

РІВЕНЬ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМУ РАКУ ЗА ВПЛИВУ 5-ФТОРУРАЦИЛУ І МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ

Вступ. Відновлений глутатіон відіграє дуже важливу роль у підтримці клітинного гомеостазу й окиснювально-відновного балансу, будучи важливим елементом внутрішньоклітинного захисту від активних форм кисню. Зменшення його вмісту нижче критичного порога вважають маркером окиснювального стресу, який лежить в основі патофізіології різноманітних дегенеративних захворювань, включаючи канцерогенез. При цьому є неоднозначні результати щодо взаємодії ксенобіотиків хіміотерапії з відновленим глутатіоном. Наявність окиснювального стресу при колоректальному раку потребує ефективної антиоксидантної терапії, а доведено, що молекулярний водень ефективно проявляє антиоксидантну дію.

Мета дослідження – оцінити вплив води, насиченої молекулярним воднем, і 5-фторурацилу на вміст відновленого глутатіону в сироватці крові білих щурів з колоректальним раком.

Методи дослідження. Досліди проведено на 70 білих щурах-самцях 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. 5-фторурацил вводили внутрішньочеревно 4 дні по 12 мг/кг і ще 4 дні через день по 6 мг/кг. Тварини споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ррт, ad libitum. Евтаназію щурів проводили під тіопенталовим наркозом. Для дослідження використовували сироватку крові, в якій колориметричним методом визначали вміст відновленого глутатіону. Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета програмного забезпечення SPSS22.

Результати й обговорення. Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів, які споживали водопровідну воду 30 тижнів упродовж моделювання КРР і насичену молекулярним воднем лише протягом 30 днів після моделювання КРР, був на 10 % більшим, ніж у тварин з КРР, які не споживали водневої води. У сироватці крові щурів з КРР, яким вводили 5-фторурацил, вміст відновленого глутатіону в кінці експерименту становив 0,85 ммоль/г протеїну, що на 32 % менше, ніж у тварин 1-ї (контрольної) групи, і на 22 %, ніж у щурів, які споживали водневу воду 30 днів після моделювання КРР. У сироватці крові щурів з КРР, яким вводили 5-фторурацил та які споживали воду, збагачену молекулярним воднем, 30 днів після моделювання КРР, він становив 1,02 ммоль/г протеїну, що на 10 % більше ($p \leq 0,05$), ніж у тварин з КРР, і на 17 %, ніж у щурів, яким вводили 5-фторурацил та які не споживали води, насиченої молекулярним воднем.

Висновки. Моделювання у щурів колоректального раку та застосування 5-фторурацилу призводять до зменшення вмісту відновленого глутатіону в сироватці їх крові, а споживання при цьому води, насиченої молекулярним воднем, сприяє достовірному збільшенню в них рівня цього антиоксиданта.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: колоректальний рак; молекулярний водень; воднева вода; відновлений глутатіон.

ВСТУП. За даними Глобальної онкологічної обсерваторії Всесвітньої організації охорони здоров'я (GLOBOCAN), у всьому світі колоректальний рак (КРР) є третім за частотою діагностування раком у чоловіків і другим – у жінок [1, 2]. Рівні захворюваності та смертності в усьому світі значно відрізняються. Незважаючи на те, що за останні 20 років виживаність пацієнтів з КРР подвоїлася, частково завдяки загальному застосуванню хіміотерапії та зниженню післяхірургічної смертності, у 2020 р. було діагностовано близько 1,93 мільйона нових випадків і майже 1 мільйон смертей від цього раку [3, 4].

© О. О. Покотило, М. М. Корда, 2024.

Важливу роль у поширенні та прогресуванні колоректального раку відіграють окиснювальний стрес і запальна реакція [5]. За умов ушкодження клітин спостерігають підвищене продукування активних форм кисню (АФК), незважаючи на їх нормальний вміст у здорових клітинах [6]. Насправді фізіологічний рівень АФК впливає на основні сигнальні шляхи, і це життєво важливо для виживання клітин. Навпаки, надмірний рівень АФК спричиняє ушкодження клітин шляхом окиснення протеїнів, ліпідів і нуклеїнових кислот, що призводить до різних патологічних станів, таких, як неврологічні захворювання, гіпертензія, діабет, атеросклероз, серцева недостатність, хронічна

хвороба нирок та канцерогенез [7]. Як наслідок для відновлення окиснювально-відновного гомеостазу необхідні адаптаційні реакції, наприклад синтез відновленого глутатіону (GSH) [5]. Проте GSH також бере участь у катаболізмі токсинів, ксенобіотиків і ліків, регуляції імунітету [8].

Окиснювальний стрес уже давно пов'язаний з розвитком і прогресуванням раку [9], є припущення, що лікування антиоксидантами може забезпечити захист від раку [10]. З іншого боку, прооксидантну терапію, включаючи іонізуюче випромінювання та хіміотерапевтичні засоби, широко використовують у клініках з огляду на те, що додатковий окиснювальний стимул при конститутивному окиснювальному стресі в пухлинних клітинах повинен фактично викликати колапс антиоксидантних систем, що призводить до загибелі клітин [11]. Однак цей останній підхід дав незадовільні результати: багато первинних пухлин надлишково синтезують антиоксидантні ензими на дуже високих рівнях, що зумовлює стійкість ракових клітин до доз ліків [12].

Підвищений рівень GSH спостерігають при різних типах пухлин, і це робить окремі тканини стійкішими до хіміотерапії [13]. Крім того, вміст GSH у деяких пухлинних клітинах зазвичай зумовлений вищою активністю пов'язаних із GSH ензимів, таких, як γ -глутамілцистеїнілаза (GCL) і γ -глутаміл-транспептидаза (GGT), а також більшою експресією GSH-транспортування експортних насосів [13]. Тому система GSH привернула нашу увагу як можлива мішень для медичного втручання проти прогресування раку та хіміорезистентності.

Трипептид L- γ -глутаміл-цистеїніл-гліцин, або глутатіон, наявний у всіх тканинах ссавців у концентрації 1–10 мМ та існує у відновленій тиолі (GSH) і дисульфідно-окисненій (GSSG) формах [14]. GSH є переважною формою, на яку припадає >98 % загального глутатіону [15]. У відновленому стані GSH – найпоширеніший небілковий сульфгідрил у клітині (від 0,1 до 10,0 мМ), і він відіграє дуже важливу роль у підтримці клітинного гомеостазу й окиснювально-відновного балансу, будучи важливим елементом внутрішньоклітинного захисту від АФК. Зменшення вмісту GSH нижче критичного порога вважають маркером окиснювального стресу, який лежить в основі патофізіології різноманітних вікових дегенеративних захворювань, включаючи запальні та пухлинні процеси [16, 17].

Відомо, що 5-фторурацил (5-ФУ) використовують для лікування різних видів раку, проте найкращий вплив і ступінь виживання спостерігали при колоректальному раку [18, 19]. Наявність окиснювального стресу при колоректальному раку потребує ефективної антиоксидантної

терапії. На сьогодні зростає кількість досліджень щодо впливу молекулярного водню (H_2) при раку через його антиоксидантну і протизапальну [20, 21] та потенційну протипухлинну дію [22], у тому числі й під час хіміотерапії [23].

Мета дослідження – оцінити вплив води, насиченої молекулярним воднем, і 5-фторурацилу на вміст відновленого глутатіону в сироватці крові білих щурів з колоректальним раком.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили в Центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України (ТНМУ). Для експерименту використано 70 білих щурів-самців лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію ТНМУ і поділили на сім груп по десять тварин у кожній: 1-ша – контрольна (щери цієї групи споживали водопровідну воду впродовж 30 тижнів); 2-га – тварини, яким моделювали КРР шляхом підшкірного введення 1,2-диметилгідразину (ДМГ) у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів [24] (щери цієї групи мали доступ до звичайної водопровідної води протягом 30 тижнів); 3-тя – тварини, 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, протягом тих же 30 тижнів; 4-та – щури з КРР, який моделювали шляхом підшкірного введення ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів, які споживали водопровідну воду впродовж тих же 30 тижнів і потім ще протягом 30 днів після закінчення моделювання КРР; 5-та – тварини з КРР, який моделювали шляхом підшкірного введення ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів, які споживали водопровідну воду впродовж тих же 30 тижнів, а потім воду, збагачену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, протягом 30 днів; 6-та – щури з КРР, який моделювали впродовж 30 тижнів, потім їм вводили 5-ФУ внутрішньочеревно 4 дні по 12 мг/кг і ще 4 дні через день по 6 мг/кг [25], ще 11 днів вони були в експерименті без додаткових втручань (тварини цієї групи споживали водопровідну воду протягом усього експерименту); 7-ма – щури з КРР, який моделювали впродовж 30 тижнів, потім їм вводили 5-ФУ внутрішньочеревно 4 дні по 12 мг/кг і ще 4 дні через день по 6 мг/кг, ще 11 днів вони були в експерименті без додаткових втручань (тварини цієї групи споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, протягом 30 днів після моделювання КРР).

Тварини під час експерименту мали доступ до звичайної води і води, насиченої молекулярним воднем, *ad libitum*. Воду, збагачену 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 ставили у клітки з тваринами. Вміст молекулярного водню визначали сертифікованим H_2 -метром ENH-100 (“Amtast”, США). Поїлки замінювали кожних 2 дні для всіх груп тварин.

Утримували щурів і проводили експеримент на них відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [26]. Щурів виводили з експерименту шляхом евтаназії під тиопенталовим наркозом. Кров забирали із серця тварин, центрифугували її при частоті обертання 1100 g упродовж 30 хв. Для дослідження використовували сироватку крові, в якій визначали вміст відновленого глутатіону [27].

Для підтвердження KPP проводили гістологічне дослідження товстої кишки щурів. З метою ідентифікації аберантних вогнищ крипт товсту кишку тварин 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. Вирізали ділянки, інтенсивно профарбовані барвником, та здійснювали подальшу обробку тканин у гістопроекторі LOGOSone (“Milestone”, Італія). Парафінові зрізи товстої кишки товщиною 5 мкм фарбували гематоксилином 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 SPSS-22 [28]. 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. Зміни вмісту GSH лежать в основі патогенезу багатьох захворювань людини, включаючи рак. На сьогодні відомо, що GSH, з одного боку, відіграє захисну роль на початку появи раку, а з іншого – бере участь у його прогресуванні та подальшій резистентності до хіміотерапії. Підвищений рівень GSH збільшує антиоксидантну здатність і стійкість до окиснювального стресу, як це спо-

стерігають у багатьох ракових клітинах на початку онкогенезу. Тоді як знижений рівень GSH зумовлює збільшення сприйнятливості організму до окиснювального стресу, пов'язаного з прогресуванням раку.

У цьому дослідженні ми встановили, що у сироватці крові тварин з ДМГ-індукованим канцерогенезом товстої кишки в кінці експерименту зростає вміст відновленого глутатіону. Ми вибрали ДМГ, який використовують для хімічно індукованого канцерогенезу товстої кишки в білих щурів. Встановлено, що ДМГ є найефективнішим для експериментального канцерогенезу з точки зору пізніх стадій аденом і карцином [24]. Пухлини, які утворюються при моделюванні колоректального раку за допомогою ДМГ у щурів, відповідають ідентичній локалізації та патологічним змінам, характерним для спорадичного раку товстої кишки людини [29].

Результати гістологічного дослідження стінки товстої кишки тварин, яким вводили ДМГ, показали зміни у тканинах, характерні для цього канцерогенезу, такі, як: цитологічна атипія, базальні ядра з конденсацією хроматину навколо ядерної оболонки, гіперхромні ядра, неоднорідність ядерної стратифікації і втрата полярності [30]. Це свідчить про наявність аденокарциноми, яка розвинулась у товстій кишці піддослідних щурів під дією ДМГ.

При дослідженні сироватки крові білих щурів з колоректальним раком за різних умов експерименту встановлено зміни вмісту відновленого глутатіону в тварин різних груп. Результати дослідження показано на рисунку.

Як видно з даних, наведених на рисунку, вміст GSH у щурів 2-ї групи з KPP становив 0,92 ммоль/г протеїну, що на 26,4 % менше, ніж у тварин інтактної групи ($p \leq 0,05$). Отримані результати вказують на те, що підшкірне введення білим щурам ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів призводило до розвитку і прогресування канцерогенезу товстої кишки, при якому знижувалося функціонування антиоксидантної системи. Це засвідчує достовірне зменшення вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові тварин з KPP, яке можна пояснити підвищеним окиснювальним стресом у ракових клітинах, що спричиняє виснаження GSH [31].

Відомо, що молекулярний водень використовують у клінічних і експериментальних дослідженнях як антиоксидант, який знешкоджує агресивні вільні радикали і водночас активує антиоксидантну систему [20, 21]. Тому молекулярний водень як засіб корекції окиснювального стресу у тварин з KPP застосовували шляхом споживання ними води, насиченої молекулярним

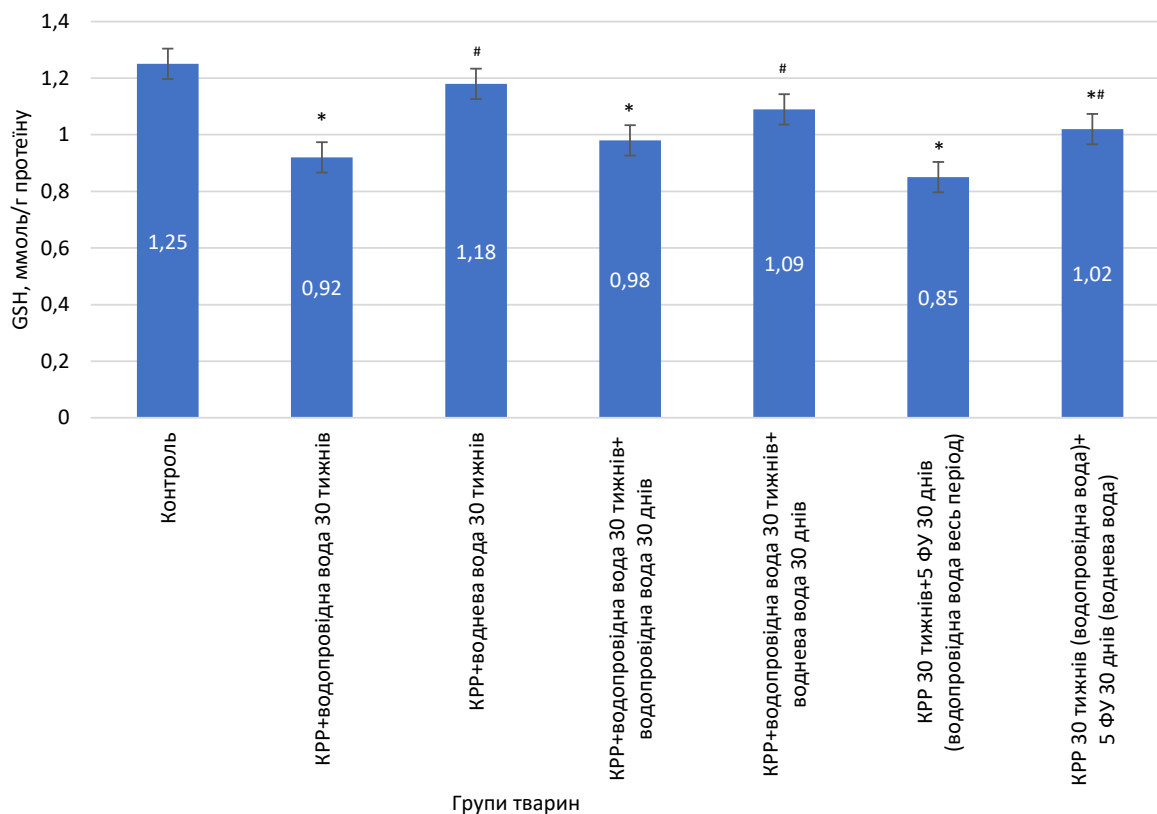


Рис. Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові білих щурів з колоректальним раком, ммоль/г протеїну ($M \pm m$, $n=10$).

Примітки:

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

воднем у різних варіантах. Так, вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів 3-ї групи з КРР, які споживали воду, збагачену молекулярним воднем, упродовж 30 тижнів паралельно із введенням ДМГ, становив 1,18 ммоль/г протеїну, що на 22 % більше, ніж у тварин 2-ї групи з КРР, які споживали водопровідну воду. Отримані дані свідчать про здатність насиченої воднем води впливати на антиоксидантну систему і збільшувати вміст відновленого глутатіону у тварин з експериментально модельованим КРР. Це можна також пояснити результатами клінічних і експериментальних досліджень про антиоксидантну роль молекулярного водню при різних патологічних станах, у тому числі й при раку [32, 33]. При онкологічному процесі збільшується кількість різних активних форм кисню, серед яких найбільш небезпечним і агресивним є гідроксильний радикал (ОН) [34, 35]. З іншого боку, встановлено, що молекулярний водень взаємодіє з гідроксильним радикалом і нейтралізує його [36].

Як показано на рисунку, в сироватці крові щурів 4-ї групи, які споживали водопровідну воду впродовж 30 тижнів і потім ще протягом 30 днів після закінчення моделювання КРР, вміст GSH становив 0,98 ммоль/г протеїну, що було на

21,4 % менше, ніж у тварин 1-ї (контрольної) групи, і наближалось до такого показника у щурів 2-ї групи з КРР.

Вміст GSH у сироватці крові щурів 5-ї дослідної групи, які споживали водопровідну воду 30 тижнів упродовж моделювання КРР і насичену молекулярним воднем лише протягом 30 днів після моделювання КРР, був на 10 % вищим, ніж у тварин 4-ї групи, та на 15,6 %, ніж у щурів 2-ї групи. Ці результати показують, що споживання тваринами води, насиченої молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, упродовж 30 днів після моделювання КРР активує їх антиоксидантну систему, що проявляється збільшенням вмісту GSH у сироватці крові.

У сироватці крові щурів 6-ї групи з КРР, яким вводили 5-ФУ, вміст GSH у кінці експерименту становив 0,85 ммоль/г протеїну, що на 32 % менше, ніж у тварин 1-ї (контрольної) групи, та на 22 %, ніж у щурів 5-ї групи, які споживали водневу воду 30 днів після моделювання КРР.

Отримані результати свідчать про те, що введення білим щурам з КРР 5-ФУ призводить до вираженого негативного впливу на їх антиоксидантну систему, який проявляється зменшенням вмісту GSH у сироватці крові. 5-Фтор-

урацил належить до найбезпечніших хіміотерапевтичних засобів, що спричиняє певні побічні й токсичні ефекти, такі, як активація пероксидного окиснення ліпідів, зниження рівня антиоксидантів [37].

У ракових клітинах окиснювальний стрес особливо підвищений, а зменшення вмісту GSH може зробити їх чутливішими до хіміотерапії [31]. Фактично, коли рівень АФК стратегічно збільшений, терапія раку показує кращі результати. Тому однією з терапевтичних стратегій при раку слід вважати виснаження клітинних антиоксидантних систем, в яких GSH має вирішальне значення у клітинній детоксикації, антиоксидантній захисті, підтримці тіолового статусу і модуляції клітинної проліферації [38].

Інший ефект зменшення вмісту GSH при раку може бути пов'язаний з його дією на протипухлинні препарати. Збільшення експресії відновленого глутатіону пов'язане з резистентністю до ліків. Встановлено кон'югацію GSH із різними речовинами, включаючи деякі хіміотерапевтичні препарати, такі, як хлорамбуцил, цисплатин [39]. Кон'югація GSH із ксенобіотиками, в тому числі протипухлинними препаратами, дійсно може спричинити подвійний ефект: з одного боку, ксенобіотики можуть втратити свою шкідливу дію [40], а з іншого – кон'югація GSH може посилити їх токсичність, викликаючи їх біоактивацію [41]. Встановлене достовірне зменшення вмісту GSH у сироватці крові білих щурів з КРР, яким вводили 5-ФУ, можливо, додатково спричинене і кон'югацією GSH з 5-ФУ. Для отримання остаточної відповіді необхідно провести додаткові дослідження.

Комбінований вплив 5-ФУ та молекулярного водню на вміст GSH у сироватці крові білих щурів досліджували у тварин 7-ї групи. Так, у сироватці крові щурів 7-ї групи з КРР, яким вводили 5-ФУ та які споживали воду, збагачену молекулярним воднем, 30 днів після моделювання КРР, він становив 1,02 ммоль/г протеїну. Цей показник на 10 % вищий ($p \leq 0,05$), ніж у тварин 2-ї групи з КРР, і на 17 %, ніж у щурів 6-ї групи, яким вводили 5-ФУ та які не споживали води, насиченої молекулярним воднем.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що споживання води, насиченої молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, тваринами з КРР, яким вводили 5-ФУ, зменшує оксидативний стрес в їх організмі, що проявляється збільшенням вмісту GSH у сироватці крові цих щурів.

ВИСНОВКИ. 1. Моделювання колоректального раку шляхом підшкірного введення білим щурам 1,2-диметилгідразину в дозі 7,2 мг/кг маси

тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів призводило до зменшення вмісту відновленого глутатіону в сироватці їх крові на 26,4 % порівняно з інтактними тваринами.

2. Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів 3-ї групи з колоректальним раком, які споживали воду, насичену молекулярним воднем, упродовж 30 тижнів паралельно із введенням 1,2-диметилгідразину, становив 1,18 ммоль/г протеїну, що на 22 % більше, ніж у тварин 2-ї групи з колоректальним раком, які споживали водопровідну воду.

3. При споживанні щурами 4-ї групи водопровідної води впродовж 30 тижнів і потім ще протягом 30 днів після закінчення моделювання колоректального раку вміст відновленого глутатіону в сироватці їх крові становив 0,98 ммоль/г протеїну, що на 21,4 % менше, ніж у тварин 1-ї (контрольної) групи, і наближалось до такого показника у щурів 2-ї групи з колоректальним раком.

4. Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів 5-ї групи, які споживали водопровідну воду 30 тижнів упродовж моделювання колоректального раку і насичену молекулярним воднем лише протягом 30 днів після моделювання колоректального раку, був на 10 % більшим, ніж у тварин 4-ї групи, та на 15,6 %, ніж у щурів 2-ї групи.

5. У сироватці крові щурів 6-ї групи з колоректальним раком, яким вводили 5-фторурацил, вміст відновленого глутатіону в кінці експерименту становив 0,85 ммоль/г протеїну, що на 32 % менше, ніж у тварин 1-ї (контрольної) групи, та на 22 %, ніж у щурів 5-ї групи, які споживали водневу воду 30 днів після моделювання колоректального раку.

6. Вміст відновленого глутатіону в сироватці крові щурів 7-ї групи з колоректальним раком, яким вводили 5-фторурацил та які споживали воду, збагачену молекулярним воднем, 30 днів після моделювання колоректального раку, становив 1,02 ммоль/г протеїну, що на 10 % більше ($p \leq 0,05$), ніж у тварин 2-ї групи з колоректальним раком, і на 17 %, ніж у щурів 6-ї групи, яким вводили 5-фторурацил та які не споживали води, насиченої молекулярним воднем.

Перспективи подальших досліджень. Встановлене достовірне зменшення вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові білих щурів з колоректальним раком, яким вводили 5-фторурацил, можливо, додатково спричинене і кон'югацією відновленого глутатіону з 5-фторурацилом. Тому подальші дослідження можуть бути направлені на розкриття цих механізмів та отримання остаточної відповіді.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Xi Y. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040 / Y. Xi, P. Xu // *Translational oncology*. – 2021. – **14**. – 10. – 101174.
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, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.
3. Neoadjuvant chemoradiotherapy for patients with unresectable radically locally advanced colon cancer: A potential improvement to overall survival and decrease to multivisceral resection / Y. Yuan, W. W. Xiao, W. H. Xie, [et al.] // *BMC Cancer*. – 2021. – **21**. – 179. DOI: 10.1186/s12885-021-07894-6.
4. Colorectal cancer prognosis twenty years later / L. Bujanda, C. Sarasqueta, E. Hijona [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – **16**. – P. 862–867. DOI: 10.3748/wjg.v16.i7.862.
5. Glutathione: Lights and Shadows in Cancer Patients Herbert Ryan Marini / Bianca Arianna Facchini, Raffaele di Francia [et al.] // *Biomedicines*. – 2023. – **11** (8). – 2226. DOI: 10.3390/biomedicines11082226.
6. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – **39**. – P. 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
7. Zaric B.L. Free Radicals Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic Applications / B. L. Zaric, M. T. Macvanin, E.R. Isenovic // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2023. – **154**. – 106346. DOI: 10.1016/j.biocel.2022.106346.
8. Role of Glutathionylation in Infection and Inflammation / P. Checconi, D. Limongi, S. Baldelli, M. R. Ciriolo, L. Nencioni, A.T. Palamara // *Nutrients*. – 2019. – **11**. – 1952. DOI: 10.3390/nu11081952.
9. Hussain S. P. Radical causes of cancer / S. P. Hussain, L. J. Hofseth, C.C. Harris // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – **3** (4). – P. 276–285.
10. Cabello C. M. Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer / C. M. Cabello, W. B. III Bair, G. T. Wondrak // *Current Opinion in Investigational Drugs*. – 2007. – **8** (12). – P. 1022–1037. 2-s2.0-36849034493.
11. Motexafin gadolinium and zinc induce oxidative stress responses and apoptosis in B-cell lymphoma lines / P. S. Lecane, M. W. Karaman, M. Sirisawad, L. Naumovski, R. A. Miller, J. G. Hacia, D. Magda // *Cancer Research*. – 2005. – **65** (24). – P. 11676–11688, 2-s2.0-292444453628, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2754.
12. Wang J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is a question / J. Wang, J. Yi // *Cancer Biology and Therapy*. – 2008. – **7**, No. 12. – P. 1875–1884, 2-s2.0-58149105356.
13. Estrela J. M., Glutathione in cancer biology and therapy / J. M. Estrela, A. Ortega, E. Obrador // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. – 2006. – **43**, No. 2. – P. 143–181, 2-s2.0-33744994567. DOI: 10.1080/10408360500523878.
14. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology & Medicine*. 5th ed. Oxford University Press; Oxford, UK: 2015.
15. Biomarkers of oxidative damage in human disease / I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani // *Clin. Chem.* – 2006. – **52**. – P. 601–623. DOI: 10.1373/clinchem.2005.061408.
16. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases / N. Ballatori, S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu, C. L. Hammond // *Biol. Chem.* – 2009. – **390**. – P. 191–214. DOI: 10.1515/BC.2009.033.
17. Singh S. Role of glutathione in cancer pathophysiology and therapeutic interventions / S. Singh, A. R. Kahn, A. K. Gupta // *J. Exp. Ther. Oncol.* – 2012. – **9**. – P. 303–316. PMID: 22545423.
18. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer / S. Afzal, S. A. Jensen, B. Vainer [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2009. – **20**. – P. 660–666.
19. Longley D. B. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies / D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – **3**. – P. 330–338. DOI: 10.1038/nrc1074.
20. Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases / S. Ohta // *Biochimica et Biophysica ACTA. General Subjects*. – 2012. – **1820**. – P. 586–594. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.05.006.
21. 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.
22. Protective effects of hydrogen gas inhalation on radiation-induced bone marrow damage in cancer patients: a retrospective observational study / S. I. Hirano, Y. Aoki, X. K. Li, N. Ichimaru, S. Takahara, Y. Takefuji // *Med. Gas. Res.* – 2021. – **11**. – P. 104–109.
23. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer / J. Runtuwene, H. Amitani, M. Amitani, A. Asakawa, K. C. Cheng, A. Inui // *Peer J.* – 2015. – **3**. – P. 859.
24. 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 – P. 1–14. DOI: 10.1155/2011/473964.
25. Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats / O. A. Kensara, A. G. El-Shemi, A. M. Mohamed, B. Refaat, S. Idris, J. Ahmad // *Drug. Des. Devel. Ther.* – 2016. – **11** (10). – P. 2239–2253. DOI: 10.2147/DDDT.S109721.
26. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg – 1986. – 53 p.
27. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / [В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін.] ; за ред. В. В. Влізла. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 761 с.
28. Okeh U. Statistical problems in medical research / U. Okeh // *East Afr. J. Public Health*. – 2009. – **6** (1). – P. 1–7.
29. 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.

30. Покотило О. С. Вплив молекулярного водню на окиснювальну модифікацію протеїнів при колоректальному раку в експерименті / О. О. Покотило, О. С. Покотило, М. М. Корда // Мед. та клініч. хімія. – 2024. – 26, № 1 (99). – С. 11–17.

31. Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy / H. Lv, C. Zhen, J. Liu, P. Yang, L. Hu, P. Shang // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2019. – 3150145. DOI: 10.1155/2019/3150145.

32. Johnsen H. M. Molecular Hydrogen Therapy – A Review on Clinical Studies and Outcomes / H. M. Johnsen, M. Hiorth, J. Klaveness // *Molecules.* – 2023. – 28 (23). – 7785. DOI: 10.3390/molecules28237785.

33. Sun Q. Biological safety of hydrogen. In: *Hydrogen Molecular Biology and Medicine* / Q. Sun, W. Han, A. Nakao // Springer: Dordrecht, The Netherlands. – 2015. – P. 35–48.

34. 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.

35. Boakye D. 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.

36. Slezák J. 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.

37. Murat Koçer. Effects of 5-fluorouracil on oxidative stress and calcium levels in the blood of patients with newly diagnosed colorectal cancer / Murat Koçer, Mustafa Nazıroğlu // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2013. – 155 (3). – P. 327–332. DOI: 10.1007/s12011-013-9795-4.

38. Application of Glutathione Depletion in Cancer Therapy Enhanced ROS-Based Therapy, Ferroptosis, and Chemotherapy / B. Niu, K. Liao, Y. Zhou, T. Wen, G. Quan, X. Pan, C. Wu // *Biomaterials.* – 2021. – 277. – 121110. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121110.

39. Glutathione S-transferase isozyme alpha 1 is predominantly involved in the cisplatin resistance of common types of solid cancer / M. Zou, X. Hu, B. Xu, T. Tong, Y. Jing, L. Xi, W. Zhou, J. Lu, X. Wang, X. Yang, [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2019. – 41. – P. 989–998. DOI: 10.3892/or.2018.6861.

40. Cooper A. J. L. Metabolism of Glutathione S-Conjugates Multiple Pathways. In: *Comprehensive Toxicology*. 3rd ed. / Cooper A. J. L., Hanigan M. H.; McQueen C. A., editor. – Oxford, UK: Elsevier Ltd., 2018. – P. 363–406.

41. Van Bladeren P. J. Glutathione Conjugation as a Bioactivation Reaction / P. J. Van Bladeren // *Chem. Biol. Interact.* – 2000. – 129. – P. 61–76. DOI: 10.1016/S0009-2797(00)00214-3.

REFERENCES

1. Xi, Y., & Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational oncology*, 14(10), 101174.

2. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.

3. Yuan, Y., Xiao, W.W., Xie, W.H., Cai, P.Q., Wang, Q.X., Chang, H., ... & Gao, Y.H. (2021). Neoadjuvant chemoradiotherapy for patients with unresectable radically locally advanced colon cancer: a potential improvement to overall survival and decrease to multivisceral resection. *BMC cancer*, 21, 1–13.

4. Bujanda, L., Sarasqueta, C., Hijona, E., Hijona, L., Cosme, A., Gil, I., ... & Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. (2010). Colorectal cancer prognosis twenty years later. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(7), 862.

5. Marini, H.R., Facchini, B.A., di Francia, R., Freni, J., Puzzolo, D., Montella, L., ... & Minutoli, L. (2023). Glutathione: Lights and shadows in cancer patients. *Biomedicine*, 11(8), 2226.

6. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44–84.

7. Zaric, B.L., Macvanin, M.T., & Isenovic, E.R. (2023). Free radicals: relationship to human diseases

and potential therapeutic applications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 154, 106346.

8. Checconi, P., Limongi, D., Baldelli, S., Ciriolo, M.R., Nencioni, L., & Palamara, A. T. (2019). Role of glutathionylation in infection and inflammation. *Nutrients*, 11(8), 1952.

9. Hussain, S.P., Hofseth, L.J., & Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 276–285.

10. Cabello, C.M., Bair 3rd, W.B., & Wondrak, G.T. (2007). Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 8(12), 1022–1037.

11. Lecane, P.S., Karaman, M.W., Sirisawad, M., Naumovski, L., Miller, R.A., Hacia, J.G., & Magda, D. (2005). Motexafin gadolinium and zinc induce oxidative stress responses and apoptosis in B-cell lymphoma lines. *Cancer research*, 65(24), 11676–11688.

12. Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer biology & therapy*, 7(12), 1875–1884.

13. Estrela, J.M., Ortega, A., & Obrador, E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 43(2), 143–181.

14. Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.

15. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), 601–623.

16. Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., & Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol. Chem.*, 390, 191-214.
17. Singh, S., Khan, A. R., & Gupta, A.K. (2012). Role of glutathione in cancer pathophysiology and therapeutic interventions. *J Exp Ther Oncol*, 9(4), 303-316.
18. Afzal, S., Jensen, S.A., Vainer, B., Vogel, U., Matsen, J.P., Sørensen, J.B., ... & Poulsen, H.E. (2009). MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Annals of oncology*, 20(10), 1660-1666.
19. Longley, D.B., Harkin, D.P., & Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*, 3(5), 330-338.
20. Ohta, S. (2012). Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(5), 586-594.
21. Pokotylo, O.O., Pokotylo, O.S., & Korda, M.M. (2023). Effects of biological action of molecular hydrogen. *Medical and Clinical Chemistry*, (2), 102-121 [in Ukrainian].
22. Hirano, S.I., Aoki, Y., Li, X.K., Ichimaru, N., Takahara, S., & Takefuji, Y. (2021). Protective effects of hydrogen gas inhalation on radiation-induced bone marrow damage in cancer patients: a retrospective observational study. *Medical Gas Research*, 11(3), 104-109.
23. Runtuwene, J., Amitani, H., Amitani, M., Asakawa, A., Cheng, K.C., & Inui, A. (2015). Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. *PeerJ*, 3, e859.
24. Perše, M., & Cerar, A. (2011). Morphological and molecular alterations in 1, 2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *BioMed Research International*, 2011(1), 473964.
25. Kensara, O.A., El-Shemi, A.G., Mohamed, A.M., Refaat, B., Idris, S., & Ahmad, J. (2016). Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats. *Drug design, development and therapy*, 2239-2253.
26. de l'Europe, C. (1986). European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes/Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques: [Strasbourg, 18. III. 1986]. Conseil de l'Europe Section des publications.
27. Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S. Ratych, I.B. (2012). *Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine. Handbook*. Lviv: Spolom [in Ukrainian].
28. Okeh, U.M. (2009). Statistical problems in medical research. *East African Journal of Public Health*, 6(1), 1-7.
29. De-Souza, A.S.C., & Costa-Casagrande, T.A. (2018). Animal models for colorectal cancer. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 31(02), e1369.
30. Pokotylo, O.O., Pokotylo, O.S., & Korda, M.M. (2024). The effect of molecular hydrogen on oxidative modification of proteins in colorectal cancer in the experiment. *Medical and Clinical Chemistry*, (1), 11-17 [in Ukrainian].
31. Lv, H., Zhen, C., Liu, J., Yang, P., Hu, L., & Shang, P. (2019). Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019(1), 3150145.
32. Johnsen, H.M., Hiorth, M., & Klaveness, J. (2023). Molecular Hydrogen Therapy – A Review on Clinical Studies and Outcomes. *Molecules*, 28(23), 7785.
33. Sun, Q., Han, W., & Nakao, A. (2015). *Biological safety of hydrogen*. in *Hydrogen Molecular Biology and Medicine*. Springer: Dordrecht, The Netherlands. 35-48.
34. Basak, D., Uddin, M. N., & Hancock, J. (2020). The role of oxidative stress and its counteractive utility in colorectal cancer (CRC). *Cancers*, 12(11), 3336.
35. Boakye, D., Jansen, L., Schoettker, B., Jansen, E.H., Schneider, M., Halama, N., ... & Brenner, H. (2020). Blood markers of oxidative stress are strongly associated with poorer prognosis in colorectal cancer patients. *International journal of cancer*, 147(9), 2373-2386.
36. Slezák, J., Kura, B., Frimmel, K., Zálešák, M., Ravingerová, T., Viczenczová, C., ... & Tribulová, N. (2016). Preventive and therapeutic application of molecular hydrogen in situations with excessive production of free radicals. *Physiol. Res*, 65 (Suppl 1), S11-S28.
37. Oçer, M., & Nazıroğlu, M. (2013). Effects of 5-fluorouracil on oxidative stress and calcium levels in the blood of patients with newly diagnosed colorectal cancer. *Biological trace element research*, 155, 327-332.
38. Niu, B., Liao, K., Zhou, Y., Wen, T., Quan, G., Pan, X., & Wu, C. (2021). Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. *Biomaterials*, 277, 121110.
39. Zou, M., Hu, X., Xu, B., Tong, T., Jing, Y., Xi, L., ... & Liao, F. (2019). Glutathione S-transferase isozyme alpha 1 is predominantly involved in the cisplatin resistance of common types of solid cancer. *Oncology reports*, 41(2), 989-998.
40. Cooper, A.J.L., & Hanigan, M.H. (2018). Metabolism of glutathione S-conjugates: multiple pathways. *Comprehensive toxicology*, 363.
41. Van Bladeren, P.J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-biological interactions*, 129(1-2), 61-76.

Отримано 25.07.2024

Адреса для листування: О. О. Покотило, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: pokotylo_ooleh@tdmu.edu.ua.

LEVEL OF REDUCED GLUTATHIONE IN COLORECTAL CANCER UNDER THE INFLUENCE OF 5-FLUOROURACIL AND MOLECULAR HYDROGEN

Summary

Introduction. Reduced glutathione plays a crucial role in maintaining cellular homeostasis and redox balance, serving as a key element of intracellular defense against reactive oxygen species. A decrease in its levels below a critical threshold is considered a marker of oxidative stress, which underlies the pathophysiology of various degenerative diseases, including carcinogenesis. However, there are conflicting results regarding the interaction between chemotherapy xenobiotics and reduced glutathione. The presence of oxidative stress in colorectal cancer necessitates effective antioxidant therapy, and it has been proven that molecular hydrogen exhibits potent antioxidant activity.

The aim of the study – to investigate the effect of molecular hydrogen-enriched water and 5-fluorouracil on the content of reduced glutathione in the blood serum of Wistar rats with colorectal cancer.

Research Methods. The experiments were conducted on 70 male Wistar rats. Colorectal cancer (CRC) was induced in the animals by subcutaneous administration of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) at a dose of 7.2 mg/kg of body weight once a week for 30 weeks. 5-fluorouracil was administered intraperitoneally for 4 days at a dose of 12 mg/kg and then every other day for an additional 4 days at a dose of 6 mg/kg. The animals consumed molecular hydrogen-enriched water at a concentration of 0.6 ppm ad libitum. Euthanasia was performed under thiopental anesthesia. Blood serum was used for the analysis, and the content of reduced glutathione was determined by a colorimetric method. Statistical data analysis was performed using SPSS-22 software.

Results and Discussion. It was found that the content of reduced glutathione in the blood serum of rats that consumed tap water for 30 weeks during the modeling of CRC and molecular hydrogen-enriched water for only 30 days after CRC modeling was 10% higher than in rats with CRC that did not consume hydrogen water. In the blood serum of rats with colorectal cancer treated with 5-fluorouracil, the reduced glutathione level at the end of the experiment was 0.85 mmol/g of protein, which is 32 % lower than in the control group and 22 % lower than in the group that consumed hydrogen water for 30 days after CRC modeling. The reduced glutathione content in the serum of rats with colorectal cancer treated with 5-FU and who consumed molecular hydrogen-enriched water for 30 days after CRC modeling was 1.02 mmol/g of protein, which was 10 % higher ($P \leq 0.05$) than in the CRC group and 17 % higher than in the group treated with 5-FU that did not consume hydrogen water.

Conclusion. Modeling colorectal cancer and administering 5-fluorouracil in rats led to a reduction in the level of reduced glutathione in their blood serum. However, the consumption of molecular hydrogen-enriched water significantly increased the content of this antioxidant.

KEY WORDS: colorectal cancer; molecular hydrogen; hydrogen water; reduced glutathione.