

Морфологические и метаболические показатели эритроцитов при обработке озоном эритроцитной массы

А. В. Дерюгина¹, Г. А. Бояринов², И. С. Симутис³,
Л. В. Бояринова², Н. А. Азов²

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Россия, 603950, ГСП-20, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23

² Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России, Россия, 603950, ГСП-470, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1

³ Нижегородская Городская клиническая больница № 40, Россия, 603083, г. Нижний Новгород, ул. Героя Юрия Смирнова, д. 71

Morphological and Metabolic Parameters of Red Blood Cells after Their Treatment with Ozone

Anna V. Deryugina¹, Gennady A. Boyarinov², Ionas S. Simutis³,
Larisa V. Boyarinoва², Nikolai A. Azov²

¹ N. I. Lobachevsky Nizhny Novgorod National Research State University, 23 Gagarin Av., 603950, GSP-20 Nizhny Novgorod, Russia

² Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Health of Russia, 10/1 Minin and Pozharsky Sq., 603950, GSP-470 Nizhny Novgorod, Russia

³ Nizhny Novgorod Municipal Clinical Hospital No. 40, 71 Hero Yury Smirnov Str., 603083 Nizhny Novgorod, Russia

Цель исследования. Изучение морфологии эритроцитов и сопряженности морфологических показателей с процессами липопероксидации и содержанием органических фосфатов в эритроцитах при обработке эритроцитной массы разных сроков хранения озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 2 мг/л.

Материалы и методы. Исследовали морфологию эритроцитов крови человека, концентрацию в них малонового диальдегида (МДА), активность каталазы, содержание АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3ДФГ) до и после обработки эритроцитной массы сроком хранения 7, 14, 21 и 30 суток озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 2 мг/л.

Результаты исследования. Действие озона (2 мг/л) *in vitro* на эритроцитную массу 7–21 суток хранения способствовало восстановлению формы эритроцитов, увеличивало в них синтез АТФ и 2,3ДФГ, оптимизировало процессы перекисного окисления липидов. При сроках хранения эритроцитной массы 30 суток озон не оказывал выраженного положительного влияния на изучаемые показатели.

Заключение. Обработка эритроцитной массы озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 2 мг/л вызывала восстановление содержания дискоцитов за счет оптимизации процессов липопероксидации в мембранах клеток и увеличивала синтез органических фосфатов вследствие активизации гликолиза и пентозо-фосфатного шунта, что может быть использовано для улучшения морфологического и метаболического статуса эритроцитной массы перед ее трансфузией.

Ключевые слова: эритроциты; озон; морфология; перекисное окисление липидов; метаболизм

The purpose of the study was to assess the morphology of red blood cells (RBC) and the association of morphological parameters with lipid peroxidation processes and the content of organic phosphates in RBC when treating packed red blood cells with the ozonized saline solution (with an ozone concentration of 2 mg/l) after different storage periods.

Materials and methods. The morphology of human RBC, the concentration of malonic dialdehyde (MDA) in RBC, the catalase activity, the concentration of ATP and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) were studied before and after treatment of RBC with the ozonized saline (with the ozone concentration of 2 mg/l) after 7, 14, 21 and 30 days of storage.

Results. The effect of ozone (2 ng/l) *in vitro* on the packed red blood cells after 7–21 days of storage contributed to the recovery of RBC shape, increased the concentration of ATP and 2,3-DPG, and optimized the lipid peroxidation. Ozone did not demonstrate a pronounced positive effect on these parameters when the packed RBCs were stored for 30 days.

Адресс для корреспонденции:

Анна Дерюгина
E-mail: derugina69@yandex.ru

Correspondence to:

Anna Deryugina
E-mail: derugina69@yandex.ru

Conclusion. The treatment of the packed RBCs with the ozonized saline solution (with the ozone concentration of 2 mg/l) contributed to the recovery of the discocyte count due to optimization of lipid peroxidation processes in cell membranes and enhanced the synthesis of organic phosphates in cells due to the activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. This can be used to improve the morphological and metabolic status of the packed RBCs before their transfusion.

Keywords: red blood cells; ozone; morphology; lipid peroxidation; metabolism

DOI:10.15360/1813-9779-2018-1-40-49

Введение

Одномоментная потеря 30–50% объема циркулирующей крови (ОЦК) сама по себе обычно не является непосредственной угрозой для жизни, но предвещает начало тяжелых осложнений, с которыми организм самостоятельно справиться не может. Лишь потеря не более 25% ОЦК может быть компенсирована организмом самостоятельно за счет защитно-приспособительных механизмов. Наиболее действенным средством, если кровопотеря значительна, является проведение трансфузии эритроцитной массы и восстановление органического кровотока (перфузии) путем достижения необходимого ОЦК. Одним из факторов, компенсирующих последствия анемии, является также и увеличение коэффициента утилизации кислорода тканями.

Однако известно, что при хранении эритроцитной массы происходит уменьшение концентрации АТФ и 2,3ДФГ в эритроцитах, увеличение в них содержания калия и лактата [1–4]. Через сутки хранения ухудшается кислородтранспортная функция эритроцитов [5]. Ко 2-й неделе хранения эритроцитной массы отмечается снижение деформируемости эритроцитов [6]. При этом сохраняющиеся эритроциты образуют микровезикулы, которые содержат фосфатидилсерин, что способствует облегчению генерации тромбина [7]. Кроме того, консервированные эритроциты теряют осмотическую резистентность, что приводит к их разрушению и развитию «сладж-синдрома», который еще в большей степени усугубляет ишемию тканей [8]. Поэтому актуальным является изучение методов направленных на улучшение свойств хранящейся крови.

Указанные недостатки могут быть нивелированы применением препаратов восстанавливающих мембранные свойства эритроцитов и улучшающих метаболические процессы в них. Известно, что озонотерапия приводит к улучшению реологических свойств крови, повышению отдачи оксигемоглобина кислорода ткани и увеличению скорости микроциркуляции. Кроме того, взаимодействуя с двойными связями ненасыщенных жирных кислот эритроцитарной мембраны, озон повышает ее эластичность [9]. В результате озонотерапии наблюдается снижение концентрации продуктов перекисного окисления липидов в крови с одновременной активацией ферментатив-

Introduction

A loss of 30–50% of the circulating blood volume (CBV) at once is usually not an immediate threat to life, but signifies the onset of severe complications the body can't cope with. The body can compensate independently the loss of only not more than 25% of CBV due to protective and adaptive mechanisms. Transfusion of packed red cells and recovery of organ blood flow (perfusion) are the most effective measures in the case of a great blood loss due to achievement of a required CBV. The coefficient of the tissue oxygen utilization is also one of factors that compensate the consequences of anemia.

However, it is known that the storage of packed red blood cells causes a decrease in the concentration of ATP and 2,3 DPG in red blood cells and an increase in the content of potassium and lactate in them [1–4]. The oxygen transport function of red blood cells deteriorates within 24 hours of storage [5]. The deformability of red blood cells decreases by the second week of storage of the packed red cells [6]. At this, the remaining red cells form microvesicles which contain phosphatidylserine thus facilitating the production of thrombin [7]. In addition, the packed red cells lose osmotic resistance, thus leading to their destruction and the development of the «sludge syndrome» which, in turn, worsen tissue ischemia [8]. Therefore, it is important to study methods improving the properties of the stored blood.

These defects may be corrected by medications that restore the membrane properties of red blood cells and improve metabolic processes. It is known that ozone therapy improves the rheological properties of blood, increases oxygen release to tissues by oxyhemoglobin and increases the rate of microcirculation. In addition, ozone increases the elasticity of the membrane due to interaction with double bonds of unsaturated fatty acids [9]. The ozone therapy reduces the concentration of lipid peroxidation products in the blood and activates enzymes of the antioxidant defense [10]. Earlier, we found out that the concentration of ozone of 2 mg/l is most effective in increasing of the ATP and 2,3 DPG concentration in red blood cells after treatment of packed red cells with ozonized saline (ozone concentration of 0.5–15 mg/L) [11]. In turn, energy processes mediate the functional activity of cells and the modification of their membrane properties [12]. Meanwhile, the effect of ozone on the structural parameters of erythrocyte membranes after different storage periods,

ного звена антиоксидантной защиты [10]. Ранее мы выявили, что при обработке эритроцитной массы озонированным физиологическим раствором (концентрации озона 0,5–15 мг/л) наибольший эффект на увеличение содержания АТФ и 2,3ДФГ в эритроцитах оказывает концентрация озона 2 мг/л [11]. В свою очередь, энергетические процессы опосредуют функциональную активность клеток и модификацию их мембранных свойств [12]. Между тем структурные показатели мембран эритроцитов, которые определяют биологическую полноценность консервированной крови, при действии озона на эритроцитную массу различных сроков хранения не исследовали.

Цель работы – изучение морфологии эритроцитов и сопряженности морфологических показателей с процессами липопероксидации и содержанием органических фосфатов в эритроцитах при обработке эритроцитной массы разных сроков хранения озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 2 мг/л.

Материал и методы

Объектом исследования служила стабилизированная гемоконсервантом ЦФДА (Натрия цитрат + Лимонная кислота + Натрия дигидрофосфат + Декстроза + Аденин) в соотношении 1:4 эритроцитная масса крови человека. Донорскую кровь получали на станции переливания крови. Заготовку крови и получение из нее компонентов производили в соответствии с «Инструкцией по заготовке и консервированию крови», утвержденной МЗ РФ 29.05.99. Эритроцитная масса хранилась при $t\ 4^{\circ}\text{C}$ 7, 14, 21 и 30 суток.

В ходе исследования сформировали 2 серии: 1-я серия – эритроцитную массу (2 мл) смешивали с озонированным раствором натрия хлорида 0,9% в эквивалентном объеме, содержащим концентрацию озона 2 мг/л. 2-я серия (контроль) – эритроцитную массу (2 мл) смешивали с раствором натрия хлорида 0,9% в эквивалентном объеме. В каждой серии было проведено 12 проб. Озонирование физиологического раствора производили на установке озонаторной терапевтической автоматической УОТА-60-01-«Медозон» (Россия). Установка изготовлена в соответствии с ТУ 9444-001-11441871-97 и может быть использована в медицинских учреждениях. Озонирование физиологического раствора производили непосредственно перед смешиванием его с эритроцитной массой и через 60 мин исследовали морфологию эритроцитов, концентрацию в них малонового диальдегида (МДА), активность каталазы, концентрацию АТФ и 2,3ДФГ. Уровень физиологической нормы исследуемых показателей определяли в эритроцитной массе в день ее заготовления, проводя измерение показателей в 12-и пробах.

Анализ морфологии эритроцитов проводили в мазках крови методом световой микроскопии [13]. Концентрацию МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [14]. Плотность окраски триметинового комплекса регистрировали при 530 нм. Для расчета концентрации МДА использовали коэффициент молярной экстинкции $E=1,56 \cdot 10^{-5}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность каталазы анализировали по снижению пероксида в пробе [15]. Изме-

which determine the biological adequacy of the pooled blood, has not been studied.

The purpose of the study was to assess the morphology of red blood cells and the association of morphological parameters with lipid peroxidation processes and the content of organic phosphates in red blood cells when treating packed red blood cells with the ozonized saline solution (with an ozone concentration of 2 mg/l) after different storage periods.

Materials and Methods

Packed human red blood cells stabilized with a blood preservative CPDA (sodium citrate + citric acid + sodium dihydrogen phosphate + dextrose + adenine) at a ratio of 1:4 was the study object. The donor blood was taken at the blood transfusion station. The blood collection and production of its derivatives were carried out in accordance with «The Guidelines for the purveyance and preservation of blood» approved by the Ministry of Health of the Russian Federation on 29.05.99. The packed red blood cells were stored at $t\ 4^{\circ}\text{C}$ for 7, 14, 21 and 30 days.

During the study, 2 batches were formed: batch 1 – packed red blood cells (2 ml) was mixed with an equivalent volume of an ozonized 0.9% sodium chloride solution with an ozone concentration of 2 mg/l; batch 2 (reference) – packed red blood cells (2 ml) mixed with an equivalent volume of an 0.9% sodium chloride solution. In each batch, 12 samples were taken. The saline solution was ozonized using and ozonizing therapeutic automatic device UOTA-60-01-Medozon (Russia). The device was manufactured in accordance with TU 9444-001-11441871-97 and could be used in healthcare institutions. Ozonization of the saline was performed immediately before mixing it with the packed red blood cells. The morphology of red blood cells, the malonic dialdehyde concentration (MDA), the catalase activity, and the concentration of ATP and 2,3 DPG were examined 60 minutes later. The physiological normal limits of the tested parameters were determined in the packed red blood cells on the day of the preparation. Measurements were performed in 12 samples.

The analysis of the morphology of red blood cells was carried out in blood smears using light microscopy [13]. The MDA concentration was determined by the reaction with thiobarbituric acid [14]. The color density of the trimethylene complex was registered at 530 nm. The molar extinction coefficient $E = 1.56 \cdot 10^{-5}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ was used to calculate the concentration of MDA. The catalase activity was analyzed based on a decrease in the peroxide concentration in the sample [15]. The measurements were carried out spectrophotometrically immediately after the H_2O_2 was introduced into the cuvette and 20 seconds after the introduction at a wavelength of 240 nm. The catalase activity (A) was calculated using the formula: $A = (\lg E_1/E_2 \times 120000) / \text{Hb} (\mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{mgHb} \times \text{min})$, where E_1 , E_2 is the extinction of the test sample immediately and 20 sec after the introduction of H_2O_2 ; Hb is the hemoglobin level. The content of 2,3-DPG and ATP in a suspension of washed red blood cells was studied by a non-enzymatic method. The inorganic phosphorus level was determined in the RBC hydrolysates by photoelectric colorimetry. Washed RBCs (1 ml) were hemolyzed with cold distilled water (2 ml) over 20 min, proteins were precipitated with 12% TCA (2 volumes), and the precipitate was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min. The supernatant was filtered through a paper filter.

рения проводили спектрофотометрически сразу после внесения H_2O_2 в кювету и через 20 секунд после внесения при длине волны 240 нм. Активность каталазы (А) рассчитывали по формуле: $A = (\lg E_1/E_2 \times 120000) / Hb$ (мкмоль H_2O_2 / мин \times мг Hb), где E_1 , E_2 – экстинция опытной пробы сразу и через 20 сек. после внесения H_2O_2 ; Hb – количество гемоглобина. Содержание 2,3-ДФГ и АТФ в суспензии отмытых эритроцитов исследовали неэнзиматическим методом, определяя неорганический фосфор (Рн) в гидролизатах эритроцитов фотоэлектрокалориметрически. Отмытые эритроциты (1 мл) гемолизовали холодной дистиллированной водой (2 мл) в течение 20 мин, белки осаждали 12% ТХУ (2 объема), а осадок отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин. с последующим фильтрованием надосадочной жидкости через бумажный фильтр. ТХУ фильтрат гемолизованных эритроцитов использовали для определения АТФ и 2,3-ДФГ. При определении АТФ к 1 мл ТХУ фильтрата добавили 1 мл 2N HCl и проводили гидролиз в кипящей водяной бане 7 мин. с последующим охлаждением и нейтрализацией равным объемом 2N NaOH. Определяли неорганический фосфор (Рн), в состав которого входил Рн, отщепившийся от АТФ после гидролиза, и Рн до гидролиза [16]. Для определения 2,3 ДФГ из ТХУ фильтрата гемолизованных эритроцитов удаляли нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ) путем адсорбции на активированном угле с последующим центрифугированием. В супернатанте (0,5 мл) определяли Рн1 (пробирка 1). Часть ТХУ фильтрата (0,5 мл) подвергали озонлению, добавляя 0,5 мл 5% раствора нитрата магния, кипятили и после охлаждения содержимое пробирки растворяли в 0,5 мл 0,36N H_2SO_4 . В 0,5 мл супернатанта измеряли Рн2 (пробирка 2). Определяли Рн в каждой пробирке, регистрируя плотность окраски на фотометре фотоэлектрическом КФК-3 ($\lambda=660$ нм). Концентрацию Рн определяли по калибровочной кривой, используя стандартный раствор KH_2PO_4 . Расчет концентрации 2,3ДФГ проводили по формуле $(Pn1 \times 100 - Pn2 \times 10) / 2$ [17].

После доказательства принадлежности экспериментальных данных к нормальному распределению с использованием критерия Шапиро-Уилка определяли значения средних арифметических и стандартных ошибок средних. Для сравнения двух подгрупп использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования была выявлена значимая способность озона влиять на соотношение патологических форм эритроцитов и дискоцитов консервированной эритроцитной массы в пользу последних на всех сроках хранения (табл. 1). Если на 7-е сутки в эритроцитсодержащей среде преобладали двояковогнутые дискоциты, то через 30 суток хранения в ней наблюдалось большее количество эхиноцитов и сфероцитов. Использование озона восстанавливало патологически измененные формы эритроцитов, наиболее выражено это проявлялось при обработке озонированным физиологическим раствором эритроцитной массы с 7-х по 21-е сутки ее хранения.

Озонирование эритроцитной массы на этапе 7-суточного ее хранения вызывало рост содержания

АТФ and 2,3 DPG were detected in the filtrate of hemolyzed RBC. While determining ATP, 1 mL of 2N HCl was added to 1 mL of TCA filtrate and hydrolysis was carried out in a boiling water bath for 7 min followed by cooling and neutralization with an equal volume of 2N NaOH. Inorganic phosphorus (IP) was determined before and after hydrolysis [16]. To determine 2,3 DPG, nucleotides (ATP, ADP, AMP) were removed from the TCA filtrate of hemolyzed RBC by adsorption on the activated charcoal followed by centrifugation. In the supernatant (0.5 ml), IP (tube 1) was determined. A portion of the TCA filtrate (0.5 mL) was mixed with 0.5 ml of 5% magnesium nitrate solution, then it was boiled and cooled, then the contents of the tube were dissolved in 0.5 mL of 0.36N H_2SO_4 . In 0.5 ml of the supernatant, IP concentration was measured (tube 2) in each tube by measuring the color density with the KFK-3 photometer ($\lambda=660$ nm). The concentration of PI was determined by means of a calibration curve using a standard KH_2PO_4 solution. Calculation of the concentration of 2,3 DPG was carried out according to the formula $(P1 \times 100 - P2 \times 10) / 2$, where P1 is PI concentration in tube 1 and P2 – concentration in tube 2 [17].

Mean arithmetic and standard errors of the mean were determined after proving that the experimental data belong to the normal distribution using the Shapiro-Wilk test. The *t*-test was used to compare the significance of difference between two subgroups.

Results and Discussion

A significant ability of ozone to influence the ratio of abnormal forms of RBCs and discocytes of the packed red blood cells with the increase of the latter at all storage times was found during the study (table 1). Biconvex discocytes were prevalent in the RBC-containing medium on the 7th day of the storage, whereas echinocytes and spherocytes count increased after 30 days of storage. Ozone restored pathologically altered forms of red blood cells. The restoration was most pronounced when packed red blood cells were treated with an ozonized saline solution from the 7th to the 21st day of storage.

Discocyte count increased from $60.5 \pm 1.97\%$ to $97.4 \pm 2.97\%$, and the echinocytes and spherocytes count significantly decreased during ozonation of the packed red blood cells during the 7-day storage period (table 1) as compared to RBCs without treatment with ozone (fig.1).

The discocyte count decreased due to an increase in the pool of echinocytes of various forms on the 14th day of storage of the packed red blood cells. The number of echinocytes increased and the number of discs decreased by 18.9% ($P < 0.05$) and 13.4% ($P < 0.05$) respectively. The data obtained are comparable with results of other authors who observed a specific change in the erythrocyte membrane nanostructure by 9–12 days of storage and the formation of structural clusters that triggered the formation of echinocytes [18]. Ozonation of the packed red blood cells at this stage significantly changed the pattern of poikilocytosis almost completely recovering the RBC pool to the characteristics observed after 7 days of storage (fig. 1, b).

Таблица 1. Морфологическая характеристика пойкилоцитоза консервированных эритроцитов после обработки озонированным и стандартным физиологическим раствором.**Table 1. Morphological characteristics of poikilocytosis of packed RBC after their treatment with ozonized and standard saline.**

Indexes in series, %	Values of indexes on the day of storage			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 30
Discocytes				
Baseline	60.5±1.97	52.4±1.50 ^{1,2}	27.9±1.28 ^{1,2}	14.3±2.32 ^{1,2}
1	97.4±2.97 ^{3,4}	90.1±1.77 ^{1,2,3,4}	88.4±1.95 ^{1,3,4}	49.3±1.26 ^{1,2,3,4}
2	63.6±0.94	53.1±2.07 ^{1,2}	32.2±1.53 ^{1,2,3}	12.0±1.85 ^{1,2}
Echinocytes				
Baseline	29.7±2.01	36.6±1.88 ^{1,2}	59.1±1.65 ^{1,2}	70.6±2.73
1	2.5±0.66 ^{3,4}	3.9±1.37 ^{3,4}	7.6±1.45 ^{1,2,3,4}	41.4±1.59 ^{1,2,3,4}
2	27.3±1.14	35.1±1.55 ^{1,2}	58.2±1.98 ^{1,2}	76.5±2.26 ^{1,2,3}
Spherocytes				
Baseline	9.1±1.21	10.7±1.48	11.3±1.42	14.6±1.33 ^{1,2}
1	0.1±0.017 ^{3,4}	5.7±0.89 ^{1,2,3,4}	4.3±0.77 ^{3,4}	11.6±0.72 ^{1,2,3}
2	8.8±0.54	11.2±1.23	7.6±1.03 ^{2,3}	12.4±1.36 ^{1,2}

Note. $P < 0.05$, significant differences: ¹ – vs 7th days of storage; ² – vs the previous storage period; ³ – vs the baseline during the study; ⁴ – vs the packed RBC with saline during the study.

Примечание. Для табл. 1, 2: Indexes in series – показатели в сериях; Values of ... on the day of storage – значения ... на день хранения; Baseline – исходная эритроцитарная масса; Discocytes – дискоциты; Echinocytes – эхиноциты; Spherocytes – сфероциты. Значимые различия при $p < 0,05$ относительно: ¹ – 7-х суток хранения; ² – предыдущего срока хранения; ³ – исходного показателя на этапе исследования; ⁴ – эритроцитарная масса с физиологическим раствором на этапе исследования.

дискоцитов с 60,5±1,97% до 97,4±2,97% (табл. 1) при значительном уменьшении количества эхиноцитов и сфероцитов относительно эритроцитарной массы без обработки озоном (рис. 1, а).

На 14-е сутки хранения эритроцитарной массы количество дискоцитов снижалось за счет увеличения пула эхиноцитов различных форм. Их относительный прирост и снижение доли дискоцитов составил в среднем 18,9% ($p < 0,05$) и 13,4% ($p < 0,05$) соответственно. Полученные данные сочетаются с результатами других авторов, которые отмечают к 9–12 суткам хранения специфическое изменение наноструктуры мембраны эритроцитов, образование структурных кластеров, которые являются пусковым механизмом формирования эхиноцитов [18]. Озонирование эритроцитарной массы на данном этапе значительно изменяло картину пойкилоцитоза, практически восстанавливая эритроцитарный пул к характеристикам 7 суточного срока хранения (рис. 1, б).

21-е сутки хранения эритроцитарной массы – пограничный срок в возможности предтрансфузионной реабилитации консервированных эритроцитов озоном. На этом этапе отмечено значительное (с 36,6 до 59,1%) ($p < 0,05$) увеличение количества эхиноцитов (табл. 1, рис. 1, с). Однако, после обработки озоном эритроцитарной массы этого срока хранения морфологический состав трансформировался до дискоцитов на 67,0%.

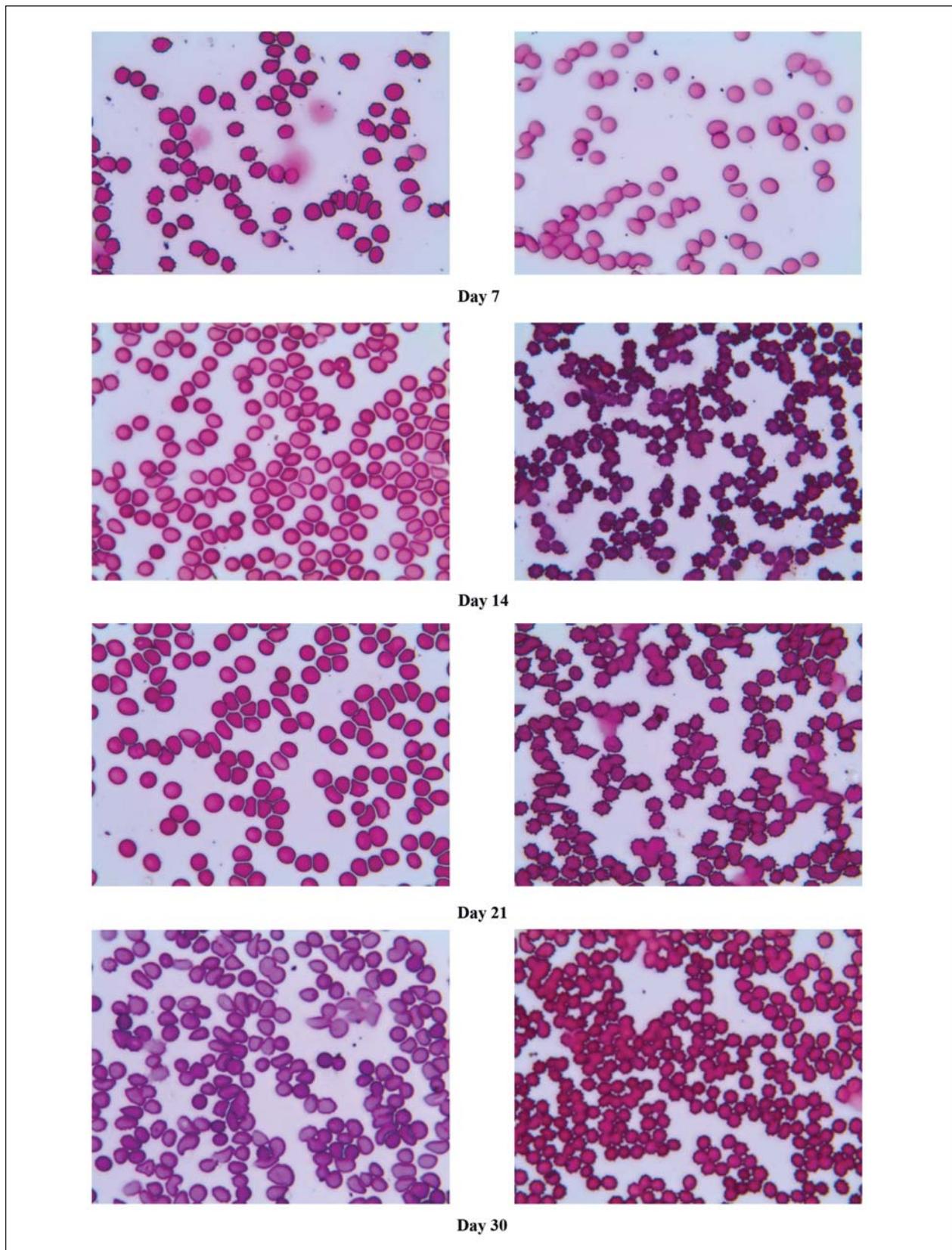
К 30-м суткам хранения эритроцитарной массы наряду с дальнейшим ростом эхиноцитарной трансформации, увеличивалось количество сфероцитов. Кроме того, наблюдалась агрегация эритроцитов (рис. 1, д). Исследования, посвященные реологии крови подчеркивают, что переливание эритроцитарной массы поздних сроков хранения сопровождается

Таблица 1. Морфологическая характеристика пойкилоцитоза консервированных эритроцитов после обработки озонированным и стандартным физиологическим раствором.

The 21st day of the storage of the packed red blood cells is a threshold in the ability of ozone to restore of packed RBC before the transfusion. A significant increase in the echinocyte count was registered (from 36.6% to 59.1%) ($P < 0.05$) at this stage (table 1, fig. 1, c). However, the morphological composition was transformed to discocytes (by 67.0%) after treatment of the packed RBC with ozone during this storage period.

By the 30th day of storage of the packed RBC, along with a further growth of the echinocyte transformation, the spherocyte count also increased. In addition, erythrocyte aggregation was observed (fig. 1, d). Studies of blood rheology emphasize that transfusion of packed RBC of late storage periods is associated with a great number of complications and worse clinical outcomes which may be explained by incapability of spherocytes to the transcapillary transport, as well as micro-clots and sludge obstruction of capillaries [19]. Ozone was ineffective on day 30 as compared to previous study dates: there was an increase in morphologically transformed RBC to echinocytes and spherocytes in the packed RBC.

It is known that hydrogen peroxide is one of echinocyte agents [20]. In addition, the formation of echinocytes and spherocytes is associated with the emergence of hemin during the oxidative processes [19], leading to the dissociation of the spectrin-protein 4.1 – protein 3 [22]. Transformation into the spherocyte which is considered a prehemolytic form of a RBC is possible with an increase in the lysophosphatidylcholine level [23]. Therefore, the morphological changes in RBC during the storage and under the effect of ozone are most likely determined by a change in the ratio of pro- and antioxidant processes in red blood cells. This statement is confirmed by our study. A study



Морфологическая структура эритроцитов на разных сроках хранения эритроцитной массы.

Morphological structure of erythrocytes after different storage periods of packed red cells.

Note. A hematoxylin-eosin stained smear of packed red cells diluted at a ratio of 1: 1 with NaCl 0.9% (right) and diluted at a ratio of 1:1 ozonized NaCl 0.9% with the ozone concentration of 2 mg/L (left). Magnification $\times 1000$.

Примечание. Окрашенный гематоксилин-эозином мазок консервированной эритроцитной массы, разведенной NaCl 0,9% в соотношении 1:1 (справа) и разведенной озонированным NaCl 0,9% в соотношении 1:1 с концентрацией озона 2 мг/л (слева). Увеличение $\times 1000$.

ется большим количеством осложнений и худшим клиническим результатом, что объясняется неспособностью сфероцитов к транскапиллярному транспорту, а также микросгустковым, сладжевым блокированием капиллярного русла [19]. Использование озона было малоэффективно, по сравнению с предыдущими сроками исследований: в эритроцитной массе регистрировалось увеличение морфологически трансформированных эритроцитов до эхино- и сфероцитов.

Известно, что эхиноцитарным агентом является, в частности, перекись водорода [20]. Кроме того, формирование эхиноцитов и сфероэхиноцитов связано с появлением гемина при окислительных процессах [21], приводящих к разобщению спектрина – белка п.4.1 – белка п.3 [22]. Трансформация в сфероцит, который рассматривается как предгемолитическая форма эритроцита, возможна при увеличении содержания лизофосфатидилхолина [23]. Таким образом, морфологические изменения эритроцитов при хранении и при действии озона, по всей видимости, определяются изменением соотношения про- и антиоксидантных процессов в эритроцитах. Данное положение подтверждает и проведенное нами исследование. Так, в ходе изучения окислительных процессов в эритроцитах выявлено, что с увеличением сроков хранения эритроцитной массы наблюдалась интенсификация процессов ПОЛ (табл. 2). Концентрация МДА в эритроцитах возрастала более чем в 2 раза к 21-м суткам хранения, тогда как активность каталазы, напротив, снижалась на данном этапе контрольного времени. Использование озона изменяло баланс про- и антиоксидантных процессов, что проявлялось в снижении концентрации МДА и увеличении активности каталазы в течение 21-х суток хранения эритроцитной массы относительно контрольной серии. К 30-м суткам состояние про- и антиоксидантных систем при действии озона приближалось к значению контроля.

Полученные результаты свидетельствуют, что по мере увеличения срока хранения эритроцитной массы в эритроцитах усиливаются процессы липопероксидации, сопряженные с появлением эхиноцитов и сфероцитов. Морфологические изменения эритроцитов могут быть обусловлены модификацией, как липидной, так и белковой части эритроцитарных мембран, например, за счет деструкции участков бислоя, обогащенных двойными связями при активации перекисного окисления липидов [24], либо сшивками белков, образующихся посредством МДА [25]. В результате изменения характера липид-белковых взаимодействий в мембране эритроцита происходит нарушение специфических мембрано-ассоциированных процессов, в том числе и транспорта ионов [26]. Накопление в клетках ионов Ca^{2+} приводит к активации мембраносвязанных фосфолипаз, что повышает транслокацию фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны и

of oxidative processes in RBC demonstrated that lipid peroxidation intensified with an increase in the time of storage of the packed RBC (table 2). The MDA concentration in red blood cells increased by more than twice by the 21st day of storage, whereas the catalase activity decreased at this stage. The use of ozone changed the balance of pro- and antioxidant processes: the MDA concentration decreased and the catalase activity increased during 21 days of storage of the packed RBC vs. the reference batch. By the 30th day, the state of pro- and antioxidant systems under the effect of ozone was approaching the reference values.

The obtained results indicate that lipid peroxidation processes and the emergence of echinocytes and spherocytes increase with the increase of the storage time of the packed RBC. Morphological changes in RBC can be caused by modification of both lipid and protein components of erythrocyte membranes, for example, by destruction of bilayer sites enriched by double bonds upon activation of lipid peroxidation [24] or by cross-linking of proteins formed by MDA [25]. The change in lipid-protein interactions in the erythrocyte membrane disrupts specific membrane-associated processes, including ion transport [26]. Upon accumulation of Ca^{2+} ions in the cells, membrane-associated phospholipases are activated, thus enhancing the phosphatidyl serine translocation to the outer surface of the membrane and formation of echinocytes [27]. Changes in the shape of cells and oxidative damage to erythrocyte membranes adversely affect the viscoelastic properties of membranes and increases erythrocyte aggregation, which is a negative factor in transfusion of the erythrocytic mass [28].

Treatment of the packed red blood cells with ozone determines the optimization of pro- and antioxidant systems of red blood cells, which may be explained by the direct effect of ozone on the cells. In response to the introduction of ozone in red blood cells, ozonide cells are formed in the lipid bilayer membranes [29]. Ozonolysis of the erythrocyte cell membrane leads to the formation of hydroxy-hydroperoxides through the cleavage of chains of unsaturated fatty acids. Hydroxy-hydroperoxides trigger different components of the antioxidant protection system [30]. The activation of antioxidant systems restores the processes of peroxidation [31].

It should be noted that the shift of the oxidation-reduction effect of ozone leads to the accumulation of oxidized glutathione [32], and, consequently, to the activation of the glucose-phosphate shunt and changes in the metabolic state of cells. In our experiments, it was found that the ozonization of the packed RBC caused an increase in the concentration of ATP and 2,3 DPG after 21 days of storage, while treatment of the packed red blood cells stored for 30 days with an ozonized saline was not accompanied by a statistically significant change in the concentration of ATP and 2,3 DPG in red blood cells (table 2). The observed effects of ozone on the content of the above phosphates in

Таблица 2. Метаболические показатели консервированных эритроцитов после обработки озонированным и стандартным физиологическим раствором.**Table 2. Metabolic parameters of packed RBC after treatment with ozonized and standard saline.**

Indexes in series, %	Values of indexes on the day of storage			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 30
MDA, nM/ml				
Baseline	1.15±0.04	1.33±0.18	2.35±0.07 ^{1,2,3}	2.57±0.08 ^{1,2,3}
1	0.96±0.07 ⁴	0.89±0.06 ^{4,5}	1.18±0.08 ^{1,2,4,5}	2.13±0.06 ^{1,2,3,4,5}
2	1.13±0.09	1.30±0.13	2.40±0.09 ^{1,2,3}	2.41±0.08 ^{1,3}
Catalase, μM H₂O₂/mgHb×min				
Baseline	37.26±3.08 ³	35.20±1.29 ^{2,3}	30.61±1.81 ^{1,2,3}	24.81±2.85 ^{1,2,3}
1	93.99±1.81 ^{3,4,5}	44.22±1.81 ^{1,2,3,4,5}	35.59±1.48 ^{1,2,3,4,5}	26.57±1.33 ^{1,2,3,5}
2	35.80±1.07 ³	33.06±2.22 ^{2,3}	29.27±1.85 ^{1,3}	22.72±2.55 ^{1,2,3}
ATP, μM P/ml×cells				
Baseline	0.90±0.11	0.79±0.11 ³	0.60±0.12 ^{1,3}	0.50±0.12 ^{1,3}
1	1.12±0.09 ⁵	1.07±0.13 ^{4,5}	1.05±0.10 ^{4,5}	0.49±0.11 ^{1,2,3}
2	0.86±0.12	0.75±0.10 ³	0.54±0.10 ^{1,2,3}	0.46±0.15 ^{1,3}
2,3 DPG μM P/ml×cells				
Baseline	2.15±0.18 ³	2.20±0.16 ³	1.80±0.16 ^{1,2,3}	1.76±0.16 ^{1,3}
1	3.54±0.11 ^{4,5}	2.97±0.13 ^{1,2,3,4,5}	2.06±0.16 ^{1,2,3}	1.90±0.20 ^{1,3}
2	2.07±0.16 ³	2.17±0.14 ³	1.73±0.15 ^{1,2,3}	1.69±0.18 ^{1,3}

Note. The normal physiological level for: ATP – 1.06±0.10 μM P/ml; 2,3 DPG – 3.98±0.12 μM P/ml; MDA – 1.09±0.08 nM/ml; Catalase activity – 57.41±2.70 μM H₂O₂/mgHb×min. *P*<0.05, significant differences: ¹ – vs 7 days of storage; ² – vs the previous storage period; ³ – vs the baseline during the study; ⁴ – vs the packed RBC with saline during the study.

Примечание. MDA – МДА; Catalase – Каталаза; ATP, cells – АТФ, клеток; DPG – ДФГ. Физиологическая норма: АТФ – 1,06±0,10 мкмоль Рн/мл; 2,3ДФГ – 3,98±0,12 мкмоль Рн/мл; МДА – 1,09±0,08 нмоль/мл; активности каталазы – 57,41±2,70 мкмоль Н₂О₂/мин×мгНб. Значимые различия при *p*<0,05 относительно: ¹ – 7-х суток хранения; ² – предыдущего срока хранения; ³ – должных величин; ⁴ – исходного показателя на этапе исследования; ⁵ – эритроциты с физиологическим раствором на этапе исследования.

образование эхиноцитов [27]. Изменение формы клеток и окислительное повреждение мембран эритроцитов негативно влияет на вязко-эластичные свойства мембран и увеличивает агрегируемость эритроцитов, что является отрицательным фактором при трансфузии эритроцитарной массы [28].

Обработка эритроцитарной массы озоном определяет оптимизацию про- и антиоксидантных систем эритроцитов, что, вероятно, можно объяснить прямым действием озона на клетки. В ответ на введение озона в эритроцитах осуществляется образование в липидном бислое мембран клеток озонидов [29]. Озонолиз клеточной мембраны эритроцитов ведет через расщепление цепей ненасыщенных жирных кислот к образованию гидрокси-гидропероксидов. Последние способствуют запуску различных звеньев системы антиоксидантной защиты [30]. Активация антиоксидантных систем восстанавливает процессы перекисного окисления [31].

Следует отметить, что сдвиг окислительно-восстановительного действия озона, приводит к накоплению окисленного глутатиона [32], следовательно, активации глюкозо-фосфатного шунта, и изменению метаболического состояния клеток. В наших экспериментах выявлено, что озонирование эритроцитарной массы вызывало увеличение концентрации АТФ и 2,3ДФГ при сроках ее хранения до 21 суток, тогда как обработка озонированным физиологическим раствором эритроцитарной массы сроком хранения 30 суток не сопровождалась статистически значимым изменением концентрации АТФ и 2,3ДФГ в эритроцитах (табл. 2). Наблюдае-

RBC probably can be explained by the modifying effect of ozonides on erythrocyte metabolism. Under the effect of ozonides, enzymes of glycolysis and pentose-phosphate shunt are activated and intracellular acidosis is reduced [33]. In turn, the implementation of such activation presumably is due to decreasing the level of molecular products of lipid peroxidation and the enhancing the antioxidant defense system.

Thus, the ozonization of the packed RBC promotes the recovery of the erythrocyte shape by optimizing the processes of lipid peroxidation of erythrocyte membranes and increasing the synthesis of ATP. Under the effect of ozonides, a mutagenic shunt of glycolysis is activated and 2,3 DPG is formed. 2,3 DPG determines the strength of the hemoglobin binding to oxygen, facilitates oxygen release by oxyhemoglobin and, thus, improves the oxygen supply of tissues. The formed ATP is used in energy-dependent processes of RBC, including contractile proteins, thus improving the deformability of RBC. The restoration of these processes during ozonization of the packed RBC is observed when they are stored for 7–21 days. In this case, ozonization of the packed RBC stored for 30 days does not improve the morphometabolic characteristics of RBC studied. The obtained results indicate that the developed technology for treatment of the packed RBC stored for 7 to 21 days with an ozonized saline solution (with the ozone concentration of 2 mg/l) improves the morphometabolic status of RBC and can be used to correct the oxygen transport function of blood in patients in critical conditions.

мые эффекты действия озона на содержание в эритроцитах вышеуказанных фосфатов, вероятно, можно объяснить модифицирующим действием озонидов на метаболизм эритроцитов. Под действием озонидов активируются ферменты гликолиза и пентозо-фосфатного шунта, снижается внутриклеточный ацидоз [33]. В свою очередь, реализация такой активизации может быть обусловлена и снижением уровня молекулярных продуктов ПОЛ и усилением антиоксидантной системы защиты.

Таким образом, озонирование эритроцитной массы способствует восстановлению формы эритроцитов за счет оптимизации процессов липопероксидации эритроцитарных мембран и повышения синтеза АТФ. Под действием озонидов, образовавшихся в процессе озонизации двойных связей С=С полиненасыщенных жирных кислот в эритроцитах активируется мутазный шунт гликолиза, на входе которого образуется 2,3ДФГ, который определяет прочность связи гемоглобина с кислородом, облегчает отдачу кислорода оксигемоглобином и, таким образом, улучшает кислородное обеспечение тканей. Образовавшаяся АТФ используется в энергозависимых процессах эритроцитов, в том числе, сократительными белками, что улучшает деформабильность красных клеток. Восстановление указанных процессов при озонировании эритроцитной массы наблюдается при сроках ее хранения 7–21-е сутки. При этом озонирование эритроцитной массы сроком хранения 30 суток не вызывает улучшения исследуемых морфометаболитических характеристик эритроцитов. Полученные результаты свидетельствуют, что разработанная технология обработки эритроцитной массы сроком хранения от 7 до 21 суток озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 2 мг/л улучшает морфометаболитический статус содержащихся в ней эритроцитов и может быть использована для коррекции кислороднотранспортной функции крови у больных в критических состояниях.

Литература

1. Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Манченко Е.А., Козлова Е.К., Бобринская И.Г., Черныш А.М., Козлов А.П. Влияние температуры эритроцитарной взвеси на морфологию и наноструктуру мембран клеток. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (4): 30-37. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-4-30-37
2. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. Влияние перинатальной гипоксии на морфологию эритроцитов у новорожденных. *Общая реаниматология*. 2017; 13 (2): 14-23. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-2-14-23
3. Karger R., Lukow C., Kretschmer V. Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. *Transfus. Med. Hemother.* 2012; 39 (4): 277–282. DOI: 10.1159/000339809. PMID: 22969698
4. 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. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104 (43): 17063-17068. DOI: 10.1073/pnas.0708160104. PMID: 17940021
5. Hardy J.F., Belisle S. Current information on the benefits of allogeneic blood. *TATM J.* 2000; 2 (3): 15-25. DOI: 10.1111/j.1778-428X.2000.tb00036.x.
6. Relevy H., Koshkaryev A., Manny N., Yedgar S., Barshtein G. Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion*. 2008; 48 (1): 136-146. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01491.x. PMID: 17900281

Conclusion

An increase in the count of echinocytes, spherocytes, MDA concentration and a decrease in the catalase activity and the content of organic phosphates is observed with the increase of the shelf life of the packed RBC.

Treatment of the packed red blood cells stored for 7, 14, and 21 days with ozonized saline solution (with ozone concentration of 2 mg/l) optimizes the impaired state of pro-antioxidant systems in RBC, increases the concentration of 2,3 DPG and ATP and, as a result, promotes restoration of the shape of RBC (from spherocytes and echinocytes to discocytes) which increases their biological significance.

These processes under the effect of ozone do not appear on the 30th day of storage of the packed RBC, which indicates the decompensation of intra-erythrocyte morphometabolic processes.

Заключение

При возрастании сроков хранения эритроцитной массы наблюдается увеличение количества эхиноцитов, сфероцитов, концентрации МДА и снижение активности каталазы, что сочетается с уменьшением содержания органических фосфатов в эритроцитах.

Обработка эритроцитной массы 7-, 14-, 21-х суток хранения озонированным физиологическим раствором с концентрацией озона 2 мг/л оптимизирует в эритроцитах нарушенное состояние про-, антиоксидантных систем, увеличивает концентрацию 2,3ДФГ и АТФ и, вследствие этого, способствует восстановлению формы эритроцитов (из сфероцитов и эхиноцитов до дискоцитов), что повышает их биологическую значимость.

На 30-е сутки хранения эритроцитной массы данные процессы при действии озона не проявляются, что свидетельствует о декомпенсации внутриэритроцитарных морфометаболитических процессов.

References

1. Sergunova V.A., Gudkova O.E., Manchenko E.A., Kozlova E.K., Bobrinskaya I.G., Chernysh A.M., Kozlov A.P. The effect of the erythrocyte suspension temperature on the morphology and nanostructure of cell membranes. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2017; 13 (4): 30-37. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-4-30-37. [In Russ., In Engl.]
2. Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E. The effect of perinatal hypoxia on red blood cell morphology in newborns. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2017; 13 (2): 14-23. DOI: 10.15360/1813-9779-2017-2-14-23. [In Russ., In Engl.]
3. Karger R., Lukow C., Kretschmer V. Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. *Transfus. Med. Hemother.* 2012; 39 (4): 277–282. DOI: 10.1159/000339809. PMID: 22969698
4. 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. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104 (43): 17063-17068. DOI: 10.1073/pnas.0708160104. PMID: 17940021
5. Hardy J.F., Belisle S. Current information on the benefits of allogeneic blood. *TATM J.* 2000; 2 (3): 15-25. DOI: 10.1111/j.1778-428X.2000.tb00036.x.
6. Relevy H., Koshkaryev A., Manny N., Yedgar S., Barshtein G. Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion*. 2008; 48 (1): 136-146. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01491.x. PMID: 17900281

7. Sweeney J., Kouttab N., Kurtis J. Stored red blood cell supernatant facilitates thrombin generation. *Transfusion*. 2009; 49 (8): 1569-1579. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02196.x. PMID: 19413726
8. Таричко Ю.В., Стефанов С.А., Кириленко А.С., Черкасов И.Ю., Муравьев А.В., Плотников М.Б., Градобоев М.И., Файбушевич А.Г. Результаты применения кровосберегающих технологий в кардиохирургии. *Вестн. РУДН. Серия: Медицина*. 2004; 1: 58-62.
9. Исхакова Р.Р., Сайфуллина Ф.Р. Озонотерапия в офтальмологии. *Казанский мед. журнал*. 2013; 94 (4): 510-516.
10. Rokitansky O. Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy. *Hospitalis*. 1982; 52: 643 – 647.
11. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Симулис И.С., Бояринов Г.А., Сениурин А.И. Содержание АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах при консервации и воздействии озона. *Биомедицина*. 2014; 1 (2): 37-42.
12. Бояринов Г.А., Бояринова Л.В., Дерюгина А.В., Соловьева О.Д., Зайцев Р.Р., Военнов О.В., Мошнина Е.В., Шумилова А.В. Роль вторичных факторов повреждения мозга в активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при черепно-мозговой травме. *Общая реаниматология*. 2016; 12 (5): 42-51. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-5-42-51
13. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина; 1987: 360.
14. Лившиц В.М., Седельникова В.И. Медицинский лабораторно-аналитический справочник. М.: Триада X; 2007: 304
15. Beers P., Sizer I.A. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952; 195 (1): 133-140. PMID: 14938361
16. Виноградова И.Л., Багрянцева С.Ю., Держиз Г.В. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах. *Лабораторное дело*. 1980; 7: 424-426. PMID: 6157873
17. 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. Фармакологическая коррекция микроциркуляции крыс, перенесших черепно-мозговую травму. *Цитология*. 2016; 58 (8): 610-617.
18. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Manchenko E. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 7846. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9. PMID: 28798476
19. Cabrales P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): H1206–H1215. DOI: 10.1152/ajpheart.00109.2007. PMID: 17449555
20. Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. Эритроцит: строение и функции его мембраны. *Вятский мед. вестник*. 2007; 2-3: 32-40.
21. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. DOI: 10.1038/srep06033. PMID: 25112597
22. Мороз В.В., Герасимов Л.В., Исакова А.А., Марченков Ю.В., Родионов Е.П. Влияние различных инфузионных растворов на микроциркуляцию. *Общая реаниматология*. 2010; 6 (6): 5-11. DOI: 10.15360/1813-9779-2010-6-5
23. Лапшина Е.А., Заводник И.Б. Микрокалориметрические и флуоресцентные исследования рН-индуцируемых переходов в эритроцитарных мембранах. *Биол. мембраны*. 1993; 10 (2): 170-178.
24. Анисимова А.В., Кузин В.М., Колесникова Т.И., Гусев Е.И. Компьютерная морфоденситометрия эритроцитов в диагностике и прогнозе хронической ишемии головного мозга. *Журнал неврологии и психиатрии. Инсульт*. 2006; 18: 36-46.
25. Дубинина Е.Е., Пустынина А.В. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях. *Биомед. химия*. 2007; 53 (4): 351-372. PMID: 18035718
26. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Константинова А.И. Электрофоретическая подвижность и активность Na,K-АТФазы эритроцитов у крыс при стрессе. *Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова*. 2014; 100 (11): 1297-1302. PMID: 25665408
27. Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.V. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cell. *Cell Mol. Life Sci.* 2005; 62 (9): 971-988. DOI: 10.1007/s00018-005-4527-3. PMID: 15761668
28. Мороз В.В., Козлова Е.К., Черныш А.М., Гудкова О.Е., Бушуйева А.В. Изменение структуры мембран эритроцитов при действии гемина. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (6): 5-10. DOI: 10.15360/1813-9779-2012-6-5
29. Алясова А.В., Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Терентьев И.Г., Цыбусов С.Н., Контрорщикова К.Н. Влияние озона и доксорубина на жизнеспособность и морфологию злокачественных клеток печени. *Совр. технологии в медицине*. 2016; 8 (2): 84-89.
30. Контрорщикова К.Н., Ефременко Ю.Р., Окрут И.Е., Алясова А.В. Биологические механизмы эффективности озонотерапии. *Казанский мед. журнал*. 2007; 88 (приложение 4): 3-4.
31. Густов А.В., Котов С.А., Контрорщикова К.Н., Потехина Ю.П. Озонотерапия в неврологии. Нижний Новгород; 1999: 243.
32. Бояринов Г.А., Соколов В.В. Озонированное искусственное кровообращение. Нижний Новгород: Покровка; 1999: 318.
33. Фисталь Э.Я., Носенко В.М. Патогенетическое обоснование парентерального применения озона при неотложных состояниях в комбустиологии. *Мед. неотложных состояний*. 2007; 3: 86-89.
7. Sweeney J., Kouttab N., Kurtis J. Stored red blood cell supernatant facilitates thrombin generation. *Transfusion*. 2009; 49 (8): 1569-1579. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02196.x. PMID: 19413726
8. Tarichko Yu.V., Stefanov S.A., Kirilenko A.S., Cherkasov I.Yu., Muravyev A.V., Plotnikov M.B., Gradoboev M.I., Fайбушевич A.G. The results of using of bloodless technologies in cardiac surgery. *Vestnik RUDN. Seriya: Meditsina*. 2004; 1: 58-62. [In Russ.]
9. Iskhakova R.R., Saifullina F.R. Ozone therapy in ophthalmology. *Kazan-sky Meditsinsky Zhurnal*. 2013; 94 (4): 510-516. [In Russ.]
10. Rokitansky O. Clinical considerations and biochemistry of ozone therapy. *Hospitalis*. 1982; 52: 643 – 647.
11. 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.]
12. Boyarinov G.A., Boyarinoва L.V., Deryugina A.V., Solovyeva O.D., Zaytsev R.R., Voyemov O.V., Moshnina E.V., Shumilova A.V. Role of secondary brain damage factors in activation of vascular-platelet hemostasis in traumatic brain injury. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2016; 12 (5): 42-51. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-5-42-51. [In Russ., In Engl.]
13. Menshikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P. Laboratory methods of research in the clinical medicine. Moscow: Meditsina Publishers; 1987: 360. [In Russ.]
14. Livshits V.M., Sedelnikova V.I. Medical laboratory and analytical reference book. Moscow: Triada X; 2007: 304. [In Russ.]
15. Beers P., Sizer I.A. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952; 195 (1): 133-140. PMID: 14938361
16. Vinogradova I.L., Bagryantseva S.Yu., Derviz G.V. Method for the simultaneous determination of 2,3-DPG and ATP in erythrocytes. *Laboratornoe Delo*. 1980; 7: 424-426. PMID: 6157873. [In Russ.]
17. Boyarinov G.A., Deryugina A.V., Yakovleva E.I., Zaitsev R.R., Shumilova A.V., Bugrova M.L., Boyarinoва L.V., Filippenko E.S., Solovyeva O.D. Pharmacological correction of microcirculation in rats suffered a traumatic brain injury. *Tsitologiya*. 2016; 58 (8): 610-617. [In Russ.]
18. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Manchenko E. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 7846. DOI: 10.1038/s41598-017-08255-9. PMID: 28798476
19. Cabrales P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 293 (2): H1206–H1215. DOI: 10.1152/ajpheart.00109.2007. PMID: 17449555
20. Troshkina N.A., Tsrkin V.I., Dvoryansky S.A. Erythrocyte: the structure and function of its membrane. *Vyatsky Meditsinsky Vestnik*. 2007; 2-3: 32-40. [In Russ.]
21. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. DOI: 10.1038/srep06033. PMID: 25112597
22. Moroz V.V., Gerasimov L.V., Isakova A.A., Marchenkov Y.V., Rodionov E.P. Effect of various infusion solutions on microcirculation. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2010; 6 (6): 5-11. DOI: 10.15360/1813-9779-2010-6-5. [In Russ., In Engl.]
23. Lapshina E.A., Zavadnik I.B. Microcalorimetric and fluorescent studies of pH-induced transitions in erythrocyte membranes. *Biologicheskie Membrany*. 1993; 10 (2): 170-178. [In Russ.]
24. Anisimova A.V., Kuzin V.M., Kolesnikova T.I., Gusev E.I. Computer morphodensitometry of erythrocytes in the diagnosis and prognosis of chronic cerebral ischemia. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii. Insult*. 2006; 18: 36-46. [In Russ.]
25. Dubinina E.E., Pustynina A.V. Free radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological states. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2007; 53 (4): 351-372. PMID: 18035718. [In Russ.]
26. Krylov V.N., Deryugina A.V., Konstantinova A.I. Electrophoretic mobility and activity Na,K-ATPase of erythrocytes in rats under stress. *Rossiiskiy Fiziologicheskyy Zhurnal Imeni I.M.Sechenova*. 2014; 100 (11): 1297-1302. PMID: 25665408
27. Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.V. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cell. *Cell Mol. Life Sci.* 2005; 62 (9): 971-988. DOI: 10.1007/s00018-005-4527-3. PMID: 15761668
28. Moroz V.V., Kozlova E.K., Chernysh A.M., Gudkova O.E., Bushuyeva A.V. Hemin-induced changes in the red blood cell membrane structure. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2012; 8 (6): 5-10. DOI: 10.15360/1813-9779-2012-6-5. [In Russ., In Engl.]
29. Alyasova A.V., Vedunova M.V., Mishchenko T.A., Terentyev I.G., Tsybusov S.N., Kontorshchikova K.N. Effect of ozone and doxorubicin on the viability and morphology of malignant liver cells. *Sovremennyye Tekhnologii v Meditsine*. 2016; 8 (2): 84-89. [In Russ.]
30. Kontorshchikova K.N., Efremenko Yu.R., Okrut I.E., Alyasova A.V. Biological mechanisms of ozone therapy effectiveness. *Kazansky Meditsinsky Zhurnal*. 2007; 88 (Suppl 4): 3-4. [In Russ.]
31. Gustov A.V., Kotov S.A., Kontorshchikova K.N., Potekhina Yu.P. Ozone therapy in neurology. Nizhny Novgorod; 1999: 243. [In Russ.]
32. Boyarinov G.A., Sokolov V.V. Озонированное искусственное кровообращение. Nizhny Novgorod: Pokrovka; 1999: 318. [In Russ.]
33. Fistal E.Ya., Nosenko V.M. Pathogenetic substantiation of parenteral application of ozone in urgent conditions in burn medicine. *Meditsina Neotlozhnykh Sostoyaniy*. 2007; 3: 86-89. [In Russ.]

Поступила 19.07.17

Received 19.07.17