

*В.В.Зинчук¹, Е. С. Билецкая¹, А.В. Приезжев³, И.А.Тихомирова,
П.В.Михайлов², А.В.Муравьев*

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОРЕОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ И КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ КРОВИ ПРИ СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ ОЗОНА И ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ

Аннотация. Эффективная деформируемость эритроцитов (ДЭ), при умеренно сниженной их агрегации (АЭ), может способствовать лучшей перфузии тканей и в целом положительно влиять на кислородтранспортную функцию (КТФ). Известно, что озон оптимизирует объемный кровоток и, в том числе, за счет влияние на реологические свойства эритроцитов. Газотрансммиттеры (ГТ), оксид азота (NO) и сульфид водорода (H₂S) также оказывают положительное влияние на микрореологию эритроцитов. Однако остается не изученной проблема взаимодействия озона и ГТ. Это и стало целью настоящего исследования. Для исследования роли ГТ в изменениях микрореологии эритроцитов (человеческие эритроциты, взятые из крови здоровых доноров, n=24), их инкубировали с донорами ГТ (НПН, 100 мкМ и NaHS, 100 мкМ), отдельно и в комбинации с озоном (O₃, 6 мг/л) с последующей регистрацией ДЭ и АЭ. В другой серии опытов на образцах крови, взятых от белых крыс-самцов массой 250-300 г (n=15), регистрировали показатели КТФ цельной крови. Создавали гипокапнические условия и определяли изменения КТФ крови, содержание NOx и концентрацию H₂S в сыворотке под влиянием ее инкубации с озоном, с донорами ГТ и при сочетанном воздействии ГТ и озона. Были найдены позитивные изменения ДЭ и АЭ под влиянием как доноров ГТ и озона отдельно, так и при их совместном добавлении в среду инкубации клеток. На другой экспериментальной модели было установлено, что при добавлении озона в кровь происходит изменение КТФ. Это проявлялось в увеличении pO₂, SO₂ и уменьшении сродства гемоглобина к кислороду. Озон повышал содержание NO и H₂S в сыворотке. Таким образом, результаты исследования показали, что озон оказывает положительное влияние на микрореологию

© В.В.Зинчук, Е. С. Билецкая, А.В. Приезжев, И.А.Тихомирова,
П.В.Михайлов, А.В.Муравьев, 2022

эритроцитов, от состояния которой, зависит капиллярная перфузия. Совместное действие доноров ГТ и озона несколько больше увеличивало микрореологические ответы эритроцитов. На фоне предварительной обработки крови гипокапнической газовой смесью, влияние озона на КТФ крови заметно увеличивалось.

Ключевые слова: *кислородтранспортная функция крови, газотрансмиттеры, озон, эритроциты, деформируемость, агрегация*

V.V. Zinchuk¹, E. S. Biletskaya¹, A.V. Priezzhev³, I.A. Tikhomirova², A.V. Muravyov², P.V. Mikhailov²

CHANGES IN ERYTHROCYTE MICRORHEOLOGY AND BLOOD OXYGEN TRANSPORT FUNCTION UNDER THE COMBINED ACTION OF OZONE AND GAS TRANSMITTERS

Annotation. The effective deformability of erythrocytes (DE), with their moderately reduced aggregation (AE), can contribute to better tissue perfusion and, in general, positively affect the oxygen transport function (OTF). It is known that ozone optimizes blood flow and, in particular, due to the effect on the rheological properties of erythrocytes. Gasotransmitters (GT), nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H₂S) also have a positive effect on erythrocyte microrheology. However, the problem of the interaction between ozone and GT remains unstudied. This was the aim of the present paper. To study the role of GT in changes in erythrocyte microrheology (human erythrocytes taken from the blood of healthy donors, n=24), they were incubated with GT donors (SNP, 100 μM and NaHS, 100 μM), alone and in combination with ozone (O₃; 6 mg/l) with subsequent registration of DE and AE. In another series of experiments on blood samples taken from white male rats weighing 250-300 g (n=15), the parameters of OTF of blood were recorded. Hypocapnic conditions were created and changes in blood OTF, NO_x content, and serum H₂S concentration were determined under the influence of its incubation with ozone, with GT donors, and under the combined effect of GT and ozone. Positive changes in DE and AE were found under the influence of both GT and ozone donors separately, and when they were added together to the cell incubation medium. On another experimental model, it was found that when ozone is added to the blood, a change in OTF occurs. This was manifested in an increase in pO₂, SO₂ and a decrease in the affinity of

hemoglobin for oxygen. Ozone increased NO and H₂S levels in serum. Thus, the results of the study showed that ozone has a positive effect on the microrheology of erythrocytes, on the state of which capillary perfusion depend. The combined effect of GT and ozone slightly increased the microrheological responses of erythrocytes. Against the background of pre-treatment of blood with a hypocapnic gas mixture, the effect of ozone on blood OTF increased markedly.

Keywords: oxygen transport function, gasotransmitters, ozone, erythrocytes, deformability, aggregation

Введение

При уменьшении резервов дилатации артериол возрастает роль реологических свойств крови для обеспечения перфузии тканей. Для последней особенно важна деформируемость эритроцитов [1]. Микрореология эритроцитов – деформируемость (ДЭ) и агрегация (АЭ) могут существенно изменяться под влиянием сигнальных молекул в том числе, под действием газотрансмиттеров (ГТ) [2], к которым относятся: оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H₂S)[3]. Известно, что озон имеет не только антигипоксический эффект, но и улучшает кислородтранспортную функцию крови (КТФ), а также оптимизирует её реологические свойства [4]. Добавление в кровь озонированного физиологического раствора существенно изменяло ее КТФ, что проявлялось в увеличении рO₂, SO₂, уменьшении сродства гемоглобина к кислороду [5]. Это сочеталось с приростом концентрации нитратов/нитритов (NOx) и сероводорода в плазме. Поскольку установлено, что озон стимулирует продукцию эндогенных ГТ, а последние положительно влияют на ДЭ и АЭ, то комплексный анализ сочетанного влияния ГТ и озона на микрореологию эритроцитов и кислородтранспортный потенциал крови, представляет собой важную научную задачу и ее решение стало целью данного исследования.

Материалы и методы

Первый протокол исследования

Образцы цельной крови (9 мл) получали венопункцией у здоровых лиц (мужчины, n=20) в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Исследование было одобрено местным этическим комитетом университета (Протокол №5 от 13.05.2021) и было получено информированное согласие всех испытуемых. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием, трижды отмывали в

изотоническом растворе NaCl. Затем готовили суспензии эритроцитов с постоянным гематокритом (Hct=40%). Агрегацию эритроцитов (ПАЭ) регистрировали с помощью агрегометра Mypette M1 (Германия). Для определения деформируемости эритроцитов, определяли их индекс удлинения (ИУЭ) в проточной микрокамере [6]. Суспензию эритроцитов делили на несколько аликвот и клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин с каждым из перечисленных ниже соединений:

- 1) с донором NO – нитропропуссидом натрия (НПН, в концентрациях 100 мкМ);
- 2) со стимулятором NO-синтазы (eNOS), L-аргинином (100 мкМ);
- 3) с донором H₂S – гидросульфидом натрия (NaHS, в концентрациях 100 мкМ);
- 4) с озоном (6 мг/л).
- 5) озон + НПН (донор NO, в концентрации 100 мкМ);
- 6) озон + L-аргинином (100 мкМ);
- 7) озон + NaHS (в концентрации 100 мкМ).

В каждом опыте в качестве контроля использовали суспензию эритроцитов, инкубируемых в течение 30 мин при 37°C в растворе Рингера без добавления указанных выше препаратов.

Раствор Рингера барботировали озонотоксической смесью при помощи озонотерапевтической установки УОТА-60-01 (ООО «Медозон», Россия), в которой предусмотрено измерение концентрации озона оптическим методом в ультрафиолетовом диапазоне. В опытах и в контроле проводилось по 20 параллельных измерений микрореологических характеристик эритроцитов.

Второй протокол исследования

Смешанную венозную кровь брали из правого предсердия от белых крыс-самцов массой 250-300 г (n=15), в объеме 8 мл с гепарином в качестве антикоагулянта. Животных наркотизировали, используя тиопентала натрия (50 мг/кг интраперитонеально). Опыты проводили в соответствии рекомендациями комитета по биомедицинской этике и деонтологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет». Кровь разделяли на 6 аликвот по 3 мл. Первая проба была *контрольной*. В пробах 2, 4, 5, 6 осуществляли обработку крови *гипокапнической газовой смесью* (4,2% CO₂; 5,3% O₂, 90,5% N₂). К пробам номер 3, 4, 5, 6 добавляли озонированный изотонический раствор NaCl с озоном 6 мг/л в объеме 1 мл (в 1-ю и 2-ю без озонирования) и 0,1 мл

растворов, содержащих дозаторы ГТ: в 5-ю – нитроглицерин (донор NO, 50 мкМ), 6-ю – NaHS (380 мкМ, Sigma-Aldrich, США); в 1-ю, 2-ю, 3-ю, 4-ю – по 0,1 мл раствора NaCl. Показатели КТФ крови определяли на газоанализаторе Stat Profile pHox plus L (США) при 37°C: парциальное давление кислорода (pO₂), степень оксигенации (SO₂) и кислотно-основное состояние (pCO₂, pH и TCO₂). Сродство гемоглобина к кислороду оценивали спектрофотометрическим методом по показателю p50_{реал} (pO₂ крови при 50% насыщении ее кислородом). По суммарному содержанию нитратов/нитритов NOx (NO₃⁻/NO₂⁻) в плазме крови оценивали продукцию эндогенного NO спектрофотометрическим методом. Уровень эндогенного сероводорода (H₂S) в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и раствором N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого в присутствии хлорного железа при длине волны 670 нм. Концентрацию газотрансмиттеров выражали в мкмоль/л.

Статистическая обработка, полученных данных исследования

Все выборки показателей проверяли на тип распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка (“Statistica 10.0”). 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. В тексте приведены средние величины параметров и их стандартное отклонение (M±σ). В необходимых случаях (Протокол 2) результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимали за p<0,05 и p<0,01.

Результаты

После инкубации эритроцитов в среде содержащий озон наблюдали прирост ДЭ на 6% (p<0,01) и уменьшение АЭ на 17% (рис. 1). Добавление к озону НПН существенно не изменило величину прироста ДЭ, но в большей мере снизило АЭ, на 35% (p<0,01).

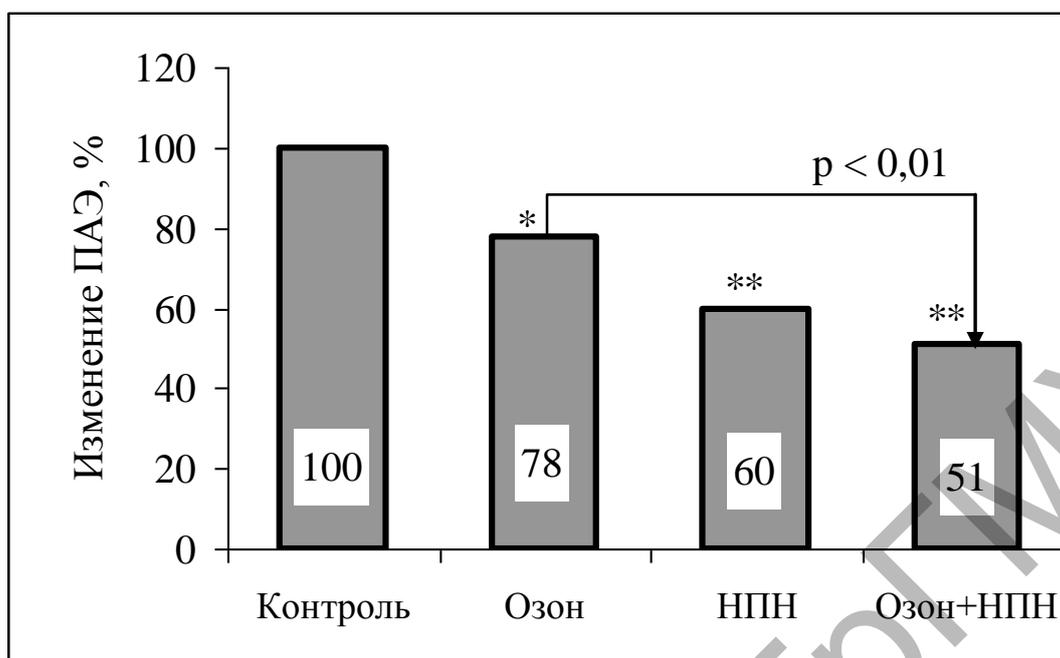


Рис. 1. Изменение микрореологии эритроцитов под влиянием их инкубации с озоном, нитропруссидом натрия (НПН), и их при сочетанном воздействии «озон+НПН».

Примечание: * - различия с контролем достоверны при $p < 0,01$, ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов

В этих условиях применения указанных соединений характер изменения агрегации был сходным с тем, что наблюдали при действии озона и НПН. Происходило достоверное снижение АЭ на 15-37% ($p < 0,01$). Сравнительный анализ показал, что при добавлении в среду инкубации к озону донора NO, НПН снижению АЭ было достоверно большим ($p = 0,005$), чем при инкубации клеток с одним озоном.

При оценке микрореологических ответов на озон и его сочетание с донором H_2S NaHS направленность сдвигом ДЭ и АЭ были сходными с таковыми при использовании NO и L-аргинина. Однако комбинация озона с NaHS давала достоверно больший эффект, чем один озон. Прирост ДЭ был на 2% ($p = 0,001$), а снижение АЭ на 11% ($p = 0,014$) было заметнее, чем отдельное действие озона. Следовательно, можно заключить, что добавление в среду инкубации, содержащей озон (6,0 мг/л) доноров газотрансмиттеров достоверно повышает микрореологический ответ эритроцитов.

3. Участие газотрансмиттеров в модификации механизмов транспорта кислорода крови под действием озона

Таблица 1

Влияние озона на кислородтранспортную функцию крови при добавлении доноров газотрансмиттеров в гипокапнических условиях (Me [25; 75])

Показатель	Контроль	Озон	Нитроглицерин + озон	NaHS+ озон
SO ₂ , %	30,15 [23,10; 32,10]	33,65 [31,0; 37,8]*#	62,00 [60,2; 66,7]*#Ψ\$	55,15 [47,1; 58,4]*#ΨΩ
pO ₂ , мм рт. ст.	20,35 [19,00;22,50]	24,25 [21,8; 25,6]*#	37,7 [34,2; 39,2]*#Ψ\$	337,5 [30,6; 34,7]*#ΨΩ
pH, ед.	7,411 [7,372; 7,431]	7,431 [7,417; 7,440]*	7,421 [7,376; 7,46]	7,431 [7,341; 7,492]
TCO ₂ , ммоль/л	21,45 [20,90; 24,00]	20,95 [20,7; 24,9]#	25,7 [25,2; 26,8]*Ψ\$	25,05 [24,6; 25,7]*Ψ\$
p50реал, мм рт. ст.	27,16 [26,26; 27,66]	30,84 [27,96; 37,21]*#	39,10 [38,08; 48,92]*#Ψ\$	38,92 [30,56;48,19]*#Ψ
p50станд, мм рт. ст.	26,75 [26,60; 27,00]	31,95 [27; 36,8]*#	38,15 [37,7; 39,5]*#Ψ\$	36,95 [36,3; 42,4]*#Ψ

Примечание: достоверные изменения в сравнении с группами: контрольной (*), гипокапния (#), озон (Ψ), гипокапния + озон (\$), гипокапния + нитроглицерин + озон (Ω); pO₂ – парциальное давление кислорода; SO₂ – степень оксигенации; TCO₂ – общая углекислота плазмы крови; p50реал – pO₂ крови при 50% насыщении ее кислородом; p50станд – pO₂ крови при 50% стандартном насыщении ее кислородом.

В *in vitro* опытах исследовали характер изменения показателей кислородтранспортной функции (КТФ) крови под влиянием озона и газотрансмиттеров. На пробах крови была реализована модель гипокапнии и на ее основе изучали механизмы изменений КТФ крови у экспериментальных животных. Действие озона приводит к росту основных показателей, отражающих транспорт кислорода кровью.

Предварительная гипокапния способствует усилению эффекта озона. На это указывал прирост pO_2 – на 32% ($p<0,05$) и SO_2 – на 68% ($p<0,05$) в сравнении с группой, в которой выполнялось только озонирование (без гипокапнии). Выявлен сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. На это указывало увеличение $p50$ реал на 23% (табл. 1, $p<0,05$). Добавление нитроглицерина привело к усилению эффекта озона, что сочеталось с приростом pO_2 на 18 % ($p<0,05$) и SO_2 на 10% (табл. 1, $p<0,05$). Было установлено, что NaHS подобным эффектом не обладает. При гипокапнии наблюдается снижение КТФ крови в сравнении с контролем (табл. 1).

Содержание ГТ: NO и H_2S в плазме крови, под действием озона возрастала в сравнении с контрольной группой (табл. 2). В условиях гипокапнии данные параметры не изменяются в сравнении с пробами, в которых содержался только озон. Добавление нитроглицерина сопровождалось увеличением содержания NO_x на 94% ($p<0,05$), а NaHS повысил содержание этих продуктов метаболизма NO в крови на 57% ($p<0,05$). Концентрация H_2S в плазме возрастала на 82% ($p<0,05$) и на 127% ($p<0,05$), соответственно, в сравнении с данными группы «озонирование+гипокапния».

Таблица 2

Влияние озона на концентрацию нитрат/нитритов и сероводорода в плазме крови при добавлении доноров газотрансмиттеров в гипокапнических условиях (Ме [25; 75])

Показатель	Контроль	Гипокапния	Озон	Гипокапния + озон	Гипокапния + нитроглицерин + озон	Гипокапния + NaHS + озон
NO_3^-/NO_2^- , мкмоль/ л	15,42 [14,12; 18,82]	22,21 [15,59; 28,82]*	27,50 [25,0; 28,53]*	26,21 [22,94; 29,12]*	50,8 [44,29; 54,41]*# Ψ\$	41,18 [40,47; 50,29]*#Ψ \$
H_2S , мкмоль/ л	7,66 [7,13; 10,52]	10,86 [7,89; 20,40]	13,16 [11,18; 15,79]*	14,21 [11,84; 19,21]*	25,88 [23,82; 26,58]*# Ψ\$	32,31 [31,53; 33,21]*#Ψ \$Ω

Примечание: достоверные изменения в сравнении с группами: контрольной (*), гипокапния (#), озон (Ψ), гипокапния + озон (\$), гипокапния + нитроглицерин + озон (Ω); NO_x (NO_3^-/NO_2^-) –

содержание суммарных нитратов/нитритов в сыворотке крови; H_2S – концентрация сероводорода в сыворотке крови.

Обсуждение

Инкубация эритроцитов с озоном сопровождалась достоверным приростом ДЭ и выраженным уменьшением АЭ. Ранее указывалось на то, что озон нормализует реологические свойства крови, [4]. Озон может стимулировать синтез гемоксигеназы-1 (ГО-1) и NO клетками сосудистого эндотелия [7]. Кроме того, озонированная плазма способна повышать экспрессию ГО-1 в эндотелиальных клетках. В свою очередь гемоксигеназа-1 стимулирует образование газотрансмиттера – монооксида углерода (CO) [8]. Эта сигнальная молекула также как и два других ГТ достоверно и положительно влияют на микрореологические характеристики эритроцитов и их транспортный потенциал [9]. Было показано, что применение доноров газотрансмиттеров (НПН и $NaHS$) в сочетании с озоном увеличивало микрореологические эффекты указанных соединений. Это может быть связано с тем, что озон стимулирует эндогенный синтез как NO, так и H_2S [5]. Что касается влияния озона и его сочетания с донорами ГТ на кислородтранспортную функцию крови, то в наших опытах было показано увеличение эффекта озона на КТФ крови. Было обнаружено, что при проведении предварительной обработки крови гипокапнической газовой смесью прирост КТФ, при добавлении доноров газотрансмиттеров, был более выраженным. При этом можно было предположить по характеру изменения рН и pCO_2 , что вследствие эффекта Бора произойдет сдвиг КДО влево, однако, полученные нами результаты свидетельствуют об обратном. Снижение концентрации ионов водорода и парциального давления углекислого газа существенно уменьшает аффинность крови к кислороду, что затрудняет поступление кислорода в ткани на уровне капилляров большого круга кровообращения, и, наоборот, при увеличении этих параметров (эффект Бора). Как известно, действие озона приводит к увеличению уровня 2,3-дифосфоглицерата способствующего повышению СГК и это способствует ослаблению эффекта Бора [10]. Озон также способствует увеличению уровня монооксида азота, активируя механизмы его образования в эритроците. Сероводород и монооксид азота влияют на синтез друг друга, а также могут напрямую взаимодействовать с образованием новых соединений ($HSNO$, $RSNOs$ и др.), которые, в свою очередь, модулируют их биологические эффекты и биодоступность [11]. В

ответ на действие озона в эритроцитах происходит изменение образования газотрансмиттеров NO и сероводорода, которое влияет непосредственно на модификацию свойств гемоглобина, так и опосредованно через гемоглобиннезависимые механизмы изменение структурной организации эритроцитарной мембраны, все это сочетается с повышением деформируемости эритроцитов и их транспортного потенциала.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках международного научного проекта Российского фонда фундаментальных исследований «БРФФИ–РФФИ-2020» (№ 20-515-00019- РФФИ) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и (№ M20P-428 – БРФФИ)

Библиографический список

1. Propel A.S., Johnson P.C. Microcirculation and Hemorheology. *Annul. Rev. Fluid. Mech.* 2005; 37: 43–69. DOI: 10.1146/annurev.fluid.37.042604.133933.
2. Bor-Kucukatay M., Meiselman H.J., Başkurt O.K. Modulation of density-fractionated RBC deformability by nitric oxide. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005; 33(4): 363-367.
3. Olas B. Gasomediators (NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis. *Clin. Chim. Acta.* 2015; 445: 115–121. DOI: 10.1016/J.CCA.2015.03.027.
4. Катюхин Л.Н. Влияние курсового лечения инъекциями озонированного физиологического раствора на реологические свойства эритроцитов у больных с комплексной патологией. *Физиология человека.* 2016;100(6):100–105.
5. Зинчук, В.В., Билецкая Е.С. Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах воздействия в опытах *in vitro*. *Биофизика.* 2020; 65(5): 15-919. DOI 10.31857/S0006302920050099.
6. Muravyov A.V., Antonova N., Tikhomirova I.A. Red blood cell micromechanical responses to hydrogen sulfide and nitric oxide donors: Analysis of crosstalk of two gasotransmitters (H₂S and NO) // *Series on Biomechanics.* - 2019. - Vol. 33. - 34-40.
7. Pecorelli A., Bocci V., Acquaviva A., Belmonte G., Gardi C., Virgili F., Ciccoli L., Valacchi G. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2013; 267(1): 30-40. DOI: 10.1016/j.taap.2012.12.001.

8. Bocci V., Aldinucci C., Mosci F., Carraro F., Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators of Inflammation*. 2007, Article ID 26785, 6. DOI:10.1155/2007/26785.
9. Muravyev A.V., Tikhomirova I.A., Bulaeva S.V., Petrochenko E.P., Malysheva Yu.V. Effect of carbon monoxide gasotransmitter on microrheology and elasticity of erythrocyte membranes. *Biological Membranes: Journal of Membrane and Cell Biology*. 2021; 38 (4): 217-224. DOI: DOI: 10.31857 / S0233475521030063. 6.
10. Clavo B., Santana-Rodríguez N., Llontop P., Gutiérrez D., Suárez G., López L., Rovira G., Martínez-Sánchez G., González E., Jorge I.J., Perera C., Blanco J., Rodríguez-Esparragón F. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? *Evid base Compl Alternative Med*. 2018: 1-11. DOI.org/10.1155/2018/7931849.
11. Lo Faro M.L., Fox B., Whatmore J.L., Winyard P.G., Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*. 2014;41:38-47. DOI: 10.1016/j.niox.2014.05.014.

УДК 616.13/.14-018.74:[613.268:665.353.4]-053.81

Л.В. Кежун, Л.В. Якубова, Ю.И. Белоус

**НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ У МОЛОДЫХ
ЗДОРОВЫХ ЛИЦ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМ
ПОТРЕБЛЕНИИ ПАЛЬМОВОГО МАСЛА**

Аннотация. Обследовано 137 здоровых добровольцев, средний возраст 20 (20;21) лет, из них 33,6% (n=46) юношей и 66,4% (n=91) девушек. Сравнительный анализ показал, что потребление 25 граммов пальмового масла в суточном рационе питания в течении 12 недель приводит к нарушению функции эндотелия у молодых здоровых добровольцев.

Ключевые слова: пальмовое масло, функция эндотелия, молодые здоровые добровольцы