

О.Ю. Кытикова¹, Т.А. Гвозденко¹, Т.И. Виткина¹, А.Д. Новгородцев²

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПРООКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

¹ Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения, Владивосток, Россия
² ООО «Клиника озонотерапии ТриО», Владивосток, Россия

Прооксидантная терапия опосредует свое действие через развитие окислительного стресса, что может приводить к оксидативной модификации ДНК клетки. Целью исследования явилось изучение генотоксического эффекта различных режимов дозирования прооксидантной терапии в условиях *in vitro* на крови больных хронической обструктивной болезнью легких. Показано, что дестабилизация генома является важным звеном патогенеза хронической бронхолегочной патологии. Выраженность оксидативного повреждения ДНК у больных хронической обструктивной болезнью легких прямо зависит от применяемой концентрации медицинского озона.

Ключевые слова: генотоксичность, прооксидантная терапия, ХОБЛ

IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF PROOXIDANT THERAPY

O.Yu. Kytikova¹, T.A. Gvozdenco¹, T.I. Vitkina¹, A.D. Novgorodtsev²

¹ Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok, Russia
² Clinic of Ozone Therapy TriO, Vladivostok, Russia

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major problem in industrialized countries. Much evidence suggest that oxidative stress has been associated with chronic diseases, including COPD. There are a number of good experimental and clinical studies clearly showing a strong relationship between oxidative stress and DNA-damage in several diseases. The present study was aimed at establishing whether genome damage is also exists in COPD.

Prooxidant therapy mediates its action through the development of oxidative stress that can lead to oxidative modification of DNA. The role of ozone in the genome damage has received little attention. The genotoxicity of ozone is of interest because ozone therapy is used for the treatment of various chronic conditions, including COPD and may impose a possible risk of genotoxic effects for patients.

The purpose of this study was to investigate genotoxic effect of different dosing schedules of prooxidant therapy *in vitro* on the blood of patients with COPD. Peripheral blood was obtained from 20 COPD patients and 15 age- and sex-matched controls.

Our present results have shown that ozone induces DNA-damage in human blood cells *in vitro*. The severity of oxidative DNA-damage in COPD patients directly depends on the concentration of ozone. Clinical results have shown that DNA-damage is an important part of the pathogenesis of the chronic inflammatory process in the bronchopulmonary system.

Key words: genotoxicity, prooxidant therapy, COPD

Редокс-окислительный гомеостаз формируется равновесными отношениями про- и антиоксидантных систем, характеризующихся колебательным режимом функционирования. Нарушение равновесия в системе «прооксиданты – антиоксиданты» сопровождается кратковременной активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6]. Запускаемые свободными радикалами контролируемые процессы ПОЛ являются неспецифическим ответом организма на действие стрессирующих факторов. Подобная стресс-реакция необходима для экспрессии генов, дифференцировки клеток, обновления мембранных структур клетки, инициации синтеза ее собственных защитных систем и запуска других жизненно важных процессов. Вместе с тем, если воздействие стрессирующих факторов превышает антиоксидантный потенциал клетки, развиваются стохастические неконтролируемые реакции перекисного окисления, индуцирующие повреждение биологических молекул, в том числе ДНК клетки [12].

Значительное количество научно-исследовательских работ посвящено изучению роли окислительного стресса в патогенезе бронхолегочной патологии, в частности хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), которая является одной из сложнейших медико-социальных проблем мирового уровня [7, 11]. Являясь неспецифическим звеном ХОБЛ, окислительный стресс опосредует развитие процессов оксидативного повреждения различных структур клетки, в том числе геномного аппарата [13]. Нарушение баланса в системе липопероксидации сохраняется и в период ремиссии заболевания [3], однако изучение уровня оксидативного повреждения генома у больных ХОБЛ стабильного течения до настоящего времени не проводилось. Исследования генотоксического эффекта окислительного стресса у больных ХОБЛ стабильного течения позволят расширить имеющиеся взгляды на молекулярные механизмы хронизации этого заболевания. Возможность регуляции процессов свободно-радикального окисления с целью умень-

шения степени выраженности или предотвращения развития оксидативного повреждения генома может дать новые направления в восстановительном лечении ХОБЛ.

Прооксидантная терапия, в частности озонотерапия, неуклонно завоевывает признание в различных областях клинической медицины, являясь уникальным по своей сути и эффективности методом лечения [5]. Терапевтическое действие медицинского озона основано на его способности к модуляции окислительно-восстановительного потенциала клетки за счет стимуляции эндогенной защиты организма [8]. Прооксидантная терапия опосредует свое действие через развитие окислительного стресса, что может приводить к оксидативной модификации ДНК клетки. В этой связи, крайне важным положением при назначении озонотерапии является соответствие применяемой дозы медицинского озона мощности антиоксидантных систем организма [4]. В этом случае, озонотерапия будет выступать в качестве регулятора процессов липопероксидации без развития нежелательных генотоксических эффектов.

В последнее десятилетие продемонстрирована клиническая эффективность применения озонотерапии в пульмонологии, в частности при лечении ХОБЛ [1]. Вопросы возможного повреждения ДНК клеток крови при действии озон-кислородной газовой смеси изучались в ограниченном количестве научно-исследовательских работ зарубежных ученых [9, 10]. Однако работы, посвященные изучению генотоксичности озонированного физиологического раствора у больных ХОБЛ отсутствуют.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение генотоксического эффекта различных режимов дозирования прооксидантной терапии в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценка безопасности применения различных концентраций медицинского озона проводилась на донорской крови 20 больных ХОБЛ легкой степени тяжести (GOLD 1) стабильного течения. Основную группу составили пациенты зрелого возраста (средний возраст – 40,30 ± 2,01 года). Соматически здоровые лица составили группу контроля лиц зрелого возраста ($n = 15$; средний возраст – 49,35 ± 1,61 года).

К образцам крови больных добавлялся озонированный физиологический раствор (ОФР) с различной насыщающей концентрацией озона: I подгруппа (низкая концентрация – 600 мкг/л); II подгруппа (средняя – 2000 мкг/л); III подгруппа (высокая – 3000 мкг/л). Кровь в объеме 20 мл забирали из локтевой вены в пробирку с гепарином. Каждая проба делилась на 4 равные части: первая – интактная, к трем другим приливали по 0,2 мл ОФР с различной концентрацией озона. Озонирование осуществляли барботажем 10 мл стерильного 0,9% раствора хлористого натрия озон-кислородной смесью с заданной концентрацией. Соотношение 5 мл крови – 0,2 мл

ОФР выбрано исходя из условий использования озона в клинике (5 л – средний объем циркулирующей крови у человека, 0,2 л – объем флакона для внутривенных инфузий). В образцах крови изучалась динамика уровня маркера окислительного повреждения ДНК – 8-гидрокси-дезоксигуанозина (8-Hydroxydesoxyguanosine – 8-OHdG) до (фон) и через 60 минут после добавления ОФР (I, II, III подгруппы). Для получения ОФР использовали медицинские генераторы озона: «Квазар» (сертификат соответствия № РОСС RU. ME34. B01135); УОТА-60-01, АОТ-Н-01-Арз-01/1, «Медозон», г. Москва, Россия.

Оценку содержания Human 8-Hydroxy-desoxyguanosine (8-OHdG) в ДНК клеток крови проводили с использованием набора «ELISA Kit» (Cusabio, PRC; Catalog Number: CSB-E10140h, 96 T).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием прикладной программы «Statistica 6.1». Достоверность оценивалась с помощью критерия Стьюдента. Для обработки полученной информации использовались стандартные статистические процедуры: расчет средней – M , стандартной ошибки средней – m , медианы – Me , среднее квадратичного отклонения – σ , коэффициента вариации – C .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях установлено, что уровень 8-OHdG больных ХОБЛ (фон) на 97,31% ($p < 0,001$) превышал аналогичный показатель среди здоровых лиц. Полученные результаты свидетельствуют об оксидативном повреждении ДНК клеток крови больных ХОБЛ, что согласуется и с данными других исследователей [13].

Добавление к пробам крови ОФР с различной концентрацией озона сопровождалось ростом уровня 8-OHdG относительно фоновых и контрольных значений (рис. 1).

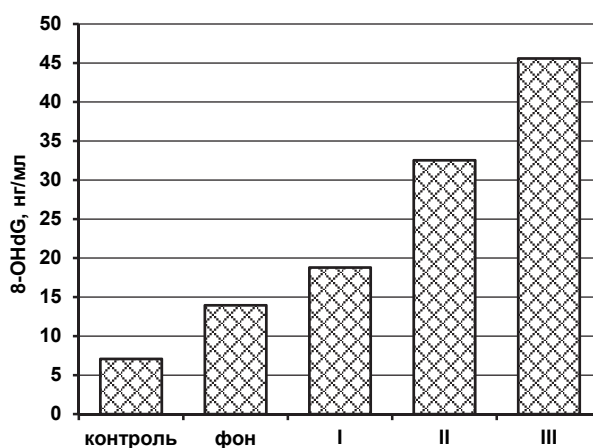


Рис. 1. Содержание 8-OHdG в ДНК больных ХОБЛ в зависимости от режима дозирования медицинского озона (*in vitro*): режим дозирования ОКС: I – низкая; II – средняя; III – высокая концентрация.

Так, в I, II, III подгруппах уровень окислительного повреждения ДНК превышал фоновые значения на 34,69 % ($p < 0,01$), 133,18 % ($p < 0,001$) и 226,73 %

($p < 0,001$) соответственно и контрольные значения – на 167,77 % ($p < 0,001$), 360,11 % ($p < 0,001$) и 544,69 % ($p < 0,001$). Степень повышения уровня 8-OHdG прямо зависела от концентрации озона, что подтверждалось статистически значимыми различиями между II, III подгруппами относительно изучаемого показателя в I подгруппе ($p < 0,01$).

На основании аналитической оценки полученных результатов можно заключить, что увеличение уровня оксидативного повреждения генома сопровождается течением ХОБЛ, в патогенезе которой значимая роль отведена окислительному стрессу. При изучении генотоксического эффекта различных режимов дозирования прооксидантной терапии в условиях *in vitro* на крови больных ХОБЛ стабильного течения показано, что добавление к пробам крови ОФР сопровождалось ростом уровня 8-OHdG. Степень оксидативного повреждения ДНК прямо зависела от применяемой концентрации медицинского озона.

Полученные в условиях *in vitro* результаты требуют дальнейших исследований в условиях *in vivo*. Применение озонотерапии в повседневной клинической практике в подавляющем большинстве случаев сопровождается положительными терапевтическими эффектами, что позволяет предположить обратимый характер первичного повреждения ДНК, опосредованного применением медицинского озона. Возможно, развитие генотоксического эффекта является закономерным этапом формирования адаптивной реакции на окислительный стресс. Данное предположение базируется на концепции протекторного катаболизма Е.П. Гуськова, согласно которой соматический мутагенез является адаптивной реакцией на изменение среды при стрессирующем воздействии [2]. Очевидно, при оценке безопасности применения различных режимов дозирования озонотерапии необходимо учитывать не столько сам факт оксидативного повреждения ДНК, сколько обратимость генотоксического эффекта, опосредованного применением озонотерапии. Сегодня разрабатывается концепция гормезиса ДНК-повреждений, демонстрирующая дозозависимость повреждений ДНК и процессов репарации клетки: незначительные повреждения ДНК, запускающие процессы репарации, приводят к развитию устойчивости клетки к стрессу, в то время как значительные повреждения и сниженная способность клеток к репарации приводят к апоптозу клетки [14].

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о сложных механизмах окислительного повреждения биомолекул и наличии множества теорий, объясняющих механизмы оксидативного повреждения геномного аппарата клетки, которые требуют проведения дальнейших экспериментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Гвозденко Т.А., Кытикова О.Ю., Новгородцев А.Д. Биоокислительные технологии в пульмонологии // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – № 41. – С. 79–81.

Gvozdenko TA, Kytikova OY, Novgorodtsev AD (2011). Oxidation technologies in pulmonology [Biookislitel'nye tekhnologii v pul'monologii]. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhanija*, 41, 79-81.

2. Гуськов Е.Г. Генетика окислительного стресса. – Ростов-на-Дону: Изд-во СКНЦ ВЦ ЮФУ, 2009. – 156 с.

Gus'kov EG (2009). Genetics of oxidative stress [Genetika okislitel'nogo stressa], 156.

3. Иванов Е.М., Журавская Н.С. Актуальные вопросы хронического бронхита. – Владивосток: Дальнаука, 2005. – 212 с.

Ivanov EM, Zhuravskaya NS (2005). The prevalence questions of chronic bronchitis [Aktual'nye voprosy khronicheskogo bronkhita], 212.

4. Иванов Е.М., Кытикова О.Ю., Новгородцев А.Д. Озонотерапия в гериатрии. – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2006. – 256 с.

Ivanov EM, Kytikova OY, Novgorodtsev AD (2006). Ozone therapy in geriatrics [Ozonoterapija v geriatrii], 256.

5. Масленников О.В., Конторщикова К.Н., Грибкова И.А. Руководство по озонотерапии. – Н. Новгород: Вектор-тиС, 2008. – 326 с.

Maslennikov OV, Kontorshchikova KN, Gribkova IA (2008). Ozone therapy guide [Rukovodstvo po ozonoterapii], 326.

6. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А. и др. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. – Новосибирск: Арта, 2008. – 284 с.

Men'shnikova EB, Zenkov NK, Lankin VZ, Bondar' IA et al. (2008). Oxidative stress. Pathological conditions and diseases [Okislitel'nyj stress. Patologicheskie sostojanija i zabolevanija], 284.

7. Хроническая обструктивная болезнь легких / под ред. А.Г. Чучалина. – М.: Атмосфера, 2008. – 568 с.

Chuchalin AG (ed.) (2008). Chronic obstructive pulmonary disease. Clinical guidelines [Khronicheskaya obstruktivnaya bolezn' legkikh. Klinicheskie rekomendatsii], 568.

8. Bocci V (2011). A new medical drug, 315.

9. Diaz-Llera S (2011) Is therapeutic ozone genotoxic? *Revista Española de Ozonoterapia*, 2 (1), 21.

10. Foksinski M, Bialkowski K, Skiba M et al. (1999) Evaluation of 8-oxodeoxyguanosine, typical oxidative DNA damage, in lymphocytes of ozone-treated arteriosclerotic patients. *Mutat Res*, 438 (1), 23-27.

11. Kirkham PA, Barnes PJ (2013). Oxidative stress in COPD. *Chest*, 144 (1), 266-273.

12. Melis JP, Van Steeg H, Luijten M (2013). Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid. Redox Signal*, 18 (18), 2409-2419.

13. Neofytou E, Tzortzaki E, Chatziantoniou A, Nikolaos M (2012). DNA damage due to oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Int. J. Mol. Sci*, 13, 1685-1686.

14. Schumacher B (2009). Transcription-blocking DNA damage in aging: a mechanism for hormesis. *BioEssays*, 31 (12), 1269-1372.

Сведения об авторах
Information about the authors

Кытикова Оксана Юрьевна – кандидат медицинских наук, врач-физиотерапевт Владивостокского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения (690105, г. Владивосток, ул. Русская, 73Г; тел.: 8 (423) 278-82-01; e-mail: kytikova@yandex.ru)

Kytikova Oksana Yuryevna – Candidate of Medical Sciences, Physiotherapist of the Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment (690105, Vladivostok, ul. Russkaya, 73g; tel.: +7 (423) 278-82-01; e-mail: kytikova@yandex.ru)

Гвозденко Татьяна Александровна – доктор медицинских наук, директор Владивостокского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения (e-mail: vfdnz@mail.ru)

Gvozdenko Tatyana Aleksandrovna – Doctor of Medical Sciences, Head of the Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment (e-mail: vfdnz@mail.ru)

Виткина Татьяна Исааковна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований Владивостокского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения

Vitkina Tatyana Isaakovna – Doctor of Biological Sciences, Leading Research Officer of the Laboratory of Biomedical Research of the Vladivostok Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment

Новгородцев Александр Дмитриевич – директор ООО «Клиника озонотерапии ТриО», (690105, г. Владивосток, ул. Русская, 73Б; тел.: 8 (423) 240-91-11)

Novgorodtsev Aleksandr Dmitriyevich – Director of the Clinic of Ozone Therapy “TriO” (690105, Vladivostok, ul. Russkaya, 73b; tel.: +7 (423) 240-91-11)