

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В ЭРИТРОЦИТАХ ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОЗОНОМ

Билецкая Е. С., Шалесная С. Я, Володина А. А.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. Эритроциты выполняют важную роль в развитии окислительного стресса, влияя на биодоступность монооксида азота (NO) [1]. Клетки крови продуцируют внутриклеточные активные формы кислорода (АФК) в основном за счет аутоокисления гемоглобина с последующим образованием метгемоглобина и супероксид-аниона, впоследствии дисмутирующих до пероксида водорода [2]. В связи с наличием высокоактивных оксидантов эритроциты хорошо оснащены антиоксидантными системами [3], в иерархии данных процессов особое место занимают газотрансмиттерные механизмы.

Воздействие озоном (O_3) на кровь приводит к образованию АФК, вызывая активацию процессов перекисного липидов клеточных мембран и способствует синтезу пероксида водорода [4]. Сероводород может предотвращать развитие окислительного стресса у мышей, которым вводили O_3 [5]. Другой газотрансмиттер NO также участвует в восстановлении окислительно-восстановительного баланса в условиях введения озона [6]. 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 [7]. В связи с этим особый интерес вызывает изучение особенностей эритроцитарного ответа на действие озона при добавлении доноров газотрансмиттеров.

Цель. Оценить степень развития окислительного стресса, индуцированного озоном в эритроцитарной суспензии в опытах *in vitro*.

Методы исследования. Опыты были выполнены на суспензии эритроцитов. Исследование проводилось в соответствии рекомендациями комитета по биомедицинской этике и деонтологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Образцы крови ($n=10$) были разделены на 4 аликвоты по 1,2 мл, которые были получены, путём центрифугирования 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 озono-кислородной смесью, которая создавалась озонотерапевтической установкой УОТА-60-01-Медозон (Россия).

Активность свободнорадикальных процессов оценивали по содержанию первичных – диеновые конъюгаты (ДК) и промежуточных – малоновый диальдегид (МДА) продуктов ПОЛ. Уровень ДК в эритроцитарной массе определяли по интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического светового потока в области спектра 232-234 нм, характерного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов. Оптическую плотность измеряли на спектрофлуориметре СМ 2203 «Солар» (Беларусь) при длине волны 233 нм по отношению к контролю. Содержание МДА оценивали по взаимодействию с 2-тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре РV1251С «Солар» (Беларусь) при длине волны 540 нм по отношению к контролю. Активность каталазы оценивали по способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс при длине волны 410 нм на спектрофотометре РV1251С «Солар» (Беларусь).

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”. Сравнение трех и более независимых групп проводили с помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. 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.

Постоянное воздействие на эритроциты множества различных оксидантов способствует формированию у них мощной системы внутриклеточной антиоксидантной защиты [2]. При нейтрализации АФК образуется пероксид водорода, что и приводит к возрастанию активности каталазы [8], 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 [9]. Последующее окисление метгемоглобина пероксинитритом может привести к синтезу глобиновых радикалов, которые усиливают прооксидантную

активность в эритроцитах [10]. В свою очередь NO и сероводород также способны влиять на метаболизм антиоксидантов за счёт газотрансммиттерных ферментов и продуктов их реакций [11].

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют свободнорадикальное повреждение клеток озоном, добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в эритроцитарную суспензию приводит к увеличению активности каталазы.

Выводы. Инкубация эритроцитарной суспензии с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия обуславливает развитие окислительного стресса, проявляющееся ростом концентраций ДК, МДА, а также снижением активности каталазы, что свидетельствует о перегрузке механизмов антиоксидантной системы. Доноры газотрансммиттеров (нитроглицерин, гидросульфид натрия) не меняют активирующего действия озона на процессы свободнорадикального окисления, однако активируют ферментативное звено антиоксидантной защиты каталазу.

Работа выполнена в рамках проекта ГПНИ № 30-24/549-21.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Franco R., Navarro G., Martínez-Pinilla E. Antioxidant Defense Mechanisms in Erythrocytes and in the Central Nervous System // *Antioxidants (Basel).* – 2019. – Vol. 8, № 2. – P.46.
3. George A., Pushkaran S., Konstantinidis D.G. et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood.* – 2013. – Vol. 121, № 11. – P. 2099–2107.
4. 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.
5. 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.
6. Moreno-Fernández A., Macías-García L., Valverde-Moreno R. et al. Autohemotherapy with ozone as a possible effective treatment for Fibromyalgia // *Acta Reumatol Port.* –2019. – Vol. 44, № 3. – P. 244–249.
7. 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 *in vitro* // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова.* – 2021. – Т. 107, № 1. – С. 16–27.
8. Dei Zotti F., Verdoy R., Brusa D. et al. Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes // *Redox Biol.* – 2020. – Vol. 34. – P. 101399.
9. 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.
10. Rifkind J.M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging // *Antioxidants Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, № 17. – P. 2274–2283.
11. Guerra D.D., Hurt K.J. Gasotransmitters in pregnancy: from conception to uterine involution // *Biol. Reprod.* – 2019. – Vol. 101, № 1. – P. 4–25.