

УДК 577.323: 576.385: 612.014.464

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ МЫШИ И КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MDA-MB-231 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ОЗОНА, ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ГЕМЦИТАБИНА

© 2022 г. А.Б. Гапеев*, Е.С. Жукова**, В.А. Синельникова***, Г.Ю. Балакин***,
М.Ю. Земскова****, Г.К. Рысцов****, Т.Г. Щербатюк**, ***

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

**Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии Роспотребнадзора, 603005, Нижний Новгород, ул. Семашко, 20

***Пушинский государственный естественно-научный институт Минобрнауки России, 142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 3

****Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 5

E-mail: a_b_g@mail.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 04.04.2022 г.

Принята к публикации 06.04.2022 г.

Проведено сравнительное исследование генотоксической активности медицинского озона и пероксида водорода в отношении нормальных лейкоцитов периферической крови лабораторных мышей линии Kv:SHK и клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231 *in vitro*. На основе данных, полученных методом ДНК-комет, определен интервал от минимальной концентрации, вызывающей повреждение ДНК опухолевых клеток, до минимальной генотоксической концентрации для нормальных клеток крови в пределах от 0.2 до 0.4 мг/л для озона в озон-кислородной смеси и от 0.1 до 3.0 мкМ для пероксида водорода. В установленных диапазонах озон по сравнению с пероксидом водорода проявляет меньшую генотоксическую активность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы. При комбинировании озона с концентрацией 0.4 мг/л в озон-кислородной смеси с цитостатическим препаратом гемцитабином наблюдалось потенцирование генотоксического эффекта цитостатика: повреждающее действие цитостатика на ДНК клеток увеличилось более чем в два раза. Предполагается, что усиление генотоксического эффекта гемцитабина в комбинации с озоном связано с интенсификацией инкорпорирования в структуру ДНК его основных метаболитов в результате стимулирования процессов репарации ДНК.

Ключевые слова: озон, пероксид водорода, гемцитабин, генотоксический эффект, лейкоциты периферической крови, клетки опухолевой линии MDA-MB-231.

DOI: 10.31857/S0006302922030164, EDN: AOVQOB

Несмотря на существенные достижения в области онкологии, проблема лечения злокачественных новообразований по-прежнему актуальна и требует разработок новых стратегий воздействия. Доклинические исследования, проведенные научными коллективами различных стран, установили наличие противоопухолевого

эффекта озона и перспективность его применения в составе комплексной противоопухолевой терапии [1]. Однако для перехода к клиническим испытаниям необходимо решить целый ряд вопросов, связанных с безопасным и эффективным применением озонотерапии в онкологии. К этим вопросам, в частности, относятся изучение дозозависимого эффекта озона и определение диапазона терапевтического дозирования, исследование вариации чувствительности различных опу-

Сокращения: ОКС – озон-кислородная смесь, dFdCTP – гемцитабина трифосфат, ПБС-ЭДТА – фосфатно-солевой буферный раствор с этилендиаминтетраацетатом.

холевых клеток, а также взаимодействия озона с различными противоопухолевыми агентами.

Ранее было показано, что озон оказывает прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки саркомы-45 при локальном применении (концентрация озона в озono-кислородной смеси (ОКС) – 0.8–5.0 мг/л) [2], а при системном введении потенцирует действие гамма-излучения (лимфосаркома Плисса, концентрация озона в ОКС 0.4 мг/л) [3], усиливает действие доксорубина и 5-фторурацила (штаммы гепатома 27 и гепатома Зайделя, концентрация озона в ОКС – 0.2 мг/л) [4], повышает эффективность фотодинамической терапии (штамм карциномы почки РА, концентрация озона в ОКС – 0.4 мг/л) [5]. Однако интервал от минимальной концентрации, вызывающей повреждение опухолевых клеток, до минимальной токсической концентрации для нормальных клеток, т. е. диапазон терапевтического действия озона, до сих пор определен не был.

Известно, что озон в высоких концентрациях способен окислять липиды, запуская их перекисное окисление, белки, а также деструктивно действовать на ДНК. Озон реагирует с двойными связями азотистых оснований нуклеиновых кислот, образуя озониды, которые в итоге вызывают образование разрывов в одиночных или двойных спиральных. Кроме того, озон нарушает включение азотистых оснований в структуру ДНК при ее синтезе [6]. Генотоксическое действие озона можно применять для усиления эффективности противоопухолевых препаратов, в основе механизмов действия которых лежит повреждение нуклеиновых кислот. Перспективность использования озона в сочетании с цисплатином, этопозидом и гемцитабином на клеточных линиях нейробластомы человека (SK-N-SH и SK-N-DZ) была продемонстрирована в работе [7]. Однако из-за выраженной токсичности гемцитабина на тестируемые клеточные линии оценить потенцирующий вклад озона в сочетании с этим цитостатиком не представилось возможным.

Гемцитабин — антиметаболит из группы антагонистов пиримидинов. Его основные метаболиты, гемцитабина дифосфат и гемцитабина трифосфат (dFdCTP), являются нуклеозидами. dFdCTP конкурирует с дезоксицитидинтрифосфатом за включение в ДНК, тем самым ингибируя удлинение цепи ДНК. Нетерминальное положение dFdCTP в цепи нуклеиновых кислот предотвращает обнаружение и репарацию вызванных им повреждений: этот процесс называется «замаскированным окончанием цепи ДНК». Включение dFdCTP в цепь ДНК в конечном итоге приводит к прекращению цепи, фрагментации ДНК и апоптотической гибели злокачественных клеток. Гемцитабин обладает феноменом само-

потенцирования фармакологического действия, что увеличивает вероятность успешного включения dFdCTP в цепь ДНК: гемцитабина дифосфат ингибирует рибонуклеотидредуктазу, фермент, ответственный за катализацию реакций, которые генерируют дезоксицитидинтрифосфат для синтеза ДНК. Поскольку гемцитабина дифосфат снижает уровень дезоксицитидинтрифосфата, уменьшается конкуренция для dFdCTP при включении в ДНК [8].

Однако одна из проблем терапевтического использования озона заключается в крайне малом времени его жизни в биологических тканях. При этом из всех активных форм кислорода самым стабильным является пероксид водорода [9, 10]. Этот оксидант характеризуется относительно малыми скоростями взаимодействия с органическими субстратами, высокой диффузной способностью и свойствами мессенджера при активации факторов транскрипции и редокс регуляции экспрессии генов [11]. При этом известно, что пероксид водорода является одним из вторичных мессенджеров, опосредующих действие озона на клетки крови при проведении озонотерапии [12], вероятно, через фактор транскрипции Nrf2 [13]. Открытым остается вопрос о целесообразности замены озона на более стабильный пероксид водорода, в первую очередь, в отношении генотоксического действия.

В связи с этим цель исследования состояла в определении на нормальных и опухолевых клетках эффективного генотоксического диапазона концентраций озона и пероксида водорода в сравнительном аспекте, а также в оценке перспективности усиления уровня повреждений ДНК при комбинировании гемцитабина с озоном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение биологических образцов. В экспериментах использовали общую фракцию лейкоцитов периферической крови лабораторных мышей линии Kv:SHK (возраст 2 месяца, масса тела 25–30 г), приобретенных в Центральном питомнике лабораторных животных РАМН (Крюково, Московская область). Мышей содержали в виварии, для кормления использовали стандартную диету со свободным доступом к коммерческому корму и водопроводной воде. Образцы периферической крови забирали из хвостовой вены мышей в пробирки, содержащие фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением ЭДТА в качестве антикоагулянта (ПБС-ЭДТА: 136.7 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 8.1 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ KH₂PO₄, 1 мМ ЭДТА, pH 7.4). При этом концентрация лейкоцитов составляла около 1·10⁶ кл/мл.

В качестве опухолевых клеток использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231. Клеточную линию культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, стрептомицина и пенициллина (50 мкг/мл) и L-глутамина (НПП «ПанЭко», Москва). Рост клеточных культур поддерживали в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) в увлажненной атмосфере, при температуре 37°C и 5%-м содержании CO₂. Пересев клеток производили каждые 72 ч по достижению 80%-й конfluence. После предварительного подсчета количества жизнеспособных клеток в образце культуры с использованием витального красителя трипанового синего и камеры Горяева образец культуры в питательной среде смешивали с ПБС-ЭДТА в необходимом соотношении до конечной концентрации $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ кл/мл.

Полученные суспензии лейкоцитов крови мыши или клеток аденокарциномы молочной железы человека использовали для приготовления микроскопных агарозных препаратов, состоящих из трех слоев 0.5%-й легкоплавкой агарозы с иммобилизованными клетками в среднем слое [14].

Обработка химическими агентами. В качестве генотоксических агентов использовали озон, пероксид водорода и гемцитабин.

При воздействии озоном препарат помещали в ПБС-ЭДТА, содержащий озон в определенной концентрации, и инкубировали в термостате в течение 10 мин при 37°C. Затем слайды с клетками помещали в лизирующий раствор. Для получения озона использовали аппарат терапевтический низких и средних концентраций озона с деструктором АОТ-НСК-01-С(А-16), разработанный в Российском федеральном ядерном центре – Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной физики (Саров, Нижегородская область) [15]. Диапазон тестируемых концентраций озона в озono-кислородной смеси составил 0.1–1.4 мг/л. Озонированный ПБС-ЭДТА использовали сразу после окончания пятиминутного барботажа ОКС.

При воздействии пероксида водорода препарат помещали в фиксированный объем ПБС-ЭДТА (10 мл – большой объем раствора по сравнению со слайдами), содержащий пероксид водорода определенной концентрации и инкубировали в термостате 10 мин при 37°C. Диапазон используемых концентраций H₂O₂: 0.1–30 мкМ для опухолевых клеток и 3–200 мкМ для лейкоцитов крови мыши. Непосредственно после инкубации в присутствии пероксида водорода микроскопные слайды с клетками помещали в лизирующий раствор.

В случае комбинированного воздействия гемцитабина и озона сначала на препараты наносили

фиксированный объем раствора гемцитабина (4 мкл) в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл и помещали их в термостат на 10 мин при 37°C, затем слайды помещали в ПБС-ЭДТА, содержащий озон (концентрация озона 0.4 мг/мл в ОКС), и термостатировали при 37°C в течение 10 мин. Такую же процедуру проводили с изменением последовательности воздействия гемцитабина и озонированного раствора: сначала препараты помещали в озонированный ПБС-ЭДТА и инкубировали при используемых ранее условиях, затем на слайды наносили 4 мкл раствора гемцитабина с исследуемой концентрацией и термостатировали при 37°C в течение 10 мин. Затем слайды с клетками помещали в лизирующий раствор.

Анализ уровня повреждений ДНК в клетках проводили с использованием щелочного варианта метода ДНК-комет согласно протоколу, описанному в работе [16]. Каждую группу препаратов сравнивали с собственным контролем. По методу ДНК-комет регистрировали нуклеотиды, расположенные в центральной части препарата в одной плоскости. На каждом слайде фотометрировали по 25–30 «комет». Рассчитывалось среднее арифметическое значение показателя «процентное содержание ДНК в «хвосте кометы», которое отражает интенсивность флуоресценции окрашенной ДНК, мигрировавшей во время электрофореза в «хвост кометы», выраженное в процентах. Процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» прямо пропорционально уровню повреждений ДНК в конкретной индивидуальной клетке и является одним из наиболее информативных показателей [17, 18].

Статистический анализ. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. Поскольку все данные соответствовали нормальному распределению (по тесту Колмогорова–Смирнова), то статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка генотоксического действия озона. Для определения терапевтического диапазона действия озона был исследован его генотоксический эффект на опухолевые клетки и лейкоциты крови мыши в составе агарозных препаратов в зависимости от концентрации озона в ОКС. В результате проведенных экспериментов была получена линейная зависимость величины генотоксического эффекта от концентрации озона на опухолевых клетках линии MDA-MB-231 (рис. 1). При этом минимально действующая концентрация озона в ОКС составила 0.2 мг/л, которая вызывала статистически значимые повреждения ДНК в исследуемых опухолевых клетках на

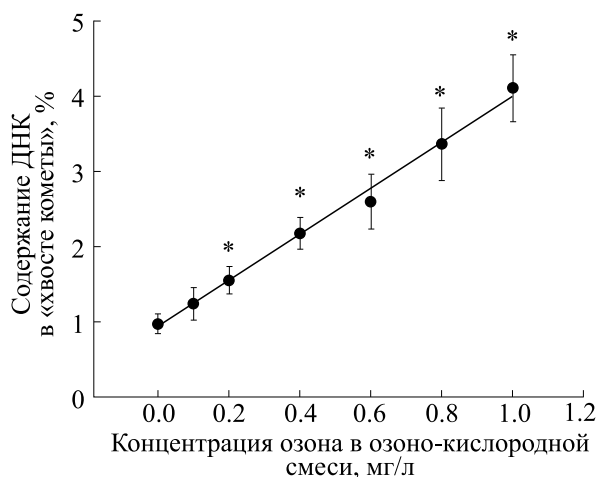


Рис. 1. Зависимость уровня повреждений ДНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 от концентрации озона в ОКС; * – $p < 0.003$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

уровне $1.55 \pm 0.18\%$, что в полтора раза выше значений контрольных образцов без воздействия.

При оценке генотоксического эффекта этого же диапазона концентраций озона в ОКС на лейкоцитах крови мыши получена нелинейная зависимость (рис. 2). Было обнаружено, что чувствительность лейкоцитов крови мыши к озону ниже, чем чувствительность к озону опухолевых клеток. Минимальная генотоксическая концентрация для лейкоцитов крови мыши составила 0.4 мг/л, индуцирующая повреждения ДНК на уровне $0.99 \pm 0.11\%$, что в 1.9 раза выше контрольных значений без воздействия. Стоит отметить, что при воздействии на лейкоциты крови мыши концентраций озона выше 0.4 мг/л и до 1.4 мг/л увеличение уровня повреждений ДНК не наблюдалось (рис. 2). Это может быть связано с активацией защитных механизмов лейкоцитов от повреждающего действия озона, вероятно, за счет усиления компактизации хроматина и снижения доступности свободных радикалов к ДНК клеток [19]. Большая чувствительность и линейность зависимости уровня повреждений ДНК от концентрации озона в опухолевых клетках говорит о нарушении или отсутствии такого защитного механизма в клетках аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231.

Таким образом, на основании исследования генотоксического действия озона методом ДНК-комет можно заключить, что терапевтический диапазон является достаточно узким и составляет 0.2–0.4 мг/л озона в ОКС. При таких концентрациях в опухолевых клетках аденокарциномы молочной железы генерация повреждений ДНК наблюдается на уровне $(1.55 \pm 0.18\%)$ – $(2.17 \pm$

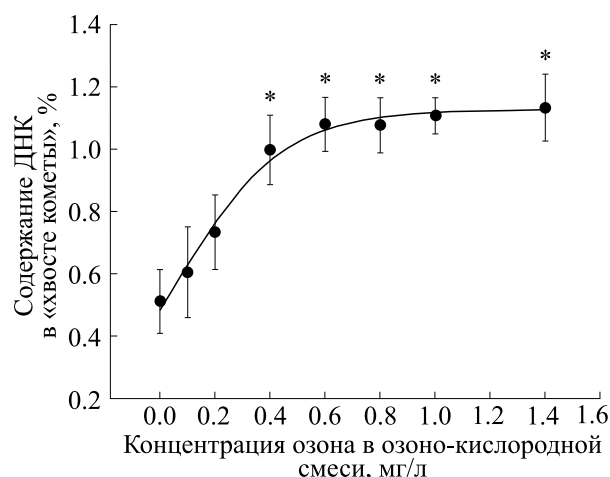


Рис. 2. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши от концентрации озона в ОКС; * – $p < 0.001$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

0.21%), что свидетельствует о высокой чувствительности опухолевых клеток данной линии к действию озона.

Оценка генотоксического действия пероксида водорода. Поскольку пероксид водорода является вторичным мессенджером озона, для сопоставления их действия и оценки вклада H_2O_2 в индукцию повреждений ДНК в тех же условиях на клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и лейкоцитах крови мыши была протестирована генотоксичность различных концентраций пероксида водорода.

Наши исследования показали, что клетки линии MDA-MB-231 чувствительны к генотоксическому действию пероксида водорода и зависимость уровня повреждений ДНК от концентрации H_2O_2 оказывается линейной (рис. 3). Минимально действующей концентрацией H_2O_2 в отношении исследуемых опухолевых клеток является концентрация 0.1 мкМ, при которой уровень повреждений ДНК статистически значимо увеличивается в четыре раза ($1.14 \pm 0.09\%$) по сравнению с контролем ($0.28 \pm 0.05\%$).

Пероксид водорода оказывает генотоксическое действие на лейкоциты крови мыши и в этом случае зависимость уровня повреждений ДНК от концентрации H_2O_2 также является линейной (рис. 4). Минимальная генотоксическая концентрация пероксида водорода для нормальных клеток составляет 3.0 мкМ. При этом процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» увеличивается более чем в два раза ($0.37 \pm 0.07\%$) по сравнению с контролем ($0.15 \pm 0.03\%$). В целом чувствительность лейкоцитов крови интактных мышей к пероксиду водорода оказывается в среднем в десять

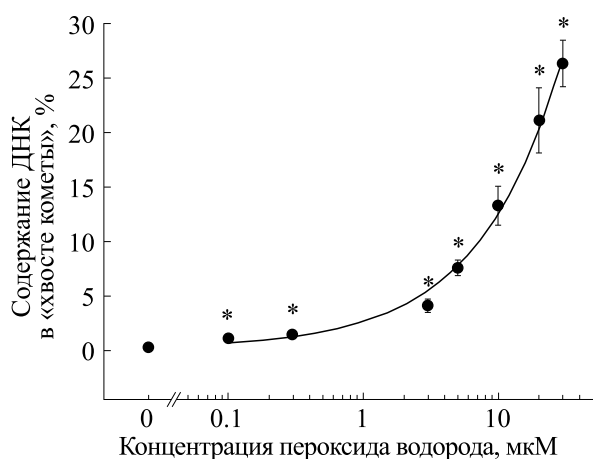


Рис. 3. Зависимость уровня повреждений ДНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 от концентрации пероксида водорода; * – $p < 0.003$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

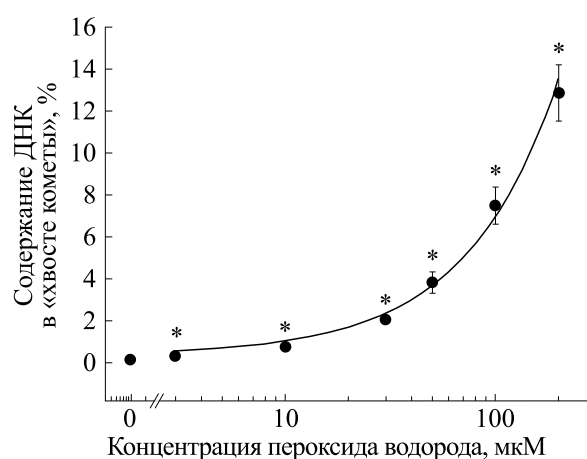


Рис. 4. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши от концентрации пероксида водорода; * – $p < 0.003$ относительно уровня повреждений в контроле по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

раз ниже по сравнению с клетками аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что терапевтический диапазон действия пероксида водорода находится в пределах 0.1–3.0 мкМ. В этом диапазоне в клетках аденокарциномы молочной железы можно индуцировать повреждения ДНК на уровне 1–4%, что превышает генотоксический эффект озона в терапевтическом диапазоне. Однако при концентрации пероксида водорода более 3.0 мкМ генотоксичность для нормальных клеток возрастает более выражено, чем для озона в пределах концентраций 0.4–1.4 мг/л. Эти данные свидетельствуют о том, что пероксид водорода если и является посредником в передаче сигнала озона при воздействии на клетки, то генотоксический эффект озона обусловлен более сложными механизмами.

Оценка совместного генотоксического действия озона и цитостатического препарата. Для определения перспективности увеличения уровня повреждений ДНК при комбинировании гемцитабина с озоном была проведена серия экспериментов, в ходе которых мы оценили повреждающее действие гемцитабина в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл с предварительной и последующей обработкой озонированным ПБС-ЭДТА. Концентрация озона в озono-кислородной смеси составляла 0.4 мг/л.

В ходе экспериментов установлено, что озон в концентрации 0.4 мг/л в ОКС усиливает генотоксичность цитостатического препарата на лейкоциты крови мыши. При комбинированном воздействии озона и гемцитабина уровень повреждений ДНК не зависит от последовательности

воздействий (рис. 5). Аналогичные результаты были получены и для клеток аденокарциномы. Показано, что уровень повреждений ДНК в опухолевых клетках линейно зависит от концентрации гемцитабина. При комбинированном воздействии озона и гемцитабина уровень повреждений ДНК не зависит от последовательности воздействий (рис. 6).

Предварительное или последующее воздействие озона в сочетании с гемцитабином позволяет снизить концентрацию последнего в 100 раз, так как повреждающее действие на опухолевые

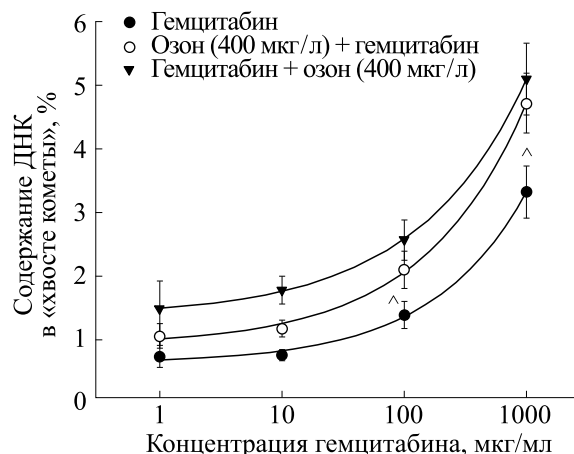


Рис. 5. Зависимость уровня повреждений ДНК в лейкоцитах крови мыши от концентрации гемцитабина; * – $p < 0.005$ относительно уровня повреждений при действии только гемцитабина по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$; ^ – $p < 0.01$ относительно уровня повреждений по сравнению с концентрацией гемцитабина 1 мкг/мл по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

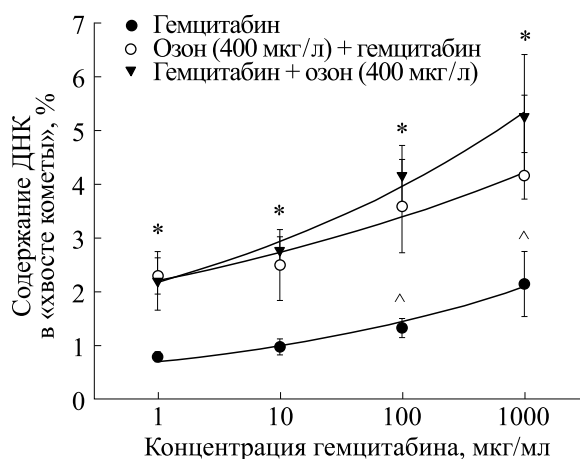


Рис. 6. Зависимость уровня повреждений ДНК в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 от концентрации гемцитабина; * – $p < 0,005$ относительно уровня повреждений при действии только гемцитабина по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$; ^ – $p < 0,01$ относительно уровня повреждений по сравнению с концентрацией гемцитабина 1 мкг/мл по t -критерию Стьюдента, $n \geq 12$.

клетки оказывает наибольшая концентрация гемцитабина 1000 мкг/л, а при совместном воздействии гемцитабина и озона такое же действие оказывает концентрация гемцитабина в 100 раз меньше – 10 мкг/л. Наблюдаемый эффект можно объяснить более эффективным встраиванием в ДНК клеток метаболитов гемцитабина за счет индуцирования озоном репаративных процессов, в результате которых дезоксицитидинтрифосфат замещается dFdCTP и нарушает структуру ДНК. При этом повреждающее действие цитостатика увеличивается более чем в два раза (рис. 5 и 6).

Следовательно, при введении озона в состав комплексной противоопухолевой терапии нужно учитывать, что возможно потенцирующее повреждающее действие исследуемого цитостатика не только на трансформированные, но и на нормальные клетки. Однако генотоксичность препарата можно нивелировать за счет снижения его дозы без потери эффективности.

ВЫВОДЫ

Таким образом, на основе данных генотоксичности, полученных с помощью щелочной версии метода ДНК-комет, определен терапевтический диапазон действия в пределах от 0.2 до 0.4 мг/л для озона в озono-кислородной смеси и от 0.1 до 3.0 мкМ для пероксида водорода. Пероксид водорода, который является вторичным мессенджером при озонотерапии, возможно, вносит существенный вклад в генотоксическое действие озона, но не определяет его в полной мере.

Комбинирование озона с концентрацией в озono-кислородной смеси 0.4 мг/л с гемцитабином потенцирует генотоксический эффект цитостатика в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, что может позволить при разработке методики комплексной противоопухолевой терапии снизить дозу химиопрепарата и соответственно уменьшить побочные эффекты в отношении нормальных клеток. В связи с возможностью разработки более щадящих режимов противоопухолевой химиотерапии продолжение исследований в этой области оправдано и перспективно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами и рекомендациями, установленными Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Baeza-Noci and R. Pinto-Bonilla, *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11796 (2021). DOI: 10.3390/ijms222111796
2. Т. Г. Щербатюк и К. Н. Конторщикова, Патент на изобретение *RUS 2137481 C1* (1999).
3. Т. Г. Щербатюк, *Фізіологіч. журн.* **54** (2), 41 (2008). DOI: 10.15407/fz54.02.041
4. Т. Г. Щербатюк, В. Д. Селемир и Е. С. Клинцева, Патент на изобретение *RUS 2361590* (2007).
5. Т. Г. Щербатюк, Е. С. Жукова (Плеханова), Ю. В. Никитина и др., *Биофизика* **65** (2), 367 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920020209
6. С. Н. Котельников, *Труды ИОФАН* **71**, 10 (2015).
7. A. Cannizzaro, C. V. Verga Falzacappa, M. Martinelli, et al., *J. Cell Physiol.* **213** (1), 115 (2007). DOI:10.1002/jcp.21097
8. *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 60750, Gemcitabine*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gemcitabine> (Last modified: 05.03.2022, accessed 05.03.2022)
9. О. Ю. Гудкова, С. В. Гудков, А. Б. Гапеев и др., *Биофизика* **50** (5), 773 (2005).
10. И. Н. Штаркман, С. В. Гудков, А. В. Черников и др., *Биофизика* **53** (1), 1 (2008).

11. Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов и др., *Современные проблемы токсикологии*, № 2, 37 (2006).
12. V. Bocci, I. Zanardi, G. Valacchi, et al., *Cardiovasc. Haematol. Disorders – Drug Target* **15**, 127 (2015). DOI: 10.2174/1871529X1502151209114642
13. L. Re, *Front. Physiol.* **13**, 842229 (2022). DOI: 10.3389/fphys.2022.842229
14. A. B. Gapeyev, N. A. Lukyanova, and S. V. Gudkov, *Central Eur. J. Biol.* **9** (10), 915 (2014). DOI: 10.2478/s11535-014-0326-x
15. С. Н. Буранов, В. И. Карелин, О. А. Пименов и др., *Мед. альманах* **3** (27), 26 (2013).
16. А. Б. Гапеев и Н. А. Лукьянова, *Биофизика* **60** (5), 889 (2015).
17. A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, et al., *Mutagenesis* **23** (3), 143 (2008). DOI: 10.1093/mutage/gem051
18. N. K. Chemeris, A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, et al., *Mutat. Res.* **558** (1–2), 27 (2004).
19. Н. Ю. Воробьева, Е. Ю. Архангельская, А. Ю. Бушманов и др., *Саратовский науч.-мед. журн.* **10** (4), 735 (2014).

Comparative Study of DNA Damage in Mouse Blood Leukocytes and MDA-MB-231 Human Breast Adenocarcinoma Cells Depending on the Concentration of Ozone, Hydrogen Peroxide and Gemcitabine

A.B. Gapeyev*, **E.S. Zhukova****, **V.A. Sinelnikova*****, **G.Yu. Balakin*****, **M.Yu. Zemskova******, **G.K. Rystov******, and **T.G. Shcherbatyuk****, *******

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Nizhny Novgorod Research Institute of Hygiene and Occupational Pathology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, ul. Semashko 20, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

****Pushchino State Institute of Natural Science, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*****G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The genotoxic activity of ozone and hydrogen peroxide was tested using the comet assay on normal Kv:SHK mouse peripheral blood leukocytes and human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 *in vitro*. The comet assay showed that the concentration range from the minimum ozone concentration in ozone-oxygen mixture that caused damage to DNA of tumor cells to the minimum ozone concentration that induced genotoxic effects on normal blood cells was 0.2 to 0.4 mg/l, while the minimum concentration of hydrogen peroxide was 0.1 to 3.0 μ M. Furthermore, the comet assay revealed that genotoxic effect of ozone on breast adenocarcinoma cells was less than that of hydrogen peroxide. Gemcitabine, a cytostatic drug, in combination with ozone-oxygen (ozone concentration in the mixture was 0.4 mg/l) induced potentiation of the genotoxic effect of the cytostatic agent: the cytotoxic effect of gemcitabine on cells increased more than twofold through enhancement of DNA damage. It is assumed that the increased genotoxic effect of gemcitabine in combination with ozone is associated with intensification of incorporation of gemcitabine main metabolites into the DNA strand because of stimulation of DNA repair processes.

Keywords: ozone, hydrogen peroxide, gemcitabine, genotoxic effect, peripheral blood leukocytes, MDA-MB-231 breast cancer cell line