

УДК 630*866.5.002.33

**В.П. Короткий¹, В.И. Великанов², Н.И. Богданович³, В.И. Роцин⁴,
И.Ф. Водопьянов², И.В. Чечет⁵**

¹НТЦ «Химинвест»

²Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия

³Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова

⁴Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет

⁵Аптечные сети г. Н. Новгород

Короткий Василий Павлович родился в 1954 г., окончил в 1976 г. лесотехнический факультет, в 1981 г. инженерно-экономический факультет Ленинградской лесотехнической академии, чл.-кор. МАНЭБ, директор НТЦ «Химинвест». Имеет более 50 печатных работ в области лесохимии, пиролиза древесины, получения активных древесных углей, угольных кормовых добавок, карбонизации, парогазовой активации, адсорбции.
E-mail: himinvest@sandy.ru



Великанов Валериан Иванович родился в 1947 г., окончил в 1975 г. Казанский ветеринарный институт, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии сельскохозяйственных животных Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии, академик Российской и международной академии аграрного образования. Имеет более 350 печатных работ в области радиационной биологии, фармакологии и токсикологии, иммунофармакологии, иммунотоксикологии.
E-mail: radiobiolog1@mail.ru



Богданович Николай Иванович родился в 1943 г., окончил в 1969 г. Ленинградскую лесотехническую академию, доктор технических наук, профессор, зав. кафедрой лесохимических производств Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова, засл. работник высшей школы РФ. Имеет более 340 печатных трудов в области изучения пиролиза древесины и отходов ее химической и механической переработки с получением адсорбентов для очистки сточных вод и газовых выбросов, а также адсорбционных методов очистки сточных вод и переработки осадков.
E-mail: lesochim@agtu.ru



Роцин Виктор Иванович родился в 1945 г., окончил в 1972 г. Ленинградскую лесотехническую академию, кандидат химических наук, доцент кафедры технологии лесохимических производств и биологически активных веществ С.-Петербургского государственного лесотехнического университета. Имеет более 130 печатных работ в области изучения состава соединений экстрактивных веществ биомассы дерева и их биологической активности, теории и технологии получения продуктов на основе экстрактивных веществ.
Тел.: (812) 904 35 03



© Короткий В.П., Великанов В.И., Богданович Н.И., Роцин В.И., Водопьянов И.Ф., Чечет И.В., 2012

Водопьянов Иван Федорович родился в 1982 г., окончил в 2004 г. Нижегородскую государственную сельскохозяйственную академию, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры анатомии сельскохозяйственных животных Ниж ГСХА. Имеет более 10 печатных работ в области ветеринарной хирургии, фармакологии и токсикологии.
Тел.: (831) 466 94 81



Чечет Инна Валериановна окончила в 2000 г. Пермскую государственную фармацевтическую академию, кандидат биологических наук, научный консультант аптечных сетей г. Н. Новгорода. Имеет более 15 печатных работ в области клинической фармакологии и биохимии.
Тел.: (831) 460 87 08



РАЗРАБОТКА НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ НА ОСНОВЕ ЖИВИЦЫ СОСНОВОЙ

Установлено, что живица сосновая в сочетании с другими препаратами, выделенными из биомассы дерева, обладает заживляющим действием при нанесении на раневые поражения кожи животных

Ключевые слова: живица сосновая, ветеринария, мази заживляющие, паста хвойная хлорофилло-каротиновая (ПХХК), препарат «Сибиол», воск хвойный.

Живица сосновая – продукт жизнедеятельности деревьев сосны, образующийся в процессе биосинтеза. Биологическая роль ее в живом дереве определяется как защитная и заключается в предохранении срезов тканей дерева от высыхания и проникновения в них грибков, бактерий и насекомых. Живица сосновая является натуральным смолистым веществом и благодаря своим свойствам обладает лечебным заживляющим действием [10].

На основании уникальных качеств она все шире находит применение в качестве составляющих компонентов различных лечебных препаратов [6, 10]. Для внутреннего рынка России требуется примерно 300 т лечебных мазей для ветеринарии в год. Потребности в этом продукте удовлетворяются в основном за счет импорта лечебных препаратов.

Данная работа направлена на создание более эффективных лекарств для ветеринарии, принципиально новой технологии производства лекарственных форм на основе живицы сосновой и других природных соединений биомассы дерева. Кроме живицы, в состав новых лекарственных препаратов входят «Силбиол» – паста хвойная хлорофилло-каротиновая (ПХХК), обладающая защитными функциями клеток растения; хвойный воск; эмульгатор.

Исследование химического состава живицы сосновой показывает, что содержание смолистых веществ в ней в зависимости от внешних условий изменяется незначительно; содержание влаги зависит от количества дождевых осадков, выпавших в период сбора живицы. Живица сосновая, добытая в начале сезона, имеет более высокое содержание скипидара – терпеновых углеводородов, которые являются предшественниками каротиноидов, фитостеролов, некоторых

растительных гормонов и могут участвовать в обмене веществ как источники энергии при отсутствии других энергетических ресурсов. Поэтому для изготовления противовоспалительного ветеринарного бальзама (линимента) предпочтительно использовать свежую живицу, добытую в начале сезона подсочки.

ПХХК состоит из экстрактивных веществ хвои, растворимых в углеводородном экстрагенте (неполярные растворители: нефрас, бензин «Галоша», гексан) с последующим омылением NaOH до pH – 8,0...9,0 для придания водорастворимых свойств. ПХХК благодаря наличию в своем составе природных соединений, стимулирующих репарацию пораженных участков, мощных антиоксидантов (токоферолы, провитамин А, витамины группы К, хлорофилл и его производные, полипрепопы, эфиры стеролов и высших жирных кислот), терпеноидов, обладающих фитонцидным и антисептическим действием, монотерпенов, сексвитерпенов, дитерпенов и их кислородсодержащих производных, очищает рану от некротических заболеваний, обладает противовоспалительным действием, защищает от внешних патогенных организмов, стимулирует репарационные процессы.

«Силбиол» и живица сосновая придают антисептические свойства линименту, хорошо совмещаются с хвойным воском и после нанесения на рану и подсыхания образуют антисептическую пленку.

Воск хвойный представляет собой смесь эфиров жирных кислот и свободных жирных (C_{12} – C_{20}) и смоляных ($C_{20}H_{30}O_2$) кислот. Содержание неомыляемых веществ в воске составляет 9...12 %. Воск хвойный придает прилипательность к коже и ворсу (шерсти, щетине и т.п.), образует тонкий защитный слой на поверхности раны (ожога), обуславливает устойчивость к атмосферным осадкам, пропускает для воздуха.

Добавка эмульгатора (ОП-7, ОП-10, ГВИН-80) от 5 до 15 % позволяет получить препарат типа «масло в воде» однородной консистенции.

Экспериментально-клинические и лабораторные исследования по изучению влияния противовоспалительного ветеринарного бальзама на заживление экспериментальных инфицированных ран у лабораторных животных (крыс) проведены в лаборатории кафедры анатомии, фармакологии с токсикологией и кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии ФГОУ ВПО «Нижегородская ГСХА».

Материалом исследований служили белые беспородные крысы (самцы) в возрасте 4...5 мес. средней массой тела на начало эксперимента 241,5...251,5 г. Всего в опыте находилось 12 крыс. Группу животных подбирали по принципу аналогов, использовали животных одного помета и приблизительно одинакового веса. Крыс с подозрением на наличие спонтанных заболеваний после оценки внешнего вида и общего состояния выбраковывали.

Для моделирования процесса животным на фоне хлороформного наркоза наносили резаные раны, затем в полость раны вводили марлевые салфетки с инфицирующим агентом [2]. Всех раненых животных разделяли на две

группы: 1 – опытная, 2 – контрольная. Кроме того, была выделена группа интактных животных. При появлении признаков гнойного воспаления (через сутки после нанесения ран) кожные швы удаляли, извлекали марлевые салфетки и начинали лечение раненых животных опытной группы, животных контрольной группы не лечили. Лечение заключалось в нанесении на поверхность раны противовоспалительного ветеринарного бальзама.

В течение всего срока заживления ран за крысами вели ежедневное клиническое наблюдение, оценивали их общее состояние, габитус, наличие и характер отека, гиперемии, болезненности в области нанесения экспериментальных ран, следили за развитием грануляций и эпителизацией ран.

Исследование крови у всех групп животных выполняли до нанесения ран, затем через 3, 7 и 14 сут. после начала лечения. Кровь у животных забирали из кончика хвоста в пробирки с антикоагулянтом (10 %-й цитрат натрия из расчета 2-3 капли на 1 мл). Цельную кровь использовали для подсчета количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в камере Горяева обычным методом [3] и определения концентрации гемоглобина гемоглобинцианидным методом, а также для выведения лейкограммы в мазках, окрашенных по Филликсу [4]. Для качественного и количественного изучения раневой микрофлоры проводили бактериологические и цитологические исследования. С этой целью до введения и после извлечения марлевых салфеток, а также через 3 и 7 сут. брали мазки из ран стерильными палочками с ватным тампоном и опускали в пробирки со стерильным изотоническим раствором хлорида натрия.

Для определения обсемененности ран пробирки прогревали на водяной бане при 38 °С, после чего из пробирок делали высевы по 0,1 мл на чашку Петри с мясопептонным агаром (МПА). После суточной экспозиции чашек в термостате (при температуре 37 °С) подсчитывали колонии бактерий. После дальнейшего культивирования микроорганизмы типировали и определяли их антибиотикочувствительность как показатель патогенности. До лечения и в ходе заживления с поверхности ран готовили мазки-отпечатки по методу Покровской и Макарова [8], которые фиксировали в жидкости Карнуа, окрашивали метиленовой синькой по Романовскому–Гимза в модификации Лилли [5], на гликоген ШИК – реакцией по Мак-Манусу с докраской эсдергематеином Майера, на нуклеиновые кислоты – галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону [7]. Для оценки скорости заживления экспериментальных кожно-мышечных ран регулярно проводили морфометрию [9].

Для гистологических исследований брали образцы тканей через 3, 7, 14 и 21 сут. после нанесения ран. Для этого на границе раны иссекали кусочки тканей с захватом здоровой кожи, края и дна раны. Образцы тканей фиксировали в 10 %-м растворе нейтрального формалина. Заливку в парафин проводили по обычной схеме после проводки в водных растворах этанола возрастающей крепости. Срезы готовили на ротационном микротоме. Серийные парафиновые срезы толщиной 7...8 мкм окрашивали гематоксилином – эозином и по Вангизону [5]. Готовые препараты изучали под микроскопом «Биолан-М».

Результаты опытов приведены в единицах СИ. Полученный материал статистически обрабатывали с использованием программы «Statistika-5», которая является интегрированной системой комплексного статистического анализа и обработки данных в среде Windows [1].

Результаты исследований показали, что в первое время после нанесения ран у всех участвовавших в эксперименте животных наблюдались одинаковые общие реакции. Стабилизация общего состояния и возвращение его в норму с восстановлением двигательной активности, аппетита, центральных рефлексов у животных разных групп отмечались в разные сроки. Так, у животных группы 1 общее улучшение (состояние) наблюдалось через 2–4 дня, у животных группы 2 подобные изменения задерживались в среднем на 3–4 дня.

До начала опыта живая масса всех животных находилась примерно на одном уровне (табл. 1).

Таблица 1

Колебания живой массы (г) крыс разных групп во время опытов

Срок исследований	Группа 1	Группа 2 (контроль)	Группа интактных животных
До начала опытов	246,9 ± 4,5	245,0 ± 3,9	248,5 ± 2,8
На 3-й день	230,4 ± 3,5	229,1 ± 4,9	262,5 ± 3,0
На 7-й день	259,5 ± 3,1	248,1 ± 4,1	283,4 ± 2,9
На 14-й день	262,9 ± 3,5	258,2 ± 3,9	291,3 ± 2,5
На 21-й день	278,9 ± 3,1	271 ± 3,4	297,3 ± 3,0

Снижение массы тела у контрольных крыс было более выраженным, а дальнейший ее набор отмечен с некоторым замедлением по сравнению с животными опытной группы, среди которых колебания массы тела различались незначительно и подчинялись схожей закономерности. Отмеченные особенности общих неспецифических реакций могут косвенно свидетельствовать о более выраженном и замедленном течении воспалительного процесса с присущей ему системной интоксикацией.

Сразу после нанесения травмы у крыс рана несколько минут слабо кровоточила. В первые сутки площадь раны увеличивалась приблизительно на 10 % по отношению к исходной при минимальном кровотечении. При лечении ветеринарным бальзамом раневая поверхность закрывалась струпом на 1–2-й день. Нагноительных процессов не наблюдалось. У животных контрольной группы закрытие раны струпом также происходило на 1–2-й день, но ее заживление протекало с выраженными нагноительными процессами. Из табл. 2 видно, как изменяется площадь раневой поверхности у подопытных крыс групп 1 и 2 на различных сроках течения раневого процесса.

У животных группы 1 образование молодого сформированного эпителизованного рубца заканчивалось в среднем на 14–15-й день. К этому времени прилегающие ткани не отечны, мягкие и безболезненные при пальпации.

Таблица 2

Площадь (мм²) экспериментальных ран у крыс на различных сроках заживления

Группа животных	1-й день	3-й день	7-й день	14-й день	21-й день
Группа 1	164,0 ± 7,3	122,1 ± 5,5	71,1 ± 4,4	2,2 ± 0,2	–
Группа 2 (контроль)	168,5 ± 7,3	143,1 ± 6,3	97,5 ± 3,9	33,5 ± 2,6	3,1 ± 0,3

Период ремиссии проходил без осложнений. У контрольных животных полное заживление ран наступало лишь к 20–25 дню. Достоверные различия площадей раневой поверхности у опытных и контрольных животных наблюдали на 3-й день. В дальнейшем эта разница становилась более выраженной, т.е. можно констатировать, что противовоспалительный ветеринарный бальзам при лечении ран у животных увеличивает скорость их заживления на всех стадиях раневого процесса.

Гематологические исследования. До начала опытов показатели морфологического и биохимического состава крови у животных опытной и контрольной групп существенно не отличались. При лечении ветеринарным бальзамом значительное уменьшение выраженности лейкоцитарной реакции было отмечено уже на 7-й день ($(8,3 \pm 0,5) \cdot 10^9$ ед./л) и сохранялось на этом уровне до полного заживления раны, у контрольных крыс в те же сроки лейкоцитоз оставался выраженным в течение длительного времени (на 7-й день – $(10,7 \pm 0,8) \cdot 10^9$ ед./л; на 14-й – $(10,9 \pm 0,8) \cdot 10^9$ ед./л).

Ведущим изменением в видовом составе лейкоцитов является различное распределение нейтрофилов по зрелости у различных групп животных: у животных опытной группы 1, раны которых лечили ветеринарным бальзамом, более выражены процессы созревания нейтрофилов и преобладание сегментоядерных форм, достигающих максимума к 14-му дню лечения. Количество лимфоцитов у этих животных по сравнению с контрольными на всех сроках лечения заметно ниже.

Бактериологические исследования. Основными представителями микрофлоры в инфицирующем агенте являются стафилококки (*St. spp.*), кишечная палочка (*E. coli*), *Proteus*; дрожжеподобные грибы (*Candida*), синегнойная палочка (*P. aeruginosa*). Перед началом лечения с раневой поверхности животных всех групп выделялось примерно одинаковое количество бактериальных колоний (табл. 3). При отборе проб через 7 дней количество микроорганизмов в раневом экссудате контрольной группы снизилось в 1,7 раза, в группе 1 – в 3,6 раза, при этом *E. coli* и *Proteus* уже не были выделены. На 15-й день в контрольной группе с поверхности ран по-прежнему в умеренном количестве высевались монокультуры кишечной палочки, *Proteus* и др.

Таблица 3

**Количество микроорганизмов, выделенных на МПА
с единицы площади раневой поверхности**

Группа животных	Число колоний на 1 см ² по дням наблюдений		
	1-й день	7-й день	14-й день
Группа 1	137,0 ± 8,0	38,0 ± 2,0*	10,0 ± 1,3*
Группа 2 (контроль)	136,0 ± 5,0	81,0 ± 4,0	59,0 ± 2,0

* Степень достоверности различий между уровнем бактериальной обсемененности ран у животных разных групп $p < 0,001$.

Цитологические исследования. До начала лечения у животных обнаруживалась острая раневая смешанная инфекция. Процесс фагоцитоза микрофлоры был заторможен – незавершенный фагоцитоз достигал 33 % с наличием 19...43 стафилококков в цитоплазме нейтрофилов и макрофагов. Отмечалась резко выраженная воспалительная реакция, протекавшая с массовой гибелью ((72,1 ± 4,0) %) и дистрофией ((24,5 ± 2,3) %) нейтрофилов. Количество относительно сохранных нейтрофилов снижено ((3,1 ± 0,2) %).

На 7-й день лечения ветеринарным бальзамом наблюдалось значительное падение числа некротически измененных нейтрофильных лейкоцитов: от (69,1 ± 6,5) до (13,5 ± 5,9) %. В контрольной группе животных этот показатель снижался от (71,5 ± 3,7) до (44,3 ± 2,3) %. Вместе с тем резко увеличивалось относительное содержание нейтрофильных лейкоцитов с нормально сегментированными ядрами у всех групп животных.

Через 14 дней лечения ветеринарным бальзамом воспалительная реакция у крыс опытной группы была выражена слабее, чем у контрольной. Содержание погибающих некротически измененных нейтрофилов падало. Одновременно количество нейтрофилов с нормальной структурой ядер возрастало. На фоне затухания воспаления и гноеобразования активировалась регенерация ран с увеличением в отпечатках малодифференцированных полибластов и молодых соединительнотканых клеток (профибробластов, фибробластов). Полученные данные свидетельствуют о том, что противовоспалительный ветеринарный бальзам активно создавал условия для стимулирования регенерации мягких тканей раны.

Гистологические исследования. На 3-й день лечения выявился четкий кожно-мышечный дефект с признаками местной воспалительно-некротической реакции. По краю раны расположены группы некробиотических клеток, резко выражена отечность ткани, ее волокна разрыхлены, утолщены, гомогенизированы, края их размытые и неровные. В более глубоких слоях по ходу раневой поверхности клеточные элементы подвергались дистрофическим изменениям (кариопикнозу и кариорексису).

На 7-й день заживления у животных, проходивших лечение ветеринарным бальзамом, по сравнению с контрольными отмечены менее выраженная краевая воспалительная реакция, более активная регенерация эпидермиса,

а также наличие большего числа вновь образованных мелких сосудов на единицу площади, распределение которых более равномерно. Кроме этого, наблюдалось формирование структур соединительной ткани в виде коллагеновых волокон.

На 14-й день у животных группы 1 (опыт) образовался незрелый соединительно-тканевый рубец, заполняющий большую часть раневого дефекта.

На 21-й день у опытных крыс в центре участка травматизации кожи базальный слой производящего слоя эпидермиса располагался в один ряд с фигурами деления, слегка углубляющимися выступами в подлежащую ткань сосочкового слоя без воронок волосяного фолликула. Шиповатый слой был представлен 3–4-мя рядами клеток разнообразной формы с фигурами деления, между которыми встречались (по одиночке или группами) лимфоциты. Клетки зернистого слоя эпителия резко уплощались и интенсивно окрашивались в однородный непрозрачный синий цвет с расположением в 3–4 ряда в виде вытянутых волоконцев, переходящих в тонкие вытянутые роговые чешуйки.

Соединительно-тканевые структуры этих участков были в меньшей степени инфильтрированы клеточными элементами. За пограничной (перифокальной) зоной травматизации все слои кожного покрова имели нормальное гистологическое строение.

Полученные нами данные общего состояния животных (на примере крыс), клинической картины заживления раны, изменений площади раны, гематологических, бактериологических, цитологических и гистологических исследований позволяют сделать заключение о значительном лечебном эффекте, оказываемом противовоспалительным ветеринарным бальзамом при лечении острых инфицированных кожно-мышечных размозженных ран у животных.

После дополнительных исследований по корректировке рецептуры противовоспалительного ветеринарного бальзама предлагается обсудить вопрос о целесообразности широкого применения данного терапевтического препарата в ветеринарной практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Боровиков П.В., Ивченко Г.И.* Прогнозирование в системе Statistika в среде Windows: моногр. М.: Финансы и статистика, 2000. 381 с.
2. *Водопьянов И.Ф.* Лечение ран у животных с помощью пенополиуретановой повязки «САРЭЛ»: дис. ... канд. вет. наук. Новгород, 2008. 136 с.
3. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии / И.П. Кондрахин [и др.]: справ. М.: Агропромиздат, 1985. 287 с.
4. *Кондратьев В.С.* Морфологические и биохимические исследования крови у животных: моногр. Л.: Изд-во ЛВИ, 1976. 65 с.
5. *Меркулов Г.А.* Курс патологоанатомической техники: моногр. Л.: Медицина, 1969. 423 с.
6. Переработка низкосортной и мелкотоварной древесины в энтеросорбенты для сельского хозяйства методом совмещенного процесса карбонизации-активации на модульных установках в полевых условиях / Н.И. Богданович, В.П. Короткий, В.И. Великанов, Д.К. Носков // Лесн. журн. 2010. № 4. С. 126–131. (Изв. высш. учеб. заведений).

7. *Пирс Э.* Гистохимия: моногр. М.: Изд-во иностр. лит., 1962. 929 с.

8. *Покровская М.П., Макаров М.С.* Цитология раневого экссудата как показатель процесса заживления раны: моногр. М.: Медгиз, 1942. 44 с.

9. *Попова Л.Н.* Как изменяются границы вновь образующегося эпидермиса при заживлении раны: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Воронеж, 1942. 20 с.

10. *Фролов Ю.А.* Лесоводственно-биологические и технологические основы подсочки сосны обыкновенной: моногр. СПб., 2001. 448 с.

Поступила 4.04.11

V.P. Korotky¹, V.I. Velikanov², N.I. Bogdanovich³, V.I. Roshchin⁴, I.F. Vodopyanov², I.V. Chechet⁵

¹Science and Technology Center "Himinvest"

²Nizhny Novgorod State Agricultural Academy

³Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov

⁴St. Petersburg State Forest Technical University

⁵Nizhny Novgorod pharmacy group

Development of New Techniques to Produce Pine Resin-based Drags for Veterinary Medicine

It has been established that pine resin in combination with other substances extracted from wood biomass has a healing effect when applied to wound lesions of animals.

Key words: pine resin, veterinary medicine, healing ointments, coniferous chlorophyll-carotene paste, "Sibiol" medicine, coniferous wax