

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 11 (77). 2025. № 4. С. 238–254.

УДК 616-092.9:615.236+615.838.7
DOI 10.29039/2413-1725-2025-11-4-238-254

АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНА В СОЧЕТАНИИ С ВЫТЯЖКОЙ ИЗ ГРЯЗИ САКСКОГО ОЗЕРА

**Чуян Е. Н.¹, Джелдубаева Э. Р.¹, Бирюкова Е. А.^{1,2}, Труханов А. И.³, Дымова Т. С.³,
Миронюк И. С.¹, Абхаирова Э. С.¹, Абилева З. С.¹**

¹*Институт биохимических технологий, экологии и фармации, ФГАОУ ВО «Крымский*
федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

²*Научно-клинический центр «Технологии здоровья и реабилитации» ФГАОУ ВО «Крымский*
федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия

³*Центр научно-исследовательской деятельности Курорта Мрия, Ялта, Республика Крым,*
Россия

E-mail: elena-chuyan@rambler.ru

Осуществлен первичный биоскрининг и целенаправленный поиск противовоспалительных свойств глутатиона в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера в экспериментальных моделях на животных с использованием тестов «горячая пластина», «отдергивание хвоста», «формалинового», которые дают возможность оценить проведение болевого импульса на разных уровнях. Установлено, что глутатион в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера обладает выраженной противовоспалительной и анальгетической активностью во всех использованных моделях воспаления и боли, значительно превосходя по эффективности воздействия вытяжку из грязи Сакского озера, что свидетельствует как о синергизме свойств вытяжки из грязи Сакского озера и глутатиона, так и о получении оптимального способа введения в организм глутатиона в составе вытяжки из грязи Сакского озера.

Ключевые слова: первичный биоскрининг, глутатион, вытяжка из грязи Сакского озера, противовоспалительная активность, болевая чувствительность, алгологические тесты, «формалиновый» тест, плеизометрия.

ВВЕДЕНИЕ

Хронические воспалительные заболевания и связанные с ними болевые синдромы остаются одной из наиболее актуальных проблем современной физиологии и медицины [1, 2]. Длительное применение нестероидных противовоспалительных препаратов и анальгетиков сопровождается риском серьёзных побочных эффектов, включая гастропатию, нефропатию, сердечно-сосудистые осложнения и развитие лекарственной толерантности [3–5]. Поэтому актуален поиск безопасных, в том числе природных, средств с анальгетическим и противовоспалительным действием.

Лечебные грязи (пелоидотерапия), традиционно используемые в санаторно-курортной медицине, обладают доказанным противовоспалительным и анальгетическим потенциалом, благодаря сложному органоминеральному составу, включающему гуминовые вещества, микроэлементы, биологически активные липофильные фракции и минеральные соли [6, 7]. Лечебные грязи способны снижать уровни провоспалительных цитокинов, в том числе IL-1 β и TNF- α , и С-реактивного белка, улучшать микроциркуляцию, повышать антиоксидантную активность тканей, уменьшать проницаемость сосудов и выраженность болевого синдрома [8, 9].

Сакские сульфидно-иловые грязи – уникальный природный лечебный фактор Крыма, который десятилетиями применяют в восстановительной медицине при заболеваниях опорно-двигательного аппарата и хронических воспалительных состояниях. В клинических и экспериментальных исследованиях они продемонстрировали противовоспалительные, иммуномодулирующие и репаративные свойства [10, 11].

Существенную роль в формировании воспалительного процесса и болевой чувствительности играет оксидативный стресс, сопровождающийся активацией свободнорадикальных реакций, нарушением редокс-гомеостаза и сенситизацией периферических и центральных ноцицептивных путей [12]. Одним из ключевых компонентов эндогенной антиоксидантной системы является глутатион (GSH), участвующий в нейтрализации реактивных форм кислорода и азота, поддержании структурной целостности клеточных мембран, регуляции митохондриальных функций и подавлении экспрессии провоспалительных генов [13–15]. Установлено, что восстановленный глутатион играет защитную роль, препятствует развитию механической аллодинии и центральной сенсибилизации у крыс с хроническим болевым синдромом [16].

Нарушение гомеостаза глутатиона может участвовать, наряду с другими физиологическими механизмами, в развитии многих заболеваний, напротив, оптимальное функционирование системы глутатиона в организме непосредственно связано с резервами здоровья, профилактикой многих заболеваний, замедлением процессов старения и увеличением здорового долголетия. Поддержание нормального уровня глутатиона возможно при оптимизации питания, особенно в тех случаях, когда под воздействием неблагоприятных факторов происходит истощение антиоксидантных систем организма. Однако рационы питания, характерные для современного городского населения и содержащие недостаточные количества свежих овощей и фруктов, могут сопровождаться истощением системы глутатиона и снижением его уровня в плазме крови. В таких ситуациях организму крайне важна возможность получения глутатиона из экзогенных источников. В связи с этим актуальны исследования оптимальных способов введения глутатиона в организм человека, возможностях межорганной транспортировки этого вещества во время болевого стресса, воспаления и других неблагоприятных воздействий на организм.

Исследование биологической и терапевтической эффективности комбинации природных пелоидов с глутатионом представляется перспективным направлением, поскольку объединяет локальные механизмы действия грязевой вытяжки (улучшение микроциркуляции, снижение локального воспаления, стабилизация

тканевых структур) и системные антиоксидантные и нейромодулирующие эффекты глутатиона. Чрескожный путь введения может обеспечивать пролонгированное поступление биологически активных веществ в организм и благоприятные условия для их взаимодействия с кожными и нейроваскулярными структурами. Лекарственные препараты, используемые для нанесения на кожу, обеспечивают высокую концентрацию активного вещества непосредственно в месте нанесения и способствуют уменьшению системных побочных эффектов.

В доступной научной литературе отсутствуют экспериментальные исследования, направленные на сравнительную оценку анальгетического и противовоспалительного действия вытяжки грязи Сакского озера и её композиции с глутатионом при курсовом применении, что определяет научную новизну и практическую значимость настоящей работы.

В связи с изложенным, **целью** работы явилась оценка эффективности применения вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом в экспериментальных исследованиях на животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Института биохимических технологий, экологии и фармации и Научно-клинического центра «Технологии здоровья и реабилитации» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского».

При выполнении исследований строго соблюдались требования Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609 EEC), законодательства Российской Федерации, биоэтические стандарты, а также нормативные акты, включая ГОСТ 31887-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)». Каждая манипуляция с участием животных осуществлялась в строгом соответствии с разработанными и утверждёнными стандартными операционными процедурами, что обеспечивает гуманность, безопасность и научную оправданность проводимых работ.

Экспериментальные исследования выполнены на 30 половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 280–300 (ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константина национального исследовательского центра «Курчатовский институт», питомник лабораторных животных «Рапполово»). Животные содержались в стандартизованных условиях вивария при температуре от 18⁰ до 22⁰ С, на подстилке «Рехофикс МК 2000» (на основе початков кукурузы) с естественным освещением 12-часового свето-температурного цикла. Доступ к воде согласно ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организационных процедур» и полноценному гранулированному корму ГОСТ Р-50258-92. Эксперимент проводился на крысах, находящихся в хорошем физиологическом состоянии (отсутствие болезней и стресса), со средней двигательной активностью и низкой эмоциональной реакцией в teste «открытое поле», которые, по нашим данным, составляют большинство в популяции, а, следовательно, у них развивается

типичная среднестатистическая реакция на действие различных факторов, включая болевые воздействия и тестируемые соединения.

Животные были рандомным образом («методом конвертов») распределены на три экспериментальные группы (по 10 особей в каждой).

Первая группа (К, Контроль, n=10) – животные, которым на предварительно выбритую кожу межлопаточной области десятикратно (один раз в день) наносили мазевую основу (физиотерапевтический гель).

Вторая группа (В, Вытяжка, n=10) – животные, которым на предварительно выбритую кожу межлопаточной области десятикратно (один раз в день) наносили вытяжку из грязи Сакского озера.

Третья группа (В+Г, Вытяжка+глутатион, n=10) – животные, которым на предварительно выбритую кожу межлопаточной области десятикратно (один раз в день) наносили вытяжку из грязи Сакского озера с глутатионом.

После 10-кратного накожного применения экспериментальных субстанций у крыс всех групп оценивали изменение болевой чувствительности и воспалительной реакции.

Оценку изменения болевой чувствительности крыс под влиянием тестируемых субстанций проводили в алгологических тестах.

Тест «горячая пластина» (hot plate, ТГП), отражающий спинальный уровень организации болевой чувствительности, в экспериментах на крысах проводили по методу, описанному Т. А. Ворониной и Л. С. Гузеватых [17]. Тест является базисным для исследования анальгетической активности и основан на поведенческих реакциях, в ответ на термическое болевое воздействие; используется для выявления соединений, подавляющих соматически поверхность и острую боль.

Крысу помещали на равномерную горячую поверхность ($55.0^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) экспериментального прибора «Cold and hot plate CHP» (BIOCIRP, Bioseb, Франция) и регистрировали латентный период болевой реакции (ЛПБР, с), характеризующийся развитием двигательных реакций беспокойства (отдергивание и облизывание лап, подпрыгивание), которые характеризуются самой сложной организацией рефлекса с вовлечением корковых и подкорковых структур головного мозга. Данная экспериментальная модель позволяет не только оценить обезболивающее действие вещества, но и определить уровень вмешательства в нейромедиаторные процессы ЦНС [18].

Анальгетическую активность исследуемого вещества представляли в виде ЛПБР (с) и процента угнетения болевой реакции (УБР), который рассчитывали по уравнениям (1, 2):

$$\text{УБР} = \frac{\text{Tэкс.}}{\text{Тконтр.}} \times 100 - 100, \quad (1)$$

где Тконтр. – латентное время болевой реакции в контрольной группе, Тэкс. – латентное время болевой реакции в экспериментальной группе.

$$\text{УБР} = \frac{\text{T(B+ГТ)}}{\text{T(B)}} \times 100 - 100, \quad (2)$$

где Т(B+ГТ) – латентное время болевой реакции в третьей группе животных, которым десятикратно наносили вытяжку из грязи Сакского озера и глутатиона;

Т(В) – латентное время болевой реакции во второй группе животных, которым десятикратно наносили вытяжку из грязи Сакского озера.

Тест «отдергивание хвоста» (*tail flick*, TOX) проводили на крысах по методу, описанному Т. А. Ворониной и Л. С. Гузеватых [17]. Данная методика позволяет выявить влияние исследуемого вещества на болевую чувствительность, реализующуюся преимущественно на спинальном уровне. Измерения проводили на алгометрическом приборе LE7106 Tail-flick Meter (Pan Lab Panlab Harvard Apparatus, Испания). На хвост крысы, находящейся в фиксаторе (пенале из оргстекла), воздействовали инфракрасным тепловым стимулом. При наступлении болевого порога животное отдергивает хвост, что улавливается датчиком прибора и регистрируется латентный период болевой реакции (ЛПБР). Аналгетическую активность оценивали по среднему латентному времени в группе и проценту угнетения болевой реакции, который рассчитывали по формулам (1, 2).

Изменение развития воспалительной реакции у крыс при действии исследуемых субстанций анализировали в «формалиновом» тесте путем субплантарного (под подошвенный апоневроз) введения 0,1 мл 2 % водного раствора формалина (ГОСТ 1625-86 ФМ, Россия) в левую заднюю лапу [17]. Данный тест позволяет оценить влияние исследуемого вещества на супраспинальный и периферический уровни организации болевой чувствительности.

Величину отека конечности измеряли с помощью метода водной плеизометрии (цифровой водный плеизометр LE 7500, BioSeb, Франция). Данная методика используется для наблюдения за развитием экспериментально вызванной воспалительной реакции у грызунов и оценки противовоспалительной активности исследуемых веществ.

Развитие отека оценивали по формуле:

$$\Pi = \frac{O - I}{I} \times 100\%, \quad (3)$$

где Π – прирост отека; O – величина объема лапы после введения индуктора воспаления; I – величина объема лапы до введения индуктора воспаления.

Рассчитывали эффект терапевтического воздействия (ЭТВ, %), который оценивали по степени угнетения воспалительной реакции в сравнении со второй группой животных по формуле [19]:

$$\text{ЭТВ} = 100\% - \left(\frac{O - I}{I} (B + GT) / \frac{O - I}{I} (B) \right) \times 100\%, \quad (4)$$

где I – величина объема лапы до введения индуктора воспаления (формалина); O – величина объема лапы после введения индуктора воспаления; $B+GT$ – третья группа животных, которым десятикратно наносили вытяжку из грязи Сакского

озера и глутатиона; В – вторая группа животных, которым десятикратно наносили вытяжку из грязи Сакского озера.

Статистическую обработку и графическое представление экспериментальных данных проводили с использованием программ GraphPad Prism 8 (версия 8.4.3 (686) (GraphPad Software, США) и Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). Проверку распределения данных на нормальность осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение данных в подавляющем большинстве случаев не соответствовало нормальному, значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. Множественные апостериорные сравнения значений показателей между группами проводили с помощью критерия Данна (Bonferroni-Dunn post hoc test, Dunn's multiple comparison post-test). На рисунках и в тексте значения показателей для соответствующей группы крыс представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q_{25} : Q_{75})).

В описании сравнения значений показателей в разных группах животных использовались %, которые рассчитывались по значениям медианы показателей соответствующих групп. Критический уровень значимости статистических гипотез (р) в данном исследовании принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изменение болевой чувствительности крыс в teste «горячая пластина».

У крыс первой контрольной группы значения ЛПБР (с) находились в пределах физиологической нормы и составили 6,15 (5,23; 6,53).

Во второй группе (В), в которой животным на кожу межлопаточной области десятикратно наносили вытяжку из грязи Сакского озера, зарегистрировано статистически значимое увеличение ЛПБР на 24,39 % (р = 0,023) относительно значений в контрольной группе. У крыс третьей группы (В+ГТ) данный показатель был выше на 58,54 % (р = 0,003) по сравнению с контрольной группой и на 21,54 % (р = 0,048) по сравнению со значениями данного показателя у животных второй группы (В) (рис. 1).

Значение УБР, которое демонстрирует увеличение времени латентного периода болевой реакции в экспериментальной группе по сравнению с контролем, во второй группе составило 24,39 %, а в третьей – 58,54 %, что демонстрирует снижение болевой реакции у крыс 2 и особенно 3 групп. Следовательно, обе исследуемые субстанции демонстрируют анальгетический эффект. При этом композиция вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом обладает более выраженной активностью, о чем свидетельствует повышение УБР на 27,58 % по сравнению с группой 2 и подтверждает усиление анальгетического действия при добавлении глутатиона.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в группах животных, которым 10-кратно наносили вытяжку из грязи Сакского озера с глутатионом снижается чувствительность к тепловому болевому стимулу, что проявляется увеличением ЛПБР и угнетением болевой реакции в teste «горячая пластина».

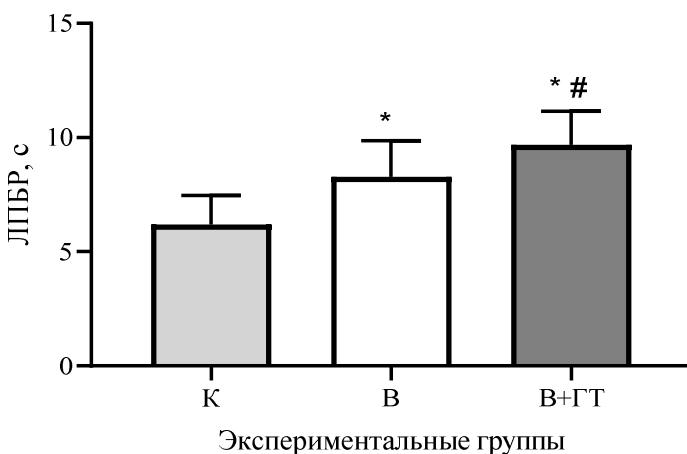


Рис. 1. Латентный период болевой реакции (ЛПБР, с) у крыс в контроле (К), после 10-кратных аппликаций вытяжки из грязи Сакского озера (В) и вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом (В+ГТ) в тесте «горячая пластишка»

Примечание: * – достоверность отличий по критерию Данна относительно значений у крыс контрольной группы ($p<0,05$); # – достоверность отличий по критерию Данна относительно значений у крыс после 10-кратных аппликаций вытяжки из грязи Сакского озера; гистограммы построены по медиане, нижнему и верхнему квартилям (Me (Q25:Q75)).

2. Изменение болевой чувствительности крыс в teste «отдергивания хвоста».

После 10-кратного курса аппликаций на кожу межлопаточной области у экспериментальных животных зарегистрированы существенные различия ЛПБР в ТОХ в зависимости от исследуемых субстанций.

У крыс первой контрольной группы ЛПБР составил 4,57 (3,65; 5,71) с (рис. 2), что согласуется с литературными данными [20].

У животных второй группы (В) отмечено статистически значимое увеличение ЛПБР на 28,85 % ($p = 0,023$) относительно значения этого показателя контрольной группы животных. Более значимое повышение порога болевой чувствительности зарегистрировано у крыс третьей группы (В+ГТ), у которых ЛПБР превышал контроль на 65,68 % ($p < 0,0001$) (рис. 2). При сравнении показателей болевой чувствительности крыс третьей группы (В+ГТ) относительно второй группы (В), зарегистрировано увеличение ЛПБР на 28,58 % ($p = 0,047$).

Значение УБР, которое демонстрирует увеличение ЛПБР в экспериментальной группе по сравнению с контролем, во второй группе составило 28,85 %, а в третьей – 65,68 %, что демонстрирует снижение болевой реакции у крыс 2 и особенно 3 групп. Следовательно, обе исследуемые субстанции демонстрируют анальгетический эффект в teste «отдергивания хвоста». При этом композиция вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом обладает более выраженной активностью, о чем свидетельствует повышение УБР на 28,47 % по сравнению с группой 2 и указывает на усиление анальгетического эффекта при добавлении глутатиона.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в группах животных, которым 10-кратно наносили вытяжку из грязи Сакского озера с глутатионом снижается чувствительность к болевому стимулу, что проявляется увеличением ЛПБР и угнетением болевой реакции в teste «отдергивания хвоста».

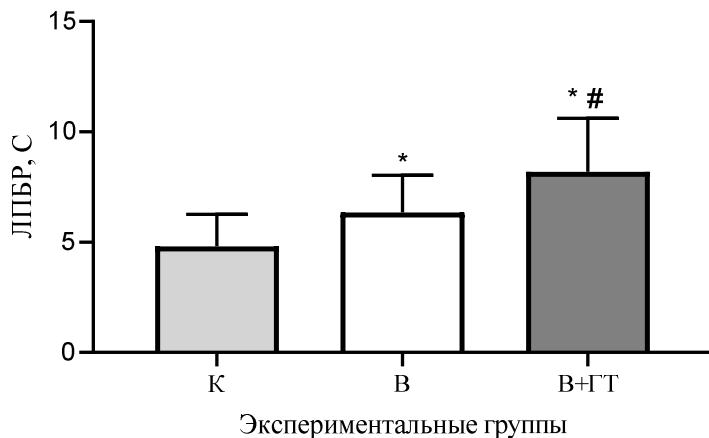


Рис. 2. Латентный период болевой реакции (ЛПБР, с) у крыс в контроле (К), после 10-кратных аппликаций вытяжки из грязи Сакского озера (В) и вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом (В+ГТ) в teste «отдергивания хвоста»
Примечание: то же, что на рисунке 1

3. Изменение воспалительной реакции у крыс в условиях «формалинового» теста.

До введения формалина объемы лапы у животных трёх групп существенно не различались и варьировали в пределах 0,30–0,80 мл. Это свидетельствует об исходной однородности групп и корректности дальнейшего сравнения (рис. 3).

Через 30 минут после субплантарного введения 2 % раствора формалина у крыс контрольной группы наблюдалось развитие ранней фазы воспалительного ответа. Объём лапы увеличился до 1,36 (1,07; 1,75) мл, что сопровождалось приростом отёка на 198,90 %.

Через 60 минут после введения формалина регистрировалось дальнейшее усиление воспаления, соответствующее ранней гипералгезии. Объём лапы увеличился до 1,91 (1,64; 1,95) мл, а прирост отёка достиг 316,48 %.

Через 120 минут у животных контрольной группы наблюдалось достижение пика второй (поздней) фазы воспаления, а объём отёка достиг максимальных значений – 2,40 (1,86; 2,69) мл, прирост отёка составил 427,47 %. Эти данные полностью соответствуют классической динамике «формалинового» теста и подтверждают воспроизводимость используемой модели воспаления [21].

У крыс второй группы (В), получивших 10-кратные аппликации вытяжки из грязи Сакского озера, через 30 минут после введения формалина объём лапы был ниже контрольных значений на 24,26 % ($p = 0,064$), однако различия не достигали

статистической значимости. Прирост отёка составил 202,94 %, что практически сопоставимо с контрольной группой (рис. 4) и указывает на минимальное влияние грязевой вытяжки на раннюю фазу воспалительной реакции.

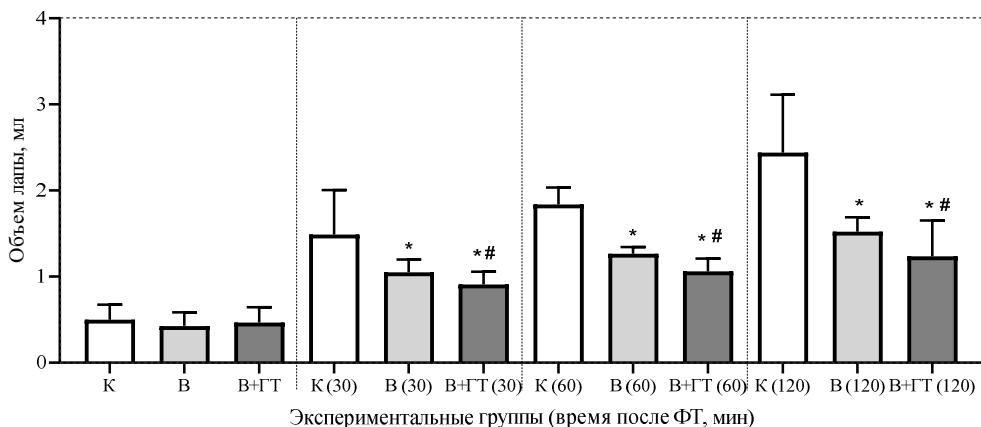


Рис. 3. Объем лапы (мл) в водном плеизометре у крыс в контроле (К), после 10-кратных аппликаций вытяжки из грязи Сакского озера (В) и вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом (В+ГТ) до и через 30, 60, 120 минут после введения раствора формалина

Примечание: то же, что на рисунке 1.

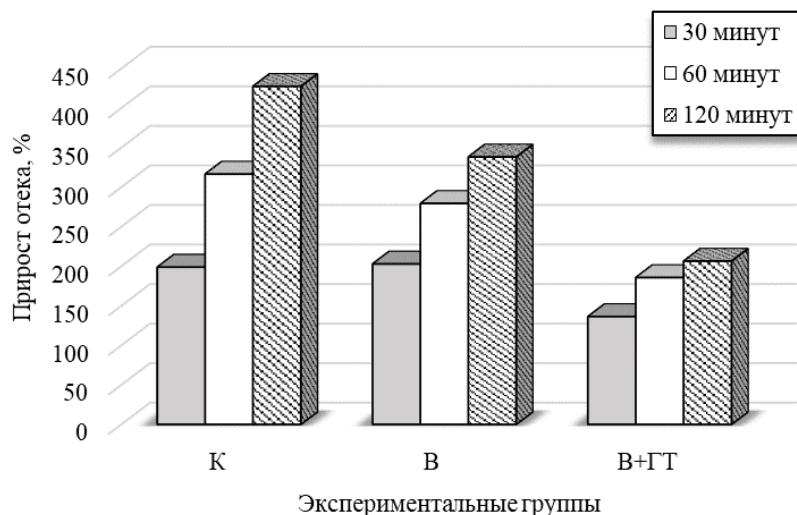


Рис. 4. Прирост отёка лапы (%) крыс в водном плеизометре у животных в контроле (К), подвергнутых 10-кратным аппликациям вытяжки из грязи Сакского озера (В) и вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом (В+ГТ) через 30, 60 и 120 минут после субплантарного введения раствора формалина.

Через 60 минут после введения формалина у животных второй группы отмечалось более выраженное снижение воспалительной реакции. Объём отёка статистически значимо уменьшился на 31,91 % ($p = 0,018$) по сравнению с контрольной группой. Прирост отёка составлял 279,41 %, что на 11,71 % ниже по сравнению со значением в контроле (рис. 4).

Через 120 минут после инъекции формалина у крыс второй группы наблюдалось дальнейшее снижение выраженности воспалительной реакции. Объём отёка был ниже значений контрольной группы на 37,92 % ($p = 0,001$). Прирост отёка уменьшился до 338,23 %, что на 20,9 % ниже значений показателя у контрольных животных. Эти данные свидетельствуют о наличии противовоспалительного эффекта вытяжки из грязи Сакского озера в поздней фазе воспаления.

У животных третьей группы (B+ГТ), получивших вытяжку из грязи Сакского озера с добавлением глутатиона, через 30 минут после введения формалина объём лапы был ниже значений в контроле на 33,09 % ($p = 0,023$), а также ниже, чем во второй группе на 11,65 % ($p = 0,061$). Прирост отёка составил 136,36 %, что на 31,45 % меньше, чем в контроле и на 32,79 % ниже значения показателя второй группы.

Через 60 минут после введения формалина наблюдалось дальнейшее усиление противовоспалительного действия исследуемой композиции. Объём лапы уменьшился на 41,65 % ($p = 0,003$) по сравнению с контролем и на 14,73 % ($p = 0,009$) относительно значений во второй группе. Прирост отёка составил 185,71 %, что на 41,31 % и 33,5 % ниже значений в контроле и во второй группе соответственно и демонстрирует выраженное подавление фазы воспаления и развитие ранней гипералгезии при добавлении в вытяжку глутатиона.

Через 120 минут после инъекции формалина в период поздней фазы воспаления объём лапы у животных третьей группы был ниже на 50,83 % ($p < 0,0001$) значения у животных контрольной группы и ниже значений показателя второй группы (B) на 20,81 % ($p = 0,049$). Прирост отёка составил 206,49 %, что на 51,79 % меньше, чем в контроле и на 38,93 % ниже, чем у крыс во второй группе (рис. 3, 4).

Эффективность терапевтического воздействия композиции глутатиона с вытяжкой из грязи Сакского озера относительно степени уменьшения воспалительного отёка по сравнению с вытяжкой из грязи Сакского озера через 30 минут после введения формалина увеличилась на 32,81 %, через 60 минут – на 33,53 %, а через 120 минут – на 38,95 %.

Таким образом, у контрольных животных наблюдалась типичная двухфазная реакция: ранний отёк (0–30 мин), более выраженная поздняя фаза воспаления (60–120 мин) [22]. У животных после курса аппликаций вытяжки из грязи Сакского озера зарегистрировано минимальное снижение отёка в раннюю фазу воспаления, однако в позднюю фазу вытяжка достоверно уменьшала прирост отёка по сравнению с контролем, что указывает на наличие противовоспалительных свойств вытяжки. У крыс 3 группы после 10-кратного курса аппликаций вытяжки из грязи Сакского озера с добавлением глутатиона отмечалось наиболее выраженное подавление болевой и воспалительной реакции. Уже на 30-й минуте отёк конечности был значительно ниже значений как контрольной, так и второй групп. В

позднюю фазу воспаления композиция обеспечивала максимальное снижение прироста отёка – более чем на 50 % относительно контроля и на 35 % относительно вытяжки из грязи Сакского озера.

Глутатион в сочетании с вытяжкой из грязи Сакского озера в экспериментах на животных обладает выраженной анальгетической активностью во всех использованных моделях воспаления и боли, значительно превосходя по эффективности терапевтического воздействия вытяжку из грязи Сакского озера. Так, в тесте «горячая пластина» уровень угнетения болевой реакции увеличился на 30,08 %, что указывает на возможное действие композиции на супраспинальный уровень организации болевой чувствительности [17].

В teste «отдергивание хвоста» глутатион в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера проявляет также выраженный анальгезирующий эффект, а уровень угнетения болевой реакции увеличился на 70,53 %. Известно, что в этом teste последовательно активируются терморецепторы, С-волокна полимодальных ноцицепторов, Ad-волокна полимодальных ноцицепторов, полимодальные ноцицепторы, высокопороговые механорецепторы [17]. Поэтому выраженные изменения болевых реакций у животных под влиянием исследуемой композиции свидетельствует о её влиянии на спинальный уровень организации болевой чувствительности.

В условиях «формалинового» теста, который имеет достаточно высокую прогностическую значимость, имитирует реакции, развивающиеся при операционных кожных разрезах [17] и отражает воспалительные и болевые реакции, глутатион в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера уменьшил прирост отёка лапы крыс в водном плетизмометре по сравнению с вытяжкой из грязи Сакского озера. Причем эффект появлялся как в первой фазе реакции, развивающейся сразу после инъекции формалина и характеризующейся воздействием на первичные афференты боли (ЭТВ увеличилась на 32,81 относительно вытяжки из грязи Сакского озера), так и во второй фазе, которая отставлена во времени и является болью, вызванной воспалительной реакцией (ЭТВ увеличилась на 38,95 % относительно вытяжки из грязи Сакского озера). Установлено, что местные анестетики блокируют только первую фазу, нестероидные противовоспалительные средства подавляют только вторую, и только опиоидные анальгетики блокируют обе фазы реакции [21].

Одним из механизмов ноцигенного действия формалина является активация ванилоидных, или «капсациновых», рецепторов 1 типа (*transient receptor potential vanilloid type 1*, TRPV1), являющихся неселективным катионным каналом с предпочтением к ионам Ca^{2+} -каналов, реагирующих в норме на холод и стимулирующих развитие воспаления [22].

Следовательно, можно предположить, что механизм анальгетического и противовоспалительного действия глутатиона в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера может быть связан с блокадой полимодальных ноцицепторов, опиоидных болевых рецепторов, TRPV1, высокопороговых механорецепторов, терморецепторов, торможением передачи болевых импульсов по нервным

волокнам, угнетением соматического рефлекса и проявляется на супраспинальном, спинальном и периферическом уровнях болевой чувствительности.

Данные, полученные в экспериментальных моделях на животных, свидетельствуют о синергизме противовоспалительных и противовирусных свойств пелоидов грязи Сакского озера и системной антиоксидантной активности глутатиона и согласуются с литературными. Показано, что пелоиды Сакского озера содержат биологически активные гуминовые кислоты, органоминеральные комплексы, липофильные компоненты, способные уменьшать локальное воспаление [11], улучшать микроциркуляцию и трофику тканей, снижать уровень провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α) [10], модулировать чувствительность периферических ноцицепторов [23], однако эффект вытяжки из грязи Сакского озера связан преимущественно с местным (локальным) действием, так как субстанция не проникает в кровоток.

Современные исследования свидетельствуют о том, что глутатион является центральным компонентом оси «оксидативный стресс → воспаление → боль». Показано, что дефицит в организме восстановленного глутатиона (GSH) сопровождается активацией NF-кБ (ядерный фактор «каппа-би», контролирует экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла), повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6), усилением продукции NO и пероксинитрита, а также сенсибилизацией периферических ноцицепторов, что рассматривается в качестве центрального механизма хронизации боли и воспаления [24, 25]. Напротив, восстановление глутатионовой системы приводит к уменьшению нейропатической и воспалительной боли, продукции простагландинов и NO, сосудистой проницаемости и миграции нейтрофилов, образования пероксинитрита – ключевого повреждающего фактора в развитии воспаления [16, 24–26]. Систематический обзор 2025 г. показывает, что многие перспективные антиоксиданты, включая N-ацетилцистеин и α -липоевую кислоту, реализуют анальгетическое действие именно через восстановление глутатионовой системы [27]. Автор отмечает, что клинический потенциал глутатиона высок, но данные пока фрагментарны и требуются крупные рандомизированные исследования.

Таким образом, можно предположить, что введение в вытяжку из грязи Сакского озера, обладающей локальными противовоспалительным и обезболивающим эффектами, глутатиона приводит к переходу от локального эффекта к выраженному системному анальгетическому и противовоспалительному действию, что требует дополнительных более развернутых исследований.

Существуют лишь единичные исследования по трансдермальному введению глутатиона, в которых отмечена низкая биодоступность препарата по сравнению с его пероральным применением [28]. Данные настоящего исследования свидетельствуют о возможно оптимальном способе введения глутатиона в составе вытяжки из грязи Сакского озера, способствующем трансдермальной и межорганной транспортировке этого вещества во время болевого стресса, воспаления и других неблагоприятных воздействий на организм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осуществлен первичный биоскрининг и целенаправленный поиск противовоспалительных свойств глутатиона в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера в экспериментах на животных в условиях тестов «горячая пластина», «отдергивание хвоста», «формалинового», которые дают возможность оценить проведение болевого импульса на разных уровнях и рекомендованы международными экспертами для проведения исследований в соответствии с принципами GLP и отечественными руководствами по доклиническому изучению новых фармакологических веществ. Только при применении комплекса болевых и противовоспалительных тестов возможно получить спектр анальгетической активности тестируемых соединений и в определенной степени прогнозировать характер возможного обезболивающего действия у человека.

Проведенный биоскрининг открывает перспективу использования этих данных для дальнейшего исследования данной композиции как эффективного средства для предупреждения и лечения системного воспаления, в том числе установление зависимости «доза-эффект» с целью определения оптимальных концентраций глутатиона, обеспечивающих максимальный анальгетический и противовоспалительный эффект, оценку длительности эффекта последействия и др. Выявленное в экспериментах на животных анальгезирующее действие глутатиона в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера, по-видимому, является частью сложного механизма противовоспалительного действия данной композиции, который может быть дополнен при исследовании вазо-, нейротропного и других эффектов. Такие исследования позволят сформировать научно обоснованные рекомендации для широкого клинического использования данного перспективного средства.

Полученные данные позволяют рекомендовать композицию глутатиона в сочетании с вытяжками из грязи Сакского озера в качестве средства для предупреждения и лечения воспаления и болевого синдрома в санаторно-курортной медицине и реабилитации с целью расширения арсенала эффективных противовоспалительных и противоболевых процедур и уменьшения финансовых затрат на их применение.

Работа выполнена в рамках договора № MP-24199/2025 от 25.11.2025 г. с ООО «Мрия» на выполнение НИР «Экспериментальная оценка эффективности применения вытяжки из грязи Сакского озера с глутатионом в качестве средства снижения системного воспаления».

Список литературы

1. Goldberg D. S. Pain as a global public health priority / D. S. Goldberg, S. J. McGee // BMC Public Health. – 2011. – Vol. 11. – P. 770. – DOI: 10.1186/1471-2458-11-770.
2. Mills S. E. E. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies / S. E. E. Mills, K. P. Nicolson, B. H. Smith // Br. J. Anaesth. – 2019. – Vol. 123, No 2. – P. e273–e283. – DOI: 10.1016/j.bja.2019.03.023.

3. da Costa B. R. Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: network meta-analysis / B. R. da Costa, T. V. Pereira, P. Saadat [et al.] // BMJ. – 2021. – Vol. 375. – P. n2321. – DOI: 10.1136/bmj.n2321.
4. Bannister K. Neuropathic pain: mechanism-based therapeutics / K. Bannister, J. Sachau, R. Baron, A. H. Dickenson // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2020. – Vol. 60. – P. 257–274. – DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021524.
5. Дядык А. И. Побочные эффекты нестероидных противовоспалительных препаратов / А. И. Дядык, Т. Е. Куглер // Consilium Medicum. – 2017. – Т. 19, № 12. – С. 94–99. – DOI: 10.26442/2075-1753_19.12.94-99.
6. Федотченко А. А. Бальнеотерапия и грязелечение (рекомендации по лечебному применению) : пособие для врачей / А. А. Федотченко. – Иркутск : РИО ИГИУВа, 2010. – 24 с.
7. Дурягина Л. Х. Обоснование эффективности применения грязелечения в Крыму / Л. Х. Дурягина, Л. А. Дегтярева, Т. А. Дубровина-Парус, Н. В. Жук // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2025. – Т. 31, № 1. – С. 81.
8. Maraver F. Peloids as thermotherapeutic agents / F. Maraver, F. Armijo, M. A. Fernandez-Toran [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2021. – Vol. 18, No 4. – P. 1965. – DOI: 10.3390/ijerph18041965.
9. Tognolo L. Clinical impact of balneotherapy and therapeutic exercise in rheumatic diseases: a lexical analysis and scoping review / L. Tognolo, D. Coraci, A. Fioravanti [et al.] // Appl. Sci. – 2022. – Vol. 12, No 15. – P. 7379. – DOI: 10.3390/app12157379.
10. Кузнецова М. Ю. Влияние природных факторов озера Саки на иммунорегуляторные процессы у больных бляшечным псориазом лёгкой и средней степени тяжести / М. Ю. Кузнецова // Universum: Медицина и фармакология. – 2015. – № 11 (22). – URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/27164>.
11. Полещук О. Ю. Применение отжима лечебной грязи сакского озера в лечении гингивита у детей / О. Ю. Полещук, О. П. Галкина, К. Н. Каладзе [и др.] // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2023. – № 1. – С. 58–60. – DOI: 10.37279/2413-0478-2023-29-1-58-60.
12. Vergne-Salle R. Chronic pain and neuroinflammation / R. Vergne-Salle, P. Bertin // Joint Bone Spine. – 2021. – Vol. 88, No 6. – P. 105222. – DOI: 10.1016/j.jbspin.2021.105222.
13. Aquilano K. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant / K. Aquilano, S. Baldelli, M. R. Ciriolo // Front. Pharmacol. – 2014. – Vol. 5. – P. 196. – DOI: 10.3389/fphar.2014.00196.
14. Forman H. J. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // Molecular Aspects of Medicine. – 2009. – Vol. 30, No 1–2. – P. 1–12. – DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
15. Wu G. Glutathione metabolism and its implications for health / G. Wu, J. R. Lupton, N. D. Turner [et al.] // J. Nutr. – 2004. – Vol. 134, No 3. – P. 489–492. – DOI: 10.1093/jn/134.3.489.
16. Yeo J. Effects of glutathione on mechanical allodynia and central sensitization in chronic postischemic pain rats / J. Yeo, H. Jung, H. Lee // Pain Res. Manag. – 2017. – 2017. – P. 7394626. – DOI: 10.1155/2017/7394626.
17. Воронина Т. А. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Т. А. Воронина, Л. С. Гузеватых // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А. Н. Миронова. – М. : Гриф и К, 2012. – С. 197–219.
18. Бондаренко Д. А. In vivo модели для изучения анальгетической активности / Д. А. Бондаренко, И. А. Дьяченко, Д. И. Скобцов, А. Н. Мурашев // Биомедицина. – 2011. – № 2. – С. 84–94.
19. Небольсин В. Е. Фармацевтическая композиция, содержащая N-ацильные производные аминокислот, и их применение в качестве противоаллергических, антианафилактических и противовоспалительных средств : патент на изобретение RU 2406727 C2 / В. Е. Небольсин, Т. А. Кромова, Г. А. Желтухина, В. Л. Ковалева. – 20.12.2010. – Заявка № 2008105611/04 от 13.02.2008.
20. Le Bars D. Animal models of nociception / D. Le Bars, M. Gozariu, S. W. Cadden // Pharmacol. Rev. – 2001. – Vol. 53. – P. 597–652.
21. McNamara C. R. TRPA1 mediates formalin-induced pain / J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, № 33. – P. 13525–13530. – DOI: 10.1073/pnas.0705924104.

22. Hunskaar S. The formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics / S. Hunskaar, O. B. Fasmer, K. Hole // J. Neurosci. Methods. – 1985. – Vol. 14, No 1. – P. 69–76. – DOI: 10.1016/0165-0270(85)90116-5.
23. Иващенко А. С. Бальнеологическое применение лечебных грязей и рапы месторождений западного и восточного Крыма в санаторно-курортной практике / А. С. Иващенко, В. И. Мизин, В. В. Ежов [и др.] // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2018. – № 1. – С. 43–51.
24. Carrasco C. Neuropathic pain: delving into the oxidative origin and the possible implication of transient receptor potential channels / C. Carrasco, M. Naziroglu, A. B. Rodríguez, J. A. Pariente // Front. Physiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 95. – DOI: 10.3389/fphys.2018.00095.
25. Dawi J. Oxidative stress, glutathione insufficiency, and inflammatory pathways in type 2 diabetes mellitus: implications for therapeutic interventions / J. Dawi, Y. Misakyan, S. Affa [et al.] // Biomedicines. – 2025. – Vol. 13. – P. 18. – DOI: 10.3390/biomedicines13010018.
26. Singh M. The mechanism and inflammatory markers involved in the potential use of N-acetylcysteine in chronic pain management / M. Singh, A. Kim, A. Young [et al.] // Life. – 2024. – Vol. 14. – P. 1361. – DOI: 10.3390/life14111361.
27. Xu Z. The role of antioxidant therapy in modulating neuropathic pain: a systematic review of mechanistic insights and research trends (2003–2024) / Z. Xu, Z. Li, Y. Dong, Y. Chen, M. Li // Brain Circulation. – 2025. – Vol. 11, No 2. – P. 113–126. – DOI: 10.4103/bc.bc_72_24.
28. Kern J. K. A clinical trial of glutathione supplementation in autism spectrum disorders / J. K. Kern, D. A. Geier, M. R. Geier // Med. Sci. Monit. – 2011. – Vol. 17, No 12. – P. CR677–CR682. – DOI: 10.12659/MSM.882125.

ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF GLUTATHIONE IN COMBINATION WITH EXTRACT FROM THE SAKI LAKE MUD

Chuyan E. N.¹, Dzheldubaeva E. R.¹, Biryukova E. A.^{1,2}, Trukhanov A. I.³,
Dymova T. S.³, Mironyuk I. S.¹, Abkhairova E. S.¹, Abileva Z. S.¹

¹*Institute of Biochemical Technologies, Ecology and Pharmacy, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russia*

²*Scientific and Clinical Center «Health and Rehabilitation Technologies» V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russia*

³*Research Activity Center, Mriya Resort, Yalta, Republic of Crimea, Russia
E-mail: elena-chuyan@rambler.ru*

Chronic inflammation and pain syndromes require the search for safe agents with analgesic and anti-inflammatory properties. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a Saki Lake mud extract with glutathione in experimental animal models.

The experiment was carried out on 30 male Wistar rats divided into 3 groups: control (ointment base), Saki Lake mud extract, and Saki Lake mud extract with added glutathione. The tested substances were applied transdermally to the interscapular region once daily for 10 days. Analgesic activity was assessed using the hot plate test and tail-flick test, while the anti-inflammatory effect was evaluated in the formalin test by measuring paw volume using water plethysmometry and calculating edema increase and the therapeutic effect.

In the hot plate test, the latency of the pain response in the second group increased by 24.39 %, and in the third group by 58.54 % compared to the control. The inhibition of

pain response was 24.39 % and 58.54 %, respectively, indicating an enhancement of the analgesic effect with the addition of glutathione. In the tail-flick test, the latency period in the second group increased by 28.85 %, and in the third group by 65.68 % relative to the control; moreover, the composition provided an additional increase in pain response inhibition by 28.47 % compared to the mud extract alone.

In the formalin test, paw edema increase in control animals reached up to 427.47 %, reflecting a typical biphasic inflammatory reaction. In the second group, edema increase in the late phase was 20.9 % lower than in the control, confirming a moderate anti-inflammatory effect of the peloid. In the third group, the most pronounced suppression of inflammation was observed: compared with group 2, the decrease in edema increase reached 32.79 %, 33.5 % and 38.93 % at different time points.

Thus, glutathione in combination with Saki Lake mud extract exhibits marked analgesic activity and significantly enhances the anti-inflammatory effect of the peloid, reducing inflammatory edema growth by more than 50 % relative to the control and by approximately 35–40 % compared with the mud extract alone. The findings indicate that this composition is a promising candidate for further preclinical and clinical studies in the therapy of inflammation and pain syndromes.

Keywords: primary bioscreening, glutathione, Saki Lake mud extract, anti-inflammatory activity, pain sensitivity, algological tests, formalin test, plethysmometry.

References

1. Goldberg D. S., McGee S. J., Pain as a global public health priority, *BMC Public Health*, **11**, 770 (2011). DOI: 10.1186/1471-2458-11-770.
2. Mills S. E. E., Nicolson K. P., Smith B. H., Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies, *Br. J. Anaesth.*, **123**(2), e273–e283 (2019). DOI: 10.1016/j.bja.2019.03.023.
3. da Costa B. R., Pereira T. V., Saadat P., Rudnicki M., Iskander S. M., Bodmer N. S. et al., Effectiveness and safety of NSAIDs and opioid treatment for osteoarthritis: network meta-analysis, *BMJ*, **375**, n2321 (2021). DOI: 10.1136/bmj.n2321.
4. Bannister K., Sachau J., Baron R., Dickenson A. H., Neuropathic pain: mechanism-based therapeutics, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **60**, 257 (2020). DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021524.
5. Dyadyk A. I., Kugler T. E., Side effects of NSAIDs, *Consilium Medicum*, **19**(12), 94 (2017). DOI: 10.26442/2075-1753_19.12.94-99.
6. Fedotchenko A. A., *Balneotherapy and mud therapy: clinical guidelines*, 24 p. (RIO IGIUVA, Irkutsk, 2010).
7. Duryagina L. Kh., Degtyareva L. A., Dubrovina-Parus T. A., Zhuk N. V., Rationale for mud therapy in Crimea, *Vestnik Physiotherapy and Balneology*, **31**(1), 81 (2025).
8. Maraver F., Armijo F., Fernandez-Toran M. A., Armijo O., Ejeda J. M., Vazquez I. et al., Peloids as thermotherapeutic agents, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **18**(4), 1965 (2021). DOI: 10.3390/ijerph18041965.
9. Tognolo L., Coraci D., Fioravanti A., Tenti S., Scanu A., Magro G. et al., Clinical impact of balneotherapy in rheumatic diseases: a scoping review, *Appl. Sci.*, **12**(15), 7379 (2022). DOI: 10.3390/app12157379.
10. Kuznetsova M. Yu., Effects of Saki lake natural factors on immunoregulation in psoriasis, *Universum: Medicine & Pharmacology*, **11**(22) (2015). URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/27164>.
11. Poleshchuk O. Yu., Galkina O. P., Kaladze K. N., Dovbnya Zh. A., Kaliberdenko V. B., Tikhopoy N. N., Use of Saki mud extract in treatment of gingivitis in children, *Vestnik Physiotherapy and Balneology*, **1**, 58 (2023). DOI: 10.37279/2413-0478-2023-29-1-58-60.

12. Vergne-Salle R., Bertin P., Chronic pain and neuroinflammation, *Joint Bone Spine*, **88(6)**, 105222 (2021). DOI: 10.1016/j.jbspin.2021.105222.
13. Aquilano K., Baldelli S., Ciriolo M. R., Glutathione: new roles in redox signaling, *Front. Pharmacol.*, **5**, 196 (2014). DOI: 10.3389/fphar.2014.00196.
14. Forman H. J., Zhang H., Rinna A., Glutathione: protective roles and biosynthesis, *Mol. Aspects Med.*, **30**(1–2), 1 (2009). DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
15. Wu G., Lupton J. R., Turner N. D., Fang Y.-Z., Yang S., Yang S., Glutathione metabolism and health, *J. Nutr.*, **134(3)**, 489 (2004). DOI: 10.1093/jn/134.3.489.
16. Yeo J., Jung H., Lee H., Effects of glutathione in chronic postischemic pain rats, *Pain Res. Manag.*, **17**, 7394626 (2017). DOI: 10.1155/2017/7394626.
17. Voronina T. A., Guzeyatykh L. S., Guidelines for evaluating analgesic activity, in: Mironov A.N. (ed.), *Preclinical drug research manual*, (Grif & K, Moscow, 2012), pp. 197–219.
18. Bondarenko D. A., Dyachenko I. A., Skobtsov D. I., Murashev A. N., In vivo models for analgesic testing, *Biomeditsina*, **2**, 84 (2011).
19. Nebolsin V. E., Kromova T. A., Zheltukhina G. A., Kovaleva V. L., *Pharmaceutical composition containing N-acyl amino acid derivatives*: Patent RU 2406727 C2 (2010). Filed 13.02.2008.
20. Le Bars D., Gozariu M., Cadden S. W., Animal models of nociception, *Pharmacol. Rev.*, **53**, 597 (2001).
21. McNamara C. R., Mandel-Brehm J., Bautista D. M. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 33, 13525 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0705924104.
22. Hunskaar S., Fasmer O. B., Hole K., The formalin test in mice, *J. Neurosci. Methods*, **14(1)**, 69 (1985). DOI: 10.1016/0165-0270(85)90116-5.
23. Ivashchenko A. S., Mizin V. I., Ezhov V. V., Vasenko V. I., Chaban V. V., Stankevich D. A., Balneological use of Saki mud and brine, *Vestnik Physiotherapy and Balneology*, **1**, 43 (2018).
24. Carrasco C., Naziroğlu M., Rodríguez A. B., Pariente J. A., Neuropathic pain and oxidative mechanisms, *Front. Physiol.*, **9**, 95 (2018). DOI: 10.3389/fphys.2018.00095.
25. Dawi J., Misakyan Y., Affa S. et al., Oxidative stress and glutathione insufficiency in type 2 diabetes, *Biomedicines*, **13**, 18 (2025). DOI: 10.3390/biomedicines13010018.
26. Singh M., Kim A., Young A. et al., N-acetylcysteine in chronic pain management, *Life*, **14**, 1361 (2024). DOI: 10.3390/life14111361.
27. Xu Z., Li Z., Dong Y., Chen Y., Li M., Antioxidant therapy in neuropathic pain: systematic review, *Brain Circulation*, **11(2)**, 113 (2025). DOI: 10.4103/bc.bc_72_24.
28. Kern J. K., Geier D. A., Geier M. R., Glutathione supplementation in autism spectrum disorders, *Med. Sci. Monit.*, **17(12)**, CR677 (2011). DOI: 10.12659/MSM.882125.