

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ 1,2,4-ТРИОКСОЛАНОВ С БЕТУЛИНОМ В РЫБЬЕМ ЖИРЕ. ВЛИЯНИЕ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВ У КРЫС

Малыгина Д.С.¹,
Ястребов П.В.²,
Фаянс А.Э.²,
Спицкая И.В.¹,
Есипович А.Л.^{3,4},
Соловьева А.Г.^{1,3},
Перетягин П.В.¹,
Мельникова Н.Б.^{3,4}

¹ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Россия)

² ГП НО «Нижегородская областная фармация» (603141, г. Нижний Новгород, ул. Геологов, 6, пом. П8, Россия)

³ ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (603022, г. Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23, Россия)

⁴ ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева» (603155, г. Нижний Новгород, ул. Минина, 24, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Малыгина Дарина Сергеевна,
e-mail: mds73@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Продукты озонирования ненасыщенных жирных кислот в жирах и маслах – 1,2,4-триоксоланы, – способствующие нормализации окислительного и энергетического метаболизма при различных заболеваниях, могут быть перспективной субстанцией для создания новых комбинированных противоожоговых препаратов.

Цель исследования. Исследование влияния 1,2,4-триоксоланов в фармацевтической композиции с бетулином, проявляющим ранозаживляющие свойства, на показатели оксидативного стресса и на энергетический метаболизм при лечении ожогов в эксперименте на крысах.

Методы. Эксперименты были проведены на 50 крысах-самцах линии Wistar с ожогом кожи 2-й степени. Оценивали активность ферментов глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, супероксиддисмутазы и каталазы, а также уровень показателей перекисного окисления липидов.

Результаты. Изучены свойства 1,2,4-триоксоланов и разработана фармацевтическая композиция 1,2,4-триоксоланов с бетулином из бересты берёзы в рыбьем жире. Исследовано влияние данной композиции на окислительный и энергетический метаболизм у крыс при лечении ожогов. Выявлена активация NADP/H- и NAD/H-зависимых ферментов (глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы), а также супероксиддисмутазы и каталазы, нормализация показателей перекисного окисления липидов под действием изучаемой композиции при лечении ожога. Отмечено влияние композиции на энергетический метаболизм эритроцитов, что было оценено по изменению соотношения активности лактатдегидрогеназы в обратной и прямой реакции. Морфогистологическими исследованиями было показано, что применение композиции в норме и при ожоге не оказывало влияния на структуру стенки желудка, а также улучшало состояние ожоговой раны на 10-й день по сравнению с состоянием раны у животных без лечения.

Заключение. Предлагаемая композиция 1,2,4-триоксоланов и бетулина в рыбьем жире, позволяющая нормализовать окислительный и энергетический метаболизм и улучшить состояние ожоговой раны без токсического действия на стенки желудка, может быть использована как элемент дополнительной терапии при лечении ожогов.

Ключевые слова: активация ферментов антиоксидантной защиты, экспериментальное лечение ожогов, рыбий жир, 1,2,4-триоксолан, бетулин

Для цитирования: Малыгина Д.С., Ястребов П.В., Фаянс А.Э., Спицкая И.В., Есипович А.Л., Соловьева А.Г., Перетягин П.В., Мельникова Н.Б. Фармацевтическая композиция 1,2,4-триоксоланов с бетулином в рыбьем жире. Влияние на окислительный и энергетический метаболизм при лечении ожогов у крыс. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(2): 253-263. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.25

Статья поступила: 15.08.2023

Статья принята: 09.04.2024

Статья опубликована: 31.05.2024

PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF 1,2,4-TRIOXOLANES WITH BETULIN IN FISH OIL. EFFECT ON OXIDATIVE AND ENERGY METABOLISM IN THE TREATMENT OF BURNS IN RATS

Malygina D.S.¹,
Yastrebov P.V.²,
Fayans A.E.²,
Spitskaya I.V.¹,
Esipovich A.L.^{3,4},
Soloveva A.G.^{1,3},
Peretyagin P.V.¹,
Melnikova N.B.^{3,4}

¹ Privolzhsky Research Medical University
(Minin and Pozharsky square 10/1,
Nizhny Novgorod 603005,
Russian Federation)

² Pharmacy of the Nizhny Novgorod Region
(Geologov str. 6, office P8, Nizhny Novgorod
603141, Russian Federation)

³ National Research Lobachevsky
State University of Nizhny Novgorod
(Gagarina Ave. 23, Nizhny Novgorod
603022, Russian Federation)

⁴ Nizhny Novgorod State Technical
University (Minina str. 24, Nizhny Novgorod
603155, Russian Federation)

Corresponding author:
Darina S. Malygina,
e-mail: mds73@yandex.ru

ABSTRACT

Background. Ozonation products of unsaturated fatty acids in fats and oils – 1,2,4-trioxolanes – which contribute to the normalization of oxidative and energy metabolism in various diseases, may be a promising substance for the creation of new combined anti-burn drugs.

The aim. To study the effect of 1,2,4-trioxolanes in a pharmaceutical composition with betulin, which exhibits wound-healing properties, on indicators of oxidative stress and on energy metabolism in the treatment of burns in an experiment on rats.

Methods. The experiments were carried out on 50 male Wistar rats with second-degree skin burns. We assessed the activity of glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, superoxide dismutase and catalase, as well as the level of lipid peroxidation indicators.

Results. The properties of 1,2,4-trioxolanes were studied and a pharmaceutical composition of 1,2,4-trioxolanes with betulin from birch bark in fish oil was developed. The effect of this composition on oxidative and energy metabolism in rats during the treatment of burns was studied. The activation of NADP/H and NAD/H dependent enzymes (glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase), as well as superoxide dismutase and catalase, and the normalization of lipid peroxidation parameters under the influence of the studied composition in the treatment of burns were revealed. The effect of the composition on the energy metabolism of erythrocytes was noted, which was assessed by changes in the ratio of lactate dehydrogenase activity in the reverse and direct reactions. Morphohistological studies showed that using the composition under normal conditions and in case of a burn had no effect on the structure of the stomach wall, and also improved the condition of the burn wound on the day 10 compared to the wound condition in animals without treatment.

Conclusion. The proposed composition of 1,2,4-trioxolanes and betulin in fish oil, which allows normalizing oxidative and energy metabolism and improving the condition of a burn wound without toxic effects on the stomach wall, can be used as an element of additional therapy in the treatment of burns.

Key words: antioxidant enzymes activation, experimental treatment of burns, fish oil, 1,2,4-trioxolane, betulin

Received: 15.08.2023

Accepted: 09.04.2024

Published: 31.05.2024

For citation: Malygina D.S., Yastrebov P.V., Fayans A.E., Spitskaya I.V., Esipovich A.L., Soloveva A.G., Peretyagin P.V., Melnikova N.B. Pharmaceutical composition of 1,2,4-trioxolanes with betulin in fish oil. Effect on oxidative and energy metabolism in the treatment of burns in rats. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(2): 253-263. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.25

ВВЕДЕНИЕ

Термические ожоги сопровождаются активацией процессов свободнорадикального окисления, в частности перекисного окисления липидов, и развитием тканевой гипоксии [1, 2]. В связи с этим, кроме местного лечения ожоговых ран, необходима коррекция фармакотерапии, учитывающая влияние оксидативного стресса. В первую очередь медикаментозное воздействие направлено на регуляцию уровня оксидоредуктаз, снижение вторичных метаболитов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и регуляцию баланса и дисбаланса NAD^+/NADH - и $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -коферментов [3]. Обычно коррекция фармакотерапии включает антиоксидантную поддержку. В последнее время появились работы, задачей которых является нормализация уровня экзо- и эндогенных оксидантов и антиоксидантов [3].

Одним из интересных представителей оксидантов, проявляющих благотворное действие при лечении различных заболеваний как при наружном, так и при пероральном приёме, являются 1,2,4-триоксоланы – продукты озонирования растительных масел и жиров [4–8]. К сожалению, данных о влиянии 1,2,4-триоксоланов при пероральном применении чрезвычайно мало. В работах Z.B. Zamora Rodríguez и соавт. [9, 10] показано, что одним из механизмов действия 1,2,4-триоксоланов из подсолнечного масла является их способность активировать ферменты антиоксидантной защиты при пероральном лечении язвы желудка у крыс. В российском патенте [11] описывается комплекс озонированных полиненасыщенных жирных кислот, полученных из рыбьего жира обработкой кислородно-озоновой смесью. Авторы доказывают возможность озонированного рыбьего жира повышать адаптационные возможности организма к экстремальным стрессовым условиям за счёт стимуляции энергетического метаболизма в организме при патологиях органов дыхания сердечно-сосудистой системы и органов желудочно-кишечного тракта. К сожалению, авторы работы не выделяли 1,2,4-триоксоланы как самостоятельную субстанцию и не доказывали их структуру, вследствие чего сложно судить о главном действующем компоненте озонированной смеси.

В терапию лечения ожогов в 2016 г. была впервые введена субстанция с антиоксидантными свойствами – сухой экстракт тритерпенов (бетулин) – после одобрения в Центральной Европе бетулинсодержащего олеогеля (в подсолнечном масле) Эписальван, используемого для ускорения заживления ран [12]. Эписальван является первым ранозаживляющим фитопрепаратом для лечения ожогов, запатентованным до 2030 г. Доказательства ускоренного заживления ожоговых ран были предоставлены в результатах клинических исследований фазы II и III, подтверждающих ускоренное заживление ран, в том числе при редком заболевании буллёзном эпидермолизе. Механизм ранозаживляющего действия бетулина заключается во влиянии на все три фазы заживления ран (воспаление, миграцию и дифференцировку) [12]. При этом в России, несмотря на многочисленные экспериментальные исследования, в настоящий момент

имеются только БАДы и косметические кремы, а противоожоговые препараты на основе бетулина отсутствуют.

Разработка нового противоожогового комбинированного препарата ранозаживляющего бетулина в липофильной среде и 1,2,4-триоксоланов, влияющих на окислительный и энергетический метаболизм, как для перорального, так и для наружного применения является важной задачей в фармации и медицине.

В настоящей работе мы разработали и исследовали ранозаживляющую комбинированную фармацевтическую композицию 1,2,4-триоксоланов с бетулином в среде рыбьего жира.

Выбор рыбьего жира в качестве липофильной среды обусловлен высоким содержанием ω -3-ненасыщенных жирных кислот, таких как эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) и докозагексаеновая кислота (ДГК), что позволяет не только увеличить долю 1,2,4-триоксолановых фрагментов при озонировании, но и улучшить фармакологическую активность за счёт ЭПК и ДГК [13, 14].

В этой работе мы изучали:

1) состав и свойства фармацевтической композиции, характеристику 1,2,4-триоксоланов из рыбьего жира, используя в качестве эталона 1,2,4-триоксоланы кунжутного масла с известными характеристиками [15, 16];

2) окислительный и энергетический метаболизм по изменению активности ферментов антиоксидантной защиты на примере супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и альдегиддегидрогеназы (АлДГ), а также по интенсивности ПОЛ, оценивая уровень малоновых диальдегидов (МДА), диеновых и триеновых конъюгатов (ДК и ТК) и оснований Шиффа;

3) состояние слизистой оболочки желудка при пероральном введении композиции крысам с ожогом и без ожога, а также состояние кожи в области раны;

4) микроциркуляторно-тканевую систему желудка и кожи в области раны с помощью лазерной доплеровской флуометрии и лазерной флуоресцентной спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Жирнокислотный состав устанавливали с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) с использованием прибора Shimadzu GC-2010 (Япония), оснащённого масс-спектрометром GCMS-QP2020 (Shimadzu, Япония), фото-ионизационным детектором и капиллярной колонкой VB-1701 (длина 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина плёнки 0,5 мкм; VICI, США), газ-носитель – гелий. Температура инжектора и детектора – 250 °С, температура печи программировалась от 100 °С (выдержка 5 мин) до 250 °С (выдержка 50 мин) со скоростью 10 °С/мин. Долю 1,2,4-триоксоланов рассчитывали с использованием метода гелпроникающей хроматографии. Использовали жидкостный хроматограф Хромос LC-310 (Хромос, Россия) с рефрактометрическим

детектором, систему из двух последовательно расположенных колонок Phenomenex Phenogel 00H-0441-KO (300 × 7,8 мм; Phenomenex, США), заполненных стирол-дивинилбензолом (размер частиц 5 мкм, диаметр пор 50 Å). Для защиты колонок от примесей использовали предколонку Phenomenex Guards 03B-2088-KO (размер частиц 5 мкм; Phenomenex, США).

Структуру 1,2,4-триоксоланов устанавливали по данным инфракрасных (ИК) Фурье-спектров (ИК-Фурье-спектрометр IR Prestige-21 (Shimadzu, Япония), таблетки KBr) и ^{13}C - и ^1H -ЯМР-спектров (спектрометр Jeol JNM ECX-400 (Jeol Ltd., Япония), частота 100 и 400 МГц).

Использовался рыбий жир MEG-3 1812 TG Oil (серия № PC00004320; Перу). Характеристики рыбьего жира: цвет по Гарднеру – 5; свободная жирная кислота (олеиновая) – 0,10 %; кислотное число – 0,2 мг КОН/г; р-анизидиновое число – 6; пероксидное число (на момент выпуска) – 0 мег/кг; влажность – 0,0 %; тест на холод: остаётся чистым при 0 °C 3 часа; общий коэффициент окисления – 6; неомыляемое вещество – 1,1 %; абсорбция (233 нм) – 0,3; олигомеры – 0,9 %. Массовое содержание эйкоза-5,8,11,14,17-пентаеновой кислоты и докоза-4,7,10,13,16,19-гексаеновой кислоты в исходном рыбьем жире составляло 16,03 % и 9,09 % соответственно (ГХ-МС).

Бетулин ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$) чистотой 99,5 % (высокоэффективная жидкостная хроматография) был получен в Sigma-Aldrich (CAS 473-98-3). Бетулин берёзовый (экстракт берёсты), соответствующий требованиям ТУ 9154-002-78885301-14, получен из фирмы «Древит» (г. Пермь, Россия): содержание бетулина – не менее 90 %, массовая доля летучих веществ – не более 0,5 %; нерастворимые примеси отсутствуют.

Вода деионизованная (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды Elix 3 (Millipore, Франция) с картриджем Progard (Millipore, Франция), с удельным сопротивлением менее 0,2 мкСм, pH = 5,5 при температуре 20 ± 10 °C, использовалась без предварительной очистки и какой-либо обработки.

1,2,4-триоксоланы получали озонированием кунжутного масла и рыбьего жира, используя концентратор кислорода марки HG5 (Shenyang Canta Medical Tech. Co., Ltd., Китай; режим 5 л/мин, 220 В, 50 Гц), генератор озона «УОТА-60-01» (ООО «Медозон», г. Москва, Россия). Диапазон значений концентрации озона в озонкислородной смеси на выходе установки – от 0 до 80 мг/л; расход озонкислородной смеси составлял 0,0–1,0 л/мин. В работе использовалась колонна для озонирования высотой 1 м, диаметром 0,1 м, снабжённая у основания фильтром Шотта. Объём рыбьего жира или кунжутного масла не превышал 300 мл. 1,2,4-триоксоланы рыбьего жира и кунжутного масла характеризовались фармакопейными показателями: кинематической вязкостью 5044 мм²/с и 3454 мм²/с для рыбьего жира и кунжутного масла соответственно; кислотным числом 7,5 мг КОН/г и 15,9 мг КОН/г для рыбьего жира и кунжутного масла соответственно; йодным числом 22,0 мг йода/100 г и 20,5 мг йода/100 г для рыбьего жира и кунжутного масла соответственно; озонидным

числом 7101 мэкв O_2 /кг и 6690 мэкв O_2 /кг для рыбьего жира и кунжутного масла соответственно. В ИК-спектрах озонированных образцов, в отличие от исходных кунжутного масла и рыбьего жира, появлялась полоса 1105 см⁻¹, характерная для валентных колебаний триоксоанового фрагмента. Данные масс-спектров озонированных образцов рыбьего жира показали практически полное отсутствие эйкоза-5,8,11,14,17-пентаеновой и докоза-4,7,10,13,16,19-гексаеновой кислот. ^1H -ЯМР-спектр озонированных образцов содержит сигналы, характерные для 1,2,4-триоксоланов (δ , м.д.) [15, 16]: 0,87 м, 1,24 ш, 1,60 ш, 2,30 два триплета (CH_3 , CH_2 и $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 5,12, 5,13, 5,1 м (CH в триоксоановом цикле); 4,14 дд, 4,28 дд, 5,16, 5,18, 5,19 м (CH в триглицеридном фрагменте). ^{13}C -ЯМР-спектр (δ , м.д.): 7,86, 8,11, 14,16, 14,25, 22,77, 22,82, 29,15, 29,20, 29,24, 29,40, 29,49, 29,58, 29,61, 29,78, 29,83, 32,05, 24,99, 30,86, 34,18, 25,03, 62,23, 103,39, 104,29, 104,34, 104,39, 104,47, 69,00.

Состав предлагаемой композиции: озонированный рыбий жир с содержанием 1,2,4-триоксоланов – 10,0 %; бетулин – 0,2 %; аскорбилпальмитат – 0,01 %; до 100 % рыбьего жира.

Оценку биологической активности проводили в отделе физико-химических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России. Исследования соответствовали Хельсинкской декларации (2000), «Правилам клинической практики в Российской Федерации», утверждённым Приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266. Эксперименты на животных проводили с соблюдением принципов гуманности, согласно директивам Европейского сообщества (№ 86/609/ЕЕС, Страсбург, 1986). Протокол исследования на животных одобрен Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России (протокол № 1 от 18.01.2021).

Эксперименты проведены на 50 крысах-самцах линии Wistar. Животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ» [17], и были разделены путём стратифицированной рандомизации по массе тела и возрасту. Группы включали крыс массой 200–250 г в возрасте 5–7 месяцев. После 14-дневной адаптации к условиям местного вивария и карантина сформировали 10 групп.

Ожог кожи 2-й степени наносили на предварительно подготовленный участок кожи под наркозом (Zoletil 100 (60 мг/кг) + XylaVET (6 мг/кг)). Рабочая поверхность прибора нагревалась до 250 °C и затем удерживалась на поверхности кожи крысы в течение 10 с. Площадь ожога при этом составляла примерно 10 %. Выводили животных на 10-е сутки под наркозом (Zoletil 100 (60 мг/кг) + XylaVET (6 мг/кг)) [18, 19].

В качестве объектов гистологического исследования были выбраны желудок и кожа в области раны. Доступ к желудку осуществлён путём лапаротомии. После фиксации в 10%-м забуференном формалине производилась вырезка репрезентативных сегментов тка-

ней с дальнейшим промыванием в проточной воде, обезжириванием с использованием этанола возрастающей концентрации (70 %, 80 %, 95 %) и изопропанола, пропитыванием и заключением в парафин и серийной резкой (5 мкм) замороженных парафиновых блоков на микротоме. При регрессивном окрашивании время инкубации в гематоксилине (Гарриса) составляло 5 или 10 мин; в дифференцирующем растворе (1%-й HCl в 70%-м этаноле) – 2 или 10 с; в 1%-м водно-спиртовом эозине – 1 или 2 мин. При прогрессивном окрашивании время инкубации в гематоксилине (Карацци) и эозине было аналогичным, однако не требовалось применения дифференцирующего раствора.

Биологический анализ *in vitro* проводили с использованием крови, стабилизированной цитратом натрия (1:9). Эритроциты дважды промывали 0,9%-м раствором NaCl путём центрифугирования в течение 10 мин при 1600 g.

Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню МДА в эритроцитах по методу Uchiyama и Mihara (1978). Содержание ДК, ТК и оснований Шиффа в плазме крови определяли по методу Хишиктуева (1996). Активность СОД (КФ 1.15.1.1) измеряли в эритроцитах по ингибированию аутоокисления адреналина по методу Сироты (2012). Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли спектрофотометрически по разложению пероксида водорода каталазой по методу Packer (1984). Активность ГР (КФ 1.8.1.7) изучали спектрофотометрически по реакции восстановления окисленного глутатиона по Сигбатуллиной (2011). Активность ГбФДГ (КФ 1.1.1.49) определяли в гемолизате эритроцитов спектрофотометрически по реакции окисления глюкозо-6-фосфата до фосfogлюколактона с образованием восстановленного NADPH по Кочетову (1980). Энергетический обмен в эритроцитах анализировали по каталитической активности ЛДГ (КФ 1.1.1.27) в прямой (субстрат – 50 мМ лактата натрия) и обратной (субстрат – 23 мМ пирувата натрия) реакциях по Соловьевой (2012). Активность АлДГ (КФ 1.2.1.3) оценивали спектрофотометрически в соответствии с методом Guru (1990). Удельную активность ферментов рас-

считывали по концентрации белка, анализируемой модифицированным методом Лоури (1984).

Микроциркуляцию оценивали количественно с помощью прибора ЛАКК-02 (ЛАСМА, г. Москва, Россия), используя пропускание лазерного света непрерывного действия (30 мВт, 890 нм) и белого света (20 Вт, 500–900 нм) в ткани кожи вблизи раны. Параметр микроциркуляции (перф. ед.) как функция скорости кровотока вычисляется по доплеровскому сдвигу, отражающему движение эритроцитов [20, 21].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ MS Excel (Microsoft Corp., США), Biostat 4.3 (AnalystSoft, США), Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) и использовали t-критерий Стьюдента. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению применяли критерий Шапиро – Уилка. При расчёте t-критерия Стьюдента применяли поправку Бонферрони, позволяющую устранить ошибку первого рода, возникающую при сравнении более чем двух выборок данным методом (при проведении множественных сравнений).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфогистологическое исследование влияния композиции 1,2,4-триоксоланов с бетулином в рыбьем жире на слизистую желудка и на рану при пероральном введении

Показано, что пероральное введение композиции 1,2,4-триоксоланов и бетулина в рыбьем жире в течение 10 дней intactным животным и животным с ожогом не оказывает негативного влияния на структуру стенки желудка (рис. 1).

Морфологическая картина всех образцов соответствовала норме. Не изменялись серозная оболочка желудка из однослойного плоского эпителия и тонкого слоя соединительной ткани, хорошо развитая трёх-

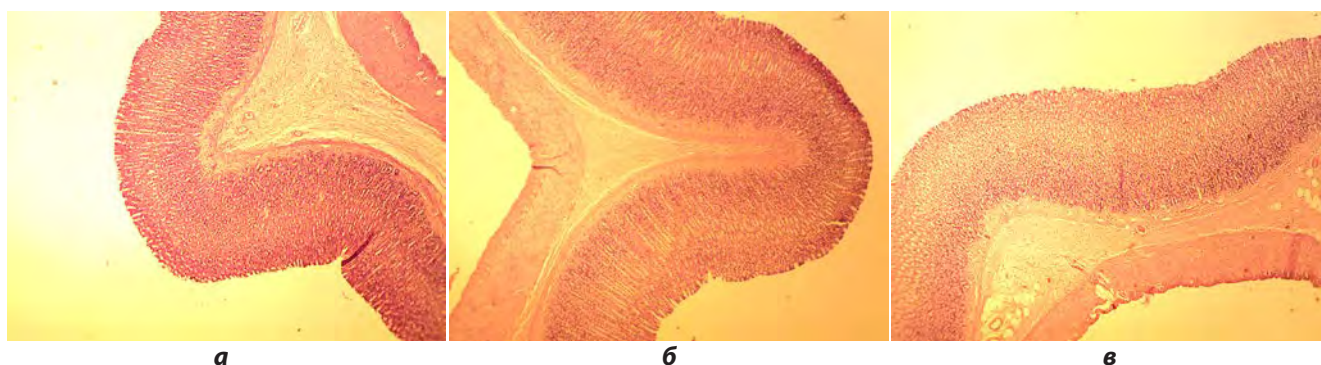


РИС. 1.

Типичная гистологическая картина образцов тканей желудка: **а** – у intactных животных без приёма композиции; **б** – у животных без ожога с приёмом композиции в течение 10 дней; **в** – у животных с ожогом с приёмом композиции в течение 10 дней

FIG. 1.

Typical histological pattern of gastric tissue samples: **a** – intact group without treatment by composition; **б** – group without burns under treatment by composition for 10 days; **в** – group with burns under treatment by composition for 10 days

слойная мышечная оболочка, соединительная ткань с кровеносными сосудами подслизистой основы. Слизистая оболочка характеризовалась рельефностью эпителиального слоя, который представлен столбчатым железистым эпителием с чётко выраженной полярной дифференциацией. Ядра в клетках эпителия расположены ближе к базальной мембране и при окраске гематоксилином и эозином приобретают синий цвет. Окраска гистологических образцов желудка показала, что значительную часть собственной пластинки слизистой оболочки занимают собственные железы. Между начальными отделами желёз видны тонкие волокна соединительной ткани, образующие поддерживающий аппарат для желёз. Подслизистую оболочку составляют коллагеновые волокна, кроме того, в ней расположены единичные мышечные волокна, ориентированные параллельно поверхности органа. В толще указанной оболочки находятся кровеносные сосуды различного калибра.

Идентичность всех образцов интактных и ожоговых животных, которым вводили композицию в течение 10 дней, характеризует фармацевтическую композицию как нетоксичную.

При гистологических исследованиях кожи в области раны положительным контролем были образцы кожи интактных животных (рис. 2а, б). В контрольной, с ожогом без лечения, группе на 10-е сутки гистологическое исследование выявило, что на месте эпидермиса обнаруживались струп (некротизированный эпидермис), остатки волосяных фолликулов, выраженный отёк. Под струпом располагались довольно крупные лимфо-гистиоцитарные и макрофагальные инфильтраты. По краю ожоговой поверхности обнаруживались фокусы молодого эпидермиса на базальной мембране, подрастающего под струпом. Вокруг сосудов выявлялись или круглоклеточные инфильтраты, или микроабсцессы (рис. 2в, г). Для опытной группы с ожогом при лечении композицией на 10-е сутки образцы характеризовались улучшением процесса заживления термической раны; признаки термического повреждения выражены слабо. Обнаружилось много островков молодого эпидермиса с остатками волос. В поле зрения наблюдался струп, под которым располагался гнойный инфильтрат,

ниже которого видны грануляционная ткань и фокусы молодого эпидермиса (рис. 2д, е).

Заживление раны сопровождалось нормализацией процесса микроциркуляции как в области желудка, так и в области ожоговой раны (табл. 1).

Влияние композиции 1,2,4-триоксоланов с бетулином в рыбьем жире на окислительный и энергетический метаболизм у крыс с ожогом

Показано, что все компоненты композиции в чистом виде (бетулин, рыбий жир и 1,2,4-триоксоланы) в норме приводят к незначительному увеличению уровня вторичных метаболитов ПОЛ – МДА, ДК и ТК. При лечении композицией крыс после ожога на 10-й день отмечались снижение и нормализация уровня МДА, ДК и ТК по сравнению с ожогом без лечения (табл. 2).

Удельная активность СОД и каталазы существенно увеличивалась под действием 1,2,4-триоксоланов и композиции, тогда как бетулин и рыбий жир практически не оказывали влияния на активность СОД. У животных без ожога отмечалось увеличение активности СОД на 13,2 % и 28,6 %, а каталазы – на 28,1 % и 42,3 %, под действием 1,2,4-триоксоланов и композиции, соответственно (табл. 3).

При ожоге удельная активность как СОД, так и каталазы резко снижалась на 70,0 % и 55,0 % по сравнению с интактными животными. При этом положительная динамика роста активности СОД и каталазы наблюдалась в группе с 1,2,4-триоксоланами на 62,5 % и 13,2 % соответственно по сравнению с животными без лечения.

В отличие от этого, активность NADPH/NADP-зависимых ферментов – ГР и Г6ФДГ – существенно увеличивалась (в 2–3 раза) под влиянием как композиции, так и всех её компонентов (табл. 3). Данная тенденция сохранялась и при ожоге.

Ожог сопровождался дисбалансом NADH/NAD-зависимых ферментов – ЛДГ в прямой и обратной реакции (табл. 4). Соотношение $\text{ЛДГ}_{\text{обр.}}/\text{ЛДГ}_{\text{пр.}}$ в норме под действием композиции увеличилось с 4,2 (интактные крысы) до 7,5, тогда как при ожоге действие композиции приводило к нормализации энергетического метаболизма и к уменьшению $\text{ЛДГ}_{\text{обр.}}/\text{ЛДГ}_{\text{пр.}}$ с 8,8 (ожог без лечения) до 3,7 (ожог под действием композиции).

ТАБЛИЦА 1
ПОКАЗАТЕЛЬ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ЖЕЛУДКА И КОЖИ
РАНЫ ИНТАКТНЫХ КРЫС И КРЫС С ОЖОГОМ (n = 5),
ПЕРФ. ЕД.

Области	Группы	Лечение				
		Без лечения	Бетулин	РЖ	1,2,4-Т	РЖ + 1,2,4-Т + бетулин
Желудок	норма	19,10 ± 1,27	23,04 ± 1,54*	23,39 ± 1,56*	22,60 ± 1,51*	22,99 ± 1,53*
	ожог	23,71 ± 1,58*	21,87 ± 1,46*	21,94 ± 1,46*	20,37 ± 1,36*	21,42 ± 1,43*
Кожа	норма	9,57 ± 0,87	17,58 ± 1,17	13,73 ± 0,92*	13,88 ± 0,93*	12,62 ± 0,84*
	ожог	9,98 ± 0,67	11,64 ± 0,78*	11,40 ± 0,76*	8,87 ± 0,59	9,53 ± 0,64

Примечание. РЖ – рыбий жир; 1,2,4-Т – 1,2,4-триоксоланы; * – различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0.05$).

TABLE 1
MICROCIRCULATION BLOOD FLOW OF THE STOMACH
AND THE WOUND SKIN IN INTACT RATS AND IN RATS
WITH BURNS (n = 5), PERFUSION UNITS

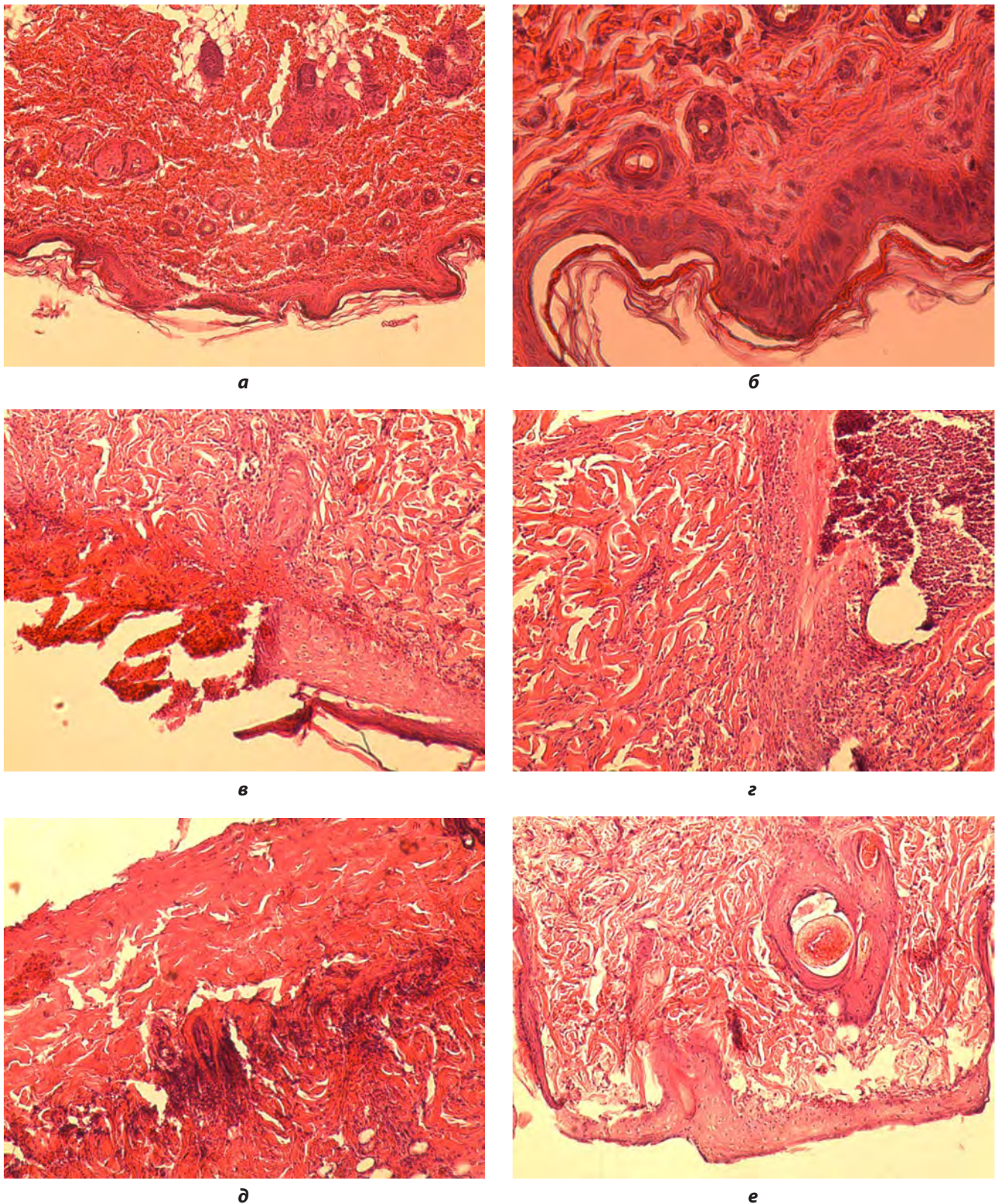


РИС. 2.

Фото образцов тканей ожоговой раны: **а, б** – интактная группа без ожога; **в, з** – группа с ожогом без лечения на 10-й день; **д, е** – группа с ожогом при лечении композицией на 10-й день. Увеличение микроскопа $\times 10$ (**а, в, д**) и $\times 40$ (**б, з, е**)

FIG. 2.

Photo of tissue samples of the burn wound: **a, б** – intact group without burns; **в, з** – group with burns without treatment on day 10; **д, е** – group with burns under the treatment by composition on day 10. Microscope magnification $\times 10$ (**a, в, д**) and $\times 40$ (**б, з, е**)

ТАБЛИЦА 2
УРОВЕНЬ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОДУКТОВ
ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПОЛ (n = 5)

TABLE 2
BIOCHEMICAL INDICES OF LIPID PEROXIDATION
SECONDARY METABOLITES (n = 5)

Показатели	Группы	Лечение				
		Без лечения	Бетулин	РЖ	1,2,4-Т	РЖ+1,2,4-Т+бетулин
МДА _{эр.} , мкмоль/л	норма	7,28 ± 0,25	7,97 ± 0,06*	8,91 ± 0,07**	8,36 ± 0,07**;	9,93 ± 0,17**;
	ожог	8,72 ± 0,07*	5,65 ± 0,14**;	5,74 ± 0,15**;	8,42 ± 0,32**;	7,15 ± 0,14**;
ДК _{пл.} , усл. ед.	норма	0,66 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,76 ± 0,00**;	0,74 ± 0,01**;	0,74 ± 0,01**;
	ожог	0,96 ± 0,02*	0,86 ± 0,01**;	0,91 ± 0,01*	0,94 ± 0,01**;	0,84 ± 0,01**;
ТК _{пл.} , усл. ед.	норма	0,26 ± 0,00	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,29 ± 0,01*
	ожог	0,25 ± 0,01	0,21 ± 0,00**;	0,22 ± 0,01*	0,23 ± 0,01	0,19 ± 0,00**;
ОШ _{пл.} , усл. ед.	норма	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,00*	0,19 ± 0,00**;	0,2 ± 0,00**;
	ожог	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,00**;	0,12 ± 0,01**;

Примечание. РЖ – рыбий жир; 1,2,4-Т – 1,2,4-триоксоланы; эр. – эритроциты; пл. – плоский эпителий; ОШ – основания Шиффа; * – различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог без лечения» ($p < 0,05$); *** – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + Бетулин» ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + РЖ» ($p < 0,05$); ^ – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + 1,2,4-Т» ($p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 3
УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
ОКСИДОРЕДУКТАЗ – СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ,
КАТАЛАЗЫ, ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ,
ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (n = 5)

TABLE 3
SPECIFIC ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE,
CATALASE, GLUTATHIONE REDUCTASE, AND GLUCOSE
6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (n = 5)

Ферменты	Группы	Лечение				
		Без лечения	Бетулин	РЖ	1,2,4-Т	РЖ + 1,2,4-Т + бетулин
СОД, % инг./мин·мг белка	норма	959,22 ± 11,27	995,79 ± 8,22*	992,71 ± 10,49*	1085,89 ± 16,08 *;*;*;***	1233,42 ± 15,13 *;*;*;***;#
	ожог	287,40 ± 6,18*	304,22 ± 9,06*	442,68 ± 12,42 *;*;*;***	467,11 ± 19,66 *;*;*;***	545,64 ± 13,13 *;*;*;***;#;^
Каталаза, мкмоль H ₂ O ₂ /мин·мг белка	норма	35,75 ± 1,25	38,99 ± 0,58*	36,58 ± 0,51	45,81 ± 1,04 *;*;*;***	50,89 ± 0,51 *;*;*;***;#
	ожог	16,09 ± 0,55*	16,79 ± 0,21*	18,82 ± 0,52 *;*;*;***	18,22 ± 0,31 *;*;*;***	19,01 ± 0,21 *;*;*;***
ГР, NADPH/мин·мг белка	норма	90,20 ± 1,49	279,85 ± 5,81*	118,43 ± 1,93**;	317,07 ± 2,02 *;*;*;***	269,20 ± 5,07 *;*;*;***;#
	ожог	75,80 ± 1,09*	175,03 ± 3,10**;	180,75 ± 2,61**;	237,94 ± 6,77 *;*;*;***;#	173,55 ± 1,70 *;*;*;^
Г6ФДГ, NADPH/мин·мг белка	норма	40,85 ± 1,17	55,77 ± 0,26*	44,65 ± 0,19**;	75,58 ± 3,48 *;*;*;***	72,90 ± 0,34 *;*;*;***
	ожог	33,03 ± 0,46*	77,37 ± 0,43**;	84,97 ± 0,65 *;*;*;***	47,76 ± 0,44 *;*;***;#	84,12 ± 0,59 *;*;*;***;^

Примечание. РЖ – рыбий жир; 1,2,4-Т – 1,2,4-триоксоланы; * – различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог без лечения» ($p < 0,05$); *** – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + Бетулин» ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + РЖ» ($p < 0,05$); ^ – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + 1,2,4-Т» ($p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 4
УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ –
АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
(n = 5)

TABLE 4
SPECIFIC ACTIVITY OF ALDEHYDE DEHYDROGENASE
AND LACTATE DEHYDROGENASE (n = 5)

Ферменты	Группы	Лечение				
		Без лечения	Бетулин	РЖ	1,2,4-Т	РЖ + 1,2,4-Т + бетулин
АлДГ, нмоль NADH/мин-мг белка	норма	40,06 ± 1,75	44,84 ± 0,44*	52,14 ± 0,27*; **	40,91 ± 0,66*; ***	42,65 ± 0,83***
	ожог	30,01 ± 0,99*	35,74 ± 0,33**	36,58 ± 0,36**	52,18 ± 0,38 *; **; ***; #	51,62 ± 0,23 *; **; ***; #
ЛДГ _{пр} , нмоль NADH/мин-мг белка	норма	42,48 ± 1,14	43,76 ± 0,12	43,56 ± 0,28	45,98 ± 1,17*	47,19 ± 0,21 *; **; ***
	ожог	31,05 ± 0,63*	31,78 ± 0,70*	57,84 ± 1,18 *; **; ***	45,02 ± 0,54 *; **; ***; #	53,06 ± 0,58 *; **; ***; #; ^
ЛДГ _{обр} , нмоль NADH/мин-мг белка	норма	176,47 ± 3,65	183,09 ± 2,51	356,95 ± 5,19 *; **	377,73 ± 3,92 *; **; ***	354,70 ± 4,90 *; **; #
	ожог	273,65 ± 3,30*	142,13 ± 0,55*; **	219,63 ± 3,89 *; **; ***	173,51 ± 4,99 *; **; ***; #	195,28 ± 0,49 *; **; ***; #; ^

Примечание. РЖ – рыбий жир; 1,2,4-Т – 1,2,4-триоксоланы; * – различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог без лечения» ($p < 0,05$); *** – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + Бетулин» ($p < 0,05$); # – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + РЖ» ($p < 0,05$); ^ – различия статистически значимы по сравнению с группой «ожог + 1,2,4-Т» ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленное увеличение удельной активности NADP/H- и NAD/H-зависимых ферментов (ГР, Г6ФДГ, ЛДГ, АлДГ), а также СОД и каталазы у интактных животных и у животных с ожогами по сравнению с нелечеными животными под действием композиций с окислителем – 1,2,4-триоксоланами – и бетулином показывает, что при оксидативном стрессе окислитель способен активировать ферментную защиту. Это, вероятно, нормализует баланс и дисбаланс оксидантных и антиоксидантных факторов окислительного стресса под действием 1,2,4-триоксоланов. Эти данные в целом согласуются с дискуссией в литературе по поводу стратегий лечения антиоксидантами и/или оксидантами заболеваний, вызванных оксидативным стрессом [3, 22]. Наиболее однозначные выводы продемонстрированы на примере лечения онкологических, нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на то, что избыточная генерация активных форм кислорода (АФК), являющихся причиной клеточных повреждений и развития вышеупомянутых заболеваний, воздействие окислителей, использующее токсические свойства АФК, может быть многообещающим. В работе, посвящённой клинической озонотерапии опорно-двигательного аппарата, также указывалось, что при мышечной оксигенации под действием озона наблюдалось улучшение состояния пациентов [23]. В работах, проведённых L. Re и соавт. [24], было доказано, что озон способствует сохранению и увеличению эндогенных антиоксидантных систем, что в свою очередь увеличивает активность ядерного фактора каппа В, важного иммуномодулятора восстановления.

Положительное влияние на баланс и дисбаланс оксидантов и антиоксидантов в окислительном стрессе, вероятно, оказывают и компоненты рыбьего жира – ω -3-жирные кислоты, эйкозапентаеновая (ЭПК) и докозагексаеновая (ДГК). При окислении ЭПК и ДГК в организме человека способны образовывать эндопероксидные циклопентановые фрагменты, из которых в свою очередь могут образоваться простагландины, простациклины, тромбоксаны, изотромбоксаны, лейкотриены, изолейкотриены, липоксины, гепоксидины (эпоксидные производные) и другие биологически активные вещества. Окисленные метаболиты, в особенности короткоцепочечные, быстрее усваиваются и эффективнее снижают последствия оксидативного стресса [25–27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компоненты рыбьего жира (ω -3-жирные кислоты) являются эффективными антиоксидантными активными биологическими веществами. При этом их совместное применение с окислителями – 1,2,4-триоксоланами – рыбьего жира нормализует баланс и дисбаланс оксидантных и антиоксидантных факторов окислительного стресса: вероятно, благодаря тому, что при оксидативном стрессе окислитель способен активировать ферментную защиту. Таким образом, 1,2,4-триоксоланы рыбьего жира могут быть элементами фармакотерапии для лечения ожогов, усугубляющихся оксидативным стрессом, за счёт коррекции баланса и дисбаланса эндогенных и экзогенных антиоксидантов и окислителей.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Porter C, Tompkins RG, Finnerty CC, Sidossis LS, Suman OE, Herndon DN. The metabolic stress response to burn trauma: Current understanding and therapies. *Lancet*. 2016; 388(10052): 1417-1426. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31469-6
- Saraf MK, Herndon DN, Porter C, Toliver-Kinsky T, Radhakrishnan R, Chao T, et al. Morphological changes in subcutaneous white adipose tissue after severe burn injury. *J Burn Care Res*. 2016; 37(2): 96-103. doi: 10.1097/BCR.0000000000000292
- Vassalle C, Maltinti M, Sabatino L. Targeting oxidative stress for disease prevention and therapy: Where do we stand, and where do we go from here. *Molecules*. 2020; 25(11): 2653. doi: 10.3390/molecules25112653
- Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapietra S, Dosio F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules*. 2020; 25(2): 334. doi: 10.3390/molecules25020334
- Carata E, Tenuzzo BA, Dini L. Powerful properties of ozonated extra virgin olive oil. *Herbal Medicine*. 2019. doi: 10.5772/intechopen.69412
- De Almeida NR, Beatriz A, de Arruda EJ, de Lima DP, de Oliveira LCS, Micheletti AC. Ozonized vegetable oils: Production, chemical characterization and therapeutic potential. *Vegetable Oil: Properties, Uses and Benefits*. Nova Science Publishers, Hauppauge; 2016.
- Menéndez S, Falcón L, Maqueira Y. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON® in patients suffering from onychomycosis. *Mycoses*. 2011; 54: e272-e277. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01898.x
- Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Sticcozzi C, et al. Ozonated oils as functional dermatological matrices: Effects on the wound healing process using SKH1 mice. *Int J Pharm*. 2013; 458: 65-73. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.09.039
- Zamora Rodríguez ZB, González Alvarez R, Guanche D, Merino N, Hernández Rosales F, Menéndez Cepero S, et al. Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm*. 2007; 2007: 65873. doi: 10.1155/2007/65873
- Zamora Z, González R, Guanche D, Merino N, Menéndez S, Hernández F, et al. Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa. *Inflamm Res*. 2008; 57(1): 39-43. doi: 10.1007/s00011-007-7034-1
- Киселевич В.Е., Бессонова Н.Е., Бояринов Г.А., Соколов С.А., Перетягин С.П. Комплекс озонированных ненасыщенных жирных кислот и его применение: Патент № 2725980 Рос. Федерация; МПК А61К 31/19 (2006.01), А61К 35/60 (2006.01), А61Р 1/00 (2006.01), А61Р 9/00 (2006.01), А61Р 11/00 (2006.01). № 2019121013; заявл. 05.07.2019; опубл. 08.07.2020. Бюл. № 19. [Kiselevich VE, Bessonova NE, Boyarinov GA, Sokolov SA, Peretyagin SP. Complex of ozonated unsaturated fatty acids and its application: Patent No. 2725980 of the Russian Federation. 2020; (19). (In Russ.)].
- Scheffler A. The wound healing properties of betulin from birch bark from bench to bedside. *Planta Med*. 2019; 85(07): 524-527. doi: 10.1055/a-0850-0224
- Manzhulo IV, Tyrtysnaia AA, Manzhulo OS, Starinets AA, Kasyanov SP, Dyuzhen IV. Neuroprotective activity of docosahexaenoic acid in the central and peripheral nervous system after damage to the sciatic nerve. *Neurochem J*. 2020; 14(1): 101-107. doi: 10.1134/S1819712420010158
- Ghasemi Fard S, Wang F, Sinclair AJ, Elliott G, Turchini GM. How does high DHA fish oil affect health? A systematic review of evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019; 59(11): 1684-1727. doi: 10.1080/10408398.2018.1425978
- Sega A, Zanardi I, Chiasserini L, Gabbriellini A, Bocci V, Travagli V. Properties of sesame oil by detailed 1H and 13C NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value, peroxide value, and viscosity measurements. *Chem Phys Lipids*. 2010; 163(2): 148-156. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2009.10.010
- Zanardi I, Travagli V, Gabbriellini A, Chiasserini L, Bocci V. Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives. *Lipids*. 2008; 43(9): 877-886. doi: 10.1007/s11745-008-3218-x
- Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина; 2005. [Khabriev RU. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances; 2nd edition, revised and enlarged. Moscow: Meditsina; 2005. (In Russ.)].
- Лампатов В.В., Семенихина Н.М., Халимов Р.И. Способ моделирования термического поражения кожи степени IIIA: Пат. № 2712051 Рос. Федерация; МПК G09B 23/28 (2006.01), A61B 18/04 (2006.01). № 2019100831; заявл. 10.01.2019; опубл. 24.01.2020. Бюл. № 3. [Lampatov VV, Semenikhina NM, Khalimov RI. Method for simulating thermal skin damage of IIIA degree: Patent No. 2712051 of the Russian Federation. 2020; (3). (In Russ.)].
- Перетягин П.В., Соловьева А.Г., Лузан А.С., Воробьев Е.В., Диденко Н.В. Устройство для экспериментального моделирования термической травмы кожи: Описание полезной модели к Патенту № 179126 Рос. Федерация; МПК А61В 18/04 (2006.01), G09B 23/28 (2006.01). № 2017123921; заявл. 05.07.2017; опубл. 26.04.2018. Бюл. № 12. [Peretyagin PV, Solovieva AG, Luzan AS, Vorobyov EV, Didenko NV. Device for experimental modeling of thermal skin injury: Description of the utility model for the Patent No. 179126 of the Russian Federation. 2018; (12). (In Russ.)].
- Martusevich AK, Larionova KD, Peretyagin SP, Peretyagin PV, Davyduk AV. Experimental estimation of pharmacological compositions effect on microcirculation state at early postburn period. *Fundam Res*. 2013; 3: 332-336.
- Dahmus JD, Bruning RS, Kenney WL, Alexander LM. Oral clopidogrel improves cutaneous microvascular function through EDHF-dependent mechanisms in middle-aged humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 305: R452-R458. doi: 10.1152/ajpregu.00366.2012
- Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem*. 2017; 86: 715-748. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037
- Seyam O, Smith NL, Reid I, Gandhi J, Jiang W, Khan SA. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med Gas Res*. 2018; 8(3): 103-110. doi: 10.4103/2045-9912.241075
- Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F. Ozone therapy: Clinical and basic evidence of its ther-

apeutic potential. *Arch Med Res.* 2008; 39: 17-26. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.07.005

25. Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN, Best JD, et al. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(5): 1085-1094. doi: 10.1093/ajcn/71.5.1085

26. Bazan NG. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10: 136-141. doi: 10.1097/MCO.0b013e32802b7030

27. Nakamoto K, Nishinaka T, Mankura M, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. Antinociceptive effects of docosahexaenoic acid against various pain stimuli in mice. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33: 1070-1072. doi: 10.1248/bpb.33.1070

Сведения об авторах

Малыгина Дарина Сергеевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии, ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, e-mail: mds73@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6962-8547>

Ястребов Павел Викторович – генеральный директор, ГП НО «Нижегородская областная фармация», e-mail: yastrebov@gpnof.ru, <https://orcid.org/0009-0008-0443-9527>

Фаянс Анна Эдуардовна – первый заместитель генерального директора, ГП НО «Нижегородская областная фармация», e-mail: fayans@gpnof.ru, <https://orcid.org/0009-0003-7150-4599>

Спицкая Ирина Вячеславовна – кандидат фармацевтических наук, заведующая кафедрой управления и экономики фармации и фармацевтической технологии, ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, e-mail: iraspitskaya@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-9294-0435>

Есипович Антон Львович – кандидат химических наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией «Лаборатория биотоплив» (BioFuelLAB), ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. П.Е. Лобачевского»; старший научный сотрудник инженерно-технологического факультета, ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный технический университет им. П.Е. Алексеева», e-mail: margyn@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2680-0562>

Соловьева Анна Геннадьевна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; доцент кафедры биохимии и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», e-mail: sannag5@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6890-4530>

Перетягин Пётр Владимирович – научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, e-mail: peretyaginpv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0707-892X>

Мельникова Нина Борисовна – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической и медицинской химии, ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; ведущий научный сотрудник инженерно-технологического факультета, ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный технический университет им. П.Е. Алексеева», e-mail: melnikovanb@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1335-1048>

Information about the authors

Darina S. Malygina – Cand. Sc. (Pharm.), Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Privolzhsky Research Medical University, e-mail: mds73@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6962-8547>

Pavel V. Yastrebov – CEO, Pharmacy of the Nizhny Novgorod Region, e-mail: yastrebov@gpnof.ru, <https://orcid.org/0009-0008-0443-9527>

Anna E. Fayans – First Deputy CEO, Pharmacy of the Nizhny Novgorod Region. e-mail: fayans@gpnof.ru, <https://orcid.org/0009-0003-7150-4599>

Irina V. Spitskaya – Cand. Sc. (Pharm.), Head of the Department of Management and Economics of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Privolzhsky Research Medical University, e-mail: iraspitskaya@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0000-9294-0435>

Anton L. Esipovich – Cand. Sc. (Chem.), Head of the Research Laboratory "Laboratory of Biofuels" (BioFuelLAB), National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; Senior Research Officer at the Faculty of Engineering and Technology, Nizhny Novgorod State Technical University, e-mail: margyn@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2680-0562>

Anna G. Soloveva – Dr. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Central Research Laboratory, Privolzhsky Research Medical University; Associate Professor at the Department of Biochemistry and Biotechnology, National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, e-mail: sannag5@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6890-4530>

Petr V. Peretyagin – Research Officer at the Central Research Laboratory, Privolzhsky Research Medical University, e-mail: peretyaginpv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0707-892X>

Nina B. Melnikova – Dr. Sc. (Chem.), Professor at the Department of Analytical and Medicinal Chemistry, National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; Leading Research Officer at the Faculty of Engineering and Technology, Nizhny Novgorod State Technical University, e-mail: melnikovanb@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-1335-1048>