ISSN 2072-2419



Nº 2

MCKAYHADOAHЫÑ BECTHNK BETEPMHAPMM

INTERNATIONAL BULLETIN OF VETERINARY MEDICINE



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ- 2015

www.gavm.spb.ru

MORAVIADOAHDIĂ BECTHIK BETEPKHAPIN

2.2015

Редакционный совет

А.А. Стекольников – гл. ред., член-корр. РАСХН, д.в.н., проф., СПб

В.Д. Соколов – зам. гл. ред. д.в.н. проф., СПб А.И. Ятусевич – зам. гл. ред. д.в.н. проф.,

Витебск

Редакционная коллегия

А.А. Алиев, д.в.н., проф., СПб.

Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.

Л.М. Белова, д.б.н., проф., СПб.

М.И. Гулюкин, акад. РАСХН, д.в.н., проф. Москва.

Н.В. Зеленевский, д.в.н., проф., СПб.

Л.Ю.Карпенко, д.б.н., проф., СПб.

С.П. Ковалев, д.в.н., проф., СПб.

А.А. Кудряшов, д.в.н., проф., СПб.

В.А. Кузьмин, д.в.н., проф., СПб.

М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.

К.В. Племяшов, д.в.н., проф., СПб.

Б.С. Семенов, д.в.н., проф., СПб.

А.М. Смирнов, акад. РАСХН, д.в.н., проф., Москва

А.А. Сухинин, д.б.н., проф., СПб.

А.Н. Шиков, д.ф.н., проф., СПб.

Редакционно-технический отдел

В.Д. Соколов, д.в.н. проф., СПб.

Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.

М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.

А.В. Рыбакова, к.в.н., СПб.

Сдано в набор 13.01.2016

Подписано к печати 13.01.2016

Формат 70×100 1/16.

Бумага глянцевая № 1. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 5,2+1,63 цв. вкл.

Усл. Кр.-отт. 18,2. Тираж 1001 экз.

Editor -in- chief

A.A. Stekolnikov professor, DVM, Corresponding Member of the Russian Academy of Agricultural Sciences

Managing Editor

V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg A.I. Yatusevich - professor, DVM, Vitebsk

Editorial Board

A.A. Aliyev - professor, DVM, St. Petersburg

N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg

L.M. Belova - professor, DBS, St. Petersburg

M.I. Gulyukina - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM,

professor, Moscow

N.V. Zelenevski - professor, DVM, St. Petersburg

L.Y. Karpenko - professor, DBS, St. Petersburg

S.P. Kovalev - professor, DVM, St. Petersburg

A.A. Kudryashov - professor, DVM, St. Petersburg

V.A. Kuzmin - professor, DVM, St. Petersburg

M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg.

K.V. Plemyshov - professor, DVM, St. Petersburg

B.S. Semenov - professor, DVM, St. Petersburg

A.M. Smirnov - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM, professor, Moscow

A.A. Sukhinin - professor, DVM, St. Petersburg

A.N. Shikov - professor, DFS, St. Petersburg

Technical Department

V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg

N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg

M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg

A.V. Rybakova - PhD, St. Petersburg

Sent to 03/14/2014

Signed for printing 14/03/2014

The format of $100 \times 70 \ 1/16$.

Glossy paper number 1. Offset printing.

Conv. Pec. liter. 5.2 1.63 fl. incl.

Conv. Cr. - ott . 18.2 . Circulation 1001 copies.

На 1 странице обложки расположено: Университет Висконсина в Мэдисоне (UWM) Школа ветеринарной медицины является селективным государственным университетом располагающимся в городе Мэдисон, штат Висконсин, США.

В школе располагается Национальный научно-исследовательский центр. В 2012 году расходы на исследования составили более чем \$ 1,1 млрд..

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

Номер госрегистрации СМИ ПИ № ФС 77-28268 от 18 мая 2007 г. Подписной индекс в агентстве Роспечать 82393.

Учредитель — Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГОУ ВПО «СПбГАВМ»)

Журнал основан в январе 2004 года в Санкт-Петербурге и входит в список ведущих лицензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Журнал распространяется по всем регионам России и Республике Беларусь (ВУЗЫ, НИИ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ ОТДЕЛЫ).

Журнал выходит не менее 4 раз в год. В нем публикуются работы по всем основным вопросам ветеринарии и смежным дисциплинам.

В этот журнал Вы можете поместить рекламу Вашей фирмы. Объявления и коммерческая реклама публикуются после оплаты. Срок исполнения — в течение 3 месяцев

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных объявлений.

При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Мнение авторов и редакции по отдельным вопросам может не совпадать.

Плата с аспирантов за публикацию рукописи не взимается.

Справки и технические возможности типографии, в которой печатается журнал, оговариваются по телефону (812) 387-11-58.

Адрес редакции: 196084, СПб, ул. Черниговская дом 5, СПбГАВМ, редакция журнала «Международный вестник ветеринарии» (МВВ).

RESEARCH AND PRODUCTION JOURNAL

State registration number media PI № FS 77-28268 on May 18, 2007. Subscription Index Rospechat 82393.

Founded in January 2004 by Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint - Petersburg State Academy of Veterinary Medicine" (FSEI-HPE "SPbGAVM")

International Bulletin of Veterinary an academic international peer-reviewed journal that publishes original research articles as well as review articles in veterinary sciences and related academic disciplines. It covers all the scientific and technological aspects of veterinary sciences in general, anatomy, physiology, biochemistry, pharmacology, microbiology, pathology, public health, parasitology, infectious diseases, clinical sciences, alternative veterinary medicine and other biomedical fields.

The manuscripts submitted to this journal must be previously unpublished and not be under consideration for publication elsewhere. Manuscripts that are found to have been plagiarized from a manuscript by other authors, whether published or unpublished, will incur plagiarism sanctions.

This journal, including all individual contributions and illustrations published therein, is legally protected by copyright. Any use, exploitation or commercialisation is illegal and liable to criminal prosecution.

Requests about legal photocopy reproduction, copyright or duplication processing should be addressed to the editorial office:

196084, St. Petersburg, ul. Chernihiv house 5 SPbGAVM, Editorial Board of "International Bulletin of Veterinary Medicine" (IBVM), phone +7-812-3871158.

СОДЕРЖАНИЕ

| | - 7-W | |
|---|---|----|
| Инфекци- онные бо- лезни | • Роль бактериальных болезней рыб в формировании эпизоотического состояния садковых хозяйств. <i>Кузнецова Е.В.</i> | 7 |
| | • Определение оптимальных концентраций действующих веществ для препаратов серии Флайблок в производственных условиях. <i>Токарев А.Н., Енгашев С.В., Токарева О.А.</i> | 10 |
| Хирургия | • Моно-и комплексная терапия ран у кроликов тромбоцитарной аутоплазмой. <i>Гусева В.А.</i> | 14 |
| Фармако- логия, ток- сикология, фармация | • Профилактика гнойных послеоперационных осложнений с использованием шовного материала с антибактериальным покрытием, представленным наночастицами серебра. Коптев В.Ю., Леонова М.А., Онищенко И.С., Шкиль Н.А., Бычков А.Л. | 20 |
| TP | • Эффективность Ципрофлоксацина при экспериментальном колибактериозе цыплят. Заикина Е.Н., Скворцов В.Н., Балбуцкая А.А. | 24 |
| | • Токсикологическая оценка комплексного препарата для лечения и профилактики кокцидиозов животных. <i>Арисов М.В., Абрамов В.Е., Поселов Д.С.</i> | 28 |
| | • Клинические испытания антигельминтика широкого спектра действия-Эпримек на лисицах. <i>Кузнецов Ю.Е., Смирнов А.А.</i> | 33 |
| | •Изучение антибактериальной и антимикотической активности препарата Аргумистин. <i>Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Крутяков Ю.А., Белкина И.В., Савенков К.С.</i> | 36 |
| | •Изучение переносимости и субхронической токсичности препарата Иверсан на свиньях. <i>Енгашева Е.С., Новиков Д.Д.</i> | 39 |
| Зоогигиена, Санитария, Кормление | •Влияние пророщенного зерна на метаболические процессы у коров. <i>Батраков А.Я., Донская Т.К, Пилаева Н.В., Васильев Р. М., Васильева С.В., Трушкин В.А.</i> | 42 |
| | •Метаболические эффекты у крыс при введении в рацион кормовой добавки с антибактериальными компонентами. <i>Белик С.Н., Горлов И.Ф., Крючкова В.В., Ранделин А.В., Мосолов А.А.</i> | 47 |
| | •Содержание металлов в рыбах и среде их обитания в верховье р. Волхов. <i>Стекольников А.А.</i> , <i>Иванов Д.И.</i> , <i>Аршаница Н.М</i> . | 50 |
| Биохимия, анатомия, физиология | • Применение статистики в диссертациях по ветеринарии. <i>Ковалёнок Ю.К., Курде-ко А.П., Карпенко Л.Ю.</i> | 56 |
| • | • Тромбоцитарная активность у телок на доращивании. Завалишина С.Ю. | 60 |
| Экспери- ментальная фармаколо- | M VIII UNII A.A. | 65 |
| рармаколо- Гия | • Влияние сухого экстракта бадана на течение экспериментального метаболического синдрома, вызванного высококалорийной диетой. <i>Ковалева М.А., Макарова М.Н.</i> | |
| | • Модель острого воспаления: каррагениновый воздушный мешочек. <i>Кательникова А.Е.</i> , <i>Крышень К.Л.</i> , <i>Мужикян А.А.</i> , <i>Макарова М.Н.</i> , <i>Макаров В.Г.</i> | |
| | • Экспериментальные модели боли и ноцицепции. <i>Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г.</i> | 87 |
| | • Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. <i>Рыбакова А.В., Макарова М.Н.</i> | 96 |

| CONTEN | TS | | | | |
|--|--|----|--|--|--|
| Infection disease | • The role of bacterial fish diseases in the formation of the epizootic status cage farms. E. Kuznetsova. | | | | |
| | • The optimal concentration determination of the active substances for the Flayblok series preparations in a production environment. A. Tokarev, S. Engashev, O. Tokareva. | | | | |
| Surgery | • Mono and combined therapy of wounds in rabbits by platelets autological plasma. V. Guseva. | 16 | | | |
| Pharmacology, toxicology, pharmacy | • Preventive properties of suture material with antibacterial coating based on silver nanoparticles. V. Koptev, M. Leonova, I. Onishchenko, N. Shkil, A. Bychkov. | | | | |
| | • Ciprofloxacin efficacy in an experimental colibacteriosis of chickens. E. Zaikina, V. Skvortzov, A. Balbutskaya. | 24 | | | |
| | • Pharmaco-toxicological evaluation of the integrated product for the treatment and prevention of coccidioses animals. M. Arisov, V. Abramov, D. Poselov. | 28 | | | |
| | • The clinical trial of broad-spectrum anthelmintic – eprimek fox. Y. Kuznetsov, A. Smirnov. | 33 | | | |
| | • Study of antibacterial and antimycotic activity of the drug Argumistin. V. Kuzmin, A. Lunegov, I. Belkina. | 36 | | | |
| Zoohygiene, Sanitation, Feedin | • Effect of sprouted grains on metabolic processes cows. A. Batrakov, T. Donskaya, N. Pylayeva, R. Vasiliev, S. Vasilieva, V. Trushkin. | 39 | | | |
| | • Metabolic effects in rats fed the rations with feed supplement, containing antibacterial components. S. Belik, I. Gorlov, V. Kryuchkova, A. Randelin, A. Mosolov. | | | | |
| | • The content of metals in fishes and the environment of their dwelling in an upper course of the Volkhov River. A. Stekolnikov, D. Ivanov, N. Arshanitsa. | 47 | | | |
| Biochemistry, anatomy, physiology | • Statistics in scientific works veterinary profile. Y. Kavalionak, A. Kurdeko, L. Karpenko. | 50 | | | |
| | • Platelet activity in heifers at growing. S. Zavalishina. | 56 | | | |
| Experimental pharmacology | • Immunohystochemical markers of C-cells animal's thyroid gland. A. Muzhikyan. | 60 | | | |
| | • Impact on the dry extract Badal during the experimental metabolic syndrome caused by high-calorie diet. M. Kovaleva, M. Makarova. | 72 | | | |
| | • Model of acute inflammation: carrageenan air pouch. A. Katelnikova, K. Kry- | 78 | | | |

• The experimental models of pain and nociception. E. Shekunova, V. Kashkin., 87

shen, A. Muzhikyan, M. Makarova, V. Makarov.

M. Makarova, V. Makarov.

pronounced and sustained reduction in food intake. Also on the background of Bergenia extract decreased the body weight of animals. It was found that the drug suppresses the appetite of animals, thus normalizing lipid and carbohydrate exchanges.

Key words: dry extract of Bergenia, diet, cholesterol.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Ballabh B., Chaurasia O.P., Ahmed Z., Singh S.B.Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh used against kidney and urinary disorders // J. of Ethnophar. −2008. №118. −P. 331-339.
- 2. Dhalwal K., Shinde V.M., Biradar Y.S. Simultaneous quantifi-cation of bergenin, catechin, and gallic acid from *Bergenia ciliata* and *Bergenia ligulata* by using thin-layer chromatography // J. of Food Com. and An. − 2008. -№21. -P. 496-500.
- 3. Roselli M., Lentini G., Habtemariam S. Phytochemical, antioxidant and anti- a-glucosidase activity evaluations of *Bergenia*

cordifolia // Phytotherapy Research. –2011. –Vol. 26. –P. 908-914.

- 4. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Dorman H.J.D., Makarov V.G., Tikhonov V.P., Hiltunen R. Chemical composition of extracts from green, brown and black leaves of *Bergenia crassifolia* // L. Planta Medica. –2007. –Vol.73. –P. 897.
- 5. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarova M.N., Dorman H.J.D., Makarov V.G., Tikhonov V.P., Galambosi B., Hiltunen R. Examination of adaptogenic effect of infusions of *Bergenia crassifolia* black and fermented leaves in the forced swimming test // Planta Medica. –2008. –Vol.74. –P. 908.
- 6. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarova M.N., Dorman H.J.D., Makarov V.G., Hiltunen R., Galambosi B. Adaptogenic effect of black and fermented leaves of *Bergenia crassifolia* L. in mice // Journal of Functional Foods. −2010. -№2. −P. 71-76.

УДК: 612.67

МОДЕЛЬ ОСТРОГО ВОСПАЛЕНИЯ: КАРРАГЕНИНОВЫЙ ВОЗДУШНЫЙ МЕШОЧЕК

Кательникова А.Е. - м.н.с, Крышень К.Л. - с.н.с, Мужикян А.А. - м.н.с., Макарова М.Н.-д.м.н., профессор, Макаров В.Г. - д.м.н., профессор, Санкт-Петербургский институт фармации



РЕФЕРАТ

Разработка новых лекарственных средств для лечения воспалительных заболеваний зависит от наличия подходящих моделей на животных. Наибольший интерес представляют модели «воспаление полости», поскольку они близки к артриту, при котором патологический процесс локализуется в синовиальной полости. Модель подкожного воздушного мешочка in vivo можно использовать для изучения острого воспаления, разрешения воспалительного ответа и оценки окислительного стресса. Воспаление

индуцируют в 6-дневном воздушном мешочке крысы или мыши путем введения в полость мешочка каррагенина. Помимо каррагенина, в качестве раздражающего агента в данной модели можно использовать зимозан или липополисахарид (LPS). Модель характеризуется миграцией лейкоцитов, формированием гранулемы, выраженным увеличением экссудата, общего белка, провоспалительных медиаторов таких как, NO, простагландинов, TNFα, IL-1β. В этом обзоре рассматриваются основные требования и особенности методологии модели острого воспаления «каррагениновый воздушный мешочек».

Ключевые слова: каррагенин, каррагениноввый воздушный мешочек, острое воспаление, синовиальная полость.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых противовоспалительных лекарственных средств (ЛС) зависит от наличия подходящей модели на животных для оценки действия препаратов на этапе доклинических исследований. Несмотря на тяжесть хронического воспалительного процесса, предпочтение отдается моделям острого воспаления по двум причинам. Во-первых, для скрининга новых противовоспалительных ЛС необходимы простые, легко воспроизводимые модели, позволяющие оценить эффективность препаратов достаточно быстро. Во-вторых, и что более важно, модели острого воспаления необходимы для изучения механизмов, участвующих в переходе острого воспаления в хроническое [1].

Для оценки противовоспалительного действия ЛС на доклиническом этапе используют множество экспериментальных моделей острого воспаления. На сегодняшний день наиболее часто используют модели «воспаление полости», позволяющие достаточно близко сымитировать такое заболевание как артрит, при котором патологический процесс локализуется в синовиальной полости [2].

Седвиг с соавторами [3] обнаружили, что инъекция индуктора воспаления в мешочек, сформированный путем подкожной инъекции воздуха в межлопаточную область крысы через шесть дней, сопровождается воспалительной реакцией. встречающейся у пациентов с ревматоидным артритом и другими хроническими заболеваниями суставов. Кроме того, шестидневная выстилка воздушного мешочка имеет структурное сходство с синовиальной оболочкой сустава, т.е. помимо макрофагов и фибробластов как и синовиальная оболочка суставов, воздушный мешочек выстлан синовиацитами типов А и В [4]. Наконец модель воздушного мешочка имеет дополнительные преимущества, так она не связана с внутренними органами, которые могут быть повреждены при заборе проб, а главное, она обеспечивает чувствительную оценку препаратов, которые ингибируют каскад арахидоновой кислоты [2]. Прототипом данной модели была однодневная модель воздушного мешочка, впервые описанная Селье в 1953 году [5]. Модель широко использовали для изучения воспалительной реакции на различные вещества, такие как зимозан [6], карбоксиметилцеллюлоза [7], кристаллы мононатриевой соли мочевой кислоты [8], керамики, используемой в искусственных органах [9], каррагенина [10], и бактериальных инфекций [11].

Несмотря на большое количество литературных источников по воспроизведению модели воздушный мешочек, условия проведения могут отличаться. В обзоре рассматриваются ключевые требования и особенности методологии при воспроизведении модели острого воспаления «каррагениновый воздушный мешочек» у крыс и мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Исследование проводят на мелких лабораторных грызунах (мыши, крысы). Причем, воспроизведение модели воздушного мешочка на мышах имеет ряд преимуществ из-за возможности использования генетически модифицированных (knockout) животных.

Оптимальный вес животных по Current Protocols in Pharmacolodgy 5.6.1-5.6.8 у крыс составляет — 130-150 г, у мышей — 20-25 г [12]. Однако жестких требований в выборе, как веса животных, так и возраста при воспроизведении данной модели нет. В большинстве исследований крыс используют массой тела 200-250 г и мышей массой 25-30 г в связи с преиму-

ществом в увеличении площади поверхности тела животных [1, 2, 13].

Количество животных, используемых в эксперименте должно быть достаточным для полной статистически значимой регистрации изучаемых эффектов. Рекомендуют использовать не менее шести животных одного пола в каждой тестируемой группе [12].

Формирование групп

В дизайне исследования обязательно должны быть указаны контрольная группа, группы с тестируемым ЛС в разных дозах и группа положительного контроля с известным противовоспалительным препаратом [12].

Модель «каррагенинового воздушного мешочка» на крысах

Формирование воздушного мешочка

1.1 Формирование воздушного мешочка осуществляется за шесть дней до индукции воспаления.

В шприц объемом 20 мл набирают воздух. К шприцу прикрепляют стерильную иглу диаметром 23G (игла от шприца объемом 2 мл).

Животное подвергают анестезии в соответствии с выбранным методом (рекомендации к выбору анестезии будут рассмотрены ниже).

За ушами у крысы собирают кожную складку и в основание складки делают инъекцию воздуха в объеме 20 мл. Иголка при ведении должна быть под углом 45° к телу животного (рис. 1, 2).

Анестезия

В соответствии с основным протоколом Current Protocols in Pharmacolodgy 5.6.1-5.6.8 анестезию проводят при помощи общего ингаляционного наркоза и искусственной вентиляции легких в процессе анестезии изофлюраном или галотаном (концентрация 5%) с использованием ветеринарного наркозного аппарата [12]. Применение данных препаратов обеспечивает безопасный, надежный и быстрый способ создания оптимальной глубины



Рис. 1. Подкожная инъекция воздуха крысе



Рис. 2. Сформированный воздушный мешочек у крысы

анестезии с коротким временем восстановления.

Учитывая стоимость анестетиков и требуемого для них оборудования, анестезию можно осуществлять путем кратковременного помещения животного в CO₂-камеру.

По результатам собственного опыта безопасное время пребывания животных в CO_2 -камере с достижением адекватной анестезии для крысы составляет не более 25 секунд, для мышей не более 15 секунд. Но учитывая индивидуальные особенности каждого животного, при выборе в качестве анестезии CO_2 -камеру необходимо осуществлять постоянный контроль за животным во время ингаляции.

1.2 Через трое суток от момента формирования воздушного мешочка проводят вторую подкожную инъекцию воздуха в полость мешочка в объеме 10 мл, также с использованием анестезии (шприц объемом 10 мл, игла диаметром

23G от шприца объемом 2 мл). Повторная инъекция необходима для поддержания объема полости воздушного мешочка.

Индукция воспаления

На шестой день от момента формирования воздушного мешочка (первой инъекции воздуха) в полость воздушного мешочка вводят 2 мл 2 % раствора харрагенина шприцом объемом 5 мл (игла диаметром 23G от шприца объемом 2 мл), с использованием анестезии.

Каррагенин взаимодействует с рецепторами TLR4 на поверхности макрофагов, выстилающих внутрикапсульную область мешочка, что вызывает их активацию и последующий синтез провоспалительных медиаторов (IL-1; IL-6; TNFa, IL-8, простагландинов и лейкотриенов, NO, активных форм кислорода) [14]. Вазодилятация способствует инфильтрации клеток и медиаторов воспаления и опосредуется в ответ на действие NO и некоторых простагландинов. NO образуется из Lаргинина вследствие активации NOсинтазы (NOS) [15]. Другой признак воспалительного процесса, вызванного введением раствора каррагенина, это экссудация жидкости. Экссудат в мешочке образуется в результате накопления богатой белками жидкости во внутритканевое пространство под действием гистамина, брадикинина, лейкотриенов, компонентов комплемента, субстанции Р и тромбоцитактивирующего фактора РАГ. Все эти факторы заметно изменяют барьерную функцию малых кровеносных сосудов и увеличивают проницаемость капилляров и венул как для воды, так и для белков [16, 17]. Вазодилятация и экссудация жидкости сопровождается миграцией лейкоцитов. Нейтрофилы первыми среди лейкоцитов мигрируют в зону воспаления. Процесс трансмиграции нейтрофилов можно разделить на несколько староллинг, адгезия, диапедез (трансмиграция) и хемотаксис [15]. Уже

через 6 часов после введения раствора каррагенина наблюдается резкое увеличение в экссудате лейкоцитов (до $10\text{-}20\text{x}10^6$ кл/мл). Из них 80-90% составляют нейтрофилы. Значительно повышается уровень провоспалительных медиаторов, включая $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, лейкотриенов и простагландинов [2].

Таким образом, инъекция раствора каррагенина в воздушный мешочек воспроизводит воспалительную реакцию, которая характеризуется инфильтрацией выстилки мешочка клетками, увеличением экссудата и массивным высвобождением провоспалительных медиаторов, таких как простагландины, лейкотриены и цитокинов.

Помимо λ -каррагенина, в качестве раздражающего агента можно использовать зимозан или липополисахарид (LPS). В большинстве случаев используют λ -каррагенин из-за развития мощной воспалительной реакции.

Введение исследуемых препаратов

Для изучения эффектов препаратов в модели острого воспаления могут быть использованы различные пути введения, но наиболее распространенный - способ, являющийся аналогом планируемого пути введения человеку в клинической практике. Не исключаются и другие пути введения, например, в полость воздушного мешочка. Выбор способа введения должен быть научно обоснован.

Время введения тестируемого ЛС или референтного препарата в группе положительного контроля (например, индометацин или дексаметазон) должны быть определены в соответствии с фармакокинетикой препаратов. Как правило, индометацин вводят непосредственно перед инъекцией каррагенина, тогда как дексаметазон вводят за 3 часа до индукции воспаления [14]. Все исследуемые объекты в эксперименте вводят однократно.

Эвтаназия животных

В зависимости от анализируемых па-

раметров животных эвтаназируют от 1 часа до 24 часов после индукции воспаления [12] путем помещения животного в ${\rm CO_2}$ -камеру, в условиях постепенного заполнения камеры диоксидом углерода.

5. Сбор экссудата из воздушного ме-

После эвтаназии, животному в полость воздушного мешочка вводят 5 мл раствора для промывания (шприц 5 мл, игла диаметром 23G от шприца объемом 2 мл) и мягко массируют область мешочка для смешения содержимого. Раствор для промывания представляет собой 2% раствор ЭДТА (10 г ЭДТА смешивают с 500 мл 0,9% физиологического раствора). ЭДТА добавляют с целью предотвращения агрегации клеток.

Далее содержимое мешочка вскрывают. В соответствии с протоколом 5.6.1-5.6.8 в области мешочка ножницами делают сагиттальный разрез приблизительно 2 см. Далее пипеткой собирают весь воспалительный экссудат в стерильные центрифужные пробирки объемом 15 мл [12]. Пробирки с экссудатом сразу после забора должны быть помещены на лед с целью сохранения уровней исследуемых показателей.

По собственному опыту рекомендуется при заборе экссудата брать животное вертикально за воздушный мешочек и делать горизонтальный надрез около 3 мм в верхней части воздушного мешочка (рис. 3). Экссудат рекомендуется собирать путем помещения в разрез шприца объемом 10 мл с атравматичным зондом вместо иглы (рис. 4).

Оцениваемые показатели

Для оценки степени воспаления и эффективности исследуемых лекарственных средств используются различные параметры. Например, измерение объема экссудата, анализ про-и противовоспалительных медиаторов (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, PGE₂), определение NO, общего белка, анализ клеточного состава экссудата.



Рис. 3.
Вскрытие
«каррагенино
вого воздушного мешочка» у крысы



Рис. 4. Забор экссудата из полости воздушно мешочка с использованием атравматичного зонда

Кроме того, противовоспалительную активность препаратов можно оценить по результатам гистологического исследования стенок воздушного мешочка [13].

Подготовка проб экссудата к анализу

Экссудат центрифугируют 10 мин при 1000xg, при 4° C. Отбирают 1 мл супернатанта, аликватируют и замораживают при -20° C для сохранения уровней исследуемых показателей, если анализ исследуемых параметров будет выполнен не сразу. Анализ провоспалительных медиаторов, таких как IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, PGE2 чаще всего проводят с использованием коммерчески доступных наборов для иммуно-ферментного анализа.

Модель «каррагенинового воздушного мешочка» на крысах

Для воспроизведения модели у мышей, как и у крыс, подкожно в основание собранной кожной складки за ушами вводят 5 мл воздуха (шприц 5 мл, игла диаметром 26G от шприца объемом 1 мл) с последующим повторным введением 2 мл воздуха через 3 дня после первой инъек-



Puc.5. Сформированный воздушный мешочек у мыши.

ции для поддержания мешочка (рис. 5). Чтобы вызвать воспаление через 6 дней после первой инъекции воздуха, вводят 1 мл 1% раствора λ -каррагенина в сформированный мешочек. После эвтаназии мышам внутрь мешочка вводят 1 мл раствора для промывания.

Предупреждение ошибок

Животные до начала эксперимента должны пройти адаптацию не менее 1 недели, чтобы предупредить влияние стресса.

Все манипуляции с экссудатом, супернатантом и клетками необходимо проводить на льду с целью сохранения исходных уровней анализируемых показателей и свести к минимуму гибель клеток.

Важно контролировать в экссудате возникновение процессов синтеза и катаболизма. Например, если планируется измерять уровень простагландинов, то в экссудат в состав раствора для промывания должны быть включены ингибиторы циклооксигеназы, для предотвращения синтеза ex-vivo эйкозаноидов [12].

Ожидаемые результаты

Теоретически выход экссудата из воздушного мешочка у крыс составляет, как правило, 7 мл: 5 мл раствора для промывания и 2 мл раствора каррагенина. Для мышей объем экссудата также эквивалентен сумме вводимых растворов и составляет 2 мл. Тем не менее, выделенный объем экссудата может варьировать.

Время между первой инъекцией воздуха и введением каррагенина влияет на

величину воспалительного ответа. Так если каррагенин вводить меньше чем через 6 дней после первой инъекции воздуха, то общая воспалительная реакция будет снижена. Сами по себе стенки нестимулированного воздушного мешочка выстланы преимущественно моноцитами/ макрофагами, число которых при непосредственном выделении составляет от $1x10^6$ до $5x10^6$ клеток. По результатам собственных микроскопических исследований стенка воздушного мешочка у интактного животного, образована волокнистой соединительной тканью, состоящей преимущественно из тонких коллагеновых волокон и клеток фибробластического ряда, и формирует выросты, выстланные клетками, морфологически схожими с синовиоцитами синовиальной оболочки сустава (рис. 6). Значительная клеточная инфильтрация происходит в ответ на введение каррагенина. В течение первых 24 часов инфильтрат в основном состоит из полиморфноядерных клеток (80-90%) с постепенным увеличением мононуклеарных клеток до 25% от общего объема через 48 ч. Гистологически после введения каррагенина, отмечается утолщение и гиперплазия стенки, сопровождающееся умеренной и выраженной диффузной смешанноклеточной, преимущественно нейтрофильной и лимфоцитарной воспалительной инфильтрацией, как самой стенки мешочка, так и подлежащей жировой ткани (рис. 7). Инъекция каррагенина в воздушный мешочек вызывает заметное увеличение выделения медиаторов таких как простагландины, лейкотриены, цитокины. Увеличение этих медиаторов, как правило, наблюдается в течение часа после инъекции каррагенина и образует пики в различные моменты времени, в зависимости от изучаемого параметра.

В таблице 1 перечислены эффекты препаратов, которые обычно используют в качестве положительного контроля, на крысах и мышах в модели «карраге-

Таблица 1 Эффекты противовоспалительных препаратов на модели «каррагениновый воздушный мешочек»

| мешочек» | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|---|---|---|---|--|--|--|--|
| Вид жи- вотн ых | Источ- ник | % р-ра каррагени на/ Время забора экссудата | Анализируемые параметры в экссудате | Уровень параметров в кон- трольной группе | Позитивный контроль/ уровень параметра | | | | |
| кры- сы | Sedgwick and Lees, 1986 [1] | 1% / 6ч | Общее кол-во лейкоцитов, х 10^6 / мл | ≈16 | Дексаметазон (80 мг/кг)/ \approx 8; Дексаметазон (160 мг/кг)/ \approx 6 | | | | |
| | | | PGE ₂ , нг/мл | ≈11 | Дексаметазон (80 мг/кг)/ \approx 9; Дексаметазон (160 мг/кг)/ \approx 6 | | | | |
| | Futaki et al., 1993 [18] | 1% /3ч | PGE_2 , (% относительно интактной группы) | 683±12 | Индометацин (3 мг/кг)/ 52,8±12,0 | | | | |
| | Kim et al., 2006 [19] | 1% 24ч | РGЕ ₂ , нг/мл | ≈26 | Индометацин (5 мг/кг)/ \approx 6 | | | | |
| мы- ши | Romano et al., 1997 [20] | 1% /24ч | Общее кол-во лейкоцитов, х 10^6 / мл | 28,95±8,4 | Дексаметазон (0,2% с питьевой воде)/ 0,62 \pm 0,19; Индометацин (2 мг/кг)/ 13,8 \pm 1,35 | | | | |
| | | | TNFα, пг/мл | 1470±480 | Дексаметазон (0,2% с питьевой воде)/ $<$ 50, Индометацин (2 мг/кг)/ 110 ± 40 | | | | |
| | | | PGE ₂ , пг/мл | > 3200 | Дексаметазон (0,2% с питьевой воде)/ 983±659, Индометацин(2 мг/кг)/1170± 1523 | | | | |
| | Vigil et al., 2008 [21] | 1% /24ч | Общее кол-во лейкоцитов, х 10^6 / мл | $7,9 \pm 0,2$ | Дексаметазон (0,5 мг/кг)/ $3,8 \pm 0,2$, Индометацин (5 мг/кг)/ $2,7 \pm 0,3$ | | | | |
| | | | Общее кол-во нейтрофилов, х 10^6 /мл | $7,4 \pm 0,1$ | Дексаметазон (0,5 мг/кг)/ $2,9 \pm 0,2$, Индометацин (5 мг/кг)/ $2,0 \pm 0,4$ | | | | |
| | | | IL-1β, пг/мл | 2066,0 ± 4,0 | Дексаметазон (0,5 мг/кг)/ $24,3 \pm 5,8$,Индометацин (5 мг/кг)/ $645,9 \pm 297,3$ | | | | |
| | | | TNFα, пг/мл | 5283,0 ± 529,1 | Дексаметазон (0,5 мг/кг)/ $2799,0 \pm 179,9$, Индометацин $(5 \text{ мг/кг})/5225,0 \pm 325,4$ | | | | |
| | | | NO, мкмоль | $12,7 \pm 0,2$ | Дексаметазон (0,5 мг/кг)/ $5,2 \pm 0,4$, Индометацин $(5 \text{ мг/кг})/8,2 \pm 1,0$ | | | | |
| | Min et al., 2010 [22] | 2% /24ч | ТΝFα, нг/мл | ≈0,8 | Индометацин (5 мг/кг)/ ≈0,5 | | | | |
| | | | PGE ₂ , нг/мл | ≈9 | Индометацин (5 мг/кг)/ \approx 3 | | | | |
| | | | IL-1β, нг/мл | ≈2,2 | Индометацин (5 мг/кг)/ ≈0,4 | | | | |
| | | | Общий белок, мг | ≈0,29 | Индометацин (5 мг/кг)/ ≈0,10 | | | | |

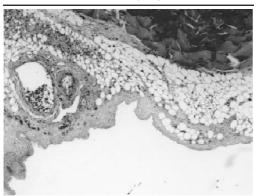


Рис. 6. Срез стенки воздушного мешочка интактной крысы (стрелкой указаны выступы сходные с синовиацитами). Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 50.

ниновый воздушный мешочек».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, модель 6-дневного каррагенинового воздушного мешочка у крыс и мышей близко имитирует многие аспекты воспаления суставов, является идеальной моделью для изучения противовоспалительных эффектов стероидных и нестероидных препаратов (НПВП), а также для изучения гранулематозного воспаления [23], разрешения острого воспаления [24, 25] и оценки окислительного стресса. [26]

Важно понимать, что условием успешного выполнения фармакологического эксперимента является отработка модели, которая позволит подобрать информативные показатели оценки воспаления, выбрать временные точки.

Model of acute inflammation: carrageenan air pouch.

A. Katelnikova, K. Kryshen, A. Muzhikyan, M. Makarova, V. Makarov. *ABSTRACT*

The development of new drugs to treat inflammatory diseases relies on the existence of suitable animal models. Experimental models of cavity inflammation are of special interest and relevance to arthritis, since this inflammation is localised in the synovial

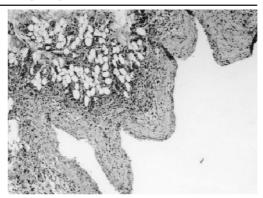


Рис. 7. Срез стенки воздушного мешочка через 6 часов после введения каррагенина (стрелкой указаны выступы сходные с синовиацитами). Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 50.

cavity. The subcutaneous air pouch is an in vivo model that can be used to study acute inflammation, the resolution of the inflammatory response, and the oxidative stress response. Inflammation is induced in the 6day-old rat or mouse air pouch by injection of carrageenan. Besides carrageenan, other irritants such as zymosan or lipopolysaccharide (LPS) can be used to induce inflammation in this model. The model is characterized in terms of leukocyte influx, granuloma formation, increase of exudate volume, total protein, proinflammatory mediators such as NO, prostaglandins, TNFα, IL-1β. In this review main requirements and especially the methodology of model of acute inflammation «carrageenan air pouch» execution are considered.

Key words: carrageenan, carrageenan air pouch, acute inflammation, synovial cavity. *ЛИТЕРАТУРА*

1. Sedgwick A.D., Lees P.A. Comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat // Agents Actions. -1986. -Vol.18. -P.439-446. 2.Martin S.W., Stevens A.J., Brennan B.S. The six-day-old rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan // J. Pharm. Tox. Methods. -1994. -Vol.32. -P.139-147. 3. Sedgwick A.D., Sin Y.M. Increased in-

- flammatory reactivity in newly formed lining tissue // J. Path. –1983. -P.483-495.
- 4. Edwards J.C.W., Sedgwick A.D. The formation of a structure with the function of synovial lining by subcutaneous injection of air. An invivo tissue culture system // J. Path. –1981. -Vol.134. -P.147-156.
- 5. Selye H. On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissue to injury // J. Am. Med. Assoc. -1953. -Vol.152. -P.1207- 1213.
- 6. Konno S., Tsurufuji S. Induction of zymosan-air-pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anticomplementary and anti-inflammatory agents // Br. J. Phar. –1983. -Vol.80. P.269 -277.
- 7. Ishikawa H., Niinobe S., Tsurufuji S. Studies on the mode of action of anti-inflammatory agents. Quantitative analysis of anti-inflammatory effects by carboxymethyl cellulose pouch method // Yakugaku Zasshi. –1968. -Vol.88. -P.1472-1477.
- 8. Gordon T.P., Kowanko I.C., James M. Monosodium urate crystal-induced prostaglandin synthesis in the rat subcutaneous air pouch // Clin. Exp. Rheumatol. -1985. Vol.3. -P.291-296.
- 9. Nagase M., Baker D.G., Schumacher J. Prolonged inflammatory reactions induced by artificial ceramics in the rat air pouch model // J. Rheumatol. –1988. -Vol.15. -P.1334 1338.
- 10. Fukuhara M., Tsurufuji S. The effect of locally injected anti-inflammatory drugs on the carrageenin granuloma in rats // Biochem Pharmacol. –1969. -Vol.18. -P.475-484.
- 11.Yoshino S., Cromartie W.J., Schwab J.H. Inflammation induced by bacterial cell wall fragments in the rat air pouch: Comparison of rat strains and measurement of arachidonic acid metabolites // Am. J. Pathol. 1985. Vol. 121. P. 327-336.
- 12. Current Protocols in Pharmacology 5.6.1 -5.6.8. John Wiley & Sons, Inc. March, 2012.
- 13. Garcı'a-Ramallo E., Marques T. Resi-

- dent cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation // J. of Imm. 2002. –Vol.169. -P.6467–6473.
- 14.Tsuji R., Hoshino K., Noro Y. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity // Clin. Exp. Allergy. -2003. -Vol. 33. -P.249-258.
- 15. Sherwood E., Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response // Best Practice & Research Cl. Anaest. -2004. Vol.18. -P.385-405.
- 16. Friedl H., Till G., Trentz O. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin // Am. J. of Pat. 1989. -Vol.135. -P.203-217.
- 17. Denzlinger C., Rapp S., Hagmann W. Leukotrienes as mediators in tissue trauma // Science. -1985. -Vol.230. -P.330-332.
- 18. Futaki R., Arai I., Hamasaka Y. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenanair-pouch inflammation // J. Pharm. –1993. Vol.45. –P.753-755.
- 19. Kim J.Y., Hwang Y.P. Inhibitory effect of the saponins derived from roots of platy-codon grandiflorum on carrageenan-induced inflammation // Biosci. Biotechnol. Biochem. –2006. -Vol.70. –P.858–864.
- 20. Romano M., Faggioni R., Sironi M. Carrageenan-induced acute in- flammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor // Mediators Inflamm. -1997. -Vol.6. -P.32-38.
- 21. Vigil S.V., Liz R. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch // Transplant Immunology. –2008. -Vol.19. P.25–29.
- 22. Sung-Won Min, Su-Noh Ryu. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acidInternational // Immunopharm. –2010. -P.959–966.
- 23. Vane J.R., Mitchell J.A., Appleton I.

Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. -1994. -Vol.91. – P.2046–2050.

24. Ariel A., Serhan, C.N. Resolvins ad protectins in the termination program of acute in - flammation. Trends Immunol. -2007. - Vol. 28. -P. 176-183.

25. Serhan C.N., Krishnamoorthy S., Rec-

chiuti A., Chiang, N. Novel antiinflammatory pro-resolving mediators and their receptors // Curr. Top. Med. Chem. -2011. -Vol.11. –P.629–647.

26. Jain M., Parmar, H.S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation // Inflamm. Res. - 2011. -Vol.60. -P.483–491.

УДК: 612.67

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ БОЛИ И НОЦИЦЕПЦИИ

Шекунова Е.В. 1,2 , Кашкин В.А. 1,2 , Макарова М.Н. 1 , Макаров В.Г. 1 - Санкт-Петербургский институт фармации; 2 – Институт фармакологии им. А.В.Вальдмана ПСПбГМУ им. акад. И.П.Павлова



РЕЗЮМЕ

Проблема изучения боли и ноцицепции является одним из актуальных направлений современной биомедицины. Тесты с использованием аверсивных стимулов различной модальности (термических механических, электрических, химических) позволяют оценивать ноцицептивные реакции. Однако понятия «боль» и «ноцицепция» не идентичны. Ноцицепция - это нейрональные процес-

сы кодирования и обработки повреждающих стимулов, а боль определяется как эмоциональное переживание, возникающее в ответ на повреждение тканей. В последние годы появились новые методические подходы, позволяющие оценивать не только ноцицептивные рефлексы, но и моделировать боль у лабораторных грызунов. Все это позволяет совершенствовать трансляционные исследования в биомедицине. В этом отношении, большое значение имеет подбор адекватных экспериментальных моделей, тестов и процедур, отвечающих целям эксперимента, а также выбор релевантных протоколов исследования.

Ключевые слова: боль, ноцицепция, экспериментальная модель, аналгезия, грызуны.

ВВЕДЕНИЕ

Боль — это не только симптом многих острых и хронических заболеваний, но и сложный психофизиологический феномен. Общим свойством разных по своей модальности стимулов, способных вызвать боль, является повреждение тканей. В начале 20-го века английский физиолог Ч.С. Шеррингтон ввел понятие «ноцицепция» (от латинского «посеге» -

причинять вред) [1]. Однако понятия «боль» и «ноцицепция» не идентичны. Согласно определению, данному Международной Ассоциацией по изучению боли (International Association for the Study of Pain (IASP)), ноцицепция - это «нейрональные процессы кодирования и обработки повреждающих стимулов», а боль определяется как «неприятное ощущение и эмоциональное переживание,