

УДК [612.223.12: 615.834]: 612.127]-092.4

Зинчук Виктор Владимирович, д.м.н., профессор,
Билецкая Елена Степановна, ассистент кафедры нормальной физиологии
Гуляй Ирина Эдвардовна к. б. н., доцент,
Zinchuk Viktor Vladimirovich, doctor of medical sciences, professor, head of the department of
normal physiology, Grodno State Medical University, Grodno
Biletskaya Elena Stepanovna, assistant of the department of normal physiology, Grodno State Medical
University, Grodno
Gulyai Irina Edvardovna, candidate of biological sciences, associate professor, leading researcher of
the research laboratory of the Grodno state medical university, Grodno

Кафедра нормальной физиологии Гр ГМУ Гродно, Беларусь

ВКЛАД ОЗОНА В АДАПТАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ К ГИПОКСИИ

Аннотация. Проведена оценка особенностей эритроцитарного ответа на действие озона в опытах *in vitro*. Выявлено усиление эффекта данного газа на показатели транспорта кислорода суспензии эритроцитов, который более выражен при добавлении донора газотрансмиттера монооксида азота (нитроглицерина) и не отмечается при введении сероводорода. Инкубация эритроцитарной суспензии с озоном обуславливает развитие окислительного стресса, проявляющееся ростом концентраций диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, а также снижением активности каталазы, что свидетельствует о перегрузке механизмов антиоксидантной защиты. Нитроглицерин и гидросульфид натрия не меняют активирующего действия озона на процессы свободнорадикального окисления, однако активируют ферментативное звено антиоксидантной защиты каталазу.

Ключевые слова: эритроциты, озон, газотрансмиттер, монооксид азота, сероводород.

ОЗОНДУН ГИПОКСИЯНЫН АДАПТАЦИЯЛЫК ПРОЦЕССТЕРИНЕ КОШКОН САЛЫМЫ

Аннотация. Озондун таасирине эритроциттердин жооп берүү өзгөчөлүктөрү *in vitro* эксперименттеринде бааланган. Эритроциттердин суспензиясында кычкылтек ташуу көрсөткүчтөрүнө бул газдын таасиринин жогорулашы аныкталды, ал азот оксидинин донордук газ өткөргүчүнүн (нитроглицерин) кошулушу менен көбүрөөк байкалат жана күкүрт суутектин киришинде байкалбайт. Эритроцит суспензиясынын озон менен инкубацияланышы диен конъюгаттарынын, малондиальдегиддин концентрациясынын жогорулашынан жана каталаза активдүүлүгүнүн төмөндөшүнөн көрүнүп турган кычкылдануу стрессинин өнүгүшүн шарттайт, бул антиоксиданттык коргонуу механизмдеринин ашыкча жүктөлүшүн көрсөтөт. Нитроглицерин жана натрий гидросульфиди озондун эркин радикалдык кычкылдануу процесстерине активдештирүүчү таасирин өзгөртпөйт, бирок антиоксиданттык коргонуу каталазасынын ферменттик байланышын активдештирет.

Негизги сөздөр: эритроциттер, озон, газ өткөргүч, азот оксиди, күкүрттүү суутек.

CONTRIBUTION OF OZONE TO ADAPTATION PROCESSES TO HYPOXIA

Abstract. The evaluation of the features of the erythrocyte response to the action of ozone in experiments *in vitro* was carried out. An increase in the effect of this gas on the parameters of oxygen transport in a suspension of erythrocytes was revealed, which is more pronounced with the addition of a donor of gas-transmitter nitrogen monoxide (nitroglycerin) and is not observed with the introduction of hydrogen sulfide. Incubation of erythrocyte suspension with ozone causes the development of oxidative stress, which is manifested by an increase in the concentrations of diene conjugates, malondialdehyde, and a decrease in catalase activity, which indicates an overload of antioxidant defense mechanisms. Nitroglycerin and sodium hydrosulfide do not change the activating effect of ozone on the processes of free radical oxidation, however, they activate the enzymatic link of the antioxidant defense catalase.

Key words: erythrocytes, ozone, gas transmitter, nitrogen monoxide, hydrogen sulfide.

Введение

Красные кровяные клетки участвуют в метаболизме газотрансмиттера монооксида азота (NO): его образовании и элиминации [1]. В гипоксических условиях существенным источником NO могут быть эритроциты. Кроме того, было показано, что данные клетки могут способствовать продукции сероводорода (H_2S) [2]. Образование нитрозилгемоглобина усиливается сульфидом и показывает наличие перекрестных взаимодействий между данными газотрансмиттерами в эритроцитах [3]. Одним из факторов, влияющих на систему газотрансмиттеров, является озон (O_3). O_3 влияет на функциональное состояние организма, в частности, на систему крови [4]. Проведённые ранее нами исследования доказывают эффект озона на кислородтранспортную функцию (КТФ) крови, который ещё больше увеличивается при добавлении нитроглицерина [5]. Данный газ проявляет свои эффекты, в том числе и за счёт воздействия на NO-генерирующую систему [6]. Эритроциты выполняют важную роль в развитии окислительного стресса, влияя на биодоступность NO [7]. В связи с наличием высокоактивных оксидантов эритроциты хорошо оснащены антиоксидантными системами, в иерархии данных процессов особое место занимают газотрансмиттерные механизмы. Воздействие O_3 на кровь приводит к активации процессов перекисного липидов клеточных мембран и способствует синтезу пероксида водорода [8]. Сероводород может предотвращать развитие окислительного стресса у мышей, которым вводили O_3 [9]. Другой газотрансмиттер NO также участвует в восстановлении окислительно-восстановительного баланса в условиях введения озона. Ранее нами было показано, что инкубация крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия приводит к увеличению содержания диеновых конъюгатов (ДК), малонового альдегида (МДА) и активности каталазы в эритроцитарной массе [10]. Однако вклад озона в процессы адаптации к гипоксии непосредственно в эритроцитарной суспензии при участии доноров газотрансмиттеров остаётся недостаточно изученным.

Цель. Оценить вклад озона в адаптационные процессы к гипоксии.

Методика. Опыты были выполнены на суспензии эритроцитов. Образцы крови ($n=10$)

были разделены на 4 аликвоты по 1,2 мл, которые предварительно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для разделения плазмы и эритроцитов, затем дважды промывали охлаждённым изотоническим раствором. К эритроцитарной массе добавляли озонированный изотонический раствор хлорида натрия в объёме 1 мл (в контроль без озонирования) и 0,1 мл растворов, содержащих газотрансмиттеры (в 3-ю – нитроглицерин в конечной концентрации 0,05 ммоль/л, 4-ю – гидросульфид натрия в конечной концентрации 0,38 ммоль/л), в остальные группы – изотонический раствор хлорида натрия, после чего пробы перемешивались. Время инкубации составляло 60 мин. Изотонический раствор хлорида натрия барбатировался озоно-кислородной смесью, которая создавалась озонотерапевтической установкой УОТА-60-01-Медозон (Россия).

Показатели КТФ крови определяли на газоанализаторе StatProfileNOxplusL (США) при 37°C: парциальное давление кислорода (pO_2), степень оксигенации (SO_2). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) оценивали спектрофотометрическим методом по показателю $p50_{\text{реал}}$ (pO_2 крови при 50% насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus рассчитывали значение $p50_{\text{станд}}$ и положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО).

Активность свободнорадикальных процессов оценивали по содержанию первичных (диеновых (ДК) и промежуточных (малоновый диальдегид (МДА)) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитарной массе. Для определения активности каталазы в гемолизатах использовали метод М. Королук, основанный на спектрофотометрической регистрации количества окрашенного продукта реакции H_2O_2 с молибденово-кислым аммонием, имеющим максимальное светопоглощение при длине волны 410 нм.

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого была использована непараметрическая статистика с применением программы «Statistica 10.0». Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимали за $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Добавление озона в эритроцитарную суспензию приводит

к росту основных показателей КТФ суспензии эритроцитов, таких как SO_2 , pO_2 , $p50_{\text{реал}}$, $p50_{\text{станд}}$ и смещению КДО вправо в сравнении с контрольной группой. Отмечается увеличение SO_2 на 121,8% $p<0,05$; pO_2 на 74,1% $p<0,05$; показателя СГК $p50_{\text{реал}}$ 21,43 % $p<0,05$. Подобная тенденция сохраняется и по отношению к $p50_{\text{станд}}$. При анализе параметров кислотно-основного баланса значимых изменений не выявлено. Нитроглицерин усиливает эффект данного газа на КТФ суспензии эритроцитов в заданных условиях, SO_2 и pO_2 увеличиваются на 12,54% $p<0,05$ и на 21,04% $p<0,05$ соответственно по отношению к группе в которую предварительно добавлялся озон. Показатель $p50_{\text{реал}}$ возрастает на 7,5% $p<0,05$ и сдвиг КДО вправо становится более выраженным. Гидросульфид натрия не оказывает подобного эффекта.

Содержание МДА в эритроцитарной суспензии при добавлении озона возрастает на 85% ($p<0,05$), ДК на 77% ($p<0,05$) в сравнении с контрольной группой. Активность каталазы уменьшается на 44% ($p<0,05$). Добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия приводит к увеличению активности фермента на 46 % ($p<0,05$) и на 44% ($p<0,05$) соответственно, в сравнении с группой эритроцитарная суспензия с добавлением озона. Значимых изменений показателей перекисного окисления липидов в данных группах не выявлено.

Эритроциты являются важной мишенью для действия озона в сравнении с другими форменными элементами. Данный газ улучшает доставку кислорода за счёт гексозомонофосфатного шунта, способствуя активации 2,3-дифосфоглицерат (ДФГ) мутазы, что в итоге приводит к сдвигу КДО вправо [11]. На наш взгляд, кроме данного механизма могут работать и другие, в частности, опосредованные газотрансммитерами. Эритроциты содержат эритроцитарную NO-синтазу, которая продуцирует NO [12]. Наши данные показывают, что эффект газотрансммитеров неоднозначен, так добавление экзогенного донора монооксида азота (нитроглицерина) усиливает влияние O_3 на КТФ эритроцитарной суспензии, а гидросульфид натрия подобным эффектом не обладает. Высвобождение NO из красных кровяных клеток регулируется изменениями pO_2 в крови, а наличие O_3 , способствует росту данного параметра.

Постоянное воздействие на эритроциты множества различных оксидантов способствует формированию у них мощной системы внутриклеточной антиоксидантной защиты. При нейтрализации которых образуется пероксид водорода, что и приводит к возрастанию активности каталазы [13], однако в наших исследованиях активность фермента снизилась, данный факт свидетельствует о перегрузке антиокислительных механизмов. В мембранной фракции эритроцитов озон, как источник кислорода, реагирует с NO, приводя к образованию сильнодействующего окислителя пероксинитрита [14]. Последующее окисление метгемоглобина пероксинитритом может привести к синтезу глобиновых радикалов, которые усиливают прооксидантную активность в эритроцитах [15].

Таким образом, полученные нами данные реализуются при участии газотрансммитеров, в частности, NO, но не H_2S , что и демонстрируют особенности эритроцитарного ответа на действие озона на показатели КТФ, за счёт влияния на NO-продуцирующую функцию красных кровяных клеток при добавлении донора монооксида азота (нитроглицерина). Однако следует отметить, что наблюдается свободнорадикальное повреждение клеток озоном.

Заключение. Физиологические эффекты O_3 реализуются через эритроцитарное звено, что проявляется в росте следующих показателей КТФ суспензии эритроцитов: pO_2 , SO_2 , $p50_{\text{реал}}$ и $p50_{\text{станд}}$. Добавление нитроглицерина в заданных условиях приводит к усилению эффекта данного фактора на КТФ эритроцитов и более выраженному сдвигу КДО вправо, а гидросульфид натрия подобного действия не оказывает. Инкубация эритроцитарной суспензии с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия обуславливает развитие окислительного стресса (рост ДК, МДА), снижение активности каталазы свидетельствует о перегрузке механизмов антиоксидантной защиты. Доноры газотрансммитеров (нитроглицерин, гидросульфид натрия) не меняют активирующего действия озона на процессы свободнорадикального окисления, однако активируют ферментативное звено антиоксидантной защиты каталазу.

Финансирование. Осуществляется в рамках проекта ГПНИ № 30-24/549-21.

Список литературы:

1. Kuhn V., Diederich L., Keller T.C. et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia // *Antioxid Redox Signal.* – 2017 – Vol. 26, № 13. – P. 718–742.
2. Cortese-Krott M.M. Red Blood Cells as a «Central Hub» for Sulfide Bioactivity: Scavenging, Metabolism, Transport, and Cross-Talk with Nitric Oxide // *Antioxid Redox Signal.* – 2020. – Vol. 33, № 18. – P.1332–1349.
3. Bianco C.L., Savitsky A., Feelisch M. et al. Investigations on the role of hemoglobin in sulfidemetabolism by intact human red blood cells // *BiochemPharmacol.* – 2018. – Vol. 149. – P. 163–173.
4. Lacerda A.C., Grillo R., Martins C.B. et al. Efficacy of biostimulatory ozone therapy: Case report and literature review // *J Cosmet Dermatol.* – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 130–133.
5. Зинчук В.В., Билецкая Е.С. Особенности влияния озона на кислородзависимые процессы крови при гипоксических условиях // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* – 2021. – Т. 20, № 3. – С. 70–76.
6. Зинчук В. В. Эффект озона на кислородтранспортную функцию и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *invitro* // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* – 2021. – Т. 107, № 1. – С. 16–27.
7. Kahn M.J., Maley J.H., Lasker G.F., Kadowitz P.J. Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function // *Cardiovasc. Haematol. Disord. Drug Targets.* – 2013. – Vol. 13, № 1. – P.83–87.
8. Coen H. Wiegman, Feng L., Bernhard R. Oxidative Stress in Ozone-Induced Chronic Lung Inflammation and Emphysema: A Facet of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Frontiers in immunology.* – Vol. 11. – 2020. – P. 1–13.
9. Zhang P., Li F., Wiegman C.H. et al. Inhibitory effect of hydrogen sulfide on ozone-induced airway inflammation, oxidative stress, and bronchial hyperresponsiveness // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2015. – Vol. 52. – P. 129–37.
10. Зинчук В.В., Билецкая Е.С., Гуляй И.Э. Эффект озона на кислородтранспортную функцию и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови в условиях воздействия на по-генерирующую систему в опытах *invitro* // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова.* – 2021– Т.107, №1. – С. 16–27.
11. Bocci V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects // *Free Radic Res.* – 2012. – Vol. 46, № 9. – P. 1068–1075.
12. Kishimoto S., Maruhashi T., Kajikawa M. et al. Hematocrit, hemoglobin and red blood cells are associated with vascular function and vascular structure in men // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 11467.
13. Dei Zotti F., Verdoy R., Brusa D. et al. Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes // *Redox Biol.* – 2020. – Vol. 34. – P.101399.
14. Dei Zotti F., Lobysheva I.I., Balligand J.L. Nitrosyl-hemoglobin formation in rodent and human venous erythrocytes reflects NO formation from the vasculature in vivo // *PLoS One.* – 2018; – Vol. 13, №7. – P. 1–20.
15. Rifkind J.M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging // *Antioxidants Redox Signal.* 2013; – Vol. 18, №17. – P. 2274–2283.