

Окислительная модификация белков ткани височной кости при хронических средних отитах

Ирина Дмитриевна Дубинец*, Антон Иванович Сеницкий,
Мусос Юсуфович Коркмазов, Екатерина Ивановна Черных,
Светлана Юрьевна Кухтик

Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск, Россия

Реферат

Цель. Изучение роли окислительной модификации белков костной ткани в формировании деструкции структур височной кости при хронических средних отитах.

Методы. В исследование включены 139 пациентов в возрасте 16–75 лет с верифицированным диагнозом хронического среднего отита, подлежащих оперативному лечению. В зависимости от способа хирургического лечения пациенты разделены на четыре группы (по нозологии и с учётом осложнений и повторных операций): пациенты с туботимпанальным средним отитом и эпитимпано-антральным средним отитом, без осложнений и с локальными или внутричерепными осложнениями, после реконструктивно-санирующей отохирургии. Состояние процессов окислительной модификации белков в костной ткани полостей среднего уха, полученной интраоперационно, оценивали спектрофотометрическим методом по содержанию карбонильных продуктов. Данные обработаны методами дескриптивной статистики и представлены в виде медианы и диапазона между квартилями с оценкой достоверности межгрупповых различий по U-критерию Манна–Уитни.

Результаты. Сопоставление показателей, характеризующих окислительную модификацию белков костной ткани височной кости у пациентов с осложнёнными и рецидивирующими формами хронического среднего отита, демонстрирует большую выраженность свободнорадикальной деструкции белков, преимущественно маркёров ранних этапов повреждения белков и повышение содержания продуктов альдегидной природы, как на базальном уровне, так и в ответ на индукцию при осложнённом течении заболевания.

Вывод. Полученные данные позволяют сделать заключение о высоком уровне окислительного стресса в костной ткани при деструктивных формах хронического среднего отита, сопровождающегося рецидивами и осложнениями, и о перспективности применения антиоксидантов в предоперационном периоде с учётом особенностей окислительного стресса в костной ткани у пациентов с хроническим средним отитом.

Ключевые слова: хронический средний отит, костная ткань полостей среднего уха, окислительная модификация белков.

Для цитирования: Дубинец И.Д., Сеницкий А.И., Коркмазов М.Ю. и др. Окислительная модификация белков ткани височной кости при хронических средних отитах. *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (2): 226–231. DOI: 10.17816/KMJ2019-226.

Oxidative protein modification of the temporal bone tissue in chronic otitis media

I.D. Dubinets, A.I. Sinitsky, M.Yu. Korkmazov, E.I. Chernykh, S.Yu. Kukhtik
South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Abstract

Aim. To study the role of oxidative protein modification of bone tissue proteins in the formation of destruction of temporal bone structures in chronic otitis media.

Methods. The study included 139 patients aged 16–75 years with a verified diagnosis of chronic otitis media, who are candidates for surgical treatment. Depending on the method of surgical treatment, patients are divided into four groups (by nosology and complications and reoperations): patients with tubotympanic otitis media and epitympanic antral otitis, without complications and with local or intracranial complications, after reconstructive sanitizing ear surgery. The state of the processes of oxidative modification of proteins was evaluated in the bone

tissue of the middle ear cavities, obtained intraoperatively, by the content of carbonyl products with the use of spectrophotometry. The data were processed by descriptive statistics and were presented in the form of a median and a range between quartiles with an estimate of the reliability of the intergroup differences by the Mann–Whitney U-criterion.

Results. A comparison of the indicators characterizing the oxidative modification of bone tissue proteins of the temporal bone in patients with complicated and recurrent forms of chronic otitis media demonstrates a greater degree of free radical destruction of proteins, primarily markers of early stages of protein damage and an increase of aldehyde products, both at the basal level and in response to induction in a complicated course of the disease.

Conclusion. The obtained data allow drawing a conclusion about a high level of oxidative stress in bone tissue in destructive forms of chronic otitis media accompanied by relapses and complications, and about the perspectives of antioxidant pre-operative use taking into account the features of oxidative stress in bone tissue in patients with chronic otitis media.

Keywords: chronic otitis media, bone tissue of middle ear cavities, oxidative modification of proteins.

For citation: Dubinets I.D., Sinitsky A.I., Korkmazov M.Yu. et al. Oxidative protein modification of the temporal bone tissue in chronic otitis media. *Kazan medical journal*. 2019; 100 (2): 226–231. DOI: 10.17816/KMJ2019-226.

В настоящее время большой удельный вес в структуре гнойно-воспалительных заболеваний оториноларингологических (ЛОР) органов занимают патологические процессы, протекающие в полостях среднего уха [1, 2]. Большое значение приобретают отогенные осложнения, которые возникают у 3,2% пациентов с хроническим средним отитом (ХСО), тогда как смертность достигает 16,1%. Как правило, к смертельным исходам приводит рецидивирующий гнойно-деструктивный процесс височной кости, который встречается у 24–63% больных ХСО [3, 4].

При достаточно высоком уровне изученности морфологического строения воспалительно-изменённой слизистой оболочки полостей среднего уха отсутствуют исследования о корреляции результатов гистологического исследования операционно-биопсийного материала с возможностью развития рецидива ХСО [5]. Интенсивно изучают патогенетическую роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе ХСО, где отмечают важную роль окислительной модификации белков (ОМБ) в развитии хронического воспаления. Ряд исследований указывает на ОМБ как на одно из ведущих патохимических звеньев развития деструкции костной ткани в полостях среднего уха [6–9].

Между тем, известно, что именно свободнорадикальное окисление биологических молекул как в воспалительно-изменённой ткани, так и в неизменённой слизистой оболочке, — атрибутивный патохимический признак ХСО [10, 11]. За последние десятилетия были проведены многочисленные исследования различных аспектов хронического воспаления, апробировались новые методы хирургического лечения ХСО, но сохраняются рецидивы отореи, оттор-

жение реконструктивных элементов и прогрессирование тугоухости [12, 13].

Обобщая, можно сделать вывод, что хронический гнойный воспалительный процесс в среднем ухе требует изучения структур костной ткани височной кости для правильного выбора способа лечения, снижения травматического влияния saniрующего этапа оперативного вмешательства, в том числе при проведении реконструкции с применением имплантационных материалов. Идентификация характера повреждения белков в костной ткани пациента как триггера формирования хронического деструктивного воспалительного процесса в закрытых полостях среднего уха позволит подобрать максимально эффективную хирургическую тактику по срокам лечения, виду оперативного вмешательства и оптимально подобранной консервативной терапии.

Цель исследования — изучение роли ОМБ костной ткани в формировании деструкции структур височной кости при ХСО.

Обследованы и пролечены 139 пациентов с ХСО в возрасте 16–75 лет (стандартное отклонение $40,4 \pm 14,58$ года; медиана 43,5 года; 95% доверительный интервал для среднего 36,82; 43,99), подлежащих оперативному лечению, которые подписали добровольное информированное согласие на участие в клиническом исследовании (клиническое исследование одобрено этическим комитетом Челябинской государственной медицинской академии, протокол №2 от 13.10.2006).

В соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра (1992) были диагностированы следующие клинические формы ХСО: хронический тубо-тимпанальный гнойный средний отит (H66.1)

и хронический эптитимпано-антральный гнойный средний отит (Н66.2).

В зависимости от способа хирургического лечения пациенты были распределены на четыре группы соответственно:

1) пациенты с туботимпанальным средним отитом, без осложнений, после однократной реконструктивно-санирующей отохирургии (n=53);

2) пациенты с эптитимпано-антральным средним отитом, без осложнений, после однократной реконструктивно-санирующей отохирургии (n=28);

3) пациенты с туботимпанальным средним отитом, локальными или внутричерепными осложнениями или повторными операциями в анамнезе (n=32);

4) пациенты с эптитимпано-антральным средним отитом, локальными или внутричерепными осложнениями или повторными операциями в анамнезе (n=26).

Всем пациентам была выполнена реконструктивно-санирующая отохирургическая операция [согласно приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 28 марта 2007 г. №212 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным туботимпанальным гнойным средним отитом и хроническим эптитимпано-антральным гнойным средним отитом (при оказании специализированной помощи)»].

Показанием для оперативного вмешательства стали жалобы, предъявляемые пациентами, результаты анамнеза, инструментального исследования ЛОР-органов с применением отоэндомикроскопии, бактериологического исследования, данные спиральной компьютерной томографии височных костей и аудиологического исследования слуховой функции. По показаниям санирующий этап операции представлен вариантами аттикоантромастотомии, включающей санацию среднего уха с удалением гнойно-расплавленной, узурированной костной ткани из тимпанальной и мастоидальной полостей с элементами облитерации неополостей и реконструкцией структур среднего уха. Образцы костной ткани из полостей среднего уха были получены во время операции у всех пациентов с ХСО [5].

Фрагменты костной ткани непосредственно после их получения освобождали от мукопероста, тщательно промывали в 0,9% растворе натрия хлорида, предварительно охлаждённом до 2–4 °С, высушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали. Далее образцы костной ткани измельчали в ступке, добавляли 1,0 мл 0,9%

раствора натрия хлорида, тщательно перемешивали (вортекс V-1, Biosan, Латвия) для удаления крови, центрифугировали при 800 g (центрифуга Eppendorf 5415R с ротором F-45-24-11, Германия) в течение 10 мин при 4 °С. Супернатант удаляли, к осадку, содержащему отмытую костную ткань, добавляли 0,5 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера с pH=7,4 и гомогенизировали в фарфоровой ступке при температуре 2–4 °С. Полученные гомогенаты вновь центрифугировали при 4500 g. Супернатант собирали, хранили при –86 °С до исследования (морозильная камера Thermo Forma 905, Thermo Fisher Scientific, США).

Состояние процессов ОМБ оценивали по содержанию карбонильных продуктов, по их реакции с 2,4-динитрофенилгидразином с последующей спектрофотометрической регистрацией продуктов взаимодействия — динитрофенилгидразонов, анализом площади под кривой спектра поглощения динитрофенилгидразонов — дериватов карбонильных производных белков [14]. Для этих целей использовали спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия), регистрируя оптическую плотность в ультрафиолетовой части спектра при длинах волн 230, 254, 270, 280 и 356 нм для выявления альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ), 363 и 370 нм для выявления кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ), в области видимого света — 428 и 430 нм для АДНФГ и 434, 524, 530, 535 нм для КДНФГ.

Использованный методический подход позволяет не только оценить общий уровень ОМБ, определить количество АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера, но и сопоставить первичные и вторичные маркёры ОМБ, а в результате выявить путь нарушения нативной конформации белков. Уровень ОМБ регистрировали на базальном уровне и при индукции (металл-катализируемое окисление белков) [14].

Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statistica 8.0 for Windows. Данные обработаны методами дескриптивной статистики и представлены в виде медианы (Me) и диапазона между нижним (LQ, 25-й процентиль) и верхним (UQ, 75-й процентиль) квартилями. О достоверности межгрупповых различий судили по U-критерию Манна–Уитни. Проверка статистических гипотез выполнялась при критическом уровне значимости $p=0,05$.

У пациентов второй группы по сравнению с пациентами первой группы отмечено усиление базального уровня ОМБ при статистически

Таблица 1. Окислительная модификация белков костной ткани височной кости у больных с хроническим средним отитом

Показатели	Первая группа (n=53)	Вторая группа (n=28)	Третья группа (n=32)	Четвёртая группа (n=26)
Общий белок, мг/г	4,056 [2,419–4,291]	2,572 [2,022–3,617]	2,347 [1,665–3,234]	1,11*** [0,86–1,338]
S АДНФГ uv, ед./г белка	8,641 [3,997–12,32]	28,072* [23,112–29,901]	18,586** [13,034–23,505]	29,013* [19,352–35,377]
S АДНФГ vs, ед./г белка	1,052 [0,456–1,365]	1,755 [1,298–2,146]	1,811 [1,335–2,084]	6,565*** [2,33–8,432]
S КДНФГ vs, ед./г белка	0,18 [0,07–0,28]	0,255 [0,093–0,311]	0,317 [0,211–0,398]	0,899*** [0,44–0,709]
S общ., ед./г белка	11,056 [5,083–18,597]	31,885* [29,422–33,842]	22,738** [15,595–29,883]	42,522* [29,188–49,946]
S АДНФГ, ед./г белка	9,693 [4,453–15,029]	29,826* [25,988–31,726]	20,397** [14,146–26,199]	35,578* [27,73–41,029]
АДНФГ, %	87,742 [87,602–89,001]	93,945* [91,01–97,812]	89,916 [87,52–92,592]	86,979 [85,655–92,505]
КДНФГ, %	12,258 [10,999–12,398]	6,055* [2,188–8,99]	10,084 [7,408–12,48]	13,021 [7,495–14,345]
S АДНФГ uv МКО, ед./г белка	14,229 [4,907–19,142]	34,11* [28,928–40,02]	27,473 [18,461–35,172]	52,032* [34,734–65,045]
S АДНФГ vs МКО, ед./г белка	5,362 [2,091–6,509]	8,867 [5,366–8,972]	10,864 [8,323–12,444]	22,029*** [10,225–32,916]
S КДНФГ vs МКО, ед./г белка	0,509 [0,203–0,445]	0,696 [0,271–0,794]	0,878 [0,678–1,039]	3,976*** [0,929–2,59]
S общ. МКО, ед./г белка	23,132 [8,267–29,609]	48,154 [40,06–47,45]	45,046 [29,869–55,126]	87,267*** [52,137–125,548]
S АДНФГ МКО, ед./г белка	19,591 [6,94–25,65]	42,976 [36,96–46,595]	38,337** [26,14–47,468]	74,061* [46,832–97,961]
РАП, %	50,454 [37,193–59,295]	32,174 [29,709–35,458]	45,308 [36,676–53,491]	50,404*** [40,965–60,217]

Примечание: S — суммарное содержание; АДНФГ — альдегид-динитрофенилгидразоны; uv — ультрафиолетовая область спектра; vs — видимая область спектра; КДНФГ — кетон-динитрофенилгидразоны; МКО — металл-катализируемое окисление; РАП — резервно-адаптационный потенциал; *статистически значимые различия между показателями групп 1 и 3, 2 и 4; **статистически значимые различия между показателями групп 1 и 2, 3 и 4.

незначимой тенденции к меньшему содержанию белка в костной ткани височной кости. Преобладание среди продуктов ОМБ веществ альдегидной природы АДНФГ нейтрального характера свидетельствует о большей выраженности процессов фрагментации белков и соответствует относительно ранним этапам развития окислительного стресса (табл. 1).

Сопоставление показателей, характеризующих ОМБ в костной ткани височной кости у пациентов с осложнённым и неосложнённым туботимпанальным средним отитом, демонстрирует большую выраженность свободнорадикальной деструкции белков при осложнённом течении заболевания.

Полученные данные свидетельствуют о накоплении в исследованном материале преимущественно маркёров ранних этапов поврежде-

ния белков (у пациентов группы с осложнённым течением туботимпанального среднего отита в сравнении с показателями группы с неосложнённым течением выявлено повышение содержания продуктов альдегидной природы как на базальном уровне, так и в ответ на индукцию).

Осложнённые формы хронического эпителиально-антрального среднего отита сопровождаются выраженными и глубокими повреждениями белков ткани височной кости, о чём свидетельствуют статистически значимо более высокие уровни всех исследованных категорий продуктов как на базальном уровне, так и при исследовании металл-катализируемой ОМБ, в том числе и КДНФГ, накопление которых свидетельствует об агрегации повреждённых белков. Данная группа пациентов характеризуется также наименьшим содержанием белка.

В третьей и четвёртой группах пациентов с осложнённым течением заболевания выявлено повышение общего содержания белка в костной ткани полостей среднего уха, и существенно повышалось содержание КДНФГ и металл-катализируемой ОМБ, что указывает на большую выраженность окислительной деструкции костной ткани, сопровождающейся фрагментацией и агрегацией белков (см. табл. 1).

Полученные данные позволяют сделать заключение о высоком уровне окислительного стресса в костной ткани как о факторе, характеризующем тяжесть воспалительного процесса и деструкции височной кости при ХСО. Учитывая, что важнейший механизм защиты от накопления и токсического действия продуктов ОМБ — их протеолитическая деградация [15], усиление ОМБ неизбежно влечёт за собой активацию протеолиза в костной ткани, что объясняет снижение общего содержания белка по мере прогрессирования хронического воспалительного процесса в полостях среднего уха.

Таким образом, развитие деструктивных форм ХСО сопровождается чрезмерной активацией ОМБ, что с высокой степенью вероятности, может оказать негативное влияние как на стабильность минеральной фазы и органического матрикса [16], так и на функции и дифференцировку клеточных элементов костной ткани [17–20], приводя к нарушениям процессов ремоделирования костной ткани и, как следствие, к её деструкции. Считаем также логичным предположение о поддержании воспалительных процессов в костной ткани за счёт кумуляции продуктов свободнорадикального окисления.

ВЫВОД

Полученные результаты позволяют сделать выводы о перспективности разработки новых подходов к лечению и профилактики осложнённых хронического среднего отита, предусматривающих применение антиоксидантов в предоперационном периоде с учётом особенностей окислительного стресса в костной ткани.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дайхес Н.А., Янов Ю.К. *Хронический гнойный средний отит*. Клинические рекомендации. М. 2016; 32 с. <http://glav-otolar.ru/assets/images/docs/clinical-recomendations/KR320%20HGSO.pdf> (дата обращения: 03.10.2018). [Daykhes N.A., Yanov Yu.K. *Khronicheskiiy gnoynnyy sredniy otit. Klinicheskie rekomendatsii*. (Chronic suppurative otitis media. Clinical practice guidelines.) M. 2016; 32 p. <http://glav-otolar.ru/assets/images/docs/clinical-recomendations/KR320%20HGSO.pdf> (access date: 19.01.2017). (In Russ.)]
2. Yeh C.F., Wu C.S., Huang C.Y. et al. Chronic otitis media surgery and re-operation risk factor analysis: A nationwide retrospective cohort study of 18 895 patients. *Acta Oto-Laryngologica*. 2016; 136 (3): 259–265. DOI: 10.3109/00016489.2015.1115550.
3. Крюков А.И., Гаров Е.В. О классификации операций при хроническом гнойном среднем отите. *Рос. оториноларингол.* 2016; (3): 181–182. [Kryukov A.I., Garov E.V. The classification of operations in chronic suppurative otitis media. *Rossiiskaya otorinolaringologiya*. 2016; (3): 181–182. (In Russ.)]
4. Пятакина О.К., Крюков А.И., Гаров Е.В. О классификации хронического гнойного среднего отита. *Рос. оториноларингол.* 2016; (3): 207–208. [Ptyakina O.K., Kryukov A.I., Garov E.V. The classification of chronic suppurative otitis media. *Rossiiskaya otorinolaringologiya*. 2016; (3): 207–208. (In Russ.)]
5. Дубинец И.Д., Коркмазов М.Ю., Тюхай М.В. Роль структурных изменений костной ткани при выполнении различных видов реконструктивно-санирующих вмешательств при хроническом воспалении ЛОР-органов. *Вестн. оториноларингол.* 2016; (S5): 15–16. [Dubinets I.D., Korkmazov M.Yu., Tyukhay M.V. The role of structural changes in bone tissue in the performance of various types of reconstructive and sanitizing interventions in chronic inflammation of ENT organs. *Vestnik otorinolaringologii*. 2016; (S5): 15–16. (In Russ.)]
6. Sinha A.K., Kumar A., Raushan E.A., Kumar G. Bone resorption in chronic otitis media. *Intern. J. Sci. Study*. 2014; 2: 82–85.
7. Ralston S.H. Bone structure and metabolism. *Medicine*. 2017; 45 (9): 560–564. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.06.008.
8. Камиллов Ф.Х., Фаршатова Е.Р., Еникеев Д.А. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и её регуляция. *Фундаментал. иссл.* 2014; 4 (7): 36–842. [Kamilov F.Kh., Farshatova E.R., Enikeev D.A. Cellular-molecular mechanisms of bone tissue remodeling and its regulation. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 4 (7): 36–842. (In Russ.)]
9. Wang J., Chen B., Xu M. et al. Etiological factors associated with chronic suppurative otitis media in a population of Han adults in China. *Acta Oto-Laryngologica*. 2016; 136 (10): 1024–1028. DOI: 10.1080/00016489.2016.1183818.
10. Schimdt M., Grünsfelder P., Hoppe F. Induction of matrix metalloproteinases in keratinocytes by cholesterol debris and granulation issue extracts. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2000; 257: 425–429. DOI: 10.1007/s004050000249.
11. Young M.F., Kerr J.M., Ibaraki K. et al. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1992; 281: 275–294. DOI: 10.1097/00003086-199208000-00042.
12. Дубинец И.Д., Тюхай М.В., Сычугов Г.В., Учаев Д.А. Структурные изменения костной ткани при хроническом гнойном среднем отите, изученные методами световой микроскопии. *Вестн. оториноларингол.* 2017; (S5): 65–66. [Dubinets I.D., Tyukhay M.V., Sychugov G.V., Uchaev D.A. Structural changes in bone tissue in chronic purulent otitis media studied by light microscopy. *Vestnik otorinolaringologii*. 2017; (S5): 65–66. (In Russ.)]
13. Дубинец И.Д., Коркмазов М.Ю., Коркмазов А.М. и др. Сравнительный анализ характера и динамики

хирургического лечения пациентов с хроническим средним отитом по данным ЛОР-отделения города Челябинска. *Вестн. оториноларингол.* 2017; 82 (S5): 64–65. [Dubinets I.D., Korkmazov M.Yu., Korkmazov A.M. et al. Comparative analysis of the nature and dynamics of the surgical treatment of patients with chronic otitis media according to the ENT department of Chelyabinsk. *Vestnik otorinolaringologii.* 2017; 82 (S5): 64–65. (In Russ.)]

14. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. *Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях.* Методические рекомендации. Рязань: РИО РязГМУ. 2014; 60 с. [Fomina M.A., Abalenikhina Yu.V. *Sposob kompleksnoy otsenki sodержaniya produktov oksislitel'noy modifikatsii belkov v tkanyakh i biologicheskikh zhidkostyakh.* Metodicheskie rekomendatsii. (A method of complex assessment of the content of oxidative modification products of proteins in tissues and biological fluids. Methodical recommendation.) Ryazan': RIO RyazGMU. 2014; 60 p. (In Russ.)]

15. Goldberg A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003; 426: 895–899. DOI: 10.1038/nature02263.

16. Нургалеев Н.В., Фаршатова Е.Р., Аглетдинов Э.Ф. и др. Метаболизм костной ткани нижней челюсти при

длительном поступлении элементов медно-цинковых колчеданных руд в эксперименте. *Мед. вестн. Башкортостана.* 2012; 7 (5): 78–81. [Nurgaleev N.V., Farshatova E.R., Agletdinov E.F. et al. Metabolism of mandibular bone tissue in case of long-term inflow of copper-zinc pyrite ore elements in the experiment. *Meditinskiy vestnik Bashkortostana.* 2012; 7 (5): 78–81. (In Russ.)]

17. Atashi F., Modarressi A., Pepper M.S. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Development.* 2015; 24: 1150–1163. DOI: 10.1089/scd.2014.0484.

18. Mody N., Parhami F., Sarafian T.A. et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radical Biol. Med.* 2001; 31 (4): 509–519. DOI: 10.1016/s0891-5849(01)00610-4.

19. Basu S., Michaelsson K., Olofsson H. et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem. Biophys. Res. Communications.* 2001; 288: 275–279. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5747.

20. Shouhed D., Kha H.T., Richardson J.A. et al. Osteogenic oxysterols inhibit the adverse effects of oxidative stress on osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 2005; 95: 1276–1283. DOI: 10.1002/jcb.20497.