

ПРОЦЕССЫ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ КОРРЕКЦИИ РЕДОКС-СТАТУСА ПРИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЕРЕЛОМАХ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Осиков М.В., Давыдова Е.В., Абрамов К.С.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Переломы бедренной кости при дорожно-транспортных происшествиях чаще встречаются у лиц молодого и среднего трудоспособного возраста и относятся к очень тяжелым повреждениям опорно-двигательного аппарата. Системный ответ на травму включает комплекс нейроиммунных, гемостазиологических и метаболических изменений. Выраженность окислительного стресса прямо пропорциональна тяжести повреждения костей. Перспективными направлениями коррекции иммунного и редокс-статуса при переломах бедренной кости могут выступать многочисленные факторы модуляции синдрома системного воспалительного ответа: блокаторы и антагонисты растворимых медиаторов, про- и противовоспалительные цитокины, факторы роста. Проведен критический анализ литературных источников в рецензируемых источниках, таких как Pubmed и Российский индекс научного цитирования за период 2010–2018 гг., о механизмах окислительного стресса, роли активных метаболитов кислорода и оксида азота, дисбаланса про- и антиоксидантных систем плазмы и клеток в расширении зоны вторичной альтерации, что является одним из основных факторов патогенеза формирования синдрома ишемии-реперфузии, отдаленных повреждений клеток и внеклеточных структур в процессе системной реакции организма на травматическое повреждение бедренной кости.

Ключевые слова: перелом бедренной кости, редокс-статус, озонотерапия

PROCESSES OF FREE-RADICAL OXIDATION AND PROMISING DIRECTIONS OF CORRECTION OF REDOX STATUS IN ISOLATED FEMORAL BONE FRACTURES

Osikov M.V., Davydova E.V., Abramov K.S.

«South Ural State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Fractures of the femur with road injuries are more common in young and middle-aged people and are considered to be severe injuries to the musculoskeletal system. The systemic response to trauma includes a complex of neuro-immune, hemostasiological and metabolic changes. The severity of oxidative stress is proportional to the severity of bone damage. Multiple modulating factors of the systemic inflammatory response syndrome: blockers and antagonists of soluble mediators, pro- and anti-inflammatory cytokines, growth factors can be promising areas for the correction of the immune and redox status in fractures of the femur. A critical analysis of the literature in the reviewed sources Pubmed and the Russian Science Citation Index for the period 2010-2018, the mechanisms of oxidative stress, the role of active metabolites of oxygen and nitric oxide, the imbalance of pro-and antioxidant systems of plasma and cells in the expansion of the secondary alteration zone, remote cell damage and extracellular structures during the systemic response of the body to traumatic injury to the femur.

Keywords: fracture of the femur, redox status, ozone therapy

В клинических условиях продемонстрировано, что выраженность окислительного стресса, оцениваемого по уровню в крови конечных метаболитов перекисного окисления липидов, в частности малонового диальдегида, пропорциональна тяжести перелома длинных трубчатых костей и максимальна при множественных переломах. В контексте рассматриваемой проблемы изменений иммунного статуса и процессов свободнорадикального окисления представляют интерес перспективные направления иммунокоррекции и вмешательства в редокс-статус у больных с травматическими переломами.

Цель работы – провести критический анализ научной литературы в базах данных, индексированных в рецензируемых источниках Pubmed и Российского индекса научного цитирования за период 2010–2018 гг., о механизмах окислительного стресса, роли активных метаболитов кислорода и оксида азота, дисбаланса про- и антиоксидантных систем плазмы и клеток в расширении зоны вторичной альтерации, отдаленных повреждениях клеток и внеклеточных структур в процессе системной реакции организма на травматическое повреждение бедренной кости.

Расширение зоны вторичной альтерации, вызванное избыточным негативным воздействием генерации активных форм кислорода (АФК), является одним из патогенетических факторов формирования синдрома ишемии-реперфузии [1]. При этом следует учитывать и регуляторную функцию АФК. Так, показано, что последние участвуют в активации MAP-киназ: экстрацеллюлярных сигнал-регулируемых (ERK), Jun-киназ (JNKs), p38 MAPK, регуляции образования внеклеточных нейтрофильных ловушек [2]. Особое значение при механических повреждениях тканей имеет образование пероксинитрита из NO в условиях дисфункции эндотелия (eNOS), продукции NO моноцитами/макрофагами (iNOS) и супероксид-анион радикала из ПЯН [3]. У больных с переломами бедренной кости зафиксирован высокий уровень продуктов NO в сыворотке в течение первых 6 часов с постепенным снижением к 21-м суткам [4]. Кроме образования пероксинитрита, это приводит к дефициту эффектов NO: регуляции тонуса артериол, адгезии и агрегации тромбоцитов, адгезии ПЯН к эндотелию и др.

Общая антиокислительная емкость сыворотки у больных с переломами бедренной кости возрастает в первые 6 часов после травмы, а затем снижается на 3-й, 7-й и 14-й день наблюдения [4]. Аналогичные результаты были получены в эксперименте на крысах с переломами бедренных костей при оценке уровня малонового диальдегида (МДА) в плазме на 3-и и 7-е сутки [5]. Конечный продукт перекисного окисления липидов (ПОЛ) МДА в эритроцитах у крыс с переломом бедра значительно увеличивается на 5-е, 10-е, 20-е и 30-е сутки наблюдения. Представляет интерес исследование редокс-статуса у 20 больных с переломами позвоночника, показавшее увеличение уровня в крови МДА, снижение активности глутатионпероксидазы и свободного глутатиона, что позволило автором констатировать окислительный стресс и рекомендовать применение антиоксидантов [6]. При переломах бедренных костей в крови возрастает уровень не только продуктов ПОЛ, оцениваемый по МДА, но и карбонильных белковых соединений [7].

При хирургическом лечении больных с переломами бедренной кости травматологическая помощь должна сопровождаться минимальным повреждением тканей, ограничением воспалительного процесса и высвобождения DAMPs и PAMPs с дальнейшей

эскалацией иммунных реакций – это так называемая ортопедическая хирургия с контролем повреждений (DCO) [8].

С учетом изменений иммунного статуса и процессов свободнорадикального окисления методы консервативной терапии должны включать подходы, направленные на модуляцию синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), иммунных реакций, предотвращение микробной пролиферации и элиминацию микробов [9].

Многочисленные экспериментальные разработки, представленные в современной литературе, направлены на снижение вероятности развития SIRS, прежде всего через подавление активности нейтрофилов. Однако ряд терапевтических подходов, описанных в литературе, таких как применение простагландина E1, моноклональных антител против β 2-интегрина, L-селектина (CD62L), а также применение статинов, не продемонстрировали желаемых результатов [10]. Ряд иммунотерапевтических подходов использует в качестве мишени при травматических повреждениях DAMPS, например анти-HMGB1 (High-mobility group B1), блокаду пуринергического рецептора P2X7, антитела к гистону ScFv, что позволяет снизить продукцию ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, улучшить функции эндотелия и снизить вероятность повреждения легочной ткани [11].

Представляют интерес имеющиеся в терапевтическом арсенале и разрабатываемые средства инфламмасомо-тропного действия. Так, ГК наряду с известным противовоспалительным действием способны через индукцию экспрессии NLRP3 в макрофагах повышать высвобождение провоспалительных факторов, в том числе ИЛ-1, что объясняет их эффект у тяжелых травматологических больных [12]. Модуляторами инфламмасомо-зависимых путей сигнализации выступают ИФН- γ и ГМ-КСФ, которые наряду с ГК рассматриваются как факторы предотвращения посттравматической иммуносупрессии и вторичных инфекций [13]. Перспективными в плане проведения дальнейших исследований по изучению модуляции воспалительного процесса после травмы являются низкомолекулярные ингибиторы NLRP3 инфламмосом [14].

МикроРНК (miR-10b) с помощью сигнальных путей TFP- β и подавления активности SMAD2 способствует остеогенной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток (МСК), образованию костной ткани и ускоряет репарацию после переломов, что позволяет рассматривать miR-10b в качестве потенциального терапевтического агента [15]. Использование микроРНК, трансплантация МСК, а также генная терапия с доставкой и модификацией генов белков костного морфогенеза (BMP), генов VEGF, PDGF, FGF могут применяться в обозримом будущем при нарушениях репарации костной ткани после переломов [16]. В ходе лечения переломов бедра с большими костными дефектами часто применяют заменители костного материала; показано, что одновременное локальное

применение с ними ИЛ-4 в дозах 10–100 нг значительно ускоряет остеогенез и васкуляризацию за счет смены фенотипа макрофагов с М1 на М2, что увеличивает миграцию, активацию, пролиферацию и остеогенную дифференциацию МСК за счет секретлируемых М2 факторов роста [17]. Последние 20–30 лет эндогенные и экзогенные антиоксиданты (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, витамины Е и С, провитамин А, глутатион, билирубин, ураты и др.) были в центре внимания и рассматривались как терапевтические агенты у травматологических больных, направленные на восстановление редокс-статуса [1]. Продемонстрировано, что применение гипербарической оксигенации у больных с политравмой снижает форбол-12-миристан-13-ацетат-индуцированную генерацию АФК нейтрофилами, образование нейтрофильных ловушек и как следствие вторичную альтерацию тканей, а также блокирует р38 MAPK-зависимые внутриклеточные пути нейтрофилов, не оказывая влияния на хемотаксис и апоптоз нейтрофилов [18]. Учитывая взаимодействие факторов врожденного иммунитета (в частности, комплемента) с реакциями гемостаза, успешные результаты показало применение транексамовой кислоты в плане подавления избыточной активности системы комплемента, снижения повреждения кишечника, легких и сердца и повышения выживаемости больных после тяжелых травм [19]. Ингибиторы С1 компонента при переломах бедра у людей и в экспериментах *in vivo* показали снижение комплементзависимого повреждения почек, кишечника и легких, снижение выраженности метаболического ацидоза [20].

Впервые озон был применен для дезинфекции больниц в 1856 г. и для лечения немецких солдат во время Первой мировой войны при посттравматической гангрене, ожогах, инфицированных ранах. В настоящее время он широко применяется в терапии многих заболеваний в форме аутогемотрансфузии различных объемов крови, внутримышечных, паравертебральных, внутривагинального введения, инсуффляции в полость носа, рта, посредством внутриматочных, интравагинальных, интраплевральных, интраперитонеальных, наружных и внутривагинальных способов введения, а также внутривенно в составе озонированного физиологического раствора [21]. Озон – водорастворимый бесцветный газ с характерным запахом, состоящий из трех атомов кислорода, входит в состав атмосферы, открыт в 1948 г. [21]. Токсичные эффекты О3 проявляются при применении его в концентрациях за пределами терапевтического окна, О3-терапия не рекомендуется при глубоких, инфицированных и некротических язвах [22].

Терапевтическое действие медицинского озона при ортопедической патологии многогранно и, как правило, рассматривается с позиций гормезиса. Поступление озона в организм приводит к умеренному окислительному стрессу, прежде всего за счет взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами и водой, образования АФК,

липоперекисей, гидроперекисей, изопростанов, озонидов, 4-гидроксиналенала и иных соединений. Это сопровождается активацией в клетках транскрипционного фактора Nrf2 и повышением синтеза и активности ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, каталазы, гемоксигеназы-1 (НО-1), НАДФ-квинон-оксидоредуктазы-1 (NQO-1), белков теплового шока (HSP) и иных соединений [21]. Антиоксидантные свойства озона значительно возрастают в сочетании с коэнзимом Q10, в частности в отношении СОД и каталазы, снижения уровня ТБК-положительных продуктов [23].

Описаны сложные взаимоотношения между ОЗ и ферментами (NOS, НО-1) генерации двух других газов в организме – NO и СО, а также БТШ Hsp32 и Hsp70. Особое внимание привлечено к индукции озоном синтеза белков теплового шока, учитывая роль последних в цитопротекции при воспалении, злокачественных опухолях, нейродегенеративных состояниях, старении и др. [24]. А изоформы оксида азота рассматривают как динамические датчики клеточного окислительного стресса и регуляторы редокс-гомеостаза. Горметическая роль ОЗ проявляется и в отношении про- и противовоспалительных эффектов СО, в частности синтеза простагландинов с различным механизмом действия, регуляции сосудистого тонуса.

ОЗ вмешивается в метаболизм клеток, повышая эффективность работы дыхательной цепи митохондрий, увеличивая скорость гликолиза за счет повышения активности фосфофруктокиназы, увеличивает синтез АТФ и 2,3-ДФГ, сдвигает кривую диссоциации оксигемоглобина вправо [25]. Данные факты наряду с увеличением синтеза NO, увеличением концентрации вазодилатора простагландин-1 повышают резистентность тканей к гипоксии, увеличивают площадь перфузии.

В экспериментах *in vitro* продемонстрировано неблагоприятное влияние (разрушение клеточной стенки, мембраны, внутриклеточных органелл, блокада ферментов, ингибирование роста и разрушение) ОЗ на различные вирусы, бактерии, грибы, в том числе на метициллинустойчивый золотистый стафилококк [26].

Иммунотропные эффекты ОЗ реализуются за счет H₂O₂-индуцированной активации синтеза ИФН, ФНО-альфа, ИЛ-8, ИЛ-2, ТФР-бета, тромбоцитарный ФР, способности снижать синтез брадикинина. Это позволяет регулировать воспалительные реакции, активировать Th1-зависимый иммунный ответ, участвовать в репарации и ремоделировании тканей. В эксперименте на крысах внутрибрюшинное введение озона в дозе 150 мг/кг уменьшает стрептозотоцин-индуцированные повреждения поджелудочной железы за счет увеличения количества в ткани железы глутатионтрансферазы, активации Nrf2-зависимых путей транскрипции, повышения уровня сывороточного инсулина и лептина [25]. В

клинических условиях показано гепатопротекторное действие ОЗ, а также увеличение эффективности традиционных гепатопротекторов при комбинированном применении последних с ОЗ [27]. В эксперименте на крысах внутрибрюшинное введение озона в дозе 150 мг/кг уменьшает стрептозотоцин-индуцированные повреждения поджелудочной железы за счет увеличения количества в ткани железы глутатионтрансферазы, активации Nrf2-зависимых путей транскрипции, повышения уровня сывороточного инсулина и лептина [22]. Продемонстрирована эффективность ОЗ-терапии в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, таких как ревматоидный артрит, субакромиальный бурсит, остеоартрит, бурситы, капсулиты, грыжи межпозвоночного диска, патология височно-нижнечелюстного сустава и др. [28]. При остеопорозе ОЗ положительно зарекомендовал себя при внутрисуставных инъекциях и внутривенном введении [29]. Применение озона в соответствии с рекомендациями Мадридской декларации по озонотерапии местно в составе озонированных растворов и при аутогемотерапии при хронических сосудистых, диабетических язвах и пролежнях повышает качество жизни пациентов по опросникам SF-36 и Евро-QOL-5D [30].

Описаны сложные взаимоотношения между ОЗ и ферментами (NOS, HO-1) генерации двух других газов в организме – NO и CO, а также БТШ Hsp32 и Hsp70. Особое внимание привлечено к индукции озоном синтеза БТШ, учитывая роль последних в цитопroteкции при воспалении, злокачественных опухолях, нейродегенеративных состояниях, старении и др. [24]. А изоформы оксида азота рассматривают как динамические датчики клеточного окислительного стресса и регуляторы редокс-гомеостаза. Применение ОЗ при диабетической стопе требует уточнения концентрации, способа введения, точных показаний и проведения дальнейших исследований [31]. По данным экспериментальных исследований ОЗ рассматривается в качестве адъювантной терапии злокачественных новообразований, требуется проведение рандомизированных клинических исследований для формулировки конкретных рекомендаций [24]. При этом еще в 1980 г. в авторитетном журнале «Science» была опубликована статья о способности ОЗ селективно ингибировать рост опухолевых клеток, не затрагивая интактные клетки [32].

Таким образом, анализ современной медицинской литературы, индексированной в Pubmed и Medline преимущественно в последние 5–10 лет, позволил интегрировать некоторые закономерности участия факторов иммунной системы и процессов свободнорадикального окисления в патогенезе изменений гомеостаза при механических повреждениях тканей, в частности при изолированных переломах бедренной кости.

Иницированные DAMPs и PAMPs активация плазменных систем протеолиза, включая комплемент, а также нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, а также секретируемые

ими медиаторы – провоспалительные цитокины, АФК, ферменты, фагоцитоз, нетоз – необходимы, с одной стороны, для удаления погибших клеток или элиминации микроорганизмов при присоединении инфекции, подготовки плацдарма для репаративных процессов, с другой – при дисфункции и дизрегуляции локальных процессов они участвуют в формировании SIRS, CARS, MODS, а позднее и PICS, приводя таким путем к нарушению репарации, инфекционным осложнениям, а зачастую и к летальности травматологических больных.

Неблагоприятные последствия во многом обусловлены несбалансированной депрессией адаптивного иммунитета, снижением отношения Th1/Th2 и Th17/Treg, избытком противовоспалительных цитокинов и формированием критического состояния у больных – ССИ. Такие неоднозначные изменения иммунного статуса обусловлены динамикой цитокинового профиля в крови, участием DAMPs и PAMPs зависимых путей сигнализации, включая формирование инфламмосом, межклеточную кооперацию, в том числе с участием MDSCs, и иные факторы.

Роль АФК и азота, генерация которых повышена после переломов бедренной кости как результат дисбаланса про- и антиоксидантных систем плазмы и клеток, связана с расширением зоны вторичной альтерации, отдаленным повреждением клеток и внеклеточных структур, регуляцией синтеза других медиаторов, репаративных процессов в костной ткани.

Выводы

1. Накопление и негативное воздействие активных форм кислорода приводит к расширению зоны вторичной альтерации и является одним из основных факторов патогенеза формирования синдрома ишемии-реперфузии.

2. Перспективными направлениями коррекции иммунного и редокс-статуса при переломах бедренной кости выступают многочисленные факторы модуляции SIRS – блокаторы и антагонисты избыточного количества растворимых медиаторов, избыточная активность иммунокомпетентных клеток, про- и противовоспалительные цитокины, факторы роста, гипербарическая оксигенация, применение озона, а также антиоксиданты.

3. Эффективность применения озонотерапии при хирургической ортопедической патологии патогенетически обоснована и отражена в многочисленных литературных источниках.

Список литературы

1. Sauaia A., Moore F.A. Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction. Crit Care Clin. 2017.

vol.33. no. 1. P.167-191.

2. Son Y., Kim S. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. *Methods Enzymol.* 2013. vol. 528. P.27-48.
3. Mittal M., Siddiqui M.R. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2014. vol. 20. no. 7. P. 1126–1167.
4. Keskin D. Reduction of Total Antioxidant Capacity after Femoral Fracture. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2015. vol. 82. no. 4. P. 293-295.
5. Cetinus E., Kiliç M. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005. vol. 125. no. 6. P. 376-80.
6. Kuyumcu F., Ayçan A. Evaluation of Oxidative Stress Levels and Antioxidant Enzyme Activities in Burst Fractures. *Med Sci Monit.* 2018. vol. 24. P. 225-234.
7. Amanvermez R., Gunay M., Piskin A. TNF- α , IL-1 β , and oxidative stress during fracture healing with or without ankaferd. *Bratisl Lek Listy.* 2013. vol. 114. no 11. P. 621-4.
8. Kanakaris N.K., Anthony C. Inflammatory response after nailing. *Injury.* 2017. vol. 48. P. S10–S14.
9. Lord J.M., Midwinter M.J. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *Lancet.* 2014. vol. 384. no. 9952. P. 1455-65.
10. Jansen J.O., Lord J.M. Clinical review: Statins and trauma - a systematic review. *Crit Care.* 2013. vol. 17. no. 3. P. 227.
11. Ruan X. Anti-HMGB1 monoclonal antibody ameliorates immunosuppression after peripheral tissue trauma: attenuated T-lymphocyte response and increased splenic CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid-derived suppressor cells require HMGB1. *Mediators Inflamm.* 2015. vol. 15. P. 458626.
12. Bortolotti P., Faure E. Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma. *Front Immunol.* 2018. vol. 9. P. 1900. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01900.
13. Kopitar-Jerala N. The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. *Front Immunol.* 2017. vol. 8. P. 873. DOI:10.3389/fimmu.2017.00873.
14. Lamkanfi M., Dixit V.M. A new lead to NLRP3 inhibition. *J Exp Med.* 2017. vol. 214. P. 3147–3149. DOI: 10.1084/jem.20171848.
15. Li H., Fan J. MiRNA-10b Reciprocally Stimulates Osteogenesis and Inhibits Adipogenesis Partly through the TGF- β /SMAD2 Signaling Pathway. *Aging Dis.* 2018. vol. 9. no. 6. P. 1058-1073.
16. Ding R.Y., Qiu J.N., Liu B.Y. A retrospective clinical study of sixty-three cases with persistent inflammation immunosuppression and catabolism syndrome. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2016. vol. 55. no. 12. P. 941-944.
17. Zheng Z.W., Chen Y.H. Development of an Accurate and Proactive Immunomodulatory

Strategy to Improve Bone Substitute Material-Mediated Osteogenesis and Angiogenesis. *Theranostics*. 2018. vol. 8. no. 19. P. 5482-5500.

18. Grimberg-Peters D., Büren C. Hyperbaric Oxygen Reduces Production of Reactive Oxygen Species in Neutrophils from Polytraumatized Patients Yielding in the Inhibition of p38 MAP Kinase and Downstream Pathways. *PLoS One*. 2016. vol. 11. no. 8. P. e0161343. DOI: 10.1371/journal.pone.0161343.

19. Roberts I., Shakur H., Coats T., Hunt B., Balogun E., Barnetson L. The CRASH-2 trial: a randomised controlled trial and economic evaluation of the effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events and transfusion requirement in bleeding trauma patients. *Health Technol Assess*. 2013. vol. 17(10). P. 1–79.

20. Heeres M. The effect of C1-esterase inhibitor on systemic inflammation in trauma patients with a femur fracture – The CAESAR study: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2011. vol. 12. P. 223.

21. Bocci V., Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem*. 2015. vol. 3. P. 4.

22. Re L., Martínez-Sánchez G., Bordicchia M. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo. A preliminary result? *Eur J Pharmacol*. 2014. vol. 742. P.158–162.

23. Inal M., Dokumacioglu A. The effects of ozone therapy and coenzyme Q(1)(0) combination on oxidative stress markers in healthy subjects. *Ir J Med Sci*. 2011. vol. 180. P. 703–707.

24. Clavo B., Santana-Rodríguez N. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018. DOI: 10.1155/2018/7931849.

25. Siniscalco D., Trotta M.C., Brigida A.L. Intraperitoneal Administration of Oxygen/Ozone to Rats Reduces the Pancreatic Damage Induced by Streptozotocin. *Biology (Basel)*. 2018. vol. 7. no. 1. pii: E10. DOI: 10.3390/biology7010010.

26. Song M., Zeng Q. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep*. 2018. vol. 17. no. 2. P. 2449-2455.

27. Bai Z., Li H. Successful treatment of acute-on-chronic liver failure and hemolytic anemia with hepato-protective drugs in combination with intravenous ozone without steroids: A case report. *Intractable Rare Dis Res*. 2018. vol. 7. no. 3. P. 204-208.

28. Seyam O., Smith N. L. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med Gas Res*. 2018. vol. 8. no. 3. P. 103–110.

29. Manoto S.L., Maepa M.J. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *J Biol Sci*. 2018. vol. 25. no. 4. P. 672-679.

30. Izadi M., Bozorgi M. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone. *Medicine (Baltimore)*. 2018. vol. 97. no. 48. P. e12505. DOI:10.1097/MD.00000000000012505.
31. Kushmakov R., Gandhi J., Seyam O. Ozone therapy for diabetic foot. *Med Gas Res*. 2018. vol. 8 (3). P. 111-115.
32. Sweet F., Kao M.-S., Lee S.-C. D., Hagar W. L., Sweet W. E. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science*. 1980. vol. 209 (4459). P. 931–933.