

*Е.С. Билецкая, В.В. Зинчук, А.В. Муравьев*  
**ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ОТВЕТА  
НА ДЕЙСТВИЕ ОЗОНА**

**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.

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

*E.S. Biletskaya, V.V. Zinchuk, A.V. Muravyov*  
**FEATURES OF THE ERYTHROCYTE RESPONSE  
TO THE ACTION OF OZONE**

**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.

**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 содержат 3-меркаптопируват, сульфотрансферазы и, следовательно, могут продуцировать газотрансмиттер сероводород (H<sub>2</sub>S) [2]. Газотрансмиттеры NO и H<sub>2</sub>S проявляют схожие, а иногда и взаимозависимые эффекты как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, образование

нитрозилгемоглобина усиливается сульфидом и показывает наличие перекрестных взаимодействий между данными газотрансмиттерами в эритроцитах [3]. Одним из факторов, влияющих на систему газотрансмиттеров, является озон ( $O_3$ ). Эта молекула влияет на функциональное состояние организма, в частности, на систему крови [4], за счет окислительной активности стимулирует антиоксидантную систему защиты, улучшает деформируемость эритроцитов. Проведённые ранее нами исследования доказывают эффект озона на кислородтранспортную функцию (КТФ) крови, который ещё больше увеличивается при добавлении нитроглицерина и проявляется в выраженном сдвиге кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [5]. Данный газ проявляет свои эффекты, в том числе и за счёт воздействия на NO-генерирующую систему [6]. Однако, как известно, NO-синтазной активностью обладают не только эритроциты, но и лейкоциты, тромбоциты. В связи с этим особый интерес вызывает изучение особенностей непосредственно эритроцитарного ответа на действие озона при добавлении доноров газотрансмиттеров.

#### **Цель**

Оценить особенности эритроцитарного ответа на действие озона в опытах *in vitro* при модификации системы газотрансмиттеров.

#### **Методика**

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 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 озono-кислородной смесью, которая создавалась озонотерапевтической установкой УОТА-60-01-Медозон (Россия).

После добавления озона на газоанализаторе Stat Profile рНОх plus L (США) при 37°С в крови определяли следующие показатели КТФ суспензии эритроцитов: парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ), степень оксигенации ( $SO_2$ ) и кислотно-основного состояния: парциальное давление углекислого газа ( $pCO_2$ ), стандартный бикарбонат (SBC), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований (ABE/SBE), гидрокарбонат ( $HCO_3^-$ ), концентрация водородных ионов (рН), общая углекислота плазмы крови ( $TCO_2$ ). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) оценивали спектрофотометрическим методом по показателю  $p50_{реал}$  ( $pO_2$  крови при 50% насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus рассчитывали значение  $p50_{станд}$ .

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 обсуждение**

Добавление озона в эритроцитарную суспензию приводит к росту основных показателей КТФ суспензии эритроцитов, таких как  $SO_2$ ,  $pO_2$ ,  $p50_{реал}$ ,  $p50_{станд}$  и смещению кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) (рис.) вправо в сравнении с контрольной группой.

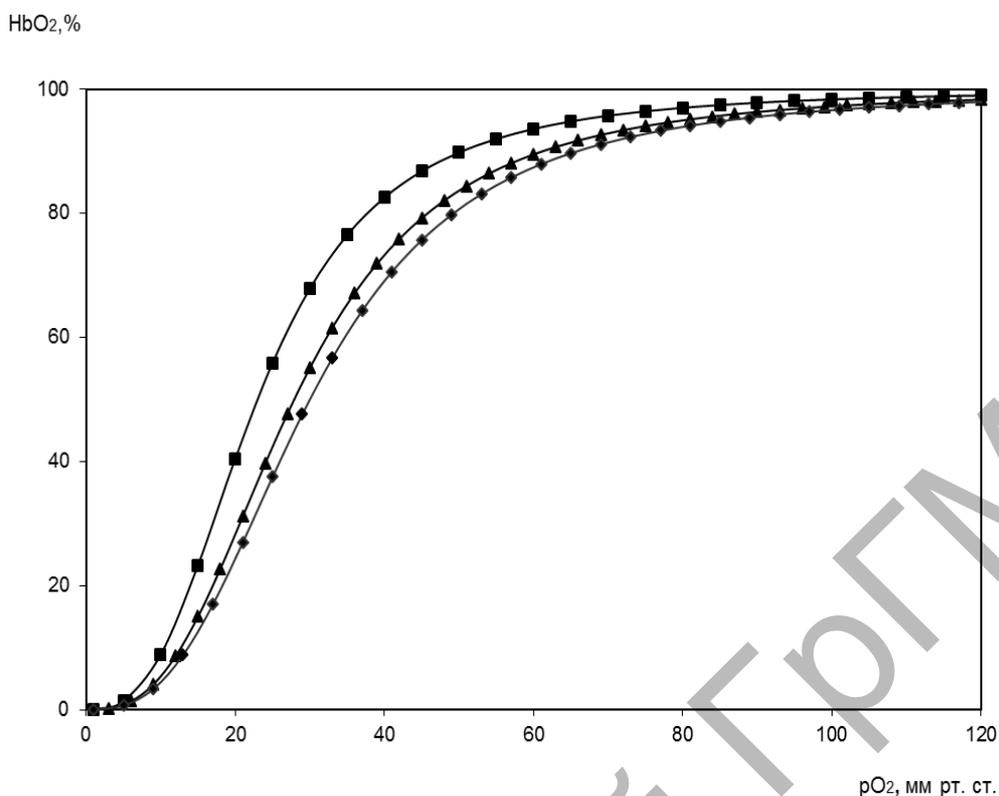


Рис. 1. Эффект озона на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH и pCO<sub>2</sub> в условиях гипоксии. Обозначения: ■ - контроль; ▲ - эритроцитарная масса + озон; ◆ - эритроцитарная масса + нитроглицерин + озон.

Отмечается увеличение SO<sub>2</sub> на 121,8% p<0,05; pO<sub>2</sub> на 74,1% p<0,05; показателя SGK p50<sub>реал</sub> 21,43 % p<0,05. Подобная тенденция сохраняется и по отношению к p50<sub>станд.</sub> При анализе параметров кислотно-основного баланса значимых изменений не выявлено. Нитроглицерин усиливает эффект данного газа на КТФ суспензии эритроцитов в заданных условиях, SO<sub>2</sub> и pO<sub>2</sub> 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<sub>реал</sub> возрастает на 7,5% p<0,05 и сдвиг КДО вправо становится более выраженным. Гидросульфид натрия не оказывает подобного эффекта.

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) мутаза, что в итоге приводит к превращению 1,3-ДФГ в 2,3-ДФГ в эритроцитах, который связываясь с β-цепью гемоглобина может приводить к

сдвигу КДО вправо [7]. На наш взгляд, кроме данного механизма могут работать и другие, в частности, опосредованные газотрансмиттерами. Эритроциты содержат эритроцитарную NO-синтазу, которая продуцирует NO [8]. Несмотря на большую реакционную способность гемоглобина при взаимодействии с NO, его родственные формы (нитриты, нитраты) обнаруживаются в плазме, однако при ингибировании эритроцитарной NO-синтазы концентрация нитритов и нитратов в плазме, значительно снижается, что доказывает факт экспорта NO из эритроцитов через анионообменник 1 в форме вторичных форм азота (например, нитрита), с которыми не может связаться гемоглобин, обеспечивая свободный пул NO [9]. Наши данные показывают, что эффект газотрансмиттеров неоднозначен, так добавление экзогенного донора монооксида азота (нитроглицерина) усиливает влияние O<sub>3</sub> на КТФ эритроцитарной суспензии, а гидросульфид натрия подобным эффектом не обладает. Высвобождение NO из красных кровяных клеток регулируется изменениями pO<sub>2</sub> в крови [10], а наличие O<sub>3</sub>, способствует росту данного параметра. Известно, что NO может оказывать влияние на изменение СГК [11].

Таким образом, полученные нами данные реализуются при участии газотрансмиттеров, в частности, NO, но не H<sub>2</sub>S, 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).

### **Заключение**

Физиологические эффекты O<sub>3</sub> реализуются через эритроцитарное звено, что проявляется в росте следующих показателей КТФ суспензии эритроцитов: pO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, p50<sub>реал</sub> и p50<sub>станд</sub>. 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.

**Финансирование.** *Осуществляется в рамках международного проекта «БРФФИ–РФФИ-2020» (№ М20Р-428).*

### **Библиографический список**

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 // *Biochem Pharmacol.* – 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 *in vitro* // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* – 2021. – Т. 107, № 1. – С. 16-27.

7. Bocci V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects // *Free Radic Res.* – 2012. – Vol. 46, № 9. – P. 1068-1075.

8. 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.

9. Richardson K.J., Kuck L., Simmonds M.J. Beyond oxygen transport: active role of erythrocytes in the regulation of blood flow // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2020. – Vol. 319, № 4. – P. 866-872.

10. Zheng S., Krump N.A., McKenna M.M. et al. Regulation of erythrocyte  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransport by an oxygen-switched kinase cascade // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol. 294, № 7. – P. 2519-2528.

11. Tsai A.G., Intaglietta M., Sakai H. et al. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier // *Curr Drug Discov Technol.* – 2012. – Vol. 9, № 3. – P. 166-172.