

ВЛИЯНИЕ ОЗОНОТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И АНТИОКСИДАНТНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

ОСИПОВ Б.Б.¹, КОЗЛОВ А.Е.²

¹Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Республика Беларусь

²Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Гомель, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2018. – Том 17, №1. – С. 34-42.

THE EFFECT OF OZONOTHERAPY ON THE INDICES OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT MECHANISMS IN EXPERIMENTAL LIVER CIRRHOSIS

OSIPOV B.B.¹, KAZLOU A.Y.²

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

²The Institute of Radiobiology of the Belarusian National Academy of Sciences, Gomel, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2018;17(1):34-42.

Резюме.

Цель – оценить изменения некоторых биохимических показателей окислительного стресса и антиоксидантных механизмов организма при экспериментальном циррозе печени у крыс, а также влияние курса озонотерапии на баланс этих показателей при экспериментальном циррозе печени.

Материал и методы. В качестве объекта использовались белые крысы-самцы линии Вистар (n=15). После моделирования цирроза печени (по авторской методике) крысам экспериментальной группы проводился курс озонотерапии. Затем животных выводили из эксперимента и изучали маркеры окислительного стресса и антиоксидантных механизмов в сыворотке крови и ткани печени.

Результаты. При экспериментальном циррозе печени у крыс наблюдается статистически значимое повышение показателей маркеров окислительного стресса и снижение активности антиоксидантных ферментов по сравнению с нормальными показателями (p=0,009). Курс озонотерапии при экспериментальном циррозе печени приводит к статистически значимому снижению большинства показателей окислительного стресса (p=0,009) и повышению активности антиоксидантных ферментов и некоторых неферментативных антиоксидантных механизмов (p=0,016 для концентрации протеиновых сульфгидрильных групп в ткани печени и p=0,009 для остальных показателей) по сравнению с животными контрольной группы (с циррозом печени без терапевтических воздействий).

Заключение. При экспериментальном циррозе печени наблюдается статистически значимое повышение показателей окислительных процессов и снижение активности антиоксидантных ферментов по сравнению с нормальными показателями. Курс озонотерапии при экспериментальном циррозе печени имеет положительное влияние на дисбаланс окислительных и антиоксидантных процессов, что проявляется статистически значимым снижением уровня большинства исследованных маркеров окислительного стресса и повышением активности антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: цирроз печени, озонотерапия, окислительный стресс, антиоксидантные процессы и механизмы, маркеры.

Abstract.

Objectives. To estimate the changes of some biochemical indices of oxidative stress and antioxidant mechanisms in rats with experimental liver cirrhosis and also to evaluate an effect of the course of ozonotherapy on the balance of these indicators in experimental liver cirrhosis.

Material and methods. White male rats of the line Wistar (n=15) served as an object of this research. After modelling liver cirrhosis (by our own technique) a course of ozonotherapy was provided to the rats of the experimental group. Then the animals were taken from the experiment and the markers of oxidative stress and antioxidant mechanisms in the blood

serum and liver samples were studied and compared to those of the control animals.

Results. A statistically significant increase of the oxidative stress indices and a decrease in the activity of antioxidant enzymes compared to normal indicators ($p=0,009$) are observed in rats with experimental liver cirrhosis. The course of ozonotherapy in experimental liver cirrhosis leads to the statistically significant decrease of the majority of the oxidative stress markers ($p=0,009$) and the increase in the activity of antioxidant enzymes and some non-enzymatic antioxidant mechanisms ($p=0,016$ for the concentration of protein sulfhydryl groups in the liver tissue and $p=0,009$ for other indices) in comparison with the control group animals (with liver cirrhosis without any therapeutic influence).

Conclusions. Liver cirrhosis is accompanied by the statistically significant increase of oxidative processes indices and the decreased activity of antioxidant enzymes in comparison with the norm. The course of ozonotherapy has a positive effect on the imbalance between oxidative and antioxidant processes, which is proved by the statistically significant decrease of the majority of the studied oxidative processes markers and the increase of antioxidant enzymes activity.

Key words: liver cirrhosis, ozonotherapy, oxidative stress, antioxidant processes and mechanisms, markers.

Цирроз печени и его осложнения остаются важной медицинской и социальной проблемой. В экономически развитых странах цирроз входит в число шести основных причин смерти пациентов от 35 до 60 лет, составляя 14-30 случаев на 100 тыс. населения. Ежегодно в США от цирроза печени умирает около 35 тысяч человек [1], в Российской Федерации – около 50 тысяч человек [2]. Цирроз печени является причиной 85-95% летальных исходов при хронических заболеваниях печени, а также наиболее частой причиной смерти пациентов среди неопухолевых заболеваний органов желудочно-кишечного тракта [3].

В нескольких исследованиях *in vivo* и *in vitro* было показано, что оксидативный стресс и связанное с ним поражение печени могут выступать как один из механизмов патогенеза при циррозе и других хронических заболеваниях печени [4, 5]. Также отмечено, что усиление перекисного окисления липидов, которое наблюдается при хронических заболеваниях печени, не сопровождается адекватным повышением активности ферментов антиоксидантной системы, таких как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и др. [6]. Учитывая вышесказанное, патогенетически обоснованным является назначение средств для коррекции дисбаланса окислительных и антиоксидантных процессов при циррозе печени. В качестве такого средства может выступать медицинский озон.

Медицинский озон – это озонкислородная смесь, состоящая из 0,05-10% озона и 99,95-90% чистого кислорода, получаемая из сверхчистого кислорода путем его разложения в слабом электрическом разряде. Ключевым моментом в озонотерапии является парентеральное применение малых доз озона, так как озон в больших концентрациях является токсичным и проявляет себя

как мощный окислитель [7, 8].

В настоящее время признано, что окислительное повреждение различных макромолекул, составляющих структурную основу всех живых организмов (нуклеиновых кислот, белков, липидов), – это основное проявление так называемого окислительного стресса. За последние десятилетия необычайно усилилось внимание к свободным радикалам как к высокоактивным и за счёт этого деструктивным молекулам, которые имеют важное значение для сохранения здоровья человека и для развития у него заболеваний. Учитывая биологическую роль молекулярного кислорода, первостепенное значение в изучении влияния в настоящее время отдаётся самому молекулярному кислороду и его разнообразным высокоактивным производным, объединяемым в понятие «активные формы кислорода» (АФК). Живые организмы подвергаются зачастую токсическому воздействию самых разнообразных АФК как экзо-, так и эндогенного происхождения. Но иногда подобное токсическое действие АФК имеет благотворное влияние на живые организмы. Например, в терапевтических целях используются гипербарическая оксигенация и озонирование [9].

Так как при озонотерапии в организм попадают активные формы кислорода, то очень важным является рассмотрение вопроса влияния озона на индукцию прооксидантных процессов. В многочисленных исследованиях показано, что терапевтические дозы озона стимулируют антиоксидантную систему и, в конечном итоге, уменьшают интенсивность свободно-радикальных процессов [10, 11]. Обсуждая механизм такого действия медицинского озона, можно сказать, что под влиянием озонотерапии сперва происходит определённая активация свободнорадикального окисления. Это объясняется тем, что при

внутривенных капельных инфузиях озонированного изотонического раствора хлорида натрия в организм вводятся озон, кислород и свободные радикалы. При этом быстро запускается антиоксидантная система защиты, которую озон, видимо, опосредованно стимулирует. Предполагается, что антиоксидантная система в данном случае работает на стадии активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), препятствуя образованию и накоплению продуктов ПОЛ (в частности малонового диальдегида) [12]. Проникая внутрь клеток, озон связывается с содержащимися там полиненасыщенными жирными кислотами и образует биологически активные озониды. Последние активируют деятельность собственной глутатионовой системы, которая, в свою очередь, обладает мощным антиоксидантным эффектом [13, 14].

Таким образом, один из основных механизмов терапевтического действия медицинского озона – это восстановление динамического равновесия между ПОЛ и антиоксидантной системой защиты организма. Кроме того, озонотерапия как лечебный метод обладает различными метаболическими эффектами и точками приложения в организме, что было подтверждено рядом исследований [15]. Применение медицинского озона активирует макрофагальную защиту и способствует индукции цитокинов [16], положительно влияет на микроциркуляцию [17].

Целью нашего исследования являлись оценка изменений некоторых биохимических показателей окислительного стресса и антиоксидантных механизмов организма при экспериментальном циррозе печени у крыс, а также оценка влияния курса озонотерапии на баланс этих показателей при экспериментальном циррозе печени.

Материал и методы

Для оценки влияния озонотерапии на показатели прооксидантной и антиоксидантной систем организма при экспериментальном циррозе печени использовались белые крысы-самцы линии Вистар (n=15).

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с приказом Минвуза СССР №742 от 13 ноября 1984 г. «Об утверждении правил работ с использованием экспериментальных животных», Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях, принятой Советом Европы в 1986

году, согласно «Положению о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе Гомельского государственного медицинского института и мерах по реализации требований биомедицинской этики», утвержденному Ученым Советом ГГМУ №54-А от 23.05.2002 года, и требованиями, регламентирующими работу с экспериментальными животными.

Для формирования цирроза печени у крыс использовалась собственная токсико-алиментарная модель. Суть модели заключалась в следующем: крысам в течение 8 недель внутрибрюшинно вводили 50% раствор CCl_4 в оливковом масле из расчета 0,5 мл/кг массы тела два раза в неделю и раствор тиоацетамида из расчета 100 мг/кг один раз в неделю. Кроме того, ежедневно с кормом животным вводили 5 г топленого свиного сала, а также добавляли к питьевой воде 5% раствора этилового спирта. Способ обеспечивает повышение воспроизводимости цирроза печени, сокращение времени моделирования, достижение более стойкого результата с меньшей обратимостью развившихся патологических изменений в печени. На данную модель получен положительный результат предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента Республики Беларусь на изобретение № а 20160406 от 20.11.2016.

Экспериментальных животных разделили на 3 группы: две контрольные и одну экспериментальную (табл. 1). Моделирование цирроза печени проводили крысам групп 2 и 3.

Озонотерапия проводилась путем внутрибрюшинного введения стерильного озонированного физиологического раствора (0,9% раствор натрия хлорида). ОФР получали путем барботирования стерильного физиологического раствора озонкислородной смесью с концентрацией озона на выходе из озонатора от 1 до 10 мг/л. Озонирование проводили на медицинской озонотерапевтической установке УОТА-60-01 «Медозон» (ООО «фирма МЕДОЗОН», Россия). В нашем исследовании использовался ОФР в концентрации 5 мг/л. После озонирования полученный раствор вводили крысам путем внутрибрюшинной инъекции инсулиновым шприцем под кратковременным масочным наркозом. Вводили ОФР из расчета 5 мкг озона на кг массы тела животного. Озонотерапию проводили курсом из 5 процедур, которые выполняли ежедневно в одно и то же время.

Животные выводились из эксперимента декапитацией в одинаковые сроки: на следующий

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных групп крыс

Экспериментальная группа	Характеристика группы
Группа 1 – контрольная (n=5)	Здоровые животные, которым не проводили моделирование цирроза печени. Они использовались для определения «нормальных» показателей маркеров окислительного стресса и антиоксидантных механизмов и сравнения их с таковыми в других группах.
Группа 2 (n=5)	После развития цирроза печени токсическое воздействие прекращали, а затем крысам в течение 5 дней проводили ежедневное внутрибрюшинное введение стерильного изотонического физиологического раствора в количестве 1 мл. Крысы данной группы использовались как контрольная группа по отношению к группе 3.
Группа 3 (n=5)	После развития цирроза печени токсическое воздействие прекращали, а затем этим крысам в течение 5 дней проводили ежедневное внутрибрюшинное введение стерильного <i>озонированного</i> изотонического физиологического раствора (ОФР). Эта основная экспериментальная группа крыс использовалась для оценки влияния озонотерапии на показатели маркеров окислительного стресса и антиоксидантных механизмов.

день после последнего сеанса озонотерапии для крыс группы 3.

Объектом для лабораторных методов диагностики являлись сыворотка крови и образцы печени. После выведения животных из эксперимента кровь собирали в одноразовые полипропиленовые пробирки (SARSTEDT) и выдерживали при 4°C в течение 1 ч. Сыворотку крови получали центрифугированием (2000g, 20 мин., 4°C), помещали в микропробирки (Eppendorf) и хранили (-80°C) до использования.

В сыворотке крови определялись следующие показатели: концентрация ТБК-активных продуктов (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) [18], конечных продуктов окисления белков (advanced oxidation protein products, AOPP) [19], карбониллов белков [20], активность глутатионпероксидазы [21]. Определение концентрации общего белка в сыворотке крови проводилось биуретовым методом (использовалась коммерческая тест-система фирмы «Анализ-Плюс» (Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя).

Образцы ткани печени немедленно замораживали в жидком азоте и хранили (-80°C) до использования, не допуская преждевременного размораживания. Разморозка проводилась в ледяном физиологическом растворе. Подготовленные образцы тканей измельчались на льду до состояния фарша и гомогенизировались в гомогенизаторе Поттера-Эльведжейма (тефлоновый пестик и стеклянная ступка, зазор – 0,2-0,3 мм). Соотношение ткань : буфер составляло 1:9 (масса:объем).

Использовался 10 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий коктейль ингибиторов протеаз (Sigma P8340). Гомогенат центрифугировался (20000g, 10 мин., 40C) для получения постмитохондриальной фракции тканей (цитозоль + микросомы) [22]. Полученный супернатант помещали в микропробирки (Eppendorf) и хранили (-80°C) до использования, не допуская преждевременного размораживания. В полученных образцах определяли: концентрацию ТБК-активных продуктов, карбониллов белков, конечных продуктов окисления белков, активность глутатион-S-трансферазы [23], супероксиддисмутазы [24], а также концентрацию протеиновых сульфгидрильных (-SH) групп [25]. Концентрация белка в постмитохондриальной фракции ткани печени определялась методом Лоури [26]. Расчёт активности ферментов осуществлялся согласно [27].

Измерения оптической плотности и интенсивности флуоресценции выполнены на микропланшетном ридере Tecan Infinite M200 (Tecan Ltd., Swiss) с использованием 96-луночных микропланшетов (SARSTEDT и Greiner Bio-One) с использованием специализированного программного обеспечения Tecan Magellan (v 6.6).

Анализ и обработка полученных данных проводились с использованием пакета программ Statistica 8 (Statsoft, USA). Для оценки различий между изучаемыми показателями экспериментальных групп использовались непараметрические методы. В случае сравнения двух независимых групп применялся критерий Манна-Уитни, при сравнении трех независимых групп исполь-

зовался критерий Краскела-Уоллиса. Статистически значимыми результаты считались при $p < 0,05$.

Результаты

Предложенная нами токсико-алиментарная модель поражения печени приводит к развитию цирроза печени к концу 8-ой недели эксперимента, что подтверждается гистологическими методами. Макроскопически печень увеличена, мелкобугристая, уплотнена, край закруглен. Микроскопически наблюдался диффузный мелкоочаговый некроз гепатоцитов с дисконплексацией пластинчатого строения долек, а также выраженный серозный отек и скопления пигмента липофуцина преимущественно вокруг сосудов. Отмечалось разрастание соединительной ткани септ, с формированием ложных долек, а также большое количество диффузно расположенных двухъядерных клеток (рис. 1).

Анализ маркеров окислительного стресса и антиоксидантных механизмов при экспериментальном циррозе печени.

Медиана концентрации маркеров окислительного стресса в сыворотке крови крыс группы 1 составила: ТБК-активные продукты – 2,10 (2,03-2,15) мкМ/г белка, конечные продукты окисления белков – 224,5 (205,2-248,48) нмоль/мг белка, карбонилы белков – 1,14 (1,11-1,23) нм/мг белка. В свою очередь, аналогичные показатели сыворотки крови крыс группы 2 были следующими: ТБК-активные продукты – 6,63 (6,23-7,11) мкМ/г белка, конечные продукты окисления

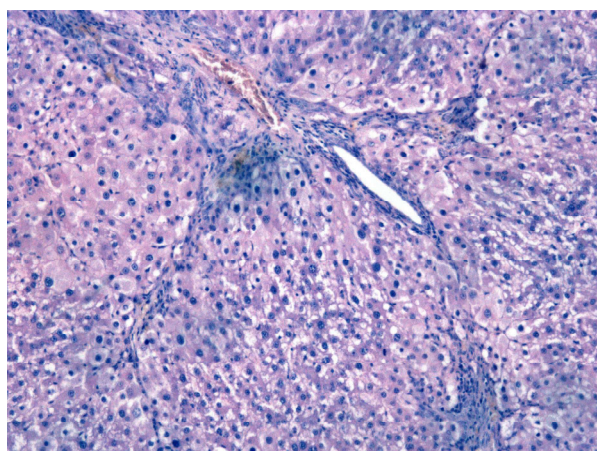


Рисунок 1 – Микрофотография участка печени крысы в день окончания моделирования цирроза печени. Увеличение $\times 100$.

белков – 741,9 (741,81-743,45) нмоль/мг белка, карбонилы белков – 5,25 (5,19-5,34) нм/мг белка.

Медиана концентрации аналогичных показателей в образцах печени крыс группы 1 составила: ТБК-активные продукты – 2,01 (1,89-2,14) нмоль/мг белка, конечные продукты окисления белков – 7,12 (6,71-7,57) мкмоль/мг белка, карбонилы белков – 1,82 (1,79-1,93) нмоль/мг белка. В свою очередь, данные показатели в образцах печени крыс группы 2 были следующими: ТБК-активные продукты – 3,69 (3,56-3,81) нмоль/мг белка, конечные продукты окисления белков – 12,96 (12,56-13,26) мкмоль/мг белка, карбонилы белков – 5,12 (4,86-5,34) нмоль/мг белка.

Таким образом, имело место статистически значимое повышение уровня маркеров свободнорадикальных окислительных процессов в сыворотке крови и в образцах печени ($p=0,009$ для всех показателей) у крыс с циррозом печени (группа 2) по сравнению со здоровыми особями (группа 1).

Медиана активности глутатионпероксидазы сыворотки крови у здоровых крыс (группа 1) составила 437,25 (431,17-463,13) Ед/л, а у крыс с циррозом печени (группа 2) – 266,33 (264,78-278,23) Ед/л.

Медиана же активности антиоксидантных ферментов печени у крыс группы 1 составила: супероксиддисмутаза – 3,65 (3,47-3,78) нмоль/мин/мг белка, глутатион-S-трансфераза 21,15 (19,47-22,34) нмоль/мг белка, протеиновые сульфгидрильные группы – 10,54 (10,23-11,36) нмоль/мг белка. У крыс группы 2 аналогичные показатели печени составили: супероксиддисмутаза – 1,62 (1,59-1,67) нмоль/мин/мг белка, глутатион-S-трансфераза 6,58 (5,69-7,67) нмоль/мг белка, протеиновые сульфгидрильные группы – 7,92 (7,45-8,54) нмоль/мг белка.

Итак, в результате проведенных исследований отмечено статистически значимое снижение уровня активности антиоксидантных ферментов сыворотки крови и печени ($p=0,009$ для всех показателей) у крыс с циррозом печени (группа 2) по сравнению со здоровыми особями (группа 1).

Анализ маркеров окислительного стресса и антиоксидантных механизмов при экспериментальном циррозе печени после курса озонотерапии.

Медиана концентрации показателей маркеров окислительного стресса в сыворотке крови крыс группы 3 составила: ТБК-активные продук-

ты – 3,27 (3,12-3,45) мкМ/г белка, конечные продукты окисления белков – 465,1 (456,22-480,90) нмоль/мг белка, карбонилы белков – 5,34 (4,89-5,78) нм/мг белка. Медиана концентрации этих же маркеров в ткани печени крыс группы 3 составила: ТБК-активные продукты – 2,75 (2,67-2,87) нмоль/мг белка, конечные продукты окисления белков – 9,78 (9,45-10,34) мкмоль/мг белка (рис. 2), карбонилы белков – 3,65 (3,52-4,25) нмоль/мг белка.

Таким образом, у крыс группы 3 после курса озонотерапии уровень маркеров свободнорадикальных окислительных процессов в сыворотке крови и ткани печени статистически ниже, чем у крыс группы 2 ($p=0,009$) для всех показателей, кроме концентрации карбонилы белков в сыворотке крови, где не было выявлено статистической разницы ($p=0,83$) между двумя группами.

Медиана активности глутатионпероксидазы в сыворотке крови у крыс после курса озонотерапии составила 392,97 (390,32-393,19) Ед/л. В свою очередь, медиана активности антиоксидантных ферментов в ткани печени у крыс данной группы принимала следующие значения: супероксиддисмутаза – 2,25 (2,21-2,34) нмоль/мин/мг белка, глутатион-S-трансфераза – 12,22 (10,78-13,58) нмоль/мг белка (рисунок 3), протеиновые сульфгидрильные группы – 9,32 (9,14-9,45) нмоль/мг белка.

Таким образом, у крыс группы 3 уровень активности антиоксидантных ферментов сыворотки крови и печени выше, чем в группе 2 ($p=0,016$ для концентрации протеиновых суль-

фгидрильных групп в ткани печени и $p=0,009$ для остальных показателей).

При сравнении всех трех групп (критерий Краскела-Уоллиса) также выявлена статистическая разница как для маркеров свободнорадикальных процессов окисления ($p=0,009$ для концентрации карбонилы белков в сыворотке крови, $p=0,0019$ для остальных показателей), так и маркеров антиоксидантных процессов ($p=0,0025$ для концентрации протеиновых сульфгидрильных групп в ткани печени, $p=0,0019$ для остальных показателей).

Обсуждение

Сравнительный анализ биохимических маркеров окислительного стресса и антиоксидантных процессов в сыворотке крови и печени здоровых крыс (группа 1) и крыс с циррозом печени (группа 2) показал, что при циррозе печени наблюдаются статистически значимое повышение маркеров окислительного стресса и снижение активности антиоксидантных ферментов ($p=0,009$). На основании этих данных можно судить о роли оксидативного стресса в патогенезе цирроза печени и наблюдаемом при этом заболевании дисбалансе окислительных и антиоксидантных процессов в организме.

После курса озонотерапии (группа 3) у крыс наблюдалось статистически значимое снижение уровня маркеров окислительных процессов для всех показателей ($p=0,009$), кроме концентрации карбонилы белков в сыворотке

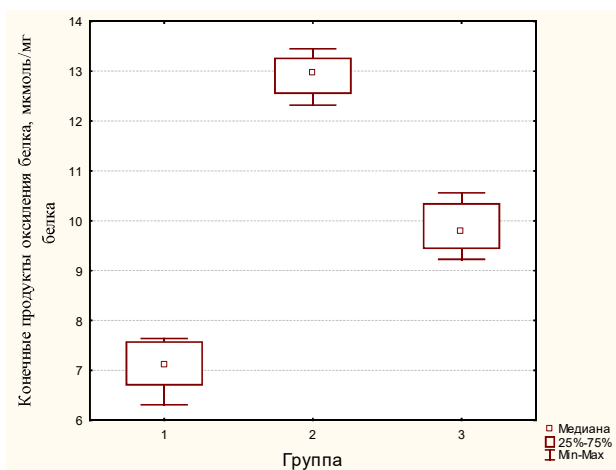


Рисунок 2 – Статистическая характеристика групп в зависимости от концентрации конечных продуктов окисления белков в образцах печени крыс после курса озонотерапии для группы 3.

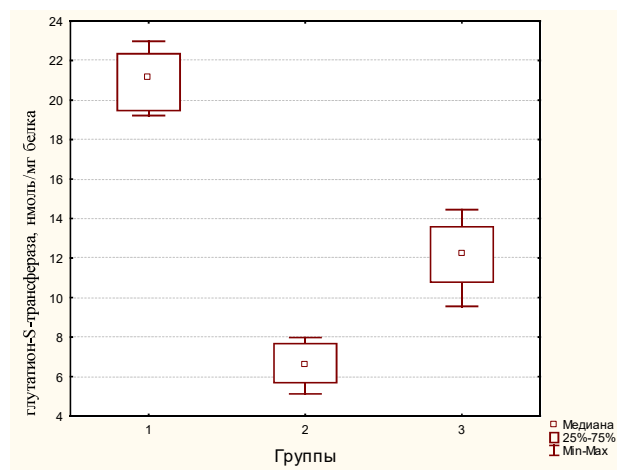


Рисунок 3 – Статистическая характеристика групп в зависимости от активности фермента глутатион-S-трансферазы в ткани печени крыс после курса озонотерапии для группы 3.

крови, где не выявлено статистической разницы ($p=0,83$), а также повышение активности антиоксидантных ферментов и маркеров некоторых неферментативных антиоксидантных механизмов в сыворотке крови и печени ($p=0,016$ для концентрации протеиновых сульфгидрильных групп в ткани печени и $p=0,009$ для остальных показателей) по сравнению с крысами группы 2. Это свидетельствует о положительном влиянии курса озонотерапии на тот дисбаланс окислительных и антиоксидантных процессов, который наблюдается при циррозе печени.

Заключение

При экспериментальном циррозе печени наблюдается статистически значимое повышение показателей окислительных процессов и снижение активности антиоксидантных ферментов по сравнению с нормальными показателями.

Курс озонотерапии имеет положительное влияние на дисбаланс окислительных и антиоксидантных процессов, который наблюдается при циррозе печени, что феноменологически проявляется статистически значимым снижением уровня большинства исследованных маркеров окислительного стресса и повышением активности антиоксидантных ферментов.

Литература

1. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study / S. Scaglione [et al.] // *J. Clin. Gastroenterol.* – 2015 Sep. – Vol. 8, N 49. – P. 690–696.
2. Бобров, А. Н. Цирроз печени: этиологические, эпидемиологические, клинико-диагностические и профилактические аспекты по данным 15-летнего (1996-2010 гг.) наблюдения в многопрофильном госпитале : дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.04 / А. Н. Бобров. – М., 2011. – 290 с.
3. Russian mortality trends for 1991-2001: analysis by cause and region / T. Men [et al.] // *BMJ.* – 2003 Oct. – Vol. 327, N 7421. – P. 964.
4. Parola, M. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis / M. Parola, G. Robino // *J. Hepatol.* – 2001 Aug. – Vol. 35, N 2. – P. 297–306.
5. Rolo, A. P. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis / A. P. Rolo, J. S. Teodoro, C. M. Palmeira // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012 Jan. – Vol. 52, N 1. – P. 59–69.
6. Супероксиддисмутаза и глутатионредуктаза при хроническом гепатите С и неалкогольной жировой болезни печени / И. А. Булатова [и др.] // *Фундам. исслед.* – 2014. – № 7-3. – С. 455–459.
7. Конторщикова, К. Н. Регуляторные эффекты озона / К. Н. Конторщикова // *Нижегород. мед. журн.* – 2003. – № S. – С. 5–6.
8. Rilling, S. 30 years of ozone-oxygen therapy a historical perspective / S. Rilling // *Ozone in medicine : proceedings of the eleventh Ozone World Congress, Aug. 29 – Sep. 3, 1993, San Francisco.* – San-Francisco, 1993. – P. 1–14.
9. Таганович, А. Д. Патологическая биохимия / А. Д. Таганович, Э. И. Олецкий, И. Л. Котович. – М. : БИНОМ, 2013. – 447 с.
10. Клеточно-метаболические аспекты патогенеза, лечения и профилактики хронических церебральных ишемий и нейродегенеративных процессов / В. А. Малахов [и др.]. – Харьков : Основа, 2000. – 174 с.
11. Bocci, V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today / V. Bocci // *J. Biol. Regul. Homeostas. agents.* – 1996 Apr-Sep. – Vol. 10, N 2/3. – P. 31–53.
12. Kontorschikova, C. N. Biochemical safety control in ozone therapy / C. N. Kontorschikova // *Ozone in Medicine : 12th World Congress of the International Ozone Association.* – Lille : Tours-Instaprint, 1995. – Vol. 3. – P. 231–234.
13. Viebahn-Haensler, R. Ozone in Medicine: Clinical Evaluation and Evidence Classification of the Systemic Ozone Applications, Major Autohemotherapy and Rectal Insufflation, According to the Requirements for Evidence-Based Medicine / R. Viebahn-Haensler, O. Fernandez, Z. Fahmy // *Ozone: Science & Engineering.* – 2016. – Vol. 38, N 5. – P. 322–345.
14. Riva Sanseverino, E. Oxygen-ozone therapy and physical activity in humans / E. Riva Sanseverino, E. Castellacci, P. Castellacci // *Proceedings of the 12-th World Congress of the International Ozone Association.* – Zurich, 1995. – Vol. 3. – P. 65–72.
15. Озонотерапия в клинике инфекционных болезней / В. Х. Фазылов [и др.] // *Практ. медицина.* – 2013. – № 5. – С. 47–51.
16. Hotchkiss, J. A. Endotoxin or cytokines attenuate ozone-induced DNA synthesis in rat nasal transitional epithelium / J. A. Hotchkiss, J. R. Harkema // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1992 Jun. – Vol. 114, N 2. – P. 182–187.
17. Газин, И. К. Оценка некоторых показателей гемостаза у больных с осложненным сахарным диабетом при использовании озонотерапии / И. К. Газин // *Эфферент. терапия.* – 2001. – Т. 7, № 2. – С. 67–68.
18. Shlafer, M. A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances / M. Shlafer, B. M. Shepard // *Anal. Biochem.* – 1984 Mar. – Vol. 137, N 2. – P. 269–276.
19. Optimisation of an Advanced Oxidation Protein Products Assay: Its Application to Studies of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus / L. T. Emma [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 496271.
20. Oxidative damage to plasma proteins in patients with chronic alcohol dependence: the effect of smoking / E. Kapaki [et al.] // *In Vivo.* – 2007 May-Jun. – Vol. 21, N 3. – P. 523–528.
21. Моин, В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // *Лаб. дело.* – 1986. – № 12. – С. 724–727.
22. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides / G. Konstantinos [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013 Jun. – Vol. 59. – P. 27–35.

23. Mannervik, B. Measurement of Glutathione Transferases / B. Mannervik, P. Jemth // *Curr. Protoc. Toxicol.* – 2001. – Chapter 6. – P. Unit6.4.
24. Сирота, Т. В. Использование нитросинего тетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // *Биомед. химия.* – 2013. – Т. 59, № 4. – С. 399–410.
25. Subcellular compartmentalization of glutathione: Correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity / R. M. Green [et al.] // *Mutagenesis.* – 2006 Nov. – Vol. 21, N 6. – P. 383–390.
26. Filchenkov, G. N. The low dose gamma ionising radiation impact upon cooperativity of androgenspecific proteins / G. N. Filchenkov, E. H. Popoff, A. D. Naumov // *J. Environ. Radioact.* – 2014 Jan. – Vol. 127. – P. 182–190.
27. Биссвангер, Х. Практическая энзимология / Х. Биссвангер; пер. с англ. Т. Мосоловой. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 328 с.

Поступила 04.01.2018 г.

Принята в печать 31.01.2018 г.

References

1. Scaglione S, Kliethermes S, Cao G, Shoham D, Durazo R, Luke A, Volk ML. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. *J Clin Gastroenterol.* 2015 Sep;49(8):690-6. doi: 10.1097/MCG.0000000000000208
2. Bobrov AN. Cirrhosis of liver: etiological, epidemiological, clinical, diagnostic and preventive aspects according the 15-year (1996-2010). observations in a multidisciplinary hospital: dis ... d-ra med nauk: 14.01.04. Moscow, RF; 2011. 290 p. (In Russ.)
3. Men T, Brennan P, Boffetta P, Zaridze D. Russian mortality trends for 1991-2001: analysis by cause and region. *BMJ.* 2003 Oct;327(7421):964. doi: 10.1136/bmj.327.7421.964
4. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2001 Aug;35(2):297-306.
5. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012 Jan;52(1):59-69. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.003
6. Bulatova IA, Shchekotova AP, Suzdal'tseva KN, Shchekotov VV, Ulitina PV, Zhizhilev EV. Superoxide dismutase and glutathionereductase in chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease. *Fundam Issled.* 2014;(7-3):455-9. (In Russ.)
7. Kontorshchikova KN. Regulatory effects of ozone. *Nizhegorod Med Zhurn.* 2003;(S):5-6. (In Russ.)
8. Rilling S. 30 years of ozone-oxygen therapy a historical perspective. In: *Ozone in medicine: proceedings of the eleventh Ozone World Congress Aug 29 – Sep 3 1993 San Francisco.* San-Francisco, USA; 1993. P. 1-14.
9. Taganovich AD, Oletskiy EI, Kotovich IL. Pathological biochemistry. Moscow, RF: BINOM; 2013. 447 p. (In Russ.)
10. Malakhov VA, Belous AM, Pasyura IN, Doroshenko GI. Cellular and metabolic aspects of the pathogenesis, treatment and prevention of chronic cerebral ischemia and neurodegenerative processes. Kharkov, Ukraine: Osnova; 2000. 174 p. (In Russ.)
11. Bocci V. Ozone as a bioregulator. *Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today.* *J Biol Regul Homeost Agents.* 1996 Apr-Sep;10(2-3):31-53.
12. Kantschikov CN. Biochemical safety control in ozone therapy. In: *Ozone in Medicine: 12th World Congress of the International Ozone Association.* Lille: Tours-Instaprint; 1995. Vol 3. P. 231-4.
13. Viebahn-Haensler R, Fernandez O, Fahmy Z. Ozone in Medicine: Clinical Evaluation and Evidence Classification of the Systemic Ozone Applications, Major Autohemotherapy and Rectal Insufflation, According to the Requirements for Evidence-Based Medicine. *Ozone: Science & Engineering.* 2016;38(5):322-45.
14. Riva Sanseverino E, Castellacci E, Castellacci P. Oxygen-ozone therapy and physical activity in humans. In: *Proceedings of the 12-th World Congress of the International Ozone Association.* Zurich; 1995. Vol 3. P. 65-72.
15. Fazylov VKh, Galeeva NV, Zagidullina AI, Tairov IN. Ozone therapy at the clinic of infectious diseases. *Prakt Meditsina.* 2013;(5):47-51. (In Russ.)
16. Hotchkiss JA, Harkema JR. Endotoxin or cytokines attenuate ozone-induced DNA synthesis in rat nasal transitional epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992 Jun;114(2):182-7.
17. Gazin IK. Evaluation of some hemostatic parameters in patients with complicated diabetes if you are using ozone therapy. *Efferent Terapiia.* 2001;7(2):67-8. (In Russ.)
18. Shlafer MB, Shepard M. A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances. *Anal Biochem.* 1984 Mar;137(2):269-76.
19. Taylor EL, Armstrong KR, Perrett D, Hattersley AT, Winyard PG. Optimisation of an Advanced Oxidation Protein Products Assay: Its Application to Studies of Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:496271. doi.org/10.1155/2015/496271
20. Kapaki E, Liappas I, Lyras L, Paraskevas GP, Mamali I, Theotoka I, et al. Oxidative damage to plasma proteins in patients with chronic alcohol dependence: the effect of smoking. *In Vivo.* 2007 May-Jun;21(3):523-8.
21. Moin VM. A simple and specific method for the determination of glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab Delo.* 1986;(12):724-7. (In Russ.)
22. Grintzalis K, Zisimopoulos D, Grune T, Weber D, Georgiou CD. Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jun;59:27-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.038
23. Mannervik B, Jemth P. Measurement of Glutathione Transferases. *Curr Protoc Toxicol.* 2001;Chapter 6:Unit6.4. doi: 10.1002/0471140856.tx0604s01.
24. Sirota TV. The use of nitro blue tetrazolium in the reaction of autookislenia of adrenaline to determine the activity of superoxide dismutase. *Biomed Khimii.* 2013;59(4):399-410. (In Russ.)
25. Green RM, Graham M, O'Donovan MR, Chipman JK, Hodges NJ. Subcellular compartmentalization of

- glutathione: Correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*. 2006 Nov;21(6):383-90. doi: 10.1093/mutage/gcl043
26. Filchenkov GN, Popoff EH, Naumov AD. The low dose gamma ionising radiation impact upon cooperativity of androgenspecific proteins. *J Environ Radioact*. 2014 Jan;127:182-90. doi: 10.1016/j.jenvrad.2013.02.002
27. Bissvanger Kh, Mosolova T, per. *Practical Enzymology*. Moscow, RF: BINOM Laboratoriia znanii; 2015. 328 p. (In Russ.)

Submitted 04.01.2018

Accepted 31.01.2018

Сведения об авторах:

Осипов Б.Б. – ассистент кафедры хирургических болезней № 1 с курсом сердечно-сосудистой хирургии, Гомельский государственный медицинский университет;

Козлов А.Е. – младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии и биохимии, Институт радиобиологии НАН Беларуси.

Information about authors:

Osipov B.B. – lecturer of the Chair of Surgical Diseases No.1 with the course of Cardiovascular Surgery, Gomel State Medical University;

Kazlou A.Y. – associate research officer of the Endocrinology & Biochemistry Laboratory, the Institute of Radiobiology of the Belarusian National Academy of Sciences.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Ланге, 5, Гомельский государственный медицинский университет, кафедра хирургических болезней № 1 с курсом сердечно-сосудистой хирургии. E-mail: b_osipov_jr@mail.ru – Осипов Борис Борисович.

Correspondence address: Republic of Belarus, 246050, Gomel, 5 Lange str., Gomel State Medical University, Chair of Surgical Diseases No.1 with the course of Cardiovascular Surgery. E-mail: b_osipov_jr@mail.ru – Boris B. Osipov.