

# ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ ПРОТЕЇНІВ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМУ РАКУ ЗА ВПЛИВУ 5-ФТОРУРАЦИЛУ І МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ

**О. О. Покотило, М. М. Корда**

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

**Ключові слова:**

молекулярний водень, 5-фторурацил, воднева вода, оксидативний стрес, колоректальний рак, карбонільні групи.

Клінічна та експериментальна патологія 2024. Т.23, №2 (88). С. 54-59.

DOI 10.24061/1727-4338.XXIII.2.88.2024.09

E-mail: olehpokotylo@gmail.com

**Мета роботи** – дослідити вплив води, насиченої молекулярним воднем, та 5-фторурацилу на вміст карбонільних груп окисно модифікованих протеїнів у сироватці крові білих щурів із колоректальним раком.

**Матеріал та методи.** Досліди проведено на 50 самцях білих щурів лінії Вістар. Тваринам моделювали колоректальний рак (КРР) шляхом підшкірного введення 1,2-диметилгідразину (ДМГ) в дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень впродовж 30 тижнів. 5-фторурацил вводили внутрішньоочеревинно 4 дні по 12 мг/кг і ще 4 дні через день по 6 мг/кг. Тварини споживали воду, збагачену молекулярним воднем в концентрації 0,6 ppm ad libitum. Евтаназію щурів проводили під тіопенталовим наркозом. Для дослідження використовували сироватку крові, в якій визначали вміст карбонільних груп колориметричним методом. Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета програмного забезпечення SPSS-22.

**Результати.** Встановлено, що моделювання колоректального раку призводило до збільшення вмісту карбонільних груп у сироватці крові щурів в 1,77 раза порівняно з інтактними тваринами. Вміст карбонільних груп у сироватці крові щурів із КРР, яким застосовували хіміотерапію шляхом введення 5-фторурацилу, зростав в 1,93 раза стосовно тварин інтактної групи та в 1,10 раза щодо тварин із КРР. Споживання води, насиченої молекулярним воднем, протягом 30 днів після моделювання КРР та введення 5-фторурацилу білим щурам призводило до зниження вмісту карбонільних груп у сироватці крові в 1,18 раза порівняно з тваринами з КРР, яким вводили 5-фторурацил та які не споживали води, насиченої молекулярним воднем.

**Висновок.** Застосування насиченої молекулярним воднем води є ефективним методом зменшення окисної модифікації білків у щурів із колоректальним раком за умов хіміотерапії 5-фторурацилом.

**Key words:**

molecular hydrogen, 5-fluorouracil, hydrogen water, oxidative stress, colorectal cancer, carbonyl groups.

Clinical and experimental pathology 2024. Vol.23, № 2 (88). P. 54-59.

## OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN COLORECTAL CANCER UNDER THE INFLUENCE OF 5-FLUOROURACIL AND MOLECULAR HYDROGEN

**O. O. Pokotylo, M. M. Korda**

Ternopil National Medical University named after I. Y. Gorbachevsky, Ternopil, Ukraine

**The aim of the study** – to investigate the effect of water saturated with molecular hydrogen and 5-fluorouracil on the content of carbonyl groups of oxidatively modified proteins in the blood serum of white rats with colorectal cancer.

**Material and Methods.** The experiments were conducted on 50 male Wistar rats. The animals were modeled with colorectal cancer (CRC) by subcutaneous injection of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) at a dose of 7.2 mg/kg body weight once a week for 30 weeks. 5-Fluorouracil was administered intraperitoneally for 4 days at 12 mg/kg and for another 4 days every other day at 6 mg/kg. Animals consumed water enriched with molecular hydrogen at a concentration of 0.6 ppm ad libitum. Rats were euthanized under thiopental anesthesia. Blood serum was used for the study, in which the content of carbonyl groups was determined by the colorimetric method. Statistical data processing was performed using the SPSS-22 software package.

**Results.** It was found that the modeling of colorectal cancer led to a 1.77-fold increase in the content of carbonyl groups in the blood serum of rats compared to intact animals. The content of carbonyl groups in the blood serum of rats with CRC treated with chemotherapy by administration of 5-fluorouracil increased 1.93 times compared to the intact group and 1.1 times compared to animals with CRC. Consumption of water saturated with molecular hydrogen 30 days after modeling CRC and administration of 5-fluorouracil to white rats led to a 1.18-fold decrease in the content of carbonyl groups in their blood serum compared to animals with CRC who were administered 5-fluorouracil but did not consume water saturated with molecular hydrogen.

**Conclusions.** The use of molecular hydrogen saturated water is an effective method of reducing oxidative modification of proteins in rats with colorectal cancer under 5-fluorouracil chemotherapy.

## Вступ

Колоректальний рак (КРР) є третьою основною причиною смертності від раку у світі, при якому помирають 3,2 % чоловіків та 2,6 % жінок [1]. При виявленні КРР на 1-й стадії виживання становить 91 %, проте загальна 5-річна виживаність становить лише 65 % [2]. Хірургічне видалення раку прямої кишки залишається актуальним методом лікування КРР. Проте безопераційні методи лікування теж є важливими у лікуванні і можуть вплинути на виживаність [3]. Відомо, що лікування 5-фторурацилом (5-FU) покращує виживання при різних видах раку, проте найбільший вплив препарату виявлено саме при колоректальному раку [4]. Активні метаболіти 5-FU порушують синтез як ДНК, так і РНК через механізм, що включає метаболічний шлях фолієвої кислоти [5]. На сьогодні зростає увага до молекулярного водню (H<sub>2</sub>), який був визнаний ефективним через його антиоксидантну та протизапальну дію [6]. Дослідження механізмів його дії також припускають потенційний протипухлинний ефект [7], зокрема і при хіміотерапії [8]. Відомо, що у патогенезі розвитку раку, в тому числі – колоректального, важливу роль відіграє окиснювальний стрес, який порушує баланс прооксидантної/антиоксидантної гомеостазу. Це призводить до окисної модифікації білків і посиленого утворення білкових карбонільних груп [9].

Отже, виходячи зі сказаного, важливим є порівняльний аналіз окремого впливу 5-фторурацилу та поєданого з молекулярним воднем на інтенсивність окиснювальної модифікації білків при експериментальному КРР.

## Мета дослідження

Оцінити вплив 5-фторурацилу окремо та комбіновано з водою, насиченою молекулярним воднем, на вміст карбонільних груп окисно модифікованих протеїнів у сироватці крові білих щурів із колоректальним раком.

## Матеріал та методи дослідження

Дослідження проведено у Центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України на 50 самцях білих щурів лінії Вістар. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію ТНМУ. Сформовано 5 експериментальних груп по 10 тварин у кожній: I група – інтактні тварини (щури цієї групи споживали водогінну воду впродовж 30 тижнів і 30 днів); II-група – щури, яким моделювали колоректальний рак (КРР) шляхом підшкірного введення 1,2-диметилгідразину (ДМГ) в дозі 7,2 мг/кг маси тіла 1 раз на тиждень впродовж 30 тижнів [10] і які ще 30 днів були в експерименті без ДМГ (щури цієї групи мали доступ до звичайної водогінної води); III група – щури із КРР, який моделювали впродовж 30 тижнів, після чого їм вводили 5-фторурацил (5-ФУ) внутрішньоочеревинно 4 дні по 12 мг/кг і ще 4 дні – через день по 6 мг/кг [11], після чого ще 11 днів тварини були в експерименті без додаткових втручань (тварини цієї групи споживали водогінну воду впродовж усього експерименту); IV група – щури, яким

моделювали КРР впродовж 30 тижнів і які споживали водогінну воду впродовж тих же 30 тижнів, а далі 30 днів без введення ДМГ споживали воду, збагачену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm; V група – щури із КРР, який моделювали впродовж 30 тижнів, потім їм вводили 5-ФУ внутрішньоочеревинно 4 дні по 12 мг/кг і ще 4 дні через день по 6 мг/кг та ще 11 днів вони були в експерименті без додаткових втручань (тварини цієї групи споживали воду, збагачену молекулярним воднем в концентрації 0,6 ppm, 30 днів після моделювання КРР).

Тварини під час експерименту мали доступ до звичайної води і води, насиченої молекулярним воднем, *ad libitum*. Воду, насичену молекулярним воднем, готували безпосередньо у напувалках щурів, в які поміщали 8 магнієвих паличок (довжина 5 см, діаметр 14 мм). Після приготування таких напувалок через 15 хв вміст молекулярного водню становив 0,6 ppm і їх встановлювали у клітки з тваринами. Вміст молекулярного водню визначали сертифікованим H<sub>2</sub>-метром ENH-100 (Amtast, USA). Напувалки замінювали кожних 2 дні для всіх груп тварин.

Утримання тварин та проведення експерименту здійснювали згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [12]. Щурів виводили із експерименту шляхом евтаназії під тіопенталовим наркозом. Кров забирали із серця тварин, центрифугували її при частоті обертання 1100 g упродовж 30 хв. Для дослідження використовували сироватку крові.

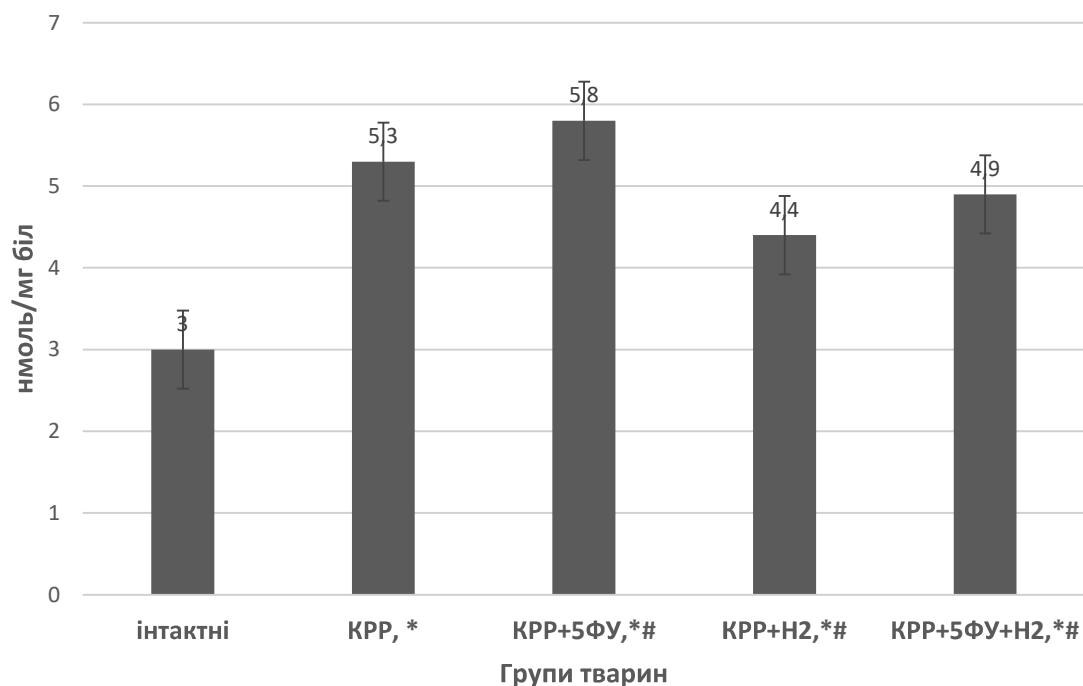
Концентрацію білка у сироватці крові оцінювали за методом Lowry et al. [13]. Рівень протеїн-карбонілу в сироватці вимірювали за допомогою аналітичного набору Elabscience (набір Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit, E-BC-K117-S, Elabscience Biotechnology Inc., Texas, USA) відповідно до інструкцій виробника [14].

Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета програмного забезпечення SPSS-22 [15]. Різницю між групами проаналізовано відповідно до t-критерію Стьюдента і непараметричного критерію Вілкоксона для зв'язаних вибірок. Розбіжності вважали вірогідними при  $p \leq 0,05$ .

## Результати та їх обговорення

Результати дослідження за різних умов експерименту засвідчують про зміни вмісту карбонільних груп, які прореагували з ДМГ.

Представлені на рис. 1 дані демонструють, що вміст карбонільних груп у тварин II групи з КРР, який становив 5,3 нмоль/мг білку, в 1,77 раза більший, ніж у тварин інтактної групи. Такий результат засвідчує, що підшкірне введення ДМГ у дозі 7,2 мг/кг маси тіла тварин 1 раз на тиждень впродовж 30 тижнів призводить до посилення окиснювальної модифікації білків, про що засвідчує достовірне збільшення вмісту карбонільних груп у сироватці крові тварин ( $P \leq 0,05$ ). Отже, ДМГ є ефективним засобом для хімічно індукованого канцерогенезу товстої кишки у щурів, що підтверджується іншими дослідниками і може використовуватися в якості експериментальної моделі [10].



**Рис. 1.** Вміст карбонільних груп у сироватці крові білих щурів із колоректальним раком, нмоль/мг білка, (M±m, n=10)

Примітка: \* – зміни достовірні порівняно з тваринами інтактної групи ( $P \leq 0,05$ ); # – зміни достовірні порівняно з тваринами II групи ( $P \leq 0,05$ )

У сироватці крові білих щурів з колоректальним раком III групи, яким вводили 5-фторурацил, вміст карбонільних груп в кінці експерименту становив 5,8 нмоль/мг білка, що в 1,93 раза більше, ніж у інтактних тварин I групи та в 1,10 раза більше, ніж у тварин II групи з KPP. Отримані дані засвідчують, що введення тваринам із KPP препарату 5-ФУ як протиракового засобу має певний негативний вплив на окиснювальну модифікацію білків, що проявляється зростанням вмісту карбонільних груп у сироватці крові тварин, порівняно із тваринами з KPP, яким 5-ФУ не вводили. Незважаючи на те, що 5-ФУ відноситься до найбезпечніших хімотерапевтичних засобів, певні побічні та токсичні його ефекти все ще виникають у частки пацієнтів із KPP, що засвідчено у ряді досліджень [16, 17]. Вважають, що основний молекулярний механізм дії цитотоксичного препарату 5-фторурацилу є результатом інгібування тимідилатсинтази. Останні відкриття, пов'язані з функцією урацил-5-метилтрансферази і її взаємодією з метаболітами 5-ФУ, включеними в тРНК, дають змогу припустити гіпотезу цитотоксичності 5-ФУ [18]. Очевидно, таким чином можна пояснити зростання вмісту карбонільних у сироватці крові тварин із KPP, яким вводили 5-ФУ.

Вивчення впливу молекулярного водню як засобу корекції окиснювальної модифікації білків у тварин із KPP здійснювали через споживання ними води, насиченої молекулярним воднем. Отже, вміст карбонільних груп у сироватці крові білих щурів з колоректальним раком, які споживали воду, насичену молекулярним воднем впродовж 30 днів після введенням ДМГ, становив 4,4 нмоль/мг білка. Це в 1,23 раза нижче ( $P \leq 0,05$ ), ніж у тварин II групи з KPP, які споживали водогінну воду та в 1,32 раза

нижче ( $P \leq 0,05$ ), ніж у тварин III групи з KPP, яким вводили 5-ФУ. Отримані результати засвідчують про здатність насиченої воднем води впливати на окисну модифікацію білків і зменшувати вміст карбонільних груп у тварин з експериментально модельованим KPP. Очевидно, що встановлений ефект можна пояснити відомою антиоксидантною роллю молекулярного водню при різних патологічних станах, зокрема і при раку [19, 20].

Відомо, що онкологічний процес супроводжується збільшенням різних активних форм кисню [21]. Найбільш небезпечним є гідроксильний радикал (ОН), вміст якого найвищий при оксидативному стресі, а також проти якого організм не має селективних антиоксидантних ферментів [22]. Також встановлено, що одним із найважливіших антиоксидантних механізмів дії молекулярного водню є його нейтралізація гідроксильного радикалу [6, 23]. Отже, молекулярний водень, зменшуючи рівень гідроксильного радикалу, може знижувати окиснювальну модифікацію білків. Як результат, зменшується вміст карбонільних груп у сироватці крові білих щурів IV групи з KPP.

Результати комбінованого впливу 5-ФУ та молекулярного водню на вміст карбонільних груп у сироватці крові білих щурів представлено у V групі тварин, у яких вміст карбонільних груп становив 4,9 нмоль/мг білка. Цей показник в 1,18 раза менший ( $P \leq 0,05$ ), ніж у тварин III групи з KPP, яким вводили 5-ФУ та які не споживали води, насиченої молекулярним воднем.

З отриманих даних можна зробити висновок, що споживання води, насиченої молекулярним воднем із концентрацією 0,6 ppm тваринами з KPP, яким вводили 5-ФУ, зменшує ступінь окиснювальної

модифікації білків в їх організмі, що проявляється зниженням вмісту карбонільних груп у сироватці їх крові.

### Висновки

1. Моделювання КРР шляхом введення 1,2-диметилгідрозину в дозі 7,2 мг/кг маси тіла білим щурам впродовж 30 тижнів призводило до збільшення вмісту карбонільних груп у сироватці їх крові в 1,77 раза порівняно з інтактними тваринами.

2. Вміст карбонільних груп у сироватці крові білих щурів із КРР, яким вводили 5-ФУ, в кінці експерименту становив 5,8 нмоль/мг білка, що в 1,93 раза перевищує показник у тварин інтактної групи та в 1,1 раза – у тварин із КРР.

3. Вміст карбонільних груп у сироватці крові білих щурів із колоректальним раком, які споживали воду, насичену молекулярним воднем впродовж 30 днів після введенням ДМГ, в 1,23 раза нижчий, ніж у тварин із КРР, які споживали водогінну воду та в 1,32 рази нижчий, ніж у тварин із КРР, яким вводили 5-ФУ.

4. Споживання води, насиченої молекулярним воднем, має позитивний вплив на вміст карбонільних груп у сироватці крові білих щурів із колоректальним раком, яким вводили 5-ФУ, про що засвідчує зниження цього показника порівняно з тваринами з КРР, яким вводили 5-ФУ та які не споживали води, насиченої молекулярним воднем.

### Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується вивчити стан антиоксидантної системи у тварин із КРР за умов хіміотерапії та споживання води, насиченої молекулярним воднем.

### Список літератури

- Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072
- National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer* [Internet]. New York: National Cancer Institute; 2023[cited 2024 Jun 20]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
- Benitez Majano S, Di Girolamo C, Rachet B, Maringe C, Guren MG, Glimelius B, et al. Surgical treatment and survival from colorectal cancer in Denmark, England, Norway, and Sweden: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):74-87. doi: 10.1016/s1470-2045(18)30646-6
- Afzal S, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Matsen JP, Sorensen JB, et al. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1660-6. doi: 10.1093/annonc/mdp046
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):330-8. doi: 10.1038/nrc1074
- Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:586-94. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.006
- Hirano SI, Aoki Y, Li XK, Ichimaru N, Takahara S, Takefuji Y. Protective effects of hydrogen gas inhalation on radiation-induced bone marrow damage in cancer patients: a retrospective observational study. *Med Gas Res* 2021;11(3):104-9. doi: 10.4103/2045-9912.314329
- Runtuwene J, Amitani H, Amitani M, Asakawa A, Cheng KC, Inui A. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. *PeerJ* [Internet]. 2015[cited 2024 Jun 20];3: e859. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4393812/pdf/peerj-03-859.pdf> doi: 10.7717/peerj.859
- Akagawa M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*. 2021;55(4):307-20. doi: 10.1080/10715762.2020.1851027
- Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011[cited 2024 Jun 17];2011:473964. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3018655/pdf/JBB2011-473964.pdf> doi: 10.1155/2011/473964
- Kensara OA, El-Shemi AG, Mohamed AM, Refaat B, Idris S, Ahmad J. 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*. 2016;10:2239-53. doi: 10.2147/dddt.s109721
- Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53 p.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
- Luo S, Wehr NB. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*. 2013;14(4):159-66. doi: 10.1179/135100009x392601
- Okeh UM. Statistical problems in medical research. *East Afr J Public Health*. 2009;6(Suppl 1):1-7. doi: 10.4314/eajph.v6i3.45762
- Vodenkova S, Buchle T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2020[cited 2024 Jun 17];206:107447. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725819301998?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107447
- Hou Y, Zhang F, Zong J, Li T, Gan W, Lv S, et al. Integrated analysis reveals a novel 5-fluorouracil resistance-based prognostic signature with promising implications for predicting the efficacy of chemotherapy and immunotherapy in patients with colorectal cancer. *Apoptosis*. 2024;2:38-47. doi: 10.1007/s10495-024-01981-2
- Hussain S. On a New Proposed Mechanism of 5-Fluorouracil-Mediated Cytotoxicity. *Trends in Cancer*. 2020;6(5):365-8. doi: 10.1016/j.trecan.2020.02.009
- Slezák J, Kura B, Frimmel K, Zálešák M, Ravingerová T, Vicenczová C, et al. Preventive and therapeutic application of molecular hydrogen in situations with excessive production of free radicals. *Physiol Res*. 2016;65(Suppl 1): S11-28. doi: 10.33549/physiolres.933414
- Singh RB, Sumbalova Z, Fatima G, Mojto V, Fedacko J, Tarnava A, et al. Effects of Molecular Hydrogen in the Pathophysiology and Management of Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Rev Cardiovasc Med* [Internet]. 2024[cited 2024 Jun 20];25(1):33. Available from: <https://article.imrpess.com/journal/RCM/25/1/10.31083/j.rcm2501033/31b1fd877f3c36d066a67678b7d97eea.pdf> doi: 10.31083/j.rcm2501033
- Sreevalsan S, Safe S. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2013;9(4):350-7. doi: 10.1007/s11888-013-0190-5

22. Ayla O, Metin O. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. In: Thatha Gowder SJ, editor. Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. Rijeka: Croatia Intech Open; 2015.

23. Покотило ОС, Покотило ОО, Корда ММ. Ефекти біологічної дії молекулярного водню. Медична та клінічна хімія. 2023;25(2):102-21. doi: 10.11603/mcch.2410-681x.2023.i2.13980

#### References

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072

2. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer Stat Facts: Colorectal Cancer [Internet]. New York: National Cancer Institute; 2023[cited 2024 Jun 20]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>

3. Benitez Majano S, Di Girolamo C, Rachet B, Maringe C, Guren MG, Glimelius B, et al. Surgical treatment and survival from colorectal cancer in Denmark, England, Norway, and Sweden: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):74-87. doi: 10.1016/s1470-2045(18)30646-6

4. Afzal S, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Matsen JP, Sorensen JB, et al. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1660-6. doi: 10.1093/annonc/mdp046

5. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):330-8. doi: 10.1038/nrc1074

6. Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:586-94. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.05.006

7. Hirano SI, Aoki Y, Li XK, Ichimaru N, Takahara S, Takefuji Y. Protective effects of hydrogen gas inhalation on radiation-induced bone marrow damage in cancer patients: a retrospective observational study. *Med Gas Res* 2021;11(3):104-9. doi: 10.4103/2045-9912.314329

8. Runtuwene J, Amitani H, Amitani M, Asakawa A, Cheng KC, Inui A. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. *PeerJ* [Internet]. 2015[cited 2024 Jun 20];3: e859. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4393812/pdf/peerj-03-859.pdf> doi: 10.7717/peerj.859

9. Akagawa M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*. 2021;55(4):307-20. doi: 10.1080/10715762.2020.1851027

10. Perse M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011[cited 2024 Jun 17];2011:473964. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3018655/pdf/JBB2011-473964.pdf> doi: 10.1155/2011/473964

11. Kensara OA, El-Shemi AG, Mohamed AM, Refaat B, Idris S, Ahmad J. 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*. 2016;10:2239-53. doi: 10.2147/dddt.s109721

12. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53 p.

13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

14. Luo S, Wehr NB. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*. 2013;14(4):159-66. doi: 10.1179/135100009x392601

15. Okeh UM. Statistical problems in medical research. *East Afr J Public Health*. 2009;6(Suppl 1):1-7. doi: 10.4314/eajph.v6i3.45762

16. Vodenkova S, Buchle T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2020[cited 2024 Jun 17];206:107447. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725819301998?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107447

17. Hou Y, Zhang F, Zong J, Li T, Gan W, Lv S, et al. Integrated analysis reveals a novel 5-fluorouracil resistance-based prognostic signature with promising implications for predicting the efficacy of chemotherapy and immunotherapy in patients with colorectal cancer. *Apoptosis*. 2024;2:38-47. doi: 10.1007/s10495-024-01981-2

18. Hussain S. On a New Proposed Mechanism of 5-Fluorouracil-Mediated Cytotoxicity. *Trends in Cancer*. 2020;6(5):365-8. doi: 10.1016/j.trecan.2020.02.009

19. Slezák J, Kura B, Frimmel K, Zálešák M, Ravingerová T, Vicenczová C, et al. Preventive and therapeutic application of molecular hydrogen in situations with excessive production of free radicals. *Physiol Res*. 2016;65(Suppl 1): S11-28. doi: 10.33549/physiolres.933414

20. Singh RB, Sumbalova Z, Fatima G, Mojto V, Fedacko J, Tamava A, et al. Effects of Molecular Hydrogen in the Pathophysiology and Management of Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Rev Cardiovasc Med* [Internet]. 2024[cited 2024 Jun 20];25(1):33. Available from: <https://article.imrpres.com/journal/RCM/25/1/10.31083/j.rcm2501033/31b1fd877f3c36d066a67678b7d97eea.pdf> doi: 10.31083/j.rcm2501033

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

22. Ayla O, Metin O. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. In: Thatha Gowder SJ, editor. Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. Rijeka: Croatia Intech Open; 2015.

23. Pokotylo OO, Pokotylo OS, Korda MM. Efekty biolohichnoi dii molekuliarnoho vodniu [Effects of biological action of molecular hydrogen]. *Medical and Clinical Chemistry*. 2023;25(2):102-21. doi: 10.11603/mcch.2410-681x.2023.i2.13980 (in Ukrainian)

#### Інформація про авторів:

Покотило О. О. – аспірант кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету, м. Тернопіль, Україна.

E-mail: [olehpokotylo@gmail.com](mailto:olehpokotylo@gmail.com)

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-3285-6892>

Корда М. М. – доктор медичних наук, професор, ректор Тернопільського національного медичного університету, м. Тернопіль, Україна.

E-mail: [rector@tdmu.edu.ua](mailto:rector@tdmu.edu.ua)

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0676-336X>

**Information about authors:**

Pokotylo O. O. – Postgraduate student of the Department of Medical Biochemistry, Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine.

E-mail: olehpokotylo@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-3285-6892>

Korda M. M. – MD, Ph.D., DSc, Professor, Rector of Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine.

E-mail: rector@tdmu.edu.ua

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0676-336X>

*Стаття надійшла до редакції 14.06.2024.*

*© О. О. Покотило, М. М. Корда*

