

**ЭФФЕКТ ОЗОНА НА КИСЛОРОДТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ  
И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС КРОВИ  
В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА NO-ГЕНЕРИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ  
В ОПЫТАХ *IN VITRO***

© 2021 г. В. В. Зинчук<sup>1</sup>, \*, Е. С. Билецкая<sup>1</sup>, И. Э. Гуляй<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

\*E-mail: zinchuk@grsmu.by

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.

После доработки 17.09.2020 г.

Принята к публикации 19.10.2020 г.

Озон обладает широким спектром физиологических эффектов, в частности, улучшает реологические свойства крови, оказывает влияние на кислородзависимые процессы. Цель данного исследования – изучить эффект озона на кислородтранспортную функцию и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro*. Для исследования использовалась концентрация озона 6 мг/л и препараты, влияющие на синтез монооксида азота в эритроцитах (нитроглицерин, L-аргинин и L-NAME). Применение нитроглицерина приводило к усилению эффекта озона на кислородтранспортную функцию (проявляющегося ростом PO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, P<sub>50</sub> реал.) и росту концентрации газотрансмиттеров NO и H<sub>2</sub>S. При добавлении L-аргинина, L-NAME и их комбинации к образцам крови изменения исследуемых параметров не отмечались. В условиях модификации образования монооксида азота в наших опытах показатели перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты) и антиоксидантной защиты (каталаза, ретинол, α-токоферол) существенно не изменились.

**Ключевые слова:** озон, кровь, кислород, газотрансмиттер, монооксид азота, L-аргинин, нитроглицерин

**DOI:** 10.31857/S0869813921010106

В клинической практике широко применяются методы терапии, основанные на использовании озона. Данный газ обладает широким спектром действия, в частности, иммунокорректирующим, антигипоксическим и антиоксидантным [1]. Озон увеличивает содержание кислорода в артериальной и венозной крови, улучшает ее реологические свойства и кислородзависимые процессы [2]. Ранее нами было показано, что инкубация крови с озонированным физиологическим раствором в диапазоне концентраций от 2 до 10 мг/л обуславливает изменение кислородтранспортной функции крови (КТФ), проявляющееся в увеличении PO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> и уменьшении сродства гемоглобина к кислороду (СГК), выраженность которых усиливается с увеличением концентрации озона и сопровождается ростом концентрации нитрат/нитритов и сероводорода в плазме крови [3].

Монооксид азота (NO) через изменение различных механизмов формирования функционального статуса эритроцитов обеспечивает адаптацию организма к гипоксии [4]. Инкубация суспензии эритроцитов с нитроглицерином (5 нг/мл) в Na-фос-

фатном буфере в течение 24 ч приводит к повышению сродства гемоглобина к кислороду, что указывает на возможность влияния нитроглицерина на данный параметр [5]. Также показано, что при инкубировании крови с S-нитрозоцистеином отмечается снижение  $P_{50 \text{ станд.}}$  с 33.2 до 30.3 мм рт. ст. [6]. Однако участие NO в реализации эффектов озона на кислородсвязывающие свойства и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови недостаточно изучено.

Исходя из вышеизложенного, цель настоящей работы – изучить эффект озона на КТФ и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты *in vitro* выполнялись на образцах крови, забранных от белых крыс-самцов массой 250–300 г ( $n = 15$ ), предварительно содержавшихся в стандартных условиях вивария. В условиях адекватного наркоза (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. Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями комитета по биомедицинской этике и деонтологии учреждения образования Гродненский государственный медицинский университет.

Образцы крови были разделены на 6 экспериментальных групп: контрольная (1-я) и опытные (2-я–6-я). В опытные группы к 3 мл крови добавляли 1 мл озонированного изотонического раствора хлорида натрия (в 1-ю – без озонирования) и 0.1 мл растворов, содержащих препараты, влияющие на синтез монооксида азота (во 2-ю группу – изотонический раствор хлорида натрия): 3-ю – нитроглицерин в конечной концентрации 0.05 ммоль/л (SchwarzPharma AG), 4-ю – L-аргинин 3 ммоль/л (Sigma-Aldrich), 5-ю – N( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester 1.25 ммоль/л (L-NAME, Sigma-Aldrich), 6-ю – комбинацию L-NAME и L-аргинин, после чего пробы перемешивали. Время инкубации составило 60 мин. Изотонический раствор хлорида натрия барботировался озono-кислородной смесью, создававшейся озонотерапевтической установкой УОТА-60-01-Медозон (Россия), в которой осуществлялся контроль концентрации озона.

После добавления озона на газоанализаторе Stat Profile pHox plus L в крови при 37°C определяли показатели КТФ: 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  $P_{50 \text{ реал.}}$  ( $PO_2$  крови при 50%-ном насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus [7] рассчитывали значение  $P_{50 \text{ станд.}}$  и положение кривой диссоциации оксигемоглобина. Затем кровь центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин, отбирали плазму, а эритроциты трижды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия.

Содержание малонового диальдегида в эритроцитах определяли по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре в кислой среде реагирует с малоновым диальдегидом с образованием окрашенного триметилового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 535 нм на спектрофотометре PV1251C СОЛАР (Беларусь) [8]. Уровень диеновых конъюгатов определяли по интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического

светового потока в области спектра 232–234 нм, характерного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов на спектрофлуориметре СМ 2203 СОЛАР (Беларусь) [9]. Для определения активности каталазы в гемолизатах использовали метод Королюк, основанный на спектрофотометрической регистрации количества окрашенного продукта реакции  $\text{H}_2\text{O}_2$  с молибденовокислым аммонием [10]. Концентрацию  $\alpha$ -токоферола и ретинола регистрировали по методу Taylog на спектрофлуориметре СМ 2203 СОЛАР (Беларусь) [11]. Продукцию эндогенного NO оценивали по суммарному содержанию нитрат/нитритов ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ) в плазме крови спектрофотометрическим методом с реактивом Грисса при длине волны 540 нм [12]. Уровень эндогенного сероводорода ( $\text{H}_2\text{S}$ ) 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 [13]. Концентрацию газотрансмиттеров рассчитывали по калибровочным графикам, и результаты выражали в мкмоль/л.

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, множественных сравнений оценивалась с использованием U-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартили. Величина  $p$  рассчитана с учетом поправки Бонферрони–Холма. Уровень статистической значимости принимали при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 1 представлены данные о характере изменения КТФ крови под воздействием озона в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro*. Инкубация крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия обуславливает изменение ее КТФ, проявляющееся в росте таких показателей, как  $\text{PO}_2$  – на 21.5% ( $p < 0.05$ );  $\text{SO}_2$  – на 6.9% ( $p < 0.05$ ) в сравнении с контролем.

Показатель СГК  $\text{P}_{50 \text{ реал}}$  под воздействием озона возрастает на 15.4% ( $p < 0.05$ ), что свидетельствует о сдвиге кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 1). Схожая динамика изменений была и по показателю  $\text{P}_{50 \text{ станд}}$ . Также в этой группе наблюдался сдвиг реакции крови в щелочную сторону, что подтверждается ростом значения pH по сравнению с контролем.

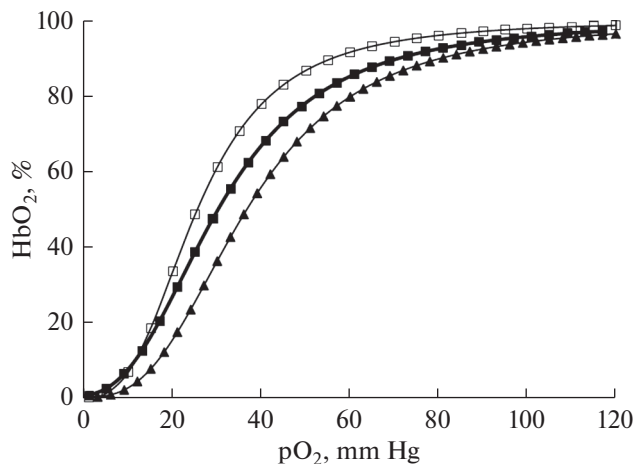
В остальных группах (3–6) исследования были проведены в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro*. Выявлено, что введение нитроглицерина приводит к усилению эффекта озона на КТФ крови. При этом отмечалось увеличение  $\text{PO}_2$  на 24.5% ( $p < 0.05$ ),  $\text{SO}_2$  на 14.2% ( $p < 0.05$ ), показателя  $\text{P}_{50 \text{ реал}}$  на 13.9% ( $p < 0.05$ ) и соответственно фиксировалась большая степень сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 1) по сравнению с группой, получавшей только озон. При добавлении L-аргинина, L-NAME и их комбинации изменения данных параметров, а также кислотно-основного состояния крови ( $\text{PCO}_2$ , SBC, ABE/SBE,  $\text{HCO}_3^-$ , pH,  $\text{TCO}_2$ ) не наблюдалось.

В табл. 2 представлены данные о характере изменения показателей процессов перекисного окисления липидов и состояния системы антиоксидантной защиты. Инкубация крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия приводила к увеличению содержания диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и активности каталазы в эритроцитарной массе. В условиях воздействия на NO-генерирующую систему в наших опытах показатели перекисного окисления

**Таблица 1.** Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro*  
**Table 1.** The effect of ozone on the oxygen transport function of blood under conditions of changes in the formation of nitrogen monoxide *in vitro* experiments

Показатель Parameter	Контроль Control		Озон Ozone		Озон + Нитроглицерин Ozone + Nitroglycerin		Озон + L-аргинин Ozone + L-arginine		Озон + L-NAME Ozone + L-NAME		Озон + L-NAME + L-аргинин Ozone + L-NAME + L-arginine	
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
SO <sub>2</sub> , %	31.6 [26.3; 32.2]	33.8 [32.4; 34.7]*	38.6 [33.9; 41.8]*#	31.6 [31; 33.8]	30.5 [27.9; 30.9]#	32.6 [31.1; 33.4]						
PO <sub>2</sub> , мм рт. ст. mmHg	19.5 [17.8; 19.6]	23.7 [22.3; 24.6]*	29.5 [26.8; 30.1]*#	21.7 [20.7; 21.9]*#	21.9 [21.8; 22.4]*	21.4 [20.9; 21.8]*#						
pH, ед units	7.412 [7.410; 7.413]	7.432 [7.428; 7.437]*	7.441 [7.439; 7.467]*	7.436 [7.406; 7.478]*	7.411 [7.401; 7.431]	7.446 [7.432; 7.469]*						
PCO <sub>2</sub> , мм рт. ст. mm Hg	34.3 [32.8; 35.7]	28.3 [27.9; 30.1]*	29.5 [24; 30.8]*	26.2 [22.3; 32.3]	31.2 [30.5; 32.5]*	28.3 [26; 2.32]*						
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ммоль/л mmol/L	21.8 [21; 22.5]	19.9 [19.1; 20.3]*	19.6 [17.6; 20.2]*	20.5 [19.2; 20.6]	19.9 [19.5; 20.5]*	20.2 [19.5; 21.1]						
TCO <sub>2</sub> , ммоль/л mmol/L	22.9 [22; 23.6]	20.8 [20; 21.7]*	20.7 [18.4; 21.1]*	21.3 [20.1; 21.6]	20.8 [20.6; 21.5]*	21 [20.; 22.1]						
ABE, ммоль/л mmol/L	-3.3 [-3.9; -2.5]	-4.7 [-5.4; -4.1]*	-5.7 [-6.5; -4.1]*	-4.05 [-4.6; -2.1]	-4.9 [-5.6; -4.3]	-3.7 [-4.4; -2.8]						
SBE, ммоль/л mmol/L	-1.9 [-2.5; -1.3]	-3.2 [-3.9; -2.7]*	-3.8 [-4.6; -2.7]*	-2.7 [-3.13; -0.6]	-3.4 [-4.1; -2.9]	-2.1 [-2.9; -1.4]						
SBC, ммоль/л mmol/L	21.9 [21.3; 22.3]	20.9 [20.4; 21.4]	20.5 [19.8; 21.3]	21.4 [20.9; 23.1]	20.8 [20.3; 21.2]	21.9 [21.2; 22.4]						
P <sub>50</sub> реал., мм рт. ст. mm Hg	26.7 [26.5; 26.9]	30.8 [29.3; 32.8]*	35.1 [34.3; 36.2]*#	28.3 [27.4; 29.2]*#	29.5 [26.5; 30.3]	28.7 [28.2; 29.1]*#						
P <sub>50</sub> станд., мм рт. ст. mm Hg)	26.6 [26.4; 26.7]	31.8 [29.7; 33.8]*	36.5 [35.5; 36.9]*#	30.3 [28.6; 32.7]*	29.9 [26.5; 30.9]	29.4 [28.5; 30.7]*						

Данные представлены как медиана [25-ый квартиль – 75-ый квартиль]. \* –  $p < 0.05$  изменения в сравнении с контрольной группой; # –  $p < 0.05$  с озоном.  
 Results are presented as median [25th quartile – 75th quartile]. \* –  $p < 0.05$  changes compared to the control; # –  $p < 0.05$  – with ozone.



**Рис. 1.** Эффект озона на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH и PCO<sub>2</sub>. Обозначения: □ – контроль; ■ – озон; ▲ – озон + нитроглицерин.

**Fig. 1.** The effect of ozone on the position of the oxyhemoglobin dissociation curve at real pH and PCO<sub>2</sub> values. Designation: □ – control; ■ – ozone; ▲ – ozone + nitroglycerin.

липидов (малоновый диальдегид МДА, ДК) существенно не изменялись. При добавлении нитроглицерина и L-аргинина в присутствии озона происходило повышение концентрации ретинола и α-токоферола, а в остальных группах подобная тенденция не наблюдалась.

Суммарное содержание NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в плазме крови (рис. 2) под действием озона возрастала (на 39.2%,  $p < 0.05$ ). При добавлении нитроглицерина в этих условиях концентрация NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> существенно увеличивалась (на 183.5%,  $p < 0.05$  по сравнению с группой, в которую вводили только озон). Уровень газотрансмиттера H<sub>2</sub>S (рис. 2) под действием озона возрастал (на 44.8%,  $p < 0.05$ ). При добавлении нитроглицерина или L-аргинина этот показатель также повышался (на 35.3% и на 41.6%,  $p < 0.05$  по сравнению с группой, в которую вводили только озон). Добавление L-NAME или его комбинации с L-аргинином в условиях действия озона не приводило к увеличению содержания данных газотрансмиттеров по сравнению с группой, в которую вводили только озон.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

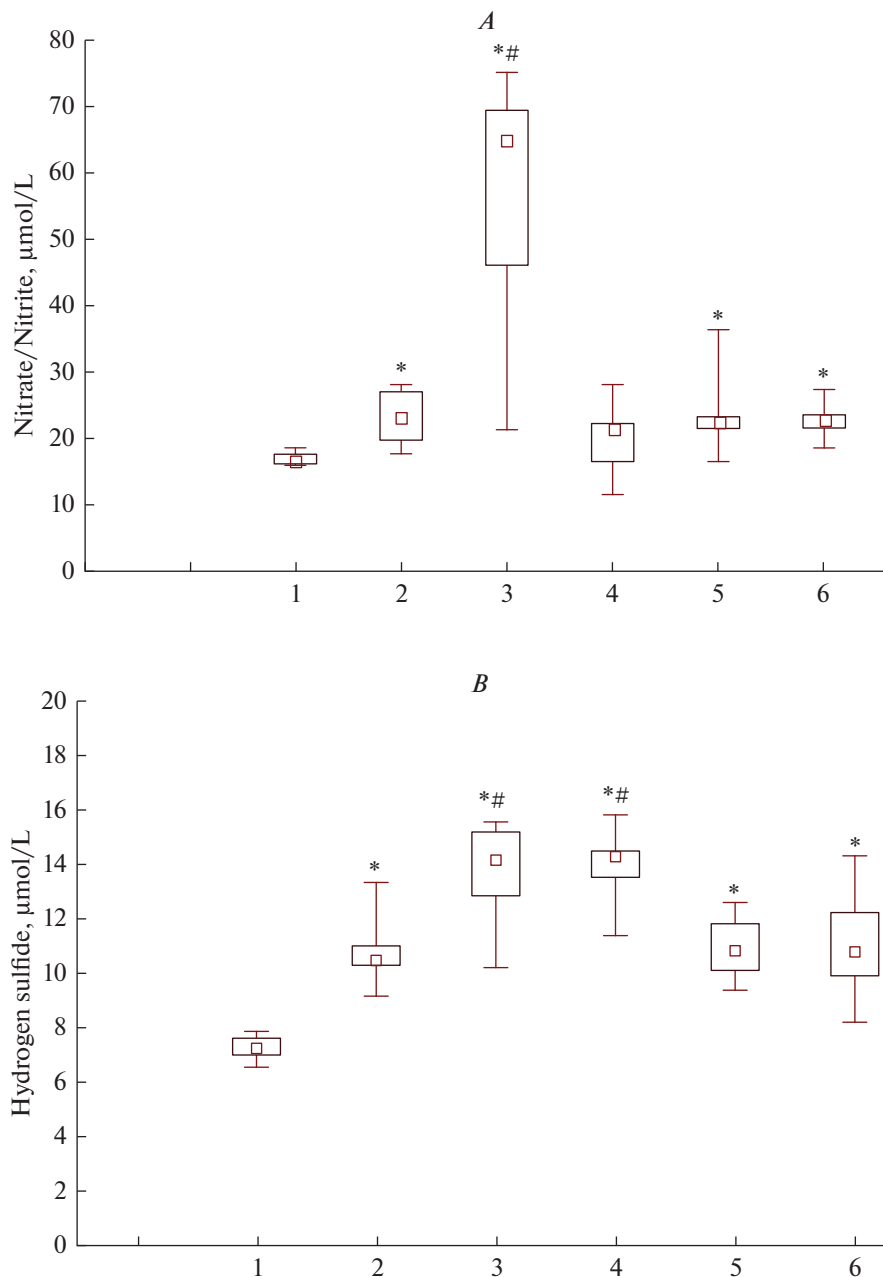
В работах некоторых исследователей при введении озонированного изотонического раствора на различных моделях наблюдалось увеличение показателей КТФ [14, 27]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при инкубации крови с озоном происходит увеличение PO<sub>2</sub> и SO<sub>2</sub>. Также в проведенном нами исследовании установлено уменьшение СГК. Согласно полученным результатам, в данном эффекте озона имеет значение рост концентрации 2,3-дифосфолицерата в эритроцитах [15] и увеличение образования монооксида азота, исходя из роста его концентрации.

В этом аспекте важно отметить, что нитроглицерин, согласно нашим результатам, усиливает эффект озона на СГК, а также на PO<sub>2</sub> и SO<sub>2</sub>, что предполагает участие NO-зависимых механизмов внутриэритроцитарной системы в формировании

**Таблица 2.** Эффект озона на концентрацию газотрансмиттеров и показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro*  
**Table 2.** Effect of ozone on the concentration of gas transmitters and indicators of the prooxidant-antioxidant balance of the blood under conditions of changes in the formation of nitrogen monoxide *in vitro* experiments

Показатель Parameter	Контроль Control	Озон Ozone	Озон + Нитроглицерин Ozone + Nitroglycerin	Озон + L-аргинин Ozone + L-arginine	Озон + L-NAME Ozone + L-NAME	Озон + L-NAME + L-аргинин Ozone + L-NAME + L-arginine
<i>n</i>	10	10	10	10	10	10
МДА, мкмоль/л MDA, μmol/L	4.79 [4.25; 5.77]	15.71 [14.80; 15.78]*	12.63 10.48; 15.87]*	14.31 [13.43; 15.57]*	14.70 [13.63; 15.27]*	15.46 [14.14; 16.92]*
ДК, ЕД/мл DK, U/ml	18.08 [17.34; 18.56]	22.25 [19.37; 23.47]*	20.545 [20.31; 21.45]*	22.43 [21.83; 24.31]*	22.38 [18.73; 24.17]*	22.10 [19.68; 22.81]*
Каталаза, ммоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мин/г Hb Catalase, mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/g Hb	10.53 [10.25; 10.88]	14.89 [14.18; 16.57]*	16.04 [15.93; 16.77]*	14.34 [13.72; 15.92]*	12.65 [11.81; 13.51]**	12.33 [11.02; 12.85]#
Ретинол, мкмоль/л Retinol, μmol/L	0.85 [0.81; 0.87]	0.93 [0.87; 0.96]	1.14 [1.08; 1.7]*	1.04 [0.96; 1.14]*	0.88 [0.85; 1.02]	0.95 [0.78; 1.04]
α-токоферол, мкмоль/л α-tocopherol, μmol/L	8.26 [8.02; 8.44]	13.57 [11.18; 14.76]	19.10 [17.36; 20.96]*	16.62 [15.00; 19.49]*	11.75 [10.48; 13.06]	12.01 [9.62; 13.56]

МДА – малоновый диальдегид, ДК – диеновые коньюгаты. Данные представлены, как медиана [25-ый квартиль – 75-ый квартиль]. \* –  $p < 0.05$  достоверные изменения в сравнении с контрольной группой; # –  $p < 0.05$  с озоном.  
 MDA – malonic dialdehyde, DK – diene conjugates. Results are presented as median [25th quartile – 75th quartile]. \* –  $p < 0.05$  достоверные изменения в сравнении с контрольной группой; # –  $p < 0.05$  с озоном. \* –  $p < 0.05$  changes in comparison with the control; # –  $p < 0.05$  with ozone.



**Рис. 2.** Концентрация нитрат/нитритов (A) и сероводорода (B) в плазме крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro*. 1 – контроль, 2 – озон, 3 – озон + нитроглицерин, 4 – озон + L-аргинин, 5 – озон + L-NAME, 6 – озон + L-NAME + L-аргинин. \* –  $p < 0.05$  изменения в сравнении с контрольной группой; # –  $p < 0.05$  с группой, содержащей только озон.

**Fig. 2.** The concentration of nitrate/nitrite (A) and hydrogen sulfide (B) in blood plasma in the formation of nitrogen monoxide *in vitro* experiments. 1 – control, 2 – ozone, 3 – ozone + nitroglycerin, 4 – ozone + L-arginine, 5 – ozone + L-NAME, 6 – ozone + L-NAME + L-arginine. \* –  $p < 0.05$  changes in comparison with the control group; # –  $p < 0.05$  with a group containing only ozone.

кислородсвязывающих свойств крови. Озон может оказывать влияние на синтез монооксида азота различными путями, в частности, за счет усиления экспрессии белков теплового шока [16]. Ранее нами было показано, что изменение генерации NO может модифицировать кислородсвязывающие свойства крови, в частности, добавление L-аргинина или нитроглицерина при действии магнитного поля приводит к уменьшению SGK, которое отсутствует при введении ингибитора фермента NO-синтазы (L-NAME) [17]. Результаты нашего исследования демонстрируют, что нитроглицерин как непосредственный донор монооксида азота усиливает эффект озона на КТФ крови. Добавление L-аргинина (исходного субстрата синтеза NO) не оказывает аналогичного влияния. Данный факт, вероятно, обусловлен тем, что механизмы синтеза NO не успевают реализоваться за время проводимого эксперимента (60 мин). Монооксид азота, наряду с pH и 2,3-дифосфоглицератом, может быть модулятором кислородсвязывающих свойств гемоглобина и изменять SGK через NO-зависимые внутриэритроцитарные механизмы [18, 19].

Выявленный нами эффект озона на SGK реализуется как непосредственно через воздействие на экспрессию NO-синтазы в эритроцитах, так и через модификацию функциональных свойств гемоглобина. Следует отметить, что при действии озона отмечается рост концентрации газотрансмиттера  $H_2S$ , который усиливается при добавлении нитроглицерина. NO, CO и  $H_2S$  участвуют в защите организма от окислительного стресса, вызванного активными формами кислорода, азота [19], и выполняют роль аллостерического эффектора функциональных свойств гемоглобина, который изменяет его сродство к кислороду, влияя на транспорт  $O_2$  [21]. Рост газотрансмиттеров (NO и  $H_2S$ ), отмечаемый в наших опытах, вносит вклад в изменение КТФ крови. Повышение уровня сероводорода при добавлении нитроглицерина и L-аргинина в условиях действия озона (донора кислорода) связано с тем, что образующиеся вследствие реакции NO с кислородом оксиды ( $NO_2$  и  $N_2O_3$ ) [22], могут взаимодействовать с гемоглобином и основаниями Шиффа с образованием нитрованных аминокислот, в частности, метионина [23], из которого посредством реакции транссульфурирования в эритроцитах образуется L-цистеин [24], предшественник синтеза  $H_2S$ . Вследствие этого увеличивается синтез сероводорода. Озон уменьшает SGK, реализуя свое действие через участие NO и  $H_2S$  (повышение концентрации нитрат/нитритов и сероводорода). Изменения функциональной активности ферментных элементов под действием озона обусловлены перестройкой внутриклеточной организации. Известно, что эритроциты имеют структуры, обеспечивающие синтез газотрансмиттеров (NO и  $H_2S$ ) непосредственно в данных клетках [25]. Действие озона изменяет конформацию макромолекул, липопротеидных комплексов мембран эритроцитов, модифицируя их функциональные свойства, в частности, через NO-ергические механизмы и через сероводород/цистеин/цистиновый путь. Сероводород, уровень которого повышается в наших опытах, может связываться с метгемоглобином, образуя сульфгемоглобин [26], который совместно с NO-производными гемоглобина может изменять положение кривой диссоциации оксигемоглобина. Газотрансмиттеры вносят вклад в модификацию SGK, что достигается через разные механизмы: образование дериватов гемоглобина (нитрозогемоглобин, нитрозилгемоглобин, метгемоглобин, сульфгемоглобин), модуляторов внутриэритроцитарной системы формирования КТФ крови. Участие NO-зависимых механизмов внутриэритроцитарной системы в изменении кислородсвязывающих свойств крови при действии озона подтверждается результатами наших исследований, в которых показано уменьшение SGK при введении нитроглицерина и отсутствие сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина при введении ингибитора фермента NO-синтазы (L-NAME) в этих условиях.



Низкие концентрации озона не вызывают интенсификации процесса липопероксидации, а при высоких дозах интенсивность образования диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и оснований Шиффа существенно возрастает [27]. Под влиянием озона происходит активация свободнорадикального окисления, а затем по принципу положительной обратной связи активизируются механизмы антиоксидантной защиты [28, 29]. Высокие дозы озона в экспериментах на крысах вызывают повреждение легких, однако после введения L-аргинина отмечается ингибирование активности миелопероксидазы базофильных гранул нейтрофилов, а при добавлении L-NAME данный эффект отсутствует [30]. Внутривентрикулярное введение озона (концентрация 1 мг/кг) в условиях ишемического повреждения тонкой кишки приводит к росту активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, а также общей антиоксидантной активности [31]. Доноры монооксида азота в опытах *in vitro* активируют систему антиоксидантной защиты [32]. В наших опытах наблюдалось повышение концентрации ретинола и  $\alpha$ -токоферола при добавлении нитроглицерина и L-аргинина в присутствии озона, возможно, за счет их высвобождения из эритроцитарной мембраны вследствие ее окислительного повреждения (в частности, под действием пероксинитрита) [33, 34]. Эффект L-NAME и его комбинации с L-аргинином на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса не отмечается.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что инкубация крови с озоном и нитроглицерином приводит к усилению эффекта данного газа на КТФ крови (рост  $PO_2$ ,  $SO_2$ ), что сопровождается уменьшением SGK. При использовании ингибитора фермента NO-синтазы L-NAME, L-аргинина и их комбинации подобный эффект не отмечается. Увеличение уровня нитрат/нитритов и сероводорода при действии озона в условиях введения нитроглицерина отражает участие данных газотрансмиттеров в модификации КТФ крови. В условиях воздействия на NO-генерирующую систему в эритроцитах в наших опытах показатели перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты) существенно не изменяются. При добавлении нитроглицерина и L-аргинина в присутствии озона наблюдается повышение концентрации ретинола и  $\alpha$ -токоферола.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществляется в рамках задания государственной программы научных исследований “Изучить молекулярно-генетические NO-зависимые механизмы формирования кислородного гомеостаза и его нарушений” № 20190511, дата регистрации 11.04.2019.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедь С.Л., Бояринов Г.А., Фраерман А.П. Применение озонированного физиологического раствора в послеоперационном периоде у больных с новообразованиями головного мозга. Биорадикалы и антиоксиданты. 5(1): 30–39. 2018. [Lebed' S.L., Boyarinov G.A., Fraerman A.P. The use of ozonized saline in the postoperative period in patients with neoplasms of the brain. Bioradicals and antioxidants. 5(1): 30–39. 2018. (In Russ)].
2. Чекман И.С., Сырвая А.О., Макаров В.А., Макаров В.В., Шаповал Е.В. Озон и озонотерапия: Монография. Харьков. Цифровая друкарня № 1. 2013. [Chekman I.S., Syrovaya A.O., Makarov V.A., Makarov V.V., Shapoval E.V. Ozone and ozone therapy: Monograph. Kharkiv. Digital typography No. 1. 2013. (In Russ)].
3. Зинчук В.В., Билецкая Е.С. Кислородзависимые механизмы физиологического действия озона (обзор). Журн. мед.-биол. исследований. 7(2): 216–227. 2019. [Zinchuk V.V., Biletskaya E.S. Oxygen-dependent mechanisms of the physiological action of ozone (Review). J. Med. Biol. Res. 7(2): 216–227. (In Russ)].
4. Zhao Y., Wang X., Noviana M., Hou M. Nitric oxide in red blood cell adaptation to hypoxia. Acta Biochim. Biophys. Sin. 50(7): 621–634. 2018.
5. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Путинцева О.В. Влияние нитроглицерина на спектральные и кислородсвязывающие характеристики внутриэритроцитарного гемоглобина. Экс-

- пер. и клин. фармакол. 79(9): 12–17. 2016. [Kalaeva E.A., Artyukhov V.G., Putintseva O.V. The influence of nitroglycerin on spectral and oxygen-binding characteristics of human intracellular hemoglobin. *Eksp. Klin. Farmakol.* 79(9): 12–17. 2016. (In Russ)].
6. *Stepuro T.L., Zinchuk V.V.* Nitric oxide effect on the hemoglobin-oxygen affinity. *J. Physiol. Pharmacol.* 57(1): 29–38. 2006.
  7. *Saveringhaus J.W.* Blood gas calculator. *J. Appl. Physiol.* 21(5): 1108–1116. 1966.
  8. *Камышников В.С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск. 2002. [Kamyshnikov V.S. Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics. Minsk. 2002. (In Russ)].
  9. *Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И.* Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лаб. дело.* (3): 33–36. 1983. [Gavrilov V.B., Mishkorudnaya M.I. Spectrophotometric determination of the content of lipid hydroperoxides in blood plasma. *Lab. Delo.* (3): 33–36. 1983. (In Russ)].
  10. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарева В.Е.* Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело.* (1): 16–19. 1988. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokareva V.E. Method for determination of catalase activity. *Lab. Delo.* (1): 16–19. 1988. (In Russ)].
  11. *Taylor S.L., Lamden M.P., Tappel A.L.* Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids.* 11(7): 530–538. 1976.
  12. *Bryan N.S., Grisham M.B.* Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 43(5): 645–657. 2007.
  13. *Norris E.J., Culbertson C.R., Narasimhan S., Clemens M.G.* The liver as central regulator of hydrogen sulfide. *Shock.* 36(3): 242–250. 2011.
  14. *Kuroda K., Yamashita M., Murahata Y., Azuma K., Osaki T., Tsuka T., Ito N., Imagawa T., Okamoto Y.* Use of ozonated water as a new therapeutic approach to solve current concerns around antitumor treatment. *Exp. Ther. Med.* 16(3): 1597–1602. 2018.
  15. *Clavo B., Santana-Rodriguez N., Llontop P., Gutiérrez D., Lypez L., Rovira G., Martınez-Sánchez G., González E., Jorge I.J., Perera C., Blanco J., Rodríguez-Esparragyn F.* Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? *Evid base Compl. Alternative Med.* 2018: 1–11. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7931849>
  16. *Seyam O., Smith N.L., Reid I., Gandhi J., Jiang W., Khan S.A.* Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med. Gas. Res.* 8(3): 103–110. 2018.
  17. *Зинчук В.В., Лепеев В.О., Гуляй И.Э.* Участие газотрансмиттеров в модификации кислородтранспортной функции крови при действии магнитного поля. *Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова.* 102(10): 1176–1184. 2016. [Zinchuk V.V., Lepeev V.O., Gulyai I.E. The participation of gas transmitters in the modification of the oxygen transport function of blood under the action of a magnetic field. *Russ. J. Physiol.* 102 (10): 1176–1184. 2016. (In Russ)].
  18. *Zinchuk V., Zhadko D.* Association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism with blood oxygen transport. *Nitric Oxide.* 84: 45–49. 2019.
  19. *Lo Faro M., Fox B., Whatmore J., Winyard P., Whiteman M.* Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide.* 41: 38–47. 2014.
  20. *Shefa U., Yeo S.G., Kim M.S., Song I.O., Jung J., Jeong N.Y., Huh Y.* Role of Gasotransmitters in Oxidative Stresses, Neuroinflammation, and Neuronal Repair. *Biomed. Res. Internat.* 2017: 1–15. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1689341>
  21. *Сукманский О.И., Реутов В.П.* Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний. *Успехи физиол. наук.* 47(3): 30–58. 2016. [Sukmansky O.I., Reutov V.P. Gas transmitters: physiological role and participation in the pathogenesis of diseases. *Usp. Fiziol. Nauk.* 47 (3): 30–58. 2016. (In Russ)].
  22. *Hughes M.N.* Chemistry of nitric oxide and related species. *Methods in Enzymology.* 436: 3–19. 2007.
  23. *Herold S., Rehmann F.-J.K.* Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferrous hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 531–545. 2003.
  24. *Reisz J.A., Nemkov T., Dzieciatkowska M.* Methylation of protein aspartates and deamidated asparagines as a function of blood bank storage and oxidative stress in human red blood cells. *Transfusion.* 58(12): 2978–2991. 2018. <https://doi.org/10.1111/trf.14936>
  25. *Kolluru G.K., Prasai P.K., Kaskas A.M., Letchuman V., Pattillo C.B.* Oxygen tension, H<sub>2</sub>S, and NO bioavailability: is there an interaction? *J. Appl. Physiol.* 120(2): 263–270. 2016. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00365.2015>
  26. *Van Leeuwen S.R., Baranoski G.V., Kimmel B.W.* Three-wavelength method for the optical differentiation of methemoglobin and sulfhemoglobin in oxygenated blood. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2017: 4570–4573. 2017. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2017.8037873>

27. *Перетягин С.П., Конторщикова К.Н., Мартусевич А.А.* Оценка эффекта различных доз озона на процессы липопероксидации и кислородообеспечение крови *in vitro*. Мед. альманах. 21(2): 101–104. 2012. [*Peretyagin S.P., Kontorshchikova K.N., Martusevich A.A.* Evaluation of the effect of various doses of ozone on the processes of lipid peroxidation and oxygen supply of blood *in vitro*. Med. alman. 21 (2): 101–104. 2012. (In Russ)].
28. *Мурзалиев А.Д., Жолдошбеков Е.Ж., Авазов Б.А.* Опыт использования озонотерапии в урологии. Вестник Смоленской гос. мед. акад. 17(1): 94–98. 2018. [*Murzaliev A.D., Zhaldoshbekov E.Zh., Avasov B.A.* Experience in the use of ozone therapy in urology. Bull. Smolensk State Med. Acad. 17 (1): 94–98. 2018. (In Russ)].
29. *Катохин Л.Н.* Влияние курсового лечения инъекциями озонированного физиологического раствора на реологические свойства эритроцитов у больных с комплексной патологией. Физиология человека. 100(6): 100–105. 2016. [*Katyukhin L.N.* Effect of course treatment with injections of ozonized physiological saline on the rheological properties of red blood cells in patients with complex pathology. Human physiology. 100(6): 100–105. 2016. (In Russ)].
30. *Zhang S., Li J., Li Y., Liu Y., Guo H., Xu X.* Nitric Oxide Synthase Activity Correlates with OGG1 in Ozone-Induced Lung Injury Animal Models. Front. Physiol. 8: 249. 2017. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00249>
31. *Onal O., Yetisir F., Sarer E., Zeybek D., Onal O., Yurekli B., Celik T., Sirma A., Kılıc M.* Prophylactic Ozone Administration Reduces Intestinal Mucosa Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in the Rat. Mediat. Inflamm. 2015: 1–8. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/792016>
32. *Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Ванин А.Ф.* Сравнительный анализ действия свободного и депонированного NO на состояние про- и антиоксидантных систем крови. Биофизика. 60(2): 348–354. 2015. [*Martusevich A.K., Solovyova A.G., Peretyagin S.P., Vanin A.F.* Comparative analysis of the effect of free and deposited NO on the state of pro- and antioxidant blood systems. Biophysics. 60 (2): 348–354. 2015. (In Russ)].
33. *Белых И.А., Воловельская Е.Л., Зинченко В.Д.* Влияние малых доз озона на гипертонический лизис эритроцитов. Проблемы криобиологии. 17(3): 237–242. 2007. [*Belykh I.A., Volovelskaya E.L., Zinchenko V.D.* Influence of small doses of ozone on hypertensive lysis of erythrocytes. Cryobiol. problems. 17 (3): 237–242. 2007. (In Russ)].
34. *Ahmad R., Hussain A., Ahsan H.* Peroxynitrite: cellular pathology and implications in autoimmunity. J. Immunoassay Immunochem. 40 (2): 123–138. 2019. <https://doi.org/10.1080/15321819.2019.1583109>

### **Effect of Ozone on Blood Oxygen Transport Function and Pro-Oxidant–Antioxidant Balance in under Conditions of Changing Nitrogen Monoxide Formation *In Vitro* Experiments**

**V. V. Zinchuk<sup>a, \*</sup>, E. S. Biletskaya<sup>a</sup>, and I. E. Gulyai<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Grodna State Medical University, Grodna, Belarus*

<sup>\*</sup>*e-mail: zinchuk@grsmu.by*

Ozone has a wide range of physiological effects, in particular, it improves the rheological properties of blood and affects oxygen-dependent processes. The purpose of this study is to investigate the effect of ozone on blood oxygen transport function and prooxidant-antioxidant balance in under conditions of changing nitrogen monoxide formation *in vitro* experiments. The study used an ozone concentration of 6 mg/l and drugs that change affecting the synthesis of nitrogen monoxide in erythrocytes (nitroglycerin, L-arginine and L-NAME). Revealed that the introduction of the nitroglycerin leads to increased effect of ozone on the oxygen-transport function (manifested by increase in pO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, p50<sub>real</sub>) and increase concentration of gaseous transmitters NO, H<sub>2</sub>S. When adding L-arginine, L-NAME, and a combination of these drugs to experimental blood samples under the influence of ozone, changes in the studied parameters were not detected. The impact on the NO-dependent mechanisms of the intra-erythrocyte system did not significantly affect the processes of lipid peroxidation (malondialdehyde, diene conjugates) and antioxidant protection (catalase, retinol, α-tocopherol).

*Keywords:* ozone, blood, oxygen, gaseous transmitter, nitrogen monoxide, L-arginine, nitroglycerin

## ЦИТИРОВАТЬ:

Зинчук В.В., Билецкая Е.С., Гуляй И.Э. 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. 107(1): 16–27. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921010106

## TO CITE THIS ARTICLE:

Zinchuka V.V., Biletskayaa E.S., Gulyai I.E. Effect of ozone on blood oxygen transport function and pro-oxidant–antioxidant balance in under conditions of changing nitrogen monoxide formation in vitro experiments. Russian Journal of Physiology. 107(1): 16–27. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921010106