

© Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ОЗОНА НА КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРКАПНИИ

В.В. Зинчук, Е.С. Билецкая*, И.Э. Гуляй

Гродненский государственный медицинский университет,
230009, Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80; *эл. почта: biletskaya.e@inbox.ru

В последнее время в медицинской практике все чаще используются немедикаментозные методы лечения, такие как озонотерапия. Целью данного исследования было изучение особенностей действия озона на кислородзависимые процессы крови в условиях гиперкапнии. Исследуемые образцы крови подвергали предварительной обработке гиперкапнической газовой смесью с последующим добавлением озонированного изотонического раствора хлорида натрия (с концентрацией озона 6 мг/л), а также доноров газотрансмиттеров: нитроглицерина и гидросульфида натрия. В этих условиях гиперкапния усиливала эффект озона на кислородтранспортную функцию крови и вызывала сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо и увеличивала синтез сероводорода при отсутствии изменений концентрации нитратов/нитритов. Нитроглицерин и гидросульфид натрия в этих условиях не изменяли параметры газотранспортной функции крови, но повышали уровень нитратов/нитритов и сероводорода. Предварительная гиперкапния не устраняла активирующего действия озона на процессы свободнорадикального окисления, также как и применение доноров газотрансмиттеров.

Ключевые слова: озон; гиперкапния; углекислый газ; газотрансмиттер; монооксид азота; сероводород

DOI:10.18097/PBMC20226803212

ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике активно применяются немедикаментозные методы лечения. В частности, для симптоматической терапии коронавирусной инфекции широко используется озон (O_3), однако механизмы действия данного газа остаются нераскрытыми [1]. Озон стимулирует метаболические процессы в эритроцитах, оказывая непосредственное влияние на кислородзависимые механизмы [2]. Ранее проведенные нами исследования отображают уменьшение сродства гемоглобина к кислороду (СГК), смещение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) вправо, демонстрируя рост концентрации газотрансмиттеров монооксида азота (NO) и сероводорода (H_2S) под воздействием озона [3].

Газотрансмиттеры NO и H_2S также оказывают влияние на кислородтранспортную функцию (КТФ) крови [4], кроме того, они участвуют в механизмах реализации эффекта O_3 на кровь [3] — пероксинитрит изменяет положение КДО в гиперкапнической среде [5]. Как известно, углекислый газ (CO_2) оказывает влияние на кислородсвязывающие свойства крови (эффект Бора), изменяя положение КДО [6]. Напряжение CO_2 влияет на синтез NO и H_2S [7]. В связи с этим особый интерес вызывает изучение эффектов озона при обработке крови гиперкапнической газовой смесью в опытах *in vitro*.

Цель данной работы — изучить особенности действия озона на кислородзависимые процессы крови в условиях гиперкапнии.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили *in vitro* на образцах крови белых беспородных крыс-самцов массой 250-300 г,

предварительно содержащихся в стандартных условиях вивария. Забор смешанной венозной крови осуществляли, используя адекватный наркоз (50 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально), из правого предсердия в предварительно подготовленный шприц с гепарином, из расчёта 50 ЕД на 1 мл крови.

Эксперименты были проведены в гиперкапнических условиях. Образцы крови ($n=10$) разделяли на 6 аликвот по 3 мл. Первая группа служила контролем. В группах 2, 4, 5, 6 образцы крови обрабатывали гиперкапнической газовой смесью (9,5% CO_2 ; 3,5% O_2 ; 87,0% N_2) в термостатируемом сатураторе в течение 30 мин. К образцам крови 3, 4, 5, 6 групп добавляли озонированный изотонический раствор хлорида натрия с концентрацией O_3 6 мг/л в объёме 1 мл (в 1 и 2 без озонирования) и 0,1 мл растворов, содержащих газотрансмиттеры: в 5 — нитроглицерин 0,05 ммоль/л (“SchwarzPharma AG”, Германия), 6 — гидросульфид натрия 0,38 ммоль/л (“Sigma-Aldrich”, США); в 1, 2, 3, 4 — 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Время инкубации с O_3 составляло 60 мин. Изотонический раствор хлорида натрия барбатировали озono-кислородной смесью, которую создавали озонотерапевтической установкой УОТА-60-01 (“Медозон”, Россия) с возможностью контроля концентрации озона.

На газоанализаторе Stat Profile pHox plus L (“Nova Biomedical”, США) при 37°C определяли показатели КТФ крови и кислотно-основного состояния: напряжение кислорода (pO_2), степень оксигенации (SO_2), напряжение 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 (ТСО₂). СГК оценивали спектрофотометрическим методом по показателю р50_{реал} (рО₂ крови при 50% насыщении её кислородом). Значение р50_{станд} и положение КДО рассчитывали по формулам Severinghaus [8].

Активность свободнорадикальных процессов оценивали по содержанию первичных (диеновые конъюгаты, ДК) и промежуточных (малоновый диальдегид, МДА) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитарной массе. Уровень ДК определяли с помощью метода, основанного на интенсивности поглощения диеновых структур гидроперекисей липидов в области 233 нм [9]. Измерение проводили на спектрофлуориметре СМ 2203 (“СОЛАР”, Беларусь) по отношению к контролю, в который вместо биологического материала добавляли дистиллированную воду. Расчёт содержания ДК производили в относительных единицах и выражали в виде ЕД/мл. Концентрацию МДА (ТБК-реагирующих продуктов) оценивали по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при нагревании в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета [10]. Интенсивность окраски по отношению к контролю измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре РV1251С (“СОЛАР”) при длине волны 535 нм. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/л.

Для определения активности каталазы в гемолизатах использовали метод Корольюк [10], основанный на спектрофотометрической регистрации количества окрашенного продукта реакции Н₂О₂ с молибденово-кислым аммонием, имеющим максимальное светопоглощение при длине волны 410 нм. Активность каталазы выражали на г Нб (ммоль Н₂О₂/мин/г Нб). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 ммоль продукта за 1 мин в условиях испытания.

Концентрацию α-токоферола и ретинола определяли в плазме крови по методу Taylor и соавт. [11]. Метод основан на определении интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 286 нм и испускания 350 нм (для α-токоферола) и при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 470 нм (для ретинола). Измерения проводили на спектрофлуориметре СМ 2203. В контрольную пробу вместо исследуемого материала вносили аликвоту бидистиллированной воды, а в стандартную — рабочего раствора, приготовленного из стандартов α-токоферола и ретинола (“Sigma-Aldrich”), концентрацию α-токоферола и ретинола выражали в мкмоль/л.

Содержание NO в плазме крови оценивали спектрофотометрическим методом с реактивом Грисса по суммарному уровню нитратов/нитритов (NO₂⁻ + NO₃⁻ = NO_x) [12]. Интенсивность окраски определяли на спектрофотометре РV1251С при длине волны 540 нм против контрольной пробы. Суммарную концентрацию общих нитритов (NO_x) рассчитывали по калибровочному графику,

построенному с известными количествами NaNO₂. Результаты выражали в мкмоль/л. Уровень эндогенного сероводорода (Н₂S) в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и раствором N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого в присутствии хлорного железа; измерения проводили при длине волны 670 нм [13]. Концентрацию сероводорода рассчитывали по калибровочному графику, построенному с известными количествами NaHS. Результаты выражали в мкмоль/л.

Данные обрабатывали с использованием методов непараметрической статистики с применением пакета программ Statistica 10.0. Сравнение трёх и более независимых групп проводили с помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Достоверность полученных данных, с учётом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях использовали критерий Вилкоксона. Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения показателей КТФ крови в условиях воздействия озона и обработки гиперкапнической газовой смесью представлены в таблице 1.

Инкубация крови с озоном увеличивает основные параметры, характеризующие транспорт кислорода кровью: рО₂, SO₂, р50_{реал} и р50_{станд}. Предварительная гиперкапния усиливает эффект О₃, что подтверждает рост следующих показателей: рО₂ — на 40,25%, SO₂ — на 50,08% (в обоих случаях $p < 0,05$) в сравнении с группой, образцы крови которой подвергали только озонированию. Параметр СГК р50_{реал} увеличивался на 18,27% ($p < 0,05$). При этом наблюдался сдвиг КДО вправо (рис. 1) с изменением соответствующих параметров напряжения кислорода при значениях оксигемоглобина 50 и 95%.

Показатель р50_{станд} также увеличивался. Добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в этих условиях не влияло на эффект озона на КТФ крови.

Показатели активности процессов перекисного окисления липидов представлены в таблице 2. Непосредственно при гиперкапнии не выявлено изменения данных параметров в сравнении с контролем. Озонированный изотонический раствор хлорида натрия приводил к увеличению содержания ДК и МДА в эритроцитарной массе в сравнении с контролем. Инкубация крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия в условиях предварительной гиперкапнии не вызывала рост этих параметров в сравнении с группой, образцы крови которой подвергались только озонированию. Добавление нитроглицерина (5 группа) и гидросульфида натрия (6 группа) приводило

ВЛИЯНИЕ ОЗОНА И ГИПЕРКАПНИИ НА КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ

Таблица 1. Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови в гиперкапнических условиях (Ме [25; 75])

Показатель	Контроль	Гиперкапния	Озон	Гиперкапния + озон	Гиперкапния + нитроглицерин + озон	Гиперкапния + NaHS + озон
n	10	10	10	10	10	10
SO ₂ , %	30,80 [26,00; 32,10]	46,65 [45,00; 57,40]*	32,55 [31,60; 34,50]* [#]	48,85 [41,20; 53,50]* ^Ψ	43,1 [35,80; 50,60]* ^Ψ	46,35 [39,00; 54,60]* ^Ψ
pO ₂ , мм рт.ст.	19,60 [18,50; 20,10]	33,15 [29,10; 37,60]*	24,10 [20,10; 25,80]* [#]	33,80 [30,70; 37,50]* ^Ψ	32,70 [29,60; 42,60]* ^Ψ	32,95 [30,70; 37,70]* ^Ψ
pH, ед	7,411 [7,353; 7,413]	7,241 [7,206; 7,27]*	7,434 [7,429; 7,442]* [#]	7,215 [7,202; 7,266]* ^Ψ	7,207 [7,184; 7,235]* ^Ψ	7,220 [7,166; 7,264]* ^Ψ
pCO ₂ , мм рт.ст.	34,70 [32,80; 38,70]	61,30 [58,20; 69,70]*	28,20 [27,60; 28,50]* [#]	66,15 [58,40; 69,80]* ^Ψ	67,10 [63,10; 73,30]* ^Ψ	65,05 [60,70; 82,10]* ^Ψ
HCO ₃ ⁻ , ммоль/л	21,65 [21,40; 22,40]	26,65 [26,10; 27,70]*	20,85 [20,60; 21,20]* [#]	27,20 [26,40; 27,90]* ^Ψ	27,65 [26,50; 27,90]* ^Ψ	28,6 [27,40; 29,90]* ^Ψ
TCO ₂ , ммоль/л	21,20 [20,50; 22,80]	28,65 [28,10; 29,50]*	20,90 [20,80; 22,10]* [#]	29,10 [28,20; 30,00]* ^Ψ	29,55 [28,70; 30,10]* ^Ψ	30,65 [29,40; 32,10]* ^{#Ψ}
ABE, ммоль/л	-3,20 [-3,70; -2,00]	-0,60 [-1,90; -0,20]*	-4,15 [-4,70; -3,60]* [#]	-0,10 [-1,30; 0,30]* ^Ψ	-0,35 [-1,40; 0,20]* ^Ψ	0,55 [-0,60; 1,40]* ^Ψ
SBE, ммоль/л	-1,70 [-2,40; -0,70]	-0,15 [-1,70; -0,10]	-3,25 [-3,50; -2,50]* [#]	0,15 [-0,80; 0,60]* ^Ψ	-0,65 [-1,00; 0,10]* ^Ψ	0,45 [-0,60; 0,90]* ^Ψ
SBC, ммоль/л	21,70 [21,50; 22,60]	23,6 [22,2; 24,00]*	21,80 [21,20; 22,80]	23,75 [22,90; 24,10]* ^Ψ	22,95 [22,70; 23,60]*	24,00 [22,90; 24,50]* ^Ψ
p50 _{реал} , мм рт.ст.	26,50 [26,30; 26,70]	32,27 [30,86; 33,28]*	31,90 [27,74; 36,36]*	50,18 [43,09; 53,93]* ^{#Ψ}	51,37 [41,29; 53,55]* ^{#Ψ}	49,89 [43,07; 52,89]* ^{#Ψ}
p50 _{станд} , мм рт.ст.	26,55 [26,30; 26,70]	26,95 [26,50; 27,30]	32,00 [29,80; 33,20]* [#]	41,65 [37,20; 46,50]* ^{#Ψ}	40,15 [37,00; 44,30]* ^{#Ψ}	41,95 [36,90; 47,40]* ^{#Ψ}

Примечание. Здесь и в таблицах 2-3 достоверные изменения в сравнении с группами: * — контроль; # — гиперкапния; Ψ — озон; \$ — гиперкапния + озон; Ω — гиперкапния + нитроглицерин + озон.

Таблица 2. Эффект озона на показатели перекисного окисления липидов в гиперкапнических условиях (Ме [25; 75])

Показатель	Контроль	Гиперкапния	Озон	Гиперкапния + озон	Гиперкапния + нитроглицерин + озон	Гиперкапния + NaHS + озон
n	10	10	10	10	10	10
МДА _{эп} , мкмоль/л	4,63 [4,47; 8,94]	7,36 [2,63; 8,68]	16,25 [12,62; 16,68]* [#]	15,39 [7,36; 19,73]*	15,26 [9,21; 18,15]* [#]	16,18 [9,99; 16,84]* [#]
ДК _{эп} , ЕД/мл	18,27 [17,04; 20,48]	20,04 [19,40; 29,16]	24,16 [22,91; 25,08]*	24,58 [22,25; 28,18]*	28,19 [27,41; 29,24]* ^{#Ψ\$}	28,63 [27,80; 29,56]* ^{#Ψ\$}

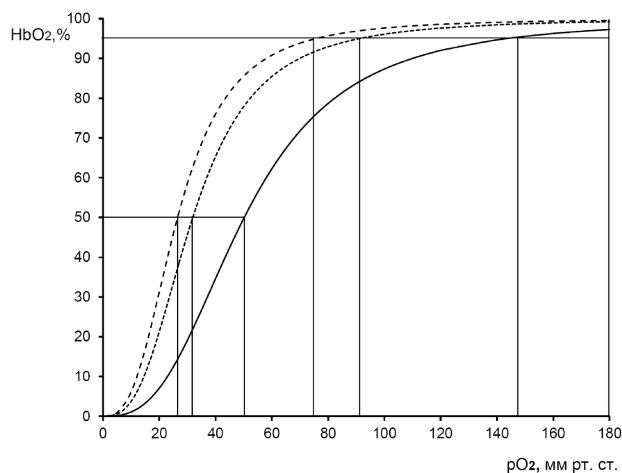


Рисунок 1. Эффект озона на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH и pCO₂ в условиях гиперкапнии: контроль (---); озон (— · — · —); гиперкапния + озон (—).

к росту ДК по сравнению с группой, в которую вводили озон, предварительно обрабатывая гиперкапнической газовой смесью.

В таблице 3 представлены показатели антиоксидантной защиты. Инкубация крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия способствует росту α-токоферола, ретинола и активности каталазы в сравнении с контролем. Озон при обработке гиперкапнической газовой смесью и добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия не вызывали изменений данных параметров в сравнении с группой, в образцы крови которой добавляли только озон.

Концентрация газотрансмиттеров NO и H₂S в плазме крови под действием O₃ возрастала в сравнении с контрольной группой (рис. 2). В условиях предварительной гиперкапнии и введения озона отмечено увеличение уровня сероводорода на 59,21% (p<0,05) без изменения содержания метаболитов NO в сравнении с группой, в образцы крови которой вводили только озон.

Таблица 3. Эффект озона на параметры антиоксидантной защиты в гиперкапнических условиях (Ме [25; 75])

Показатель	Контроль	Гиперкапния	Озон	Гиперкапния + озон	Гиперкапния + нитроглицерин + озон	Гиперкапния + NaHS + озон
n	10	10	10	10	10	10
Каталаза, ммоль H_2O_2 /мин/г Нб	10,27 [7,49; 12,03]	11,67 [9,99; 13,77]	14,09 [9,32; 19,22]*	14,11 [11,76; 15,28]*	13,94 [9,04; 15,06]*	14,29 [9,99; 15,99]*
Ретинол, мкмоль/л	0,88 [0,76; 1,03]	0,99 [0,85; 1,11]	1,10 [1,00; 1,58]*	1,14 [1,08; 1,18]*	1,13 [1,08; 1,17]*	1,18 [1,15; 1,53]* ^{#Ω}
α-токоферол, мкмоль/л	8,62 [7,25; 11,50]	10,68 [9,55; 14,84]	13,35 [11,56; 17,94]*	14,68 [14,18; 17,54]*	16,45 [14,91; 18,27]* [#]	14,98 [13,03; 16,07]*

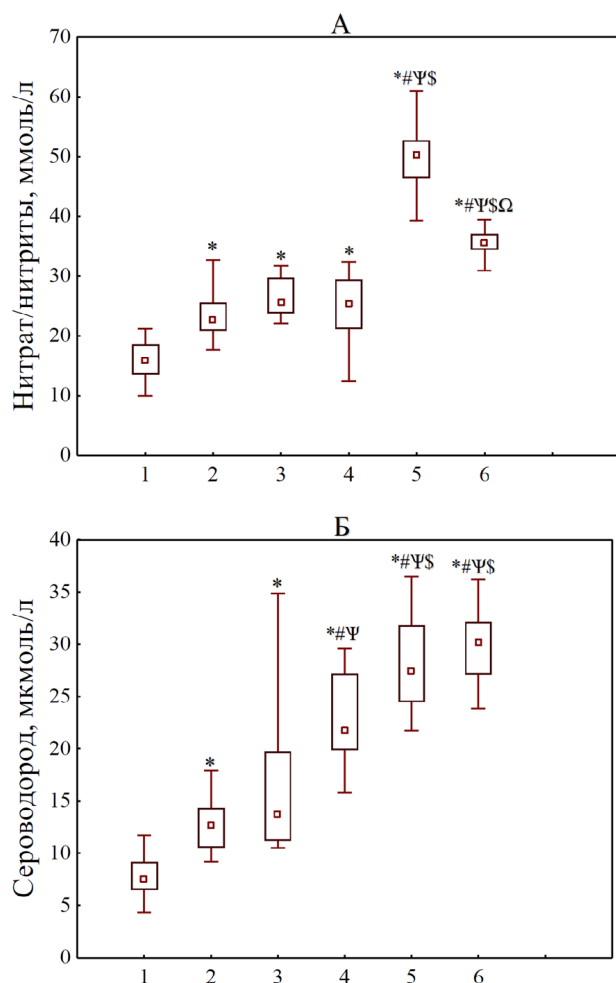


Рисунок 2. Концентрация нитратов/нитритов (А) и сероводорода (Б) в плазме крови под действием озона в гиперкапнических условиях. 1 — контроль, 2 — гиперкапния, 3 — озон, 4 — гиперкапния + озон, 5 — гиперкапния + нитроглицерин + озон, 6 — гиперкапния + NaHS + озон. Достоверные изменения в сравнении с группами: * — контроль; # — гиперкапния; Ψ — озон; \$ — гиперкапния + озон; Ω — гиперкапния + нитроглицерин + озон.

Добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в условиях гиперкапнии приводило к росту NO_x на 98,49% и 40,68% соответственно (в обоих случаях $p < 0,05$). Уровень H_2S растёт в этих группах на 25,99% и 38,33% (в обоих случаях $p < 0,05$) соответственно в сравнении

с группой озонирование в условиях гиперкапнии. Заслуживает внимания тот факт, что наиболее выраженный рост NO_x отмечается в группе с нитроглицерином, а самый высокий уровень H_2S — в группе с гидросульфидом натрия.

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 [14]. Кроме того, молекула CO_2 связывается с дезоксигемоглобином, 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 проведённых нами исследованиях снижение pH и рост pCO_2 , возникающие через реализацию механизмов эффекта Бора, приводят к усилению влияния озона на показатели КТФ крови, проявляющемся 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 как непосредственно на модификацию свойств гемоглобина, так и опосредованно — на изменение структурной организации эритроцитарной мембраны через гемоглобин-независимые механизмы. В этот процесс вовлекается и углекислый газ (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 [7], которая способствует синтезу H_2S в эритроцитах [15]. Однако в данной группе образцов

крови не обнаружено изменение содержания NO_x , что, возможно, связано с участием эритроцитарной карбоангидразы в регулировании распределения NO_x между плазмой и эритроцитами в этих условиях [16]. При добавлении нитроглицерина и гидросульфида натрия отмечен рост NO и H_2S , что обусловлено их взаимно сопряженным влиянием на синтез друг друга [17].

Значимый рост МДА и ДК, отмечаемый в исследуемых группах образцов крови, 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 ПОЛ, а нитроглицерин и гидросульфид натрия 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 [18]. 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 [19], при нейтрализации которых образуется пероксид водорода, что и приводит к возрастанию активности каталазы [20].

Таким образом, анализ полученных результатов указывает на то, что 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Гиперкапния усиливает эффект озона на КТФ крови в опытах *in vitro*, что проявляется в росте pO_2 , SO_2 , $\text{p50}_{\text{реал}}$ и $\text{p50}_{\text{станд}}$ и сдвиге КДО вправо. Добавление нитроглицерина и гидросульфида натрия в этих условиях не вызывает значимых изменений параметров кислородсвязывающих свойств крови.

2. Действие озона при гиперкапнии приводит к усилению синтеза сероводорода при отсутствии изменений концентрации нитратов/нитритов. Доноры данных газотрансмиттеров (нитроглицерин и гидросульфид натрия) увеличивают NO_x и H_2S .

3. Предварительная гиперкапния не устраняет активирующего воздействия озона на процессы свободнорадикального окисления, а введение используемых доноров газотрансмиттеров не вносит вклад в регуляцию исследуемых показателей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансирование осуществлено в рамках международного научного проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Российского фонда фундаментальных исследований “БРФФИ-РФФИ-2020” (№ М20Р-428-БРФФИ) и (№ 20-515-00019-РФФИ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментальные процедуры проведены в соответствии с требованиями Директивы Европейского Союза 2010/10/63 EU, одобрены комитетом по биомедицинской этике и деонтологии Гродненского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 14 января 2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Izadi M., Cegolon L., Javanbakht M., Sarafzadeh A., Abolghasemi H., Alishiri G., Zhao S., Einollahi B., Kashaki M., Jonaidi-Jafari N., Asadi M., Jafari R., Fathi S., Nikoueinejad H., Ebrahimi M., Imanizadeh S., Ghazale A.H. (2021) Ozone therapy for the treatment of COVID-19 pneumonia: A scoping review. *Int. Immunopharmacol.*, **92**, 107307. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107307
2. Hernández A., Viñals M., Isidoro T., Vilás F. (2020) Potential role of oxygen-ozone therapy in treatment of COVID-19 pneumonia. *Am. J. Case Rep.*, **21**, e925849. DOI: 10.12659/AJCR.925849
3. Зинчук В.В., Билецкая Е.С. (2020) Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах воздействия в опытах *in vitro*. *Биофизика*, **65**(5), 915-919. [Zinchuk V.V., Biletskaya E.S. (2020) Different dosage effects of ozone on oxygen transport in blood during *in vitro* experiments. *Biophysics*. **65**(5), 915-919.] DOI: 10.1134/S0006350920050231
4. Зинчук В.В., Фираго М.Э. (2017) Участие мелатонина в регуляции кислородтранспортной функции крови при окислительном стрессе, вызванном введением липополисахарида. *Биомедицинская химия*, **63**(6), 520-526. [Zinchuk V.V., Firago M.E. (2017) Participation of melatonin in regulation of blood oxygen-transport function in oxidative stress induced by injection of lipopolisaccharide. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **63**(6), 520-526.] DOI: 10.18097/PBMC20176306520
5. Степура Т.Л., Зинчук В.В. (2013) Модификация оксидом азота сродства гемоглобина к кислороду в различных условиях кислородного режима. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **99**(1), 111-119. [Stepuro T.L., Zinchuk V.V. (2013) Nitric oxide modification of hemoglobin oxygen affinity in different conditions of oxygen regime. *Russ. J. Physiol.*, **99**(1), 111-119.]
6. Böning D., Littschwager A., Hütler M., Beneke R., Staab D. (2014) Hemoglobin oxygen affinity in patients with cystic fibrosis. *PLoS One*, **9**(2), e97932. DOI: 10.1371/journal.pone.0097932

7. Liu T., Mukosera G.T., Blood A.B. (2020) The role of gasotransmitters in neonatal physiology. *Nitric Oxide*, **95**, 29-44. DOI:10.1016/j.niox.2019.12.002
8. Severinghaus J.W. (1966) Blood gas calculator. *J. Appl. Physiol.*, **21**(5), 1108-1116.
9. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. (1983) Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лабораторное дело*, №3, 33-36. [Gavrilov V.B., Mishkorudnaya M.I. (1983) Spectrophotometric determination of the content of lipid hydroperoxides in blood plasma. *Laboratornoe Delo*, No. 3, 33-36.]
10. Камышников В.С. (2002) Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике, 2-е изд., Беларусь, Минск 465 с. [Kamyshnikov V.S. (2002) Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics, Belarus, Minsk 465 p.]
11. Taylor S.L., Lamden M.P., Tappel A.L. (1976) Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids*, **11**(7), 530-538. DOI: 10.1007/BF02532898
12. Bryan N.S., Grisham M.B. (2007) Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.*, **43**(5), 645-657. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026
13. Norris E.J., Culbertson C.R., Narasimhan S., Clemens M.G. (2011) The liver as central regulator of hydrogen sulfide. *Shock*, **36**(3), 242-250. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182252ee7
14. Gutiérrez-Jiménez E., Angleys H., Rasmussen P.M., Mikkelsen I.K., Mouridsen K., Østergaard L. (2018) The effects of hypercapnia on cortical capillary transit time heterogeneity (CTH) in anesthetized mice. *J. Cerebral Blood Flow Metabolism*, **38**(2), 290-303. DOI: 10.1177/0271678X17692598
15. Jin Z., Zhang Q., Wondimu E., Verma R., Fu M., Shuang T., Arif H.M., Wu L., Wang R. (2020) H₂S-stimulated bioenergetics in chicken erythrocytes and the underlying mechanism. *Am. J. Physiol.: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **319**(1), 69-78. DOI: 10.1152/ajpregu.00348.2019
16. Tsikas D., Suttmöller K., Maassen M., Nacke M., Böhmer A., Mitschke A., Konrad H., Starke H., Hummler H., Maassen N. (2013) Even and carbon dioxide independent distribution of nitrite between plasma and erythrocytes of healthy humans at rest. *Nitric Oxide*, **31**, 31-37. DOI: 10.1016/j.niox.2013.03.002
17. Lo Faro M.L., Fox B., Whatmore J.L., Winyard P.G., Whiteman M. (2014) Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*, **41**, 38-47. DOI: 10.1016/j.niox.2014.05.014
18. Белых И.А. (2007) Влияние малых доз озона на гипертонический лизис эритроцитов. Проблемы криобиологии, **17**(3), 237-242. [Belykh I.A. (2007) The use of low doses of ozone on hypertonic lysis of erythrocytes. *Problems of Cryobiology*, **17**(3), 237-242.]
19. Akbudak I.H., Kucukatay V., Kilic-Erkek O., Ozdemir Y., Bor-Kucukatay M. (2019) Investigation of the effects of major ozone autohemotherapy application on erythrocyte deformability and aggregation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **71**(3), 365-372. DOI: 10.3233/CH-180417
20. Орлов Ю.П. (2008) Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов в развитии органических дисфункций при критических состояниях. Общая реаниматология, **4**(2), 88-93. [Orlov Yu.P. (2008) Intravascular hemolysis of erythrocytes in the development of organ dysfunctions in critical conditions. *General Resuscitation*, **4**(2), 88-93.] DOI: 10.15360/1813-9779-2008-2-88

Поступила в редакцию: 01. 02. 2022.
После доработки: 14. 04. 2022.
Принята к печати: 19. 04. 2022.

FEATURES OF OZONE EFFECT ON THE OXYGEN-DEPENDENT BLOOD PROCESSES UNDER HYPERCAPNIA CONDITIONS

V.V. Zinchuk, E.S. Biletskaya*, I.E. Gulyai

Grodno State Medical University,
80 Gorky str., Grodno, 230009 Belarus; *e-mail: biletskaya.e@inbox.ru

The aim of this work is to study of ozone effect on blood oxygen-dependent processes under hypercapnia conditions. The studied blood samples are pretreated with a hypercapnic gas mixture followed by the addition of ozonized isotonic sodium chloride solution (with an ozone concentration of 6 mg/l), as well as gaseous transmitters donors, nitroglycerin and sodium hydrosulfide. It has been established that hypercapnia enhanced the ozone effect on the blood oxygen transport function and was characterized by the oxyhemoglobin dissociation curve shift to the right, also increased hydrogen sulfide synthesis and absence of changes in the nitrates/nitrites concentration. Under these conditions nitroglycerin and sodium hydrosulfide did not change the parameters of the blood gas transport function, but increased the level of nitrate/nitrite and hydrogen sulfide. Preliminary hypercapnia does not eliminate the activating effect of ozone on the free radical oxidation processes, and the addition of the applied gaseous transmitter donors does not contribute to the regulation of the studied parameters.

Key words: ozone; hypercapnia; carbon dioxide; gaseous transmitter; nitrogen monoxide; hydrogen sulfide

Funding. This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research and the Russian Foundation for Basic Research "BRFFR-RFFR-2020" (Project No. M20R-428-BRFFR) and (Project No. 20-515-00019-RFBR).

Received: 01.02.2022; revised: 14.04.2022; accepted: 19.04.2022.