

УДК 616.351-006.04-076.6:543.272.2
DOI: 10.24061/1727-0847.24.1.2025.12

О. О. Покотило, С. Б. Крамар*, М. М. Корда

*Кафедри медичної біохімії (зав. – д.мед.н. С. Р. Підручна); *гістології та ембріології (зав. – проф. З. М. Небесна) Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України*

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ОЦІНКА ПОТЕНЦІАЛУ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМУ РАКУ

Резюме. Колоректальний рак (КРР) є однією з провідних причин онкологічної смертності. Сьогодні активно досліджуються нові стратегії, які могли б покращити якість життя хворих на КРР. Увагу привертає молекулярний водень, як біологічно активна молекула, здатна зменшувати оксидативний стрес, модулювати сигнальні шляхи, пов'язані із запаленням, проліферацією та активністю імунних клітин, і впливати на мікросередовище пухлини.

Мета. За допомогою імуногістохімічних досліджень на моделі КРР у щурів з'ясувати як збагачена молекулярним воднем вода впливає на маркери імунних клітин, запалення, проліферації та клітинного циклу. **Матеріал і методи.** Тварин поділили на три групи: 1-а – контроль; 2-а – щурі, яким моделювали КРР шляхом введення 1,2-ДМГ упродовж 30 тижнів і які мали доступ до звичайної води; 3-я – тварини, яким моделювали КРР і які споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm. Для імуногістохімічної детекції цільових молекул в стінці кишок були використані антитіла до CD4+, CD8+, CD20+, CD68+ клітин, TNF- α , Ki-67 і p53.

Результати. Відсоткове значення кількості Т-хелперів (CD4+) у стінці товстої кишки тварин з КРР перевищувало інтактний показник у 11,02 раза, Т-кілерів (CD8+) – у 3,33 раза, В-лімфоцитів (CD20+) – в 11,41 раза, кількість популяції макрофагів (CD68+) в аберантних осередках збільшувалася в 11,28 раза, відсоток експресії TNF- α – у 16,72 раза ($p < 0,001$ у всіх випадках). За умов моделювання канцерогенезу також збільшувався індекс проліферативної активності клітин (показник Ki-67 перевищував норму у 2,38 раза ($p < 0,001$)) і показник інтенсивності клітинного циклу (рівень p53 був більшим від інтактного показника у 6,85 раза ($p < 0,001$)).

У тварин з КРР, які споживали воду, збагачену молекулярним воднем, порівняно з щурами без корекції спостерігалось незначне зменшення CD4+ і CD20+-клітин у стінці товстої кишки і невелике підвищення CD8+-клітин. Середні значення експресії CD68 і TNF- α у тварин 3-ї групи були достовірно меншими порівняно з аналогічними показниками у 2-й групі тварин – в 1,33 та у 1,22 раза відповідно. У той час, статистично значущої різниці між експресією Ki-67 і p53 у стінці товстої кишки тварин 2-ї та 3-ї груп не виявлено.

Висновок. Молекулярний водень сприяє адаптивному протипухлинному імунітету, посилює активність цитотоксичних CD8+ клітин, здатних знищувати пухлинні клітини, ефективно зменшує запалення (CD68+, TNF- α), але не впливає на проліферацію (Ki-67) чи накопичення p53, що вказує на його допоміжну роль у модуляції мікросередовища, а не основних онкогенних процесів у моделі КРР в щурів.

Ключові слова: колоректальний рак, молекулярний водень, імуногістохімія, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, TNF- α , Ki-67, p53.

Колоректальний рак (КРР) є однією з провідних причин онкологічної захворюваності та смертності у світі, займаючи третє місце за частотою серед злоякісних новоутворень і друге за летальністю [1, 2]. Ця патологія характеризується складним патогенезом, у якому ключову роль відіграють хронічне запалення, порушення клітинної проліферації та дисрегуляція імунної відповіді [3-5]. Сучасні методи лікування, такі як хірургічне втручання, хіміотерапія

та таргетна терапія, значно покращили виживаність пацієнтів, однак у багатьох випадках їх ефективність залишається обмеженою через резистентність пухлин, побічні ефекти та рецидиви захворювання. У зв'язку з цим наукова спільнота активно досліджує нові терапевтичні стратегії, які могли б доповнити існуючі підходи та покращити якість життя хворих.

Останніми роками молекулярний водень (H_2) привертає увагу дослідників як біологічно активна

молекула з вираженими антиоксидантними, протизапальними та цитопротекторними властивостями [6-8]. Завдяки своїй малій молекулярній масі та нейтральному заряду, H_2 здатен легко проникати через клітинні мембрани, вибірково нейтралізуючи реактивні форми кисню (РФК), які відіграють важливу роль у канцерогенезі. Збагачена молекулярним воднем вода стала зручним і безпечним способом доставки цього агента в організм, що робить її перспективним кандидатом для використання в клінічній практиці. Попередні дослідження показали, що молекулярний водень може зменшувати оксидативний стрес, модулювати сигнальні шляхи, пов'язані із запаленням, проліферацією та активністю імунних клітин, і впливати на мікросередовище пухлини, що відкриває нові можливості для його застосування при онкологічних захворюваннях, зокрема КРР [9, 10].

Особливу цінність у вивченні ефектів збагаченої молекулярним воднем води мають імуногістохімічні методи, які дозволяють детально оцінити зміни в тканинах пухлини на молекулярному рівні. Такі маркери, як TNF- α , CD68+, що відображають інтенсивність запальних процесів, Ki-67, як показник проліферативної активності клітин, p53, як показник, який відображає стан клітинного циклу та апоптоз, а також CD4+, CD8+, CD20+, як індикатори імунної інфільтрації, є ключовими для розуміння патологічних механізмів КРР та оцінки терапевтичного потенціалу нових агентів. Дослідження цих показників у контексті дії молекулярного водню може пролити світло на його здатність впливати на пухлинне мікросередовище, пригнічувати прогресію захворювання та посилювати протипухлинну імунну відповідь.

Мета дослідження: аналіз результатів експериментального застосування збагаченої молекулярним воднем води в моделі колоректального раку з акцентом на імуногістохімічні показники. Ми прагнули з'ясувати, як H_2 впливає на маркери запалення, проліферації та імунних клітин, що дасть можливість оцінити його потенціал як ад'ювантного засобу в лікуванні КРР.

Результати цього дослідження можуть стати важливим кроком у розробці нових стратегій терапії, спрямованих на підвищення ефективності боротьби з КРР, а також слугувати основою для подальших клінічних випробувань.

Матеріал і методи. Для експерименту використано 90 білих щурів-самців лінії Вістар, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин розподілили на три групи по десять щурів у кожній: 1-а – контрольна (щури цієї групи споживали водопровідну воду впродовж 30 тижнів); 2-а – тварини, яким моделювали КРР шля-

хом підшкірного введення 1,2-диметилгідазину (ДМГ) упродовж 30 тижнів (щури цієї групи мали доступ до звичайної водопровідної води впродовж 30 тижнів); 3-я – тварини, яким моделювали КРР упродовж 30 тижнів та які споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm, упродовж тих же 30 тижнів. 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 – 5,0 см, діаметр – 14,0 мм). Після приготування таких поїлок через 15 хв вміст молекулярного водню становив 0,6 ppm, і тоді їх ставили у клітки з тваринами. Вміст молекулярного водню визначали сертифікованим H_2 -метром ENH-100 («Amtast», США).

Аденокарциному товстої кишки моделювали введенням диметилгідазину 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 [11].

Евтаназію тварин проводили на 211 день експерименту.

Імуногістохімічні дослідження. Для імуногістохімічних досліджень парафінові зрізи товстої кишки товщиною 4 мкм піддавали процесу депарафінізації та відновлення антигенів у буферній системі з низьким (6) або високим (9) pH Target Retrieval Solution (Agilent Technologies, США) в гістопротекторі KOS (Milestone, Італія).

Для імуногістохімічної детекції цільових молекул були використані наступні первинні антитіла:

- кролячі рекомбінантні первинні антитіла Anti-CD4 (ab237722, Abcam, США) для субпопуляції CD4+ клітин;
- мишачі моноклональні первинні антитіла Anti-CD8 (ab33786, Abcam, США) для субпопуляції CD8+ клітин;
- кролячі рекомбінантні первинні антитіла Anti-CD20 (ab64088, Abcam, США) для субпопуляції CD20+ клітин;
- кролячі рекомбінантні первинні антитіла Anti-CD68 (ab303565, Abcam, США) для популяції CD68+ клітин;
- мишачі моноклональні первинні антитіла Anti-TNF alpha (ab220210, Abcam, США) для детекції фактору некрозу пухлин TNF- α ;
- кролячі рекомбінантні первинні антитіла Anti-Ki-67 (ab16667, Abcam, США) для Ki-67+ клітин;

- кролячі поліклональні первинні антитіла Anti-p53 (ab131442, Abcam, США) для p53+ клітин.

У протоколі імуногістохімічного фарбування застосовували полімерну систему детекції Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAВ (Diagnostic BioSystems, США). Зрізи контрастно дофарбовували гематоксиліном Майєра (Biognost, Хорватія) і аналізували за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse Ci-E (Nikon, Японія) та фотодокументували цифровою камерою Sigeta M3CMOS 14000. Заміри проводили за допомогою програмного забезпечення TourView. Для кількісного вираження результатів імуногістохімічних досліджень зафотодокументовані гістограми обробляли за допомогою програми ImageJ та за допомогою функцій «Colour Deconvolution», «Threshold», «Analyze Measure» обраховували відсоток експресії цільових молекул.

Для отриманих даних в межах однієї групи визначали значення середнього арифметичного (M), похибки середнього арифметичного (m) і стандартне відхилення (σ). Достовірність різниці між даними визначалася при нормальному розподілі за t -критерієм Стьюдента. Різниця вважалася достовірною при значенні $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Імуногістохімічні дослідження експресії білка CD4 (маркер Т-хелперів) у стінці товстої кишки інтактної групи тварин показали наявність ($3,02 \pm 0,46$) % CD4+-клітин. Середнє відсоткове значення CD8+-клітин, що є Т-кілерами та володіють цитотоксичною активністю по відношенню до ракових клітин, становило ($1,86 \pm 0,14$) % у цій групі. Середній відсоток В-лімфоцитів у стінці товстої кишки інтактних тварин, що представлені CD20+-клітинами, мав значення ($2,54 \pm 0,21$) % (рис. 1, табл. 1).

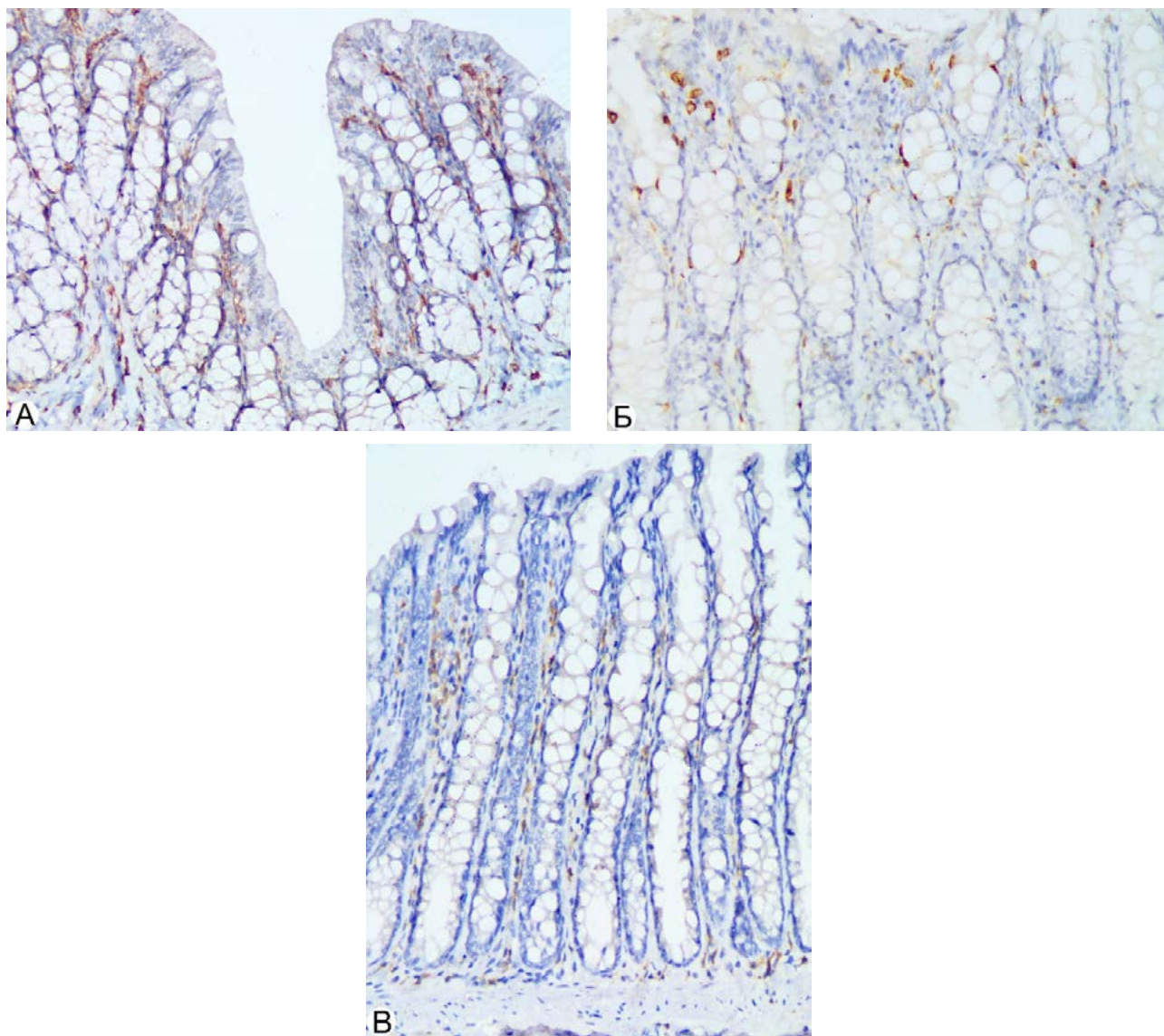


Рис. 1. Імуногістохімічна детекція CD4+- (А), CD8+- (Б), CD20+- (В) клітин у слизовій оболонці стінки товстої кишки інтактних білих щурів. ІГХ-метод (200х)

Таблиця 1

Відсоткові значення експресії маркерів CD4+-, CD8+-, CD20+- у стінці товстої кишки щурів різних експериментальних груп

Група	CD4+, %	CD8+, %	CD20+, %
1	3,02±0,46	1,86±0,14	2,54±0,21
2	33,32±2,12*	6,19±0,61*	28,97±2,03*
3	27,95±1,78*	10,62±1,74*	21,62±2,31*

Примітка. * – величини, які статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняються від показників інтактної групи тварин

Згідно кількісного аналізу результатів імуногістохімічних досліджень, середній відсоток макрофагів (CD68+-клітин) у стінці товстої кишки інтактних тва-

рин становив (2,37±0,21) %. Експресія маркера фактору некрозу пухлин (TNF- α) у досліджуваних тканинах відповідала значенню (2,48±0,63) % (рис. 2, табл. 2).

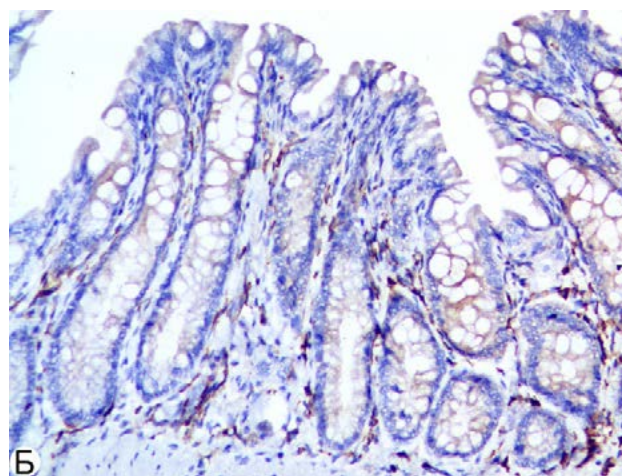
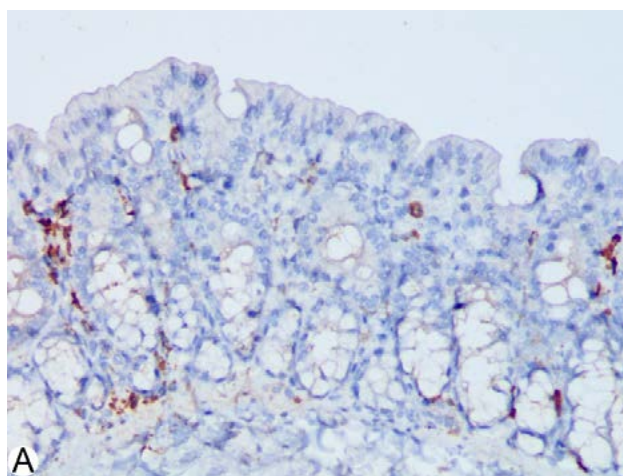


Рис. 2. Експресія прозапальних маркерів CD68 (А) та TNF- α (Б) у слизовій оболонці стінки товстої кишки інтактних білих щурів. ІГХ-метод (200х)

Експресія білка Ki-67 у даній дослідній групі становила в середньому (15,03±1,12) % і в основному спостерігалася на дні крипт, адже саме ці ділянки є місцями з високою проліферативною активністю епітеліоцитів, що забезпечують ре-

генерацію епітеліальної пластинки слизової оболонки товстої кишки. Відсоткові значення рівня білка p53, який регулює клітинний цикл, зупиняючи його при пошкодженнях ДНК, були рівними (2,07±0,52) % (рис. 3, табл. 2).

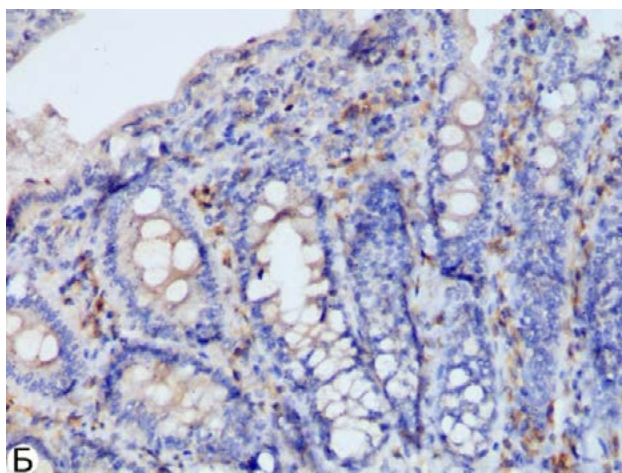
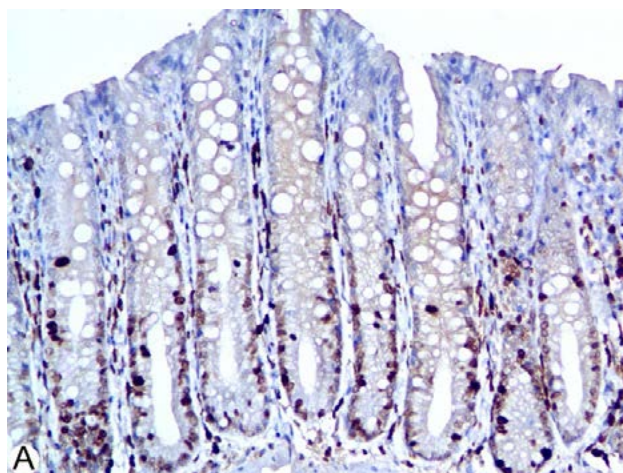


Рис. 3. Експресія маркера проліферативної активності Ki-67 (А) та регулятора клітинного циклу p53 (Б) у слизовій оболонці стінки товстої кишки інтактних білих щурів. ІГХ-метод (200х)

Таблиця 2

Відсоткові значення експресії маркерів CD68, TNF- α , Ki-67, p53 у стінці товстої кишки білих щурів різних експериментальних груп

Група	CD68+, %	TNF- α , %	Ki-67, %	p53, %
1	2,37 $\pm$ 0,21	2,48 $\pm$ 0,63	15,03 $\pm$ 1,12	2,07 $\pm$ 0,52
2	26,74 $\pm$ 2,34*	41,46 $\pm$ 3,11*	35,76 $\pm$ 2,39*	14,17 $\pm$ 1,03*
3	20,15 $\pm$ 1,14* [@]	34,12 $\pm$ 2,06* [@]	31,04 $\pm$ 1,47*	11,74 $\pm$ 0,78*

Примітка. * – величини, які статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняються від показників інтактної групи тварин; @ – зміни статистично достовірні ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин 2-ї групи

Імуногістохімічні дослідження, проведені з метою детекції субпопуляцій Т-лімфоцитів у стінці товстої кишки після 30-ти тижневого моделювання КРР, показали суттєве зростання чисельності цих клітин у слизовій оболонці та підслизовій основі (рис. 4). Так, середнє відсоткове значення кількості Т-хелперів перевищувало ін-

тактний показник у 11,02 раза ($p < 0,001$). Середня кількість Т-кілерів у стінці товстої кишки тварин цієї групи також істотно (у 3,33 раза, $p < 0,001$) перевищувала показник інтактних тварин, а середнє значення кількості В-лімфоцитів перевищувало показник норми в 11,41 раза ($p < 0,001$) (рис. 4, табл. 1).

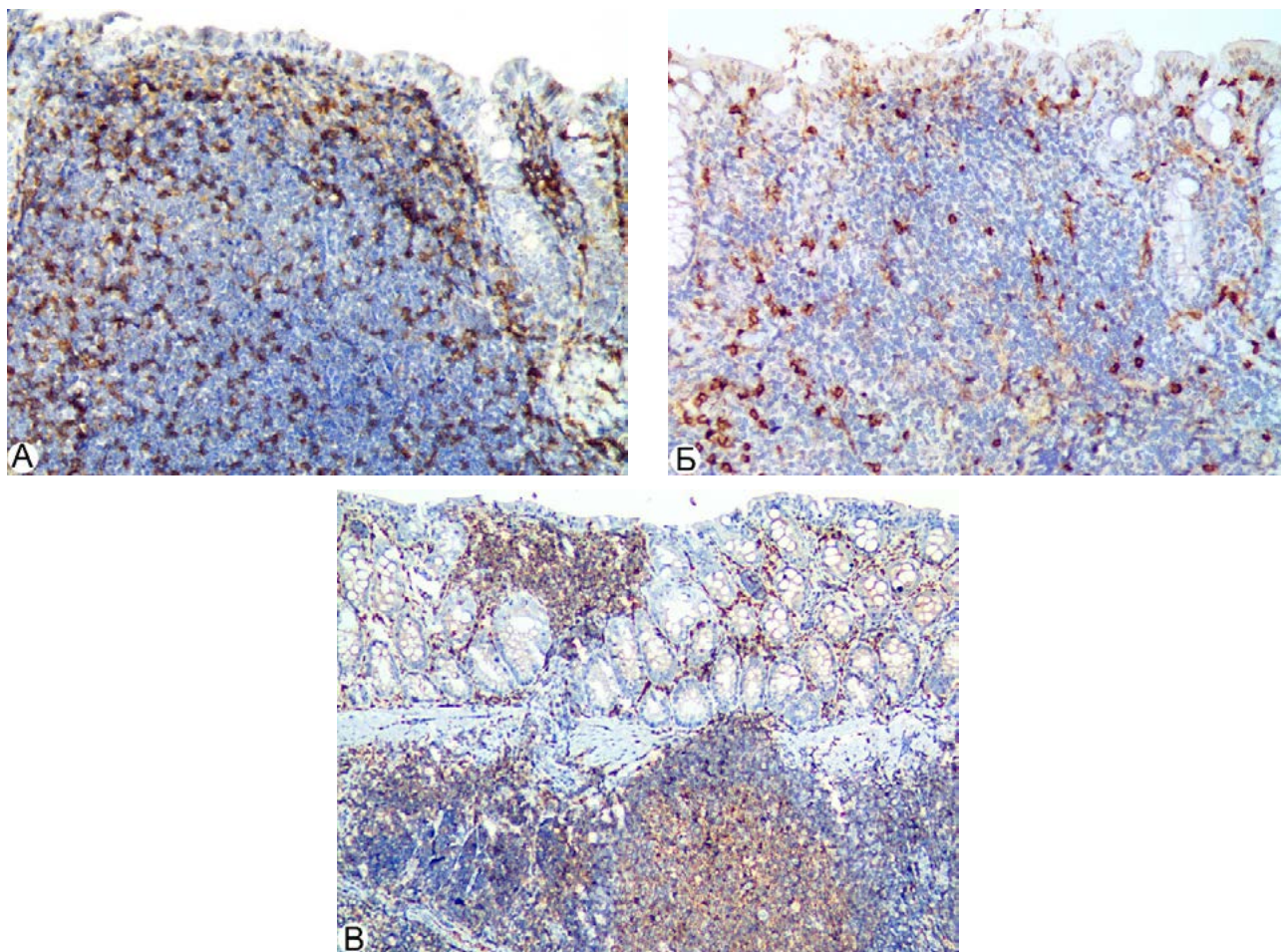


Рис. 4. Локалізація CD4+- (А), CD8+- (Б), CD20+ (В) -клітин у стінці товстої кишки тварин, яким протягом 30-ти тижнів проводили ДМГ-індуковане моделювання канцерогенезу. ІГХ-метод (200х)

Співвідношення між кількістю CD4+/CD8+-клітин у даній групі тварин є високим, тобто кількість Т-хелперів переважає кількість Т-кілерів. Індекс CD20+/CD8+-клітин також є високим, тобто В-лімфоцити чисельно переважають субпопуляцію CD8+-клітин. Це свідчить про домінування гумо-

ральної імунної відповіді на патологічний процес та слабкий цитотоксичний потенціал.

Імуногістохімічно встановлено, що при 30-ти тижневому ДМГ-моделюванні неопластичного процесу в 11,28 раза ($p < 0,001$) збільшувалася кількість популяції макрофагів в аберантних осередках та при-

легких до них ділянках. Збільшення чисельності клітин лейкоцитарного ряду призводило і до зростання середнього відсотку експресії фактору некрозу пухлин TNF- α – даний показник був вищим за аналогічний параметр здорових тварин у 16,72 раза (рис. 5, табл. 2).

За умов 30-ти тижневого моделювання канцерогенезу зростав індекс проліферативної ак-

тивності клітин у досліджуваних ділянках товстої кишки. Так, середнє відсоткове значення кількості клітин, які синтезували білок Ki-67, перевищувало показник здорових тварин у 2,38 раза ($p < 0,001$). Середнє значення експресії білка p53 у даній дослідній групі було більшим від інтактного показника у 6,85 раза (рис. 6, табл. 2).

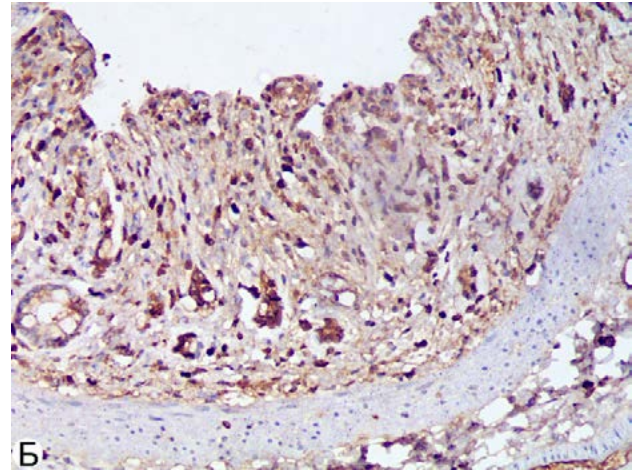
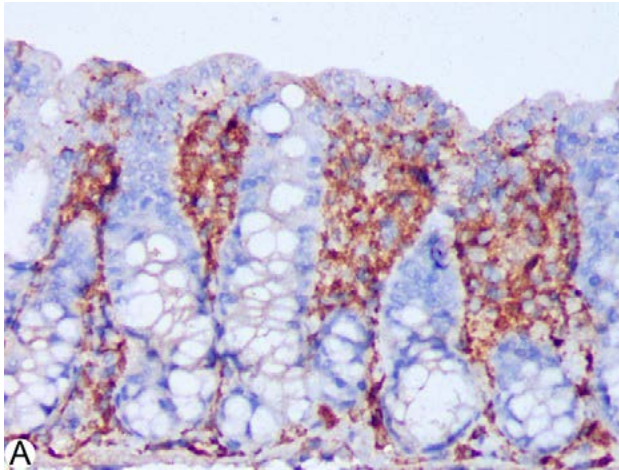


Рис. 5. Експресія прозапальних маркерів CD68 (А) та TNF- α (Б) у слизовій оболонці стінки товстої кишки тварин, яким протягом 30-ти тижнів проводили ДМГ-індуковане моделювання канцерогенезу. ІГХ-метод (200х)

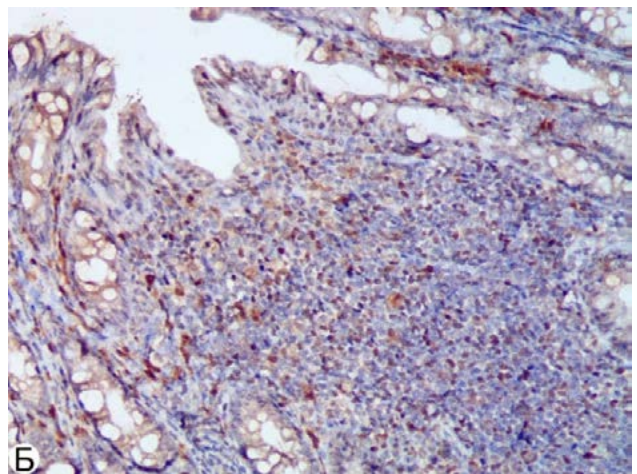
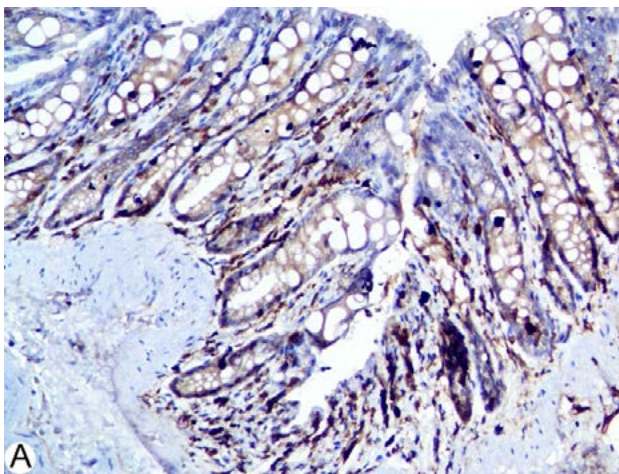


Рис. 6. Експресія маркера проліферативної активності Ki-67 (А) та регулятора клітинного циклу p53 (Б) у слизовій оболонці стінки товстої кишки тварин, яким протягом 30-ти тижнів проводили ДМГ-моделювання канцерогенезу. ІГХ-метод (200х)

У тварин 3-ї групи, незважаючи на корекцію молекулярним воднем, все ще мало місце суттєве підвищення лімфоцитарної інфільтрації стінки товстої кишки порівняно з інтактною групою (рис. 7, табл. 2). У той же час, середня кількість CD4⁺ і CD20⁺-клітин у стінці товстої кишки 3-ї групи була меншою в 1,19 та у 1,34 раза відповідно, а CD8⁺-клітин – більшою у 1,72 рази порівняно з тваринами з КРР без корекції. Незважаючи на більшу кількість цитотоксичних клітин порівняно з 2-ю дослідною групою, індекси CD4⁺/CD8⁺ та CD20⁺/CD8⁺ були високими, що свідчить про активацію адаптивного імунітету та домінування гуморальної ланки.

Імуногістохімічні дослідження зрізів товстої кишки тварин 3-ї групи з використанням антитіл до прозапальних маркерів CD68 та TNF- α показали, що середні значення експресії CD68 і TNF- α були більшими за показник норми у 10,23 та 13,76 раза відповідно ($p < 0,001$). Порівняння цих параметрів з аналогічними у 2-й групі тварин показало достовірно меншу експресію білків CD68 та TNF- α – у 1,33 та у 1,22 раза відповідно (рис. 8, табл. 2). Це свідчить про менший прояв реакції запалення у стінці товстої кишки тварин з КРР, які споживали воду, насичену молекулярним воднем.

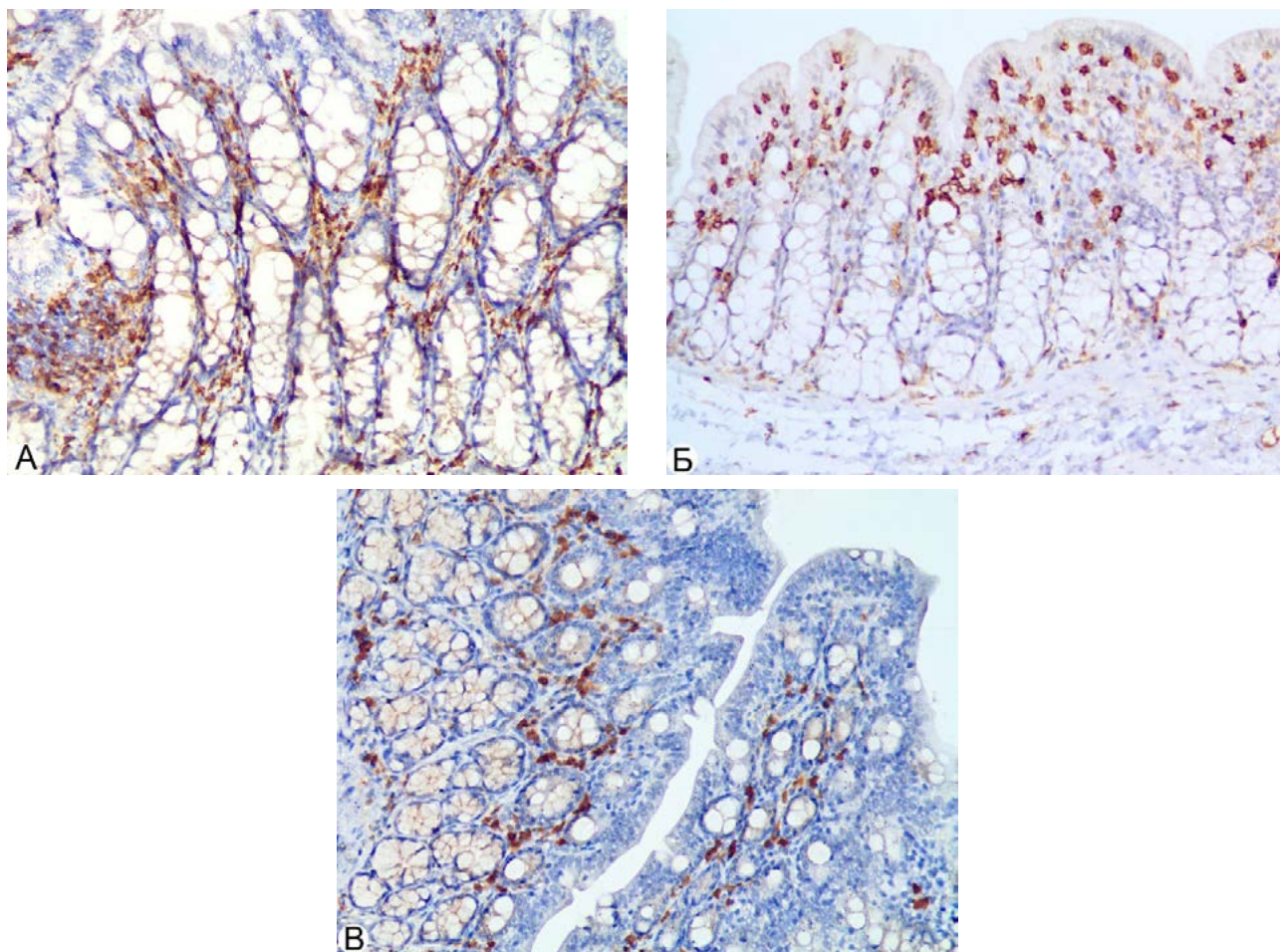


Рис. 7. Імуногістохімічна детекція CD4+- (А), CD8+- (Б), CD20+ (В) -клітин у слизовій оболонці стінки товстої кишки тварин з ДМГ-змодельованим колоректальним раком, які споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm. ІГХ-метод (200х)

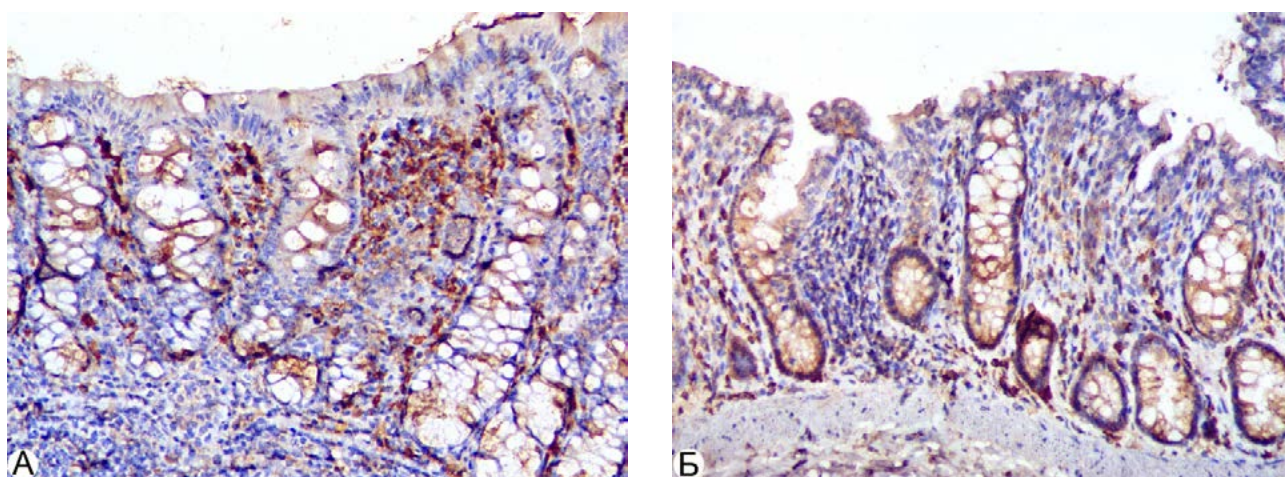


Рис. 8. Експресія прозапальних маркерів CD68 (А) та TNF-α (Б) у слизовій оболонці стінки товстої кишки тварин з ДМГ-змодельованим колоректальним раком, які споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ppm. ІГХ-метод (200х)

Згідно імуногістохімічної детекції проліферативної активності, у тварин 3-ї дослідної групи встановлено, що середнє значення кількості Ki-67+клітин було більшим за аналогічний показник у інтактних тварин у 2,07 раза ($p < 0,001$). Статистично

значущої різниці між експресією Ki-67 у стінці товстої кишки тварин 2-ї та 3-ї груп не виявлено (табл. 2). Ki-67+клітини в основному були зосереджені в епітеліальній пластинці, що вкривала дно та тіло крипти, у сполучній тканині власної пластин-

ки слизової оболонки та у лімфатичних фолікулах підслизової основи (рис. 9А). Експресія білка p53 у стінці товстої кишки тварин 3-ї групи була вищою

від показника норми у 5,67 раза ($p < 0,001$), проте суттєво не відрізнялася від групи тварин з КРР, які мали доступ до водопровідної води (рис. 9Б, табл. 2).

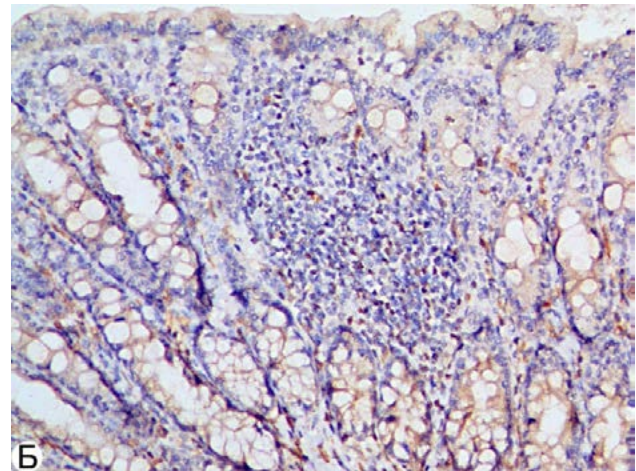
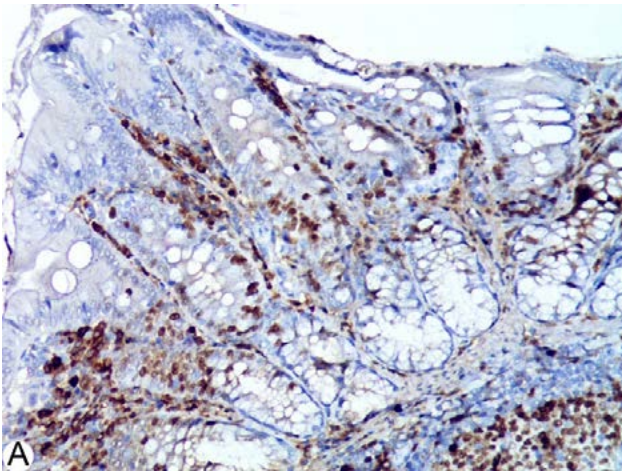


Рис. 9. Експресія маркера проліферативної активності Ki-67 (А) та регулятора клітинного циклу p53 (Б) у слизовій оболонці стінки товстої кишки тварин з ДМГ-змодельованим колоректальним раком, які споживали воду, насичену молекулярним воднем у концентрації 0,6 ррт. ІГХ-метод (200х)

Збільшення експресії білків CD4+, CD8+ і CD20+ в стінці кишки у щурів з КРР свідчить про активацію імунної відповіді, що може мати як захисний, так і патологічний характер [12, 13]. Посилена експресія CD4+ (Т-хелпери), очевидно, є наслідком активного залучення адаптивного імунітету. Підвищення експресії CD8+ може вказувати на спробу організму активувати цитотоксичну відповідь, спрямовану на знищення пухлинних клітин. Висока експресія CD8+ зазвичай корелює з кращим прогнозом, якщо ці клітини функціонально активні. Проте пухлина може використовувати механізми імунної втечі, наприклад, через PD-L1-опосередковане виснаження CD8+ клітин [14]. Підвищена експресія CD20+ вказує на активацію гуморального імунітету та можливу інфільтрацію пухлини В-клітинами [15]. В-клітини можуть мати як стимулюючу (через продукцію антитіл проти пухлинних антигенів), так і супресивну роль (наприклад, через продукцію імуносупресивних цитокінів). Також відомо, що В-клітини можуть брати участь у формуванні так званих «третинних лімфоїдних структур» у тканині пухлини, що асоціюється з покращеним прогнозом.

У 3-й групі тварин спостерігалось незначне зниження експресії білків CD4+ і CD20+ в стінці кишківника. Це може вказувати на імуномодуючий та протизапальний ефект збагаченої молекулярним воднем води при КРР. Зокрема, зниження Т-хелперів (CD4+) свідчить про зменшення активації адаптивного імунітету, а зниження В-лімфоцитів (CD20+) може означати, що молекулярний водень пригнічує надмірну В-клітинну

активність, що часто супроводжує хронічне запалення, яке сприяє росту пухлини.

У тварин з КРР, які мали доступ до насиченої молекулярним воднем води, також спостерігалось незначне підвищення експресії білків CD8+ в стінці кишківника порівняно з некоригованими щурами, що може свідчити про потенційний протипухлинний ефект молекулярного водню. CD8+ Т-клітини є основними ефекторами клітинного імунітету, здатними впливати на знищення пухлинних клітин через механізми апоптозу. Посилена інфільтрація CD8+ у пухлинну тканину часто корелює з кращим прогнозом у багатьох видах раку, зокрема при КРР [16]. Отже, водень, зменшуючи загальну запальну активність, може стимулювати адаптивний протипухлинний імунітет через активацію CD8+ клітин.

Результати наших досліджень також вказують на різке підвищення експресії CD68+ і TNF- α у стінці кишки щурів із КРР. CD68 є маркером макрофагів – ключових клітин імунної системи, які беруть участь у запальних процесах і реакціях на пухлинне мікросередовище. Підвищення експресії CD68+ свідчить про інфільтрацію тканини кишки макрофагами і може бути пов'язано з реакцією імунної системи на пухлинні клітини або з формуванням сприятливого для пухлини мікросередовища. Макрофаги в пухлинах можуть бути як M1-типу (протипухлинні, прозапальні), так і M2-типу (протуморогенні, імуносупресивні), залежно від сигналів у мікросередовищі [17].

TNF- α – прозапальний цитокін, який продукується активованими макрофагами, Т-клітинами

та іншими імунними клітинами. Підвищення його експресії в стінці кишки вказує на активний запальний процес. TNF- α відіграє двояку роль у розвитку раку: з одного боку, він може сприяти апоптозу пухлинних клітин, а з іншого – при хронічному запаленні стимулювати проліферацію клітин, ангіогенез і метастазування [18].

Оскільки макрофаги (CD68+) є основним джерелом TNF- α , одночасне підвищення експресії обох маркерів логічно пов'язане. Це може вказувати на активну інфільтрацію макрофагів у пухлинну тканину та їх активацію з подальшим вивільненням прозапальних цитокінів, таких як TNF- α . Колоректальний рак часто асоціюється з хронічним запаленням, тому показане нами підвищення CD68+ і TNF- α підтверджує ключову роль запалення у прогресії пухлини. Висока присутність макрофагів і TNF- α може свідчити про формування пухлино-асоційованого мікросередовища, яке підтримує ріст пухлини. Наприклад, макрофаги M2-типу, активовані в присутності пухлинних клітин, можуть секретувати фактори росту та цитокіни (включаючи TNF- α), сприяючи ангіогенезу та інвазії [19].

Потенційно можлива двояка роль макрофагів і TNF- α – з одного боку, активація макрофагів і продукція TNF- α можуть бути спробою організму боротися з пухлиною, з іншого боку, якщо запалення стає хронічним, це може сприяти прогресії раку, пошкоджуючи нормальну тканину та стимулюючи мутації.

Застосування збагаченої молекулярним воднем води призводило до достовірного зниження експресії CD68+ і TNF- α у стінці кишечника щурів з KPP. Це, очевидно, є наслідком антиоксидного ефекту молекулярного водню, який, як відомо, здатний вибірково нейтралізувати РФК, зокрема, такі як гідроксильні радикали [20]. Окислювальний стрес відіграє ключову роль у запальних процесах і прогресії KPP, стимулюючи активацію імунних клітин, в тому числі макрофагів (CD68+), і секрецію прозапальних цитокінів, зокрема TNF- α [21]. Зниження окислювального стресу завдяки H_2 може зменшувати запальну активність у тканинах. Крім того, збагачена воднем вода, ймовірно, послаблює хемотаксичні сигнали (наприклад, через зменшення РФК або прозапальних медіаторів), що призводить до зниження залучення макрофагів у стінку кишки, що також призводить до зменшення запального компонента, пов'язаного з пухлиною. Зменшення експресії TNF- α при застосуванні H_2 може бути як прямим наслідком пригнічення активації макрофагів або інших імунних клітин, так і результатом зниження сигналів, що індукують синтез цього цитокіну (наприклад, через NF- κ B-шлях, який чутливий до окислювального стресу).

Отже, отримане нами зниження експресії CD68+ і TNF- α свідчить про те, що збагачена молекулярним воднем вода чинить протизапальну дію в стінці кишківника щурів з KPP. Це може бути результатом зменшення окислювального стресу, який є драйвером запалення і залучення макрофагів. Оскільки макрофаги (особливо M2-типу) і TNF- α можуть сприяти прогресії пухлини, їхнє зниження під впливом H_2 може вказувати на зміну мікросередовища в бік менш сприятливого для росту та інвазії пухлини. Це потенційно може уповільнити розвиток KPP.

Отримані нами дані, які вказують на достовірне підвищення експресії Ki-67 у стінці кишківника щурів з KPP, є важливими для розуміння проліферативної активності в тканині пухлини. Ki-67 – це ядерний білок, який експресується в клітинах, що перебувають у активних фазах клітинного циклу (G1, S, G2 і мітоз), але відсутній у клітинах у стані спокою (G0). Його експресія є широко визнаним маркером клітинної проліферації, який часто використовується для оцінки швидкості росту пухлин [22]. Показане нами різке підвищення експресії Ki-67 у стінці кишки при KPP відображає високу мітотичну активність пухлинних клітин, що може корелювати з агресивністю KPP в досліджуваній моделі.

При застосуванні збагаченої молекулярним воднем води ми не спостерігали достовірного зниження експресії Ki-67 в щурів з KPP, що вказує на те, що H_2 не впливає суттєво на швидкість проліферації пухлинних клітин у цій моделі. Молекулярний водень відомий переважно як антиоксидант і, хоча окислювальний стрес може сприяти прогресії раку, проліферація пухлинних клітин регулюється складнішими механізмами, включаючи генетичні мутації (наприклад, в APC, KRAS, TP53) і сигнальні шляхи (Wnt, MAPK), які не залежать безпосередньо від РФК [23]. Отже, H_2 може не впливати на ці ключові драйвери проліферації. Вище ми показали, що збагачена воднем вода знижувала експресію CD68+ і TNF- α , що вказує на її протизапальний ефект. Однак проліферація пухлинних клітин (Ki-67) і запалення (CD68+, TNF- α) регулюються різними механізмами. Зменшення запалення не обов'язково призводить до пригнічення проліферації, особливо якщо пухлина вже досягла автономного росту.

Отже, відсутність достовірного зниження Ki-67 свідчить про те, що молекулярний водень не чинить прямого антипроліферативного ефекту на пухлинні клітини в стінці кишки щурів з KPP. Його дія, ймовірно, обмежується модуляцією запального мікросередовища, але не зачіпає основні меха-

нізми росту пухлини. Ці дані підкреслюють, що запалення і проліферація в контексті KPP є частково незалежними процесами. Хоча H_2 зменшує запальну інфільтрацію і продукцію цитокінів, це не впливає суттєво на мітотичну активність пухлинних клітин, яка керується внутрішньоклітинними онкогенними шляхами. Ці результати дозволяють припустити, що збагачена воднем вода може бути ефективною як допоміжний засіб для зменшення запалення, але не як основний агент для пригнічення росту пухлини. Для впливу на Ki-67, можливо, потрібні інші підходи, наприклад, таргетована терапія чи хіміотерапія, спрямовані на сигнальні шляхи проліферації.

Ми також отримали дані, які свідчать про різке підвищення експресії p53 у стінці кишківника щурів із KPP. p53 – це ключовий супресор пухлин, що активується у відповідь на пошкодження ДНК, окислювальний стрес або онкогенні сигнали, регулюючи зупинку клітинного циклу, репарацію ДНК або апоптоз. У нормі рівень p53 у клітинах низький через швидку деградацію за участю MDM2, але при патологічних станах, таких як рак, його експресія може різко зростати [24]. У багатьох випадках підвищення експресії p53, виявлене імуногістохімічно, асоціюється з накопиченням мутантного білка p53. Дикотипний (функціональний) p53 швидко розкладається, тоді як мутантні форми стабілізуються і накопичуються в клітинах, що легко виявляється при імуногістохімії. У колоректальному раку мутації в гені TP53 є однією з найпоширеніших подій, особливо на пізніх стадіях прогресії (аденома-карцинома) [25].

KKP у щурів може супроводжуватися накопиченням генетичних ушкоджень через канцерогени (наприклад, хімічну індукцію диметилгідразином), запалення або окислювальний стрес. Це може призводити до активації p53 як захисного механізму або до його мутації, що порушує нормальну функцію. Різке підвищення експресії p53 у стінці кишки щурів із KPP найімовірніше свідчить про накопичення мутантного білка p53, який втратив свою супресорну функцію. У такому разі це не є ознакою активного захисту від пухлини, а радше маркером генетичної нестабільності та прогресії раку. У KKP мутації TP53 часто корелюють із переходом від аденоми до карциноми [26].

Високий рівень p53 може вказувати на пізнішу стадію розвитку пухлини в цій моделі, коли клітини втрачають контроль над клітинним циклом і апоптозом через дисфункцію p53. Це узгоджується з агресивним фенотипом, який також може супроводжуватися високою проліферацією (як у наших даних із Ki-67).

Попередні дані про підвищення CD68+ і TNF- α у нашій моделі вказують на сильне запалення, яке може спричиняти окислювальний стрес і пошкодження ДНК. Це могло стати тригером для активації p53, але через мутації він не здатен виконувати свою функцію, що призводить до його накопичення.

Без додаткових даних (наприклад, секвенування гена TP53 чи аналіз апоптозу) складно однозначно сказати, чи є підвищена експресія p53 ознакою функціональної активації (спроби пригнічення пухлини) чи накопичення нефункціонального мутанта. Однак у контексті раку імуногістохімічне виявлення високого рівня p53 частіше асоціюється з мутаціями [27].

Отже, різке підвищення експресії p53 у стінці кишки щурів із KPP, імовірно, відображає накопичення мутантного білка p53, що є маркером генетичної нестабільності та прогресії пухлинного процесу. Це може свідчити про порушення захисних механізмів клітини та перехід пухлини до більш злоякісного стану. Для точнішого висновку варто було б провести аналіз мутаційного статусу TP53 (наприклад, за допомогою ПЛР або секвенування) і дослідити маркери апоптозу (Вах, caspase-3), щоб з'ясувати, чи зберігає p53 свою функціональність у цій моделі.

Як і у випадку з Ki-67, при застосуванні збагаченої молекулярним воднем води ми не спостерігали достовірного зниження експресії p53 в стінці кишківника щурів з KPP. Як зазначалося раніше, різке підвищення експресії p53 у нашій моделі, виявлене імуногістохімічно, найімовірніше пов'язане з накопиченням мутантного білка p53, який стабілізується в пухлинних клітинах через втрату нормальної деградації (наприклад, порушення взаємодії з MDM2). Молекулярний водень, як антиоксидант, не впливає безпосередньо на генетичні мутації чи стабільність мутантного p53, що пояснює відсутність змін у його експресії. Хоча окислювальний стрес може бути тригером для активації дикотипного p53 у нормальних клітинах, у пухлинах із мутантним p53 його експресія вже не залежить від таких зовнішніх стимулів. Отже, H_2 не впливає на рівень мутантного p53, який регулюється на посттрансляційному рівні.

Наші попередні дані показали, що H_2 знижує експресію CD68+ і TNF- α , що вказує на його проти-запальний ефект. Однак p53, на відміну від цих маркерів, є внутрішньоклітинним білком, пов'язаним із генетичними змінами в пухлинних клітинах, а не з мікросередовищем чи запаленням. Тому антиоксидантна дія H_2 не зачіпає механізми, що лежать в основі експресії p53 у цьому контексті.

Відсутність змін у експресії p53 може також свідчити про те, що пухлинні клітини в цій моделі вже досягли стабільного стану, де мутації TP53 є фіксованими, а їхній рівень експресії не залежить від зовнішніх модифікацій, таких як зменшення окислювального стресу.

Отже, відсутність достовірного зниження експресії p53 при застосуванні збагаченої воднем води вказує на те, що H_2 не впливає на накопичення мутантного p53 у пухлинних клітинах. Це логічно, оскільки антиоксидантні властивості H_2 не можуть коригувати генетичні мутації чи змінювати стабільність мутантного білка, який є характерним для ККР. Дані результати підкреслюють, що дія молекулярного водню обмежується модуляцією запального мікросередовища (зниження CD68+ і TNF- α), але не поширюється на внутрішньоклітинні онкогенні процеси, такі як регуляція p53. Це свідчить про те, що H_2 впливає на вторинні фактори пухлинного росту (запалення), а не на первинні генетичні драйвери. Стабільно високий рівень p53, незважаючи на застосування H_2 , може вказувати на те, що пухлина в цій моделі перебуває на стадії, коли мутації TP53 уже закріплені, і її зловиясний фенотип не залежить від окислювального стресу чи запалення, які H_2 здатен модулювати.

Отримані дані дозволяють стверджувати, що збагачена воднем вода не є ефективним засобом для впливу на ключові молекулярні маркери прогресії раку, такі як p53, у цій моделі. Її дія, ймовірно, обмежується допоміжним ефектом (зменшення запалення), але не зачіпає основні механізми пухлинної трансформації.

Висновки. 1. Збільшення експресії білків CD4+, CD8+ і CD20+ у стінці кишки щурів із ККР свідчить про активацію імунної відповіді, яка може мати як захисний, так і патологічний ефект. Підвищення CD4+ вказує на залучення адаптивного імунітету, CD8+ – на цитотоксичну відповідь проти пухлинних клітин, що асоціюється з кращим прогнозом. Висока експресія CD20+ відображає активацію гуморального імунітету та можливу роль В-клітин у формуванні третинних лімфоїдних структур, що також пов'язано з позитивним прогнозом. Використання води, збагаченої молекулярним воднем, призводить до незначного зниження експресії CD4+ і CD20+, що може вказувати на її імуномодуючий та протизапальний ефект. Підвищення CD8+ під впливом H_2 свідчить про потенційний протипухлинний ефект водню через стимуляцію цитотоксичних Т-клітин, здатних знищувати пухлинні клітини. 2. Різке підвищення експресії CD68+ і TNF- α у стінці кишки щурів із ККР свідчить про активне запалення та інфільтрацію макрофагів, що може сприяти прогресії пух-

лини. Застосування збагаченої молекулярним воднем води достовірно знижує ці маркери, вказуючи на її протизапальний і антиоксидантний ефект. 3. Різке підвищення Ki-67 при ККР відображає високу проліферативну активність пухлинних клітин, що є ознакою агресивного росту пухлини. Молекулярний водень не впливає достовірно на експресію Ki-67, що свідчить про відсутність прямого антипроліферативного ефекту в досліджуваній моделі. 4. Різке підвищення експресії p53, ймовірно, вказує на накопичення мутантного білка, що є маркером генетичної нестабільності та прогресії раку. Застосування H_2 не знижує його рівень, що підтверджує обмежений вплив водню на генетичні зміни в пухлині.

Отже, молекулярний водень сприяє адаптивному протипухлинному імунітету, посилює активність цитотоксичних CD8+ клітин, здатних знищувати пухлинні клітини, ефективно зменшує запалення (CD68+, TNF- α), але не впливає на проліферацію (Ki-67) чи накопичення p53, що вказує на його допоміжну роль у модуляції мікросередовища, а не основних онкогенних процесів у моделі ККР в щурів.

Перспективи подальших досліджень. Наявність CD8+ та CD4+ інфільтрації може бути позитивним прогностичним фактором ККР, але необхідно дослідити, чи ці клітини не є функціонально виснаженими. CD20+ клітини можуть відігравати роль у протипухлинному імунітеті або ж підтримувати пухлинне мікросередовище, тому необхідні додаткові дослідження їх ролі.

Необхідно дослідити фенотип макрофагів, тобто співвідношення M1 (протипухлинних) і M2 (протуморогенних) макрофагів у стінці кишки щурів із ККР за допомогою маркерів (iNOS, Arg1) до та після застосування збагаченої молекулярним воднем води. Це допоможе з'ясувати, як H_2 впливає на запальне мікросередовище та його роль у прогресії пухлини.

Потрібно провести аналіз мутаційного статусу TP53, секвенування гена TP53, щоб підтвердити чи підвищення експресії p53 пов'язане з мутаціями і оцінити чи може H_2 впливати на функціональність p53 у разі збереження дикотипного варіанту.

Потрібно вивчити вплив молекулярного водню на маркери апоптозу (Bax, Bcl-2, caspase-3) і регулятори клітинного циклу (p21, цикліни) для оцінки чи може H_2 опосередковано впливати на виживаність пухлинних клітин, незважаючи на стабільний рівень Ki-67 і p53.

Необхідно дослідити динаміку розміру, маси пухлини та частоти метастазування у щурів із ККР при тривалому застосуванні H_2 , щоб визначити чи має протизапальний ефект клінічний вплив на прогресію захворювання.

Список використаної літератури

1. Baidoun F, Elshiw K, Elkerai Y, Merjaneh Z, Khoudari G, Sarmini MT, et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Curr Drug Targets*. 2021;22(9):998-1009. doi: 10.2174/1389450121999201117115717.
2. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. *Medicina (Kaunas)*. 2023 Sep 12;59(9):1646. doi: 10.3390/medicina59091646.
3. Sohrab SS, Raj R, Nagar A, Hawthorne S, Paiva-Santos AC, Kamal MA, et al. Chronic Inflammation's Transformation to Cancer: A Nanotherapeutic Paradigm. *Molecules*. 2023 May 29;28(11):4413. doi: 10.3390/molecules28114413.
4. Zhang M, Li X, Zhang Q, Yang J, Liu G. Roles of macrophages on ulcerative colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Front Immunol*. 2023 Mar 16;14:1103617. doi: 10.3389/fimmu.2023.1103617.
5. Kasprzak A. Prognostic Biomarkers of Cell Proliferation in Colorectal Cancer (CRC): From Immunohistochemistry to Molecular Biology Techniques. *Cancers (Basel)*. 2023 Sep 15;15(18):4570. doi: 10.3390/cancers15184570.
6. Johnsen HM, Hiorth M, Klaveness J. Molecular Hydrogen Therapy-A Review on Clinical Studies and Outcomes. *Molecules*. 2023 Nov 26;28(23):7785. doi: 10.3390/molecules28237785.
7. Artamonov MY, Pyatakovich FA, Minenko IA. Synergistic Antioxidant Effects of Molecular Hydrogen and Cold Atmospheric Plasma in Enhancing Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Antioxidants (Basel)*. 2024 Dec 23;13(12):1584. doi: 10.3390/antiox13121584.
8. Kura B, Slezak J. The Protective Role of Molecular Hydrogen in Ischemia/Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 18;25(14):7884. doi: 10.3390/ijms25147884.
9. Mohd Noor MNZ, Alauddin AS, Wong YH, Looi CY, Wong EH, Madhavan P, et al. A Systematic Review of Molecular Hydrogen Therapy in Cancer Management. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023 Jan 1;24(1):37-47. doi: 10.31557/APJCP.2023.24.1.37.
10. Zhou W, Zhang J, Chen W, Miao C. Prospects of molecular hydrogen in cancer prevention and treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024 Mar 31;150(4):170. doi: 10.1007/s00432-024-05685-7.
11. Kachur O, Fira L, Lykhatskyi P, Fira D, Garlitska N. Evaluation of membrane-destructive processes in rats with induced carcinogenesis of the colon using the cytostatic vincristine. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2022;73(2):215-20. doi:10.32394/rpzh.2022.0212.
12. Schardey J, Lu C, Neumann J, Wirth U, Li Q, Jiang T, et al. Differential Immune Infiltration Profiles in Colitis-Associated Colorectal Cancer versus Sporadic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Sep 27;15(19):4743. doi: 10.3390/cancers15194743.
13. Ágoston EI, Acs B, Herold Z, Fekete K, Kulka J, Nagy A, et al. Deconstructing Immune Cell Infiltration in Human Colorectal Cancer: A Systematic Spatiotemporal Evaluation. *Genes (Basel)*. 2022 Mar 25;13(4):589. doi: 10.3390/genes13040589.
14. Dolina JS, Van Braeckel-Budimir N, Thomas GD, Salek-Ardakani S. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Front Immunol*. 2021 Jul 20;12:715234. doi: 10.3389/fimmu.2021.715234.
15. Sun LL, Ellerman D, Mathieu M, Hristopoulos M, Chen X, Li Y, et al. Anti-CD20/CD3 T cell-dependent bispecific antibody for the treatment of B cell malignancies. *Sci Transl Med*. 2015 May 13;7(287):287ra70. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4802.
16. Reina-Campos M, Scharping NE, Goldrath AW. CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(11):718-38. doi:10.1038/s41577-021-00537-8.
17. Zhang J, Li S, Liu F, Yang K. Role of CD68 in tumor immunity and prognosis prediction in pan-cancer. *Sci Rep*. 2022 May 12;12(1):7844. doi: 10.1038/s41598-022-11503-2.
18. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(3):409-16. doi:10.1007/s10555-006-9005-3.
19. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-55. doi:10.1016/s1471-4906(02)02302-5.
20. Slezak J, Kura B, LeBaron TW, Singal PK, Buday J, Barancik M. Oxidative Stress and Pathways of Molecular Hydrogen Effects in Medicine. *Curr Pharm Des*. 2021;27(5):610-25. doi:10.2174/1381612826666200821114016.

21. Ghafoor DD. Correlation between oxidative stress markers and cytokines in different stages of breast cancer. *Cytokine*. 2023;161:156082. doi:10.1016/j.cyto.2022.156082.
22. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta*. 2019;491:39-45. doi:10.1016/j.cca.2019.01.011.
23. Shorning BY, Dass MS, Smalley MJ, Pearson HB. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 25;21(12):4507. doi: 10.3390/ijms21124507.
24. Sabapathy K, Lane DP. Understanding p53 functions through p53 antibodies. *J Mol Cell Biol*. 2019 Apr 1;11(4):317-29. doi: 10.1093/jmcb/mjz010. Erratum in: *J Mol Cell Biol*. 2019 Dec 19;11(12):1105. doi: 10.1093/jmcb/mjz110.
25. Kanapathipillai M. Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 May 23;10(6):154. doi: 10.3390/cancers10060154.
26. Li H, Zhang J, Tong JHM, Chan AWH, Yu J, Kang W, et al. Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 28;20(23):5999. doi: 10.3390/ijms20235999.
27. Schulz-Heddergott R, Stark N, Edmunds SJ, Li J, Conradi LC, Bohnenberger H, et al. Therapeutic Ablation of Gain-of-Function Mutant p53 in Colorectal Cancer Inhibits Stat3-Mediated Tumor Growth and Invasion. *Cancer Cell*. 2018 Aug 13;34(2):298-314.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.07.004.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF THE MOLECULAR HYDROGEN POTENTIAL IN COLORECTAL CANCER

Abstract. Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related mortality. Currently, new strategies to improve the quality of life for CRC patients are being actively explored. Molecular hydrogen has garnered attention as a biologically active molecule capable of reducing oxidative stress, modulating signaling pathways related to inflammation, proliferation, and immune cell activity, and influencing the tumor microenvironment.

Aim. To investigate, using immunohistochemical studies on a rat CRC model, how water enriched with molecular hydrogen affects markers of immune cells, inflammation, proliferation, and the cell cycle.

Material and Methods. Animals were divided into three groups: Group 1 – control; Group 2 – rats with CRC induced by 1,2-DMH administration for 30 weeks and given access to regular water; Group 3 – rats with induced CRC that consumed water enriched with molecular hydrogen at a concentration of 0.6 ppm. For immunohistochemical detection of target molecules in the intestinal wall, antibodies against CD4+, CD8+, CD20+, CD68+ cells, TNF- α , Ki-67, and p53 were used.

Results. In the colon wall of rats with CRC, the percentage of T-helper cells (CD4+) exceeded the intact value by 11.02 times, T-killer cells (CD8+) by 3.33 times, B-lymphocytes (CD20+) by 11.41 times, and the macrophage population (CD68+) in aberrant foci increased by 11.28 times, while TNF- α expression rose by 16.72 times ($p < 0.001$ in all cases). Under carcinogenesis conditions, the index of proliferative activity (Ki-67 exceeded the norm by 2.38 times ($p < 0.001$)) and the intensity of the cell cycle (p53 levels were 6.85 times higher than the intact value ($p < 0.001$)) also increased.

In CRC rats consuming molecular hydrogen-enriched water, compared to uncorrected rats, a slight decrease in CD4+ and CD20+ cells and a minor increase in CD8+ cells were observed in the colon wall. The average expression levels of CD68 and TNF- α in Group 3 were significantly lower than in Group 2 by 1.33 and 1.22 times, respectively. However, no statistically significant differences in Ki-67 and p53 expression in the colon wall were found between Groups 2 and 3.

Conclusion. Molecular hydrogen promotes adaptive antitumor immunity, enhances the activity of cytotoxic CD8+ cells capable of destroying tumor cells, effectively reduces inflammation (CD68+, TNF- α), but does not affect proliferation (Ki-67) or p53 accumulation. This suggests its auxiliary role in modulating the microenvironment rather than influencing core oncogenic processes in the rat CRC model.

Key words: Colorectal cancer, molecular hydrogen, immunohistochemistry, CD4+, CD8+, CD20+, CD68+, TNF- α , Ki-67, p53.

Відомості про авторів:

Покотило Олег Олегович – аспірант кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-3285-6892>;

Крамар Соломія Богданівна – доцент кафедри гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3654-4950>;

Корда Михайло Михайлович – професор кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0676-336X>.

Information about the authors:

Pokotylo Oleh O. – PhD student at the Department of Medical Biochemistry of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0006-3285-6892>;

Kramar Solomia B. – Associate Professor at the Department of Histology and Embryology of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3654-4950>;

Korda Mykhailo M. – Professor at the Department of Medical Biochemistry of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0676-336X>.

Надійшла 06.03.2025 р.