

## ВЛИЯНИЕ ОЗОНИРОВАННОГО РАСТВОРА КРЕБСА НА ТОНИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И $\beta$ -АДРЕНОРЕАКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ ТРАХЕИ КРОВЫ

Сизова Е.Н., Циркин В.И., Костяев А.А.

*Вятский социально-экономический институт, Кировская государственная медицинская академия, Вятский государственный гуманитарный университет, Кировский НИИ гематологии и переливания крови, Киров*

**Озонированный ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) раствор Кребса не влиял на базальный тонус продольных полосок ( $n=21$ ) трахеи 5 коров, а также на их тонус, вызванный ацетилхолином ( $10^{-6}$  г/мл), но в 43% опытов достоверно уменьшал релаксирующий эффект адреналина ( $10^{-7}$  г/мл), т.е. проявлял  $\beta$ -адреноблокирующий эффект. Это свойство озона необходимо учитывать при нормировании условий труда в производствах с повышенным образованием озона и при озонотерапии.**

Озон является постоянным компонентом атмосферного воздуха, при этом его концентрация как поллютанта особенно высока в мегаполисах [18]; он также образуется при УФ-обработке операционных, проведении физиопроцедур [3,4] и при работе множительной техники [1,4]. Озон оказывает как положительное, так и отрицательное действие на организм (прежде всего, на дыхательную систему), что зависит от его концентрации, длительности контакта и других факторов [1]. В частности, при длительном воздействии озон вызывает фиброз паренхимы легких, способствует злокачественной трансформации легочных клеток [15], повышает проницаемость гематопаренхиматозного барьера за счет активации фагоцитарной активности нейтрофилов, которые усиливают цитолиз эпителиоцитов дыхательных путей [17,19]. При ингаляции озона снижаются бронхиальная проходимость [12], максимальное транспульмональное давление, дыхательный объем, минутная вентиляция легких, возрастает частота дыхания и повышается неспецифическая реактивность дыхательных путей на различные раздражители [1,11,13]. Эти негативные влияния объясняются повышением уровня простагландинов, эйкозаноидов и высвобождением гистамина из тучных клеток [1,4], а также развитием воспаления в дыхательных путях под влиянием интерлейкина-8 [16].

С другой стороны, известно, что озонотерапия в последние годы используется для лечения заболеваний дыхательной системы (параназальных синуситов, туберкулеза легких, бронхиальной астмы, хронического обструктивного брон-

хита, пневмонии) [2,6], сердечно-сосудистой системы (ишемическая болезнь сердца) [10], центральной и периферической нервной системы [4], репродуктивной системы [5] и других систем [4], а также для коррекции акушерских аномалий [5]. Положительное влияние озонотерапии объясняется способностью озона оказывать иммуностимулирующие, бактерицидные, вируцидные и фунгицидные эффекты [1,14]. В связи с перспективностью озонотерапии, в том числе в лечении заболеваний дыхательных путей, а также с расширением производств, связанных с повышенным образованием озона, и ростом концентрации озона в местах проживания в работе была поставлена цель изучить влияние озона на сократительную активность и  $\beta$ -адренореактивность гладких мышц дыхательных путей.

### Методика исследований

Эксперименты проведены на 21 продольных полосках (длиной в 8-10 мм, шириной в 2-3 мм) трахеи 5 коров, иссеченных из дорсальной стенки биоптата трахеи между хрящевыми полукольцами. Регистрацию сократительной активности полосок проводили по методике [7,9] с использованием 6-канального «Миоцитографа» при  $38^\circ\text{C}$  в условиях пассивной аэрации рабочих камер «Миоцитографа» при скорости перфузии раствора Кребса, равной 0,7 мл/мин, и исходной нагрузке в пределах 500 мгс (4,9 мН).

Проведено 2 серии экспериментов. В серии 1 изучали влияния озонированного раствора Кребса ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) на базальный тонус полосок. Схема опытов предусматривала 30-минутную перфузию полоски обычным раствором Кребса, по-

сле которой проводилось 10-15-минутное воздействие озонированным раствором Кребса. В серии 2 исследовали влияние озонированного раствора Кребса ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) на тоническую активность, вызванную ацетилхолином ( $10^{-6}$  г/мл), а также на  $\beta$ -адренореактивность полосок, которую оценивали по реакции на адреналин ( $10^{-7}$  г/мл) на фоне сокращения, вызванного ацетилхолином. Во всех опытах использовали раствор Кребса (рН-7,4), содержащий (в мМ): NaCl-136, KCl-4,7, CaCl<sub>2</sub>-2,52, MgCl<sub>2</sub>-1,2, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0,6, NaHCO<sub>3</sub>-4,7, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>-11. Озонированный раствор Кребса готовили путем 20-минутного барботирования стандартного раствора Кребса озонкислородной смесью, получаемой с помощью медицинского озонатора типа «Озон-М-50», в которой содержание озона достигало  $5 \times 10^{-3}$  г/л. Согласно расчетам [3], концентрация озона в таком растворе спустя 1-3 часа после барботирования удерживается на уровне  $5 \times 10^{-7}$  г/мл. Это незначительно превышает терапевтические концентрации озона, которые, согласно [3,4,10], составляют  $10^{-8} - 2 \times 10^{-8}$  г/мл. В работе применяли адреналина гидрохлорид (Россия), ацетилхолина хлорид (Россия) и обзидан (Германия), а также 100-кратные разведения сыворотки венозной крови беременных (III триместр) женщин. Результаты исследования подвергнуты статистической обработке; различия между показателями оценивали по критерию Стьюдента, считая их достоверными при  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования

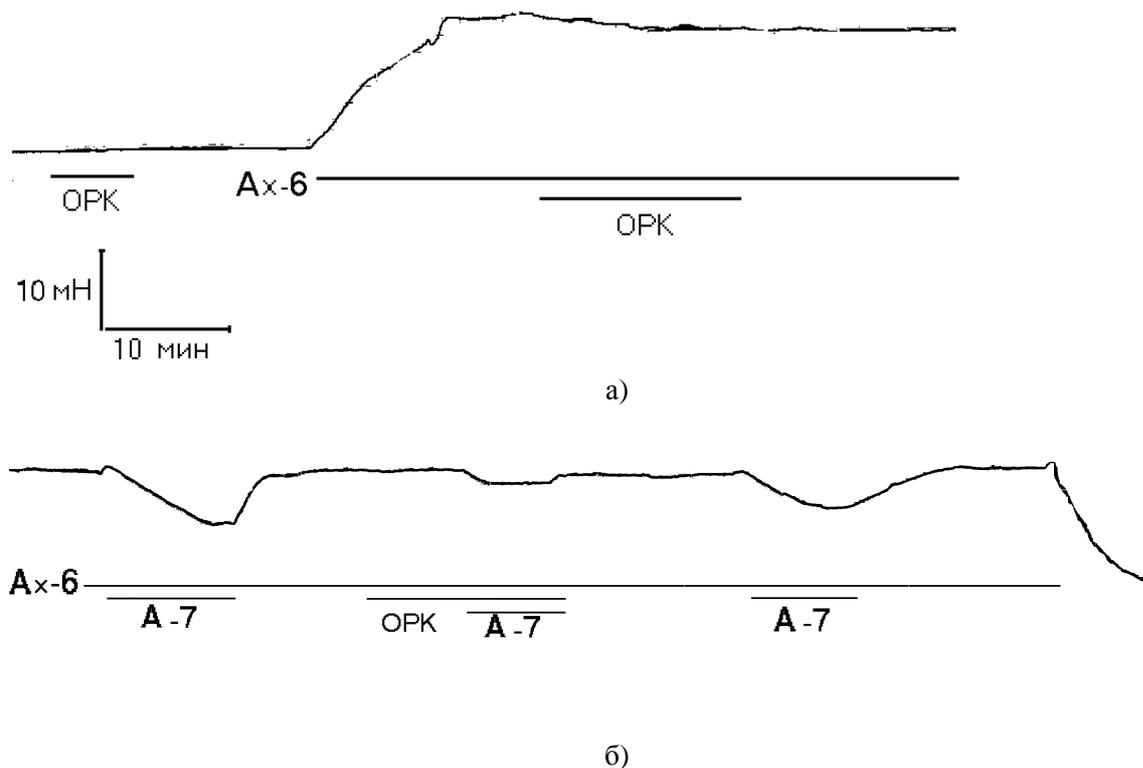
*Серия 1.* Установлено (рис.1), что при перфузии раствором Кребса полоски не развивали фазную сократительную активность и имели относительно низкий базальный тонус, что не противоречит данным литературы [8,20]. Озонированный раствор Кребса и адреналин ( $10^{-7}$  г/мл) не влияли на базальный тонус полосок.

*Серия 2.* Ацетилхолин ( $10^{-6}$  г/мл) сравнительно быстро и обратимо повышал базальный тонус полосок (рис. 1 и 2). Озонированный раствор Кребса не снижал вызванный ацетилхолином тонус (рис.1), а адреналин ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  г/мл) частично и обратимо снижал его, т.е. проявлял релаксирующий эффект (рис.1). Этот эффект адреналина ( $10^{-8}$  г/мл) возрастал под влиянием 100-кратных разведений сыворотки венозной крови (рис. 2), что можно объяснить, согласно [8,9], наличием в ней эндогенного сенсibilизатора  $\beta$ -адренорецепторов. Обзидан ( $10^{-6}$  г/мл) препятствовал проявлению релаксирующего эффекта ад-

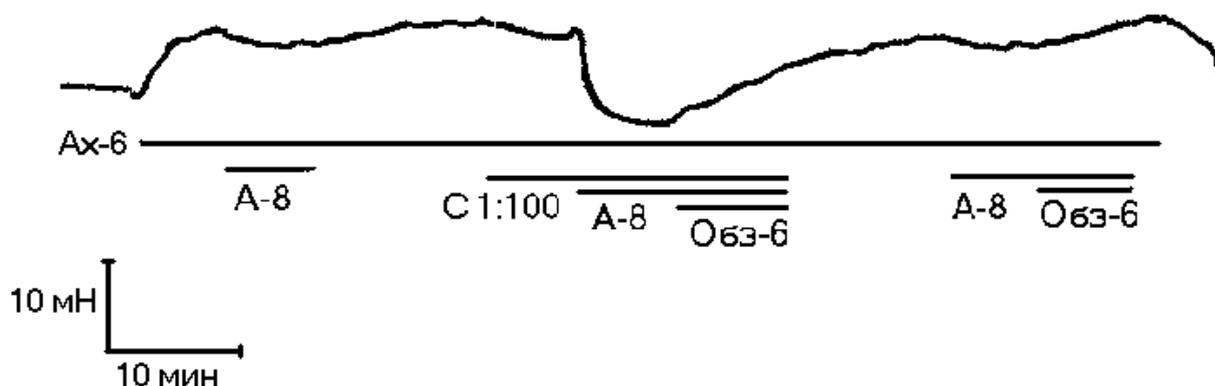
реналина и  $\beta$ -адреносенсибилизирующей активности 100-кратных разведений сыворотки крови. Это означает, что релаксирующий эффект адреналина обусловлен активацией  $\beta$ -адренорецепторов (вероятнее всего, подтипа  $\beta_2$ ) миоцитов.

Озонированный раствор Кребса в 9 опытах из 21, т.е. в 43% случаев (рис.1) снижал  $\beta$ -адренореактивность полосок (серия 2а), а в 12 опытах, т.е. в 57% случаев (серия 2б) он не влиял на нее. Действительно, в серии 2а тонус, вызванный ацетилхолином, составил  $9,41 \pm 1,89$  мН. Под влиянием адреналина он достоверно ( $p < 0,05$ ) уменьшался до  $6,27 \pm 0,93$  мН, или до  $66,6 \pm 5,21\%$  от исходного уровня. Т.е. исходная величина релаксирующего эффекта адреналина составила 3,14 мН, или 33,4% от исходного тонуса. Удаление адреналина сопровождалось восстановлением тонуса (до  $10,2 \pm 1,53$  мН). Озонированный раствор Кребса незначительно повышал тонус (до  $10,5 \pm 1,23$  мН). На фоне этого раствора адреналин ( $10^{-7}$  г/мл) снижал тонус всего до  $8,45 \pm 0,67$  мН, или до  $89,2 \pm 6,31\%$  от исходного уровня (снижение носило недостоверный характер). Следовательно, величина релаксирующего эффекта адреналина составила всего 2,05 мН, или 19,5% от тонуса, развиваемого при действии озонированного раствора Кребса. Это в 1,53 раза ( $p < 0,05$ ) меньше релаксирующего эффекта адреналина, наблюдаемого исходно.

В серии 2б тонус, вызванный ацетилхолином, составил  $5,39 \pm 0,83$  мН. Под влиянием адреналина он уменьшался до  $4,17 \pm 0,28$  мН, или до  $77,4 \pm 7,64\%$  от исходного уровня ( $p < 0,05$ ), т.е. величина релаксирующего эффекта адреналина составила 1,22 мН, или 22,6% от исходного тонуса. Удаление адреналина сопровождалось восстановлением тонуса (до  $5,54 \pm 0,56$  мН). Озонированный раствор Кребса незначительно повышал его (до  $5,60 \pm 0,48$  мН). На фоне этого раствора адреналин ( $10^{-7}$  г/мл) снижал тонус до  $4,04 \pm 0,23$  мН ( $p < 0,05$ ), или до  $74,9 \pm 6,47\%$  ( $p < 0,05$ ) от фонового уровня. Таким образом, величина релаксирующего эффекта адреналина составила 1,56 мН, или 27,9% от тонуса, развиваемого при действии озонированного раствора Кребса (различия с первым тестированием адреналина недостоверны ( $p > 0,1$ )). Следовательно, в серии 2б озонированный раствор Кребса не снижал  $\beta$ -адренореактивность полосок трахеи.



**Рис1.** Механограмма продольной полоски трахеи коровы, демонстрирующая отсутствие тонотропного эффекта и наличие  $\beta$ -адреноблокирующего эффекта озонированного ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) раствора Кребса (*а* – начало эксперимента, *б* – продолжение). Горизонтальные линии под механограммой обозначают момент воздействия ацетилхолина в концентрации  $10^{-6}$  г/мл (Ах-6), адреналина ( $10^{-7}$  г/мл; А-7) и озонированного раствора Кребса (ОРК). Калибровка - 10 мН, 10 мин.



**Рис 2.** Механограмма продольной полоски трахеи коровы, демонстрирующая  $\beta$ -адреносенсибилизирующий эффект сыворотки венозной крови и снятие данного эффекта обзиданом. Горизонтальные линии под механограммой обозначают момент воздействия ацетилхолина в концентрации  $10^{-6}$  г/мл (Ах-6), адреналина ( $10^{-8}$  г/мл; А-8), обзидана ( $10^{-6}$  г/мл; Обз-6) и 100-кратного разведения сыворотки венозной крови (С 1:100). Калибровка - 10 мН, 10 мин.

**Таблица 1.** Величина тонической активности продольных полосок трахеи коровы при действии ацетилхолина ( $10^{-6}$  г/мл), адреналина ( $10^{-7}$  г/мл) и озонированного раствора Кребса (ОРК).

| Этапы опытов  | Характер воздействия          | Величина тонической активности |   |
|---|-------------------------------|--------------------------------|---|
|   |                               | мН                             | в % к ацетилхолин-вызванному сокращению |
| Серия 2а. Наличие $\beta$ -адреноблокирующего влияния озонированного раствора Кребса (n=9). |                               |                                |   |
| 1   | Ацетилхолин                   | 9,41±1,89                      | 100±0,0                                 |
| 2   | Ацетилхолин + адреналин       | 6,27±0,93*                     | 66,6±5,21*                              |
| 3   | Ацетилхолин                   | 10,2±1,53                      | 108±8,45                                |
| 4   | Ацетилхолин +ОРК              | 10,5±1,23                      | 111±6,87                                |
| 5   | Ацетилхолин +ОРК + адреналин  | 8,45±0,67                      | 89,2±6,31 <sup>a</sup>                  |
| 6   | Ацетилхолин                   | 11,3±1,73                      | 120±11,5                                |
| 7   | Ацетилхолин + адреналин       | 6,63±0,71*                     | 70,5±8,22*                              |
| 8   | Ацетилхолин + адреналин + ОРК | 8,10±0,43                      | 86,2±6,53                               |
| Серия 2 б. Отсутствие $\beta$ -адреноблокирующего влияния озонированного Кребса (n=12).     |                               |                                |   |
| 1   | Ацетилхолин                   | 5,39±0,83                      | 100±0,0                                 |
| 2   | Ацетилхолин + адреналин       | 4,17±0,28                      | 77,4±7,64*                              |
| 3   | Ацетилхолин                   | 5,54±0,56                      | 103±7,98                                |
| 4   | Ацетилхолин + ОРК             | 5,60±0,48                      | 104±8,53                                |
| 5   | Ацетилхолин + ОРК + адреналин | 4,04±0,23*                     | 74,9±6,47*                              |

Примечание: \* - различия с тонической активностью, повышенной ацетилхолином, достоверны,  $p < 0,05$ ; <sup>a</sup> - различия со значениями 2-го этапа опыта, достоверны,  $p < 0,05$ .

### Обсуждение результатов

Итак, исследования показали, что озонированный ( $5 \times 10^{-7}$  г/мл) раствор Кребса не влияет на базальный тонус полосок трахеи коровы и их тоническую активность, вызванную ацетилхолином, но у 43% полосок он уменьшает релаксирующий эффект адреналина, т.е. снижает их  $\beta$ -адренореактивность, а у 57% полосок не влияет на нее. Это говорит о наличии в трахеи двух популяций миоцитов – соответственно чувствительных и резистентных к  $\beta$ -адреноблокирующему действию озона.

В исследованиях, проведенных нами параллельно с этими экспериментами, показано, что озонированный раствор Кребса повышает тоническую активность гладких мышц коронарной артерии свиньи и спонтанную фазную активность продольных полосок рога матки небеременных крыс, существенно снижая при этом их  $\beta$ -адренореактивность; в то же время этот раствор уменьшает спонтанную сократительную активность и  $\alpha$ -адренореактивность полосок миометрия беременных (38-40 нед.) женщин. Следовательно, влияние озонированного раствора Кребса на сократительную активность и адре-

нореактивность миоцитов зависит от видовой принадлежности, выполняемой ими функции, от их локализации и от типа доминирующей адренореактивности. С этих позиций можно утверждать, что миоциты трахеи в силу постоянного контакта с атмосферным воздухом в отличие от миоцитов коронарных артерий и матки в процессе эволюции приобрели повышенную устойчивость к миоцитотоническому и  $\beta$ -адреноблокирующему действию озона. Исходя из представлений о механизмах адренорецепции [8], полагаем, что снижение  $\beta$ -адренореактивности, происходящее под влиянием озона у 43% полосок трахеи (как и у всех полосок коронарной артерии свиньи и полосок матки крысы), обусловлено снижением эффективности передачи сигнала от  $\beta$ -адренорецепторов к внутриклеточным эффекторам. Это явление необходимо учитывать при озонотерапии, в том числе у больных, страдающих бронхиальной астмой и другими видами патологии, обусловленными недостаточностью  $\beta$ -адренергического механизма. С другой стороны, результаты наших исследований позволяют объяснить негативное влияние на человека высоких

концентраций озона, характерных для атмосферы мегаполисов [18] или для производств, связанных с повышенным образованием озона [1,4], его  $\beta$ -адреноблолирующим действием на миоциты дыхательных путей.

В целом, обнаружение способности озона оказывать  $\beta$ -адреноблолирующий эффект позволяет предложить новый принцип профилактики побочного влияния озона, заключающийся в применении сенсбилизаторов  $\beta$ -адренорецепторов, в том числе предуктала (триметазидина) и милдроната [9], а также гистидина, триптофана и тирозина [8]. В экспериментах показано, что эти вещества повышают  $\beta$ -адренореактивность миоцитов трахеи коров, коронарных артерий свиньи и матки крысы [8,9], в том числе, как недавно было установлено нами, и сниженную под влиянием озона. С учетом того, что содержание эндогенного сенсбилизатора  $\beta$ -адренорецепторов в крови у человека зависит ряда факторов, например, от пола [8], не исключаем, что другим направлением профилактики побочных эффектов озона может стать отбор лиц, устойчивых к  $\beta$ -адреноблолирующему действию озона, в том числе за счет высокого содержания в крови эндогенного сенсбилизатора  $\beta$ -адренорецепторов.

#### Список литературы

1. Алейников С.О., Чучалин А.Г. // Пульмонология.- 1997.- № 3.- С. 81.
2. Белянин И.И. // Терапевт. арх..-1997.- № 11.- С. 44
3. Бояринов Г.А., Соколов В.В. Озонированное искусственное кровообращение. Экспериментальное обоснование и результаты применения. – Н. Новгород: Изд-во «Покровка», 1999.- 317 с.
4. Густов А.В., Котов С.А., Конторщикова К.Н., Потехина Ю.П. Озонотерапия в неврологии. –Н. Новгород : Литера, 1999.- 178 с.
5. Зуев Б.М.; Побединский Н.М.; Джибладзе Т.А. // Акушерство и гинекол. .- 1998.- № 3.- С. 3.
6. Петров Г.М.; Кудрявцев Б.П.; Акулич И.И. // Воен.-мед. ж., 1996., № 12.- С. 16.
7. Циркин В.И., Дворянский С.А., Ноздрачев А.Д., и др. // Доклады РАН, 1997. – Т.352, № 1.- С. 124.
8. Циркин В.И., Дворянский С.А. Сократительная деятельность матки (механизмы регуляции).- Киров, 1997.- 270 с
9. Циркин В.И., Сизова Е.Н., Подтетенев А.Д, и др. // Российский кардиолог. ж., 2002., Т.33, № 1.- С. 45.
10. Яворская В.А., Малахов В.А., Хвсюк В.В., и др. // Місцеве та парентеральне використання озонотерапії в медицині: Сб. наукових робіт.-Харьків, 2001.- С. 45.
11. Frischer Th., Studnicka M.// Atemwegs-und Lungenkrankh., 1999.- № 6. - P. 303.
12. Hiltermann T., Stolk J., Hiemstra P., et al. //Clin. Sci.– 1995.- № 6.- P.619.
13. Hiltermann T., Peters E., Alberts B. et al. // Free Radic. Biol. and Med. – 1998.- № 6. – P. 952.
14. Gong H., Shamoo D., Anderson K., Linn W. // Arch. Environ. Health.- 1997.-. № 1.- P. 18.
15. Gustafsson L., Cotgreave I. // Scand. J. Work, Environ. and Health.- 1996.- № 1- P. 27.
16. Kopp M., Ulmer C., Seidel A. et al // Atemwegs-und Lungenkrankh – 1995 - № 6. – P. 322.
17. McDonald R., Usachenko J. // Inflammation.- 1999.- № 1. - P. 63.
18. Pope C., Schwartz J., Ransom M. // Energ.-sante .- 1999.- № 1.- P. 57.
19. Qu Qing Shan; Chen Lung Chi // Amer. J. Physiol., 1995.- № 4. – P.558
20. Tessier G., Lackner P., O'Grandy S. // Respir. Physiol.-1991.- Vol. 84, № 1.- P. 105.

### **Influence of ozonized Krebs' solution on tonic activity and $\beta$ -adrenoreactivity smooth muscles of a cow trachea**

E.N.Sizova, V.I. Tsirkin, A.A. Kostjaev

Ozonized ( $5 \times 10^{-7}$  g/ml) Krebs' solution did not influence on basal tone of longitudinal tracheas stripes ( $n=21$ ) of 5 cows, and also on their tone caused asetilcholin ( $10^{-6}$  g/ml), but in 43% of experiences authentically reduced the relaxatory effect of adrenaline ( $10^{-7}$  g/ml), i.e. showed  $\beta$ -adrenoblokatory effect. This property of ozone is necessary for taking into account at normalization of working conditions in manufactures with the raised formation of ozone and at ozonotherapy.