

## ЭФФЕКТ ОЗОНА НА КИСЛОРОДТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ВОЗДЕЙСТВИЯ В ОПЫТАХ *in vitro*

© 2020 г. В.В. Зинчук, Е.С. Билецкая

Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Гродно, ул. М. Горького, 80, Беларусь

E-mail: zinchuk@grsmu.by

Поступила в редакцию 02.04.2018 г.

После доработки 30.10.2019 г.

Принята к публикации 16.06.2020 г.

Изучен эффект озона на кислородтранспортную функцию крови экспериментальных животных в опытах *in vitro*. Инкубация крови с озонированным физиологическим раствором (концентрация  $O_3$  – 2, 6, 10 мг/л) в течение 30 и 60 мин обуславливает изменение кислородтранспортной функции крови, проявляющееся в увеличении напряжения кислорода, степени оксигенации и уменьшении сродства гемоглобина к кислороду. Действие данного фактора увеличивает содержание таких газотрансмиттеров, как монооксид азота и сероводород, что имеет значение для модификации кислородсвязывающих свойств крови.

*Ключевые слова:* озон, кровь, кислород, газотрансмиттеры.

DOI: 10.31857/S0006302920050099

Фармакологическая терапия в ряде случаев имеет негативные последствия, что определяет интерес к альтернативным немедикаментозным методам лечения, в частности к озонотерапии, нашедшей в последние годы широкое применение в клинической практике [1]. Озон ( $O_3$ ) обладает большим разнообразием физиологических эффектов, в том числе влияет на систему крови. Воздействие озон-кислородной смесью с концентрацией озона 10–100 мкг/л на кровь собак обуславливало выраженное увеличение уровня напряжения кислорода [2]. Установлено, что инкубация озона в интервале доз 1–3 мг/л с эритроцитарной массой приводит к увеличению содержания АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), в то время как высокие концентрации озона (5–11 мг/л) не вызывают подобного эффекта [3]. При введении крысам после кровопотери отмытых эритроцитов (0.5 мл) и озонированного физиологического раствора (2 мл с концентрацией озона 2 мг/л) происходит увеличение электрофоретической подвижности красных клеток крови, улучшаются реологическое состояние крови и микроциркуляция, что позволяет оптимизировать процесс транспорта кислорода в ткани [4]. Однако эффект озона непосредственно на кислородсвязывающие свойства крови недостаточно изучен.

Целью данного исследования являлось изучение эффекта озона на кислородтранспортную функцию

крови экспериментальных животных в опытах *in vitro* при различных режимах воздействия.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты выполняли на двадцати белых крысах-самцах массой 250–300 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Под адекватным наркозом (50 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) проводили забор смешанной венозной крови из правого предсердия в объеме 8 мл в предварительно подготовленный шприц с гепарином из расчета 50 ЕД на 1 мл крови.

Объектом исследования явилась кровь, которая была разделена на четыре экспериментальные группы по 10 проб в каждой. Во всех группах к 3 мл крови добавляли 1 мл изотонического (0.9%) раствора хлорида натрия: в первую (контрольную) группу вводили 0.9%-й раствор NaCl без озонирования, в кровь остальных групп – озонированный NaCl с  $O_3$  в концентрации 2 мг/л (вторая группа), 6 мг/л (третья группа) и 10 мг/л (четвертая группа), после чего пробы перемешивали. Время инкубации составило 30 и 60 мин. Физиологический раствор барботировали озон-кислородной смесью при помощи озонотерапевтической установки УОТА-60-01 (ООО «Медозон», Россия), в которой предусмотрено измерение концентрации озона оптическим методом в ультрафиолетовом диапазоне. Его содержание в изотоническом растворе хлорида натрия через 30 мин составляло 0.86, 2.78, 5.26 мг/л при исходной концентрации 2, 6 и 10 мг/л соответственно; через 60 мин его концентрация равнялась нулю.

*Сокращения:* 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат, СГК – показатель сродства гемоглобина к кислороду.

Показатели кислородтранспортной функции крови, такие как напряжение кислорода ( $pO_2$ ) и степень оксигенации ( $SO_2$ ), и кислотно-основного состояния (напряжение углекислого газа ( $pCO_2$ ), стандартный бикарбонат ( $SBC$ ), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований ( $ABE/SBE$ ), гидрокарбонат ( $HCO_3^-$ ), концентрация водородных ионов ( $pH$ ), общая углекислота плазмы крови ( $TCO_2$ )) определяли при  $37^\circ C$  на газоанализаторе Stat Profile  $pNOx$  plus L (NOVA Biomedical Corporation, США). Средство гемоглобина к кислороду (СГК) оценивали спектрофотометрическим методом по показателю  $p50$  ( $pO_2$  крови при 50%-м насыщении ее кислородом). По формулам, приведенным в работе [5], рассчитывали значение  $p50_{станд}$  и положение кривой диссоциации оксигемоглобина.

Продукцию NO измеряли по содержанию нитрат/нитритов ( $NO_3^-/NO_2^-$ ) в плазме крови с помощью реактива Грисса на спектрофотометре PV1251C (ЗАО «СОЛАР», Беларусь) при длине волны 540 нм. Содержание сероводорода ( $H_2S$ ) определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и кислым раствором солянокислого N,N-диметил-парафенилендиамина в присутствии хлорно-железа при длине волны 670 нм [6].

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. С учетом этого были использованы методы непараметрической статистики 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 и множественных сравнений, оценивали с использованием  $U$ -критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й процентиля. При проведении множественных сравнений применяли поправку Бонферрони–Холма для определения критического уровня значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице представлены данные о характере изменения кислородтранспортной функции под воздействием озона. В опытных группах при каждом последующем увеличении концентрации данного фактора отмечается уменьшение  $pCO_2$  при экспозиции 30 и 60 мин. Так, в группе с концентрацией озона 2 мг/л наблюдается уменьшение данного показателя по сравнению с контролем при двух рассматриваемых экспозициях соответственно. В крови животных, которую подвергали воздействию озонированного 0.9%-го NaCl, наблюдается сдвиг реакции крови в щелочную сторону, что подтверждается ростом значения  $pH$  при экспозиции 30 и 60 мин в группе с ми-

нимальной концентрацией озона по сравнению с контролем. Также установлено значимое снижение значения концентрации  $HCO_3^-$  в группе с концентрацией озона 2 мг/л при экспозиции 30 и 60 мин. Подобная динамика изменений наблюдалась и по отношению к показателям  $TCO_2$ ,  $SBC$ . При этом значительно повышается уровень  $ABE/SBE$  по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о сдвиге кислотно-основного состояния в щелочную сторону, усиливаемом с увеличением концентраций озона, но с сохранением его в диапазоне нормальных значений.

При инкубации крови с озонированным физиологическим раствором с различной концентрацией озона отмечается выраженный рост напряжения кислорода. Так, в группе с концентрацией озона 2 мг/л этот параметр возрастает при экспозиции 30 и 60 мин. При наибольшей концентрации озона (10 мг/л) отмечается наибольший прирост  $pO_2$ . Подобная тенденция наблюдается и по отношению к степени насыщения крови кислородом, которая возрастает при экспозиции 30 и 60 мин в сравнении с контролем. Показатель значения СГК  $p50_{реал}$  при воздействии данным фактором возрастает (рис. 1а). При концентрации озона 2 мг/л отмечается его увеличение до 31.6 мм рт. ст. (28.6, 36.1;  $p = 0.049$ ) при экспозиции 30 мин и до 32.2 мм рт. ст. (28.5, 37.9;  $p = 0.043$ ) при экспозиции 60 мин в сравнении с контролем, что свидетельствует о сдвиге кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 2). Схожая динамика изменений была и по показателю  $p50_{станд}$  (рис. 1б). С увеличением концентрации озона отмечается уменьшение СГК и соответственно большая степень сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 2). Как видим, полученные данные свидетельствуют об увеличении таких показателей кислородтранспортной функции крови, как  $p50$ ,  $pO_2$ ,  $SO_2$ .

Суммарное содержание  $NO_3^-/NO_2^-$  в плазме крови (рис. 3) в группах с концентрацией озона 2, 6 и 10 мг/л увеличивается по сравнению с контролем. Уровень другого газотрансмиттера ( $H_2S$ ) также возрастает (рис. 4).

Использование озона демонстрирует широкую вариабельность эффектов его применения, что может быть обусловлено особенностью реализации этого воздействия, различием в дозах и условиях, в которых он вводится. Активация метаболизма организма наблюдается даже при введении очень низких доз озона, сопровождающемся повышением содержания в крови свободного и растворенного кислорода, интенсификацией активности ферментов, катализирующих аэробные процессы окисления углеводов, липидов и белков с образованием энергетического субстрата АТФ [7]. Озон обладает выраженным противогипоксическим эффектом, который объясняют улучше-

Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах экспозиции

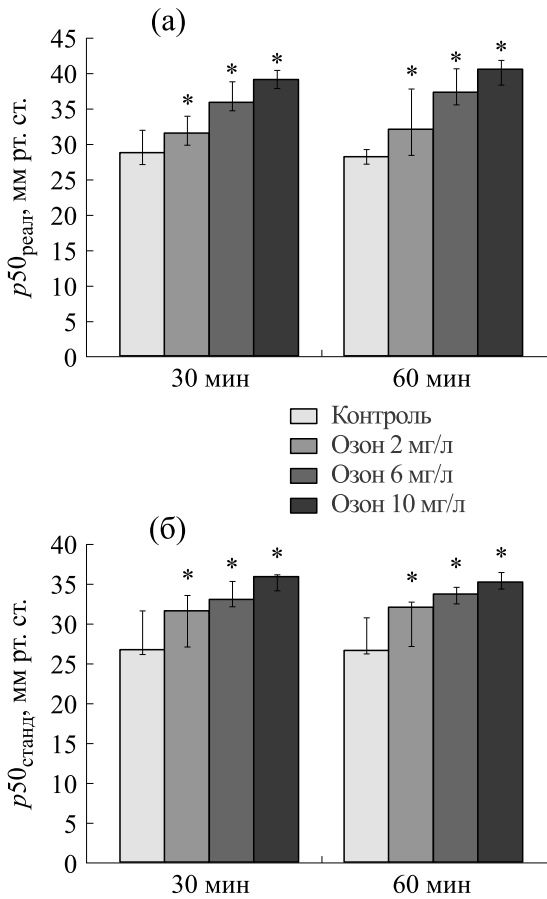
Показатель	Контроль	Концентрация озона		
		2 мг/л	6 мг/л	10 мг/л
n	10	10	10	10
Экспозиция 30 мин				
SO <sub>2</sub> , %	32.3 (30.8, 33.8)	34.1 (32.4, 35.2)*	37.6 (34.8, 38.6)*	39.2 (37.6, 40.7)*
pO <sub>2</sub> , мм рт.ст.	22.2 (19.6, 23.3)	24.7 (21.9, 28.7)*	27.5 (26.7, 31.4)*	31.4 (29.2, 33.4)*
pH, ед	7.351 (7.325, 7.372)	7.371 (7.362, 7.391)*	7.393 (7.381, 7.402)*	7.411 (7.390, 7.433)*
pCO <sub>2</sub> , мм рт.ст.	39.6 (38.4, 40.2)	37.1 (36.1, 39.4)*	35.4 (34.6, 36.7)*	33.7 (32.8, 35.7)*
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ммоль/л	21.6 (20.8, 23.5)	20.2 (18.9, 21.3)*	18.15 (18.1, 19.3)*	17.7 (17.4, 18.2)*
TCO <sub>2</sub> , ммоль/л	22.75 (21.7, 24.7)	21.4 (20.3, 22.4)*	20.25 (19.5, 20.6)*	19.25 (18.5, 19.7)*
ABE, ммоль/л	-4.05 (-4.7, -3.1)	-5.15 (-7.0, -4.2)*	-6.9 (-7.8, -6.6)*	-7.9 (-9.4, -7.1)*
SBE, ммоль/л	-2.7 (-2.9, -1.4)	-3.45 (-4.4, -2.3)*	-4.2 (-5.6, -3.8)*	-5.5 (-6.1, -5.1)*
SBC, ммоль/л	21.5 (20.7, 21.7)	20.5 (19.0, 21.1)*	19.0 (18.6, 19.4)*	18.2 (17.2, 18.7)*
Экспозиция 30 мин				
SO <sub>2</sub> , %	30.6 (28.9, 32.4)	32.7 (32.3, 33.9)*	35.8 (33.4, 37.9)*	38.7 (36.8, 40.8)*
pO <sub>2</sub> , мм рт.ст.	22.1 (19.0, 23.1)	24.7 (21.4, 28.5)*	28.2 (26.9, 30.6)*	30.9 (28.6, 32.9)*
pH, ед	7.332 (7.330, 7.361)	7.394 (7.382, 7.421)*	7.415 (7.401, 7.432)*	7.433 (7.422, 7.443)*
pCO <sub>2</sub> , мм рт.ст.	39.9 (37.3, 41.9)	33.9 (31.1, 39.2)*	30.1 (29.3, 33.6)*	27.5 (27.1, 30.1)*
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ммоль/л	21.5 (20.7, 23.4)	20.45 (19.7, 21.2)*	19.0 (18.5, 19.3)*	17.8 (17.4, 18.3)*
TCO <sub>2</sub> , ммоль/л	22.75 (22.6, 24.6)	21.3 (21, 22.7)*	20.1 (19.4, 20.3)*	18.9 (18.4, 19.3)*
ABE, ммоль/л	-3.95 (-4.4, -3.3)	-5.2 (-7.1, -3.8)*	-7.05 (-7.5, -6.5)*	-7.55 (-8.2, -7.4)*
SBE, ммоль/л	-2.85 (-3.1, -2.2)	-3.4 (-5.7, -2.8)*	-4.7 (-6.5, -4.3)*	-6.3 (-6.5, -5.8)*
SBC, ммоль/л	21.55 (21.3, 22.1)	20.7 (18.8, 21.3)*	19.0 (18.3, 19.6)*	18.0 (17.6, 18.5)*

Примечание. Данные представлены как *Me* (25, 75); \* – достоверные изменения в сравнении с контролем; величина *p* рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.

нием реологических свойств крови, повышенной отдачей оксигемоглобином кислорода тканям и увеличением скорости микроциркуляции [8]. Сеанс озонотерапии приводит к улучшению реологии крови у пациентов с комплексной патологией не только непосредственно после процедур, но и в течение двух месяцев после курса, что обусловлено снижением микровязкости мембран, минимальной прочности агрегатов и скорости спонтанной агрегации эритроцитов, возрастанием их деформируемости [9].

В организме СГК в значительной степени определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров в ткань [10]. Сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо направлен на компенсирование кислородной недостаточности, а в условиях окислительного стресса, когда нарушена утилизация кислорода тканями, может усиливаться активность процессов свободнорадикального окисления [11]. Имеются единичные работы о непосредственном эффекте озона на СГК. Так,

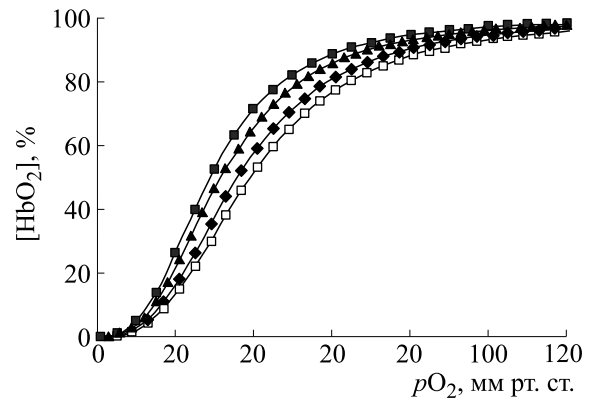
воздействие озоном (1 или 3%) на кровь не изменяло доставку кислорода, включая СГК и концентрацию 2,3-ДФГ в эритроцитах [12]. Однако при исследовании пациентов с периферической окклюзией артерий озонированная аутогемотрансфузия (реинфузия 100 мл аутологичной крови, предварительно подвергнутой воздействию O<sub>3</sub> в течение 10 мин) повышала значение *p*50<sub>станд</sub>, а уровень 2,3-ДФГ существенно не менялся [13]. Использование озона в опытах *in vitro* (в концентрации 6.5, 13, 26 и 78 мкг/л) с кровью, взятой от пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов (стадия II–IV по классификации Фонтане) и сахарным диабетом второго типа, приводит к снижению СГК [14]. Применение данного фактора при кровопотере у крыс приводит к росту активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы, что обусловлено развитием компенсаторных процессов за счет роста концентрации 2,3-ДФГ, уменьшающей СГК, а также за счет снижения концентрации АТФ [15]. В результате озонлиза индуцируется каскад реакций, которые в конечном итоге приводят к по-



**Рис. 1.** Эффект озона на показатели  $p50_{реал}$  (а) и  $p50_{станд}$  (б); \* – достоверные изменения в сравнении с контролем, величина  $p$  рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.

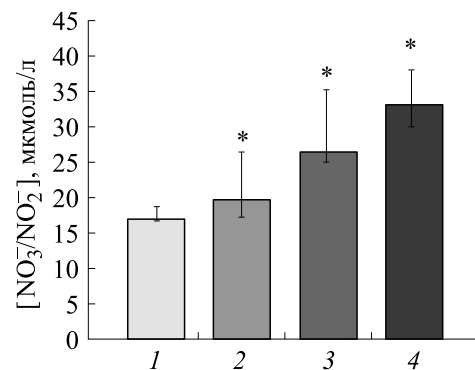
вышению уровня 2,3-ДФГ, облегчая высвобождение кислорода из оксигемоглобина [16]. Данный промежуточный метаболит гликолиза является важным фактором внутриэритроцитарной системы регуляции кислородсвязующих свойств крови, обеспечивающих ее адаптивные изменения. Можно предположить, что отмечаемый в ряде работ положительный клинический эффект озонотерапии [17] обусловлен, как это наблюдалось в наших опытах, сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, способствующим улучшению потока кислорода в ткани.

Механизм выявленной нами модификации СГК связан с изменением содержания таких газотрансмиттеров, как монооксид азота и сероводород. Эффект озона на СГК реализуется как непосредственно через вклад в функционирование систем цистеин/цистин и L-аргинин-NO, так и через модификацию функциональных свойств гемоглобина. Газотрансмиттер NO является аллостерическим эффектором СГК [18]. Образуемые им при взаимодействии с гемопротеидом метгемоглобин и нитрозогемоглобин повышают

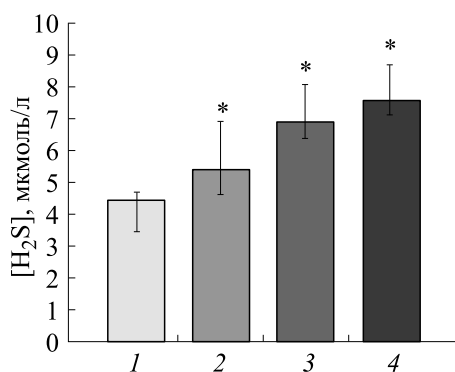


**Рис. 2.** Эффект озонированного изотонического раствора на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH и  $pCO_2$  при экспозиции 60 мин: контроль (темные квадраты), концентрация O<sub>3</sub> равна 2 мг/л (треугольники), 6 мг/л (ромбы), 10 мг/л (светлые квадраты).

его сродство к кислороду, а нитрозилгемоглобин его снижает, положение кривой диссоциации оксигемоглобина определяется соотношением этих производных [19]. Газотрансмиттеры представляют собой класс физиологически активных веществ, выполняющих в клетках сигнальную функцию и с высокой специфичностью участвующих в межклеточной и внутриклеточной коммуникации [20]. Взаимодействие NO и H<sub>2</sub>S имеет значение для модификации СГК через образование различных дериватов гемоглобина (мет-, нитро-, нитрозил- и сульфогемоглобины), модулирование внутриэритроцитарной системы формирования кислородсвязывающих свойств крови, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина [21]. Наблюдаемый рост газотрансмиттеров (NO, H<sub>2</sub>S), отмечаемый в наших



**Рис. 3.** Концентрация нитрат/нитритов в плазме при инкубации крови с озонированным изотоническим раствором: 1 – контроль, 2 – 2 мг/л O<sub>3</sub>, 3 – 6 мг/л O<sub>3</sub>, 4 – 10 мг/л O<sub>3</sub>; \* – достоверные изменения в сравнении с контролем; величина  $p$  рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.



**Рис. 4.** Содержание сероводорода в плазме при инкубации крови с озонированным изотоническим раствором: 1 – контроль, 2 – 2 мг/л O<sub>3</sub>, 3 – 6 мг/л O<sub>3</sub>, 4 – 10 мг/л O<sub>3</sub>; \* – достоверные изменения в сравнении с контролем; величина р рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма.

опытах, несомненно вносит вклад в изменение кислородтранспортной функции крови.

### ВЫВОДЫ

Таким образом, инкубация крови с озонированным физиологическим раствором в диапазоне концентраций от 2 до 10 мг/л обуславливает изменение кислородтранспортной функции крови, проявляющееся в увеличении  $pO_2$ ,  $\Delta SO_2$  и уменьшении СГК, выраженность которых усиливается с увеличением концентрации озона. Действие данного фактора увеличивает содержание таких газотрансмиттеров, как NO и H<sub>2</sub>S, что имеет значение для модификации кислородсвязывающих свойств крови. Очевидно, противогипоксическое действие озона реализуется через механизмы, изменяющие кислородтранспортную функцию крови.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Манипуляции на животных были выполнены в соответствии с рекомендациями и разрешением

региональной комиссии по биомедицинской этике.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. В. Змызгова и В. А. Максимов, *Клинические аспекты озонотерапии* (Первая образцовая типография, М., 2003).
2. С. П. Перетягин, К. Н. Контрощикова и А. А. Мартусевич, *Медицинский альманах* **2**, 101 (2012).
3. В. Н. Крылов, И. С. Дерюгина, А. В. Симутис и др., *Биомедицина* **2**, 37 (2014).
4. А. В. Дерюгина, Я. В. Галкина, И. С. Симутис и др., *Изв. Уфимского научного центра РАН* **1**, 41 (2017).
5. J. W. Severinghaus, *J Appl. Physiol.* **21** (5), 1108 (1966).
6. E. J. Norris, C. R. Culberson, S. Narasimhan, et al., *Shock*. **36** (3), 242 (2011).
7. Н. А. Шаназарова, Н. Ю. Лисовская, Е. В. Лисовский и др., *Медицинские науки* **2**, 113 (2016).
8. Р. Р. Исхакова и Ф. Р. Сайфуллина, *Казанский мед. журн.* **94** (4), 510 (2013).
9. Л. Н. Катюхин, *Физиология человека* **6**, 100 (2016).
10. В. В. Зинчук и Н. В. Глуткина, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **99** (5), 537 (2013).
11. A. David, *Blood, Cells, Molecules and Diseases* **70**, 2017). DOI: 10.1016/j.bcmd.2017.10.006
12. B. K. Ross, M. P. Hlastala, and R. Frank, *Arch. Environ. Health* **34** (3), 161 (1979).
13. R. Giunta, A. Coppola, C. Luongo, et al., *Ann. Hematol.* **80** (12), 745 (2001).
14. L. Coppola, R. Giunta, G. Verrazzo, et al., *Diabete Metab.* **21** (4), 252 (1995).
15. А. В. Дерюгина, Я. В. Галкина и А. А. Мартусевич, *Биорадикалы и антиоксиданты* **3** (3), 33 (2016).
16. Л. С. Ковальчук, *Проблемы здоровья и экологии* **2** (12), 93 (2007).
17. И. С. Чекман, А. О. Сыровая, В. А. Макаров и др., *Озон и озонотерапия* (Цифрова друкарня № 1, Харьков, 2013).
18. V. V. Zinchuk and L. V. Dorokhina, *Nitric Oxide* **6** (1), 29 (2002).
19. В. В. Зинчук и Т. Л. Степуро, *Биофизика* **131** (1), 32 (2006).
20. О. И. Сукманский и В. П. Реутов, *Успехи физиол. наук* **3**, 30 (2016).
21. В. В. Зинчук, М. Э. Фираго и И. Э. Гуляй, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **99** (8), 890 (2017).

## Different Ozone Dosage Effects on Oxygen Transport in Blood, *in vitro* Experiments

V.V. Zinchuk and E.S. Biletskaya

Grodno State Medical University, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230009 Belarus

The effects of ozone on oxygen transport in blood from the experimental animals were studied *in vitro*. Incubation of blood with ozonated water (O<sub>3</sub> concentration of 2, 6, 10 mg/L) for 30 and 60 minutes caused a change in oxygen transport by blood, resulting in raised oxygen tension, increased oxygenation and a reduced affinity of hemoglobin for oxygen. As a result, the amounts of the gaseous transmitters such as nitric oxide and hydrogen sulfide, increase significantly contributing to modification of the blood oxygen binding properties.

*Keywords:* ozone, blood, oxygen, gaseous transmitters