

## Роль трансфузии озонированной эритроцитной массы в восстановлении морфологических изменений миокарда при кровопотере

Г. А. Бояринов<sup>1</sup>, И. С. Симулис<sup>1</sup>, В. О. Никольский<sup>2</sup>, А. В. Дерюгина<sup>3</sup>,  
Л. В. Бояринова<sup>1</sup>, А. С. Гордецов<sup>1</sup>, А. Б. Кузнецов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России, Россия, 603950, ГСП-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1

<sup>2</sup> Нижегородский Областной клинический противотуберкулезный диспансер, Россия, 603093, г. Нижний Новгород, ул. Родионова, д. 198

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Россия, 603950, ГСП-20, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23

## The Role of Ozonized Erythrocytic Mass Transfusion in the Restoration of Myocardial Morphological Changes during Blood Loss (Experimental Study)

Gennady A. Boyarinov<sup>1</sup>, Ionas S. Simutis<sup>1</sup>, Viktor O. Nikolsky<sup>2</sup>, Anna V. Deryugina<sup>3</sup>,  
Ludmila V. Boyarinoва<sup>1</sup>, Alexander S. Gordetsov<sup>1</sup>, Alexander B. Kuznetsov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Health of Russia, 10/1 Minin and Pozharsky Sq., GSP-470, 603950 Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup> Nizhny Novgorod Regional Clinical Anti-tuberculosis Dispensary, 198 Rodionova Str., 603093 Nizhny Novgorod, Russia

<sup>3</sup> N. I. Lobachevsky Nizhny Novgorod National Research State University, 23 Gagarin Av., GSP-20, 603950 Nizhny Novgorod, Russia

**Цель исследования** — оценить роль трансфузии озонированной эритроцитной массы в восстановлении повреждений архитектоники микроциркуляторного русла миокарда и кардиомиоцитов при тяжелой кровопотере.

**Материал и методы.** Проведено две серии экспериментов по 17 белых беспородных крыс в каждой. Животных наркотизировали тиопенталом натрия (25 мг/кг). Кровопотерю вызывали путем забора у крыс 3 мл крови из хвостовой артерии, что составляет 35% от объема циркулирующей крови. Через час после кровопотери в контрольной серии выполняли трансфузию аутоэритроцитов с физиологическим раствором и инфузию раствора Рингера в соотношении 1:1. В опытной серии крысам вводили аутоэритроциты, обработанные озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 2 мг/л в объеме 3 мл и 3 мл раствора Рингера (соотношение 1:1). Заготовка эритроцитной массы осуществлялась из 3 мл аутокрови, взятой у животных за 3-е суток до эксперимента. На 5-е сутки посттрансфузионного периода в обеих сериях и у 5 интактных животных на фоне внутрибрюшинного введения тиопентала натрия (100 мг/кг) извлекали сердце. На исследование забирали стенку левого желудочка. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр препаратов и морфометрические исследования осуществляли на микровизоре Vizo-103.

**Результаты.** Установлено, что применение эритроцитов, обработанных озоном, для коррекции тяжелой кровопотери ограничивает в посттрансфузионном периоде уменьшение числа профилей капилляров и их диаметра, формирование смешанных и гиалиновых тромбов, частично и полностью перекрывающих просвет микрососудов, массивные кровоизлияния, снижение числа профилей ядер, периваскулярный, перичеллюлярный, перинуклеарный и внутриядерный отек миокардиальной ткани, зоны пересокращений кардиомиоцитов, с их разрывами.

**Заключение.** Положительная направленность показателей микроциркуляции, плотности васкуляризации и отека миокарда, как прогностических маркеров в оценке потенциала постгипоксической реабилитации поврежденной ткани, при восполнении кровопотери озонированной эритроцитной массой обусловлена антигипоксическим, антиоксидантным и детоксицирующим действием озона на эритроциты и продуктами его реакций — озонидами на организм крыс в посттрансфузионном периоде.

**Ключевые слова:** кровопотеря; озон; озонированная эритроцитная масса; морфология миокарда

**Purpose.** To evaluate the role of ozonized erythrocytic mass transfusion in the restoration of damages in the architectonics of myocardium microvasculature and cardiomyocytes in case of a severe blood loss.

**Materials and Methods.** Two batches of experiments were conducted, 17 white outbred rats in each. The animals were anesthetized with thiopental sodium (25 mg/kg). Blood loss was caused by taking 3ml of blood from the tail artery of rats, which is 35% of the circulating blood volume. One hour after the blood loss, transfusion of autoerythrocytes with normal saline solution and Ringer's solution infusion in 1:1 ratio was performed in the control batch. In the experimental

Адресс для корреспонденции:

Ионас Симулис  
E-mail: simutis@mail.ru

Correspondence to:

Ionas S. Simutis  
E-mail: simutis@mail.ru

batch, 3 ml of autoerythrocytes treated with ozonized saline solution with ozone concentration of 2 mg/l and 3 ml of Ringer's solution (1:1 ratio) were administered to rats. Erythrocyte mass was prepared from 3 ml of the autoblood harvested from the animals 3 days before the experiment. On a post-transfusion day 5, in both batches and in five intact animals, hearts were removed following the intraperitoneal thiopental sodium injection (100 mg/kg). The left ventricle wall specimen from each heart was removed for examination. Histologic sections were stained with hematoxylin and eosin. The preparations were visually examined and morphometric studies were performed using microvisor Vizo-103.

**Results.** It has been established that administration of ozonized erythrocyte for severe blood loss correction limited the decrease in numbers of capillary profiles and their diameters, formation of mixed and hyaline thrombi fully or partially occluding microvascular lumens, major hemorrhages and reduction of variation of nuclear profiles, decreased perivascular, pericellular, perinuclear, and endonuclear edema of myocardial tissue, cardiomyocyte overconstriction zone, and their ruptures.

**Conclusion.** The positive trends for microcirculation indices, vascularization density and myocardial edematization as prognostic markers in assessing potential posthypoxic rehabilitation of damaged tissues upon blood loss correction with ozonized erythrocyte mass might be explained by the antihypoxic, antioxidant, and detoxifying actions of ozone on erythrocytes and/or its metabolites (ozonides) in the body post-transfusion.

**Keywords:** blood loss; ozone; ozonized erythrocyte mass; myocardium morphology

DOI:10.15360/1813-9779-2018-3-27-35

## Введение

Тяжелая кровопотеря — проблема, не утрачивающая своей актуальности на фоне достижений современной реаниматологии [1, 2]. Это связано, прежде всего, с высокой летальностью, вследствие закономерно развивающейся на фоне тканевой гипоксии полиорганной недостаточности [1]. Важнейшими патогенетическими факторами ее формирования являются гиповолемия и реологические изменения крови, приводящие к микроциркуляторному блоку, а также значительное морфологическое разобщение структур тканей, обусловленное выраженным интерстициальным и внутриклеточным отеком [1, 3]. Формирующиеся в этих условиях гипоперфузия и ишемическое повреждение миокарда вместе с анемией являются причинами развития сердечной недостаточности в постгеморрагическом периоде, что в свою очередь усугубляет тканевую гипоксию и снижает эффективность интенсивной терапии [1, 3]. Учитывая многокомпонентность лечения миокардиальной дисфункции после тяжелой кровопотери, рациональным была бы модификация облигатных ее компонентов, таких как трансфузия эритроцитной массы. В исследованиях, выполненных нами ранее, была показана высокая эффективность озонирования консервированных эритроцитов *in vitro* [4–6]. В связи с этим цель исследования — оценить роль трансфузии озонированной эритроцитной массы в восстановлении повреждений архитектоники микроциркуляторного русла миокарда и кардиомиоцитов при кровопотери.

## Материал и методы

Экспериментальное исследование было выполнено на белых нелинейных крысах массой 180–220 г. Содержание животных и проводимые с ними манипуляции осуществляли в соответствии с нормативными документами, представленными в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals. ILAR publication, 1996, National

## Introduction

Severe blood loss is a problem still relevant at the background of contemporary resuscitation advances [1, 2]. This is related, firstly, to high mortality due to multiple organ failure expectedly developing at the background of tissue hypoxia [1]. Most important pathogenic factors of its formation are hypovolemia and rheological blood changes resulting in microcirculatory occlusion, also significant morphological separation of tissue structures due to prominent interstitial and intracellular edema [1, 3]. Hypoperfusion and ischemic myocardial damage combined with anemia, which form in this situation, are the reasons for cardiac failure during the posthemorrhagic period, which, in turn, aggravates tissue hypoxia and diminishes intensive care efficacy [1, 3]. Taking into account the multicomponent nature of myocardial dysfunction after a severe blood loss, modification of its obligatory components such as erythrocytic mass transfusion would be rational. Our earlier studies have demonstrated high efficacy of preserved erythrocyte ozonization *in vitro* [4–6]. In this connection, the purpose of this study is to assess the role of ozonized erythrocytic mass transfusion in the restoration of damages in the architectonics of myocardium microvasculature and cardiomyocytes in case of a blood loss.

## Materials and Methods

The experimental study was performed on white outbred rats weighting 180–220g. The animals care and manipulations with them were carried out following the regulatory documents presented in guidelines «Guide for Care and Use of Laboratory Animals. ILAR publication, 1996, National Academy Press» and requirements of Russian Health Ministry Order No. 267 dated 19.06.03 «On Approval of Good Laboratory Practice in the Russian Federation».

Blood loss was created by taking 3 ml of blood from the tail artery of rats, which is 35% of the circulating blood volume. The animals were split into 2 batches, 17 animals in each. One hour after the blood loss, transfusion of autoerythrocytes with normal saline solution and Ringer's solution

Academy Press» и требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

Кровопотерю создавали путем забора у крыс 3 мл крови из хвостовой артерии, что составляет 35% от объема циркулирующей крови. Животные были разделены на 2 серии по 17 особей в каждой. Через час после кровопотери в контрольной серии выполняли трансфузию аутоэритроцитов с физиологическим раствором и раствора Рингера в соотношении 1:1. В опытной серии крысам вводили аутоэритроциты, обработанные озонированным 0,9% раствором NaCl с концентрацией озона 2 мг/л в объеме 3 мл и 3 мл раствора Рингера (соотношение 1:1). Инфузионно-трансфузионную терапию проводили в течение 2-х часов.

Заготовку эритроцитной массы осуществляли из 3 мл аутокрови, взятой у животных за 3-е суток до эксперимента, и включали 2-х кратное отмывание эритроцитов физиологическим раствором с последующим добавлением 0,5 мл консерванта ЦФДА 1 (МНН: Натрия цитрат + Лимонная кислота + Натрия дигидрофосфат + Декстроза + Аденин). Указанную эритроцитную массу хранили в холодильнике при температуре 4°C. В день трансфузии к 1,5 мл аутоэритроцитов добавляли 1,5 мл физиологического раствора в контрольной серии и 1,5 мл озонированного 0,9% раствора NaCl — в опытной. Озонирование физиологического раствора производили непосредственно перед смешиванием его с эритроцитной массой на установке озонаторной терапевтической автоматической УОТА-60-01-«Медозон» (Россия). Последняя изготовлена в соответствии с ТУ 9444-001-11441871-97 и может быть использована в медицинских учреждениях.

На 5-е сутки посттрансфузионного периода в контрольной и опытной серии и у 5 интактных животных на фоне внутрибрюшинного введения тиопентала натрия (100 мг/кг) осуществляли декапитацию крыс, проводили срединную торакотомию, извлекали сердце. На исследование забирали стенку левого желудочка на всю толщину с прилегающей папиллярной мышцей. Гистологические препараты для светоптической микроскопии готовили путем фиксации ткани миокарда в течение 72–96 ч в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживания в спиртах восходящей концентрации и заливки в парафин. Срезы толщиной 7 мкм в количестве 5 из различных мест каждого препарата изготавливали на микротоме SAKURA ACCU-CUT SRM 200, Model: CRM 200 CW (Китай) и окрашивали гематоксилином и эозином. Просмотр гистологических препаратов, регистрацию изображений и морфометрические исследования осуществляли на микровизоре Vizo-103. На каждом срезе, в количестве 10, выбирали поля зрения по методу случайных чисел [7].

Исследовали следующие структуры в интрамуральном слое миокарда: число профилей капилляров ( $N$  на 1 мм<sup>2</sup> площади среза миокарда) их диаметр ( $d$ , мкм) и площадь ( $S$ , мкм<sup>2</sup>) поперечного сечения, число профилей ядер ( $N$  на 1 мм<sup>2</sup>) и их площадь ( $S$ , мкм<sup>2</sup>), число профилей перинуклеарного отека ( $N$  на 1 мм<sup>2</sup>) и их площадь ( $S$ , мкм<sup>2</sup>). Площадь экрана, на котором изучали вышеперечисленные показатели, составляла 500 мкм<sup>2</sup>, ув. 63х/0,85.

Статистическую обработку результатов провели с помощью пакетов прикладных программ Biostat и Microsoft Excel с использованием методов одномерной ста-

infusion in 1:1 ratio was performed in the control batch. In the experimental batch, 3 ml of autoerythrocytes treated with ozonized 0.9% NaCl solution with ozone concentration of 2 mg/l and 3 ml of Ringer's solution (1:1 ratio) were administered to rats. The infusion-transfusion therapy was conducted during 2 hours.

Erythrocytic mass was prepared from 3 ml of the autoblood taken from animals 3 days before the experiment; preparation included double washing of erythrocytes with natural saline solution followed by addition of 0.5 ml of preservative CPDA 1 (INN: Sodium Citrate + Citric Acid + Sodium Dihydrogen Phosphate + Dextrose + Adenine). The said erythrocytic mass was kept in a refrigerator at 4°C. On the transfusion day, to 1.5 ml of autoerythrocytes, 1.5 ml of natural saline solution in the control batch and 1.5 ml of ozonized 0.9% NaCl in the experimental batch was added. Saline solution was ozonized immediately before it was mixed with erythrocytic mass using automatic ozonization therapeutic unit UOTA-60-01-Medozon (Russia). The latter was made according to TU 9444-001-11441871-97 and is allowed for use in medical institutions.

On post-transfusion day 5, in the control and experimental batches and in 5 intact animals, the rats were decapitated at the background of thiopental sodium (100 mg/kg), median thoracotomy was performed and the heart was removed. For examination, the left ventricle wall to the whole thickness together with adjacent papillary muscle was taken. Histologic preparations for light-optical microscopy were prepared by myocardial tissue fixation during 72–96 hrs. in 10% neutral formalin solution, dehydration in alcohols of ascending concentrations, and paraffin embedding. 7 μm-thick sections, 5 from different parts of each preparation, were made using microtome SAKURA ACCU-CUT SRM 200, Model: CRM 200 CW (China) and stained with hematoxylin and eosin. Histologic preparations were visually examined, images were recorded, and morphometric studies were carried out with the help of microvisor Vizo-103. On each section, numbering 10, fields of vision were chosen by the random number technique [7].

The following structures in the intramural layer of myocardium were examined: the number of capillary profiles ( $N$  per 1 mm<sup>2</sup> of the myocardium section area), their diameter ( $d$ , μm), and cross-section area ( $S$ , μm<sup>2</sup>); the number of nucleus profiles ( $N$  and 1 mm<sup>2</sup>) and their area  $S$  (μm<sup>2</sup>), the number of perinuclear edema profiles ( $N$  per 1 mm<sup>2</sup>) and their area ( $S$ , μm<sup>2</sup>). The area of the screen on which the above indices were studied was equal to 500 μm<sup>2</sup>, magnification was 63x/0.85.

The results were statistically processed with the help of Biostat and Microsoft Excel applied software packages using univariate statistic methods. The results were presented as  $M \pm m$ , where  $M$  is the arithmetic mean and  $m$  is the standard error of the mean. To check the hypothesis about the type of distribution, Shapiro–Wilk test was used. Since distribution of signs corresponded to normal, statistic regularities were studied using the Student's  $t$ -test. The value of statistical significance of differences was adopted equal to  $P \leq 0.05$ .

## Results and Discussion

On day 5 of the infusion-transfusion therapy for acute blood loss, in the control batch rats, light microscopy found foci of diapedetic and major hemorrhages in myocardium, and prominent pericellular

тистики. Результаты представили в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – стандартная ошибка среднего. Для проверки гипотезы о виде распределения применяли метод Шапиро–Уилка. Поскольку распределение признаков соответствовало нормальному, изучение статистических закономерностей осуществляли с применением параметрического критерия Стьюдента. За величину уровня статистической значимости различий принимали  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

На 5-е сутки инфузионно-трансфузионной терапии острой кровопотери у крыс контрольной серии в миокарде при световой микроскопии определяли очаги диапедезных и массивных кровоизлияний, сильно выраженный перичеллюлярный отек (рис. 1,  $a_1$ ), зоны пересокращений и даже разрывов кардиомиоцитов (рис. 1,  $b_1$ ). В просвете артериол определяли смешанные тромбы, частично перекрывающие их просвет (рис. 1,  $d_1$ ), в некоторых артериолах выявляли гиалиновые тромбы, полностью перекрывающие их просвет (рис. 1,  $c_1$ ), во всех сосудах определяли отек эндотелия и сильно выраженный периваскулярный отек.

У животных опытной серии на 5-е сутки посттрансфузионного периода в миокарде не определяли массивных кровоизлияний; имели место лишь диапедезные кровоизлияния, выраженный перичеллюлярный отек (рис. 1,  $a_2$ ), отмечали зоны пересокращений кардиомиоцитов, однако, разрывы их были единичными (рис. 1,  $b_2$ ). В части артериол определяли смешанные тромбы, частично перекрывающие их просвет (рис. 1,  $c_2$ ), в небольшой части артериол встречали гиалиновые тромбы неполностью закрывающие их просвет (рис. 1,  $d_2$ ), во всех сосудах выявляли выраженный периваскулярный отек и отек эндотелия.

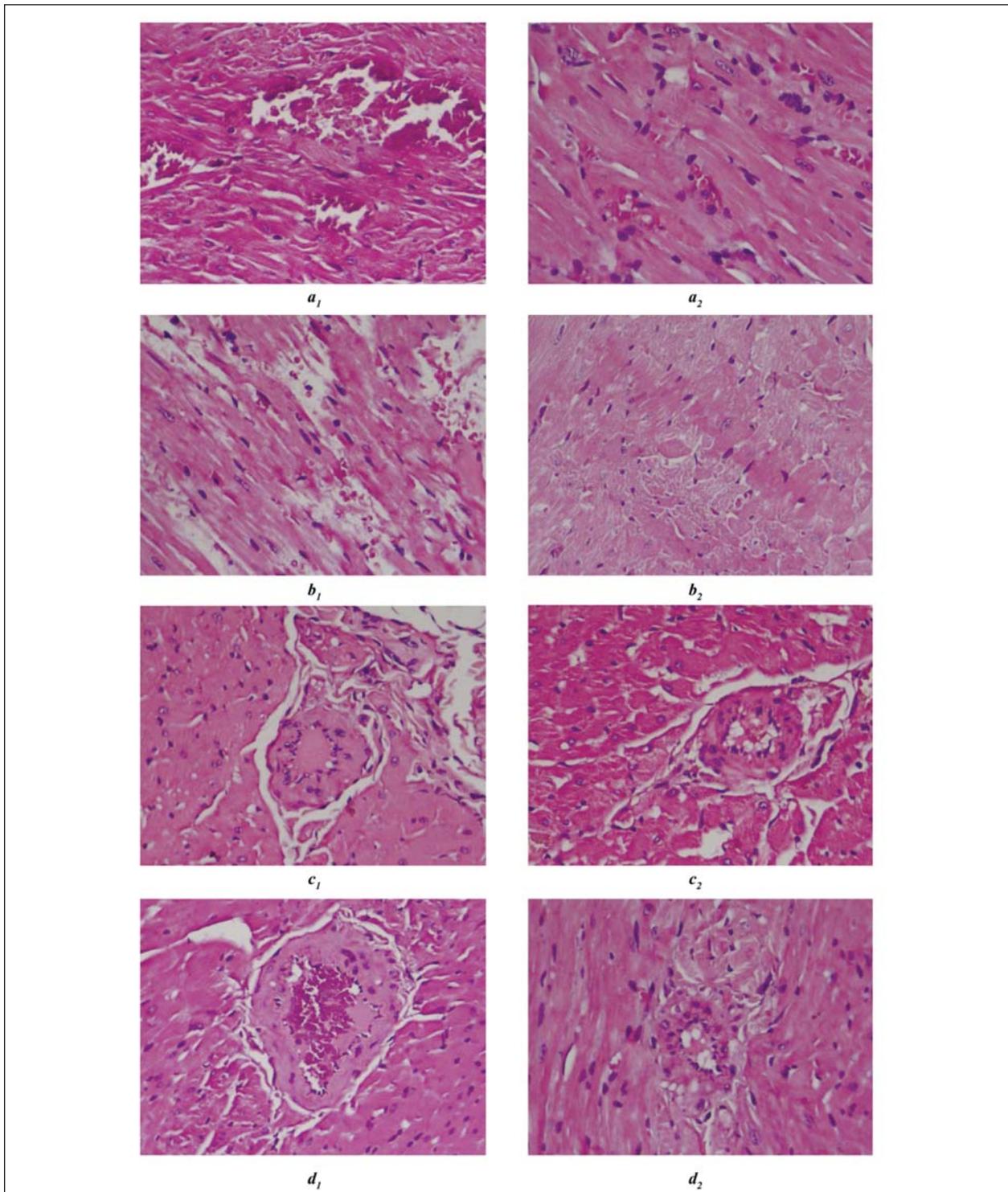
Сравнительный анализ морфометрических показателей миокарда у животных контрольной и опытной серий на 5-е сутки посттрансфузионного периода позволил оценить эффективность предварительной обработки эритроцитов озоном. Это проявлялось в определении числа профилей капилляров и их просвета на уровне интактных животных и снижении отека миокардиальной ткани относительно крыс, которым восполнение кровопотери было проведено обычной эритроцитной массой. При этом в контрольной серии число профилей капилляров и их просвет были статистически значимо уменьшенными по сравнению с их величинами у интактных и опытных животных (таблица). Число профилей ядер и их площадь в серии с озонированной эритроцитной массой определяли одинаковыми с интактными животными, но величины этих показатели статистически значимо отличались от таковых в контрольной серии. Число профилей ядер было снижено на 42%, а площадь ядра увеличена на 12,5%. Через 5 суток посттрансфузионного периода перинуклеарный

edema (fig. 1,  $a_1$ ), a zone of over-contraction and even ruptures of cardiomyocytes (fig. 1,  $b_1$ ). In the lumen of arterioles, mixed thrombuses partially occluding their lumen were detected (fig. 1,  $d_1$ ); in some arterioles, hyaline thrombuses fully occluding their lumen were identified (fig. 1,  $c_1$ ); in all vessels, endothelium edema and severe perivascular edema were determined.

In the experimental batch animals, on post-transfusion day 5, not major hemorrhages were found in myocardium; there were only diapedetic hemorrhages and prominent pericellular edema (fig. 1,  $a_2$ ); zones of cardiomyocyte over-contraction were noted, however, their ruptures were sporadic (fig. 1,  $b_2$ ). In some arterioles, mixed thrombuses partially occluding their lumen were found (fig. 1,  $c_2$ ); in a small fraction of arterioles, hyaline thrombuses partially occluding their lumen were encountered (fig. 1,  $d_2$ ); in all vessels, prominent perivascular edema and endothelium edema were observed.

A comparative analysis of myocardium morphometric indices in control and experimental animals on post-transfusion day 5 has allowed assessing the efficacy of erythrocyte pre-treatment with ozone. This manifested in the number of capillary profiles and their lumens at the level of intact animals and reduced edema of myocardial tissue versus the rats to which the blood loss was made up with conventional erythrocytic mass. In the control batch, the number of capillary profiles and their lumen were statistically significantly lower compared to those values in intact and experimental animals (table 1). The number of nuclei profiles and their areas in the ozonized erythrocytic mass batch were found to be equal to those of intact animals, but the values of these indices were statistically different from those in the control batch. The number of nuclei profiles was decreased by 42% while the nucleus area was increased by 12.5%. On the post-transfusion day 5, perinuclear edema was observed in 79.3% of cases in the control batch and in 38.8% in animals after blood loss made up with ozonized erythrocytic mass. The perinuclear edema area in the experimental batch was established to be 37.6% less versus control. A more prominent pericellular, endonuclear, and perinuclear edema of myocardial tissue in control animals versus experimental was one of the reasons for reduced number of capillary profiles per 1 mm<sup>2</sup> of the tissue under study and compression of microvessel lumen.

So, the vascularization density and myocardium edema indices, as prognostic markers in the evaluation of the potential of post-hypoxic rehabilitation of damaged tissue, evidence faster restoration of ischemically damaged cardiomyocyte structures both thanks to improved membrane elasticity of transfused erythrocytes under the effect of ozone and, probably, due to reduced expression of NO-caused reactions. As it is known that ozonides produced through ozone interaction with membranes of formed elements of blood (fig. 1), stimulate expression by endotheliocytes of nitrogen oxide,



**Рис. 1.** Структура миокарда левого желудочка контрольной (1) и опытной (2) серий животных на 5-е сутки посттрансфузионного периода.

**Fig. 1.** The structure of left ventricle myocardium of control (1) and experimental (2) animals on post-transfusion day 5.

**Note.**  $a_1$  – Focuses of diapedetic and massive hemorrhages, severe pericellular edema;  $b_1$  – cardiomyocyte over-contraction and rupture zones;  $c_1$  – arterioles with hyaline thrombuses fully occluding their lumen;  $d_1$  – mixed thrombuses in arteriole lumen, which partially occlude the lumen;  $a_2$  – Severe pericellular edema;  $b_2$  – zones of cardiomyocyte over-contraction with their sporadic ruptures;  $c_2$  – arterioles with mixed thrombuses partially occluding their lumen;  $d_2$  – arterioles with hyaline thrombuses partially occluding their lumen. Mag.  $\times 7$  approximately, lens  $\times 20$ .

**Примечание.**  $a_1$  – очаги диапедезных и массивных кровоизлияний, сильно выраженный перичеллюлярный отек;  $b_1$  – зоны пересокращений и разрывов кардиомиоцитов;  $c_1$  – артериолы с гиалиновыми тромбами, полностью перекрывающими их просвет;  $d_1$  – смешанные тромбы в просвете артериол, частично перекрывающие их просвет;  $a_2$  – выраженный перичеллюлярный отек,  $b_2$  – зоны пересокращений кардиомиоцитов, с их единичными разрывами;  $c_2$  – артериолы со смешанными тромбами, частично перекрывающие их просвет;  $d_2$  – артериолы с гиалиновыми тромбами неполностью закрывающие их просвет. УВ. Ок.  $\times 7$ , об.  $\times 20$ .

### Морфометрические показатели миокарда крыс на 5-е сутки посттрансфузионного периода. Morphometric Indices of Rat Myocardium on Post-Transfusion Day 5.

Index	Values of indexes in groups		
	Intact Animals	Control Batch	Experimental Batch
Number of capillary profiles, u/mm <sup>2</sup>	2113.1±208.9	1448.3±186.9*	2499.9±243.4 <sup>#</sup>
Capillary diameter, μm	6.2±1.1	5.0±0.8	6.7±0.7 <sup>#</sup>
Number of nuclear profiles, u/mm <sup>2</sup>	2324.4±111.0	1593.1±94.2*	2749.9±101.7* <sup>#</sup>
Capillary cross-section area, μm <sup>2</sup>	30.1±1.6	19.6±0.8*	35.2±1.9* <sup>#</sup>
Nucleus area, μm <sup>2</sup>	40.5±2.9	44.1±3.7	39.2±1.5 <sup>#</sup>
Number of profiles of perinuclear edemas, u/mm <sup>2</sup>	None	1264±36.0	1067±72.0 <sup>#</sup>
Perinuclear edema area, μm <sup>2</sup>	None	37.0±0.83	23.1±0.6 <sup>#</sup>
Perinuclear edema prevalence, %	None	79.3±3.43	38.8±6.1 <sup>#</sup>

**Note.** \* –  $P < 0.05$  of intact animals; <sup>#</sup> –  $P < 0.05$  of the control batch.

**Примечание.** Index – показатель; Values of ... in groups – показатель ... в группах; Intact Animals – интактные животные; Control Batch – контрольная серия; Experimental Batch – опытная серия; Number of capillary profiles, u/mm<sup>2</sup> – число профилей капилляров, ед./мм<sup>2</sup>; Capillary diameter, μm – диаметр капилляров, мкм; Number of nuclear profiles – число профилей ядер; Capillary cross-section area, μm<sup>2</sup> – площадь поперечного сечения капилляра, мкм<sup>2</sup>; Nucleus area – площадь ядер; Number of profiles of perinuclear edemas – число профилей перинуклеарных отеков; Perinuclear edema area – площадь перинуклеарного отека; Perinuclear edema prevalence – распространенность перинуклеарных отеков; None – нет. \* –  $p < 0,05$  от интактных животных; <sup>#</sup> –  $p < 0,05$  от контрольной серии.

отек встречали в 79,3% случаев в контрольной серии и в 38,8% – у животных после восполнения кровопотери озонированной эритроцитной массой. При этом площадь перинуклеарного отека в опытной серии определялась меньше на 37,6% по сравнению с контрольной. Более выраженный перичеселлюлярный, внутриядерный и перинуклеарный отек миокардиальной ткани у животных контрольной серии, по сравнению с опытной, явился одной из причин уменьшения числа профилей капилляров в 1 мм<sup>2</sup> исследуемой ткани и сдвигания просвета микрососудов.

Итак, показатели плотности васкуляризации и отечности миокарда, как прогностические маркеры в оценке потенциала постгипоксической реабилитации поврежденной ткани, свидетельствуют о более быстром восстановлении поврежденных ишемией структур кардиомиоцитов, как за счет улучшения эластичности мембраны трансфузируемых эритроцитов под действием озона, так, вероятно, и вследствие снижения выраженности NO-обусловленных реакций. Ибо известно, что озониды, образующиеся в результате взаимодействия озона с мембранами форменных элементов крови (рис. 1), стимулируют экспрессию эндотелиоцитами оксида азота, последний кроме вазодилатирующего эффекта, обладает мощным антиагрегантным и антиадгезивным действием на тромбоциты и другие клетки крови и, вследствие этого, оказывает благоприятное воздействие на микроциркуляцию [8–12]. В этой связи на снижение уровня постоянно синтезируемого клетками эндотелия NO указывают и выявленные нами изменения в микрососудах миокарда крыс, перенесших тяжелую кровопотерю, которые были более выражены в контрольной серии и проявлялись в уменьшении диаметра и площади поперечного сечения капилляров, отеке эндотелиоцитов, агрегации эритроцитов, образовании смешанных и гиалиновых тромбов.

the latter, in addition to its vasodilatory effect, possessing a powerful antiaggregant and antiadhesive effect on thrombocytes and other blood cells and, therefore, rendering a favorable influence on microcirculation [8–12]. In this connection, the reduced level of NO continuously synthesized by endothelial cells is also indicated by the changes we found in the myocardium microvessels of rats exposed to a severe blood loss, which were more prominent in the control batch and manifested as a smaller diameter and cross-section area of capillaries, edema of endotheliocytes, aggregation of erythrocytes, and formation of mixed and hyaline thrombuses.

Ozone's favorable effect on erythrocytes was shown in our previous papers and by other researchers as well and is explained by that their membranes contain a large quantity of phospholipids with unsaturated fatty acid chains, which double links C=C form a reactive center. In the process of ozonolysis, fatty acid chains break to produce peroxides and other compounds (ozonides), erythrocyte membrane becoming loose and elastic and deformable (fig. 2) [13, 14].

Ozonides produced penetrate into formed elements of blood and activate metabolism therein. In erythrocytes, glycolysis and pentose phosphate cycle are intensified. Because of that, synthesis of high-energy phosphates increases. ATP is generated in energy-dependent processes of erythrocytes, including by contractile proteins, which improves deformability of red cells. Activated mutase shunt of glycolysis results in increased synthesis of 2,3-BPG in erythrocytes, which improves delivery of oxygen to tissues and HbO<sub>2</sub>/Hb equilibrium shifts towards hemoglobin peroxides [15–18].

It is known that in critical conditions, a large amount of toxic substances accumulate erythrocyte membrane, which make cell membranes rigid. Ozone oxidizes these substances, promoting improved deformability of erythrocytes. Double links C=C of liposoluble toxic substances are the reactive center. In

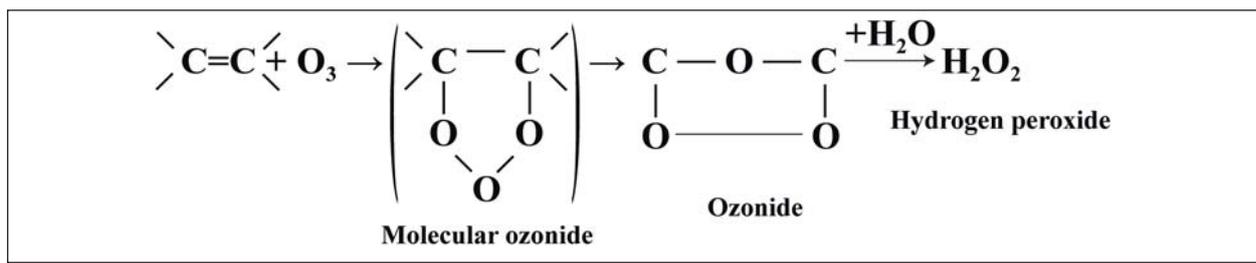


Рис. 2. Схема процесса озонлиза двойных связей цепей жирных кислот.

Fig. 2. Schematic diagram of ozonolysis of double links of fatty acid chains.

Примечание. Molecular ozonide — молекулярный озонид. Для рис. 2, 3: Hydrogen peroxide — пероксид водорода.

Благоприятное действие озона на эритроциты было показано нами в предыдущих работах, а также и другими исследователями и обусловлено тем, что их мембраны содержат большое количество фосфолипидов с ненасыщенными цепями жирных кислот, двойные связи С=С которых образуют реактивный центр. В процессе озонлиза цепи жирных кислот разрываются с образованием перекисей, пероксидов и других соединений (озонидов), а мембрана эритроцитов при этом разрыхляется и становится эластичной и деформабельной (рис. 2) [13, 14].

Образовавшиеся озониды проникают во внутрь форменных элементов крови и активируют в них метаболизм. В эритроцитах интенсифицируются гликолиз и пентозофосфатный цикл. Вследствие этого, возрастает синтез высокоэнергетических фосфатов. Образовавшаяся АТФ используется в энергозависимых процессах эритроцитов, в том числе сократительными белками, что улучшает деформабельность красных клеток. В результате активации мутазного шунта гликолиза в эритроцитах возрастает синтез 2,3-ДФГ, что облегчает отдачу кислорода тканям и равновесие  $\text{HbO}_2/\text{Hb}$  смещается в направлении восстановленного гемоглобина [15–18].

Известно, что при критических состояниях на мембране эритроцитов накапливается большое количество токсических веществ, которые и обуславливают жесткость мембран клеток. Озон окисляет эти вещества, что способствует улучшению деформабельности эритроцитов. Двойные связи С=С жирорастворимых токсических веществ являются реактивным центром. В процессе озонлиза двойные связи разрываются с образованием перекисей, пероксидов и присоединением группы ОН (рис. 3). В результате этих реакций жирорастворимые токсические вещества трансформируются в водорастворимые и выделяются с мочой, т.е. окисление ксенобиотиков озоном приводит к образованию конечных продуктов, аналогичных

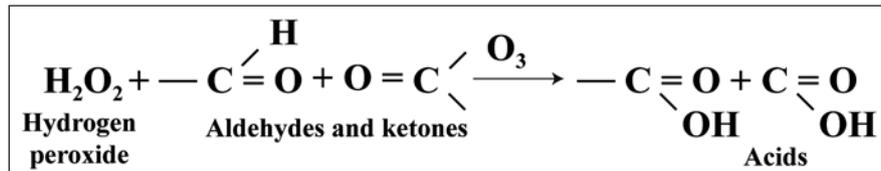


Рис. 3. Схема трансформации жирорастворимых токсических веществ под действием озона в водорастворимые.

Fig. 3. Schematic diagram of transformation of liposoluble toxic substances into water-soluble substances under the action of ozone.

Примечание. Aldehydes and ketones — альдегиды и кетоны; acids — кислоты.

the process of ozonolysis, double links break with generation of peroxides and addition of OH group (fig. 3). As a result of these reactions, liposoluble toxic substances transform into water-soluble substances and are eliminated with urine, i.e. oxidation of xenobiotics by ozone leads to production of end products similar to those that are produced through cytochrome P-450-mediated metabolism in endoplasmic reticulum of liver [16–21].

It is important to note that an excessive amount of reactive oxygen intermediates appearing due to a major blood loss renders an adverse effect on cellular membranes and capillary walls. At present, an intensive discussion is ongoing in literature concerning the three mechanisms of antioxidant protection prevailing over the action of peroxides in case of parenteral use of ozone in hemic and tissue hypoxia conditions: glutathione activation through direct and mediated influence of ozone on the expression of nrf2 factor [20, 21], liquidation of lactate acidosis accompanied with normalization of intracellular enzymatic activity including reduction of MDA in erythrocytes [11, 13, 15], intensification of glycolysis and pentose phosphate cycle accompanied with a faster correction of hypoxia-caused disergosis [14–16].

Hence, as a result of improved microcirculation, rheological properties of blood, intensified activity of erythrocytes' antioxidant system, decreased amount of toxic products on their membranes, and facilitated delivery of oxygen from oxygenated hemoglobin to cells during makeup of acute blood loss by ozonized erythrocytic mass, oxygenation of rats' organs and tissues during the post-transfusion period increases. A consequence thereof is an earlier and fuller restoration

получаемым с участием цитохрома P-450 в эндоплазматическом ретикулуме печени [16–21].

Важно отметить, что избыточное количество активных форм кислорода, возникающего в результате массивной кровопотери, оказывает отрицательное действие на мембраны клеток и стенки капилляров. В настоящее время в литературе активно обсуждается три механизма превалирования антиоксидантной защиты над действием перекисей и пероксидов при парентеральном применении озона в условиях гемической и тканевой гипоксии: активация глутатиона через прямое и опосредованное влияние озона на экспрессию *ngf2* фактора [20, 21], ликвидация лактатацидоза с нормализацией внутриклеточной ферментной активности, в том числе каталазы, со снижением содержания МДА в эритроцитах [11, 13, 15], интенсификация гликолиза и пентозофосфатного цикла, сопровождающегося более быстрой коррекцией обусловленного гипоксией дисэргоза [14–16].

Таким образом, в результате улучшения микроциркуляции, реологических свойств крови, увеличения активности антиоксидантной системы эритроцитов, уменьшения токсических продуктов на их мембране и облегчения отдачи кислорода из оксигемоглобина клеткам при восполнении острой кровопотери озонированной эритроцитной массой возрастает оксигенация органов и тканей крыс в посттрансфузионном периоде. Следствием этого является более раннее и полное восстановление патоморфологических изменений миокарда, развившихся при тяжелой кровопотере, по сравнению с животными контрольной серии. Положительная направленность указанных изменений опосредована антигипоксическим, антиоксидантным и детоксифицирующим действиями озона и продуктов его реакций — озонидов. Исходя из этого, можно говорить о кардиопротекторном действии озона при восполнении тяжелой кровопотери озонированной эритроцитной массой.

### Заключение

После коррекции тяжелой кровопотери у крыс трансфузией стандартных консервированных эритроцитов на 5-е сутки посттрансфузионного периода микроциркуляторное русло миокарда характеризуется снижением числа профилей капилляров на 31,5% и уменьшением их просвета (диаметра на 19,4%, площади поперечного сечения на 35%), изменением стенки микрососудов, которые проявляются в нарушении ее проницаемости и отеке эндотелиальных клеток. Нарушения за пределами сосудистой стенки выявляются в формировании диапедезных и массивных кровоизлияний, развитии сильно выраженного периваскулярного отека. Внутрисосудистые изменения проявляются в образовании смешанных и гиалиновых тромбов частично или полностью перекрывающих в некоторых микрососудах их просвет. Формирующиеся

of myocardial pathomorphological changes developed due to a severe blood loss compared to control animals. The positive trend of the said changes is mediated by the anti-hypoxic, antioxidant, and detoxicating effects of ozone and products of its reactions — ozonides. Based on the above, one can speak about cardio-protective action of ozone when a severe blood loss is compensated with ozonized erythrocytic mass.

### Conclusion

After correction of a severe blood loss in rats by transfusion of standard preserved erythrocytes, on post-transfusion day 5 the myocardial microvasculature is characterized by decrease of the number of capillary profiles by 31.5% and reduction of their lumen просвета (diameter — by 19.4%, cross-section area — by 35%), microvascular wall change manifesting in its impaired permeability and endothelial cell edema. Disturbances beyond the vascular wall are formation of diapedetic and massive hemorrhages, development of a severe perivascular edema. Intravascular changes manifest in formation of mixed and hyaline thromboses fully or partially occluding lumen in some microvessels. The pathomorphological disturbances of microcirculation forming in myocardium are accompanied with cardiomyocyte damage. A prominent pericellular edema, a zone of cardiomyocyte over-contraction and even rupture is noted; the number of nuclear profiles decreases by 42%, the nuclear area increases by 12.5%; in 79.3% of cases, a perinuclear edema having an area of  $37.0 \pm 0.83 \mu\text{m}^2$  are found. All above might be one of the reasons for development of cardiac failure during the post-transfusion period.

Use of erythrocytes treated with ozone to correct a severe blood loss restricts, during the post-transfusion period, damages of myocardial architectonics and microvasculature and disturbances in cardiomyocytes, and assists their earlier and fuller restoration.

патоморфологические нарушения микроциркуляции в миокарде сопровождаются повреждениями кардиомиоцитов. Определяются сильно выраженный перицеллюлярный отек, зоны пересокращений и даже разрывов кардиомиоцитов, уменьшается число профилей ядер на 42%, увеличивается площадь ядра на 12,5%, в 79,3% случаев выявляется перинуклеарный отек, площадь которого составляет  $37,0 \pm 0,83 \mu\text{m}^2$ . Все это может являться одной из причин развития сердечной недостаточности в посттрансфузионном периоде.

Применение эритроцитов, обработанных озоном, для коррекции тяжелой кровопотери ограничивает в посттрансфузионном периоде повреждения архитектоники микроциркуляторного русла в миокарде и нарушения в кардиомиоцитах, способствует более раннему и полному их восстановлению.

## Литература

1. Мороз В.В., Рыжков И.А. Острая кровопотеря: регионарный кровоток и микроциркуляция (обзор, часть I). *Общая реаниматология*. 2016; 12 (2): 66–89. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-2-56-65
2. Шифман Е.М., Куликов А.В., Беломестнов С.Р. Интенсивная терапия и анестезия при кровопотере в акушерстве. *Анестезиология и реаниматология*. 2014; 2: 76–78. PMID: 25055500
3. Мороз В.В., Рыжков И.А. Острая кровопотеря: регионарный кровоток и микроциркуляция (обзор, часть II). *Общая реаниматология*. 2016; 12 (5): 65–94. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-5-65-94
4. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Симулис И.С., Бояринов Г.А., Сенюрина А.И. Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах при консервации и воздействии озона. *Биомедицина*. 2014; 1 (2): 37–42.
5. Симулис И.С., Бояринов Г.А., Мухин А.С., Прилуков Д.Б., Дерюгина А.В. Новые возможности реабилитации консервированных эритроцитов озонотерапией. *Физиотерапия, бальнеология и реабилитация*. 2014; 6: 8–12.
6. Симулис И.С., Бояринов Г.А., Мухин А.С., Дерюгина А.В. Возможности предтрансфузионного кондиционирования консервированных эритроцитов озонотерапией. *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2016; 3 (1): 63–68.
7. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина; 1990: 384.
8. Малахов В.А., Белоус А.М., И.Н. Пастора И.Н., Дорошенко Г.И. Клеточно-метаболические аспекты патогенеза, лечения и профилактики хронических церебральных ишемий и нейродегенеративных процессов. Харьков: Ранок; 1999: 175.
9. Перетягин П.В., Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Экспериментальная оценка состояния микроциркуляции при системном введении озонированного физиологического раствора. *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2015; 2 (1): 54–61.
10. Muñoz A. Design and analysis of studies of the health effects of ozone. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101 Suppl 4: 231–235. DOI: 10.1289/ehp.93101s4231. PMID: 8206039
11. Mudd J.B., Dawson P.J., Adams J.R., Wingo J., Santrock J. Reaction of ozone with enzymes of erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 335 (1): 145–151. DOI: 10.1006/abbi.1996.0492. PMID: 8914845
12. Jacobs M.T. Adverse effects and typical complications in ozone-oxygen therapy. *Ozonachrichten*. 1983; 1: 193–201.
13. Разумовский С.Д., Зайков Г.Е. Озон и его реакции с органическими соединениями. М.: Наука; 1974: 312.
14. Buyuklu M., Kandemir F.M., Set T., Bakirci E.M., Degirmenci H., Hamur H., Topal E., Kucukler S., Turkmen K. Beneficial effects of ozone therapy on oxidative stress, cardiac functions and clinical findings in patients with heart failure reduced ejection fraction. *Cardiovasc. Toxicol.* 2017; 17 (4): 426–433. DOI: 10.1007/s12012-017-9400-8. PMID: 28097518
15. Алехина С.П., Щербатюк Т.Г. Озонотерапия: клинические и экспериментальные аспекты. Нижний Новгород: Литтерра; 2003: 240.
16. Бояринов Г.А., Соколов В.В. Озонированное искусственное кровообращение (экспериментальное обоснование и результаты клинического применения). Нижний Новгород: Покровка; 1999: 318.
17. Rokitsansy O. Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy. *Hospitalis*. 1982; 52: 643–647.
18. Бояринов Г.А., Векслер Н.Ю., Бояринова Л.В., Ахмеров Ф.Ш., Юрьев М.Ю., Горячев М.Е. Детоксицирующее действие озона. *Казанский мед. журнал*. 2007; 88 (4): 261–263.
19. Векслер Н.Ю., Бояринов Г.А., Макаров Н.А., Мухин А.С., Германова Т.А., Частов В.П. Коррекция эндотоксикоза направленным воздействием на токсические агенты. *Рос. мед. журнал*. 2004; 3: 29–32.
20. Векслер Н.Ю., Бояринов Г.А., Макаров Н.А., Мухин А.С., Частов В.П., Буровкин Б.А., Смирнов Н.Ф., Петрова Л.А. Коррекция эндотоксикоза в комплексной интенсивной терапии острого деструктивного панкреатита. *Рос. мед. журнал*. 2004; 4: 14–17.
21. Re L., Rowen R., Travagli V. Ozone therapy and its use in medicine: further comments. *Cardiology*. 2017; 136 (4): 269. DOI: 10.1159/000452618. PMID: 27894109

Поступила 20.03.18

## References

1. Moroz V.V., Ryzhkov I.A. Acute blood loss: regional blood flow and microcirculation (review, part I). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2016; 12 (2): 66–89. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-2-56–65. [In Russ., In Engl.]
2. Shifman E.M., Kulikov A.V., Belomestnov S.R. Intensive care and anesthesia for blood loss in obstetrics. *Anesteziologiya i Reanimatologiya*. 2014; 2: 76–78. PMID: 25055500. [In Russ.]
3. Moroz V.V., Ryzhkov I.A. Acute blood loss: regional blood flow and microcirculation (review, part II). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2016; 12 (5): 65–94. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-5-65-94. [In Russ., In Engl.]
4. Krylov V.N., Deryugina A.V., Simutis I.S., Boyarinov G.A., Senyurina A.I. Contents of ATP and 2,3-DPG in erythrocytes for preservation and ozone exposure. *Biomeditsina*. 2014; 1 (2): 37–42. [In Russ.]
5. Simutis I.S., Boyarinov G.A., Mukhin A.S., Prilukov D.B., Deryugina A.V. The new possibilities for the rehabilitation of conserved erythrocytes with the use of ozone. *Fizioterapiya, Balneologiya i Reabilitatsiya*. 2014; 6: 8–12. [In Russ.]
6. Simutis I.S., Boyarinov G.A., Mukhin A.S., Deryugina A.V. Possibilities of pre-transfusion conditioning of packed erythrocytes with ozone. *Bioradikaly i Antioksidanty*. 2016; 3 (1): 63–68. [In Russ.]
7. Avtandilov G.G. Medical morphometry. Leadership. Moscow: Meditsina Publishers; 1990: 384. [In Russ.]
8. Malakhov V.A., Belous A.M., Pasyura I.N., Doroshenko G.I. Cell-metabolic aspects of pathogenesis, treatment and prevention of chronic cerebral ischemia and neurodegenerative processes. Kharkov: Ranok; 1999: 175. [In Russ.]
9. Peretyagin P.V., Martusevich A.K., Peretyagin S.P. Experimental evaluation of the microcirculation state in the systemic administration of ozonized saline. *Bioradikaly i Antioksidanty*. 2015; 2 (1): 54–61. [In Russ.]
10. Muñoz A. Design and analysis of studies of the health effects of ozone. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101 Suppl 4: 231–235. DOI: 10.1289/ehp.93101s4231. PMID: 8206039
11. Mudd J.B., Dawson P.J., Adams J.R., Wingo J., Santrock J. Reaction of ozone with enzymes of erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 335 (1): 145–151. DOI: 10.1006/abbi.1996.0492. PMID: 8914845
12. Jacobs M.T. Adverse effects and typical complications in ozone-oxygen therapy. *Ozonachrichten*. 1983; 1: 193–201.
13. Razumovsky S.D., Zaikov G.E. Ozone and its reactions with organic compounds. Moscow: Nauka; 1974: 312. [In Russ.]
14. Buyuklu M., Kandemir F.M., Set T., Bakirci E.M., Degirmenci H., Hamur H., Topal E., Kucukler S., Turkmen K. Beneficial effects of ozone therapy on oxidative stress, cardiac functions and clinical findings in patients with heart failure reduced ejection fraction. *Cardiovasc. Toxicol.* 2017; 17 (4): 426–433. DOI: 10.1007/s12012-017-9400-8. PMID: 28097518
15. Alekhina S.P., Shcherbatyuk T.G. Ozone therapy: clinical and experimental aspects. Nizhny Novgorod: Litterra; 2003: 240. [In Russ.]
16. Boyarinov G.A., Sokolov V.V. Ozonized artificial circulation (experimental substantiation and results of clinical application). Nizhny Novgorod: Pokrovka; 1999: 318. [In Russ.]
17. Rokitsansy O. Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy. *Hospitalis*. 1982; 52: 643–647.
18. Boyarinov G.A., Veksler N.Yu., Boyarinova L.V., Akhmerov F.Sh., Yuryev M.Yu., Goryachev M.E. Detoxifying effect of ozone. *Kazansky Meditsinsky Zhurnal*. 2007; 88 (4): 261–263. [In Russ.]
19. Veksler N.Yu., Boyarinov G.A., Makarov N.A., Mukhin A.S., Germanova T.A., Chastov V.P. Correction of endotoxemia by the oriented action on toxic agents. *Rossiyskiy Meditsinsky Zhurnal*. 2004; 3: 29–32. [In Russ.]
20. Veksler N.Yu., Boyarinov G.A., Makarov N.A., Mukhin A.S., Chastov V.P., Burovkin B.A., Smirnov N.F., Petrova L.A. Correction of endotoxemia within the complex intensive therapy for acute destructive pancreatitis. *Rossiyskiy Meditsinsky Zhurnal*. 2004; 4: 14–17. [In Russ.]
21. Re L., Rowen R., Travagli V. Ozone therapy and its use in medicine: further comments. *Cardiology*. 2017; 136 (4): 269. DOI: 10.1159/000452618. PMID: 27894109.

Received 20.03.18