глутатиона при гемодепрессиях радиационного и химического генеза / А.А. Антушевич, А.Е. Антушевич, А.Н. Гребенюк // Там же. – С. 215.

13. Тарумов, Р.А. Влияние литиевой соли окисленного глутатиона на динамику гематологических показателей у облученных крыс / Р.А. Тарумов, А.А. Антушевич // Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия: материалы II Всерос. науч. конф. молодых ученых. – СПб., 2012. – С. 507-508.

14. Антушевич, А.А. Влияние препарата глутоксим на основные проявления радиоэпителиита у крыс / А.А. Антушевич // Там же. – С. 215-216.

**15. Антушевич, А.А. Экспериментальное моделирование лучевых и химиолучевых стоматитов у крыс / А.А. Антушевич, А.Е. Антушевич, Л.П. Полевая, А.Н. Гребенюк // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 12. – С. 785-788.**

16. Тарумов, Р.А. Современные антиоксиданты как перспективные средства профилактики и лечения радиационных поражений / Р.А. Тарумов, В.А. Башарин, А.А. Антушевич, В.Ю. Ковтун, А.Н. Гребенюк // Острые проблемы разра-

ботки противолучевых средств: консерватизм или модернизация: тез. докл. Рос. науч. конф. – М., 2012. – С. 20.

17. Антушевич, А.А. Противолучевая активность фармакологических препаратов, содержащих соли окисленного глутатиона / А.А. Антушевич, А.Е. Антушевич, А.Н. Гребенюк // Там же. – С. 30.

18. Антушевич, А.А. Глутоксим как средство лечения лучевых дерматитов / А.А. Антушевич, А.Е. Антушевич, А.А. Вайнсон, А.Н. Гребенюк // Состояние и перспективы развития средств медицинской защиты от экстремальных факторов: Материалы Юбилейной науч.-практ. конф. – М.: НПЦ «Фармзащита» ФМБА России, 2012. – С. 158-159.

19. Антушевич, А.А. Профилактика и лечение химиолучевых стоматитов при химиолучевой терапии рака орофарингеальной области / А.А. Антушевич, Т.В. Ладанова, А.Г. Климов, А.Е. Антушевич, Б.Т. Мороз // Там же. – С. 165.

20. Антушевич, А.А. Механизмы фармакологической активности моликсана как средства сопровождения химиолучевой терапии рака орофарингеальной области / А.А. Антушевич, В.Г. Антонов, А.Г. Климов, А.Е. Антушевич, Б.Т. Мороз // 6-й Невский радиологический форум: материалы Рос. науч. конф. – СПб., 2013. – С. 166.

**21. Тарумов, Р.А. Влияние антиоксиданта литана на динамику гематологических показателей у облученных крыс / Р.А. Тарумов, А.А. Антушевич // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – Т. 20, № 2. – С. 223-226.**

22. Антушевич, А.А. Роль герпесвирусной инфекции в клинических проявлениях экспериментального орофарингеального синдрома / А.А. Антушевич, А.Е. Антушевич, А.Н. Гребенюк, А.В. Степанов, В.Г. Антонов, А.Г. Климов // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2013. – № 4. – С. 70-75.

23. Антушевич, А.А. Экспериментальное изучение эффективности и механизмов действия дисульфида глутатиона в качестве средства коррекции последствий лучевой терапии / А.А. Антушевич, А.Н. Гребенюк, А.Е. Антушевич, В.Г. Антонов // Радиобиологические основы лучевой терапии опухолей: материалы Междунар. науч. конф. – М., 2013. – С. 28.

**24. Гребенюк, А.Н. Сравнительное изучение эффективности генистеина, мексидола, литана и цитохрома С как средств профилактики и ранней терапии радиационных поражений / А.Н. Гребенюк, В.А. Башарин, Р.А. Тарумов, В.Ю. Ковтун, А.А. Антушевич // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2013. – № 1 (41). – С. 102-106.**

25. Антушевич, А.А. Экспериментальное изучение лечебной эффективности литиевой соли дисульфида глутатиона в условиях острого внешнего

воздействия гамма-излучения / А.А. Антушевич, А.Е. Антушевич, А.Н. Гребенюк, Р.А. Тарумов, В.Г. Антонов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53, № 5. – С. 451-458.

26. Антушевич, А.А. Патофизиологические основы эффективности глутоксима как средства сопровождения лучевой терапии рака ротоглотки / А.А. Антушевич, В.Г. Антонов, А.Н. Гребенюк, А.Е. Антушевич, Т.В. Ладанова, Е.Б. Бурова // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2013. – № 3 (43). – С. 32-37.

27. Ярцева, А.А. Состояние микробиоценоза полости рта экспериментальных животных, подвергшихся комбинированному воздействию повреждающих факторов химиолучевой терапии / А.А. Ярцева, А.В. Степанов, А.Н. Гребенюк, А.Е. Антушевич, В.Г. Антонов // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2014. – № 1 (45). – С. 105-109.

28. Антушевич, А.Е. Влияние моликсана на активность окислительно-восстановительных процессов в слизистой оболочке полости рта экспериментальных животных при комбинированном химиолучевом воздействии / А.Е. Антушевич, А.А. Ярцева, А.Н. Гребенюк, В.Г. Антонов // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2014. – № 1 (45). – С. 152-155.

29. Степанов, А.В. Экспериментальное обоснование применения иммуномодулятора моликсан в качестве средства терапии герпесвирусной инфекции / А.В. Степанов, А.А. Ярцева, А.Н. Гребенюк, Антонов В.Г., Антушевич А.Е. // Военно-медицинский журнал. – 2014. – №2. – С. 64-65.

30. Ярцева, А.А. Влияние моликсана на микробиоценоз полости рта после комбинированного химиолучевого воздействия / А.А. Ярцева, А.В. Степанов, А.Н. Гребенюк, А.Е. Антушевич // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2014. – № 1. – С. 57-63.

31. Ярцева, А.А. Эффективность моликсана как средства коррекции негативных проявлений химиолучевой терапии у больных раком орофарингеальной области / А.А. Ярцева, Б.Т. Мороз, А.Н. Гребенюк, А.Е. Антушевич, А.Г. Климов, В.Г. Антонов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54, № 3. – С. 265-272.

#### ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

1. Пат. 2519164 С1 Российская Федерация, МПК А61N 5/00 А61К 38/04 А61Р 1/00. Способ профилактики и лечения химиолучевых стоматитов при химиолучевой терапии рака орофарингеальной области / Антушевич А.Е., Антушевич А.А., Антонов В.Г., Гребенюк А.Н., Климов А.Г., Макеев Б.Л. – № 2012149718/14; заявл. 21.11.2012; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 16. – 11 с.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП	- Антимикробные пептиды
Гр	- Грей (единица измерения поглощенной дозы облучения)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛД <sub>50</sub>	- летальная доза, вызывающая гибель 50% биообъектов
МАР-киназа	- митогенаактивируемая протеинкиназа
ОФО	- орофарингеальная область
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
РОД	- разовая очаговая доза
СОД	- суммарная очаговая доза
СОПР	- слизистая оболочка полости рта
ХЛТ	- химиолучевая терапия
ЦП	- цисплатин
ЦФ	- циклофосфамид (циклофосфан)
EGF	- эпидермальный фактор роста
EGFR	- рецептор эпидермального фактора роста
ERK	- киназа, регулируемая экстраклеточным сигналом
GSH	- восстановленный глутатион
GSSG	- дисульфид глутатиона (окисленный глутатион)
Hb	- гемоглобин
HSV-1	- вирус герпеса простого I типа
sIgA	- секреторный иммуноглобулин А
IG	- индекс гигиены
IL-1 $\beta$	- интерлейкин-1 бета
IL-4	- интерлейкин-4
IL-6	- интерлейкин-6
IM	- индекс кровоточивости десен (индекс Мюллемана)
IFN- $\alpha$	- интерферон альфа
PI	- пародонтальный индекс
PMA	- папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс
TNF	- тумор некротический фактор (фактор некроза опухолей)