

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ В УСЛОВИЯХ ОЗОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2020 г. Т.Г. Щербатюк\*, \*\*, Е.С. Жукова (Плеханова)\*, Ю.В. Никитина\*, А.Б. Гапеев\*\*\*

\*Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

\*\*Пушкинский государственный естественно-научный институт Минобрнауки России, 142290, Московская область, Пушкино Московской области, проспект Науки, 3

\*\*\*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: ozone\_stg@mail.ru

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 02.12.2019 г.

Принята к публикации 20.01.2020 г.

С использованием модели карциномы почки РА исследовано озono-фотодинамическое воздействие на скорость опухолевого роста и окислительную модификацию белков в тканях крыс. Показано, что разработанный экспериментально-терапевтический метод, основанный на совместном парентеральном введении озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л внутривентрально и 0.3% раствора фотосенсибилизатора «Фотосенс» интратуморально с локальным действием света с длиной волны  $660 \pm 10$  нм в течение 10 мин, снижает интенсивность опухолевого роста. На фоне комбинированного применения озонированного физиологического раствора и фотодинамической терапии наблюдается нормализация про-/антиоксидантного баланса в организме экспериментальных животных.

*Ключевые слова:* фотодинамическое воздействие, озонированный физиологический раствор, окислительный стресс, окислительная модификация белков, экспериментальная карцинома почки, аутобредные крысы.

DOI: 10.31857/S0006302920020209

Фотодинамическое воздействие, генерирующее активные формы кислорода при облучении фотосенсибилизатора светом, используется в онкологической практике в основе фотодинамической терапии (ФДТ), которая рассматривается как многообещающий подход при лечении поверхностно расположенных злокачественных новообразований, множественных опухолей, первичных и метастатических поражений у инкурабельных больных, у пациентов с тяжелыми сопутствующими патологиями [1]. Однако несмотря на целый ряд преимуществ ФДТ, таких как малая инвазивность, высокая избирательность поражения новообразования, низкая темновая токсичность вводимых фотосенсибилизаторов, отсутствие риска тяжелых местных и си-

стемных поражений, возможность проведения ранней диагностики и органосохраняющей терапии, одновременное совмещение диагностики и терапии [1], противоопухолевая эффективность фотодинамического воздействия во многом зависит от кровоснабжения и степени оксигенации опухоли [2]. Одним из подходов, способствующих увеличению насыщенности кислородом крови и тканей, является озонотерапия [3].

Ранее мы показали, что применение озонированного физиологического раствора (ОФР) в комплексе с ионизирующим излучением селективно управляет тканевой радиочувствительностью, повышает терапевтический интервал между опухолевой и нормальной тканью. Вызванная озонотерапией искусственная оксигенация, преодолевающая радиорезистентность гипоксических клеток лимфосаркомы Плисса, позволила снизить дозу гамма-облучения и, следовательно, уменьшить нагрузку на здоровые ткани организма [4]. Синергизм озono- и химиотерапии был проде-

*Сокращения:* ФДТ – фотодинамическая терапия, ОФР – озонированный физиологический раствор, ОМБ – окислительная модификация белков, ДНФГ – динитрофенилгидразоны, ТБК – тиобарбитуровая кислота, ОИП – ориентировочно-исследовательское поведение.

монстрирован нами на моделях крысиных опухолевых штаммов – гепатоме-27 и гепатоме Зайделя. Нами было показано, что совместное применение ОФР и 5-фторурацила крысам с перевитой гепатомой-27 и гепатомой Зайделя тормозит рост опухоли на 54 и 66% и увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных на 62 и 86% соответственно [5]. Применение такой комбинированной терапевтической схемы приводит к коррекции про-/антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей, снижает уровень окислительной модификации белков (ОМБ), повышает общую антиоксидантную активность и активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы) в крови животных в условиях роста гепатомы-27 и гепатомы Зайделя. Комбинированное введение ОФР и доксорубина в дозах 0.6 и 1.2 мг/кг внутривенно крысам с гепатомой Зайделя общим курсом семь суток тормозило рост опухоли на 54 и 56% соответственно, а также снижало общую свободнорадикальную активность, интенсивность перекисного окисления липидов, активность супероксиддисмутазы и каталазы [6].

Принимая во внимание, что озонотерапия может уменьшить опухолевую гипоксию, привести к менее агрессивному поведению опухоли и представляется действенным адъювантом во время проведения ФДТ, мы выполнили серию экспериментов по разработке способа повышения противоопухолевой эффективности ФДТ.

Цель исследования состояла в оценке противоопухолевой эффективности комбинированного применения фотодинамического воздействия и озонированного физиологического раствора с контролем влияния этого воздействия на ОМБ тканей организма лабораторных животных-опухоленосителей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** В исследованиях были использованы 2.5-месячные аутбредные крысы-самцы SD (Sprague Dawley) массой  $250 \pm 25$  г, приобретенные в НПП «Питомник лабораторных животных» (Пушино Московской обл.). Эксперименты проводили на базе кафедры биологии Приволжского исследовательского медицинского университета (ПИМУ, Нижний Новгород) в весенне-летний период. Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественным освещением, получали полнорационный комбикорм («Лабораторкорм», Москва) и без ограничений питьевую водопроводную воду. До ввода в эксперимент крысы ( $n = 105$ ) были протестированы в тесте «Открытое поле» [7] в ранее предложенной модификации [8] для выявления девиантного поведения и отбраковывания особей. Определяли горизонтальную и вертикальную двигательную ак-

тивность, ориентировочно-исследовательскую активность, эмоциональность и уровень тревожности.

Эксперименты по исследованию комбинированного действия ОФР и ФДТ были выполнены на 32-х крысах. В качестве модели неоплазии была взята быстрорастущая опухоль – карцинома почки (штамм РА, РОНЦ им. Блохина РАМН, Москва). Инкубационный период опухоли не превышает семи-десяти суток, развитие опухоли полностью завершается к 26-м суткам от момента перевивки. Опухоль для инокуляции брали на 14-е сутки развития. Инокулюм РА вводили крысам подкожно в область левого бедра.

В эксперимент брали особей с исходным объемом подкожно перевитой опухоли от 0.5 до 4.2 см<sup>3</sup>. На девятые сутки после трансплантации животные были равномерно распределены в зависимости от объемов опухоли и их ориентировочно-исследовательской активности по группам: 1) животные-опухоленосители без воздействия «РА» ( $n = 6$ ); 2) животные-опухоленосители, которым проводили инъекции озонированного физиологического раствора «ОФР» ( $n = 6$ ); 3) животные-опухоленосители, которым проводили процедуры «ФДТ» ( $n = 6$ ); 4) животные-опухоленосители, которым проводили комбинированную терапию «ФДТ + ОФР» ( $n = 5$ ). Отдельную группу «Интактные» составили интактные крысы ( $n = 9$ ), которые не подвергались никаким воздействиям.

**Схема воздействия.** Учитывая характер роста экспериментальной модели карциномы почки РА, была разработана следующая схема комбинированной терапии [9].

Для проведения ФДТ интратуморально вводили 0.3%-й раствор фотосенсибилизатора – гидроксид алюминия трисульфогталоцианин (ГНЦ «НИОПИК», Москва) в три точки опухоли из расчета 30% от объема опухоли. Затем через 10 ч после инъекций препарата на каждую точку в течение 10 мин воздействовали светодиодным лазером с длиной волны  $660 \pm 10$  нм и интенсивностью излучения 100 мВт/см<sup>2</sup>. В качестве источника света использовали аппарат физиотерапевтический светодиодный АФС (ООО «Полироник», Москва). Всего было проведено два сеанса ФДТ – на 15-е и 19-е сутки после перевивки.

Действие озона осуществляли введением ОФР в течение десяти суток (пять воздействий через сутки), начиная с десятых суток после перевивки опухолевого штамма. Внутривентриально вводили по 0.5 мл ОФР с концентрацией озона в озонкислородной смеси 400 мкг/л. Инъекции ОФР животным осуществляли сразу после барботирования изотонического 0.9%-го раствора хлорида натрия озонкислородной смесью. Озонкис-

лородную смесь получали из медицинского сверхчистого кислорода на озонаторе «ТЕОЗОН» (РФЯЦ–ВНИИЭФ, Саров Нижегородской обл.) [10].

**Методы оценки опухолевого роста.** Противоопухолевый эффект проводимой терапии оценивали по коэффициенту абсолютного прироста опухоли ( $K$ ), который рассчитывали на основе изменения объемов опухолевого узла по формуле (1):

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \quad (1)$$

где  $V = \frac{\pi}{6} \cdot \left(\frac{d_1 + d_2}{2}\right)^3$  – объем опухолевого узла ( $\text{см}^3$ ),  $V_0$  – до воздействия,  $V_t$  – после воздействия на срок наблюдения  $t$ ,  $d_1$  и  $d_2$  – два взаимно перпендикулярных поперечных сечения опухоли (в см). Значения  $K \geq 0$  оценивали как продолженный рост неоплазии,  $-1 \leq K < 0$  – как торможение роста, а  $K = -1$  – как полную регрессию опухоли. Заключение о полной регрессии неоплазии делали на основании отсутствия видимого и пальпируемого очага [11].

**Методы оценки параметров свободнорадикального окисления.** На 20-е сутки после трансплантации опухоли животных выводили из эксперимента декапитацией под ингаляционным наркозом с последующим обескровливанием, затем проводили вскрытие с извлечением и фиксацией органов в жидком азоте [12]. Для биохимических исследований использовали плазму крови и гомогенаты тканей печени и селезенки. Гомогенизацию тканей осуществляли в жидком азоте методом растирания.

Для определения выраженности окислительного стресса, вызванного ростом опухоли и озono-фотодинамическим воздействием, оценивали показатели ОМБ как одного из ранних индикаторов повреждения ткани [13], перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы. Степень ОМБ анализировали по реакции карбонильных группировок с 2,4-динитрофенилгидразином: кетон-динитрофенилгидразонов (кетон-ДНФГ) и альдегид-динитрофенилгидразонов (альдегид-ДНФГ) при спонтанном и металл-индуцированном окислении [14]. Концентрацию карбонильных производных, образующихся в результате ОМБ, выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 мг белка или мл плазмы [15]. Детектировали ТБК-активные продукты (ТБК – тиобарбитуровая кислота) перекисного окисления липидов [14]. Интенсивность общей свободнорадикальной активности оценивали косвенно методом индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа хемилюминесценции [16]. Состояние антиоксидантной системы защиты оценивали по активности антиоксидан-

ных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы в гомогенатах тканей. Об активности супероксиддисмутазы судили по реакции восстановления нитросинего тетразолия, каталазы – по изменению оптической плотности в области поглощения пероксида водорода [14]. Активность ферментов выражали в единицах активности на 1 г ткани.

**Статистический анализ.** Все эксперименты проведены по протоколу «слепого контроля», когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Все данные представлены в виде  $Me$  [25%; 75%], где  $Me$  – медиана регистрируемого параметра, а 25 и 75% – интерперцентильный размах. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента–Ньюмена–Кейлса при нормальном распределении данных по тесту Колмогорова–Смирнова ( $p < 0.016$ ). Для парного сравнения групп данных использовали  $U$ -критерий Манна–Уитни ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты по оценке опухолевого роста у крыс без воздействия и после проведенной терапии на 10-е и 20-е сутки после перевивки представлены в табл. 1. Случаев спонтанной регрессии трансплантированной карциномы почки РА у животных не было выявлено (табл. 1). После проведения фотодинамического воздействия полная регрессия карциномы наблюдалась в трех из шести случаев, а внутрибрюшные инъекции ОФР вызвали полную регрессию опухоли только в одном случае (табл. 1). При этом после ФДТ при продолженном росте карциномы в некоторых случаях наблюдалась интенсификация роста опухоли по сравнению с контролем, о чем можно судить по более высоким показателям коэффициента прироста опухоли (табл. 2).

Анализ индивидуальных физиологических особенностей крыс с интенсификацией роста опухоли после ФДТ показал, что они относятся к животным с исходно высоким уровнем ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) в тесте «Открытое поле» (табл. 3). Учитывая данные о связи поведения лабораторных крыс с уровнем функциональной активности иммунокомпетентных клеток [17], показателей иммунного статуса с интенсивностью процессов свободнорадикального окисления [18] и об обратной корреляционной зависимости между показателями свободнорадикальной активности и поведенческими реакциями крыс [19], можно заключить, что экспериментальные животные с высоким уровнем ОИП имеют низкие уровни продуктов перекисидации при активной иммунной системе

**Таблица 1.** Изменение объема опухолевого узла и коэффициента абсолютного прироста опухоли у крыс без воздействия и после проведенной терапии

Группа животных	Исходный объем опухоли, см <sup>3</sup>	Объем опухоли, см <sup>3</sup>		Случаи регресса опухоли	K прироста опухоли
		Сутки после перевивки			
		10 (до лечения)	20 (после лечения)		
РА	0.52 – 4.19	1.40 [1.02; 2.81]	20.83 [4.68; 35.43]	0/6	7.56 [3.59; 11.61]
ФДТ		1.77 [1.77; 2.57]	12.22 [0.00; 33.27]	3/6	1.92 [-1.00; 17.80]
ОФР		2.03 [1.77; 2.81]	15.92 [5.20; 32.61]	1/6	4.13 [1.94; 17.42]
ФДТ + ОФР		1.91 [0.52; 4.19]	3.32 [1.76; 7.58]	2/5	0.42* [-0.41; 5.44]

Примечание. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой без воздействия (РА) по  $U$ -критерию Манна–Уитни

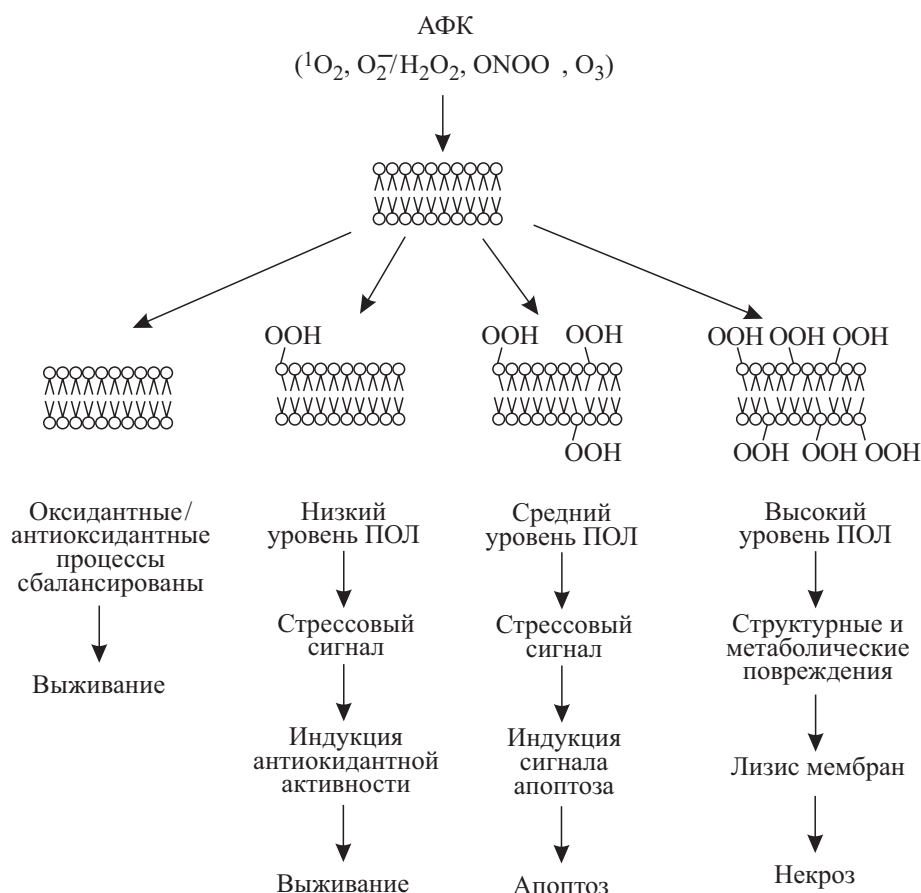
**Таблица 2.** Интенсивность роста карциномы почки РА в случаях продолженного роста ( $K \geq 0$ )

Группа животных	Кол-во животных без регрессии опухоли	Коэффициент прироста опухоли
РА	6	7.56 [3.59; 11.61]
ФДТ	3	17.26 [4.83; 28.79]
ОФР	5	4.88 [3.39; 17.45]
ФДТ + ОФР	3	3.49 [0.42; 11.17]

**Таблица 3.** Параметры ориентировочно-исследовательского поведения аутбредных белых крыс SD в тесте «Открытое поле»

Группа животных	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность			Ориентировочно-исследовательская активность
	Периферическая	Центральная	Суммарная	Свободная	С опорой на стенку	Суммарная	
1 ( $n = 25$ )	210 [195; 221]	18 [13; 23]	227 [209; 242]	2 [1; 5]	10 [8; 11]	11 [10; 16]	237 [219; 253]
2 ( $n = 57$ )	155 [143; 164]*	12 [7; 17]	168 [152; 177]*	2 [0; 4]	7 [4; 11]	9 [5; 13]	175 [161; 186]*
3 ( $n = 23$ )	104 [74; 125]*^	6 [4; 13]*	117 [84; 134]*^	1 [0; 3]	5 [2; 7]*	5 [4; 9]*	126 [88; 142]*^

Примечание. 1 – группа животных с высоким уровнем ОИП; 2 – группа животных со средним уровнем ОИП; 3 – группа животных с низким уровнем ОИП; \* –  $p < 0.001$  относительно группы 1, ^ –  $p < 0.001$  относительно группы 2 по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.



**Рис. 1.** Зависимость реакции клеток на воздействие активных форм кислорода от интенсивности процессов перекисного окисления липидов (модифицировано из работы [20]).

организма. Реакция клеток на воздействие активных форм кислорода зависит от интенсивности процессов перекисного окисления липидов (рис. 1) [20], и фотодинамическое воздействие на опухоль с исходно низким уровнем свободнорадикального окисления, вероятно, привело к индукции антиоксидантной активности в опухолевых клетках и их выживанию. Локальное же повышение уровня свободнорадикального окисления в опухолевом очаге, возможно, способствовало снижению уровня местного иммунитета. Все это в результате и привело к интенсификации роста карциномы РА при фотодинамическом воздействии.

Стоит отметить, что для животных-опухоленосителей без воздействия с исходно высоким уровнем ОИП были характерны самые низкие показатели коэффициента прироста опухоли. У крыс с исходно низкой горизонтальной и вертикальной двигательной активностью трансплантированная карцинома почки росла более агрессивно.

После комбинированного действия ОФР и ФДТ регресс карциномы наблюдался в двух из пяти случаев (табл. 1), но при этом не было заре-

гистрировано стимуляции роста при разработанной нами схеме (табл. 2) и торможение роста опухоли было статистически значимо по сравнению с группой без воздействия (табл. 1). Мы предполагаем, что воздействие ОФР с выбранной концентрацией озона за счет образования активных форм кислорода, озонидов и запуска синтеза цитокинов [3] снизило устойчивость клеток карциномы к фотодинамическому воздействию. Вероятно, гибель опухолевых клеток в таком случае происходит даже при низком уровне генерации активных форм кислорода, тем самым преодолевается нежелательное цитостимулирующее действие ФДТ и повышается ее противоопухолевая эффективность.

Оценка изменений окислительного гомеостаза показала, что на 20-е сутки роста карциномы почки РА наблюдалось достоверное повышение содержания альдегид-ДФГ, полученных при спонтанном окислении, по сравнению с интактными крысами ( $p < 0.025$ ) в гомогенатах печени животных-опухоленосителей (табл. 4). При металл-катализируемом окислении белка в ткани печени животных-опухоленосителей повышался

**Таблица 4.** Содержание альдегид-ДНФГ и кетон-ДНФГ в гомогенатах ткани печени крыс при спонтанном и индуцированном окислении

Группа животных	Содержание альдегид-ДНФГ, ед. опт. пл./1 мг белка		Содержание кетон-ДНФГ, ед. опт. пл./1 мг белка	
	Спонтанное окисление	Индуцированное окисление	Спонтанное окисление	Индуцированное окисление
Интактные	443 [338; 514]	461 [385; 674]	515 [411; 589]	558 [438; 800]
РА	642 [532; 850]*	729 [700; 871]*	774 [508; 1038]	855 [775; 920]*
ФДТ	496 [466; 625]	597 [494; 663]^	485 [404; 763]	587 [514; 700]^
ОФР	555 [396; 615]	629 [500; 874]	635 [416; 676]	586 [580; 986]
ФДТ + ОФР	500 [432; 558]	573 [465; 728]^	564 [532; 644]	682 [544; 889]

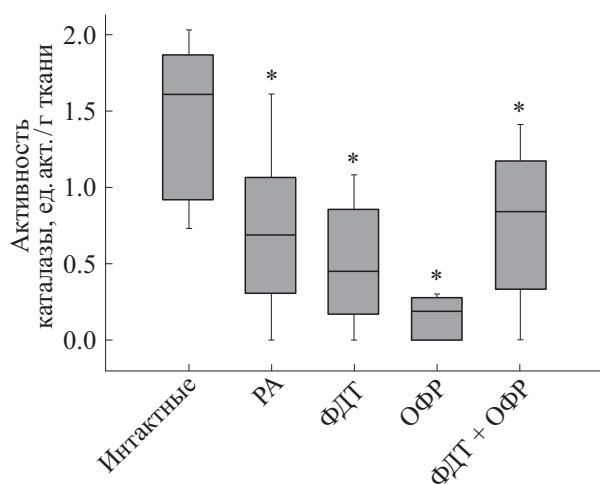
Примечание. \* –  $p < 0.04$  по сравнению с интактными животными, ^ –  $p < 0.05$  по сравнению с животными-опухоленосителями без воздействия (РА) по  $U$ -критерию Манна–Уитни.

уровень альдегид-ДНФГ ( $p < 0.015$ ) и кетон-ДНФГ ( $p < 0.04$ ) по сравнению с интактными животными. Эти данные указывают на раннее развитие окислительного стресса в тканях печени опухоленосителей и истощение резервно-адаптационных возможностей ее клеток [13].

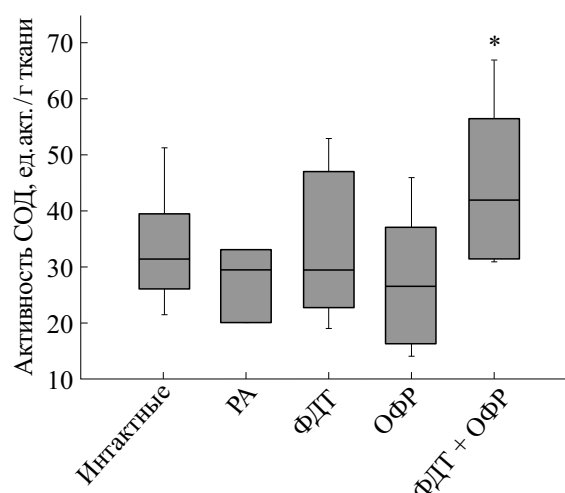
Усиление ОМБ в тканях печени на 20-е сутки роста опухоли РА частично можно объяснить снижением активности антиоксидантного фермента каталазы более чем в два раза ( $p < 0.01$ ) (рис. 2) и снижением активности супероксиддисмутазы в тканях этого органа по сравнению с ин-

тактными крысами (рис. 3). Это может быть обусловлено оттоком антиоксидантных ферментов в опухолевый очаг [21].

Однако стоит отметить, что при этом на 20-е сутки развития опухоли в плазме крови животных не было выявлено статистически значимых различий в уровне ОМБ (табл. 5) на фоне 15%-го увеличения свободнорадикальной активности (рис. 4) и повышения содержания ТБК-активных продуктов (рис. 5), основным из которых является малоновый диальдегид, по сравнению с интактными крысами. Это говорит о том, что белки плазмы более устойчивы к окислению, чем белки печени, и могут прояв-



**Рис. 2.** Активность каталазы в гомогенатах печени крыс различных экспериментальных групп; \* –  $p < 0.01$  по сравнению с интактной группой по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.



**Рис. 3.** Активность супероксиддисмутазы в гомогенатах печени крыс; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой опухоленосителей (группа «РА») без воздействия по  $U$ -критерию Манна–Уитни.

**Таблица 5.** Содержание альдегид-ДНФГ и кетон-ДНФГ в плазме крови интактных животных и крыс-опухоленосителей

ОМБ, ед. опт. пл./мл плазмы	Группа животных	
	Интактные	РА
Альдегид-ДНФГ при спонтанном окислении	0.24 [0.23; 0.26]	0.22 [0.20; 0.25]
Альдегид-ДНФГ при индуцированном окислении	0.58 [0.54; 0.62]	0.60 [0.57; 0.70]
Кетон-ДНФГ при спонтанном окислении	0.29 [0.28; 0.31]	0.29 [0.25; 0.30]
Кетон-ДНФГ при индуцированном окислении	0.69 [0.66; 0.75]	0.72 [0.66; 0.77]

**Таблица 6.** Содержание альдегид-ДНФГ в гомогенатах селезенки при спонтанном и индуцированном окислении

Группа животных	Группа животных	
	Спонтанное окисление	Индуцированное окисление
Интактные	418 [388; 487]	646 [565; 806]
РА	443 [356; 520]	738 [501; 855]
ФДТ	514 [501; 546]*	823 [749; 862]*
ОФР	453 [330; 585]	644 [514; 790]
ФДТ + ОФР	550 [474; 716]*	868 [685; 1055]

Примечание. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с интактными животными по  $U$ -критерию Манна–Уитни.

лять антиоксидантные свойства, что уже показано для билирубина [22] и альбумина [23]. Поэтому оценка ОМБ в плазме крови при опухолевом росте не является хорошим маркером состояния окислительного стресса.

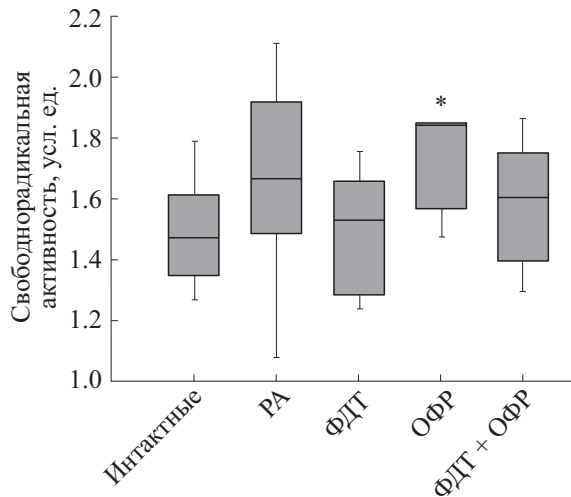
Локальное фотодинамическое воздействие на опухоль привело к уменьшению окислительной напряженности в печени: статистически значимо снизился уровень альдегид-ДНФГ и кетон-ДНФГ при металл-катализируемом окислении белка по сравнению с животными-опухоленосителями без воздействия (табл. 4), что говорит о восстановлении адаптационных резервов в печени. Однако при моновоздействии ФДТ спровоцировала окислительное повреждение в тканях селезенки – повысился уровень альдегид-ДНФГ в гомогенатах ткани при спонтанном и металл-катализируемом окислении ( $p < 0.05$ ) по сравнению с интактными крысами (табл. 6).

Инъекции ОФР с низкой концентрацией озона на фоне повышения свободнорадикальной активности плазмы крови (рис. 4) не вызывали роста уровня ОМБ в селезенке (табл. 6), но и не способствовали снижению повреждающего действия ФДТ в комбинации (табл. 6).

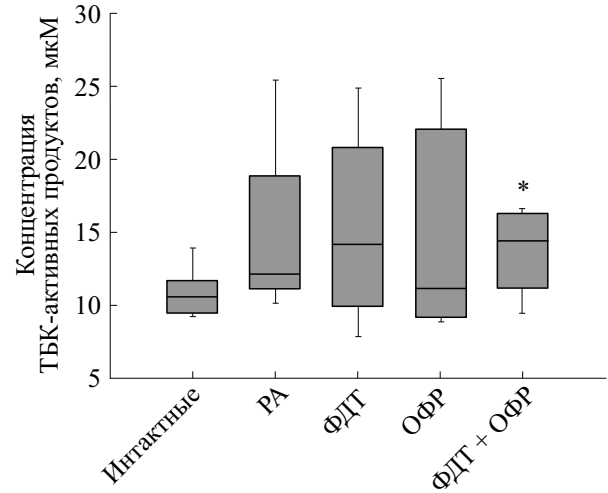
Следует отметить, что только после совместного применения ОФР и фотодинамического воздействия наблюдалось восстановление работы

антиоксидантных ферментов, таких как каталаза и супероксиддисмутаза, в ткани печени (рис. 2 и 3). Это, скорее всего, связано не с прямым действием комбинированной терапии, а с подавлением роста опухолевого очага и уменьшением патологического влияния на печень. При этом наблюдалось статистически значимое снижение уровня индуцированных альдегид-ДНФГ в гомогенатах ткани печени (табл. 4) и значительное снижение процентильного размаха по данным ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс-опухоленосителей (рис. 5).

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 [21]. Окислительные воздействия, направленные на интенсификацию свободнорадикальных процессов в опухоли и преодолевающие ее гипоксию, могут спровоцировать гипероксическое состояние в целостном организме. Отсюда важно проводить комплексную оценку уровня свободнорадикального окисления с учетом тканеспецифичности, в частности, и индивидуальной особенности, в общем.



**Рис. 4.** Уровень свободнорадикальной активности плазмы крови крыс в различных экспериментальных группах; \* –  $p < 0.03$  по сравнению с интактной группой по  $U$ -критерию Манна–Уитни.



**Рис. 5.** Концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс; \* –  $p < 0.02$  по сравнению с интактной группой по  $U$ -критерию Манна–Уитни.

Мы установили, что монофотодинамическое воздействие при интратуморальном введении 0.3% раствора «Фотосенса» из расчета 30% от объема опухоли и последующей активацией его светодиодным лазером может оказывать стимулирующее действие на рост неоплазии. При этом «группой риска» для такого ответа на экспериментальную терапию являются животные с исходно низким уровнем ориентировочно-исследовательской активности. Разработанный нами экспериментально-терапевтический метод, основанный на комбинированном действии озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л и фотодинамического воздействия, снижает интенсивность опухолевого роста, снижает содержание продуктов ОМБ альдегид-ДФГ, повышает активность супероксиддисмутазы в печени, однако сохраняет высокий фон окислительных повреждений селезенки. Для повышения эффективности разрабатываемой схемы комбинированного применения озono-фотодинамического воздействия необходимы дальнейшие исследования в направлении оптимизации параметров озонотерапии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта № 19-02-00667.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили согласно рекомендациям, установленным Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и в соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным (Эдинбург, 2000). Работа была одобрена Локальным этическим комитетом ПИМУ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Кузнецов, Исследования и практика в медицине **2** (4), 98 (2015).
2. А. Б. Гапеев и Т. Г. Щербатюк, Биол. мембраны **37** (2020) (в печати)
3. Т. Г. Щербатюк, Нижегородский мед. журн. **1**, 52 (2003).
4. Т. Г. Щербатюк, Фізіологіч. журн. **54**, 41 (2008).
5. Т. Г. Щербатюк, В. Д. Селемир и Е. С. Клинцева, Патент на изобретение RUS 2361590 (2007).
6. Е. С. Князева, Т. Г. Щербатюк, и А. Б. Гапеев, Вестн. физиотерапии и курортологии **25**, 37 (2019).
7. Я. Буреш, О. Бурешова и Д. П. Хьюстон, *Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения* (Высш. шк., М., 1991).
8. Н. В. Вдовина, Е. С. Клинцева и Т. Г. Щербатюк, Соврем. технологии в медицине **2**, 12 (2010).
9. Т. Г. Щербатюк, И. А. Чернигина, Е. С. Плеханова и А. Б. Гапеев, Актуальные вопросы биологической физики и химии **4**, 564 (2019).



10. С. Н. Буранов, В. В. Горохов, В. И. Карелин и В. Д. Селемир, Патент на изобретение RU 2249445 (2003).
11. Е. В. Ярославцева-Исаева, М. А. Каплан, Ю. С. Романко и др., Рос. биотерапев. журн. **2**, 19 (2003).
12. К. Е. Коптяева, А. А. Мужикян, Я. А. Гущин и др., Лабораторные животные для научных исследований **2**, 71 (2018).
13. Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий и др., Современ. проблемы токсикологии **8**, 20 (2005).
14. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина и Н. Н. Зыбина, Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма (ИКФ «Фоллиант», СПб., 2000).
15. Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и И. С. Порохов, Вопр. мед. химии **41**, 24 (1995).
16. Е. И. Кузьмина, А. С. Нелюбин и М. К. Шенникова, в сб. *Биохимия и биофизика микроорганизмов* (ГГУ, Горький, 1983), сс. 41–48.
17. Е. В. Маркова, *Поведение и иммунитет* (НГПУ, Новосибирск, 2013).
18. Б. Л. Жаркой, в сб. *Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных* (Воронежский гос. ун-т, Воронеж, 2004), сс. 36–40.
19. Ю. В. Никитина, Автореферат дис. ... к-та биол. наук (Нижегород. госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород 2009).
20. W. Girotti, *J. Lipid Res.* **39**, 1529 (1998).
21. Ю. П. Козлов, *Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах* (МГУ, М., 1973).
22. Л. Б. Дудник, Л. М. Виксна и А. Я. Майоре, Вопр. мед. химии **46**, 597 (2000).
23. М. М. Созарукова, Е. В. Проскурина и Ю. А. Владимиров, Вестн. РГМУ **1**, 61 (2016).

## Oxidative Modification of Proteins in Tissues of Tumor-Bearing Rats after Ozone-Photodynamic Therapy

T.G. Shcherbatyuk<sup>\*, \*\*</sup>, E.S. Zhukova (Plekhanova)<sup>\*</sup>, Ju.V. Nikitina<sup>\*</sup>, and A.B. Gapeyev<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>*Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

<sup>\*\*</sup>*Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

<sup>\*\*\*</sup>*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Rat renal carcinoma was used as the model to study ozone-photodynamic effects on the rate of tumor growth and oxidative modification of proteins in rat tissues. In this study, we explore the utility of the experimental method for therapeutic benefits to test a combination of the ozonated physiological saline solution and Photosens photosensitizer for parenteral administration. Results indicated that the intraperitoneal injection of a gaseous oxygen-ozone mixture with an ozone concentration of 400 µg/L in ozonated physiological saline and intratumoral administration of 0.3% Photosens solution with local exposure to light at a wavelength of 660 ± 10 nm for 10 min cause a decrease in tumor growth rate. Combined treatment with ozonated physiological saline and photodynamic therapy led to a normalization of the prooxidant /antioxidant balance in animals used for experiments.

*Keywords: photodynamic therapy, ozonated physiological saline, oxidative stress, oxidative modification of proteins, experimental kidney carcinoma, outbred rats*