

СПОНТАННЫЕ И ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ КРЫС С КАРЦИНОМОЙ ПОЧКИ РА ПРИ ОЗОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Щербатюк Т.Г.^{1,2}, Чернигина И.А.², Плеханова Е.С.², Гапеев А.Б.³

¹ ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»

Проспект науки, 3, г. Пуццо, 142290, РФ; e-mail: ozone_stg@mail.ru

² ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

пл. Минина и Пожарского, 10/1, г. Нижний Новгород, 603950, РФ

³ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение

ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

ул. Институтская, 3, г. Пуццо, 142290, РФ

Поступила в редакцию: 11.11.2019

Аннотация. С использованием карциномы почки крыс РА в качестве модели экспериментальной неоплазии исследовали действие озонированного физиологического раствора и фотодинамическое действие на скорость опухолевого роста и уровень спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс. Обнаружено, что совместное парентеральное введение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л внутривентрально и 0,3% раствора «Фотосенса» интратуморально с локальным действием света с длиной волны 660 ± 10 нм в течение 10 минут вызывает статистически значимое торможение роста карциномы почки крыс и полную регрессию опухоли в 50% случаев. На 20 сутки роста карциномы почки РА комбинированное озono-фотодинамическое воздействие приводит к снижению уровня спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс по сравнению с фотодинамическим действием и действием озонированного физиологического раствора по отдельности.

Ключевые слова: повреждения ДНК, озон, фотодинамическая терапия, экспериментальная онкология.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с открытием молекулярно-генетических механизмов кислородного гомеостаза, в частности, роли индуцированного гипоксией фактора (hypoxia-inducible factor, HIF) [1], ожидается ренессанс свободнорадикальной биологии, сопровождающийся усиленным интересом к исследованиям, направленным на возможность управления свободнорадикальными процессами с терапевтической целью.

Считается, что онкогенез, возникающий в результате многоэтапной активации онкогенов и потери опухолевых супрессоров частично обусловлен нестабильностью генома в результате окислительных повреждений ДНК [2]. Резистентность опухолей к терапевтическим воздействиям, в основе которых лежит влияние на свободнорадикальные процессы, обусловлена устойчивостью бластотрансформированных клеток к окислительному стрессу за счет высокой активности антиоксидантных ферментов [3], активацией HIF-1, индукцией эндотелиального фактора роста сосудов, усилением ангиогенеза [2].

Фотодинамическая терапия (ФДТ), механизм действия которой связан с развитием свободнорадикальных реакций [4] и ингибированием HIF [1], применяется как метод лечения злокачественных новообразований в последние 40 лет во всем мире [5]. Однако низкая генерация синглетного кислорода, гипоксические условия в опухолевой ткани и ряд других ограничений препятствуют широкому применению ФДТ в клинической онкологии [6]. В связи с этим актуальной задачей является оптимизация ФДТ и поиск новых способов повышения её противоопухолевой эффективности. Принимая во внимание ключевые механизмы противоопухолевого действия озона, такие как повышение оксигенации опухолевой ткани [7], ингибирование пролиферации опухолевых клеток посредством инактивации транскрипционных факторов и усиление иммунных реакций [8], мы предположили, что комбинированное применение озонированного физиологического раствора (ОФР) с фотодинамическим воздействием может усилить деструкцию опухолевой ткани.

Цель работы состояла в оценке противоопухолевого и генотоксического действия озono-фотодинамической терапии в условиях экспериментальной неоплазии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 250 ± 25 г (возраст 2 мес.), которые содержались на стандартном пищевом рационе в виварии. Все манипуляции с экспериментальными животными проводили в соответствии с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным (Эдинбург, 2000).

В качестве модели экспериментальной неоплазии использовали карциному почки РА, полученную из банка

опухолевых штаммов РОИЦ РАМН (Москва). Опухоль относится к числу быстрорастущих с достаточно коротким инкубационным периодом, не превышающим 7-10 суток, развитие опухоли полностью завершается к 26-м суткам от момента перевивки. Карцинома почки РА характеризуется достаточно большой биомассой и высокой степенью перевиваемости. Опухоль для инокуляции брали на 14 сутки развития. Инокулом РА вводили крысам подкожно в область правого бедра [9].

Для фотодинамического воздействия использовали синтетический фотосенсибилизатор второго поколения – гидроксисаломиния трисульфопталоцианин (препарат «Фотосенс», ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), который имеет максимум поглощения на длине волны 676 нм в спектральной области прозрачности биоткани, что позволяло воздействовать на глубокие слои опухолевой ткани. Интратуморально вводили 0,3% раствор «Фотосенса» в три точки опухоли из расчета 30% от объема опухоли. Затем через 6 ч после инъекций «Фотосенса» на каждую точку в течение 10 мин воздействовали светом с длиной волны 660 ± 10 нм и интенсивностью излучения 100 мВт/см^2 [10]. В качестве источника света использовали аппарат физиотерапевтический светодиодный АФС (ООО «Полироник», Россия). Всего провели 2 сеанса ФДТ на 15-е и 19-е сутки после перевивки опухоли, что соответствовало периоду активного роста карциномы почки крыс (рис. 1).

Действие озона осуществляли введением ОФР в течение 10 суток (5 воздействий через сутки), начиная с 10-х суток после перевивки опухолевого штамма. Внутривенно вводили по 0,5 мл ОФР с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л [11]. Инъекции ОФР животным осуществлялись сразу после барботирования изотонического 0,9%-го раствора хлорида натрия озono-кислородной смесью (рис. 1). Озono-кислородную смесь получали из медицинского сверхчистого кислорода на озонаторе «ТЕОЗОН» (РФЯЦ-ВНИИЭФ, г. Саров, Россия) [12].

Противоопухолевый эффект проводимой терапии оценивали по коэффициенту абсолютного прироста опухоли (K), который рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_o}{V_o},$$

где $V = \frac{\pi}{6} \cdot \left(\frac{d_1 + d_2}{2} \right)^3$ – объем опухоли (см^3); V_o – до воздействия; V_t – после воздействия на срок наблюдения t , d_1 и d_2 – два взаимно перпендикулярных поперечных сечения опухоли (см) [13].

При $K > 0$ – оценивали как продолженный рост опухоли, при $-1 < K < 0$ – торможение роста опухоли, $K = -1$ – полная регрессия опухоли. Заключение о полной регрессии неоплазии делали при отсутствии видимого и пальпируемого очага.

Из эксперимента животные выводились декапитацией под наркозом и образцы венозной крови отбирались в пробирки, содержащие гепарин. Для оценки генотоксичности озono-фотодинамического воздействия на общую фракцию лейкоцитов крови крыс использовали метод "комета-тест" [14]. Основные процедуры приготовления агарозных слайдов, лизис клеток в составе агарозного геля, щелочную денатурацию ДНК, электрофорез в щелочных условиях, нейтрализацию, окрашивание ДНК красителем SYBR Green I и визуализацию изображений "комет" проводили в соответствии с протоколами "комета-теста" [15, 16]. Регистрацию и анализ изображений ДНК-комет проводили с помощью специализированного программного обеспечения. Для количественной оценки уровня повреждения ДНК использовали процентное содержание ДНК в "хвосте кометы", измеряемое отношением интенсивности флуоресценции в "хвосте кометы" к общей интенсивности флуоресценции "кометы", выраженное в процентах [17, 18]. На каждом слайде анализировали по 100 комет и из полученных данных рассчитывали среднее значение, для каждой экспериментальной точки использовали не менее 12 агарозных слайдов. Для оценки индуцированных повреждений ДНК на иммобилизованные в агарозный гель клетки

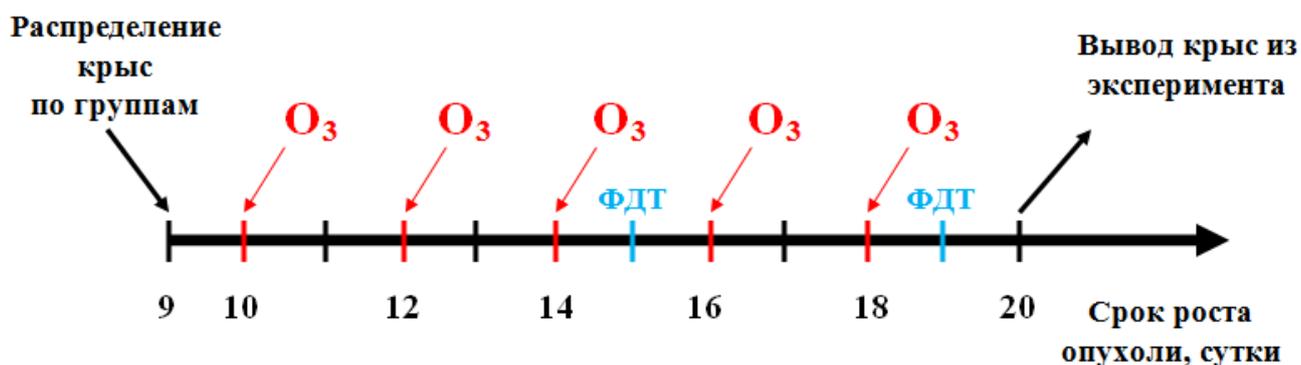


Рисунок 1. Схема комбинированного действия ФДТ и ОФР на животных-опухоленосителей

воздействовали озоном по методике, описанной в [19].

Все эксперименты проведены по протоколу "слепого контроля", когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Данные по росту карциномы РА представлены в виде $Me [25\%; 75\%]$, где Me – медиана регистрируемого параметра, а 25% и 75% – интерпроцентильный размах. Данные по уровням повреждения ДНК представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента-Ньюмена-Кейлса при нормальном распределении данных по тесту Колмогорова-Смирнова или множественного критерия Данна при отличном от нормального распределении данных ($p < 0.016$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ роста карциномы почки крыс после проведенного фотодинамического воздействия и инъекций ОФР по отдельности показал отсутствие достоверных изменений по коэффициенту прироста опухоли (K) на 20-е сутки роста в этих экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой (без воздействия) (табл. 1). Однако следует отметить, что в этих группах по сравнению с контролем наблюдалась полная регрессия опухоли у 5 и 2 крыс соответственно (табл. 1). После комбинированного озono-фотодинамического воздействия коэффициент прироста опухоли достоверно снижался по сравнению с контролем и наблюдалась полная регрессия опухоли у 5 животных (табл. 1).

Противоопухолевый эффект комбинированного применения ФДТ и ОФР, вероятно, связан с интенсификацией свободнорадикального гомеостаза в опухолевых клетках. Активные формы кислорода (АФК) и озониды, индуцируемые ОФР, в синергизме с механизмами фотооксигенации при ФДТ, способствуют тому, что опухоль не в состоянии сдерживать усиленное свободнорадикальное окисление, продукты которого имеют значимый ингибирующий эффект на клетки опухоли: нарушают митотическое веретено деления и останавливают клеточную пролиферацию.

При оценке уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс нами выявлено, что уровень спонтанных повреждений ДНК у животных с карциномой почки РА достоверно выше уровня спонтанных повреждений ДНК у интактных животных ($p < 0.001$) (рис. 2). Воздействия ФДТ и ОФР по отдельности не вызывали значимого снижения уровня спонтанных повреждений ДНК относительно группы «РА» (опухоленосители без воздействия), в отличие от комбинированного озono-фотодинамического воздействия, которое приводило к статистически значимому ($p < 0.003$) снижению уровня спонтанных повреждений ДНК в лейкоцитах крови животных-опухоленосителей по сравнению с группой «РА» (рис. 2). Уровень индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс оказался значимо выше ($p < 0.001$) во всех экспериментальных группах, кроме группы животных-опухоленосителей без воздействия. ФДТ и ОФР по отдельности вызывали значительный рост уровня индуцированных повреждений ДНК ($p < 0.01$ относительно группы «РА»), а комбинированное озono-фотодинамическое воздействие снижало уровень индуцированных повреждений ДНК до уровня у интактных крыс и животных-опухоленосителей (рис. 2).

Мы предполагаем, что наблюдаемый генотоксический эффект ФДТ может быть результатом влияния АФК и производных оксида азота (NO) на структуру молекулы ДНК лейкоцитов крови крыс-опухоленосителей [20]. Эндогенные порфирины (фотосенсибилизаторы), содержание которых в организме увеличивается при экстремальных состояниях, способны поглощать излучение в красной области спектра. В частности, лейкоциты, содержащие порфирины, являются мишенями излучения в красной области спектра, действие которого приводит

Таблица 1. Рост карциномы почки РА в контроле и при озono-фотодинамическом воздействии.

Группы животных-опухоленосителей	Кол-во крыс в группе	Кол-во крыс с полной регрессией опухоли	Объем опухоли, см ³		K прироста
			Сутки после перевивки		
			10-е (до воздействия)	20-е (после воздействия)	
Без воздействия	10	0	0,77 [0,22; 1,77]	3,15 [0,52; 21,97]	2,85 [1,36; 11,41]
ФДТ	10	5	1,15 [0,07; 1,77]	0,23 [0,00; 33,27]	1,92 [-1,00; 17,80]
ОФР	10	2	1,77 [0,18; 2,42]	13,44 [0,24; 21,95]	3,39 [0,09; 20,36]
ФДТ+ОФР	10	5	0,52 [0,11; 2,61]	1,18 [0,00; 4,64]	-0,60* [-1,00; 1,97]

* $p < 0.014$ – достоверные отличия относительно контроля (без воздействия).

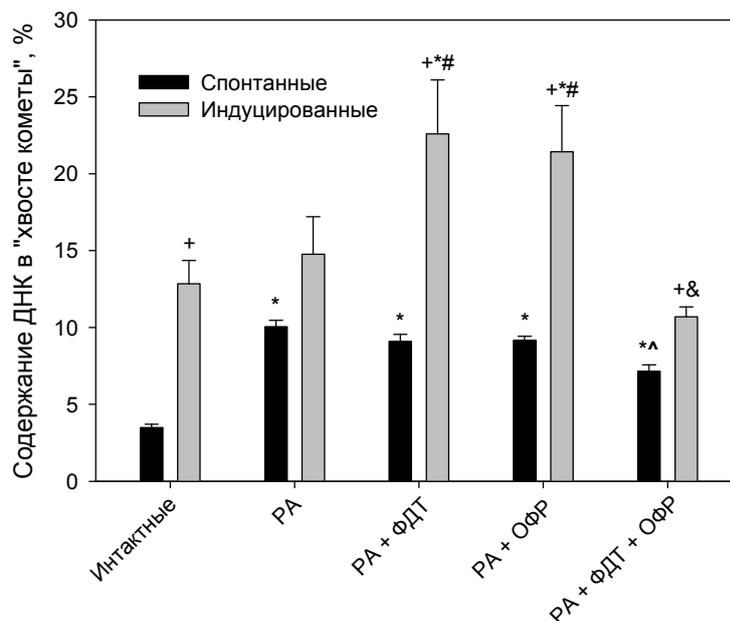


Рисунок 2. Уровень спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови интактных животных и животных-опухоленосителей (РА) после озono-фотодинамического воздействия.

* $p < 0.001$ – достоверные отличия относительно интактных животных;

^ $p < 0.003$ – достоверные отличия относительно групп «РА», «РА+ФДТ» и «РА+ОФР»;

+ $p < 0.001$ – достоверные отличия относительно уровня спонтанных повреждений;

$p < 0.01$ – достоверные отличия относительно группы "РА";

& $p < 0.01$ – достоверные отличия относительно групп "РА+ФДТ" и "РА+ОФР"

к фотосенсибилизированным свободнорадикальным реакциям, инициирующим перекисное окисление липидов в мембранах клеток. В результате увеличивается ионная проницаемость мембран для ионов Ca^{2+} , которые запускают в цитозоле лейкоцитов Ca^{2+} -зависимые реакции, приводящие к повышению уровня функциональной активности клеток (прайминг лейкоцитов). Вследствие этого лейкоциты интенсивно продуцируют NO и супероксид-анион-радикал (O_2^-). Взаимодействие NO и O_2^- приводит к образованию пероксинитрита (ONOO^-), инициирующего свободнорадикальные реакции, в результате которых индуцируются одонитевые разрывы в цепи ДНК [21-23].

При комбинированном озono-фотодинамическом воздействии, возможно, активируется транскрипционный фактор NF- κ B, вызывая экспрессию гена антиапоптотического протеина *bcl-x_l*, что приводит к увеличению данного белка в мононуклеарных лейкоцитах и ингибированию их апоптоза [24]. Это может быть следствием гиперпродукции мононуклеарными лейкоцитами интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли TNF α – ключевых цитокинов в активации механизма иммунной защиты и противоопухолевой резистентности [25].

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что совместное парентеральное введение озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л внутривенно и 0,3% раствора «Фотосенса» интратуморально с локальным действием света с длиной волны 660 ± 10 нм в течение 10 минут вызывает статистически значимое снижение скорости роста карциномы почки крыс и полную регрессию опухоли в 50% случаев.

2. Установлено, что на 20 сутки роста карциномы почки РА комбинированное озono-фотодинамическое воздействие приводит к снижению уровня спонтанных и индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс по сравнению с фотодинамическим действием и действием озонированного физиологического раствора по отдельности.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-02-00667).

Список литературы / References:

1. Semenza G.L. Pharmacologic targeting of hypoxia-inducible factors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2019, vol. 59, pp. 379-403.

2. Gao P., Zhang H., Dinavahi R., Li F., Xiang Y., Raman V., Bhujwala Z.M., Felsner D.W., Cheng L., Pevsner J., Lee L.A., Semenza G.L., Dang C.V. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell*, 2007, vol. 12, no. 3, pp. 230-238.
3. Козлов Ю.П., Котелевцев С.В., Новиков К.Н. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. *Медицина и высокие технологии*, 2016, № 1, с. 28-30. [Kozlov Yu.P., Kotelevtsev S.V., Novikov K.N. Free radicals and their role in normal and pathological processes. *Medicine and High Technologies*, 2016, no. 1, pp. 28-30. (In Russ.)]
4. Bhatta A.K., Keyal U., Wang X., Gellén E. A review of the mechanism of action of lasers and photodynamic therapy for onychomycosis. *Lasers Med. Sci.*, 2017, vol. 32, no. 2, pp. 469-474.
5. Якубовская Р.И., Плютинская А.Д., Лукьянец Е.А. Сравнительное изучение фотосенсибилизаторов различных классов в системе in vitro. Фталоцианины. *Российский биотерапевтический журнал*, 2014, т. 13, № 4, с. 65-72. [Yakubovskaya R.I., Plyutinskaya A.D., Lukyanets E.A. Comparative study of photosensitizers of various classes in the in vitro system. Phthalocyanines. *Russian Biotherapeutic Journal*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 65-72. (In Russ.)]
6. Sheng T., Ong Y.H., Busch T.M., Zhu T.C. Reactive oxygen species explicit dosimetry to predict tumor growth for BPD-mediated vascular photodynamic therapy. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, 2019, p. 10861.
7. Щербатюк Т.Г. Озонотерапия злокачественных новообразований: за и против. *Нижегородский медицинский журнал*, 2003, № 1, с. 52-56. [Shcherbatyuk T.G. Ozone therapy of cancer: advantages and disadvantages. *Nizhny Novgorod Medical Journal*, 2003, no. 1, pp. 52-56. (In Russ.)]
8. Bocci V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *J. Biol. regulators and homeostatic agents*, 1997, vol. 10, no. 2/3, pp. 31-53.
9. Фисенко В.П. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Ремедиум, 2000. 398 с. [Fisenko V.P. *Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. Moscow, Remedium, 2000, 398 p. (In Russ.)]
10. Лагода Т.С., Каплан М.А., Бондарь А.М., Бокова М.Б., Иванов Э.А., Бровин А.И., Спиченкова О.Н. Оптимизация фотодинамической терапии солидной саркомы М1 у крыс Вистар на примере применения препарата «Фотосенс». *Вопросы онкологии*, 2005, т. 51, № 1, с. 103-107. [Lagoda T.S., Kaplan M.A., Bondar A.M., Bokova M.B., Ivanov E.A., Brovin A.I., Spichenkova O.N. Optimization of the photodynamic therapy of solid M1 sarcoma in Wistar rats using the Photosens drug as an example. *Questions of Oncology*, 2005, vol. 51, no. 1, pp. 103-107. (In Russ.)]
11. Щербатюк Т.Г., Селемир В.Д., Клинцева Е.С. *Способ повышения противоопухолевого эффекта химиотерапии*. Патент РФ № 2361590 от 24.05.2007. [Shcherbatyuk T.G., Selemir V.D., Klintsova E.S. *A way to increase the antitumor effect of chemotherapy*. RF patent no. 2361590 dated 05.24.2007. (In Russ.)]
12. Буранов С.Н., Горохов В.В., Карелин В.И., Селемир В.Д. *Устройство для озонотерапии*. Патент на изобретение RUS 2249445 от 21.04.2003. [Buranov S.N., Gorokhov V.V., Karelin V.I., Selemir V.D. *Device for ozone therapy*. Patent for invention RUS 2249445 dated 04/21/2003. (In Russ.)]
13. Ярославцева-Исаева Е.В., Каплан М.А., Романко Ю.С., Сокол Н.И. Разработка методики фотодинамической терапии экспериментальной опухоли (саркома М1) при локальном введении фотосенсибилизатора. *Российский биотерапевтический журнал*, 2003, № 2 (4), с. 19-22. [Yaroslavtseva-Isaeva E.V., Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Sokol N.I. Development of a method for the photodynamic therapy of an experimental tumor (M1 sarcoma) with local administration of a photosensitizer. *Russian Biotherapeutic Journal*, 2003, no. 2 (4), pp. 19-22. (In Russ.)]
14. Speit G., Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.*, 2006, no. 314, pp. 275-286.
15. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Сидневая Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А., Середенин С.Б., Бекиш В.Я., Чернуха И.М. *Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений*: Методические рекомендации. М.: Полиграфсервис, 2006, 27 с. [Durnev A.D., Zhanataev A.K., Anisina E.A., Sidnevaya E.S., Nikitina V.A., Oganesyants L.A., Seredenin S.B., Bekish V.Ya., Chernukha I.M. *The use of the method of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess the genotoxic properties of natural and synthetic compounds*: Methodological recommendations. Moscow, Polygraphservice, 2006, 27 pp. (In Russ.)]
16. Gapeyev A.B., Lukyanova N.A., Gudkov S.V. Hydrogen peroxide induced by modulated electromagnetic radiation protects the cells from DNA damage. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2014, vol. 9, no. 10, pp. 915-921.
17. Chemeris N.K., Gapeyev A.B., Sirota N.P., Gudkova O.Yu., Kornienko N.V., Tankanag A.V., Konovalov I.V., Buzoverya M.E., Suvorov V.G., Logunov V.A. DNA damage in frog erythrocytes after in vitro exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field. *Mutat. Res.*, 2004, vol. 558, no. 1-2, pp. 27-34.
18. Сирота Н.П., Кузнецова Е.А. Применение метода «комета тест» в радиобиологических исследованиях. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2010, т. 50, № 3, с. 329-339. [Sirota N.P., Kuznetsova E.A. Application of the "comet assay" method in radiobiological research. *Radiation Biology. Radioecology*, 2010, vol. 50, no. 3, pp. 329-339. (In Russ.)]
19. Чернигина И.А., Щербатюк Т.Г. Новая версия метода ДНК-комет. *Современные технологии в медицине*, 2016, т. 8, № 1, с. 20-27. [Chernigina I.A., Shcherbatyuk T.G. A new version of the DNA-comet method. *Modern Technologies in Medicine*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 20-27. (In Russ.)]

20. Чернигина И.А., Плеханова Е.С., Щербатюк Т.Г. Метод ДНК-комет в оценке уровня повреждений ДНК лейкоцитов цельной крови после фотодинамической терапии. *Современные технологии в медицине*, 2017, т. 9, № 4, с. 89-95. [Chernigina I.A., Plekhanova E.S., Shcherbatyuk T.G. The DNA-comet method for assessing the level of damage to the DNA of whole blood leukocytes after photodynamic therapy. *Modern Technologies in Medicine*, 2017, vol. 9, no. 4, pp. 89-95. (In Russ.)]
21. Klebanov G.I., Poltanov E.A. Primary free-radical and secondary molecular cellular mechanisms behind laser therapy. *Laser Physics*, 2003, vol. 13, no. 1, pp. 70-83.
22. Vladimirov Yu.A., Klebanov G.I., Borisenko G.G., Osipov A.N. Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect. *Biophysics*, 2004, vol. 49, no. 2, pp. 339-350.
23. Ванин А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы. *Биохимия*, 1998, т. 63, № 7, с. 867-869. [Vanin A.F. Nitric oxide in biology: history, condition and prospects. *Biochemistry (Moscow)*, 1998, vol. 63, no. 7, pp. 867-869. (In Russ.)]
24. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В., Стариков Ю.В., Филипенко М.Л., Боярских У.А. Участие факторов транскрипции p53 и NF-kB в редоксзависимых механизмах нарушения апоптоза мононуклеарных лейкоцитов. *Вестник Российской АМН*, 2009, № 4, с. 3-7. [Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Chasovskikh N.Yu., Starikova E.G., Kaygorodova E.V., Starikov Yu.V., Filipenko M.L., Boyarsky U.A. Participation of p53 and NF-kB transcription factors in redox-dependent mechanisms of apoptosis disturbance of mononuclear leukocytes. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2009, no. 4, pp. 3-7. (In Russ.)]
25. Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения. *Практическая онкология*, 2002, т. 3, № 4, с. 229-235. [Kopnin B.P. Neoplastic cell: basic properties and mechanisms of their occurrence. *Practical Oncology*, 2002, vol. 3, no. 4, pp. 229-235. (In Russ.)]

SPONTANEOUS AND INDUCED DNA DAMAGE IN BLOOD LEUKOCYTES OF RATS WITH RA KIDNEY CARCINOMA UNDER OZONE-PHOTODYNAMIC TREATMENT

Shcherbatyuk T.G.^{1,2}, Chernigina I.A.², Plekhanova E.S.², Gapeyev A.B.³

¹ Pushchino State Institute of Natural Science

Prospekt Nauki, 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: ozone_stg@mail.ru;

² «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Minin and Pozharsky Sq., 10/1, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

³ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia

Abstract. Using rat RA kidney carcinoma as a model of experimental neoplasia, the effects of ozonized saline and the photodynamic treatment on the tumor growth and the level of spontaneous and induced DNA damage in rat blood leukocytes were studied. It was found that the combined parenteral administration of an ozonized physiological solution with ozone concentration of 400 µg/L in an ozone-oxygen mixture intraperitoneally and a 0.3% Photosens solution intratumorally with local exposure to light at a wavelength of 660±10 nm for 10 min causes a statistically significant inhibition of growth of rat kidney carcinoma and complete tumor regression in 50% of cases. On the 20th day of RA kidney carcinoma growth, the combined ozone-photodynamic treatment leads to a decrease in the level of spontaneous and induced DNA damage in rat blood leukocytes in comparison with the photodynamic treatment and the action of ozonized physiological solution separately.

Key words: DNA damage, ozone, photodynamic therapy, experimental oncology.