

ПРОТЕКТИВНИЙ ЕФЕКТ ЗБАГАЧЕНОЇ МОЛЕКУЛЯРНИМ ВОДНЕМ ВОДИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ КОЛОРЕКТАЛЬНОМУ РАКУ

©О. О. Покотило, М. М. Корда

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського
Міністерства охорони здоров'я України

РЕЗЮМЕ. Окислювальні процеси відіграють важливу роль в онкогенезі, в тому числі колоректального раку (КРР). Існує ряд повідомлень про зміни у функціонуванні системи циклічних нуклеотидів в онкологічних хворих, зокрема, щодо ролі цГМФ. Застосування антиоксидантів потенційно може уповільнити пухлинний процес. Ураховуючи антиоксидантні та протизапальні властивості молекулярного водню, актуальним є вивчення потенційної терапевтичної дії збагаченої воднем води при онкопатології.

Мета – оцінити вплив води, насиченої молекулярним воднем, на вміст циклічного гуанозинмонофосфату та малонового діальдегіду в сироватці крові лікованих 5-фторурацилом (5ФУ) щурів із колоректальним раком.

Матеріал і методи. Експерименти проведені на 90 щурах-самцях лінії Вістар. КРР моделювали за допомогою підшкірних ін'єкцій 1,2-диметилгідразину в дозі 7,2 мг/кг 1 раз на тиждень протягом 30 тижнів. Щури споживали воду, збагачену молекулярним воднем, у концентрації 0,6 ppm *ad libitum*. У сироватці крові тварин вміст цГМФ визначали методом імуноферментного аналізу, рівень МДА визначали колориметричним методом.

Результати. Вміст цГМФ у сироватці крові щурів з КРР був на 39,9 % нижчим, ніж у тварин в контрольній групі, водночас рівень МДА був збільшений в 1,9 раза. Вміст цГМФ у сироватці крові тварин з КРР, що споживали збагачену молекулярним воднем воду, був на 38,1 % вищим, ніж у тварин, що споживали водопровідну воду, при цьому рівень МДА достовірно (на 30,8 %) знижувався. Введення 5ФУ тваринам з КРР призводило до зниження вмісту цГМФ у сироватці крові на 42,3 % і до збільшення МДА в 2,3 раза, порівняно з контролем, але ці показники достовірно не відрізнялися від аналогічних у тварин з КРР, які були не ліковані 5ФУ. Рівень цГМФ у сироватці крові щурів, які були ліковані 5ФУ та споживали воду, збагачену молекулярним воднем, був на 24,1 % вищим, ніж у лікованих 5ФУ щурів з КРР, що мали доступ до звичайної води. Воднева вода істотно не вплинула на інтенсивність окиснювального стресу у щурів з КРР, які отримували 5ФУ.

Висновок. У щурів з КРР, індукованим 1,2-диметилгідразином, рівень цГМФ у сироватці крові знижується, а рівень МДА підвищується. Лікування щурів з КРР за допомогою 5ФУ не викликає достовірних змін інтенсивності окисного стресу та в системі циклічних нуклеотидів. Споживання води, насиченої молекулярним воднем, тваринами з КРР, приводить до значного покращання показників інтенсивності окиснювального стресу та системи циклічних нуклеотидів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: молекулярний водень; окиснювальний стрес; цГМФ; колоректальний рак.

Вступ. В Україні щороку виявляють приблизно 13 500 випадків захворювань на рак товстої та прямої кишки, що займає у структурі загальної онкозахворюваності 3 місце, при цьому помирають від недуги близько 6300 пацієнтів, що становить 46,6 % [1]. За останнє десятиліття спостерігається стрімке підвищення рівня захворюваності у більшості країн світу, а також відмічено «помолодіння» колоректального раку. Шанс на одужання значною мірою залежить від вчасного звернення та комплексного підходу до лікування.

Важливу роль у патогенезі онкогенезу, в тому числі і розвитку колоректального раку (КРР), відіграє активація окислювальних процесів [2]. Є також ряд повідомлень про зміни функціонування системи циклічних нуклеотидів у хворих на рак [3], зокрема про роль і зміни вмісту цГМФ [4]. Сигнальна система цГМФ є одним із найважливіших регуляторів різноманітних фізіологічних і патофізіологічних процесів у тканинах тварин і людини [5]. Циклічні нуклеотиди, цАМФ і цГМФ, є повсюдними вторинними месенджерами, відповідальними за трансляцію позаклітинних сигналів у внутріш-

ньоклітинні біологічні відповіді як у нормальних, так і в пухлинних клітинах. Розшифровка багатогранної ролі цГМФ у патогенезі раку дає можливість розробити нові протипухлинні методи лікування шляхом точного націлювання на відповідні молекулярні шляхи [6]. цГМФ регулює ріст ракових клітин, адгезію та мікрооточення пухлини, кровотік, ангіогенез, запалення та імунну відповідь [7]. Рівень цГМФ знижується в ракових клітинах через підвищену активацію фосфодіестерази 5 [8].

Оскільки окисдавативний стрес пов'язаний з розвитком і прогресуванням раку [9, 11, 12], то застосування антиоксидантів може потенційно сповільнити пухлинний процес [10]. В останні роки значно зріс інтерес до використання молекулярного водню при патологіях, що супроводжуються оксидативним стресом. Враховуючи антиоксидантні і протизапальні властивості [13, 14] молекулярного водню, а також відомі факти, що свідчать про посилення ліпідної пероксидації та зростання вмісту АФК при колоректальному раку [15, 16], актуальним є дослідження потенційного терапевтичного ефекту збагаченої воднем води при даній

патології. Беручи до уваги відомі факти посилення оксидативних процесів при інтоксикації, що виникає внаслідок хіміотерапії онкопатології, важливим також є вивчення впливу молекулярного водню на інтенсивність оксидативного стресу, зумовленого специфічними хімічними препаратами [17].

Мета – оцінити вплив води, насиченої молекулярним воднем, на вміст циклічного гуанозинмонофосфату та малонового діальдегіду в сироватці крові лікованих 5-фторурацилом щурів з колоректальним раком.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проводили в Центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського. Для експерименту використано 90 білих щурів-самців лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин поділили на дев'ять груп по десять щурів у кожній: 1-а – контрольна (щури цієї групи споживали водопровідну воду впродовж 30 тижнів); 2-а – тварини, яким моделювали КРР шляхом підшкірного введення 1,2-диметилгідрозину (ДМГ) у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень впродовж 30 тижнів [18] (щури цієї групи мали доступ до звичайної водопровідної води протягом 30 тижнів); 3-я – тварини, яким моделювали КРР впродовж 30 тижнів та які споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, протягом тих же 30 тижнів; 4-а – щури з КРР, який моделювали впродовж 30 тижнів, які споживали водопровідну воду впродовж тих же 30 тижнів і потім ще протягом 30 днів після закінчення моделювання КРР; 5-а – тварини з КРР, який моделювали впродовж 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-а – 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 [19] (тварини цієї групи споживали водопровідну воду протягом усього експерименту); 7-а – щури з КРР, який моделювали впродовж 30 тижнів, потім ще 11 днів вони були в експерименті без додаткових втручань (тварини цієї групи споживали водопровідну воду протягом усього експерименту); 8-а – 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 водопровідну воду протягом усього експерименту); 9-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, ще 11 днів вони були в експерименті без додаткових втручань (тварини цієї

групи споживали водопровідну воду впродовж тих же 30 тижнів, а потім воду, збагачену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, протягом 30 днів). 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 H₂-метром ENH-100 ("Amtest", США). Поїлки замінювали кожних 2 дні для всіх груп тварин.

Аденокарциному товстої кишки моделювали введенням диметилгідрозину гідрохлориду (Sigma-Aldrich Chemie, Японія, серія D161802), попередньо розведеного ізотонічним розчином натрію хлориду. Хімічний канцероген вводили підшкірно в міжлопаткову ділянку в дозі 7,2 мг/кг маси тіла (з розрахунку на діючу речовину) 1 раз на тиждень впродовж 30 тижнів [18]. Для лікування колоректального раку використовували концентрат для розчину для інфузій 5ФУ (5-фторурацил) (Ебеве, Австрія) згідно з методикою [19].

Евтаназію тварин проводили під тіопенталовим наркозом у наступні терміни: 1-а, 2-а і 3-а групи – на 211-й день експерименту, 4-а, 5-а, 8-а, 9-а групи – на 241-й день експерименту, 6-а, 7-а групи – на 230-й день експерименту. 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) [20].

Для підтвердження КРР проводили гістологічне дослідження товстої кишки щурів. З метою ідентифікації абераційних 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. Вирізували ділянки, інтенсивно профарбовані барвником, 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.

Визначення вмісту малонового діальдегіду в сироватці крові проводили спектрофотометричним методом: в кислому середовищі при високій температурі малоновий діальдегід реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлену

ний комплекс червоного кольору з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм [21].

цГМФ у сироватці крові білих щурів визначали методом імуноферментного аналізу (CyclicGMP, ELISA KIT, США). Під час реакції цГМФ у зразках або стандартних розведеннях конкурує з цГМФ на твердофазному носії. Надлишок кон'югату змивають з планшетки, а авідин, кон'югований з Horseradish peroxidase, додають у кожну лунку та інкубують. Потім в кожну лунку додають розчин субстрату-реагенту. Реакцію фермент-субстрат припиняють додаванням стоп-розчину та отриману зміну кольору вимірюють спектрофотометрично при довжині хвилі 450 ± 2 нм. Концентрацію цГМФ у зразках визначали шляхом порівняння оптичної щільності зразків зі стандартною кривою.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета програмного забезпечення SPSS-22 [22]. 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. При гістологічному дослідженні стінки товстої кишки тварин, яким вводили ДМГ підшкірно в дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень впродовж 30-ти тижнів, виявлено виражену епітеліальну дисплазію слизової оболонки, гіперхроматичність ядер і дезорганізацію клітинних рядів епітелію (рис. 1). Спостерігали атипові 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, не-

однорідність ядерної стратифікації і втрата полярності. З огляду на вищенаведені дані можна констатувати, що у товстій кишці щурів розвинулась аденокарцинома *in situ*.

Результати впливу води, збагаченої воднем, на вміст цГМФ у сироватці крові щурів з КРР показано в таблиці 1. Як можна побачити, на 211-й день експерименту вміст цГМФ у сироватці крові щурів 2-ї групи був на 39,9 % меншим ($p \leq 0,05$), ніж у тварин контрольної групи. У цей же термін рівень МДА в сироватці крові тварин з КРР зростав в 1,9 рази ($p \leq 0,05$). Отримані результати свідчать про те, що розвиток і прогресування канцерогенезу товстої кишки, стимульованого підшкірним введенням щурам ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень упродовж 30 тижнів, призводить до пригнічення функціонування системи циклічних нуклеотидів та активації системи ПОЛ.

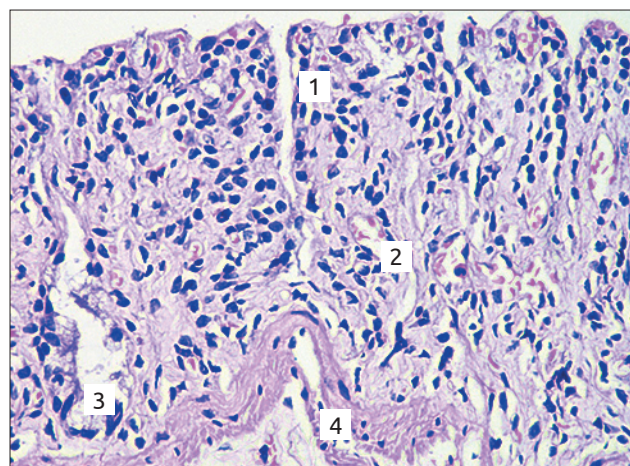


Рис. 1. Гістологічні зміни стінки товстої кишки тварин з ДМГ-змодельованим колоректальним раком, які мали доступ до водопровідної води. 30-й тиждень експерименту. Забарвлення гематоксиліном та еозином (400×). 1 – гетерогенні клітини з гіперхромними ядрами; 2 – кровоносна судина; 3 – келихоподібні клітини; 4 – м'язова пластинка.

Таблиця 1. Вміст цГМФ і МДА у сироватці крові щурів із колоректальним раком, лікованих 5-ФУ і при корекції збагаченою молекулярним воднем водою

Група тварин	cGMP, pmol/ml	MDA, nmol/l
1	$45,0 \pm 3,87$	$0,70 \pm 0,07$
2	$27,5 \pm 2,20$ *	$1,30 \pm 0,11$ *
3	$38,0 \pm 3,01$ #	$0,90 \pm 0,08$ #
4	$25,0 \pm 2,10$ *	$1,45 \pm 0,08$ *
5	$34,0 \pm 2,30$ \$	$1,10 \pm 0,08$ *\$
6	$26,0 \pm 1,83$ *	$1,60 \pm 0,12$ *
7	$30,1 \pm 2,10$ *	$1,31 \pm 0,10$ *
8	$28,2 \pm 1,60$ *	$1,51 \pm 0,12$ *
9	$35,1 \pm 1,80$ @	$1,15 \pm 0,10$ *

Примітки: * – зміни достовірні порівняно з тваринами 1-ї групи (контроль), # – зміни достовірні порівняно з тваринами 2-ї групи, \$ – зміни достовірні порівняно з тваринами 4-ї групи, @ – зміни достовірні порівняно з тваринами 8-ї групи.

Вміст цГМФ у сироватці крові щурів 3-ї групи, які споживали збагачену молекулярним воднем воду упродовж 30 тижнів паралельно із введенням ДМГ, був на 38,1 % більшим, ніж у тварин 2-ї групи, які споживали водопровідну воду. Рівень МДА у тварин цієї групи достовірно (на 30,8 %) знижувався, порівняно з аналогічним показником у щурів 2-ї групи, що свідчить про антиоксидантний ефект молекулярного водню.

У сироватці крові щурів 4-ї групи, яким моделювали КРР і які споживали водопровідну воду впродовж 30 тижнів і потім ще протягом 30 днів після закінчення моделювання КРР, вміст цГМФ був на 44,5 % меншим, ніж в інтактних тварин. Вміст МДА в сироватці крові щурів 4-ї групи становив 207,1 % від рівня контролю, що підтверджує важливу роль оксидативного стресу в патогенезі канцерогенезу. Позитивний ефект молекулярного водню продемонстровано також на 4–5 парі груп тварин. Зокрема, у щурів, які споживали збагачену воднем воду протягом 30 днів після закінчення моделювання КРР, вміст цГМФ в сироватці крові був на 36,0 % вищим, ніж у тварин 4-ї групи, які вживали водопровідну воду. В той же час, рівень МДА у сироватці крові тварин 5-ї групи був на 24,1 % нижчим, ніж у тварин 4-ї групи. У наступній парі груп (6–7) досліджуваних тварин ми вивчали, як впливає лікування 5-ФУ на систему циклічних нуклеотидів та інтенсивність окислювальних процесів у щурів з КРР. Виявлено, що введення 5-ФУ протягом 11-и днів тваринам зі змодельованим КРР (6-а група) призводило до зменшення вмісту цГМФ в сироватці крові на 42,3 % і до підвищення МДА в 2,3 раза, порівняно з контролем. У сироватці крові щурів 7-ї групи, які отримували лише ДМГ, ані рівень цГМФ, ані вміст МДА достовірно не відрізнялися від аналогічних показників у щурів 6-ї групи.

Ми також дослідили, як впливає молекулярний водень на показники системи циклічних нуклеотидів і окислювальні процеси у тварин з КРР, яких лікували 5-ФУ (пара 8–9). Як видно з наведених у таблиці 1 даних, вміст у сироватці крові цГМФ у тварин, які споживали збагачену воднем воду, був на 24,1 % вищим, ніж у щурів з КРР, лікованих 5-ФУ, які мали доступ до звичайної води. У сироватці крові 9-ї групи тварин також спостерігалася тенденція до зменшення рівня МДА, порівняно з 8-ю групою, проте зміни виявилися недостовірними, тобто воднева вода суттєво не впливала на рівень оксидативного стресу в лікованих 5-ФУ щурів з КРР.

Отже, на основі результатів наших гістологічних досліджень можемо стверджувати, що ДМГ є ефективним засобом для хімічно індукованого канцерогенезу товстої кишки у щурів. Щодо отриманого нами позитивного ефекту збагаченої молекулярним воднем води на показники вмісту

МДА при КРР, то, беручи до уваги відому роль оксидативного стресу в патогенезі канцерогенезу, можемо припустити, що такий ефект зумовлений антиоксидантними властивостями H_2 . Відомо, що молекулярний водень є селективним перехоплювачем активних форм кисню (АФК), у тому числі й гідроксильних радикалів. Зниження рівня АФК супроводжується пригніченням окислювальних процесів, у результаті чого знижується вміст МДА у сироватці крові. Повідомляється, що молекулярний водень має не тільки антиоксидантні властивості, а й антипроліферативні, антиапоптичні і протипухлинні ефекти [23–25]. На сьогодні існує кілька сотень статей щодо механізму, результатів лікування та загальної ефективності застосування H_2 -терапії у лікуванні раку. Зокрема, є повідомлення про позитивний ефект застосування інгаляцій молекулярного водню при раку легень з множинними метастазами [26]. У роботі [27] показано, що застосування інгаляцій молекулярного водню у 55 хворих на колоректальний рак суттєво поліпшувало імунологічні показники і підвищувало загальне виживання пацієнтів.

J. B. Chen та ін., 2020 [28], одержав оригінальні результати досліджень на 82 пацієнтах III і IV стадій, які отримували інгаляцію водню. Після 4 тижнів інгаляції вони повідомили про значне зменшення втоми, безсоння, анорексії та болю. Крім того, в 41,5 % пацієнтів поліпшився фізичний стан, причому найкращого ефекту було досягнуто у хворих на рак легень, а найгіршого – у пацієнтів з раком підшлункової залози та гінекологічними онкозахворюваннями. З 58 випадків з підвищенням рівня одного або кількох аномальних онкомаркерів в 36,2 % пацієнтів показники були знижені через 13–45 днів після інгаляції водню. Отже, інгаляційний водень може покращити якість життя пацієнтів із раком і допомогти контролювати прогресування хвороби.

Вивчення впливу молекулярного водню на рак шийки матки продемонструвало, що H_2 суттєво знижував рівень реактивних форм кисню, порівняно з контрольною групою [29]. На тваринних моделях було показано пригнічення росту пухлин під впливом H_2 через різні протипухлинні механізми. D. Kawai та ін., 2012 [30], також продемонстрували, що воднева вода має значну антиоксидантну та протиканцерогенну дію. Автори показали, що молекулярний водень знижує експресію ключових генів метаболізму ліпідів, впливаючи на печінкову експресію генів синтезу й окиснення жирних кислот через взаємодію з рецепторами, що активуються пероксисомними проліфераторами (PPAR). Загалом ці дослідження підтверджують, що H_2 може бути надійним допоміжним засобом у лікуванні раку.

D. Wang та ін., 2018, у дослідженнях на тваринах показали інгібування у присутності H_2 проліферації, інвазії і міграції ракових клітин унаслідок зниження експресії SMC3, що призвело до зниження пухлиногенезу [31].

Висновки. У щурів з КРР, індукованим 1,2-ДМГ, знижується рівень цГМФ і підвищується вміст МДА в сироватці крові. Лікування КРР за допомогою 5-ФУ не призводило до достовірних змін показників інтенсивності оксидативного стресу і системи циклічних нуклеотидів. Спожи-

вання насиченої молекулярним воднем води тваринами з КРР приводить до достовірного поліпшення показників інтенсивності оксидативного стресу і системи циклічних нуклеотидів.

Перспективи подальших досліджень. Застосування H_2 для лікування раку можна розглядати як багатообіцяючий метод допоміжної терапії, що може використовуватися у комбінації з традиційними методами лікування онкопатології і призводить до поліпшення показників інтенсивності оксидативного стресу в організмі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Рак в Україні 2022–2023. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби 2022–2023 : Бюлетень національного канцер-реєстру № 25, Київ, 2024.
2. Oxidative stress and its role in cancer / M. D. Jelic, A. D. Mandic, S. M. Maricic, B. U. Srdjenovic // Journal of cancer research and therapeutics – 2021. – No. 17(1). – P. 22–28. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_862_16.
3. Heterogeneity of cGMP signalling in tumour cells and the tumour microenvironment: Challenges and chances for cancer pharmacology and therapeutics / D. Stehle, M. Barresi, J. Schulz, R. Feil // Pharmacology & Therapeutics. – 2023. – No. 242. – P. 108337.
4. Hofmann F. The cGMP system: Components and function / F. Hofmann // Biological chemistry. – 2020. – No. 401(4). – P. 447–469.
5. Pros and cons of pharmacological manipulation of cGMP-PDEs in the prevention and treatment of breast cancer / P. Di Iorio, M. Ronci, P. Giuliani, F. Caciagli [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – No. 23(1). – P. 262.
6. Windham P. F. cGMP signaling as a target for the prevention and treatment of breast cancer / P. F. Windham, H. N. Tinsley // Seminars in cancer biology. – 2015. – No. 31. – P. 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.06.006>.
7. Targeting the paracrine hormone-dependent guanylate cyclase/cGMP/phosphodiesterases signaling pathway for colorectal cancer prevention / N. S. Yarla, H. Gali, G. Pathuri [et al.] // Seminars in cancer biology. – 2019. – No. 56. – P. 168–174.
8. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.08.011>
9. Beyond Erectile Dysfunction: cGMP-Specific Phosphodiesterase 5 Inhibitors for Other Clinical Disorders / A. Samidurai, L. Xi, A. Das, R. C. Kukreja // Annual review of pharmacology and toxicology. – 2023. – No. 63. – P. 585–615. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-040122-034745>.
10. Hussain S. P. Radical causes of cancer / S. P. Hussain, L. J. Hofseth, C. C. Harris // Nature Reviews Cancer. – 2003. – No. 3 (4). – P. 276–285.
11. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol [et al.] // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2007. – No. 39. – P. 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
12. Basak D. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC) / D. Basak, M. N. Uddin, J. Hancock // Cancers. – 2020. – No. 12(11). – P. 3336. <https://doi.org/10.3390/cancers12113336>.
13. Schmitt M. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. Nature reviews / M. Schmitt, F. R. Greten // Immunology. – 2021. – No. 21(10). – P. 653–667. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00534-x>.
14. Ohta S. Molecular hydrogen as a novel antioxidant: overview of the advantages of hydrogen for medical applications / S. Ohta // Methods in enzymology. – 2015. – No. 555. – P. 289–317. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.038>
15. A New Approach for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. Molecular Hydrogen Significantly Reduces the Effects of Oxidative Stress / T. W. LeBaron, B. Kura, B. Kalocayova [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2019. – No. 24 (11). – P. 2076. <https://doi.org/10.3390/molecules24112076>
16. Lin J., Chuang C. C., Zuo L. Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets / J. Lin, C. C. Chuang, L. Zuo // Oncotarget. – 2017. – No. 8 (10). – P. 17328–17346. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14461>
17. Perše M. Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? / M. Perše // BioMed research international. – 2013. – P. 725710. <https://doi.org/10.1155/2013/725710>
18. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer / J. Runtuwene, H. Amitani, M. Amitani [et al.] // PeerJ. – 2015. – No. 3. – P. e859. <https://doi.org/10.7717/peerj.859>
19. Evaluation of membrane-destructive processes in rats with induced carcinogenesis of the colon using the cytostatic vincristine / O. Kachur, L. Fira, P. Lykhatskyi [et al.] // Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny. – 2022. – No. 73(2). – P. 215–220. <https://doi.org/10.32394/rpzh.2022.0212>
20. Thymoquinone subdues tumor growth and potentiates the chemopreventive effect of 5-fluorouracil on the early stages of colorectal carcinogenesis in rats / O. A. Kearsa, A. G. El-Shemi, A. M. Mohamed [et al.] // Drug. Des. Devel. Ther. – 2016. – No. 11 (10). – P. 2239–2253. DOI: 10.2147/DDDT.S109721.
21. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg – 1986. – 53 p.
22. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological

samples: Analytical and biological challenges / D. Tsikas // *Anal Biochem.* – 2017. – No. 524. – P. 13–30. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021.

23. Okeh U. M. Statistical problems in medical research / U. M. Okeh // *East African Journal of Public Health.* – 2009. – No. 6(1). – P. 1–7.

24. 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 / S. Ohta // General Subjects.* – 2012. – No. 1820. – P. 586–594. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.05.006.

25. Hydrogen-rich water reduces inflammatory responses and prevents apoptosis of peripheral blood cells in healthy adults: a randomized, double-blind, controlled trial / M. Sim, C. S. Kim, W. J. Shon [et al.] // *Scientific reports.* – 2020. – No. 10(1). – P. 12130. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68930-2>

26. Antitumor Activity of Protons and Molecular Hydrogen: Underlying Mechanisms / L. Rochette, M. Zeller, Y. Cottin, C. Vergely // *Cancers.* – 2021. – No. 13 (4). – P. 893. <https://doi.org/10.3390/cancers13040893>

27. Brain Metastases Completely Disappear in Non-Small Cell Lung Cancer Using Hydrogen Gas Inhalation: A Case Report / J. Chen, F. Mu, T. Lu [et al.] // *OncoTargets*

and therapy. – 2019. – No. 12. – P. 11145–11151. <https://doi.org/10.2147/OTT.S235195>).

28. Akagi J., Baba H. Hydrogen gas restores exhausted CD8⁺ T cells in patients with advanced colorectal cancer to improve prognosis / J. Akagi, H. Baba // *Oncol Rep.* – 2019. – No. 41 (1). – P. 301–311. doi:10.3892/or.2018.6841.

29. Chen J. B. A narrative review of hydrogen oncology: from real world survey to real world evidence / J. B. Chen, J. Akagi, H. Baba // *Medical gas research.* – 2020. – No. 10 (3). – P. 130–133. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.296044>

30. Mechanism of hydrogen on cervical cancer suppression revealed by high-throughput RNA sequencing / J. Chu, J. Gao, J. Wang, L. Li [et al.] // *Oncology reports.* – 2021. – No. 46 (1). – P. 141. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8092>

31. Hydrogen-rich water prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice / D. Kawai, A. Takaki, A. Nakatsuka [et al.] // *Hepatology (Baltimore, Md.).* – 2012. – No. 56 (3). – P. 912–921. <https://doi.org/10.1002/hep.25782>

32. Hydrogen gas inhibits lung cancer progression through targeting SMC3 / D. Wang, L. Wang, Y. Zhang [et al.] // *Biomedicine & pharmacotherapy.* – 2018. – No. 104. – P. 788–797. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.055>

REFERENCES

1. Onkologichna sluzhba Ukrainy [Oncological Service of Ukraine]. (2024) Rak v Ukraini 2022–2023. Zakhvoriuvaniist, smertnist, pokaznyky diialnosti onkologichnoi sluzhby 2022–2023 [Cancer in Ukraine 2022–2023. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service 2022–2023]. *Biuletyn natsionalnoho kantser-reiestru – Bulletin of the National Cancer register*, 25. [in Ukrainian].

2. Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 17(1), 22–28. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_862_16.

3. Stehle, D., Barresi, M., Schulz, J., & Feil, R. (2023). Heterogeneity of cGMP signalling in tumour cells and the tumour microenvironment: challenges and chances for cancer pharmacology and therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 242, 108337.

4. Hofmann, F. (2020). The cGMP system: components and function. *Biological chemistry*, 401(4), 447–469.

5. Di Iorio, P., Ronci, M., Giuliani, P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., Caruso, V., ... & Zuccarini, M. (2021). Pros and cons of pharmacological manipulation of cGMP-PDEs in the prevention and treatment of breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 262.

6. Windham, P. F., & Tinsley, H. N. (2015). cGMP signaling as a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Seminars in cancer biology*, 31, 106–110. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.06.006.

7. Yarla, N. S., Gali, H., Pathuri, G., Smriti, S., Farooqui, M., Panneerselvam, J., Kumar, G., Madka, V., & Rao, C. V. (2019). Targeting the paracrine hormone-dependent guanylate cyclase/cGMP/phosphodiesterases signaling pathway for colorectal cancer prevention. *Seminars in*

cancer biology, 56, 168–174. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.08.011

8. Samidurai, A., Xi, L., Das, A., & Kukreja, R. C. (2023). Beyond Erectile Dysfunction: cGMP-Specific Phosphodiesterase 5 Inhibitors for Other Clinical Disorders. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 63, 585–615. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-040122-034745.

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

10. 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. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

11. 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. DOI:10.3390/cancers12113336.

12. Schmitt, M., & Greten, F. R. (2021). The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature reviews. Immunology*, 21(10), 653–667. DOI: 10.1038/s41577-021-00534-x.

13. Ohta, S. (2015). Molecular hydrogen as a novel antioxidant: overview of the advantages of hydrogen for medical applications. *Methods in enzymology*, 555, 289–317. DOI: 10.1016/bs.mie.2014.11.038

14. LeBaron, T. W., Kura, B., Kalocayova, B., Tribulova, N., & Slezak, J. (2019). A New Approach for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. Molecular Hydrogen Significantly Reduces the Effects of Oxidative Stress. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11), 2076. DOI: 10.3390/molecules24112076

15. Lin, J., Chuang, C. C., & Zuo, L. (2017). Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets. *Oncotarget*, 8(10), 17328-17346. DOI: 10.18632/oncotarget.14461
16. Perše, M. (2013). Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? *BioMed research international*, 2013, 725710. DOI: 10.1155/2013/725710
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. *PeerJ*, 3, e859. DOI: 10.7717/peerj.859
18. Kachur, O., Fira, L., Lykhatskyi, P., Fira, D., & Garlitska, N. (2022). Evaluation of membrane-destructive processes in rats with induced carcinogenesis of the colon using the cytostatic vincristine. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 73(2), 215-220. DOI: 10.32394/rpzh.2022.0212
19. 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. Des. Devel. Ther.*, 11(10), 2239-2253. DOI: 10.2147/DDDT.S109721.
20. Council of Europe. (1986). *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. Strasbourg.
21. Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*, 524, 13-30. DOI: 10.1016/j.ab.2016.10.021.
22. Okeh, U.M. (2009). Statistical problems in medical research. *East African Journal of Public Health*, 6(1), 1-7.
23. 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*, 1820(5), 586-94.
24. Sim, M., Kim, C. S., Shon, W. J., Lee, Y. K., Choi, E. Y., & Shin, D. M. (2020). Hydrogen-rich water reduces inflammatory responses and prevents apoptosis of peripheral blood cells in healthy adults: a randomized, double-blind, controlled trial. *Scientific reports*, 10(1), 12130. DOI: 10.1038/s41598-020-68930-2
25. Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2021). Antitumor Activity of Protons and Molecular Hydrogen: Underlying Mechanisms. *Cancers*, 13(4), 893. DOI: 10.3390/cancers13040893
26. Chen, J., Mu, F., Lu, T., Du, D., & Xu, K. (2019). Brain Metastases Completely Disappear in Non-Small Cell Lung Cancer Using Hydrogen Gas Inhalation: A Case Report. *OncoTargets and therapy*, 12, 11145-11151. DOI: 10.2147/OTT.S235195).
27. Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2021). Antitumor Activity of Protons and Molecular Hydrogen: Underlying Mechanisms. *Cancers*, 13(4), 893. DOI: 10.3390/cancers13040893
28. Akagi, J., Baba, H. (2019). Hydrogen gas restores exhausted CD8+ T cells in patients with advanced colorectal cancer to improve prognosis. *Oncol Rep.*, 41(1), 301-311. DOI: 10.3892/or.2018.6841.
29. Chen, J. B., Lu, Y. Y., & Xu, K. C. (2020). A narrative review of hydrogen oncology: from real world survey to real world evidence. *Medical gas research*, 10(3), 130-133. DOI: 10.4103/2045-9912.296044
30. Chu, J., Gao, J., Wang, J., Li, L., Chen, G., Dang, J., Wang, Z., Jin, Z., & Liu, X. (2021). Mechanism of hydrogen on cervical cancer suppression revealed by high throughput RNA sequencing. *Oncology reports*, 46(1), 141. DOI: 10.3892/or.2021.8092
31. Kawai, D., Takaki, A., Nakatsuka, A., Wada, J., Tamaki, N., Yasunaka, T., Koike, K., Tsuzaki, R., Matsumoto, K., Miyake, Y., Shiraha, H., Morita, M., Makino, H., & Yamamoto, K. (2012). Hydrogen-rich water prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(3), 912-921. DOI: 10.1002/hep.25782
32. Wang, D., Wang, L., Zhang, Y., Zhao, Y., & Chen, G. (2018). Hydrogen gas inhibits lung cancer progression through targeting SMC3. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 104, 788-797. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.055

PROTECTIVE EFFECT OF WATER ENRICHED WITH MOLECULAR HYDROGEN IN EXPERIMENTAL COLORECTAL CANCER

©O. O. Pokotylo, M. M. Korda

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine

SUMMARY. Oxidative processes play an important role in the pathogenesis of oncogenesis, e. g. colorectal cancer (CRC). There are also a number of reports on changes in the functioning of the cyclic nucleotide system in cancer patients, in particular, on the role of cGMP. The use of antioxidants can potentially slow down the tumor process. Given the antioxidant and anti-inflammatory properties of molecular hydrogen, it is relevant to study the potential therapeutic effect of hydrogen-enriched water in this oncopathology.

The aim – to assess the effect of water saturated with molecular hydrogen on the content of cGMP and malondialdehyde (MDA) in the blood serum of rats with CRC treated with 5-fluorouracil.

Material and Methods. Experiments were conducted on 90 male Wistar white rats. CRC was simulated in animals by subcutaneous injection of 1,2-dimethylhydrazine (1,2-DMG) at a dose of 7.2 mg/kg once a week for 30 weeks. Rats consumed water saturated with molecular hydrogen at a concentration of 0.6 ppm *ad libitum*. In blood serum the content of cGMP was measured by immunoassay method and the level of MDA was measured by the colorimetric method.

Results. The content of cGMP in the blood serum of rats with CRC was 39.9 % lower than in animals of the control group, while the level of MDA in the blood serum increased by 1.9 times. The content of cGMP in the blood serum of rats with CRC that consumed water enriched with molecular hydrogen was 38.1 % higher than in animals that consumed tap water, while the level of MDA significantly (by 30.8 %) decreased. Administration of 5-FU to animals with CRC led to a decrease in the content of cGMP in the blood serum by 42.3 % and an increase in MDA by 2.3 times compared to the control, but did not significantly differ from similar indicators in animals with CRC that were not treated with 5-FU. Serum cGMP levels in animals treated by 5-FU consuming hydrogen-enriched water were 24.1 % higher than in 5-FU-treated CRC rats that had access to tap water. Hydrogen water did not significantly affect the level of oxidative stress in 5-FU-treated CRC rats.

Conclusions. In rats with CRC induced by 1,2-DMG, the level of blood serum cGMP decreased and the content of MDA increased. Treatment of CRC-rats with 5-FU does not lead to significant changes in the intensity of oxidative stress and the cyclic nucleotide system. Consumption of water saturated with molecular hydrogen by animals with CRC leads to a significant improvement in the intensity of oxidative stress and the cyclic nucleotide system.

KEY WORDS: molecular hydrogen; oxidative stress; cGMP; colorectal cancer.

Отримано 02.11.2024

Електронна адреса для листування: pokotylo_ooleh@tdmu.edu.ua