

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ОЗОНА НА КРОВЬ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАРЦИАЛЬНЫХ ДАВЛЕНИЯХ КИСЛОРОДА И УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

Билецкая Е.С., Зинчук В.В., Володина А.А.

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
г.Гродно, Республика Беларусь*

Озон (O_3) обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими, антибактериальными эффектами и в терапевтических концентрациях не оказывает побочного действия. Его мультимодальные свойства оказывают положительное системное воздействие на функционирование ключевых гомеостатических систем многократно подтвержденные клиническими и экспериментальными наблюдениями [9]. В основе патофизиологических механизмов действия озона на молекулярном уровне лежит его высокая биохимическая активность к соединениям, содержащим двойную $C=C$ связь [10]. В первую очередь к таким соединениям относятся жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов клеточных мембран. В результате ряда биохимических реакций образуются промежуточные перекисные соединения так называемые «озониды» — соединений озона с органическими соединениями, которые содержат «двойные связи» (рисунок) [2]. Основная масса двойных связей находится в ненасыщенных жирных кислотах, что позволяет считать органическим озонидом перекись ненасыщенных жирных кислот, которая владеет неспецифическим бактерио-, фунги-, вирусцидным действием и оказывает систематический метаболический эффект на все ткани и клетки организма. Именно эти соединения, по мнению ряда авторов, определяют большинство биологических эффектов озона [4]. Однако влияние данного газа на кислородтранспортную функцию крови при различных парциальных давлениях кислорода и углекислого газа является недостаточно изученным и является предметом исследования данного обзора.

В наших исследованиях установлено, что оксигенация усиливает влияние озона на кислородтранспортную функцию (КТФ) крови [1]. Гидросульфид натрия и нитроглицерин увеличивают данный эффект, особенно последний. Гипероксия в условиях действия озона приводит к росту содержания NO_3^-/NO_2^- и H_2S , а добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия увеличивают эти показатели. Предварительная оксигенация существенно не меняет состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса, а добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в данных условиях способствует увеличению диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, активности каталазы. В этих опытах отмечается участие газотранзиттеров в изменениях КТФ крови при воздействии озоном в условиях оксигенации (рост pO_2 , SO_2 , $p50_{реал}$). Эритроциты за счёт экспрессии каталитически активной синтазы монооксида азота (NOS3 типа 1), которая идентична экспрессируемой в эндотелии, индуцируют синтез NO. Эта субстанция является мощным митохондриальным регулятором, снижая сродство к кислороду цитохром-с-оксидазы, терминального акцептора электронов митохондриальной цепи транспорта электронов [17]. Как видим из проведённых нами исследований, нитроглицерин и гидросульфид натрия

приводят к увеличению содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и H_2S . Эритроциты участвуют в поддержании кислородзависимого баланса между образованием и окислением H_2S за счёт своей способности генерировать данный газотрансмиттер.



Рисунок - Морфометаболические эффекты озона в кровеносном русле [2]

Озон может оказывать, как про-, так и антиоксидантный эффект в зависимости от используемых концентраций. Так, в образцах крови, подвергнутых воздействию O_3 в дозе 160 мг/мл, наблюдается рост МДА [15], а у пациентов с бессонницей и ишемической болезнью сердца озонотерапия способствует росту каталазы [7]. В наших опытах в условиях оксигенации при воздействии озона и добавлении нитроглицерина наблюдается рост МДА и ДК, а гидросульфид натрия подобного эффекта не оказывает [1]. Изоформы NO рассматривают как динамические датчики клеточного окислительного стресса и регуляторы редокс-гомеостаза. Механизм положительного влияния озонотерапии проявляется в повышении активности антиоксидантных ферментов сыворотки крови. В нашем эксперименте добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в условиях оксигенации приводит к росту активности каталазы.

Согласно полученным нами данным выявлено, что предварительная дезоксигенация ослабляет влияние озона на кислородтранспортную функцию крови [6]. Нитроглицерин препятствует проявлению данного эффекта. Действие озона в гипоксических условиях приводит к росту содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и H_2S , а добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия увеличивают эти показатели. Дезоксигенация под влиянием озона приводит к уменьшению показателей перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты), а также снижению ретинола и α -токоферола, в том числе, в группе с нитроглицерином.

При гипоксии наблюдается ухудшение процессов тканевого трансапиллярного обмена кислорода, снижение возможностей микроциркуляторного русла для доставки кислорода в ткани. Выявлены функциональные взаимосвязи различных компонентов регуляции

микродинамики и показателей КТФ крови при проведении гипоксического теста. Озон значительно улучшает микроциркуляцию за счет повышения функциональной активности капилляров, изменения физико-химических характеристик крови и, в частности, кислородсвязывающих свойств крови [14]. Как видим, из проведенных нами опытов [6], отмечаются изменения КТФ крови под влиянием озона в гипоксических условиях и при добавлении доноров газотрансмиттеров. Инкубация крови с озоном и нитроглицерином (донором NO) приводит к усилению эффекта данного газа на КТФ крови (рост pO_2 , SO_2), что приводит к уменьшению СГК и сопровождается ростом газотрансмиттеров (NO, H_2S). Данный факт свидетельствует о важной роли NO в автономной внутриэритроцитарной системе регуляции СГК, действие которого определяется параметрами кислородного обеспечения. Кроме того, следует обратить внимание, что противогипоксическое действие O_3 реализуется, в том числе, за счет влияния на синтез монооксида азота, увеличения концентрации 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах, повышения пластичности мембран красных кровяных клеток и уменьшения вязкости крови [12].

NO обеспечивает адаптацию организма к изменениям pO_2 через влияние на механизмы формирования функционального статуса эритроцитов. Кроме того, данный газотрансмиттер является основным регулятором тонуса сосудов и ангиопротектором, что обуславливает его влияние на локальную микроциркуляцию. Описаны сложные взаимоотношения между O_3 и группой ферментов NO-синтаз, генерирующих образование NO [12]. O_3 может активировать индуцибельную синтазу оксида азота, что приводит к росту концентрации последнего, а также восстанавливает NO_2^- при низких значениях pH. В этих механизмах участвует и другой газотрансмиттер сероводород. Эритроциты продуцируют эндогенный H_2S , используя в качестве субстрата 3-меркаптопирuvat.

Продукция H_2S в красных клетках крови зависит от уровня NO в сыворотке крови. Взаимодействие доноров монооксида азота и сероводорода может иметь значение для модификации сродства гемоглобина к кислороду через образование различных дериватов гемоглобина. В наших исследованиях показана роль H_2S в эффекте озона на кислородзависимые процессы. H_2S участвует в защите от окислительного стресса, вызванного гипоксией. Наблюдается увеличение данного газотрансмиттера в условиях дезоксигенации, а добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия способствует еще более значительному его росту. В результате действия S-нитрозосоединений происходит трансформация молекул гемоглобина: окисление в их составе железа, нитрозилирование гема и, вероятно, SH-групп, что изменяет свойства гемопротейна, его способность связывать и удерживать кислород. H_2S выполняет и антиоксидантные функции за счет модификаций активности ферментов, в том числе каталазы.

Как видим, предварительная обработка крови дезоксигенирующей газовой смесью уменьшает влияние озона на КТФ крови, что проявляется в снижении pO_2 , SO_2 , $p50$ по сравнению с группой, в которую вводили только озон [6]. Введение нитроглицерина препятствует проявлению данного эффекта,

а гидросульфид натрия подобного действия не оказывает. Действие озона в данных условиях приводит к росту содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и H_2S , а добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия существенно увеличивает эти показатели, что отражает участие данных газотрансмиттеров в модификации КТФ крови. В крови, обработанной дезоксигенирующей газовой смесью при добавлении озона, а также в группе с нитроглицерином наблюдается уменьшение показателей перекисного окисления липидов (МДА, ДК) и антиоксидантной защиты (ретинола и α -токоферола) [6]. Полученные результаты демонстрируют влияние озона на КТФ крови и синтез NO , что будет важно для понимания механизмов оксигенации тканей на микроциркуляторном уровне в гипоксических условиях.

В следующей части нашего исследования в условиях предварительной обработки гипокапнической газовой смесью эффект озона на КТФ крови существенно увеличивается, что проявляется в росте следующих показателей: pO_2 , SO_2 , $\text{p50}_{\text{реал}}$, $\text{p50}_{\text{станд}}$ и сдвигом КДО вправо [3]. Добавление нитроглицерина в этих условиях приводит к ещё более выраженному усилению эффекта озона на КТФ крови, сопровождающееся ростом содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и H_2S . Гидросульфид натрия подобного действия на кислородсвязывающие свойства крови не оказывает, несмотря на увеличение концентраций $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и H_2S . Предварительная гипокапния с озоном, как и добавление нитроглицерина либо гидросульфида натрия существенно не влияют на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса исследуемой крови. В наших опытах наблюдается увеличение эффекта озона на КТФ крови при проведении предварительной её обработки гипокапнической газовой смесью, особенно выражено при добавлении доноров газотрансмиттеров. Можно было предположить по характеру изменения pH 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 афинность крови к кислороду, что затрудняет поступление кислорода в ткани на уровне капилляров большого круга кровообращения, и наоборот при увеличении этих параметров (эффект Бора). Вероятно, это связано с действием других факторов внутриэритроцитарной системы регуляции кислородсвязывающих свойств крови, которая представляет собой аллостерическое взаимодействие между гемоглобином и различными физиологическими модуляторами (H^+ , 2,3-дифосфоглицерата, CO_2 и др.). Как известно, действие озона приводит к увеличению уровня 2,3-дифосфоглицерата способствующего повышению СГК [12], что способствует ослаблению эффекта Бора. В ряде работ было показано, что гипокапния содействует увеличению концентрации 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах. Кроме того, известно, что гипокапнические условия усиливают генерацию синтеза озона, эффекты которого, в свою очередь, проявляются дозозависимо. Следует отметить, как было показано в наших опытах способность пероксинитрита в гипокапнической среде увеличивать значения показателей СГК $\text{p50}_{\text{реал}}$ и $\text{p50}_{\text{станд}}$ в сравнении с контрольной группой, что

свидетельствует о существенном вкладе газотрансмиттера монооксида азота в регуляцию транспорта кислорода кровью. Вероятно, перечисленные факты приводят к усилению эффекта O_3 в заданных условиях.

Газотрансмиттеры NO и H_2S участвуют в реализации эффектов озона на кислородзависимые процессы в связи, с чем была проведена серия экспериментов с их участием в гипокапнических условиях. Как видим, из проведённых нами исследований, нитроглицерин и гидросульфид натрия при обработке гипокапнической газовой смесью и добавлении озона приводят к увеличению содержания NO_3^-/NO_2^- и H_2S . Биоактивность NO сохраняется в эритроцитах благодаря его взаимодействию с цистиолами в гемоглобине с образованием S-нитрозотиола, S-нитрозогемоглобина [20], высвобождение которых происходит при уменьшении СГК. В гипокапнических условиях добавление O_3 , вероятно, приводит к увеличению содержания производных NO , а добавление нитроглицерина (донора NO) усиливает данный эффект. Озон также способствует увеличению уровня монооксида азота, активируя механизмы его образования в эритроците [16]. 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. 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 гемоглобин-независимые механизмы изменение структурной организации эритроцитарной мембраны. Как видим, в этот процесс может вовлекаться и молекулы углекислого газа, а именно снижение парциального давления этого газа. Как видим, гипокапния и газотрансмиттеры монооксид азота и сероводород существенно не влияют на основные показатели прооксидантно-антиоксидантного равновесия крови в условиях действия озона. Таким образом, анализ собственных результатов исследований указывает на то, что гипокапния усиливает эффект озона за счёт механизмов автономной регуляции свойств крови и системы газотрансмиттеров.

В наших исследованиях установлено, что гиперкапния усиливает эффект озона на кислородтранспортную функцию крови и характеризуется сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, а также увеличивает синтез сероводорода при отсутствии изменений концентрации нитратов/нитритов [5]. Нитроглицерин и гидросульфид натрия в этих условиях не изменяют параметры газотранспортной функции крови, однако, повышают уровень нитрат/нитритов и сероводорода. Предварительная гиперкапния не устраняет активирующего воздействия озона на процессы свободнорадикального окисления, а введение используемых доноров газотрансмиттеров не вносит вклад в регуляцию исследуемых показателей. Результаты нашего эксперимента показывают, что эффект озона на КТФ крови при проведении предварительной обработки гиперкапнической газовой смесью увеличивается. Гиперкапния влияет на систему крови, в частности, увеличивает средний объём эритроцитов [13]. Кроме того, молекула CO_2 связывается с дезоксигемоглобином

(присоединяется к гистидину по 146 позиции бета-цепи, которая образует неполярную связь с концевыми NH_2 -группами α -цепи), что приводит к стабилизации Т-структуры гемоглобина (эффект Бора). Повышение концентрации ионов водорода и напряжения углекислого газа существенно снижает аффинность крови к кислороду, что изменяет поступление его в ткани на уровне капилляров большого круга кровообращения. В проведенных нами исследованиях снижение рН и рост pCO_2 , возникающие через реализацию механизмов эффекта Бора, приводят к усилению влияния озона на показатели КТФ крови, проявляющемуся в более выраженном сдвиге КДО вправо.

Механизмы внутриэритроцитарной регуляции SGK реализуются на различных уровнях: изменение структурной организации эритроцитов, моделирующее действие аллостерических эффекторов на молекулу гемоглобина. В ответ на действие озона в эритроцитах происходит изменение образования газотрансмиттеров NO и H_2S , которое влияет непосредственно, как на модификацию свойств гемоглобина, так и опосредованно – через гемоглобин-независимые механизмы – на изменение структурной организации эритроцитарной мембраны. Как видим, в этот процесс вовлекается и молекула углекислого газа, а именно, при повышении его напряжения. Газотрансмиттеры (NO и H_2S) в ряде случаев могут обладать синергичным действием, но в опытах при гиперкапнии этого не наблюдалось – отмечался рост содержания сероводорода при отсутствии изменения активности L-аргинин- NO системы, не ведущей к увеличению концентрации NO . В наших исследованиях показано, что предварительная гиперкапния с добавлением озона приводит к росту уровня сероводорода, что может быть связано с повышением продукции 3-меркаптопируват-сульфуртрансферазы в этих условиях, которая способствует синтезу H_2S в эритроцитах. Однако, в данной группе не отмечается изменений содержания NO_x , что, возможно, связано с участием эритроцитарной карбоангидразы в регулировании распределения NO_x между плазмой и эритроцитами в этих условиях [19]. При добавлении нитроглицерина и гидросульфида натрия наблюдается рост NO и H_2S , что обусловлено их взаимно сопряженным влиянием на синтез друг друга.

Значимый рост МДА, ДК, отмечаемый в исследуемых группах, к которым добавлялся O_3 , свидетельствует об активации процессов свободнорадикального окисления, что отражает определённый риск при применении озона в качестве терапевтического средства. Следовательно, гиперкапния не устраняет активирующее действие данного газа на процессы пероксидации липидов, а нитроглицерин и гидросульфид натрия, более того, усугубляют его. Напряжение механизмов антиоксидантной защиты, судя по повышению концентрации ретинола и α -токоферола, очевидно, связано с их высвобождением из эритроцитарной мембраны и является следствием окислительного повреждения, вызванного озоном. В то же время, отмечается рост активности каталазы в гемолизатах при добавлении O_3 . Данный газ, являясь донором кислорода, влияет на ферментативный компонент антиоксидантной системы эритроцитов, обеспечивающей защиту от активных

форм кислорода [1], при нейтрализации которых образуется пероксид водорода, что и приводит к возрастанию активности каталазы [8].

Гиперкапния снижает сродство гемоглобина к кислороду, меняя в целом и кислородсвязывающие свойства крови. Обработка крови гиперкапнической газовой смесью не предотвращает эффект озона по увеличению активности процессов ПОЛ и напряжение системы антиоксидантной защиты. Доноры газотрансмиттеров (нитроглицерин и гидросульфид натрия) в заданных условиях не вносят вклад в регуляцию исследуемых показателей, характеризующих процессы свободнорадикального окисления липидов.

Таким образом, результаты выполненного исследования раскрывают новые аспекты действия озона на систему крови при различных парциальных давлениях углекислого газа и кислорода, которые реализуются через влияние на КТФ крови, процессы ПОЛ, а также за счёт воздействия на систему газотрансмиттеров (монооксида азота, сероводорода).

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований Республики Беларусь № договора 30-24/549-21.

ЛИТЕРАТУРА

1. Билецкая, Е.С. Вклад газотрансмиттеров (NO, H₂S) в эффект озона на кислородзависимые процессы крови в условиях оксигенации / Е.С. Билецкая, В.В. Зинчук, А.В. Муравьев, И.Э. Гуляй, К.М. Дорохин // Новости медико-биологических наук. - 2021.- Т.21 (2).- С.18-24.

2. Бояринов, Г.А. Озонированное искусственное кровообращение (экспериментальное обоснование и результаты клинического применения) / Г.А.Бояринов, В.В. Соколов – Н. Новгород: изд-во «Покровка», –1999. – 318 с.

3. Влияние газотрансмиттеров и озона на микрореологию эритроцитов и кислородтранспортную функцию крови / В. В. Зинчук, А. В. Муравьев, Е. С. Билецкая [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2022. – № 2. – С. 73-83. – doi: 10.25555/THR.2022.2.1022.

4. Гаврилов, В. В. Эффективность озонотерапии в сравнении с антибактериальными дисками "Моксифлоксацин" в эксперименте in vitro / В. В. Гаврилов, И. О. Гаврилюк // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2022. – Т. 41, № S2. – С. 98-103.

5. Зинчук, В. В. Особенности действия озона на кислородзависимые процессы крови в условиях гиперкапнии / В. В. Зинчук, Е. С. Билецкая, И.Э. Гуляй // Биомедицинская химия. – 2022. – № 3. – С. 212-217.

6. Зинчук, В.В. Особенности влияния озона на кислородзависимые процессы крови при гипоксических условиях / В.В. Зинчук, Е.С. Билецкая // Регионарное кровообращение и микроциркуляция.- 2021.- Т.20 (3).- С.70-76.

7. Низкодозовая озонотерапия улучшает качество сна у пациентов с бессонницей и ИБС путём повышения уровней BDNF и ГАМК в сыворотке крови/ Li Y. [et al.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т.170, №10. – С. 508–514.

8. Орлов, Ю. П. Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов в развитии органических дисфункций при критических состояниях / Орлов Ю.П. // *Общая реаниматология.* – 2008. – Т.4, №2. – С 88-93. – doi: 10.15360/1813-9779-2008-2-88.
9. Ковалев, М. А. Клинико-иммунологическая эффективность применения топической озонотерапии после хирургического лечения экссудативных поражений пространства Рейнке / М.А. Ковалев, Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка, Ю.А. Первухина // *Южно-Уральский медицинский журнал.* – 2023. – №1. – С.18-26.
10. Змызгова, А. В. Клинические аспекты озонотерапии / А. В. Змызгова, В.А. Максимов - М.: НПЦ озонотерапии. - 2003. - С. 287.
11. Investigation of the effects of major ozone autohemotherapy application on erythrocyte deformability and aggregation / Akbudak I.H. [et al.] // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2019. – Vol. 71, №3. – P. 365-372. – doi:10.3233/CH-180417
12. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? / Clavo B. [et al.] // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2018. – Vol. 2018. – P.7931849. – doi:10.1155/2018/7931849.
13. The effects of hypercapnia on cortical capillary transit time heterogeneity (CTH) in anesthetized mice / Gutiérrez-Jiménez E. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* – 2018. – Vol. 38, №2. – P. 290-303. – doi:10.1177/0271678X17692598
14. Effects of ozone autohemotherapy on blood VEGF, TGF- β and PDGF levels after finger replantation. / He S. [et al.] // *Ann Palliat Med.* – 2020. – Vol. 9, № 5. – P.3332-3339. – doi: 10.21037/apm-20-1467.
15. Melatonin alleviates oxidative stress in sleep deprived mice: Involvement of small intestinal mucosa injury / Gao T. [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2020. – doi:10.1016/j.intimp.2019.106041.
16. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility / Smith N.L [et al.] // *Med Gas Res.* – 2017. – Vol. 7, №3. – P. 212-219. – doi:10.4103/2045-9912.215752.
17. Strahl, J. Nitric oxide mediates metabolic functions in the bivalve *Arctica islandica* under hypoxia / J. Strahl, D. Abele // *PLoS One.* – 2020. – Vol.15, №5. – P. 1-19. – doi: 10.1371/journal.pone.0232360.
18. The effects of systemic ozone application and hyperbaric oxygen therapy on knee osteoarthritis: an experimental study in rats / Yilmaz O. [et al.] // *Int. Orthop.* – 2021. – Vol.45, №2. – P. 489-496.
19. Even and carbon dioxide independent distribution of nitrite between plasma and erythrocytes of healthy humans at rest / Tsikas D. [et al.] // *Nitric Oxide.* – 2013. – Vol. 31. – P. 31-37. – doi:10.1016/j.niox.2013.03.002
20. Hemoglobin betacy93 is essential for cardiovascular function and integrated response to hypoxia / Zhang R. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – Vol. 112. – P. 6425–6430.