

©Н. В. Зигрій <https://orcid.org/0009-0008-7975-2702>  
©О. О. Шевчук <https://orcid.org/0000-0003-2473-6381>

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України,  
Тернопіль, Україна

## МОЛЕКУЛЯРНИЙ ВОДЕНЬ ЯК МОДУЛЯТОР ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ТА ЗАПАЛЕННЯ ПРИ ДОКСОРУБІЦИН-ІНДУКОВАНІЙ ТОКСИЧНОСТІ

**РЕЗЮМЕ.** Доксорубіцин – ефективний антрацикліновий антибіотик, який широко застосовують у онкологічній практиці, але його використання обмежується токсичними побічними ефектами, зокрема кардіотоксичністю, яку пов'язують з оксидативним стресом та ініціацією каскаду запалення. Молекулярний водень ( $H_2$ ) проявляє антиоксидантні та протизапальні властивості, здатний селективно нейтралізувати гідроксильні радикали і пероксинітри.

**Мета дослідження** – вивчити вплив води, збагаченої молекулярним воднем, на оксидативний стрес і запальні процеси при доксорубіцин-індукованій токсичності у щурів.

**Матеріал і методи.** Експеримент проводили на статевозрілих щурах-самцях, рандомізованих на чотири групи: контрольна, доксорубіцин (DOX), доксорубіцин + вода з молекулярним воднем ( $DOX+H_2$ -вода), вода з молекулярним воднем ( $H_2$ -вода). Доксорубіцин вводили внутрішньоочеревинно 4-разово, кумулятивна доза 20 мг/кг. Тварин виводили з експерименту на 29 добу. Визначали рівні прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), маркери оксидативного стресу (МДА, 8-ізопростан, карбонільні групи), активність антиоксидантних ферментів (каталаза, супероксиддисмутаза) та вміст відновленого глутатіону.

**Результати.** Доксорубіцин викликав значне підвищення рівня прозапальних цитокінів, посилення оксидативного стресу, інтенсифікацію пероксидного окиснення ліпідів та білків, про що свідчить підвищення рівня МДА, 8-ізопростану та протеїнових карбонільних груп. Про пригнічення антиоксидантного захисту клітин свідчить зниження активності каталази, супероксиддисмутази у тканинах міокарда і рівня відновленого глутатіону у сироватці крові. Вживання збагаченої молекулярним воднем води суттєво знижувало концентрацію прозапальних цитокінів на 33–35% та показники оксидативного стресу, покращувало антиоксидантний захист клітин. При цьому досліджувані показники не відрізнялися від контрольних тварин, при споживанні лише води з молекулярним воднем.

**Висновки.** Молекулярний водень у вигляді збагаченої води ефективно зменшує прояви оксидативного стресу та запалення, викликані доксорубіцином, шляхом модуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу та цитокінового статусу. Цей підхід є перспективним для адитивної терапії для зменшення проявів токсичності антрациклінових антибіотиків без зниження їх протипухлинної ефективності. Рекомендується подальше дослідження механізмів дії молекулярного водню в клінічних умовах.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** молекулярний водень; доксорубіцин; оксидативний стрес; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; антиоксидантний захист; субхронічна токсичність; щури.

Доксорубіцин, як один із найширше застосовуваних антрациклінів, завдяки своїй високій ефективності залишається «наріжним каменем» схем поліхіміотерапії при широкому спектрі злоякісних новоутворень. Проте його клінічне застосування часто обмежене побічними ефектами щодо здорових органів/тканин, які призводять до розвитку кардіотоксичності, мієлодепресії, гепатотоксичності, нефротоксичності, проблем із фертильністю тощо [1–3]. Як інтеркалятор за механізмом дії доксорубіцин є циклонеспецифічним і не має вибіркової дії до клітин пухлин. Ураження міокарда, зокрема, характеризується розвитком кардіоміопатії, серцевої недостатності та аритмій, хоча патогенетичний механізм доксорубіцин-індукованої кардіотоксичності залишається недостатньо вивченим. Було висунуто кілька гіпотез щодо механізмів розвитку побічних ефектів, включаючи інтеркаляцію препарату в ДНК, інгібування синте-

зу макромолекул, ініціацію пошкодження ДНК шляхом пригнічення топоізомерази II, порушення аутофагії, фероптоз, надмірну продукцію активних форм кисню (АФК) та апоптоз клітин [3–5]. На думку багатьох дослідників, важливу роль відіграє апоптоз клітин, який індукується оксидативним стресом та утворенням АФК через екзогенні або ендогенні шляхи [6, 7]. Водночас, просто застосування антиоксидантів не запобігає розвитку доксорубіцин-індукованої кардіоміопатії [8, 9], що свідчить про більш складні механізми патології, ніж передбачалося. Антрациклінові антибіотики можуть безпосередньо індукувати апоптоз кардіоміоцитів, навіть без участі АФК та пероксидного стресу [10].

Подальше дослідження патогенетичних механізмів, пов'язаних із регуляцією та впливами на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу, а також пошук нових ефективних терапевтичних середни-

ків для пом'якшення побічної дії антрациклінів, які безпосередньо зменшують процеси запалення та оксидативний стрес, є надзвичайно актуальними. У цьому аспекті є перспективним молекулярний водень ( $H_2$ ) – газ із надзвичайно малою молекулярною масою, який привернув увагу дослідників. Його роль у патогенезі станів, пов'язаних з оксидативним та запальним стресом (променева хвороба, ішемічно-реперфузійне ушкодження, інфаркт міокарда та мозку, трансплантація серця тощо) активно вивчається у преклінічних та клінічних дослідженнях [11, 12].

Біологічні ефекти водню пов'язують з такими механізмами дії [11]:

- селективна нейтралізація гідроксильних радикалів та пероксинітриду;
- зменшення інтенсивності запальних реакцій;
- модуляція сигнальної трансдукції;
- зміна експресії генів.

Експериментально доведено, що молекулярний водень у вигляді інгаляції послаблює прояви доксорубіцин-індукованого ураження серця, пригнічуючи процеси автофагії через AMPK/mTOR сигнальний шлях [13].

Тож, з огляду на біологічні властивості молекулярного водню та його потенціал у регулюванні інтенсивності оксидативного стресу та запалення, **метою нашого дослідження** стало вивчення впливу збагаченої молекулярним воднем води на тлі застосування доксорубіцину у щурів.

**Матеріал і методи дослідження.** Дослідження виконувалися на статевозрілих білих нелінійних щурах-самцях масою тіла ( $200 \pm 20$ ) г. Тварини перебували у стандартних умовах віварію та на стандартному раціоні, перед залученням до експерименту їх оглядав ветеринар. Шляхом сліпої вибірки щурів було рандомізовано у чотири групи ( $n=10$ ): 1 група – контрольна; 2 група – тварини, які отримували доксорубіцин (DOX); 3 група – тварини, які окрім доксорубіцину мали необмежений доступ до води, збагаченої молекулярним воднем ( $DOX+H_2$ -вода); 4 група – тварини, які *ad libitum* мали доступ до збагаченої воднем води ( $H_2$ -вода). Тварини 1 та 2 груп вживали звичайну водопровідну воду.

Для дослідів використано Doxorubicin Accord ( $2 \text{ mg/mL}$ , Accord Healthcare Limited, Польща). Лікарський засіб вводили з розрахунку  $5 \text{ mg/kg}$  один раз на тиждень внутрішньоочеревинно, кумулятивна доза становила  $20 \text{ mg/kg}$ . Цитостатик вводили на 1-у, 8-у, 15-у та 21-у доби експерименту. Воду, збагачену молекулярним воднем, готували безпосередньо в поїлках щурів, у які поміщали вісім магнієвих паличок (довжина –  $5 \text{ cm}$ , діаметр –  $14 \text{ mm}$ ). Через  $15 \text{ хв}$  після внесення магнієвих паличок у воду вміст молекулярного водню у ній

становив  $0,6 \text{ ppm}$ . Поїлки встановлювали у клітки з тваринами і замінювали кожні  $2 \text{ дні}$ . Концентрацію водню у воді постійно контролювали за допомогою сертифікованого  $H_2$ -метра ENH-100 (Amtast, США). Контрольна група тварин додатково отримувала еквівалентні до доксорубіцину за кількістю та об'ємом ін'єкції фізіологічного розчину.

Тварин виводили з експерименту на  $29 \text{ добу}$  методом знекровлення під загальним знеболюванням. У крові визначали концентрацію цитокінів TNF- $\alpha$  та IL- $1\beta$ , вміст 8-ізопростанів (за допомогою імуноензимного аналізу та стандартних наборів відповідно до інструкції виробника); показники прооксидантно-антиоксидантної рівноваги – вміст малонового діальдегіду (МДА) спектрофотометрично (за Zeb A., & Ullah, F., 2016), протеїнових карбонільних груп та відновленого глутатіону, G-SH (за допомогою стандартних наборів); у гомогенатах серця досліджували активність супероксиддисмутази (СОД) (за Чевари С., Чаба І., Секей І., 1986) та каталази (за Góth L., 1991).

Усі маніпуляції проводили з дотриманням принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях, та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах. Протоколи досліджень і їх результати затверджені рішенням Комісії з біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України № 279 від 13.01.2025 року.

Для статистичної обробки результатів застосовували загальноприйняті методи варіаційного аналізу із використанням програм OriginPro 2025 (OriginLab Corporation, USA) та Microsoft Excel XP (USA), оцінюючи достовірність на рівні значущості не більше  $5\%$  ( $p \leq 0,05$ ). Дані представлені у вигляді  $M \pm SD$ , де  $M$  – середня величина, а  $SD$  – середнє квадратичне відхилення. Для визначення нормальності та гомогенності дисперсії використовували критерій Шапіро – Уїлка та тест Левена. За умови нормального розподілу та гомоскедастичності вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA для порівняння груп з поправкою Бонферроні. В інших випадках використовували аналіз Краскела-Уолеса з апостеріорними попарними тестами Манна – Уїтні з поправкою Тьюкі.

**Результати й обговорення.** На тлі субхронічної токсичності доксорубіцину у тварин, які споживали звичайну водопровідну воду, на  $29 \text{ добу}$  після отримання кумулятивної дози препарату  $20 \text{ mg/kg}$  та через один тиждень після останньої ін'єкції з розрахунку  $5 \text{ mg/kg}$  ми спостерігаємо

зростання вмісту цитокінів TNF- $\alpha$  у 3 рази та IL-1 $\beta$  у 2,2 рази ( $p < 0,001$  у обох випадках) (рис. 1).

У піддослідних щурів, які на тлі ін'єкцій доксорубіцину мали необмежений доступ до води з молекулярним воднем, концентрація прозапальних

цитокінів достовірно знижувалася: TNF- $\alpha$  на 35,1 % ( $p < 0,001$ ), а IL-1 $\beta$  на 33,2 % ( $p < 0,05$ ). У тварин, які споживали збагачену молекулярним воднем воду, показники не відрізнялися від контрольної групи.

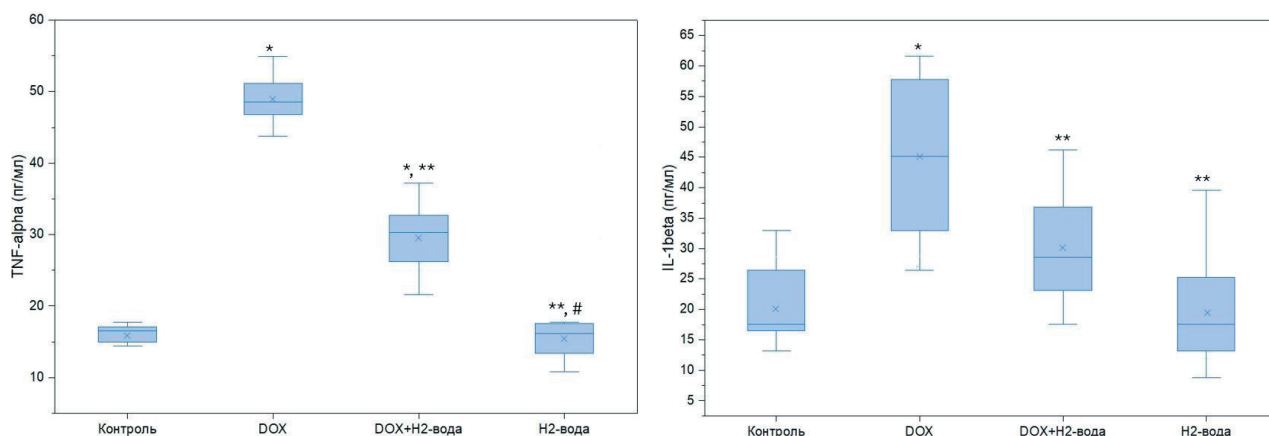


Рис. 1. Зміни показників цитокінів фактора некрозу пухлин-альфа (TNF- $\alpha$ ) та інтерлейкіну-1 бета (IL-1 $\beta$ ) у тварин, які отримували доксорубіцин та збагачену молекулярним воднем воду.

Примітки. Показники достовірно відрізняються у порівнянні з \* – контрольною групою тварин; \*\* – групою тварин, які отримували доксорубіцин (DOX); # – з групою (DOX+H<sub>2</sub>-вода).

Таким чином, збагачена молекулярним воднем вода сприяє зменшенню концентрації прозапальних цитокінів, які відіграють безпосередню роль у розвитку проявів токсичності доксорубіцину, в тому числі ураження серця.

Доксорубіцин викликає виражений оксидативний стрес і ушкодження як білків, так і ліпідів. Так, у групі тварин, які отримували цитостатик, ми

спостерігаємо зростання вмісту МДА у 2,65 рази, 8-ізопростану – у 4 рази, а протеїнових карбонільних груп – у 1,7 рази (табл. 1).

Водночас, ми спостерігаємо зниження вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові на 42,3 % у групі DOX. Також у тканинах серця активність каталази падала на 41,9 %, а СОД – на 28,8 %.

Таблиця 1. Зміни показників прооксидантно-антиоксидантної рівноваги на тлі субхронічної доксорубіцинової токсичності та її корекції за допомогою збагаченої молекулярним воднем води,  $M \pm SD$ ,  $n=10$

| Показник                               | Група тварин       |                                   |                                                   |                                                                    |
|----------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
|                                        | контрольна група   | DOX                               | DOX + H <sub>2</sub> -вода                        | H <sub>2</sub> -вода                                               |
| МДА, нмоль/л                           | 0,395 $\pm$ 0,096  | 1,050 $\pm$ 0,143<br>$p < 0,001$  | 0,698 $\pm$ 0,174<br>$p < 0,001$<br>$p_1 < 0,001$ | 0,311 $\pm$ 0,089<br>$p > 0,05$<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$  |
| 8-ізопростан, пг/мл                    | 119,60 $\pm$ 20,56 | 489,80 $\pm$ 57,83<br>$p < 0,001$ | 262,1 $\pm$ 45,42<br>$p < 0,001$<br>$p_1 < 0,001$ | 111,10 $\pm$ 25,08<br>$p > 0,05$<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$ |
| Карбонільні протеїнові групи, нмоль/мг | 3,51 $\pm$ 0,71    | 6,16 $\pm$ 0,46<br>$p < 0,001$    | 4,37 $\pm$ 0,77<br>$p < 0,05$<br>$p_1 < 0,001$    | 2,90 $\pm$ 0,51<br>$p > 0,05$<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$    |
| Відновлений глутатіон, мг GSH/л        | 2,55 $\pm$ 0,51    | 1,47 $\pm$ 0,26<br>$p < 0,001$    | 1,98 $\pm$ 0,21<br>$p < 0,01$<br>$p_1 < 0,05$     | 2,89 $\pm$ 0,40<br>$p > 0,05$<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,001$    |
| СОД (міокард), у.о./кг                 | 1,97 $\pm$ 0,45    | 1,33 $\pm$ 0,42<br>$p > 0,01$     | 1,75 $\pm$ 0,43<br>$p > 0,05$<br>$p_1 > 0,05$     | 2,01 $\pm$ 0,14<br>$p > 0,05$<br>$p_1 > 0,05$<br>$p_2 > 0,05$      |

|                                 |           |                      |                                             |                                                                      |
|---------------------------------|-----------|----------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Каталаза (міокард),<br>мккат/мг | 3,70±0,53 | 2,15±0,62<br>p<0,001 | 3,20±0,69<br>p<0,05<br>p <sub>1</sub> <0,05 | 3,89±1,11<br>p>0,05<br>p <sub>1</sub> <0,001<br>p <sub>2</sub> >0,05 |
|---------------------------------|-----------|----------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|

У щурів, які додатково споживали збагачену молекулярним воднем воду (група DOX-H<sub>2</sub>-вода), показники 8-ізопростану, МДА та протеїнових карбонілів знижувалися на 45,6 % (p<0,001), 33,5 % (p<0,001) та 29,0 % відповідно, порівняно з групою DOX. 8-ізопростан (також відомий як 8-ізо простагландин F<sub>2α</sub>, 8-ізо PGF<sub>2α</sub>) утворюється в результаті неферментативної пероксидації арахідонової кислоти у мембранних фосfolіпідах. Його концентрація зростає при оксидативному стресі та слугує біомаркером пероксидного окиснення ліпідів. І утворюється він, власне, під дією виключно вільних радикалів, які, як відомо, продукують антрациклінові антибіотики. Отримані нами результати свідчать про ефективність збагаченої молекулярним воднем води для зменшення прооксидантних впливів.

Вміст відновленого глутатіону – неферментативного ендogenous антиоксиданта, у щурів, які мали доступ до молекулярного водню у воді, підвищувався на 34,3%. У тканинах серця також зростала активність ферментів каталази на 49,1 %, а СОД – на 28,9 %, порівняно з групою тварин, які на тлі ін'єкцій доксорубіцину споживали звичайну водопровідну воду.

Показники групи H<sub>2</sub>-вода не відрізнялися від групи контролю з невеликою тенденцією до покращення.

За даними літератури, доксорубіцин-індукований оксидативний стрес активує різноманітні сигнальні шляхи, які призводять до розвитку побічних ефектів. Активація Nrf2 шляху надзвичайно важлива для захисту клітин, а запалення, індуковане NLRP3 інфламасомою, посилює токсичність цитостатика, що підкреслює взаємозв'язок між оксидативним стресом та запальною відповіддю, особливо у розвитку ураження серцевого м'яза. Сигнальні шляхи процесів регуляції апоптозу та піроптозу клітин ініціюються каскадом, який запускається цитокінами. До прикладу, роль фактора некрозу пухлин-альфа (TNF-α) у патогенезі проявів побічної дії антрациклінових антибіотиків описана доволі широко [14, 15]. У пацієнтів, які отримували поліхіміотерапію з доксорубіцином, було виявлене підвищення рівня TNF-α у сироватці крові, а у дослідях на мишах спостерігається посилене експресування цитокіну в міокарді після введення препарату. Доведено, що фактор некрозу пухлин-альфа здатен

стимулювати експресію низки проапоптичних білків, таких як Bax, стимулюючи апоптоз кардіоміоцитів [16, 17].

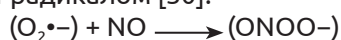
Надмірний оксидативний стрес, індукований доксорубіцином, призводить до експресії транскрипційного фактора – ядерного фактора каппа В-клітин (NF-κB) [18] та активації інфламасоми білка NOD-подібного рецептора 3 (NLRP3), що, у свою чергу, стимулює вивільнення прозапальних цитокинів, як TNF-α та IL-1β, та запускає судинні зміни через експресію VEGF (судинного ендотеліального фактора росту, vascular endothelial growth factor) [17]. Fang G. et al. дослідили запуск піроптозу та запалення у серцевому м'язі через STING/NLRP3 сигнальний шлях, опосередкований цитокінами [19]. Члени родини A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM), протеїнази, трансмембранні білки типу I з домонами, подібними до епідермального фактора росту (EGF), а саме ADAM17, пов'язані з розвитком токсичних проявів доксорубіцину. ADAM17 відомий також як фермент, що конвертує фактор некрозу пухлин α (TACE, tumor necrosis factor α converting enzyme) і перетворює трансмембранний TNF-α (tmTNF-α) у розчинну форму (sTNF-α). Розщеплення TNF-α за участю ADAM17 є необхідною умовою для прояву прозапальної активності цитокіну, що впливає на перебіг патологічних станів, у патогенезі яких ключову роль відіграє TNF-α [8]. Залученість цих шляхів описано і при проявах гепатотоксичності [20, 21], в тому числі через Nrf2/HO-1 шлях [22].

Nrf2 – ядерний фактор, що активується еритроїдним фактором 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) – це транскрипційний фактор, білок, який відіграє ключову роль у регулюванні антиоксидантного захисту та детоксикації в клітинах. Йдеться про базальну та індуковану експресію генів багатьох антиоксидантних ферментів, в тому числі глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонредуктази та супероксиддисмутази [23]. Периферичне або центральне запалення низької інтенсивності є ключовим чинником розвитку багатьох хронічних станів і Nrf2 регулює вроджену імунну відповідь, безпосередньо або опосередковано взаємодіючи з її основними компонентами, як тол-подібні рецептори (TLRs), NF-κB та інфламасоми [24]. На сьогодні уже доведено, що Nrf2 регулює експресію генів, які контролюють фероптоз – форму клітинної заги-

белі, яка запускається через регуляцію обміну та метаболізму заліза та ліпід-пероксидазний стрес [25]. Це особливо цікаво для нашого дослідження, адже прийнято вважати, що кардіотоксичність антрациклінів пов'язана з генерацією вільних радикалів комплексом «антрациклін-залізо» та пошкодженням кардіоміоцитів продуктами пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [5, 26].

За даними дослідників, введення доксорубіцину порушує процеси мітохондріального дихання у кардіоміоцитах, особливо функціонування цитохромоксидази [1]. *Денисова М. В. та інші* за свідчили, що при отриманні доксорубіцину в кумулятивній дозі 15 мг/кг протягом двох діб у мітохондріях серця різко зростає вміст АФК: ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) – у 10,5 раза, ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) – у 5,3 раза, ( $\bullet\text{OH}$ ) – у 3,4 раза порівняно з контролем, що свідчить про розвиток вираженого оксидативного стресу [1]. Власне один з механізмів дії доксорубіцину та його висока протипухлинна ефективність пов'язані саме з генерацією супероксиданіон-радикала [27].

Доведено, що антиоксидантна дія  $\text{H}_2$  реалізується через взаємодію з гідроксильним радикалом ( $\bullet\text{OH}$ ) та пероксинітридом ( $\text{ONOO}^-$ ) [28]. Це важливо у світлі того, що такі АФК як пероксид водню і супероксидний радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), залучені до механізмів клітинної сигналізації, тож вживання молекулярного водню не перешкоджає перебігу фізіологічних процесів. У дослідях на мишах інгібування індукцбельної NO-синтази (iNOS) або використання мишей з нокаутом iNOS зменшувало клітинну загибель, але не впливало на підвищене утворення мітохондріального супероксиданіон-радикала, викликане DOX [29]. Донори оксиду азоту посилювали апоптоз кардіоміоцитів, а пригнічення iNOS за допомогою специфічних інгібіторів 1,3-PB-ITU та I-NIL запобігало його розвитку (визначали за рівнем утворення 3-нітротироzinу – специфічного біомаркера генерації пероксинітриду *in vivo*). Відомо, що на тлі застосування доксорубіцину саме iNOS відповідальна за посилене утворення пероксинітриду шляхом генерації субстрату – оксиду азоту NO, який легко проникає трансмембранно і зв'язується з супероксиданіон-радикалом [30].



#### ЛІТЕРАТУРА

1. Розвиток мітохондріальної дисфункції при гострій кардіотоксичній дії доксорубіцину у дорослих щурів / Денисова М. В. та ін. *Фізіологічний журнал*. 2023. № 69 (6). С. 3–14.
2. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection / Spears N. et al. *Hum Reprod*

Таким чином, *Mukhopadhyay P. et al.* довели, що супероксиданіон-радикал не є основним медіатором мітохондріальної фази апоптозу, індукованого доксорубіцином (DOX) [29], а важливу роль тут відіграє саме пероксинітрид. Таким чином, молекулярний водень, нейтралізуючи гідроксильні радикали та пероксинітрид, сприяє зменшенню токсичних проявів доксорубіцину, в тому числі пом'якшуючи прояви надмірного оксидативного стресу.

**Висновки.** 1. Введення доксорубіцину у кумулятивній дозі 20 мг/кг супроводжується вираженим оксидативним стресом і викликає надмірну активацію процесів пероксидного окиснення ліпідів та білків і пригнічення антиоксидатних здатностей організму, про що свідчить зниження активності каталази, супероксиддисмутази та вмісту відновленого глутатіону. Також ми спостерігаємо зростання концентрації прозапальних цитокінів, що свідчить про запуск регуляторних сигнальних шляхів та активацію запального процесу.

2. Молекулярний водень, розчинений у воді, ефективно сприяє послабленню проявів оксидативного стресу, про що свідчить зниження вмісту відповідних маркерів та зростання показників ферментативної та неферментативної ланок захисту клітин. Важливим є також те, що вживання збагаченої молекулярним воднем води не призводить до якихось коливань у досліджуваних нами показниках, порівняно з контрольною групою тварин, які вживали водопровідну воду, що опосередковано свідчить про безпечність такої води.

3. Отже, молекулярний водень – перспективний засіб у якості адитивної терапії для зменшення проявів токсичності антрациклінових антибіотиків шляхом регуляції прооксидантно-антиоксидантного балансу та запалення, при цьому не зменшуючи ефективність лікування та підтримуючи фізіологічні сигнальні регуляторні шляхи.

**Джерела фінансування.** Власні кошти авторів.

**Внесок авторів:**

Н. В. Зигрій – проведення дослідження, статистична обробка результатів, написання статті;

О. О. Шевчук – розробка ідей та дизайну дослідження, формування дослідницької концепції.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

*Update*. 2019. No. 25(6) P. 673–693. DOI:10.1093/humupd/dmz027

3. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming / Mattioli R. et al. *Mol Aspects Med*. 2023 No. 93 P. 101205. DOI:10.1016/J.MAM.2023.101205

4. Vitale R., Marzocco S., Popolo A. Role of Oxidative Stress and Inflammation in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Brief Account. *Int J Mol Sci.* 2024. No. 25(13). P. 7477. DOI:10.3390/IJMS25137477
5. Li Y., Yan J., Yang P. The mechanism and therapeutic strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity: Role of programmed cell death. *Cell Stress Chaperones.* 2024. No. 29(5). P. 666. DOI:10.1016/J.CSTRES.2024.09.001
6. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity / Songbo M. et al. *Toxicol Lett.* Published online 2019. DOI:10.1016/j.toxlet.2019.02.013
7. Doxorubicin – An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity / Kciuk M. et al. *Cells.* 2023. No. 12(4). P. 659. DOI:10.3390/CELLS12040659
8. Cardiomyocyte-specific knockout of ADAM17 alleviates doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibiting TNF $\alpha$ -TRAF3-TAK1-MAPK axis / Xie L. et al. *Signal Transduct Target Ther.* 2024. No. 9(1). P. 273. DOI:10.1038/S41392-024-01977-Z,
9. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers / Gullestad L. et al. *Cardiology.* 2012. No. 122(1). P. 23–35. DOI:10.1159/000338166
10. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies / Octavia Y. et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2012. No. 52(6). P. 1213–1225. DOI:10.1016/j.yjmcc.2012.03.006
11. A new approach for the prevention and treatment of cardiovascular disorders. Molecular hydrogen significantly reduces the effects of oxidative stress / LeBaron T. W. et al. *Molecules.* 2019. No. 24(11). P. 2076. DOI:10.3390/molecules24112076
12. Hydrogen attenuates sepsis-associated encephalopathy by NRF2 mediated NLRP3 pathway inactivation / Xie K. et al. *Inflamm Res.* 2020. No. 69(7). P. 697–710. DOI:10.1007/s00011-020-01347-9
13. Hydrogen inhalation enhances autophagy via the AMPK/mTOR pathway, thereby attenuating doxorubicin-induced cardiac injury / Ma T. et al. *Int Immunopharmacol.* 2023. No. 119. P. 110071. DOI:10.1016/J.INTIMP.2023.110071
14. Proteasomal Degradation of TRAF2 Mediates Mitochondrial Dysfunction in Doxorubicin-Cardiomyopathy / Dhingra R. et al. *Circulation.* 2022. No. 146(12). P. 934. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058411
15. Hekmat A. S., Navabi Z., Alipanah H., Javanmardi K. Alamandine significantly reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2021. No. 40(10). P. 1781–1795. DOI:10.1177/09603271211010896
16. Hsp70 regulates the doxorubicin-mediated heart failure in Hsp70-transgenic mice / Naka K. K. et al. *Cell Stress Chaperones.* 2014. No. 19(6). P. 853. DOI:10.1007/S12192-014-0509-4
17. Eid B. G., El-Shitany N.A.E.A., Neamatallah T. Trimetazidine improved adriamycin-induced cardiomyopathy by downregulating TNF- $\alpha$ , BAX, and VEGF immunoexpression via an antioxidant mechanism. *Environ Toxicol.* 2021. No. 36(6). P. 1217–1225. DOI:10.1002/TOX.23120
18. Бобкова Л. С., Бухтіарова Т. А., Лук'янчук В. Д., Ядловський О. Є. Сигнальні, медіаторні та ефекторні механізми протизапальної дії лікарських препаратів і біологічно активних речовин різної природи. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2025. № 19(2). С. 115–135. DOI:10.33250/19.02.115
19. Amentoflavone mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing cardiomyocyte pyroptosis and inflammation through inhibition of the STING/NLRP3 signalling pathway / Fang G. et al. *Phytomedicine.* 2023. No. 117. P. 154922. DOI:10.1016/j.phymed.2023.154922
20. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel / Pieniżek A. et al. *Adv Med Sci.* 2013. No. 58(1). P. 104–111. DOI:10.2478/v10039-012-0063-1
21. Protective Effects of Omega-3 Supplementation against Doxorubicin-Induced Deleterious Effects on the Liver and Kidneys of Rats / Espírito Santo S. G. et al. *Molecules.* 2023. No. 28(7). P. 3004. DOI:10.3390/molecules28073004
22. Prasanna P. L., Renu K., Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci.* 2020. No. 250. P. 117599. DOI:10.1016/J.LFS.2020.117599
23. Френкель Ю. Д., Черно В. С., Костенко В. О. Індукція транскрипційного фактора Nrf2 пригнічує продукцію активних форм кисню і азоту в печінці щурів при моделюванні метаболічного синдрому за умов цілодобового освітлення. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії.* 2022. № 3. 22(1). С. 129–133. DOI:10.31718/2077-1096.22.1.129
24. Health position paper and redox perspectives – Bench to bedside transition for pharmacological regulation of NRF2 in noncommunicable diseases / Cuadrado A. et al. *Redox Biol.* 2025. No. 81. P. 103569. DOI:10.1016/J.REDOX.2025.103569
25. Anti-Ferroptotic Effects of Nrf2: Beyond the Antioxidant Response / Shakya A. et al. *Mol Cells.* 2023. No. 46(3). P. 165–175. DOI:10.14348/MOLCELLS.2023.0005
26. Shevchuk O. O., Posokhova E. A., Sakhno L. A., Nikolaev V. G. Theoretical ground for adsorptive therapy of anthracyclines cardiotoxicity. *Exp Oncol.* 2012. No. 34(4). P. 314–322.
27. Glorieux C., Calderon P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017. No. 398(10). P. 1095–1108. DOI:10.1515/HSZ-2017-0131/ASSET/GRAPHIC/J\_HSZ-2017-0131\_FIG\_001.JPG
28. Покотило О. О., Покотило О. С., Корда М. М. Ефекти біологічної дії молекулярного водню. *Медицина та клінічна хімія.* 2023. № (2). P. 102–121. DOI:10.11603/MCCH.2410-681X.2023.I2.13980
29. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro / Mukhopadhyay P. et al. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol.* 2009. No. 296(5). P. H1466–1483. DOI:10.1152/AJPHEART.00795.2008
30. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2007. No. 87(1). P. 315–424. DOI:10.1152/PHYSREV.00029.2006

## REFERENCES

- Denysova MV, Strutyns'ka NA, Mys' LA, Kor-kach YUP, Rozova KV, Sahach VF. Rozvytok mitokhon-drial'noyi dysfunktsiyi pry hostriy kardiotoksychniy diyi doksorubitsynu u doroslykh shchuriv [Development of mitochondrial dysfunction during acute cardiotoxic action of doxorubicin in adult rats]. *Fiziolohichnyy zhurnal*. 2023;69(6):3-14. Ukrainian.
- Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, De Felici M, Anderson RA, Klinger FG. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update*. 2019;25(6):673-693. DOI:10.1093/humupd/dmz027
- Mattioli R, Ilari A, Colotti B, Mosca L, Fazi F, Colotti G. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med*. 2023;93:101205. DOI:10.1016/J.MAM.2023.101205
- Vitale R, Marzocco S, Popolo A. Role of Oxidative Stress and Inflammation in Doxorubicin-Induced Cardio-toxicity: A Brief Account. *Int J Mol Sci*. 2024;25(13):7477. DOI:10.3390/IJMS25137477
- Li Y, Yan J, Yang P. The mechanism and therapeutic strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity: Role of programmed cell death. *Cell Stress Chaperones*. 2024;29(5):666. DOI:10.1016/J.CSTRES.2024.09.001
- Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett*. Published online 2019. DOI:10.1016/j.toxlet.2019.02.013
- Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kotat D, Ka-tu-zińska-Kotat Z, Celik I, Kontek R. Doxorubicin – An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*. 2023;12(4):659. DOI:10.3390/CELLS12040659
- Xie L, Xue F, Cheng C, Sui W, Zhang J, Meng L, Lu Y, Xiong W, Bu P, Xu F, Yu X, Xi B, Zhong L, Yang J, Zhang C, Zhang Y. Cardiomyocyte-specific knockout of ADAM17 alleviates doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibiting TNF $\alpha$ -TRAF3-TAK1-MAPK axis. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):273. DOI:10.1038/S41392-024-01977-Z
- Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*. 2012;122(1):23-35. DOI:10.1159/000338166
- Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(6):1213-1225. DOI:10.1016/j.jmcc.2012.03.006
- LeBaron TW, Kura B, Kalocayova B, Tribulova N, Slezak J. A new approach for the prevention and treatment of cardiovascular disorders. Molecular hydrogen significantly reduces the effects of oxidative stress. *Molecules*. 2019;24(11):2076. DOI:10.3390/molecules24112076
- Xie K, Zhang Y, Wang Y, Meng X, Wang Y, Yu Y, Chen H. Hydrogen attenuates sepsis-associated encephalopathy by NRF2 mediated NLRP3 pathway inactivation. *Inflamm Res*. 2020;69(7):697-710. DOI:10.1007/s00011-020-01347-9
- Ma T, Yang L, Zhang B, Lv X, Gong F, Yang W. Hydrogen inhalation enhances autophagy via the AMPK/mTOR pathway, thereby attenuating doxorubicin-induced cardiac injury. *Int Immunopharmacol*. 2023;119:110071. DOI:10.1016/J.INTIMP.2023.110071
- Dhingra R, Rabinovich-Nikitin I, Rothman S, Guberman M, Gang H, Margulets V, Jassal DS, Alagar-samy KN, Dhingra S, Valenzuela Ripoll C, Billia F, Diwan A, Javaheri A, Kirshenbaum LA. Proteasomal Degradation of TRAF2 Mediates Mitochondrial Dysfunction in Doxorubicin-Cardiomyopathy. *Circulation*. 2022;146(12):934. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058411
- Hekmat AS, Navabi Z, Alipanah H, Javanmardi K. Alamandine significantly reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2021;40(10):1781-1795. DOI:10.1177/09603271211010896
- Naka KK, Vezyraki P, Kalaitzakis A, Zerikiotis S, Michalis L, Angelidis C. Hsp70 regulates the doxorubicin-mediated heart failure in Hsp70-transgenic mice. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(6):853. DOI:10.1007/S12192-014-0509-4
- Eid BG, El-Shitany NAEA, Neamatallah T. Trimetazidine improved adriamycin-induced cardiomyo-pathy by downregulating TNF- $\alpha$ , BAX, and VEGF immunoexpression via an antioxidant mechanism. *Environ Toxicol*. 2021;36(6):1217-1225. DOI:10.1002/TOX.23120
- Bobkova LS, Bukhtiarova TA, Luk'yanchuk VD, Yadlovs'kyi OYE. Syhnal'ni, mediatorni ta efekturni mekha-nizmy proty zapal'noyi diyi likars'kykh preparativ i biolo-hichno aktyvnykh rehovyn riznoyi pryrody [Signaling, mediator and effector mechanisms of anti-inflammatory action of drugs and biologically active substances of various nature]. *Farmakolohiya ta likars'ka toksykolohiya*. 2025;19(2):115-135. Ukrainian. DOI:10.33250/19.02.115
- Fang G, Li X, Yang F, Huang T, Qiu C, Peng K, Wang Z, Yang Y, Lan C. Amentoflavone mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing cardiomyocyte pyroptosis and inflammation through inhibition of the STING/NLRP3 signalling pathway. *Phytomedicine*. 2023;117:154922. DOI:10.1016/j.phymed.2023.154922
- Pieniazek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwoździński K, Koceva-Chyta A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv Med Sci*. 2013;58(1):104-111. DOI:10.2478/v10039-012-0063-1
- Espírito Santo SG, Monte MG, Polegato BF, Barbisan LF, Romualdo GR. Protective Effects of Omega-3 Supplementation against Doxorubicin-Induced Deleterious Effects on the Liver and Kidneys of Rats. *Molecules*. 2023;28(7):3004. DOI:10.3390/molecules28073004
- Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci*. 2020;250:117599. DOI:10.1016/J.LFS.2020.117599
- Frenkel' YUD, Chernov VS, Kostenko VO. Induktsiya transkryptsynohoho faktora Nrf2 pryhnychuye produktsiyu aktyvnykh form kysnyu i azotu v pechintsi shchuriv pry mo-delyuvanni metabolichnoho syndromu za umov tsilodobovoho osvittleniya [Induction of the transcription factor Nrf2 suppresses the production of reactive oxygen and nitrogen species in the liver of rats in the modeling of metabolic syndrome under conditions of 24-hour lighting]. *Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visnyk Ukra-yins'koyi medychnoyi stomatolohichnoyi akademiyi*. 2022;

22(1):129-133. Ukrainian. DOI:10.31718/2077-1096.22.1.129

24. Cuadrado A, Cazalla E, Bach A, Bathish B, Naidu SD, DeNicola GM, Dinkova-Kostova AT, Fernández-Ginés R, Grochot-Przeczek A, Hayes JD, Kensler TW, León R, Liby KT, López MG, Manda G, Shivakumar AK, Hakomäki H, Moerland JA, Motohashi H, Rojo AI, Sykietis GP, Taguchi K, Valverde AM, Yamamoto M, Levonen AL. Health position paper and redox perspectives – Bench to bedside transition for pharmacological regulation of NRF2 in noncommunicable diseases. *Redox Biol.* 2025;81:103569. DOI:10.1016/J.REDOX.2025.103569

25. Shakya A, McKee NW, Dodson M, Chapman E, Zhang DD. Anti-Ferroptotic Effects of Nrf2: Beyond the Antioxidant Response. *Mol Cells.* 2023;46(3):165-175. DOI:10.14348/MOLCELLS.2023.0005

26. Shevchuk OO, Posokhova EA, Sakhno LA, Nikolaev VG. Theoretical ground for adsorptive therapy of anthracyclines cardiotoxicity. *Exp Oncol.* 2012;34(4):314-322.

27. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017;398(10):1095-1108. DOI:10.1515/HSZ-2017-0131/ASSET/GRAPHIC/J\_HSZ-2017-0131\_FIG\_001.JPG

28. Pokotylo OO, Pokotylo OS, Korda MM. Efekty biolohichnoyi diyi molekulyarnoho vodnyu [Effects of biological action of molecular hydrogen]. *Medychna ta klinichna khimiya.* 2023;(2):102-121. Ukrainian. DOI:10.11603/MCCH.2410-681X.2023.I2.13980

29. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátakai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C, Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2009; 296(5):H1466-1483. DOI:10.1152/AJPHEART.00795.2008

30. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315-424. DOI:10.1152/PHYSREV.00029.2006

**N. V. Zyhrii, O. O. Shevchuk**

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

## **MOLECULAR HYDROGEN AS A MODULATOR OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN DOXORUBICIN-INDUCED TOXICITY**

**SUMMARY.** Doxorubicin is an effective anthracycline widely used in chemotherapy, but its clinical use is limited by toxic side effects, especially cardiotoxicity associated with oxidative stress and inflammation. Molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties by selectively neutralizing hydroxyl radicals and peroxynitrite.

**The aim** – to investigate the effect of molecular hydrogen-enriched water on oxidative stress and inflammation in doxorubicin-induced toxicity in rats.

**Material and Methods.** The experiment was conducted on adult male rats randomized into four groups: control, doxorubicin (DOX), doxorubicin + hydrogen-enriched water (DOX+H<sub>2</sub>-water), and hydrogen-enriched water (H<sub>2</sub>-water). Intraperitoneal injections of doxorubicin were administered at a dose of 5 mg/kg, with a cumulative dose of 20 mg/kg. Rats were sacrificed on the 29th day of the experiment. Levels of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β), oxidative stress markers (MDA, 8-isoprostane, carbonyl groups), antioxidant enzyme activities (catalase, superoxide dismutase), and reduced glutathione content were measured.

**Results.** Doxorubicin significantly increased the level of pro-inflammatory cytokines, enhanced oxidative stress and elevated lipid and protein peroxidation: increased levels of MDA, 8-isoprostane, and protein carbonyl groups were observed. At the same time, the suppression of activity of catalase, superoxide dismutase and reduced glutathione levels confirmed the inhibition of antioxidant defense. Consumption of hydrogen-enriched water reduced pro-inflammatory cytokines by 33–35%, decreased oxidative stress markers, and improved antioxidant defense. Consumption of hydrogen-enriched water did not cause deviations in indices compared to control group animals.

**Conclusions.** Molecular hydrogen-enriched water effectively attenuates doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation by modulating the pro-oxidant-antioxidant balance and cytokines profile. This approach is promising as an adjunct therapy to reduce anthracycline antibiotic toxicity without compromising antitumor efficacy. Further research into the mechanisms of molecular hydrogen action in clinical settings is recommended.

**KEY WORDS:** molecular hydrogen; doxorubicin; oxidative stress; TNF-α; IL-1β; antioxidant defense; subchronic toxicity; rats.

Отримано 14.07.2025

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