УДК 619:616.62-002.1

DOI: 10.31279/2222-9345-2019-8-33-39-45

И. С. Коба, Е. Н. Новикова, Е. А. Иванова, А. О. Яновская, С. П. Складар

Koba I. S., Novikova E. N., Ivanova E. A., Yanovskaya A. O., Sklyarov S. P.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ ХЕЛАТА ЦИНКА, РАЗРАБАТЫВАЕМОГО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МАСТИТА У КОРОВ

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF GEL ON THE BASIS OF CHELATE OF ZINC OF THE MASTITIS DEVELOPED FOR TREATMENT AT COWS

При разработке гелей и кремов, предназначенных для лечения мастита у коров, одним из важных показателей является противовоспалительная активность разрабатываемого препарата. Нами было проведено данное исследование на 60 белых крысах массой 150–180 г. Опыт проводился в двух сериях. В первой серии опыта крысам вводили под плантарный апоневроз задней лапки 4 % раствор формалина, во второй серии – 2 % раствор, тем самым вызывая острый воспалительный процесс в области инъекции. В дальнейшем животных лечили, обрабатывая вызванный отек в опытной группе экспериментальным гелем, а в контрольной – кремом Долгит. В результате систематических обработок отмечали снижение и полное прекращение экссудации. Также регистрировали уменьшение отека. У животных контрольной группы улучшение отмечали у 20 % животных, а в опытной – у 30 %.

Следует отметить, что животные опытной группы выздоравливали к третьему дню лечения, а в группе контроля выздоровление наступало к четвертым суткам терапии. Проведенные гистологические исследования подтвердили, что гель на основе хелата цинка тормозит экссудацию при остром воспалении, вызванном формалином, при этом уменьшает болевой рефлекс.

Ключевые слова: мастит, гель против мастита, доклинические исследования, отек, формалиновый отек, хелат цинка.

Коба Игорь Сергеевич –
доктор ветеринарных наук,
заведующий кафедрой терапии и фармакологии
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
аграрный университет им. И. Т. Трубилина»
г. Краснодар
Тел.: 8 (861) 221-58-20
E-mail: terap-farm@kubsau.ru

Новикова Елена Николаевна –
кандидат ветеринарных наук,
старший преподаватель кафедры терапии
и фармакологии
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
аграрный университет им. И. Т. Трубилина»
г. Краснодар
E-mail: terap-farm@kubsau.ru
старший научный сотрудник отдела терапии
и акушерства
ФГБНУ «Краснодарский научно-исследовательский
ветеринарный институт»
г. Краснодар
Тел.: 8(861)221-62-20
E-mail: krasnodarnivi@mail.ru

Яновская Анна Олеговна –
аспирант кафедры терапии

When developing the gels and creams intended for treatment of mastitis at cows, one of important indicators is the anti-inflammatory activity of the developed medicine. They conducted this research on 60 white rats weighing 150–180 g. Experiment was made in two series. In the first series of experience to rats entered under a plantar aponeurosis of a back pad 4 % formalin solution, in the second series of 2 % solution thereby causing sharp inflammatory process in the field of an injection. Further animals were treated, processing the caused hypostasis in skilled group experimental gel, and in control cream Dolgit. As a result of systematic processings noted decrease and complete cessation of an exsudation. Also registered reduction of hypostasis. At animals of control group improvement was noted at 20 % of animals, and in skilled at 30 %.

It should be noted that animals of skilled group recovered by third day to treatment, and in group of control recovery occurred by fourth day of therapy. The conducted histologic researches confirmed that gel on the basis of chelate of zinc brakes an exsudation at the acute inflammation caused by formalin at the same time reduces a painful reflex. On the basis of the received researches. By us it was established that gel on the basis of chelate of zinc brakes exudation at the acute inflammation provoked by formalin. In connection with decrease in inflammatory process there is a reduction of pain reaction at rats which is shown in behavioural reaction. Gel on the basis of chelate of zinc has antiinflammatory and well-marked regeneration property.

Key words: mastitis, gel against mastitis, preclinical researches, hypostasis, formalin hypostasis, zinc chelate.

Koba Igor Sergeevich –
Doctor of Veterinary Sciences,
Head of the Department of Therapy and Pharmacology
FSBEI HE «Kuban State Agrarian University
named after I. T. Trubilin»
Krasnodar
Tel.: 8(861)221-58-20
E-mail: terap-farm@kubsau.ru

Novikova Elena Nikolaevna –
Ph.D of Veterinary Sciences,
Senior Teacher of the Department
of Therapy and Pharmacology
FSBEI HE «Kuban State Agrarian University
named after I. T. Trubilin»
Krasnodar
E-mail: terap-farm@kubsau.ru
Senior Research of the Department
of Therapy and Obstetrics
FSBSI «Krasnodar Research Veterinary Institute»
Krasnodar
Tel.: 8(861)221-62-20
E-mail: krasnodarnivi@mail.ru

Yanovskaya Anna Olegovna –
Postgraduate Student of the Department

и фармакологии
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
аграрный университет им. И. Т. Трубилина»
г. Краснодар
Тел.: 8(861)221-58-20
E-mail: terap-farm@kubsau.ru

Иванова Евгения Анатольевна –
аспирант кафедры терапии и фармакологии
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
аграрный университет
имени И. Т. Трубилина»
г. Краснодар
Тел.: 8(861)221-58-20
E-mail: terap-farm@kubsau.ru

Скляр Сергей Павлович –
кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры
паразитологии, ветеринарно-санитарной экспертизы,
анатомии и патанатомии
им. профессора С. Н. Никольского
ФГБОУ ВО «Ставропольский
государственный аграрный университет»
г. Ставрополь
Тел.: 8(8652)28-67-38
E-mail: ssklyar@mail.ru

of Therapy and Pharmacology
FSBEI HE «Kuban State Agrarian University
named after I. T. Trubilin»
Krasnodar
Тел.: 8(861)221-58-20
E-mail: terap-farm@kubsau.ru

Ivanova Evgenia Anatolyevna –
Postgraduate Student of the Department
of Therapy and Pharmacology
FSBEI HE «Kuban State Agrarian University
named after I. T. Trubilin»
Krasnodar
Тел.: 8(861)221-58-20
E-mail: terap-farm@kubsau.ru

Sklyarov Sergey Pavlovich –
Ph.D. of Veterinary Sciences, Associate Professor
of the Department of Parasitology, Veterinary
and Sanitary Examination, Anatomy and Pathological
Anatomy named after Professor S. N. Nikolsky
FSBEI HE «Stavropol State Agrarian University»
Stavropol
Тел.: 8(8652)28-67-38
E-mail: ssklyar@mail.ru

В настоящее время существует значительное количество препаратов для лечения маститов, некоторые из них имеют одно действующее antimicrobное вещество, другие комплекс, но все они содержат в своем составе антибиотики. При этом длительное применение антибиотиков ведет к снижению лечебного эффекта и образованию к ним резистентных видов микроорганизмов. Микроорганизмы, вызывающие маститы, способны формировать защитные биопленки на поверхности слизистых оболочек цистерны, показывая при этом выживаемость в присутствии антибиотиков в концентрации в 5000 раз больше, чем МПК. При действии антисептиков на биопленку происходит ее уменьшение [1].

Современной ветеринарной фармацевтической индустрией выпускаются противомаститные препараты, в качестве действующих веществ которых используют антисептики. К таким препаратам относят Септогель, Хеносидин, Антимаст. Однако использование антисептиков не всегда приводит к желаемому результату в лечении. Поэтому для решения проблемы мастита очень важно создание новых высокоэффективных препаратов без применения антибиотиков, но на основе нетоксичного antimicrobного препарата широкого спектра действия, резистентность микроорганизмов к которому не сформирована [2].

Целью данного исследования являлось определение специфической противовоспалительной активности геля на основе хелатных соединений цинка на экспериментальной модели формалин-индуцированного артрита у крыс.

Изучение специфической противовоспалительной активности препарата на основе хелатных соединений цинка проводили на модели острого воспаления: формалиновый артрит. Острые воспалительные реакции вызывали у 60

белых крыс-самцов и самок массой 150–180 г однократным введением под плантарный апо-нефроз задней лапки в двух сериях опыта 4 % и 2 % раствора формалина [3]. Подопытных животных содержали в условиях вивария (с естественным режимом освещения; при температуре 22–24 °С; относительной влажности воздуха 40–50 %) с использованием стандартной диеты (ГОСТ Р 50258–92) [4]. В первой серии опытов у 30 крыс субплантарным введением в заднюю правую лапу крысы 0,1 мл 4 % водного раствора формалина вызывали острый воспалительный отек. Выраженность отека оценивали, измеряя толщину лапки подопытного животного с помощью штангенциркуля до и через 4, 12 часов, а также в динамике через 24 и 48 часов после введения раствора формалина. Противовоспалительную активность исследуемых соединений выражали в процентах угнетения отека.

Через 24 часа после манипуляции крысам контрольной группы ежедневно в области правого предплюсневой сустава наносили крем «Долгит» (действующее вещество – ибупрофен, группа: противовоспалительные нестероидные препараты). В опытной группе крысам ежедневно наносили опытный гель. Учитывали общее состояние животного, величину отека, болезненность и эритему в области сустава, наличие аллопеций, некроза и дерматита в месте инъекции. Во 2-й контрольной группе крысы служили в качестве фонового контроля, манипуляции с этими животными не проводились. Через 7 дней после инъекции формалина крысы были подвергнуты эвтаназии и проведена экзартикуляция в голенопредплюсневом суставе и гистологическое исследование голенопредплюсневых суставов.

Величину отека измеряли онкометрически, процент угнетения отека рассчитывали по формуле

$$\% = (V_k / V_o - 1) \times 100,$$

где V_0 – разность между начальным объемом конечности и ее объемом во время замера в экспериментальной группе;
 V_k – аналогичная разность в контрольной группе [5, 6].

Оценка результатов проводилась на основании следующих данных:

- Оценка противоотечного действия с помощью измерения диаметра коленного сустава штангенциркулем или микрометром.
- Ноцицептивное поведение количественно оценивается по 4-балльной системе (от 0 до 4) следующим образом:
 - 0 = лапа, поврежденная формалином, остается прижатой к поверхности и держит вес животного;
 - 1 = животное перемещает вес на здоровую лапу;
 - 2 = животное поднимает лапу, поврежденную формалином (отсутствует соприкосновение с поверхностью);
 - 3 = животное облизывает, кусает или колеблет лапу, поврежденную формалином;
 - 4 = животное подпрыгивает на пластине.

Через 10 дней по 3 крысы из каждой группы подвергались эвтаназии ингаляцией CO_2 . Сразу же после эвтаназирования проводилась экзартикуляция в голенопредплюсневом суставе и гистологическое исследование голенопредплюсневых суставов.

Вторую серию опытов проводили аналогично на 30 крысах субплантарным введением (под подошвенный апоневроз) в заднюю правую лапу крысы 0,1 мл 2 % водного раствора формалина. Учитывали общее состояние животного, величину отека, болезненность и эритему в области сустава, наличие аллопечий, некроза и дерматита в месте инъекции. В 3-й контрольной группе (отрицательный контроль) лечение не проводили. Животных опытных и первой контрольной групп лечили до клинического выздоровления. Через 2 дня после выздоровления крысы были подвергнуты эвтаназии, у них была взята кровь из сердца для биохимического, гематологического анализа, были сделаны рентгенологические снимки, затем проводилась экзартикуляция в голенопредплюсневом суставе и гистологическое исследование голенопредплюсневых суставов.

У всех крыс голенопредплюсневые суставы отделяли однотипно. Затем проводили фиксацию в 10 % растворе нейтрального формалина в течение 3 дней. Далее материал подвергали декальцинации азотной кислотой, которую в дальнейшем нейтрализовали 5 % раствором алюмо-калиевых квасцов и тщательно промывали в проточной воде в течение суток. После этого проводили обезвоживание в спиртах нарастающей концентрации от 40 до 96 %. Декальцинацию и проводку осуществляли

по общепринятой в патогистологии методике по Г. А. Меркулову (1969).

Уплотнение материала проводили парафином в термостате при постоянной температуре 57 °С. Заливку материала осуществляли в парафин, препарат располагали в боковом положении. Затем готовили парафиновые блоки. После этого при помощи санного микротомы МС-2 изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм. Готовые срезы наклеивали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином. Всего было изготовлено 40 парафиновых блоков и 200 микропрепаратов, по 5 микропрепаратов с каждого блока.

Патоморфологические исследования проводили на кафедре анатомии, ветеринарного акушерства и хирургии Кубанского ГАУ под руководством доктора ветеринарных наук, доцента В. М. Кравченко.

В первой серии опыта анализ проведенных исследований показал, что объем конечности после экспериментально вызванного формалинового отека у крыс через 4–6 часов – увеличивался в 1,25 раза, а спустя 48 часов – в 1,5 раза, что на 38 % больше по сравнению с нормой. Далее у крыс, подвергшихся лечению, экссудация прекращалась, и отек спадал постепенно по мере систематических обработок гелем и контрольным кремом, однако у 50 % крыс опытных и контрольных групп наблюдались аллопечии и очаги некроза на месте инъекции. Общее состояние крыс группы отрицательного контроля в первые 2 дня было удовлетворительное, на третий день состояние животных ухудшилось, отмечалась хромота, апатия, снижение аппетита. На 5 сутки две крысы пали. Состояние остальных крыс было стабильно тяжелое.

На 3–4 сутки лечения у животных опытной и контрольной группы отмечали улучшение общего состояния. У 30 % животных опытной группы и 20 % контрольной группы (крем «Долгит») спадал отек и визуально не отмечали признаков некроза тканей. Через 7 дней обработок опытным и контрольным препаратами у этих животных клинических проявлений воспаления не отмечали. Животные хорошо потребляли корм, воду, были активны и доминировали в своей группе. У остальных животных опытных и контрольной (крем «Долгит») групп общее состояние было заметно лучше, чем у крыс отрицательного контроля, крысы имели хороший аппетит, однако в месте инъекции формалина регистрировали некроз окружающих тканей, что может быть связано с высокой концентрацией формалина и в связи с этим недостаточным проведением местной терапии.

При патоморфологическом исследовании тканей контрольной группы (крем «Долгит») крыс во всех структурных компонентах выявляли различные морфологические изменения.

В месте введения формалина отмечали некроз эпидермиса, дермы, мышечной и костной ткани (рис. 1, 2).

По периферии места введения формалина процессы репаративной регенерации не выявлены.

При патоморфологическом исследовании тканей конечностей 3 опытной группы крыс отмечали аналогичные морфологические нарушения структуры кожи и подлежащих под ней тканей, как у тканей конечностей контрольной группы животных (крем «Долгит»).

Однако альтеративные изменения сопровождались отчетливыми процессами репаративной регенерации как со стороны мышечной, так и со стороны костной ткани. По периферии мышечной и соединительной ткани, подвергшейся некрозу, были хорошо обозначены различной величины пролифераты, состоящие из грануляционной и жировой ткани (рис. 3). Кроме того, в самой костной ткани, подвергшейся разрушению, формировались участки, состоящие из молодых клеток костной ткани (рис. 4).

Во второй серии опытов было установлено, что у крыс, которым наносили гель, отек полностью спадал на 3 день, а у крыс, обработанных кремом «Долгит», на 4 день (табл.). Стоит отметить, что на 3 день обработок отечность у всех

обработанных крыс спала, и лапы по диаметру не отличались от контрольных, у которых формалиновый отек не вызывали. В результате расчетов процент отека в первый день лечения в опытной и контрольной (крем «Долгит») группах составлял 47–49 %, а через 3–4 дня – 0 %.

Таким образом, гели на основе хелата цинка тормозят экссудацию при остром воспалении, спровоцированном формалином (рис. 5).

Ноцицептивное поведение крыс через 4, 6 часов после введения 2 % раствора формалина оценивалось в 2 балла, через 24 и 48 часов крысы облизывали, кусали лапы, поврежденные формалином, что соответствует 3 баллам четырехбалльной системы оценки ноцицептивного поведения. Однако через 2 дня ежедневных обработок гелем и кремом «Долгит» животные перемещали вес на здоровую лапу (1 балл), а через 3 дня лапа, поврежденная формалином, оставалась прижатой к поверхности и держала вес животного (0 баллов). Таким образом, в связи со снижением воспалительного процесса происходило уменьшение болевой реакции у крыс, которая проявлялась в поведенческой реакции.

Рисунок 1 – Некроз дермы и мышечной ткани у крысы 3 опытной группы в области введения формалина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$

Рисунок 2 – Разрушение костной ткани и некроз соединительной ткани в области введения формалина у крысы 3 опытной группы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$

Рисунок 3 – Проллифераты из грануляционной и жировой ткани в области некроза дермы и мышечной ткани у крысы 3 опытной группы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$

Рисунок 4 – Островки вновь образованной костной ткани на месте разрушенной у крысы 3 опытной группы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 150$

Таблица – Изменение диаметра сустава во время обработок кремом «Долгит» и гелем на основе хелатных соединений цинка при формалиновом отеке 2 % раствором формалина, мм ($M \pm m$)

Дни обработки	Гель на основе хелата цинка	Крем «Долгит»	Контроль
1	$5,6 \pm 0,245$	$5,8 \pm 0,192$	$4,26 \pm 0,108$
2	$5,44 \pm 0,024$	$5,46 \pm 0,166$	$4,26 \pm 0,108$
3	$4,9 \pm 0,341$	$5,06 \pm 0,275$	$4,32 \pm 0,102$
4	$4,5 \pm 0,35$	$4,8 \pm 0,19$	$4,32 \pm 0,102$

Рисунок 5 – Графики появления и снижения отека в контрольных и опытных группах

При патоморфологическом исследовании у всех животных фонового контроля изменений структуры тканей не выявлено.

В коже хорошо определялись ее структурные компоненты: эпидермис и дерма. Под кожей располагалась подкожная клетчатка, представленная жировой тканью. В эпидермисе хорошо выделялись все пять слоев: роговой, блестящий, зернистый, шиповатый и базальный. Дерма была представлена рыхлой соединительной тканью. В ней хорошо определялись сосочковый и сетчатый слои. Железистый аппарат кожи был представлен сальными и потовыми железами,

которые располагались в сосочковом и сетчатом слоях дермы.

Под подкожной жировой клетчаткой располагалась поперечнополосатая мышечная ткань, которая морфологических изменений структуры не имела. Мышечная ткань была представлена различной толщины мышечными пучками, состоящими из поперечнополосатых мышечных волокон, идущими в различных направлениях. Мышечные пучки были разделены тонкими прослойками из рыхлой соединительной ткани (рис. 6). Капсула, полость сустава и кости, формирующей сустав, изменений в своей структуре не имели (рис. 7).

Рисунок 6 – Мышечная, костная, хрящевая и соединительная ткань у крысы фонового контроля

Рисунок 7 – Сустав крысы фонового контроля

Рисунок 8 – Воспалительный очаг фиброзной ткани

Рисунок 9 – Воспалительный очаг хрящевой ткани

При патоморфологическом исследовании тканей крыс отрицательного контроля выявлены различные морфологические нарушения.

При патоморфологическом исследовании тканей контрольной группы (крем «Долгит») крыс во всех структурных компонентах выявляли различные морфологические изменения.

В месте введения формалина отмечали некроз эпидермиса, дермы, мышечной и костной тканей. По периферии места введения формалина процессы репаративной регенерации не выявлены. Выявлена неоднородность окрашивания костной ткани, имеются небольшие некротические очаги, а также воспалительный очаг фибринозной и хрящевой тканей, а также имеется хрящевой компонент с лизисом верхнего слоя (изменение цвета на более коричневый и утрата клеточной дифференциации) (рис. 8, 9).

В опытной группе у 33 % крыс отмечали, что гиалиновый хрящ не имеет надхрящницы, выделяется неоднородность окрашивания костной ткани. Имеется воспалительный очаг хрящевой ткани. У 67 % крыс патологических изменений не обнаружено.

Таким образом, на основании полученных нами результатов можно сделать следующие выводы.

Гель на основе хелата цинка тормозит экссудацию при остром воспалении, спровоцированном формалином. В связи со снижением воспалительного процесса происходит уменьшение болевой реакции у крыс, которая проявляется в поведенческой реакции. Гель на основе хелата цинка обладает противовоспалительным и хорошо выраженным регенерационным свойством.

Крем «Долгит» обладает противовоспалительным и не обладает регенерационным свойством.

Литература

1. Domenjoz R. Pharmacological evaluation of anti-inflammatory agents, a contribution to the pharmacology of phenylbutazone // Ann. Univ. Saraviensis Med. 1953. № 1. P. 317–325.
2. Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals // Biometals. 2009. № 22(1), Feb. P. 149–157.
3. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М. : Медицина, 2005. 832 с.
4. ГОСТ Р 50258–92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. URL: <http://gost.donses.ru/Data/280/28067.pdf> (дата обращения: 03.06.2018).
5. Казаишвили Ю. Г., Попов Н. С. Исследо-

References

1. Domenjoz R. Pharmacological evaluation of anti-inflammatory agents, a contribution to the pharmacology of phenylbutazone // Ann. Univ. Saraviensis Med. 1953. № 1. P. 317–325.
2. Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals // Biometals. 2009. № 22(1), Feb. P. 149–157.
3. Khabriev R. U. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Edition 2, revised and expanded. M. : Medicine, 2005. 832 p.
4. GOST R 50258-92: Complete feed for laboratory animals. URL: <http://gost.donses.ru/Data/280/28067.pdf> (date of access: 03.06.2018).
5. Kazaishvili Yu. G., Popov N. S. Study of the anti-inflammatory activity of new thiadiazole

- вание противовоспалительной активности новых производных тиадиазола при формалиновом отеке лапы у крыс // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 3. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=9598> (дата обращения: 07.06.2018).
6. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники. Л. : Медицина, 1969. 423 с.
- derivatives with formalin paw edema in rats // Modern problems of science and education. 2013. № 3. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=9598> (date of access: 07.06.2018).
6. Merkulov G. A. Course histopathological technique. L. : Medicine, 1969. 423 p.