

Влияние магнитного поля на кислородтранспортную функцию крови при введении донора сероводорода

В.В. Зинчук, В.О. Лепеев

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь; e-mail: zinchuk@grsmu.by

В работе оценивали влияние магнитного поля (МП) на кислородтранспортную функцию крови при введении донора сероводорода. Крыс-самцов в течение 10 сут облучали МП хвостовую артерию и интраперитонеальную инфузию препаратов, влияющих на образование сероводорода: гидросульфид натрия (NaHS); L-аргинин; неселективный ингибитор фермента NO-синтазы – метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME); необратимый ингибитор фермента цистатионинулиазы - DL-пропаргилглицин (PAG). Оценивали параметры кислородтранспортной функции крови, содержание сероводорода и нитрат-анион/нитрит-анион (NO₂⁻/NO₃⁻) в плазме. Показано, что облучение МП крыс и введение NaHS или аминокислоты L-аргинин приводит к уменьшению сродства гемоглобина к кислороду и сопровождается повышением содержания газотрансмиттеров (NO и сероводорода) в крови. При введении L-NAME и PAG эффект МП на сродство гемоглобина к кислороду не проявляется. Таким образом, МП реализует свой эффект через газотрансмиттер сероводород при участии NO. Ключевые слова: магнитное поле; кровь; кислород; газотрансмиттеры; сероводород.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из используемых физических факторов, влияющих на адаптационные процессы, является магнитное поле (МП), применение которого оказывает антистрессорные эффекты на различные системы, и, в частности, на кровь [6]. Так, применение МП позволяет существенно уменьшить проявление гипоксии у пациентов с сепсисом, осложненным респираторным дистресс-синдромом, реализующееся через механизмы изменения кислородсвязывающих свойств крови [5]. В модификации кислородтранспортной функции крови, имеющей значение в формировании кислородного обеспечения организма, немаловажную роль играют такие газотрансмиттеры, как монооксид азота (NO), оксид углерода и сероводород [12]. Эти медиаторы относятся к представителям газообразных сигнальных соединений, которые имеют важное значение в трансляции физиологических сигналов [4]. Они составляют единый комплекс газообразных посредников, легко проникающих через мем-

© В.В.Зинчук, В.О. Лепеев

брану клетки и регулирующих многочисленные реакции в клетке [6]. Газотрансмиттеры, и в частности сероводород, обеспечивают различные механизмы межклеточных и внутриклеточных коммуникаций, а также адаптативные процессы в организме [7]. Сероводород является эндогенно продуцируемой сигнальной молекулой с противовоспалительными, антиапоптозными и цитопротекторными свойствами [10]. Однако его участие в реализации эффектов МП на кислородсвязывающие свойства крови недостаточно изучены.

Исходя из вышеизложенного, цель работы – оценить эффект МП на кислородтранспортную функцию крови при введении донора сероводорода, а также блокатора его эндогенного синтеза.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на самцах белых беспородных крыс, массой 250-300 г (n=68).

Крысы получали стандартный рацион питания один раз в сутки, при свободном доступе к воде. Режимы освещения и кормления животных в контрольных и опытных группах были одинаковы. Манипуляции на животных выполнялись в первой половине дня, в соответствии с рекомендациями и решением комиссии по биомедицинской этике Гродненского Государственного Медицинского Университета.

Крысам в течение 10 сут на протяжении 10 мин проводили облучение МП хвостовой артерии и интраперитонеальную инфузию препаратов, влияющих на образование сероводорода. Для этого использовали донор сероводорода гидросульфид натрия (NaHS, «Sigma-Aldrich», США) в дозе 5 мг/кг, исходный субстрат синтеза оксида азота – L-аргинин («Sigma-Aldrich», США) в дозе 100 мг/кг, неселективный ингибитор фермента NO-синтазы – метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME, «Sigma-Aldrich», США) в дозе 10 мг/кг, необратимый ингибитор фермента цистатионинулиазы DL-пропаргилглицин (PAG, «Chem-Impex International», Китай) в дозе 10 мг/кг.

Все животные были разделены на экспериментальные группы: контрольная (1-я группа), вводили 0,9%-й раствор хлорида натрия, в остальных группах осуществляли воздействие МП и вводили 0,9%-й раствор хлорида натрия (2-я группа), NaHS (3-я группа), NaHS и аминокислота L-аргинин (4-я группа), NaHS и L-NAME (5-я группа), PAG (6-я группа).

В качестве источника МП использовали аппарат серии СПОК «НемоСпок» производства ООО «МагноМед» (Беларусь). На индуктор прибора подавали пульсирующий ток с частотой от 60 до 200 Гц с модуляцией по частоте 10 Гц, а магнитная индукция равнялась 150 мТл (низкочастотная магнитотерапия). В конце эксперимента в условиях адекватного наркоза (50 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) проводили забор смешанной венозной крови из правого

предсердия в объёме 8 мл, в предварительно подготовленный шприц с гепарином из расчёта 50 ЕД на 1 мл крови.

Определение показателей кислород-транспортной функции крови – рО₂, степень оксигенации (SO₂) и кислотно-основного состояния, таких как рСО₂, стандартный бикарбонат (SBC), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований (ABE/SBE), гидрокарбонат (HCO₃⁻), концентрация водородных ионов (рН), общая углекислота плазмы крови (ТСО₂) осуществляли при 37°C на микрогазоанализаторе «Syntesis-15». Сродство гемоглобина к кислороду оценивали спектрофотометрическим методом по показателю р50 (рО₂ крови при 50% насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus рассчитывали значение р50_{станд} [16]. На основании полученных результатов по уравнению Хилла определяли положение кривой диссоциации оксигемоглобина.

Продукцию NO оценивали по содержанию нитрат-анион/нитрит-анион (NO₂/NO₃-) в плазме крови с помощью реактива Грисса на спектрофотометре «Solar» PV1251C при длине волны 540 нм. Содержание сероводорода определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и кислым раствором реактива N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого в присутствии хлорного железа при длине волны 670 нм [14].

Полученные результаты были обработаны методами непараметрической статистики с использованием программы «Statistica 10.0» (StatsoftInc, США). Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. При непараметрическом распределении использовали значения медианы (Me) 25- и 75-го перцентиля. Достоверность дисперсионного анализа, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. Сравнение трех и более независимых групп проводили с

помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Уровень статистической значимости принимали за $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных, которые подвергались облучению МП, не обнаружено существенных изменений со стороны кислотно-основного состояния крови (табл. 1). Однако установлено уменьшение сродства гемоглобина к кислороду: так значение $p50_{\text{реал}}$ возрастало с $33,9 \pm 0,32$ до $37,9 \pm 0,39$ мм рт. ст. ($P < 0,05$), а $p50_{\text{станд}}$ - с $34,2 \pm 0,68$ до $38,1 \pm 0,60$ мм рт. ст. ($P < 0,05$). Также при этом наблюдается рост степени насыщения крови кислородом и его напряжения в крови. Суммарное содержание $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ в плазме крови (см. рис. 1, а) повышалось до $16,52 \pm 0,64$ мкмоль/л ($P < 0,05$) в сравнении с контрольной группой ($7,26 \pm 0,28$ мкмоль/л). Содержание сероводорода (см. рис. 1, б) также увеличивалось с $16,03 \pm 0,42$ до $19,30 \pm 0,39$ мкмоль/л ($P < 0,05$).

У животных, которым вводили NaHS в условиях действия МП, значение $p50_{\text{реал}}$ увеличивалось до $37,3 \pm 0,55$ мм рт. ст. ($P < 0,05$) по отношению к контролю, что свидетельствует о сдвиге кривой диссоциации оксигемоглобина (рис. 2) вправо (в том же направлении, как и при действии только МП). Подобная динамика изменений была и по $p50_{\text{станд}}$. При этом степень оксигениции крови возрастала до $34,8 \pm 0,76$ % ($P < 0,05$), а напряжение кислорода в крови – до $36,0 \pm 0,80$ мм рт. ст. ($P < 0,05$). Содержание $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ и сероводорода в плазме крови при этом увеличилась до $15,04 \pm 0,88$ ($P < 0,05$) и $20,10 \pm 0,81$ мкмоль/л ($P < 0,05$) соответственно.

При совместном введении NaHS и аминокислоты L-аргинин характер изменений $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$, а также $p\text{O}_2$ и SO_2 имеет такую же тенденцию, как и в 3-й группе. Концентрация $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ и сероводорода в плазме крови увеличивается, но не превышает уровень по сравнению с группой (2-я), которая подвергалась только облучению МП.

Очевидно, МП реализует свое действие через активацию механизмов L-аргинин–NO-системы. Кроме того, введение исходного субстрата (L-аргинина) не является лимитирующим фактором активности системы, опосредованной экспрессией NO-синтазы, его содержание, как правило, достаточно для синтеза NO в обычных условиях. Действие МП активирует как NO, так и H_2S -продуцирующие механизмы, в результате чего непосредственно L-аргинин в этих условиях не оказывает своего потенцирующего эффекта. Учитывая взаимосопряженность механизмов действия NO и сероводорода [17] этого не наблюдается и в условиях введения донора NaHS.

При введении NaHS и L-NAME, с последующим облучением, увеличение значений $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$ не отмечалось, и они были близкими к контрольной группе, т.е. эффект МП не проявился. Отмечается снижение содержания $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($9,11 \pm 1,20$ мкмоль/л, $P < 0,05$) в сравнении с группами 3 и 4 ($15,04 \pm 0,88$ и $15,86 \pm 1,11$ мкмоль/л соответственно ($P < 0,05$)). Концентрация сероводорода также снижалась.

При введении необратимого ингибитора фермента цистатионинулиазы (PAG) выявлено достоверное снижение $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$ до $26,6 \pm 0,54$ и $26,5 \pm 0,78$ мм рт. ст. соответственно, сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево (см. рис. 2). Следует отметить снижение продукции газотрансмиттеров. Суммарное содержание $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ составило $7,70 \pm 0,77$ мкмоль/л ($P < 0,05$), а концентрация сероводорода – $8,11 \pm 0,58$ мкмоль/л ($P < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о вкладе газотрансмиттера сероводорода в воздействии МП на модификацию кислородтранспортной функции крови.

Ранее нами было показано, что облучение МП крыс приводит к уменьшению сродства гемоглобина к кислороду и реализуется при участии системы L-аргинин–NO [3]. Данная сигнальная молекула играет роль аллостерического эффектора в отношении

Влияние магнитного поля на показатели кислородтранспортной функции крови при введении веществ, влияющих на образование сероводорода

Показатель	Контроль	Магнитное поле					
		0,9% раствор хлорида натрия	гидросульфид натрия	гидросульфид натрия + L-аргинин	гидросульфид натрия + L-NAME	пропаргилглицин	
n	11	11	12	10	12	12	
p50 _{реал.} , мм рт.ст.	33,9±0,32	37,9±0,39 *	37,3±0,55 *	37,2±0,35 *	33,8±0,39 **	26,6±0,54 ***	
p50 _{станд.} , мм рт.ст.	34,2±0,68	38,1±0,60 *	36,8±0,74 *	37,6±0,67 *	31,6±0,69 **	26,5±0,78 ***	
Гемоглобин, г/л	125,5±1,47	125,6±1,84	127,0±1,60	125,6±1,59	126,8±2,17	123,4±1,71	
Степень оксигенации, %	30,1±0,59	33,3±1,25 *	34,8±0,76 *	34,7±0,87 *	30,9±0,65	30,3±0,93	
Напряжение кислорода, мм рт.ст.	31,0±0,71	34,1±0,78 *	36,0±0,80 *	35,6±0,96 *	31,2±0,37 **	24,9±1,11 ***	
Водородный показатель, ед	7,378±0,02	7,388±0,01	7,375±0,01	7,374±0,01	7,372±0,01	7,385±0,01	
Напряжение углекислого газа, мм рт.ст.	52,3±0,86	49,4±0,67	46,8±1,04	45,1±1,05	46,1±1,05	49,4±0,85	
Концентрация гидрокарбонат аниона, ммоль/л	30,9±0,53	29,5±0,36	27,4±0,82	26,1±0,86	26,1±0,45	33,9±0,9	
Общая углекислота плазмы крови, ммоль/л	32,1±0,51	31,3±0,39	28,5±0,63	27,3±0,77	27,0±0,55	35,6±0,86	
реальный недостаток (избыток) буферных оснований, ммоль/л	4,5±0,74	4,0±0,44	1,7±0,31	1,0±0,88	0,8±0,67	9,1±0,64	
Стандартный недостаток (избыток) буферных оснований, ммоль/л	7,8±0,35	7,5±0,41	5,7±0,56	4,3±0,33	10,6±0,66	8,36±0,56	
Стандартный бикарбонат, ммоль/л	29,3±0,63	28,6±0,32	33,7±2,42	27,8±0,42	37,9±1,28	30,27±0,69	

P<0,05 по сравнению с группой контроля; ** P<0,05 по сравнению с группой животных, которых облучали и вводили NaCl

гемоглобина, изменяя его сродство к кислороду и определяя состояние кислородтранспортной функции крови [2], но, как следует из выполненных нами исследований, в этом участвует и другой газотрансмиттер – сероводород.

Эндогенная продукция сероводорода осуществляется двумя пиридоксаль⁵’фосфатзависимыми ферментами – цистатионинβ-синтазой и цистатионинулиазой, которые используют в качестве субстрата аминокислоты L-цистеин и гомоцистеин [6]. Кроме того, возможно его образование в

эндотелиальных клетках кровеносных сосудов путем активации комплекса митохондриальных ферментов 3-меркаптосульфотрансферазы и цистеин-аминотрансферазы [17]. В физиологических условиях сероводород быстро утилизируется в организме путем митохондриального окисления (основной путь элиминации) с образованием сульфатов или через путь цитозольного метилирования с участием фермента S-метилтрансферазы [11]. В эритроцитах из сероводорода, обладающего высоким сродством к гемоглобину, образуется сульфгемоглобин [12].

NO и сероводород могут влиять на синтез друг друга. Сероводород вероятно регулирует продукцию NO за счет модуляции экспрессии и активности различных изоформ фермента NO-синтазы [8]. Так, его введение активирует эндотелиальную NO-синтазу и проявляет защитный эффект при ишемических повреждениях сердца [18]. В тоже время показано, что экзогенное применение донора NO (нитропрусида натрия) усиливает экспрессию ферментов цистатионинβ-синтазы и цистатионинулиазы, увеличивая продукцию сероводорода в тканях крыс [19].

Выявлена содружественность в действии данных газотрансмиттеров на сердечно-сосудистую систему, хотя она реализуется непосредственно через различные механизмы: NO – через активацию фермента гуанилилциклазы и потенциалзависимых каль-

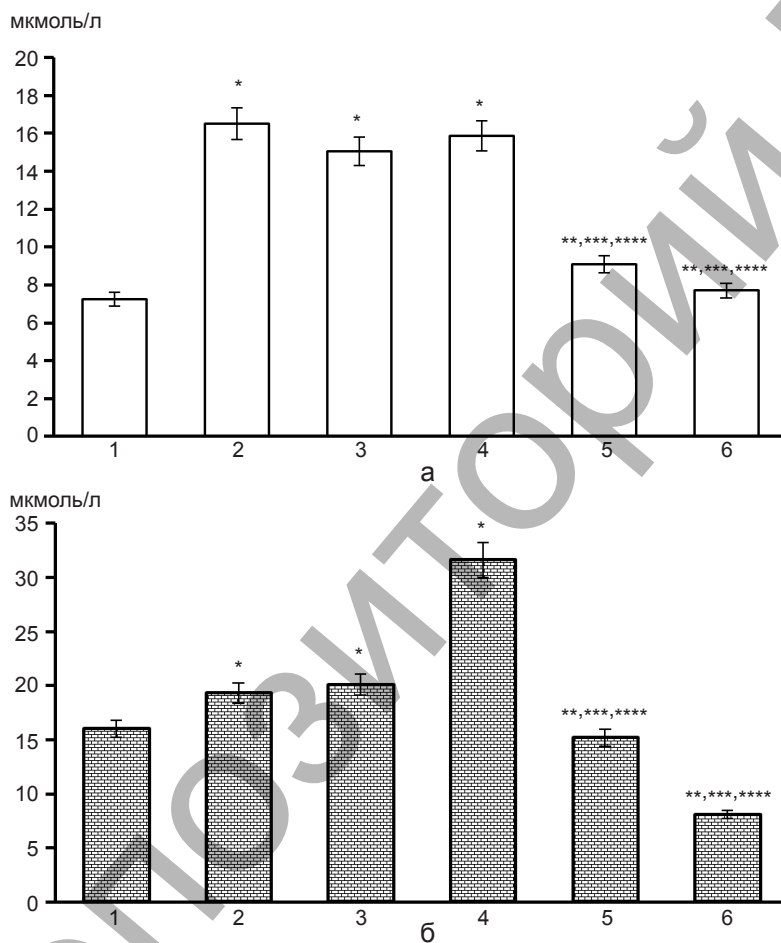


Рис. 1. Влияние магнитного поля на содержание NO (а) и сероводорода (б) в плазме при введении донора сероводорода

По оси ординат - концентрация газотрансмиттеров, по оси абсцисс - исследуемые группы: 1- контроль, 2- магнитное поле (МП) и 0,9%-й раствор NaCl, 3 - МП и NaHS, 4– МП, NaHS и L-аргинин, 5 – МП, NaHS и L-NAME, 6 – МП и PAG.

* P<0,05 по сравнению с 1-й группой; ** P<0,05 по сравнению со 2-й группой; *** P<0,05 по сравнению с 3-й группой; **** P<0,05 по сравнению с 4-й группой

циевых каналов [13], а сероводород – путем открытия АТФ-зависимых калиевых каналов [9]. При патологических состояниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса, взаимодействие сероводорода с NO может обеспечивать кардиопротективный эффект [20]. Ингибирование продукции NO через использование неселективного ингибитора NO-синтазы – L-NAME, значительно ослабляет кардиопротекторный эффекты сероводорода [15].

Как видим, в сложно организованной иерархии системы газотрансмиттеров существует определенный синергизм между механизмами действия NO и сероводорода в реализации кислородтранспортной функции крови в условиях действия МП, что подтверждается и в проведенных нами опытах с модуляцией образования сероводорода и NO.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют, что облучение МП, как в условиях действия сероводорода,

так и в его отсутствии, обуславливает однонаправленные изменения кислородсвязывающих свойств крови. Влияние МП в условиях введения NaHS и аминокислоты L-аргинин вызывает сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, что сопровождается повышением концентрации NO₂-/NO₃- и сероводорода. При введении неселективного ингибитора фермента NO-синтазы (L-NAME) или необратимого ингибитора фермента цистатионинулиазы (PAG) эффект МП на сродство гемоглобина к кислороду не проявляется, концентрация NO и сероводорода в плазме крови снижается, что отражает вклад сероводорода при участии NO в формирование кислородтранспортной функции крови в условиях действия МП.

V.V. Zinchuk, V.O. Lepeev

MAGNETIC FIELD EFFECT ON BLOOD OXYGEN TRANSPORT FUNCTION UNDER IMPACT OF A DONOR OF HYDROGEN SULPHIDE

Gaseous transmitters (hydrogen sulphide, NO) belong to the representatives of gaseous signaling compounds, which are important in the translation of physiological signals. But hydrogen sulphide participation in magnetic field (MF) effects on oxygen transport function modification are still poorly understood. Aim of the work was to evaluate MF effect on blood oxygen transport function under impact of a donor of hydrogen sulphide. Experiments were conducted on white male rats. MF application on rat tail artery and intraperitoneal injection of different substances, affecting the formation of hydrogen sulphide: sodium hydrosulfide (NaHS); L-arginine; a non-selective nitric oxide synthase inhibitor - NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME); an irreversible inhibitor of the

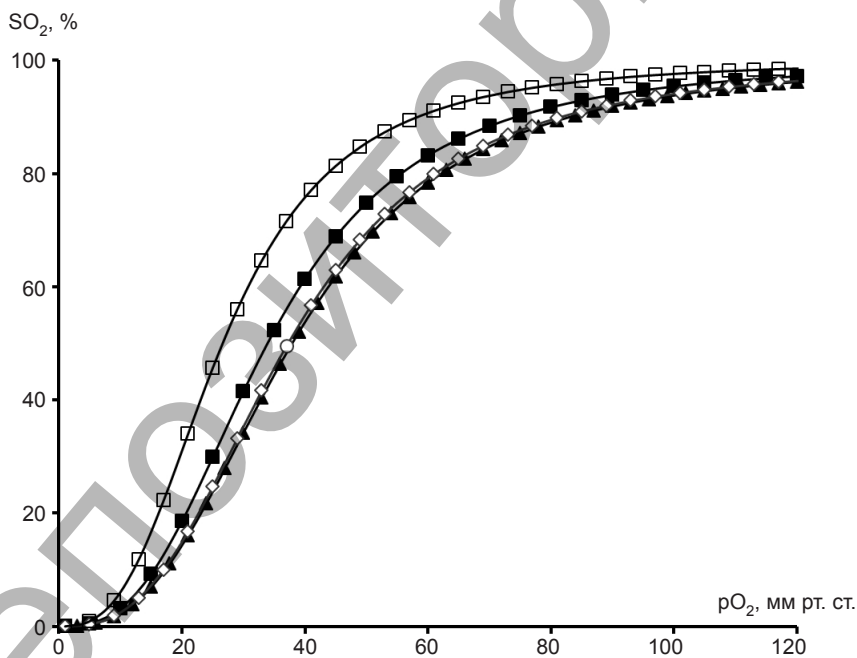


Рис. 2. Эффект магнитного поля на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при введении донора сероводорода. По оси ординат – насыщение гемоглобина кислородом, по оси абсцисс – напряжение кислорода в крови; ■ - контроль, ▲ - магнитное поле, ◇ - магнитное поле и гидросульфид натрия, □ - магнитное поле и пропаргилглицин.

enzyme cystathionine γ -lyase DL-Propargylglycine (PAG) were performed over 10 days. Indices of blood oxygen transport function, the level of hydrogen sulphide and the level of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ in blood plasma were estimated. It was shown that MF irradiation of rats tail artery and the injection of NaHS or amino acid L-arginine for 10 days led to a decrease of the hemoglobin oxygen affinity and was accompanied by an increased gaseous transmitters concentration (NO and hydrogen sulfide) in the blood. During administration of L-NAME and PAG MF effect on hemoglobin oxygen affinity did not occur. MF modifies blood oxygen transport function through the action of gaseous transmitter hydrogen sulphide with the participation of NO.

Keywords: magnetic field; blood; gaseous transmitters; oxygen; hydrogen sulphide.

Grodno State Medical University, Belarus.

REFERENCES

1. Varaksin AA, Pushhina EV. Role of hydrogen sulphide in regulatory functions. *Pacific Med J.* 2012;48(2):27-36.
2. Zinchuk VV, Glutkina NV. Oxygen-binding capacities of hemoglobin and nitric oxide. *Rus J Physiol. I.M. Sechenova.* 2013;99(5):537-54.
3. Zinchuk VV, Lepeev VO, Guliaj IE. Participation of gaseous transmitters in blood oxygen transport function modification under the influence of magnetic field. *Rus J Physiol I.M. Sechenova.* 2016;102(10):1176-84.
4. Sagach VF, Shimanskaya TV, Goshowska YV. Influence of stimulation and blockade of endogenous synthesis of hydrogen sulfide on cardiac function in ischemia-reperfusion. *Fiziol Zh.* 2013;59(4):8-15 [Ukrainian].
5. Spas VV, Yakubtsevich RE. Respiratory distress syndrome of adults. Minsk: Ipati, 2007.
6. Ulashchik VS. Elements of molecular physiotherapy. Minsk: Belaruskaya Navuka, 2014.
7. Chertok VM, Zenkina VG. Regulation of Ovarian Function: Part of the gas transmitters NO, CO and H_2S . *Successes Physiol Sci.* 2015;(4):74-89.
8. Altaany Z, Yang G., Wang R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2013;17(7):879-888.
9. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(3):756-63.
10. Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(2):205-14.
11. Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. *Frontiers in Physiology.* [cited 2012 Apr 18]; available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00101>.
12. Kolluru GK, Prasai PK, Kaskas AM, Letchuman V, Pattiello CB. Oxygen tension, H_2S , and NO bioavailability: is there an interaction? *J Appl Physiol.* 2016;120:263-70.
13. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemlit N, Marks AR. Protein kinase A phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000;101(4):365-76.
14. Norris EJ, Culbertson CR, Narasimhan S, Clemens MG. The Liver as a Central Regulator of Hydrogen Sulfide. *Shock.* 2011;36(3):242-50.
15. Pan T-T, Feng Z-N, Lee SW, Moore PK, Bian J-S. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40(1):119-30.
16. Severinghaus JW. Blood gas calculator. *J Appl Physiol.* 1966;21(5):1108-16.
17. Szabo C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2017;312(1):3-15.
18. Yong QC, Lee SW, Foo CS, Neo KL, Chen X, Bian J-S. Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic preconditioning. *Am J Physiol - Heart and Circul Physiol.* 2008;295(3):1330-40.
19. Zhao W, Ndisang JF, Wang R. Modulation of endogenous production of H_2S in rat tissues. *Canad J Physiol Pharmacol.* 2003;81(9):848-53.
20. Zhu YZ, Wang Z, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang XW, Huang SH, Tan CS, Whiteman M, Lu J, Moore PK. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J Appl Physiol.* 2007;102(1):261-268.

Материал поступил в редакцию 18.01.2017