

КОРРЕКЦИЯ ОЗОНИРОВАННОЙ ЭРИТРОЦИТНОЙ МАССОЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ И СТРУКТУРЫ МИОКАРДА ПОСЛЕ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРИ

© А. В. Дерюгина,¹ Г. А. Бояринов,² И. С. Симулис,³ В. О. Никольский,²
А. Б. Кузнецов,² Т. С. Ефимова¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950,

²Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ, Нижний Новгород, 603950, и

³Городская клиническая больница № 40, Нижний Новгород, 603083;
* электронный адрес: derugina69@yandex.ru

Ранний посттрансфузионный период после острой кровопотери с использованием эритроцитной массы без озона характеризовался снижением электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ), концентрации АТФ, 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), активности $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$, повышением уровня малонового диальдегида (МДА) и активности каталазы в эритроцитах с постепенным восстановлением исследуемых показателей к 5-м сут наблюдения при сохранении сниженной концентрации 2,3-ДФГ на протяжении всего эксперимента. Через 1 ч после трансфузии озонированной эритроцитной массы в эритроцитах, циркулирующих в сосудистом русле, возрастала концентрация 2,3-ДФГ, через 24 ч увеличивались активность каталазы, ЭФПЭ и концентрация АТФ, а через 5 сут — активность $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$. Эти величины сохранялись до конца эксперимента на более высоком уровне по сравнению с показателями у животных, которым осуществляли трансфузию неозонированной эритроцитной массы. Улучшая метаболическое состояние эритроцитов, озонированная эритроцитная масса способствовала более раннему восстановлению кислородтранспортной функции крови и вследствие этого ограничивала повреждение микроциркуляторного русла миокарда и кардиомиоцитов при кровопотере.

Ключевые слова: кровопотеря, миокард, озон, эритроцитная масса, эритроциты.

Принятые сокращения: 2,3-ДФГ — 2,3-дифосфоглицерат, МДА — малоновый диальдегид, ПОЛ — перекисное окисление липидов, ЭФПЭ — электрофоретическая подвижность эритроцитов.

Основным звеном патогенеза кровопотери является уменьшение объема циркулирующей крови, что вызывает снижение адаптационных возможностей организма, в значительной мере определяемое утратой способности обеспечивать адекватное снабжение тканей кислородом. Острая кровопотеря приводит к гипоксии, гипоксемии, анемии (Тарханов и др., 2015), развитию окислительного стресса, истощению системы антиоксидантной защиты организма (Моргунов, 2011).

Терапевтические мероприятия при кровопотере направлены на восстановление текучести и деформируемости клеточных компонентов крови. В настоящее время купирование анемии тяжелой степени у больных в критических состояниях производится в основном путем трансфузии эритроцитной массы. Однако трансфузия обычной эритроцитной массы не всегда эффективна, поскольку при ее хранении уменьшается содержание функционально и морфологически полноценных эритроцитов: снижаются деформируемость эритроцитов, уровень в них АТФ и 2,3-ДФГ (Hardy, Belisle, 2000; Bennett-Guerrero et al., 2007; Karger et al., 2012). Показано, что озонотерапия при кровопотере улучшает микроциркуляцию и теку-

честь крови (Richelmi et al., 1995; Viebahn-Haensler, 1998; Бояринов, Соколов, 1999), приводит к восстановлению кислородного транспорта (Крылов и др., 2014б) и улучшает кислородный метаболизм тканей (Оспанова и др., 2008; Буранова, Федорова, 2009). В результате озонотерапии наблюдается снижение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови с одновременной активацией ферментативного звена антиоксидантной защиты (Rokitansky, 1982). Кроме того, взаимодействуя с двойными связями ненасыщенных жирных кислот эритроцитарной мембраны, озон повышает ее эластичность (Исхакова, Сайфуллина, 2013).

При кровопотере утрата форменных элементов и плазмы крови неизбежно приводит к нарушению гемодинамики и кислородтранспортной функции крови и как следствие — к расстройству микроциркуляции и снижению перфузии тканей, что находит отражение в изменении морфологического строения последних. Поскольку уменьшение объема циркулирующей крови сопряжено с изменением гемодинамики, которая реализуется при непосредственном участии сердца, поддержание его стабильной насосной и сократительной функций становится

одной из основных точек приложения в условиях кровопотери. При этом изучение состояния сердца в клинике проводится в основном по анализу биохимических и биоэлектрических показателей и, как правило, на фоне массивной медикаментозной терапии, что затрудняет оценку корректирующего действия исследуемого фармакологического средства. Поэтому актуально исследование влияния озонированной эритроцитной массы на морфологию миокарда при массивной кровопотере.

Цель настоящей работы — исследовать метаболические изменения эритроцитов и структуры микроциркуляторного русла миокарда и кардиомиоцитов у крыс при кровопотере в посттрансфузионном периоде.

Материал и методика

Работа выполнена на белых нелинейных крысах массой 180—220 г. Содержание животных и манипуляции с ними осуществляли в соответствии с принципами, изложенными во Всемирной декларации прав животных (<https://belmapo.by/assets/templates/files/nauka/bioetika/4.pdf>), а также согласно приказу Министерства здравоохранения РФ № 119н от 01.04.16 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Кровопотерю создавали путем забора у крыс 3 мл крови из хвостовой артерии, что составило 35 % от объема циркулирующей крови. Животные были разделены на две группы по 15 особей в каждой. Через 1 ч после кровопотери проводили трансфузию эритроцитной массы, полученной путем смешивания аутоэритроцитов с физиологическим раствором (контрольная трансфузия, группа 1) и аутоэритроцитов с озонированным 0.9%-ным раствором NaCl (экспериментальная трансфузия, группа 2). Инфузионно-трансфузионная терапия длилась 1 ч и включала в себя введение эритроцитной массы (3.0 мл) и раствора Рингера в эквивалентном объеме.

Эритроцитную массу получали из 3 мл аутокрови животных за 3 сут до начала эксперимента. Эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором, добавляли 0.5 мл консерванта крови ЦФДА-1 (цитрат натрия, лимонная кислота, дигидрофосфат натрия, декстроза и аденин). Эритроцитную массу хранили при 4 °С. В день трансфузии 1.5 мл аутоэритроцитов смешивали с 1.5 мл физиологического раствора, который в зависимости от группы не подвергался обработке озоном (группа 1) или был озонирован (группа 2). Концентрация озона в физиологическом растворе составляла 2 мг/л. Озонирование физиологического раствора производили непосредственно перед смешиванием его с эритроцитной массой на озонотерапевтической автоматической установке УОТА-60-01-Медозон (Россия). Прибор изготовлен в соответствии с ТУ 9444-001-11441871-97 и может быть использован в медицинских учреждениях.

Забор крови для анализа проводили до кровопотери (при подготовке аутоэритроцитов) и через 1, 24 ч и 5 сут после моделирования кровопотери. На каждом этапе исследовали ЭФПЭ, концентрацию МДА, 2,3-ДФГ, АТФ, активность каталазы и $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$ в отмывтых эритроцитах. Контролем служили показатели интактных животных до кровопотери. Эритроциты отмывали путем трехкратного центрифугирования в 0.9%-ном растворе NaCl по 10 мин при 1500 об/мин (1700 г).

Измерение электрофоретической подвижности эритроцитов производили методом

микроэлектрофореза в нашей модификации (Крылов, Дерюгина, 2011). Суспензию отмывтых эритроцитов разводили 10 mM трис-HCl-буфером (pH 7.4) и измеряли ЭФПЭ, регистрируя время прохождения эритроцитами расстояния 100 мкм в Трис-HCl-буфере (pH 7.4) при силе тока 12 mA. Величину ЭФПЭ определяли по формуле $U = S/TH$, где S — расстояние, на которое перемещались клетки, T — время перемещения, H — градиент потенциала, величину которого определяли по формуле $H = I/g\chi$, где I — сила тока, g — поперечное сечение камеры, χ — удельная электропроводимость среды.

Концентрацию МДА определяли с помощью реакции с тиобарбитуровой кислотой по образованию окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при 530 нм. Для расчета концентрации МДА использовали коэффициент молярной экстинкции $E = 1.56 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Лившиц, Седельникова, 2007).

Активность каталазы анализировали по снижению пероксида водорода в пробе. Измерения проводили спектрофотометрически сразу и через 20 с после внесения H_2O_2 в кювету с пробой при длине волны 240 нм. Активность каталазы (A) рассчитывали по формуле $A = (lgE_1/E_2 \cdot 120\,000)/\text{Hb}$, где E_1, E_2 — экстинкция экспериментальной пробы сразу и через 20 с после внесения H_2O_2 , Hb — количество гемоглобина в пробе. За каталазную активность эритроцитов принимали количество мкмоль H_2O_2 , преобразуемого ферментом в единицу времени (1 мин), рассчитанное на 1 мг Hb в пробе, т. е. мкмоль/мин на 1 мг Hb (Beers, Sizer, 1952).

Измерение концентрации АТФ и 2,3-ДФГ проводили неэнзиматическим методом. Отмытые эритроциты (1 мл) гемолизировали холодной дистиллированной водой (2 мл) в течение 20 мин, белки осаждали двумя объемами 12%-ной ТХУ, а осадок отделяли центрифугированием при 3000 об/мин (1700 г) в течение 15 мин с последующим фильтрованием надосадочной жидкости через бумажный фильтр. ТХУ-фильтрат гемолизированных эритроцитов использовали для определения АТФ и 2,3-ДФГ. При определении АТФ к 1 мл ТХУ-фильтрата добавляли 1 мл 2N HCl и проводили гидролиз на кипящей водяной бане в течение 7 мин с последующим охлаждением и нейтрализацией равным объемом 2N NaOH. Определяли неорганический фосфор (Фн), в состав которого входил Фн, отщепившийся от АТФ после гидролиза, и Фн до гидролиза (Виноградова и др., 1980). Для определения 2,3-ДФГ из ТХУ-фильтрата гемолизированных эритроцитов удаляли нуклеотиды (АТФ, АДФ и АМФ) путем адсорбции на активированном угле с последующим центрифугированием. В супернатанте (0.5 мл) определяли Фн (Фн1). Часть ТХУ-фильтрата (0.5 мл) подвергали озолению, добавляя 0.5 мл 5%-ного раствора нитрата магния, кипятили и после охлаждения содержимое пробирки растворяли в 0.5 мл 0.36 N H_2SO_4 . В 0.5 мл супернатанта измеряли Фн (Фн2). Определяли Фн, регистрируя плотность окраски на фотометре КФК-3 при длине волны 660 нм. Концентрацию Фн определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор KH_2PO_4 . Расчет концентрации 2,3-ДФГ проводили по формуле $[(\text{Фн1} \cdot 100) - (\text{Фн2} \cdot 10)]/2$ (Бояринов и др., 2016).

Каталитическую активность $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФазы}$ определяли по приросту Фн при инкубации гемолизированных эритроцитов в изотонической среде (Казеннов и др., 1984). В качестве гемолизирующей среды использовали 10 mM Трис-HCl-буфер и 1 mM ЭДТА. Стандартная инкубационная среда для определения активности

фермента содержала (в мМ): 100 Na⁺, 20 K⁺, 3 Mg²⁺, 50 Трис-НСl, рН 7.4 и 3 АТФ. К инкубационной среде, включающей в себя 1.2 мл Трис-НСl, 0.2 мл MgCl₂, 0.2 мл NaCl, 0.2 мл Kcl и 0.2 мл АТФ, добавляли 0.5 мл гемолизата эритроцитов. В пробу сравнения добавляли 1 мл 20%-ной ТХУ (контроль на реактивы). Пробы инкубировали на водяной бане 30 мин при 37 °С. Для остановки реакции в экспериментальную пробу добавляли ТХУ. Экспериментальную и контрольную пробы центрифугировали 20 мин при 1500 об/мин (1700 g) и в 2 мл ТХУ-фильтрата определяли количество Фн фотоколориметрически, как описано выше. Активность Na⁺-K⁺-АТФазы выражали в мкмоль Фн, образующегося в ходе ферментативной реакции за 1 ч на 1 мл суспензии цельных эритроцитов. Объем введенных в пробу эритроцитов рассчитывали по гематокриту суспензии эритроцитов после последнего промывания и удаления надосадочной жидкости.

Через 5 сут посттрансфузионного периода на фоне внутрибрюшинного введения тиопентала натрия (100 мг/кг) осуществляли декапитацию крыс, проводили срединную торакотомию и извлекали сердце. Гистологические препараты для светооптической микроскопии фиксировали в течение 72—96 ч в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм изготавливали на микротоме SAKURA ACCU-CUT SRM 200, Model: CRM 200 CW (Китай) и окрашивали гематоксилином и эозином. Для получения морфометрических показателей и регистрации изображений использовали микровизор Vizo-103. Поля зрения на срезе выбирали по методу случайных чисел (Автандилов, 1990).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов прикладных программ Biostat и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики. Результаты представлены в виде среднего арифметического и его ошибки. Для проверки гипотезы о типе распределения применяли метод Шапиро—Уилка. Поскольку распределение признаков соответствовало

нормальному, использовали параметрический критерий Стьюдента, вероятность различий оценивали при $P \leq 0.05$.

Результаты и обсуждение

Через 1 ч после проведения инфузионно-трансфузионной терапии эритроцитарной массой как без предварительного озонирования (группа 1), так и после ее обработки озоном (группа 2) регистрировали уменьшение концентрации АТФ в эритроцитах. При этом в группе 1 снижение концентрации АТФ наблюдали на протяжении 24 ч после трансфузии эритроцитарной массы с восстановлением показателя до значений интактных животных через 5 сут. Динамика активности Na⁺-K⁺-АТФазы совпала с изменением концентрации АТФ в клетках. Содержание 2,3-ДФГ снижалось на протяжении всего срока наблюдения с максимальным уменьшением его величины на 5-е сут посттрансфузионного периода относительно показателей интактных животных (см. таблицу).

Трансфузия озонированной эритроцитарной массы животным (группа 2) при первоначально сниженных активности Na⁺-K⁺-АТФазы и концентрации АТФ приводила к восстановлению их значений до уровня интактных животных через 24 ч эксперимента с последующим возрастанием активности Na⁺-K⁺-АТФазы и содержания АТФ через 5 сут посттрансфузионного периода относительно значений интактных животных. Концентрация 2,3-ДФГ после введения озонированной эритроцитарной массы повышалась через 1 ч эксперимента с постепенным восстановлением показателя в течение 5 сут посттрансфузионного периода (см. таблицу).

Динамика изменений ЭФПЭ, активности про- и антиоксидантных процессов при кровопотере характеризовалась снижением электроотрицательности мембран эритроцитов и усилением процессов липопероксидации, стимулирующих увеличение активности антиоксидантного фермента каталазы. Трансфузия озонированной эритроцитарной массы на начальном этапе эксперимента (1 ч) бо-

Динамика метаболических показателей и электрофоретической подвижности эритроцитов крыс после трансфузии неозонированной (Э-1) и озонированной (Э-2) эритроцитарной массы

Показатель	Трансфузия	До кровопотери (интактные)	Посттрансфузионный период		
			1 ч	24 ч	5 сут
АТФ, мкмоль Фн · мл ⁻¹	Э-1	2.05 ± 0.21	1.27 ± 0.09 ^а	1.17 ± 0.14 ^а	2.02 ± 0.64
	Э-2	2.47 ± 0.21	1.72 ± 0.16 ^{а, б}	2.19 ± 0.43 ^{а, б}	3.02 ± 0.20 ^{а, б}
2,3-ДФГ, мкмоль Фн · мл ⁻¹	Э-1	2.25 ± 0.35	2.74 ± 0.33	1.89 ± 0.47	1.16 ± 0.14 ^а
	Э-2	2.30 ± 0.55	4.18 ± 0.42 ^{а, б}	2.09 ± 0.35	1.83 ± 0.54
Na ⁺ -K ⁺ -АТФаза, мкмольФн · мл ⁻¹ · ч ⁻¹	Э-1	2.70 ± 0.12	2.37 ± 0.33	2.15 ± 0.07 ^а	2.99 ± 0.97
	Э-2	2.72 ± 0.51	2.40 ± 0.32	2.52 ± 0.36	3.37 ± 0.58 ^а
МДА, нмоль · мл ⁻¹	Э-1	0.99 ± 0.05	1.21 ± 0.08 ^а	0.97 ± 0.07	0.92 ± 0.06
	Э-2	1.12 ± 0.08	1.32 ± 0.09 ^а	1.22 ± 0.08 ^б	1.12 ± 0.09
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ · мин ⁻¹ на 1 мг Hb	Э-1	29.31 ± 3.16	55.08 ± 4.55 ^а	36.32 ± 3.66	35.00 ± 5.11
	Э-2	29.70 ± 1.91	40.92 ± 3.50 ^{а, б}	59.36 ± 2.72 ^{а, б}	71.30 ± 4.47 ^{а, б}
ЭФПЭ, мкМ · см · В ⁻¹ · с ⁻¹	Э-1	0.95 ± 0.04	0.92 ± 0.02	0.78 ± 0.01 ^а	0.93 ± 0.04
	Э-2	0.88 ± 0.02	0.82 ± 0.03 ^{а, б}	0.89 ± 0.01 ^б	1.21 ± 0.06 ^{а, б}

^а Отличие по отношению к показателям до кровопотери и ^б отличие трансфузии Э-2 от трансфузии Э-1 при $P < 0.05$.

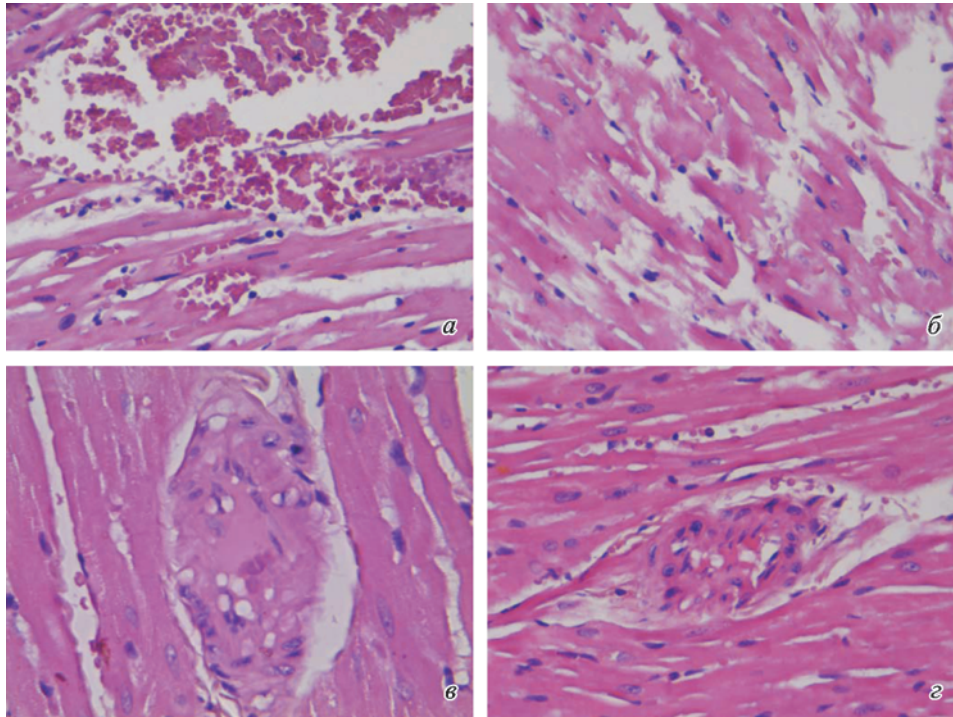


Рис. 1. Структура миокарда левого желудочка животных после трансфузии неозонированной эритроцитной массы на 5-е сут посттрансфузионного периода.

a — массивные и диапедзные очаги кровоизлияний, сильно выраженный перичеллюлярный и периваскулярный отек; *б* — зоны пересокращений и разрывов кардиомиоцитов, диапедзные кровоизлияния; *в* — гиалиновый тромб в артериоле, полностью обтурирующий ее просвет, отек эндотелия и сильно выраженный периваскулярный отек; *г* — смешанный тромб в артериоле, частично перекрывающий ее просвет, отек эндотелия и сильно выраженный периваскулярный отек. Об. 20×.

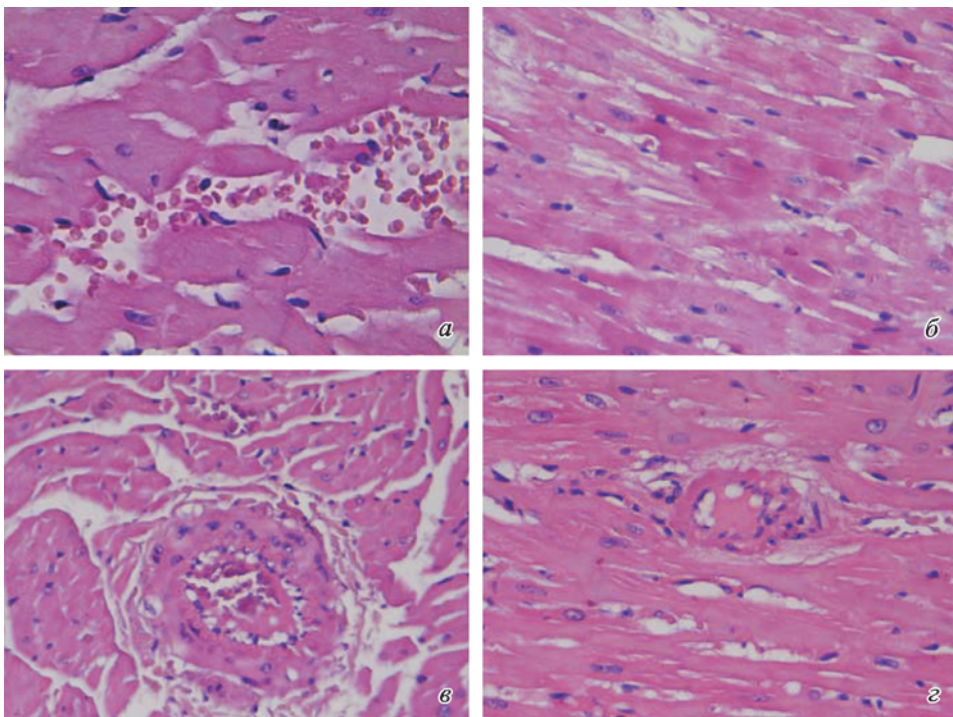


Рис. 2. Структура миокарда левого желудочка животных после трансфузии озонированной эритроцитной массы на 5-е сут посттрансфузионного периода.

a — диапедзные кровоизлияния, перичеллюлярный отек; *б* — зоны пересокращения кардиомиоцитов, единичные разрывы отдельных волокон; *в* — пристеночный смешанный тромб в артериоле, частично перекрывающий ее просвет, отек эндотелия и сильно выраженный периваскулярный отек; *г* — гиалиновый тромб в артериоле, частично обтурирующий ее просвет, отек эндотелия и сильно выраженный периваскулярный отек. Об. 20×.

лее значимо по сравнению с группой 1 увеличивала концентрацию МДА и понижала поверхностный заряд эритроцитарной мембраны, что проявлялось в снижении их ЭФПЭ. Через 24 ч после трансфузии озонированной эритроцитарной массы регистрировали увеличение активности каталазы и рост ЭФПЭ, более выраженный по сравнению с группой 1. Такая направленность исследуемых показателей поддерживалась 5 сут посттрансфузионного периода (см. таблицу).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что при острой кровопотере наблюдается стереотипная реакция организма, связанная с активацией процессов ПОЛ, инициация которого сопряжена с целым комплексом неспецифических изменений структуры и функции клеточных мембран. Влияние ПОЛ на структуру и состояние мембран обусловлено изменениями липидной фазы, в частности, значительно снижаются количество жидких липидов в бислое и количество иммобилизованных мембранными белками липидов, резко возрастает доля плотноупакованных липидов и увеличивается жесткость мембраны (Блума и др., 1992). Реактивные альдегиды, включая МДА, модифицируют белки, что сопровождается нарушением структуры макромолекул и дезорганизует их функционирование (Дубинина, Пустынина 2007). Так, продукты ПОЛ образуют сшивки с гемоглобином, спектрином, актином и анкирином, а также с белками полос 3, 4.1 и 4.9, ассоциированных с цитоскелетом мембраны эритроцита (Shacter, 2000). Модифицирующее влияние структуры мембранных белков и липидов проявляется в понижении ЭФПЭ (Крылов, Дерюгина, 2011). Кроме того, дезорганизация липидов, являющихся субстратом ПОЛ и ферментативного гидролиза, приводит к нарушению работы мембранно-связанных энзимов (Анисимова и др., 2006; Крылов и др., 2014а). В частности, применительно к нашему исследованию, снижается активность $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ}$ азы и, вероятно, ферментов гликолиза, что отражается на уменьшении концентрации АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах.

Влияние озона определяет оптимизацию работы про- и антиоксидантных систем клеток. Озониды, образующиеся при взаимодействии озона с двойными связями жирных кислот, сначала запускают прооксидантные процессы клеток (Cardendale, Griffiths, 1993). Цепи жирных кислот при воздействии озона частично разрываются, образуются пероксиды, при этом структура эритроцита становится более эластичной (Richelmi et al., 1995; Алясова и др., 2016). Короткоцепочечные пероксиды активируют работу антиоксидантной системы (Густов и др., 1999). Пероксиды проникают во внутриклеточное пространство, по крайней мере частично, и тем самым влияют на метаболизм эритроцитов. Показано, что при озонотерапии происходит усиление гликолиза, снижается ацидоз клеток (Бояринов, Соколов, 1999; Фисталь, Носенко, 2007).

В нашей работе использование озонированной эритроцитарной массы, вероятно, сопровождается перечисленными выше процессами, что определяет повышение электроотрицательности мембран эритроцитов и рост концентрации АТФ и 2,3-ДФГ. Повышение электроотрицательности клеток способствует снижению агрегации, а рост содержания АТФ и 2,3-ДФГ — увеличению деформации эритроцитов и облегчению отдачи кислорода тканям организма (Крылов и др., 2014б). В свою очередь эти процессы оказывают влияние на гемодинамику, а значит, на перфузию тканей организма, улучшая ее.

Для подтверждения сказанного нами были проведены морфологические исследования ткани миокарда животных обеих серий на 5-е сут посттрансфузионного периода.

На 5-е сут инфузионно-трансфузионной терапии у крыс группы 1 в миокарде при световой микроскопии определялись очаги диапедезных и массивных кровоизлияний, сильно выраженный перичеллюлярный и периваскулярный отек (рис. 1, а), зоны пересокращений и разрывов кардиомиоцитов (рис. 1, б). В просвете артериол определялись смешанные тромбы, частично перекрывающие их просвет (рис. 1, в), в некоторых артериолах выявлялись гиалиновые тромбы, полностью перекрывающие их просвет (рис. 1, г), во всех сосудах наблюдали отек эндотелия и сильно выраженный периваскулярный отек.

У животных экспериментальной группы с использованием озонированной эритроцитарной массы на 5-е сут посттрансфузионного периода в миокарде не наблюдали массивных кровоизлияний; имели место лишь диапедезные кровоизлияния, сильно выраженный перичеллюлярный отек (рис. 2, а), отмечались зоны пересокращений кардиомиоцитов, однако разрывы их были единичными (рис. 2, б). В части артериол определяли смешанные тромбы, частично перекрывающие их просвет (рис. 2, в), в небольшой части артериол встречались гиалиновые тромбы, не полностью обтурирующие их просвет (рис. 2, г), во всех сосудах выявлялись сильно выраженные периваскулярный отек и отек эндотелия.

Таким образом, сравнение метаболических показателей эритроцитов крыс при моделировании кровопотери и оценка морфологической структуры ткани миокарда свидетельствуют о том, что восполнение острой кровопотери озонированной эритроцитарной массой позволило снизить степень проявлений тканевой гипоксии, улучшало реологические свойства крови и микроциркуляцию миокарда в посттрансфузионном периоде. Интенсифицированная за счет использования озона микроциркуляция миокарда ограничивала в посттрансфузионном периоде повреждение архитектоники микроциркуляторного русла в миокарде и нарушения в кардиомиоцитах, способствовала более быстрому и полному восстановлению структурной целостности органелл сердечных клеток. Исходя из этого можно говорить о том, что предварительная обработка трансфузируемой эритроцитарной массы озоном оказывает кардиопротекторное действие.

Список литературы

- Автандилов Г. Г. 1990. Медицинская морфометрия: руководство. М.: Медицина. 384 с. (Avtandilov G. G. 1990. Medical morphometry: guide. Moscow: Medicine. 384 p.)
- Алясова А. В., Ведунова М. В., Мищенко Т. А., Терентьев И. Г., Цыбусов С. Н., Контрощикова К. Н. 2016. Влияние озона и доxorубина на жизнеспособность и морфологию злокачественных клеток печени. Современные технологии в медицине. 8 (2) : 84—89. (Alyasova A. V., Vedunova M. V., Mishchenko T. A., Terentev I. G., Tsybusov S. N., Kontorshchikova K. N. 2016. Effect of ozone and doxorubicin on the viability and morphology of malignant liver cells. Modern Technol. Med. 8 (2) : 84—89.)
- Анисимова А. В., Кузин В. М., Колесникова Т. И., Гусев Е. И. 2006. Компьютерная морфоденситометрия эритроцитов в диагностике и прогнозе хронической ишемии головного мозга. Инсульт. 18 : 36—46. (Anisimova A. V., Kuzin V. M., Kolesnikova T. I., Gusev E. I. 2006. A computer morfodensitometriya

of erythrocytes in diagnostics and the forecast of chronic ischemia of the main brain. *Insult*. 18 : 36—46.)

Блума Р. К., Калния И. Э., Иванова С. М. 1992. Исследование структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов с помощью флуоресцентных зондов ДСМ и ДСП-6. Биол. мембраны. 9 (5) : 47—52. (Bluma R. K., Kalniya I. E., Ivanova S. M. 1992. A research of structurally functional properties of membranes of erythrocytes by means of fluorescent probes DSM and DSP-6. *Biol. membr.* 9 (5) : 47—52.)

Бояринов Г. А., Дерюгина А. В., Яковлева Е. И., Зайцев Р. Р., Шумилова А. В., Бугрова М. Л., Бояринова Л. В., Филиппенко Е. С., Соловьева О. Д. 2016. Фармакологическая коррекция микроциркуляции крыс, перенесших черепно-мозговую травму. Цитология. 58 (8) : 610—617. (Boyarinov G. A., Deryugina A. V., Yakovleva E. I., Zaitsev R. R., Shumilova A. V., Bugrova M. L., Boyarinova L. V., Filippenko E. S., Soloveva O. D., 2017. Pharmacological correction of microcirculation in rats suffered from traumatic brain injury. *Cell Tissue Biol. (Tsitologiya)*. 11 (1) : 65—72.)

Бояринов Г. А., Соколов В. В. 1999. Озонированное искусственное кровообращение. Нижний Новгород. 318 с. (Boyarinov G. A., Sokolov V. V. 1999. The ozonized artificial blood circulation. *Nizhny Novgorod*. 318 p.)

Буранова Ф. Б., Федорова Т. А. 2009. Медицинский озон в терапии плацентарной недостаточности у беременных после экстракорпорального оплодотворения. Вестн. Рос. ун-та дружбы народов. Медицина. 3 : 79—80. (Buranova F. B., Fedorova T. A. 2009. Medical ozone in therapy of placentary insufficiency at pregnant women after extracorporal fertilization. *Bulletin of the Russian Peoples' Friendship University. Medicine*. 3 : 79—80.)

Виноградова И. Л., Багрянцева С. Ю., Держиз Г. В. 1980. Метод одновременного определения 2,3 ДФГ и АТФ в эритроцитах. Лаб. дело. 7 : 424—426. (Vinogradova I. L., Bagryantseva S. Yu., Derviz G. V. 1980. Method of simultaneous determination of 2,3 DPG and ATP in erythrocytes. *Laboratory Work (Russ.)*. 7 : 424—426.)

Густов А. В., Котов С. А., Конторщикова К. Н., Потехина Ю. П. 1999. Озонотерапия в неврологии. Нижний Новгород. 243 с. (Gustov A. V., Kotov S. A., Kontorschikova K. N., Potekhina Yu. P. 1999. Ozonotherapy in neurology. *Nizhny Novgorod*. 243 p.)

Дубинина Е. Е., Пустынина А. В. 2007. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях. Биомед. химия. 53 (4) : 351—372. (Dubinina E. E., Pustynina A. V. 2007. Free-radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological conditions. *Biomed. Chem. (Russ.)*. 53 (4) : 351—372.)

Исхакова Р. Р., Сайфуллина Ф. Р. 2013. Озонотерапия в офтальмологии. Казан. мед. журн. 94 (4) : 510—516. (Iskhakova R. R., Saifullina F. R. 2013. Ozonotherapy in Ophthalmology. *Kazan. Med. J. (Russ.)*. 94 (4) : 510—516.)

Казеннов А. М., Маслова М. Н., Шалабодов А. Д. 1984. Исследование активности Na,K-АТФазы в эритроцитах млекопитающих. Биохимия. 49 (7) : 1089—1094. (Kazennov A. M., Maslova M. N., Shalabodov A. D. 1984. Study of the activity of Na, K-ATPase in erythrocytes of mammals. *Biokhimiya. (Russ.)*. 49 (7) : 1089—1094.)

Крылов В. Н., Дерюгина А. В. 2011. Изменение электрофоретической подвижности изолированных эритроцитов при действии стресс-факторов. Гематол. трансфузиол. 5 : 18—21. (Krylov V. N., Deryugina A. V. 2011. Effects of stress factors on electrophoretic mobility of isolated erythrocytes. *Hematol. Transfusiol. (Russ.)*. 5 : 18—21.)

Крылов В. Н., Дерюгина А. В., Константинова А. И. 2014а. Электрофоретическая подвижность и активность Na,K-АТФазы эритроцитов у крыс при стрессе. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 100 (11) : 1297—1302. (Krylov V. N., Deryugina A. V., Konstantinova A. I. 2014a. Electrophoretic mobility and activity of Na, K-ATPase of erythrocytes in rats under stress. *Russ. Physiol. J. named after I. M. Sechenov*. 100 (11) : 1297—1302.)

Крылов В. Н., Дерюгина А. В., Симулис И. С., Бояринов Г. А., Сениурина А. И. 2014б. Содержание АТФ и 2,3 ДФГ в эритроцитах при консервации и воздействии озона. Биомедицина. 2 : 37—40. (Krylov V. N., Deryugina A. V., Simutis I. S., Boyarinov G. A., Senyurina A. I. 2014b. Content of ATP and 2,3 DFG in erythrocytes at preservation and influence of ozone. *Bio-meditina. (Russ.)*. 2 : 37—40.)

Лившиц В. М., Седелникова В. И. 2007. Медицинский лабораторно-аналитический справочник. М.: Триада Х. 312 с. (Livshits V. M., Sedelnikova V. I. 2007. Medical laboratory and analytical reference book. Moscow: Triad X. 312 p.)

Моргунов С. С. 2011. Коррекция тканевой гипоксии процессов свободнорадикального окисления при гастродуоденальных кровотечениях. Хирургия. Журн. им. Н. П. Пирогова. 9 : 71—75. (Morgunov S. C. 2011. The correction of tissue hypoxia and free radical peroxidation by gastroduodenal bleedings. *Surgery. Magazine of N. P. Pirogov. (Russ.)*. 9 : 71—75.)

Оспанова М. А., Оспанова С. А., Ибраков Н. Е. 2008. Озон/NO-ультразвуковые технологии в комплексном лечении острых и хронических экссудативных полисинуситов. Рос. оториноларингол. 5 (36) : 51—54. (Osplanova M. A., Osplanova S. A., Ibrakov N. E. 2008. Technology ozone/NO-ultrazvukovye in complex treatment sharp and chronic the eksksudativnykh of polysinusitis. *Russ. Otorhinolaryngol.* 5 (36) : 51—54.)

Тарханов А. А., Герасимов М. В., Гребенев Е. А., Дорофеев А. В., Карташов М. В., Ковальчук Л. А. 2015. Роль предоперационной эмболии в снижении интраоперационной кровопотери и в профилактике гематологических осложнений у пациентов с метастазами почечно-клеточного рака в позвоночник. Вестн. Урал. мед. акад. науки. 3(54) : 48—55. (Tarkhanov A. A., Gerasimov M. V., Grebenev E. A., Dorofeyev A. V., Kartashov M. V., Kovalchuk L. A. 2015. The effect of pre-operative embolization of the blood loss decrease and prevention of hematological complications in patients with metastases from renal cell carcinoma in the spinal column. *Messenger Ural Med. Acad. Sci. (Russ.)*. 3 (54) : 48—55.)

Фисталь Э. Я., Носенко В. М. 2007. Патогенетическое обоснование парентерального применения озона при неотложных состояниях в комбустиологии. Медицинские неотложные состояния. 3 : 86—89. (Fistal E. Ya., Nosenko V. M. 2007. Pathogenetic justification of parenteral use of ozone at medical emergencies in combustiology. *Medical Emergency Conditions. (Russ.)*. 3 : 86—89.)

Бейерс П., Сизер И. А. 1952. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 3 : 133—140.

Bennett-Guerrero E., Veldman T. H., Doctor A., Telen M. J., Ortel T. L., Reid T. S., Mulherin M. A., Zhu H., Buck R. D., Califf R. M., McMahon T. J. 2007. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104 : 17 063—17 068.

Cardendale M. T., Griffiths J. 1993. Is there a role for medical ozone in the treatment of HIV and associated infections? *Ozone in Medicine. Proc. of the 11-th Ozone World Congress. San Francisco*. 32—37.

Hardy J. F., Belisle S. 2000. Current information on the benefits of allogeneic Blood. *TATM J.* 2 : 15—25

Karger R., Lukow C., Kretschmer V. 2012. Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. *Transfus. Med.* 39 : 277—282.

Richelmi P., Frazini M., Valdenassi L. 1995. Ossigeno-ozono terapia. Pavia—Bergamo. 134 p.

Rokitansky O. 1982. Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy. *Hospitals*. 52 : 643—647.

Shacter E. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Rev.* 32 : 307—326.

Viebahn-Haensler R. 1998. The use of ozone in medicine. *Heidelbergl.* 148 p.

CORRECTION OF METABOLIC INDICATORS OF ERYTHROCYTES
AND THE STRUCTURE MYOCARDIUM AFTER ACUTE BLOOD LOSS
USING AN OZONIZED ERYTHROCYTAL MASS

A. V. Deryugina,^{1,} G. A. Boyarinov,² I. S. Simutis,³ V. O. Nikolskiy,²
A. B. Kuznetsov,² T. S. Efimova¹*

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education,
N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950,

² State Budgetary Educational institution of Higher Professional Education «Nizhny Novgorod State Medical Academy»,
Nizhny Novgorod, 603950, and

³ State Budgetary Institution of Health Nizhny Novgorod region «City clinical hospital N 40»,
Nizhny Novgorod, 603083;

* e-mail: derugina69@yandex.ru

The early posttransfusion period after acute blood loss in the case of using erythromass without ozone was characterized by a decrease in the electrophoretic mobility of erythrocytes (EFME), ATP concentration, 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG), activity of Na⁺-K⁺-ATPase, an increased in concentration of malonic dialdehyde (MDA) and catalase activity in erythrocytes with a gradual restoration of the studied parameters to 5 days of observation while maintaining a reduced concentration of 2,3-DPG throughout the entire experiment. Transfusion of the ozonized erythrocyte mass 1 hour after its administration caused an increase in the concentration of 2,3-DPG in erythrocytes circulating in the vascular bed, 24 hours later, an increase in catalase activity, EPPE, ATP concentration, after 5 days of Na⁺-K⁺-ATPase activity and helped maintain their values until the end of the experiment at a higher level than in animals that underwent transfusion of the non-ozonized erythromass. Ozonized erythrocyte mass improves the functional metabolic state of erythrocytes and contributes to an earlier recovery of the oxygen transport function of the blood and limits the damage to the microcirculatory bed of the myocardium and cardiomyocytes during blood loss.

Key words: blood loss, myocardium, ozone, erythrocytic mass, erythrocytes.
