

О. О. Покотило¹, О. С. Покотило², М. М. Корда¹¹ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МОЗ УКРАЇНИ²ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ПУЛЮЯ

ВПЛИВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ НА ОКИСНЮВАЛЬНУ МОДИФІКАЦІЮ ПРОТЕЇНІВ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМУ РАКУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Вступ. Важливу роль у патогенезі розвитку колоректального раку відіграє окиснювальний стрес або дисбаланс прооксидантно/антиоксидантного гомеостазу, що призводить до окиснювальної модифікації протеїнів і посиленого утворення протеїнових карбонільних груп. Наявність окиснювального стресу при колоректальному раку потребує ефективної антиоксидантної терапії. Останніми роками зростає інтерес до дослідження молекулярного водню як інертного газу, який ефективно проявляє антиоксидантну дію.

Мета дослідження – дослідити вплив води, насиченої молекулярним воднем, на вміст карбонільних груп окисномодифікованих протеїнів у сироватці крові білих щурів з колоректальним раком.

Методи дослідження. Досліди проведено на 50 самцях білих щурів лінії Вістар. Тваринам моделювали колоректальний рак (КРР) шляхом підшкірного введення 1,2-диметилгідразину в дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів. Щури споживали воду, насичену молекулярним воднем, у концентрації 0,6 ppm ad libitum. Евтаназію тварин проводили під тіопенталовим наркозом. Для дослідження використовували сироватку крові, в якій визначали вміст карбонільних груп колориметричним методом. Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета програмного забезпечення SPSS22.

Результати й обговорення. Встановлено, що моделювання колоректального раку призводило до збільшення вмісту карбонільних груп у сироватці крові щурів в 1,93 раза порівняно з інтактними тваринами. Вміст карбонільних груп у сироватці крові щурів з колоректальним раком, які споживали воду, насичену молекулярним воднем, упродовж 30 тижнів паралельно із введенням 1,2-диметилгідразину, був в 1,29 раза меншим, ніж у тварин з колоректальним раком, які споживали звичайну воду. Споживання насиченої молекулярним воднем води впродовж 30 днів після моделювання колоректального раку білим щурам також призводило до зниження вмісту карбонільних груп у сироватці їх крові.

Висновки. Застосування насиченої молекулярним воднем води є ефективним методом зменшення окиснювального стресу в щурів з колоректальним раком.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: молекулярний водень; воднева вода; окиснювальний стрес; колоректальний рак.

ВСТУП. Колоректальний рак (КРР) – третє за поширеністю онкологічне захворювання, на частку якого припадає близько 10,0 % усіх випадків раку, що є другою за значимістю причиною смертності від раку у усьому світі [1]. У 2020 р. у світі було зареєстровано 19,3 мільйона нових випадків раку, з яких 10,0 % діагностовано як КРР, а рівень смертності від КРР становив 9,4 % [2].

У літературі наведено численні докази того, що активація окиснювальних реакцій у клітинах відіграє важливу роль у патогенезі багатьох патологічних процесів [3]. Зараз існують переконливі докази того, що окиснювальний стрес має велике значення в етіології та/або прогресуванні колоректального раку [4–7].

© О. О. Покотило, О. С. Покотило, М. М. Корда, 2024.

Окиснювальний стрес (дисбаланс прооксидантно/антиоксидантного гомеостазу) призводить до підвищення рівнів протеїнових карбонільних груп [5, 8–10]. Карбонільні групи (альдегіди та кетони) утворюються на бічних ланцюгах протеїну (особливо Pro, Arg, Lys і Thr), коли вони окиснюються. Карбонільні групи є хімічно стабільними, що широко використовують для їх кількісного визначення. На сьогодні вміст протеїнових карбонілів є одним з маркерів інтенсивності окиснювальних процесів, які найчастіше застосовують [8, 10].

Наявність окиснювального стресу при колоректальному раку потребує ефективної антиоксидантної терапії. Останніми роками зростає інтерес до дослідження молекулярного водню (H₂O) як інертного газу, який ефективно проявляє

антиоксидантну дію [11–15]. Під час експериментальних та клінічних досліджень розкрито механізми впливу молекулярного водню (H_2) і показано, що H_2 – це потужний антиоксидант, який знешкоджує гідроксильний радикал (OH^\bullet) та пероксинітрит ($ONOO^-$) [11, 12, 15, 16]. У ряді досліджень продемонстровано, що реалізація антиоксидантного впливу молекулярного водню, зокрема через ядерні фактори та певні антиоксидантні ензими, впливає на механізми розвитку раку в організмі [17, 18].

Мета дослідження – дослідити вплив води, насиченої молекулярним воднем, на вміст карбонільних груп окисномодифікованих протеїнів у сироватці крові білих щурів з колоректальним раком.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили в Центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Для експериментів використано 50 самців білих щурів лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію університету і поділили на п'ять груп: 1-ша – контроль (тварини цієї групи споживали водопровідну воду); 2-га – щури, яким моделювали колоректальний рак шляхом підшкірного введення 1,2-диметилгідразину (ДМГ) у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів [19] (тварини цієї групи мали доступ до звичайної водопровідної води); 3-тя – щури, яким моделювали КРР шляхом підшкірного введення ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів та які споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, упродовж тих же 30 тижнів; 4-та – щури, яким моделювали КРР шляхом підшкірного введення ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів та які споживали водопровідну воду впродовж тих же 30 тижнів і потім ще протягом 30 днів після закінчення моделювання КРР; 5-та – щури, яким моделювали КРР шляхом підшкірного введення ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів та які впродовж тих же 30 тижнів споживали водопровідну воду, а потім протягом 30 днів воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm.

Тварини під час експерименту мали доступ до звичайної води і води, насиченої молекулярним воднем, *ad libitum*. Воду, насичену молекулярним воднем, готували безпосередньо в поїлках щурів, у які поміщали вісім магнієвих паличок (довжина – 5 см, діаметр – 14 мм). Після приготування таких поїлок через 15 хв вміст молекулярного водню становив 0,6 ppm, і тоді їх

встановлювали у клітки з тваринами. Вміст молекулярного водню визначали сертифікованим H_2 -метром ENH-100 (“Amtast”, США). Поїлки замінювали кожних 2 дні в усіх групах тварин.

Утримували щурів та проводили експерименти на них відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [20]. Щурів виводили з експерименту шляхом евтаназії під тіопенталовим наркозом. Кров забирали із серця тварин і центрифугували при частоті обертання 1100 г упродовж 30 хв. Для дослідження використовували сироватку крові.

Концентрацію протеїну в сироватці крові оцінювали за методом Lowry та ін. [21]. Рівень карбонільних груп визначали у сироватці крові щурів за допомогою аналітичного набору Elabscience (набір Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit, E-BC-K117-S, Elabscience Biotechnology Inc., Texas, США) відповідно до інструкцій виробника [22, 23].

Для підтвердження КРР проводили гістологічне дослідження товстої кишки. Для ідентифікації абераційних вогнищ крипти її виділяли та промивали фізіологічним розчином. Кишку розкривали поздовжньо, розкладали плазом, фіксували в 10 % нейтральному буферному розчині формаліну впродовж 24 год і фарбували 0,2 % метиленовим синім протягом 3–5 хв. Ділянки, інтенсивно профарбовані барвником, вирізали та здійснювали подальшу обробку тканин у гістопроцесорі LOGOSone (“Milestone”, Італія). Парафінові зрізи товстої кишки товщиною 5 мкм фарбували гематоксиліном та еозином, оцінювали за допомогою світлового мікроскопа Nikon Eclipse Ci-E (“Nikon”, Японія) і фотодокументували цифровою камерою Sigeta M3CMOS 14000.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета програмного забезпечення SPSS22 [24]. Різницю між групами було проаналізовано відповідно до t-критерію Стьюдента і непараметричного критерію Вілкоксона для зв'язаних вибірок. Розбіжності вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. 1,2-Диметилгідразин використовують для хімічно індукovanого канцерогенезу товстої кишки у гризунів. Є повідомлення, що ДМГ найефективніший щодо моделювання канцерогенезу з точки зору пізніх стадій аденом і карцином [22]. Крім того, пухлини, що утворюються при моделюванні за допомогою ДМГ, відповідають ідентичній локалізації та патологічним змінам, подібним до спорадичного раку товстої кишки людини [19, 25].

При гістологічному дослідженні стінки товстої кишки тварин, яким вводили ДМГ, виявлено виражену епітеліальну дисплазію слизової оболонки, гіперхроматичність ядер і дезорганізацію клітинних рядів епітелію. Спостерігали атипів клітини з гіперхромними ядрами різної форми та розміру, зміну ядерно-цитоплазматичного співвідношення в бік ядер, порушення цілісності базальної мембрани. Усі гістопатологічні особливості, які ми спостерігали, відповідали класичним гістологічним змінам при розвитку неоплазії товстої кишки в людини: цитологічна атипія, базальні ядра з конденсацією хроматину навколо ядерної оболонки, гіперхромні ядра, неоднорідність ядерної стратифікації і втрата полярності. З огляду на вищенаведені дані, можна констатувати, що у товстій кишці щурів розвинулась аденокарцинома *in situ*. Отже, ДМГ є ефективним засобом для хімічно індукованого канцерогенезу товстої кишки у гризунів.

Дослідження сироватки крові щурів з колоректальним раком на різних етапах експерименту показало зміни вмісту продуктів окиснення протеїнів, які прореагували з 2,4-динітрофенілгідразином, у тварин різних груп. Результати

дослідження показано на рисунку. Як видно з наведених даних, вміст карбонільних груп у тварин 2-ї групи з КРР становив 5,8 нмоль/мг протеїну, що в 1,93 раза більше, ніж у щурів інтактної групи. Отримані дані свідчать про те, що підшкірне введення ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла тварини 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів призводить до вираженої окиснювальної модифікації протеїнів.

Для корекції порушень, виявлених у тварин з КРР, вони споживали воду, насичену молекулярним воднем. Вміст карбонільних груп у сироватці крові щурів 3-ї групи з КРР, які споживали воду, насичену молекулярним воднем, упродовж 30 тижнів паралельно із введенням ДМГ, становив 4,5 нмоль/мг протеїну, що в 1,29 раза менше, ніж у тварин 2-ї групи з КРР, які мали доступ до водопровідної води. Отримані дані свідчать про здатність насиченої воднем води впливати на окиснювальну модифікацію протеїнів і знижувати вміст карбонільних груп у тварин з експериментально модельованим КРР. Це можна пояснити доведеною клінічно й експериментально антиоксидантною роллю молекулярного водню при різних патологічних станах, у тому числі

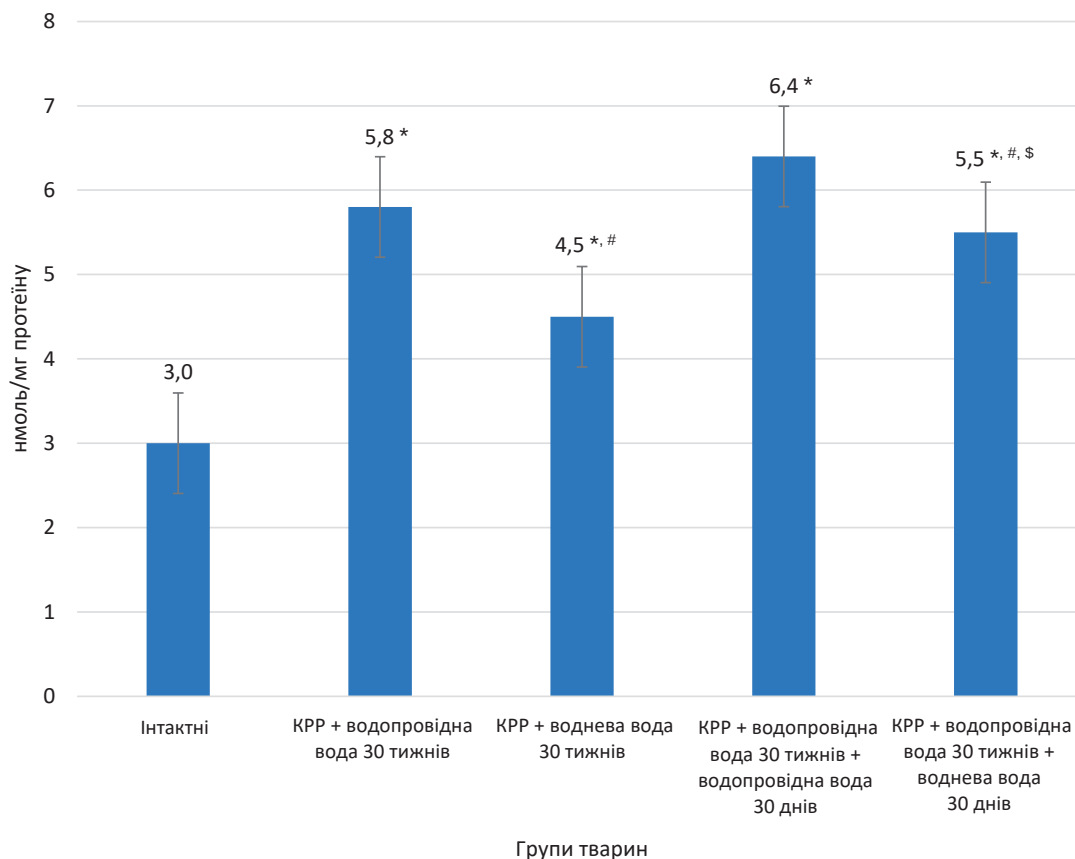


Рис. Вміст карбонільних груп у сироватці крові щурів з колоректальним раком, нмоль/мг протеїну ($M \pm m$, $n=10$).

Примітки:

- * – зміни достовірні порівняно з тваринами інтактної групи ($p \leq 0,05$).
- # – зміни достовірні порівняно з тваринами 2-ї групи ($p \leq 0,05$).
- \$ – зміни достовірні порівняно з тваринами 4-ї групи ($p \leq 0,05$).

й при раку [7, 26–29]. Відомо, що онкологічний процес характеризується збільшенням вмісту активних форм кисню (АФК), таких, як супероксид ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильний радикал (OH^{\cdot}), пероксид (RO_2^{\cdot}), алкоксил (RO^{\cdot}), гідропероксид (HO_2^{\cdot}), і нерадикальних видів, таких, як пероксид водню (H_2O_2), хлорнуватиста кислота ($HOCl$), озон (O_3), синглетний кисень (1O_2) і пероксинітрил ($ONOO^{\cdot}$) [3, 4]. Особливо небезпечним є гідроксильний радикал, проти якого немає селективних антиоксидантних ензимів в організмі [3]. Було доведено, що одним з антиоксидантних механізмів дії молекулярного водню є власне його взаємодія з гідроксильним радикалом і нейтралізація останнього через утворення води [11, 12, 14, 17]. Таким чином, молекулярний водень зменшує рівень АФК, особливо гідроксильного радикала, а це, у свою чергу, знижує окиснювальну модифікацію протеїнів, і, як наслідок, зменшується вміст карбонільних груп у тканинах щурів з модельованим КРР. Можна зробити висновок, що споживання води, насиченої молекулярним воднем, тваринами з КРР знижує ступінь деструкції протеїнів в організмі, що, очевидно, вказує і на менш агресивний перебіг патологічного процесу.

Споживання водопровідної води впродовж 30 тижнів і потім ще протягом 30 днів після закінчення моделювання КРР (щури 4-ї групи) спричиняло підвищення вмісту карбонільних груп у сироватці крові до 6,4 нмоль/мг протеїну, що було на 9 % більше, ніж у тварин 2-ї групи (5,8 нмоль/мг протеїну). Одержані дані вказують на те, що при утримуванні щурів на звичайній воді ще 30 днів після моделювання в них КРР спостерігалася тенденція до зростання вмісту карбонільних груп у сироватці крові. Це свідчить, з одного боку, про продовження розвитку КРР після завершення моделювання патології, а з іншого – про посилення його негативного впливу на окиснювальну модифікацію протеїнів.

Як показано на рисунку, вміст карбонільних груп у сироватці крові щурів 5-ї групи, які споживали водопровідну воду 30 тижнів упродовж моделювання КРР і насичену молекулярним воднем воду лише протягом 30 днів після моделювання КРР, був на 14 % меншим, ніж у тварин 4-ї групи, які споживали водопровідну воду. Ці результати ще раз підтверджують, що споживання води, насиченої молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, послаблює окиснювальну

модифікацію протеїнів, що проявляється зниженням вмісту карбонільних груп у сироватці крові тварин.

На сьогодні накопичено велику кількість даних, що стосуються вивчення механізмів окиснення протеїнів за умов фізіологічної норми і в патогенезі захворювань, у тому числі при раку [30–32]. Характер окиснювальної модифікації протеїнів залежить від типу АФК [33]. Відомо, що найбільш агресивний гідроксильний радикал найчастіше викликає агрегацію протеїнів, а в комбінації з O_2 або $O^{\cdot-}$ – ще й їх фрагментацію. У першому випадку утворюються ковалентно зв'язані протеїнові агрегати у вигляді високомолекулярних форм – димерів, тримерів і навіть тетрамерів. Під дією АФК руйнується триптофан і утворюється бітирозин-фенол [1].

Окиснювальний стрес, який виникає при КРР, найімовірніше, спричиняє зростання рівня агресивного гідроксильного радикала [10, 26]. У сироватці крові щурів 3-ї і 5-ї груп з КРР, які споживали воду, насичену молекулярним воднем, зафіксовано менший вміст карбонільних груп порівняно з тваринами 2-ї та 4-ї груп з КРР, які споживали звичайну воду. При цьому в сироватці крові щурів 3-ї групи, які споживали воду, насичену молекулярним воднем, упродовж 30 тижнів, вміст карбонільних груп був найнижчим. Молекулярний водень є селективним антиоксидантом щодо АФК, у тому числі й гідроксильного радикала. Зниження рівня АФК супроводжується зменшенням окиснювального ушкодження протеїнів, у результаті чого знижується вміст карбонільних груп у сироватці крові. Тому споживання щурами з КРР води, насиченої молекулярним воднем, призводить до зменшення вмісту карбонільних груп у сироватці крові порівняно з інтактними тваринами.

ВИСНОВКИ. 1. Моделювання колоректального раку шляхом підшкірного введення щурам 1,2-диметилгідразину в дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів призводить до збільшення вмісту карбонільних груп у сироватці крові порівняно з інтактними тваринами.

2. Споживання тваринами з колоректальним раком води, насиченої молекулярним воднем, спричиняє достовірне зниження вмісту карбонільних груп у сироватці крові, що свідчить про антиоксидантний ефект збагаченої воднем води.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Colorectal cancer statistics, 2020 / R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Goding Sauer [et al.] // *CA: Cancer Journal for Clinicians*. – 2020 – **70** (3). – P. 145–164. DOI: 10.3322/caac.21601.
2. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – **71**. – P. 209–249.
3. Ayla O. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress; Sivakumar Joghi Thatha / O. Ayla, O. Metin // *Intech Open: Rijeka – Croatia*. – 2015. – P. 3.
4. Basak D. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC) / D. Basak, M. N. Uddin, J. Hancock // *Cancers*. – 2020. – **12**. – P. 3336.
5. Blood markers of oxidative stress are strongly associated with poorer prognosis in colorectal cancer patients / D. Boakye, L. Jansen, B. Schottker [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2020. – **147**. – P. 2373–2386.
6. Liou G. Y. Reactive oxygen species in cancer / G. Y. Liou, P. Storz // *Free Radic. Res.* – 2010. – **44**. – P. 479–496. DOI: 10.3109/10715761003667554.
7. Sreevalsan S. Reactive oxygen species and colorectal cancer / S. Sreevalsan, S. Safe // *Current Colorectal Cancer Reports*. – 2013. – **9** (4). – 350–357. DOI: 10.1007/s11888-013-0190-5.
8. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / Isabella Dalle-Donne, Ranieri Rossi, Aldo Milzani, Roberto Colombo // *Clinica Chimica Acta*. – 2003 – **329**. – Iss. 1–2. – P. 23–38. DOI: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2.
9. The state of pro- and antioxidant systems in rats with DMH-induced colon carcinogenesis on the background of extracorporeal detoxification / O. Kachur, L. Fira, P. Lykhatskyi [et al.] // *Pharmacia*. – 2021. – **68** (4). – P. 941–946.
10. Mitsugu Akagawa. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches // *Free Radical Research* – **55**, Issue 4 (2021). – P. 307–320. DOI: 10.1080/10715762.2020.1851027.
11. Preventive and therapeutic application of molecular hydrogen in situations with excessive production of free radicals / J. Slezák, B. Kura, K. Frimmel [et al.] // *Physiol. Res.* – 2016. – **65** (Suppl. 1). – P. 11–28. DOI: 10.33549/physiolres.933414.
12. Effects of Molecular Hydrogen in the Pathophysiology and Management of Cardiovascular and Metabolic Diseases / Ram B. Singh, Zuzana Sumbalova, Ghizal Fatima [et al.] // *Rev. Cardiovasc. Med.* – 2024. – **25** (1). – P. 33. DOI: 10.31083/j.rcm2501033.
13. Xiao L. Hydrogen-rich water achieves cytoprotection from oxidative stress injury in human gingival fibroblasts in culture or 3D-tissue equivalents, and wound-healing promotion, together with ROS-scavenging and relief from glutathione diminishment / L. Xiao, N. Miwa // *Hum Cell*. – 2017. – **30** (2) – P. 72–87. DOI: 10.1007/s13577-016-0150-x.
14. Покотило О. С. Ефекти біологічної дії молекулярного водню / О. С. Покотило, О. О. Покотило, М. М. Корда // *Мед. та клініч. хімія*. – 2023. – **25**, № 2 (96). – С. 102–121. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13980.
15. Покотило О. С. Роль молекулярного водню та оксиду азоту в патогенезі COVID-19 / О. С. Покотило, М. М. Корда, Ю. С. Кравчук // *Мед. та клініч. хімія*. – 2021. – **23**, № 1 (87). – С. 93–100. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2021.i1.12119.
16. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals / I. Ohsawa, M. Ishikawa, K. Takahashi [et al.] // *Nat. Med.* – 2007. – **13**. – P. 688–694.
17. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer / J. Runtuwene, H. Amitani, M. Amitani // *Peer J*. – 2015. – **3** e859. DOI: 10.7717/peerj.859.
18. Protective effect of hydrogen-rich water on liver function of colorectal cancer patients treated with mFOLFOX6 chemotherapy / Q. Yang, G. Ji, R. Pan [et al.] // *Mol. Clin. Oncol.* – 2017. – **7**. – P. 891–896. DOI: 10.3892/mco.2017.1409.
19. Perse M. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats / M. Perse, A. Cerar // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2011. – Article ID 473964 – 14 p. DOI: 10.1155/2011/473964.
20. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg – 1986. – 53 p.
21. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265–275.
22. De-Souza A. S. C. Animal models for colorectal cancer / A. S. C. De-Souza, T. A. Costa-Casagrande // *Arq. Bras. Cir. Dig.* – 2018. – **31**. – 1369.
23. Shen Luo, Nancy B. Wehr. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay // *Redox Report* – 2013 – **14**, Issue 4 (2009). – P. 159–166. DOI: 10.1179/135100009X392601.
24. Okeh U. Statistical problems in medical research / U. Okeh // *East Afr. J. Public Health*. – 2009. – No. 6 (1). – P. 1–7.
25. Corpet D. E. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men / D. E. Corpet, F. Pierre // *Eur. J. Cancer*. – 2005. – **41**. – P. 1911–1922.
26. Hennie Marie Johnsen, Marianne Hiorth, Jo Klaveness. Molecular Hydrogen Therapy – A Review on Clinical Studies and Outcomes // *Molecules* – 2023. – **28** (23). – 7785. DOI: 10.3390/molecules28237785.
27. Sun Q. Biological safety of hydrogen / Q. Sun, W. Han, A. Nakao // *Hydrogen Molecular Biology and Medicine*; Springer: Dordrecht, The Netherlands. – 2015. – P. 35–48.
28. Hydrogen gas inhibits lung cancer progression through targeting SMC3 / D. Wang, L. Wang, Y. Zhang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – **104**. – P. 788–797.
29. Zhang J. H. Emerging mechanisms and novel applications of hydrogen gas therapy / J. H. Zhang, N. Matei, R. Camara // *Med. Gas Res.* – 2018. – **8**. – P. 98–102.
30. Mitsugu Akagawa. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches // *Free Radical Research* – **55**,

Issue 4 (2021) – P. 307–320. DOI: 10.1080/10715762.2020.1851027.

31. Thomas Nyström. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence // *The EMBO Journal*. – 2005. – **24**. – P. 1311–1317. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600599.

32. Young Rim Song, Jwa-Kyung Kim, Hyung-Seok Lee, Sung Gyun Kim, Eun-Kyoung Choi. Serum levels

of protein carbonyl, a marker of oxidative stress, are associated with overhydration, sarcopenia and mortality in hemodialysis patients // *BMC Nephrology*. – **21**, 21. – 281. – 2020. – P. 2–11.

33. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins // *Methods in Enzymology*. – **233**. – 1994. – P. 346–357. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33040-9.

REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Goding Sauer A. (2020). Colorectal cancer statistics, *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 70(3), 145-164. DOI: 10.3322/caac.21601

2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021). Global Cancer Statistics: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.*, 71, 209-249.

3. Ayla O., Metin O. (2015). Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress; Sivakumar Joghi Thatha. *Intech Open: Rijeka* – Croatia.

4. Basak D., Uddin M.N., Hancock J. (2020). The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). *Cancers*, 12.

5. Boakye D., Jansen L., Schotker B. (2020). Blood markers of oxidative stress are strongly associated with poorer prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*, 147, 2373-2386.

6. Liou G.Y., Storz P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.*, 44, 479-496. DOI: 10.3109/10715761003667554

7. Sreevalsan, S., Safe, S. (2013). Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*, 9 (4), 350-357. DOI: 10.1007/s11888-013-0190-5

8. Isabella Dalle-Donne, Ranieri Rossi, Daniela Giustarini, Aldo Milzani, Roberto Colombo. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. – **329**. – Iss. 1–2, 23-38. DOI: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2

9. Kachur, O., Fira, L., Lykhatskyi, P., Fira, D., Stechyshyn, I. (2021). The state of pro- and antioxidant systems in rats with DMH-induced colon carcinogenesis on the background of extracorporeal detoxification. *Pharmacia*, 68(4), 941-946.

10. Mitsugu Akagawa. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*, 55 (4), 307-320. DOI: 10.1080/10715762.2020.1851027

11. Slezák, J., Kura, B., Frimmel, K. (2016). Preventive and therapeutic application of molecular hydrogen in situations with excessive production of free radicals. *Physiol. Res.*, 65 (Suppl.1), 11-28. DOI: 10.33549/physiolres.933414

12. Ram B. Singh, Zuzana Sumbalova, Ghizal Fatima, Viliam Mojto, Jan Fedacko, Alex Tarnava, Oleg Pokotylo, Anna Gvozdzjakova, Kristina Ferenczyova, Jana Vlkovicova, Branislav Kura, Barbora Kalocayova, Pavol Zenuch, Jan Slezak. (2024). Effects of Molecular

Hydrogen in the Pathophysiology and Management of Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Rev. Cardiovasc. Med.* 25(1), 33. DOI: 10.31083/j.rcm2501033

13. Xiao L., Miwa N. (2017). Hydrogen-rich water achieves cytoprotection from oxidative stress injury in human gingival fibroblasts in culture or 3D-tissue equivalents, and wound-healing promotion, together with ROS-scavenging and relief from glutathione diminishment. *Hum. Cell*, 30 (2), 72-87. DOI: 10.1007/s13577-016-0150-x

14. Pokotylo, O.S., Pokotylo, O.O., Korda, M.M. (2023). Effects of biological action of molecular hydrogen. *Medychna ta klinichna khimiia*, 25, No. 2, 102-121.

15. Pokotylo O. S., Korda M. M., Kravchuk Yu. S. (2021). The role of molecular hydrogen and nitric oxide in the pathogenesis of COVID-19. *Medychna ta klinichna khimiia*, (1), 93-100. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2021.i1.12119

16. Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.*, 13, 688-694.

17. Runtuwene J., Amitani H., Amitani M., Asakawa A., Cheng K.C., Inui A. (2015). Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. *Peer J.*, 3 e859. DOI: 10.7717/peerj.859

18. Yang Q., Ji G., Pan R., Zhao Y., Yan P. (2017). Protective effect of hydrogen-rich water on liver function of colorectal cancer patients treated with mFOLFOX6 chemotherapy. *Mol. Clin. Oncol.*, 7, 891-896. DOI: 10.3892/mco.2017.1409

19. Perse, M., Cerar, A. (2011). Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J. Biomed. Biotechnol.* Article ID 473964 – 14 pages. DOI: 10.1155/2011/473964

20. (1986). European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg.

21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

22. De-Souza, A.S.C., Costa-Casagrande, T.A. (2018). Animal models for colorectal cancer. *Arq. Bras. Cir. Dig.*, 31, 1369.

23. Shen Luo, Nancy B. Wehr. (2009). Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report.*, 14 (4), 159-166 DOI: 10.1179/135100009X392601

24. Okeh, U. (2009). Statistical problems in medical research. *East Afr. J. Public Health*. 6 (1), 1-7.
25. Corpet, D.E., Pierre, F. (2005). How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. *Eur. J. Cancer*. 41, 1911-1922.
26. Hennie Marie Johnsen, Marianne Hiorth, Jo Klaveness. (2023). Molecular Hydrogen Therapy – A Review on Clinical Studies and Outcomes. *Molecules* 28(23),7785. DOI: 10.3390/molecules28237785
27. Sun Q., Han W., Nakao A. (2015). Biological safety of hydrogen. *Hydrogen Molecular Biology and Medicine; Springer: Dordrecht, The Netherlands*, 35-48.
28. Wang D., Wang L., Zhang Y., Zhao Y., Chen G. (2018). Hydrogen gas inhibits lung cancer progression through targeting SMC3. *Biomed. Pharmacother.*, 104, 788-797.
29. Zhang, J.H., Matei, N., Camara, R. (2018). Emerging mechanisms and novel applications of hydrogen gas therapy. *Med. Gas Res.*, 8, 98-102.
30. Mitsugu Akagawa. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*, 55(4), 307-320. DOI: 10.1080/10715762.2020.1851027
31. Thomas Nyström. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal*, 24, 1311-1317. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600599
32. Young Rim Song, Jwa-Kyung Kim, Hyung-Seok Lee, Sung Gyun Kim, Eun-Kyoung Choi. (2020). Serum levels of protein carbonyl, a marker of oxidative stress, are associated with overhydration, sarcopenia and mortality in hemodialysis patients. *BMC Nephrology*. 21(21), 281, 2-11.
33. Rodney L. Levine, Joy A. Williams, Earl P. Stadtman, Emily Shacter. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 233, 346-357. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33040-9

Отримано 02.02.2024

Адреса для листування: О. С. Покотило, Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: pokotylo_oleg@ukr.net.

O. O. Pokotylo¹, O. S. Pokotylo², M. M. Korda¹

¹I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

²TERNOPIL IVAN PULIUI NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY

THE EFFECT OF MOLECULAR HYDROGEN ON OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN COLORECTAL CANCER IN THE EXPERIMENT

Summary

Introduction. An important role in the pathogenesis of the development of colorectal cancer is played by oxidative stress or imbalance of prooxidant/antioxidant homeostasis, which leads to oxidative modification of proteins and enhanced formation of protein carbonyl groups. The presence of oxidative stress in colorectal cancer requires effective antioxidant therapy. In recent years, there has been a growing interest in the study of molecular hydrogen as an inert gas that effectively exhibits an antioxidant effect.

The aim of the study – to investigate the effect of water saturated with molecular hydrogen on the content of carbonyl derivatives of oxidatively modified proteins in the blood serum of white rats with colorectal cancer.

Research Methods. Experiments were conducted on 50 male Wistar white rats. Colorectal cancer (CRC) was simulated in animals by subcutaneous injection of 1,2-dimethylhydrazine at a dose of 7.2 mg/kg of body weight once a week for 30 weeks. Rats consumed water saturated with molecular hydrogen at a concentration of 0.6 ppm *ad libitum*. Animals were euthanized under thiopental anesthesia. Blood serum was used for the study, in which the content of carbonyl groups was determined by the colorimetric method. Statistical data processing was performed using the SPSS22 software package.

Results and Discussion. It was established that the modeling of colorectal cancer led to an increase in the content of carbonyl groups in the blood serum of rats by 1.93 times compared to intact animals. The content of carbonyl groups in the blood serum of rats with colorectal cancer that consumed water saturated with molecular hydrogen for 30 weeks in parallel with the administration of 1,2-dimethylhydrazine was 1.29 times lower than in animals with colorectal cancer that consumed ordinary water. Consumption of water saturated with molecular hydrogen for 30 days after modeling colorectal cancer in white rats also led to a decrease in the content of carbonyl groups in their blood serum.

Conclusions. The use of water saturated with molecular hydrogen is an effective method of reducing oxidative stress in rats with colorectal cancer.

KEY WORDS: molecular hydrogen; hydrogen water; oxidative stress; colorectal cancer; antioxidants.