***Содержание***

Введение

1. Компоненты мази

2. Материалы и методы

2.1 Лабораторные животные

2.2 Острая кожная токсичность

2.3 Выбор дозы препарата

2.4 Изучение ранозаживляющей активности

Иссеченная модель раны

Рассеченная модель раны

Модель ожога

2.5 Изучение противовоспалительной активности на модели отека лапы у крыс

2.6 Изучение грануляционной ткани

2.7 Артрит, индуцированный формалином

2.8 Изучение ульцерогенного действия

2.9 Гистологическое исследование

2.10 Статистический анализ

Заключение

Список литературы

***Резюме***

В настоящее время травматизм животных очень распространен, особенно среди мелких домашних. Не последнее место среди травм у животных занимают различные раны, требующие вмешательства ветеринарных хирургов. Наиболее часто встречаются раны резаные, укушенные и др.

Поиск новых, эффективных средств борьбы с раневой инфекцией, ускоряющих заживление ран, является одним из решений проблемы хирургической инфекции. Актуальным является поиск новых фармакологических субстанций, обладающих антимикробными свойствами широкого спектра действия против микроорганизмов, а также стимулирующими регенерацию клеток с минимальными побочными эффектами.

Одним из перспективных препаратов в этом направлении является изучаемая нами мазь, которая содержит в своем составе левомицетин, стрептоцид, метилурацил, тримекаин и аллантоин. Левомицетин и стрептоцид являются антибактериальными препаратами различной природы и обладают широким спектром действия, метилурацил и аллантоин активно стимулируют клеточную регенерацию, а тримекаин способствует местному обезболиванию. Таким образом, разработка новых ранозаживляющих и антибактериальных мазей, а также изучение их фармако-токсикологических свойств, является актуальными задачами ветеринарной медицины.

В данном обзоре будут описаны актуальность представленной темы, свойства некоторых компонентов мази и наиболее распространенные материалы и методы для доклинического изучения ранозаживляющей активности новых лекарственных препаратов.

# ***Введение***

Рана может быть определена как потеря или разрушение клеточного и анатомического или функциональной непрерывности живой ткани. Это часто встречаемая проблема в клинической практике. Заживление ран относится к естественным процессам тела для восстановления архитектуры и функции ткани после травмы. Оно включает в себя воспаление, клеточную пролиферацию, и сокращение образования коллагеновой решетки. На основе этиологии, раны могут быть широко классифицированы в острой или хронической форме, включая хирургические раны, травматической раны, рваные раны, резаные, ссадины, ушибы, язвы, ожоги и т.д.

Лечение раны обычно включает профилактику инфекции, поскольку кожа, являющаяся барьером организма, предотвращающим попадание инфекции, при ранении уничтожается. Ожоговые раны требуют лечения в соответствии с тяжесть ожога. Незначительные ожоги, как правило, лечатся с мазями и повязками, а тяжелые ожоги нуждаются в немедленной медицинской помощи и госпитализации.

Неправильная обработка раны может задержать ее излечение, в результате чего разовьется хроническая рана. Противомикробные мази такие как сульфадиазин серебра, мафинид, нитрат серебра, повидон-йод, мупироцин и бацитрацина, используются для уменьшения риска заражения при незначительных порезах и ожогах. Тем не менее, Эти актуальные противомикробные препараты имеют ряд побочных эффектов и только частично эффективны в лечении ран.

Следовательно, существует потребность в более новых препаратах, чтобы лечить раны.

С древних времен использовались растения для лечения различных заболеваний кожи, особенно порезов, ран, ожогов. В настоящее время, в странах востока и Азии ведется большая работа по разработке ранозаживляющих и антибактериальных препаратов на основе растительных компонентов. Скорее всего, это связано с тем, что по данным исследователей на 2011год 80% населения развивающихся стран не в состоянии позволить себе лекарственные препараты и полагаться на традиционные лекарственные травы для оказания первичной медико-санитарной помощи.

При создании лекарств на основе растений активно используется метод газо-жидкостной хроматографии позволяющий выделить компоненты, перспективные для лечения ран.

Целью любого доклинического исследования новых ранозаживляющих и антибактериальных препаратов является изучение их активности в сравнении со схожими препаратами или с группой контроля на моделях различных ран или воспалительных процессов.

# ***1. Компоненты мази***

В состав изучаемой мази входят два антибактериальных компонента - это левомицетин (хлорамфеникол) и стрептоцид (группа сульфаниламидов).

Хлорамфеникол является антибиотиком широкого спектра бактериостатического действия против многих Грам-положительных и Грам-отрицательных бактерий, а также хламидии, риккетсии и микоплазмы. Левомицетин широко используется для лечения ран, а также поверхностных глазные инфекции и, из-за его низкой стоимости и признается эффективным. Он является одним из наиболее популярных антибиотиков не только на территории РФ. Механизм его действия известен и заключается в ингибировании пептидилтрансферазы, РНК фермента, который катализирует образование пептидной связи между соседними аминокислоты во время белкового синтеза. Хотя молекула хлорамфеникола весьма мала (ММ = 323,13 Da) и достаточно стабильна при обычных условиях хранения, присутствие фрагмента нитробензола делает это соединение почти растворимым в воде. В результате гидрофильные пролекарства (например, левомицетин натрия сукцината и левомицетин пальмитат) или масляные средства, как правило, используются для приготовления фармацевтических композиций.

Однако данные литературы утверждают, что комплексы хлорамфеникола с β-циклодекстринами достаточно сильны, чтобы повысить растворимость левомицетина в водной среде, но не так сильны, чтобы оказать вредное воздействие на его активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Сульфаниламиды были первыми препаратами, которые стали использоваться в качестве химиотерапевтических агентов против различных заболеваний. Применяются как антигипертензивные агенты, антибактериальные, антипротозойные, противогрибковые, противовоспалительные, не пептидные антагонисты рецептора вазопрессина и др. Некоторые важные производные сульфонамидов используются в качестве ингибиторов карбоангидразы. Они также эффективны для лечения недержания, кишечных патологий и офтальмологических инфекций, ожогов, язвенных колитов, ревматоидных артритов.

Сульфаниламиды - это соединения, имеющие общую структуру. На сегодняшний день было синтезировано более двадцати тысяч производных сульфаниламидов. Эти синтезы привели к открытию новых соединений с различными фармакологическими свойствами.

Алифатические сульфаниламиды имеют высокое мощное антибактериальное действие против Грам-отрицательных бактерии, чем против Грам-положительных.

раневая инфекция мазь ранозаживляющая

# ***2. Материалы и методы***

Эксперимент является незаменимой и основополагающей составляющей данной работы. В литературе описан широкий выбор методик, в связи с чем выбор из них наиболее современных и их тщательный разбор позволит правильно поставить опыт и получить наиболее достоверные данные.

# ***2.1 Лабораторные животные***

Обычно в подобного рода исследованиях используют крыс весом от 150 до 300 г. Крыс содержат в клетках с идентификационным номером, при температуре 25 ± 1°С, доступ к коммерческому рациону (гранулы) свободный, вода вволю. Перед проведением эксперимента животные проходят карантин в течение 7-14 дней для акклиматизации и выявления клинически здоровых особей. Любые опыты должны проводиться в соответствии с конвенцией по использованию лабораторных животных в эксперименте. Все внимание уделяется минимизации страданий животных. Животных случайным образом разделяют на группы в зависимости от типа эксперимента и предстоящих обработок.

# ***.2 Острая кожная токсичность***

Исследование острой кожной токсичности осуществляется крысах по методу "исправление дозы" ОЭСР (Организация экономического сотрудничества и разработки) Руководство No.434. Препарат наносят местно в высокой дозе с повышением. Критериями служат зуд и покраснение.

# ***2.3 Выбор дозы препарата***

Для оценки ранозаживляющей активности препарата, уровень дозы выбирают таким образом, что бы доза составляла примерно 1/10 максимальной дозы при исследовании острой токсичности.

# ***.4 Изучение ранозаживляющей активности***

Данный опыт является основополагающим доклиническим исследованием для данного рода препаратов. При этом оценивается скорость регенераторных процессов под влиянием мази и без нее. Полученные данные сопоставляются и должны иметь статистически достоверную разницу. Только в таком случае препарат будет считаться эффективным.

# ***Иссеченная модель раны***

Некоторые авторы для нанесения ран используют методику Мортона и Малона. Крыс анестезируют путем введения кетамина (0,5 мл / кг внутрибрюшинно) или любым другим доступным и разрешенным в стране препаратом для общего наркоза животных. Шерсть животного на спине выбривают электрической машинкой. Область раны, создаётся следующим образом: к спине животных прикладывают круговой трафарет из нержавеющей стали, смоченный метиленовым синим. Полная окружность вырезания раны 2,5 см в ширину (площадь = 4,90 см2) и глубина 0,2 см создаётся по отмеченным меткам с помощью зубчатого пинцета, хирургического скальпеля и ножниц. Вся рана остается открытой. День создания раны считают 0. Обработки ран животным начинают на следующий день и продолжают в течение 14 дней или до заживления.

Исследуемые параметры: закрытие раны, время эпителизации, содержание коллагена и вес ткани. Измерения раневых площадей проводят каждый день или через определенные интервалы, используя прозрачную бумагу и водоустойчивый маркер. Зарисованные области раны измеряют на миллиметровой бумаге. Период эпителизации рассчитывают как количество дней, необходимых для отпадения мертвых остатков ткани без каких-либо остатков сырой раны.

Скорость ранозаживления рассчитывают по формуле:

% от закрытия раны раны = [ (площадь на день 0 - площадь области на день N) × 100] / площадь на день 0. Где N = количество дней.

# ***Рассеченная модель раны***

Крыс анестезируют до и во время создания ран как описано выше. Шерсть животных на спине выбривают электрической машинкой. Делают продольный паравертебральный разрез стерильным скальпелем длиной 6 см через кожу и ткани спине, как описано Эрлихом и Хантом. После разреза, зашивают кожу с интервалами между швами в 1 см (или 0,5 мм) друг от друга с помощью хирургической нити и иглы изогнутой и иглодержателя. День моделирования раны считался как день 0. Препараты наносят местно на раны раз в день. Швы снимают на 8-й постоперационный день и продолжают применение препарата. Эластичность рубца измеряют методом Ли на 10-й день вечером после последнего нанесения. Это вес в граммах, который требуется, чтобы разорвать рубец. Измерение проводится с помощью тензиометра. Прочность при растяжении рассчитывается по следующей формуле Прочность на растяжение = прочность на разрыв (г) / площадь поперечного сечения кожи (мм2).

# ***Модель ожога***

Используется метод, описанный Somboonwong др., который был модифицирован Заваски. Животных анестезируют внутрибрюшинной инъекцией пентобарбитала натрия (60 мг / кг массы тела) для индукции раны. Спина животного между нижними частями обеих лопаток выбривается. Далее, на подготовленную поверхность в течение 10 с прикладывают плитку (3,5 × 4,6 см) при температуре 75°С и на неполную толщину выжигают кожу. Сожженая область составляет около 10% от общей площади поверхности тела. После моделирования ожога, 0,5 мл испытуемых веществ местно наносятся для раневую область один раз в день. Сожженный район измеряется сразу после ожога и на 3, 7, 10 и 14 дни после ожоговой травмы с помощью миллиметровой бумаги. На 14-й день после ожога, животных умерщвляют с помощью интраперитонеальной инъекции натрия фенобарбитала в дозе 100 мг / кг массы тела. Ткань раны (0,5 × 0,5 см), вырезают у каждого животного для гистологического исследования.

# ***.5 Изучение противовоспалительной активности на модели отека лапы у крыс***

Экспериментальные группы мышей или крыс обрабатывают изучаемым препаратом и лекарствами сравнения. Через 60 мин после перорально лечения или 30 мин после подкожной инъекции животным инъецируют 3% формалин (20 мкл) в правую заднюю лапу.

После инъекции воспалительного агента, животное помещают в акриловую коробку, с зеркалом под уклоном на 45° для облегчения наблюдения. Время реакции боли (время облизывания лапы) наблюдается в двух периодах, 0-5 мин (нейрогенная боль) и 15-30 мин (воспалительное боль).

# ***.6 Изучение грануляционной ткани***

Это исследование проводится, как описано Исмаил и др. (1997). Стерильный ватный тампон весом 30 мг имплантируют подкожно в паховую область крыс, после чего группы животных обрабатывают (один раз в день) с различными дозировками препарата, а также лекарствами из группы сравнения, контрольную группу обрабатывают физиологическим раствором. Животных умерщвляют на 8-й день высокой дозой диэтилового эфира. После этого гранулы, окруженные грануляцтонной тканью иссекают и тщательно сушат в сушильном шкафу при температуре 60° С до постоянного веса. Получают средний вес гранулемы ткани, сформированной вокруг каждого тампона и высчитывают процент ингибирования.

# ***2.7 Артрит, индуцированный формалином***

Это исследование проводят согласно методике Owoyele и др., 2005. Животных разделяют на группы, согласно плану обработок. В каждую лапу животных инъецируют 0,1 мл 4% формальдегида в первый и третий день эксперимента. Изучаемый препарат, лекарства группы сравнения и физиологический раствор наносят животным один раз в день в течение 10 последовательных дней, начиная с первого дня введения формальдегида. Ежедневные изменения в размерах лапы измеряют с помощью хлопчатобумажной нити и миллиметровой ленты. Изменения размеров лапы в группе изучаемого препарата, сравнивают с таковой в контрольной группе.

# ***.8 Изучение ульцерогенного действия***

Это исследование проводят путем изменения методов, используемых Сингх и др. (1997) Гоел. и др (1986). Животные были введены препараты, физиологический раствор или лекарства группы сравнения один раз в день в течение трех последовательных дней. Животные голодают в течение 24 ч до введения первой и последней дозы препарата, лекарств сравнения или физиологического раствора. Животных умерщвляют высокой дозой диэтилового эфира через 12 ч после введения последней дозы препаратов и проводится их вскрытие. Желудки удаляют, вскрывают через большую кривизну, промывают нормальным физиологическим раствором и рассматривается под переносной линзой (x10) на наличие раздражения слизистой оболочки. Язвы классифицируются в соответствии с произвольной шкалой, используемой Сингх и др. (1997), где 0 = нет поражения, 0,5 = гиперемия, 1 = один или два небольших поражения, 3 = очень серьезные повреждения, 4 = на слизистой много поражений. Индекс изъязвлений рассчитывают как средние баллы язвы (Tan и др., 1996).

# ***.9 Гистологическое исследование***

Образец кожи (0,5 × 0,5 см) берут из середина эпителизируемой области. Ткань помещают в 10% свежий, нейтральный буферный раствор формальдегида по меньшей мере на 24 ч. Срезы окрашивают гематоксилином и эозином и исследуют с помощью светового микроскопа с расширением объектива 20 × 40.

# ***.10 Статистический анализ***

Результаты представляются в виде среднего ± стандартная ошибка среднего (СЭМ). Различия между экспериментальными группами сравниваются с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), значения считались значимыми при Р менее 0,05.

# ***Заключение***

Проблема лечения ран и раневой инфекции остается актуальной на протяжении всей истории хирургии. Среди большого количества различных способов лечения ран до сих пор не найдено оптимальных методов стимуляции заживления обширных ран, ожогов, трофических язв кожи.

Рана (Vulnus) - открытое механическое повреждение кожи, слизистой оболочки глубжележащих тканей и органов. Процесс заживления состоит из трех фаз: воспаления, фиброплазии и созревания. Острые раны заживают, проходя поочередно стадии коагуляции, воспаления, синтеза матрикса, ангиогенеза, фиброплазии, эпителизации, контракции и ремоделирования рубца. Конечный результат неосложненного процесса раневого заживления - это нежный рубец с небольшим фиброзом, минимальным при наличии раневой контракции, и возвращение практически к нормальной структуре ткани и функции органа. Повреждение целостности кожных покровов, а также случайные раны увеличивают риск инфицирования и даже развития сепсиса. Инфекция в хирургии занимает одно из ведущих мест и определяет сущность многих заболеваний, к примеру, в ветеринарии частота нагноения ран составляет 73,2%.

Несмотря на достигнутые успехи в разработке и изучении новых препаратов для лечения случайных ран у мелких домашних животных (левомеколь, левосин и др.), повышенный спрос и небольшой выбор мазей на водорастворимой основе требуют решения проблемы дальнейшего расширения их ассортимента.

Разработанная новая многокомпонентная мазь нуждается в доклиническом исследовании. Рассмотренный в данном обзоре широкий список методик позволит наиболее достоверно определить свойства изучаемого препарата для дальнейшего его изучения в клинической практике.

# ***Список литературы***

1. Aneta Kołaczek, Iwona Fusiarz, Justyna Ławecka, Danuta Branowska Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review - CHEMIK 2014, 68, 7, 620-628

2. Narendra Nalwaya, Gaurav Pokharna, Lokesh Deb, Naveen Kumar Jain wound healing activity of latex of *Calotropis Gigantea - International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol.1, Issue 1, July-Sep. 2009*

3. Vipin Kumar Garg <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Garg%20VK%5Bauth%5D> and Sarvesh Kumar Paliwal <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Paliwal%20SK%5Bauth%5D> Wound-healing activity of ethanolic and aqueous extracts of *Ficus benghalensis -* J Adv Pharm Technol Res. 2011 Apr-Jun; 2 (2): 110-114.

4. Antonio Zuorro, Marco Fidaleo and Roberto Lavecchia Solubility Enhancement and Antibacterial Activity of Chloramphenicol Included in Modified β-Cyclodextrins - *Bull. Korean Chem. Soc. 20*10, Vol.31, No.11

. Shivananda Nayak, Poorna Nalabothu, Steve Sandiford, Vidyasagar Bhogadi, Andrew Adogwa Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica. L.* and *Laurus nobilis. L.* extracts on rats - BMC Complementary and Alternative Medicine 2006, **6**: 12

6. Hajiaghaalipour F <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hajiaghaalipour%20F%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\_uid=23864889>1, Kanthimathi MS <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kanthimathi%20MS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\_uid=23864889>, Abdulla MA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Abdulla%20MA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\_uid=23864889>, Sanusi J <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sanusi%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\_uid=23864889>. The Effect of Camellia sinensis on Wound Healing Potential in an Animal Model - Evid Based Complement Alternat Med <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864889>, 2013

. Nidhi Chowdhary, Mohanjit Kaur, Amarjeet Singh, Bimlesh Kumar Wound healing activity of aqueous extracts of *Ficus Religiosa* and *Ficus Benghalensis* leaves in rats - *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 2014

. Bamidele V. Owoyele, Olubori M. Adebukola, Adeoye A. Funmilayo and Ayodele O. Soladoye Anti-Inflammatory activities of ethanolic extract of Carica Papaya leaves - Birkhauser Verlag, Basel, 2008

9. Jose´ L. Aguilar, Percy Rojas, Adolfo Marcelo, Alberto Plaza, Rudolf Bauer, Eveline Reininger, Christoph A. Klaas, Irmgard Merfort Anti-inflammatory activity of two different extracts of Uncaria tomentosa (Rubiaceae) - Journal of Ethnopharmacology 81 (2002) 271\_/276

. Iziara F. Florentino, Marcus Vinícius M. Nascimento, Pablinny M. Galdino, Adriane F. De Brito, Fabio F. Da Rocha, Carlos R. Tonussi, Thereza Christina M. De Lima, José R. De Paula And Elson A. Costa Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae (acariçoba) in mice - Anais da Academia Brasileira de Ciências (2013) 85 (3): 987-997

*11. Habibur Rahman, M. Chinna Eswaraiah and A. M. Dutta In-vitro* Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam) - American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 15 (1): 115-121, 2015

. Ramesh HA, Mohammad Azmathulla, Malay Baidya, Mohammed Asad Wound healing activity of human urine in rats - Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2010

. Juraiporn Somboonwong, Mattana Kankaisre, Boonyong Tantisira3 and Mayuree H Tantisira Wound healing activities of different extracts of Centella asiatica in incision and burn wound models: an xperimental animal study - Somboonwong et al. BMC Complementary and Alternative Medicine 2012, 12: 103

. Sushil S. Pimpare, Yogesh T. Sonawane, Chetan A. Chaudhari, Lalit P. Sali, Naveenkumar P. Jain and Chhaya H. Gadgoli Wound healing activity of topical application form based on herbomineral formulation - Asian Journal of Plant Science and Research, 2012, 2 (3): 355-363

. Ali shams El din Chemical composition and bioassay of essential oils and crude extracts from two *Artemisia* species against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd and the pink corn borer *Sesamia cretica* led (Lepidoptera: Noctuidae) larvae, 2013