

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭВКАЛИМИНА – ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

В.В. Бортникова

к.б.н., вед. науч. сотрудник, отдел токсикологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: bortnikova.v@yandex.ru

Л.В. Крепкова

к.б.н., зав. отделом токсикологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail mail: krepkova2011@yandex.ru

Н.М. Крутикова

к.б.н., вед. Эксперт, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (Москва)
E-mail: nat.krutickova@yandex.ru

Т.В. Фатеева

зав. лабораторией микробиологических исследований,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: fateeva2151@mail.ru

Представлены результаты доклинического экспериментального изучения специфической фармакологической активности эвкалимина, лекарственного фитопрепарата антимикробного действия, его безопасности, включая исследование специфических видов токсичности. В опытах *in vitro* выявлены высокая антимикробная активность эвкалимина в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов, отсутствие развития резистентности штаммов стафилококка к препарату; в опытах *in vivo* на различных моделях локализованных экспериментальных инфекций показано выраженное химиотерапевтическое действие эвкалимина: сроки заживления ран, общая площадь поражения и сроки высеваемости возбудителя достоверно ниже у экспериментальных животных, получавших лечение эвкалимином по сравнению с группами контрольных животных. Установлена низкая токсичность эвкалимина при однократном и длительном введении лабораторным животным, отсутствие у препарата эмбриотоксических и тератогенных, мутагенных, аллергизирующих свойств; при этом у эвкалимина обнаружены иммуностимулирующие свойства.

Ключевые слова: экспериментальное изучение антимикробных свойств эвкалимина, доклиническое токсикологическое исследование.

Для цитирования: Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Крутикова Н.М., Фатеева Т.В. Доклиническое изучение эвкалимина – лекарственного средства антимикробного действия. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018; 21(4):35–45. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-07

Широкое бесконтрольное применение антибиотиков и уникальная способность микроорганизмов приспосабливаться к новым условиям существования приводят к возникновению резистентных (устойчивых) штаммов патогенных возбудителей бактериальных инфекций и их распространению в окружающей среде. Рост резистентности среди возбудителей инфекций к существующим антибиотикам представляет серьезную угрозу эффективности применяемой антибиотикотерапии, оборачивается увеличением частоты и длительности госпитализаций и случаев летальности от осложнений инфекционного заболевания. Проблема лечения бактериальных инфекций и поиска новых препаратов для эффективной антибиотикотерапии приводит к появлению на фармацев-

тическом рынке все более дорогих и, как правило, более токсичных антибактериальных средств.

Антибиотики выписываются чаще, чем другие препараты – только в США их ежегодно продается на 5 млрд долларов. На антибиотики приходится почти 30% препаратов, назначаемых детям. За последние 10 лет производство антибиотиков выросло в 3 раза, в то время как численность населения – в 1,11 раз. При этом от 30 до 65% назначений антибиотиков оказываются недостаточно обоснованными. Как показали маркетинговые исследования, в амбулаторной практике каждый второй врач назначает антибиотики при простуде, считая, что нелеченая инфекция опаснее побочных эффектов антибиотиков [1]. Поэтому разработка оригинальных антимикробных средств

иной природы, с новыми свойствами и принципиально другим механизмом действия является актуальной задачей современной медицины.

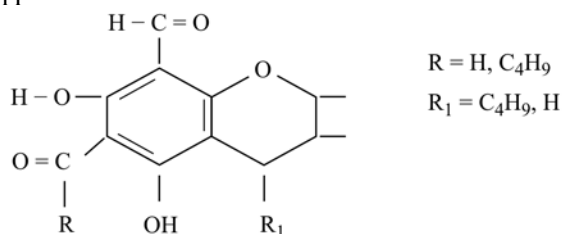
Среди лечебных средств, обладающих антимикробной активностью, особую группу представляют ингибиторы микроорганизмов растительного происхождения, отличающиеся наличием хорошей переносимости в терапевтических дозах и активностью в отношении антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов. Их применение отвечает тенденциям развития современной науки, создающей предпосылки для открытия новых направлений фармакотерапии и профилактики, создания более физиологичных малотоксичных лекарств нового поколения [2, 3].

Многолетние исследования, проводимые в ФГБНУ ВИЛАР, привели к созданию ряда эффективных противомикробных лекарственных средств, среди которых достойное место занимает эвкалимин, препарат широкого спектра антимикробного действия.

Цель исследования – экспериментальное изучение антимикробных свойств эвкалимина, полученного из лекарственного растительного сырья, и доклиническая оценка его безопасности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эвкалимин получают из листьев и побегов эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.) семейства миртовых (*Myrtaceae*). Субстанция эвкалимин представляет собой стандартизованную очищенную сумму терпеноидных фенолоальдегидов флороглюцинового ряда (эуглобали) и тритерпеноидов. За биологическую активность препарата ответственны фенолальдегиды флороглюцинового ряда (эуглобали), формулы $C_{23}H_{30}O_5$ и $C_{28}H_{38}O_5$, содержание которых в субстанции составляет не менее 40% и имеющие общий фрагмент:



Эвкалимин субстанция – аморфный порошок серовато-кремового цвета или серовато-кремового цвета с зеленоватым оттенком, со специфическим

запахом, напоминающим запах исходного сырья, электризуется. Умеренно растворим в 95%-ном спирте, мало растворим в хлороформе, практически не растворим в воде [4].

Исследования проведены в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [5]. Эксперименты на животных проведены в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986). Животные получены из питомника ФГБНУ ВИЛАР (Москва).

Антимикробный спектр субстанции эвкалимина изучали в опытах *in vitro* методом двукратных серийных разведений в соответствующих каждому микроорганизму жидких питательных средах. В качестве тест-микроорганизмов использовали грамположительные и грамотрицательные бактерии рода *Staphylococcus*, *Streptococcus Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *B. subtilis*, *B. anthracoides*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* и др., а также некоторые патогенные грибы и вирусы. Важным этапом исследований являлось изучение активности эвкалимина в отношении клинических штаммов патогенных бактерий, выделенных из биологического материала (кровь, воспалительные экссудаты различного происхождения) от больных, находящихся на стационарном лечении ряда клиник г. Москвы: НИИ трансплантологии и искусственных органов, НИИ акушерства гинекологии и перинатологии, институт хирургии им. А.В. Вишневского, ЦКБ № 1 и РМАПО.

Исследование потенциальной возможности развития резистентности микроорганизмов к эвкалимину проводили методом непрерывных воздействий и методом серийных пассажей с использованием лабораторного и клинического штаммов золотистого стафилококка.

Химиотерапевтическую эффективность эвкалимина в виде готовых лекарственных форм (1%-ный спиртовой раствор, суппозитории с эвкалимином 0,05 г и 0,03 г) изучали в опытах *in vivo* на экспериментальных моделях локализованного инфекционного процесса белых крыс, вызванного *Staphylococcus aureus*, (инфицированная рана, гнойная язва и стафилококковый вагинит).

Параметры токсичности субстанции эвкалимина определяли при однократном внутрибрюшинном или пероральном способе введения белым нелинейным мышам и крысам Вистар обоего пола, а также пестрым морским свинкам-самцам с использованием метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксону.

Для исследования кумулятивных свойств эвкалимина применяли метод Лима, основанный на сопоставлении токсического действия веществ по показателям средних смертельных доз при их однократном введении препарата и назначении в режиме повторных введений – подострого эксперимента в дозах, увеличивающихся в 1,5 раза каждые четыре дня. Оценку кумулятивных свойств проводили на мышах-самцах при внутрибрюшинном введении с помощью расчета коэффициента кумуляции (вещества, имеющие коэффициент кумуляции 1 или меньше, обладают кумулятивными свойствами).

Общетоксическое действие эвкалимина проводили в условиях подострого 30-дневного эксперимента на 40 нелинейных крысах-самцах, разделенных на 4 экспериментальные группы по 10 животных в каждой. Эвкалимин вводили в желудок в дозах 5, 50 и 500 мг/кг. В качестве контроля использовали крыс, получавших растительное масло, предназначенное для растворения субстанции эвкалимина. Хронический эксперимент проводили на 40 крысах Вистар, самцах при ежедневном введении в желудок эвкалимина в дозах 5, 50 и 250 мг/кг в течение 90 дней. Максимальная испытанная доза эвкалимина в эксперименте соответствовала примерно 1/20 ЛД₅₀ для крыс при внутрижелудочном введении.

Перед началом эксперимента у животных брали кровь для определения некоторых фоновых показателей (число эритроцитов, лейкоцитов, содержание гемоглобина), на основании которых формировали экспериментальные группы. В исследовании регистрировали интегральные показатели здоровья животных: внешнее состояние и потребление корма и воды, прирост массы тела. Ежемесячно брали пробу периферической крови для исследования гематологических показателей (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, гематокрит), время свертывания крови по методу Моравица, ряда биохимических показателей и активности ферментов сыворотки крови (общий белок, белковые фракции, мочевины, глюкоза, общий холестерин,

щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, аланин- и аспартаттрансаминазы, фруктозо-1,6-дифосфат альдолаза) с использованием общепринятых стандартных методов, характеризующих функциональное состояние печени, поджелудочной железы, почек, сердечно-сосудистой системы. В те же сроки проводили ЭКГ-исследование, определяли диурез на фоне 3%-ной водной нагрузки и осуществляли ЦНС-исследование по «ориентировочным реакциям». Эвтаназию подопытных животных осуществляли в СО₂-камере, определяли коэффициенты массы внутренних органов, проводили их патогистологическое исследование (гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином).

Исследование потенциальных аллергизирующих свойств эвкалимина выполняли на морских свинках-альбиносах по методу О.Г. Алексеевой и А.И. Петкевич, а также с использованием модели анафилактической реакции изолированного отрезка тонкой кишки и непрямой реакции дегрануляции тучных клеток.

Потенциальные иммуномодулирующие свойства эвкалимина изучали на модели тимус-зависимого иммунного ответа. Влияние препарата на гуморальное звено иммунитета проводили на 40 мышах линии *СВА* и 40 крысах Вистар. Иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке экспериментальных животных, используя прямой метод локального гемолиза в модификации Cunningham. Мышей и крыс иммунизировали внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (ЭБ), в оптимальной иммуногенной дозе. Эвкалимин вводили мышам внутрибрюшинно однократно в дозах 0,5, 5,0 и 25 мг/кг, крысам – внутрижелудочно в течение 90 дней в дозах 5, 25 и 250 мг/кг. На 5-е сутки после иммунизации животных декапитировали и в суспензии клеток селезенки определяли число АОК, а в сыворотке крови – титр гемагглютининов в реакции гемагглютинации, поставленной в микротетраторе Такачи. Контрольным животным вводили соответствующее количество 0,9%-ного раствора NaCl. Влияние препарата на клеточный иммунитет изучали на 100 мышах линии *СВА*, разделенных на 4 группы по 10 животных в каждой с помощью реакции гиперчувствительности «замедленного» типа (ГЗТ). Эвкалимин вводили мышам однократно внутрибрюшинно в дозах 0,5, 5,0 и 25 мг/кг за сутки до иммунизации ЭБ («Д-1»), одновременно с иммунизацией («Д-0») и через 24 ч

после инъекции антигена («Д+1»). Контрольные мыши получали внутривентриально в режиме «Д+1» соответствующие количества 0,9%-ного раствора NaCl. На 5-е сутки после иммунизации все животные получали субплантарно в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе 5×10^8 клеток на мышшь в объеме 50 мкл (опытная лапка). В подушечку контрлатеральной лапы (контрольная лапка) вводили 50 мкл 0,9% раствора NaCl. Результаты реакции регистрировали через 24 ч путем взвешивания «контрольной» и «опытной» лапок: разница в их массе характеризовала величину отека и интенсивность реакции ГЗТ. Индекс реакции вычисляли по формуле

$$ИР = \frac{P_o - P_k}{P_o} \times 100,$$

где P_o – масса опытной лапки; P_k – масса контрольной лапки.

Кроме того, определяли фагоцитарную активность нейтрофилов в крови крыс, получавших эвкалимин в подостром и хроническом экспериментах, с вычислением опсоно-фагоцитарного индекса.

Потенциальные эмбриотоксические и тератогенные свойства эвкалимина исследовали при внутрижелудочном введении субстанции препарата белым нелинейным крысам-самкам (масса тела 210–230 г) с 1-го по 19-й день беременности в дозах 5,50 и 250 мг/кг. Контрольным животным вводили растворитель субстанции эвкалимина – растительное масло. На протяжении всей беременности определяли массу тела крыс. Состояние потомства оценивали в конце антенатального периода, на 20-й день беременности. У каждой самки подсчитывали количество желтых тел беременности, мест имплантации, количество живых и мертвых плодов и вычисляли относительную гибель эмбрионов до и после имплантации. Плоды извлекали, взвешивали, измеряли краниокаудальные размеры, подвергали внешнему осмотру и затем разделяли на две группы для изучения у них костной системы (по методу Доусона) и внутренних органов (по методу Вильсона). Для исследования состояния потомства в постнатальном периоде жизни часть самок оставляли для рождения и вскармливания крысят. У потомства до 60-го дня жизни учитывали прирост массы тела и выживаемость. Оценивали скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания. Использовали тесты: переворачивание на плоскости (8-й день), избегание обрыва (9-й день). Исследовали эмоционально-двигательное поведение

и способность к тонкой координации движений – переворачивание в свободном падении (20-й день), «открытое поле» (30-й день). В опытах обследовали все потомство.

Потенциальные мутагенные свойства эвкалимина изучали методом учета хромосомных аберраций.

Исследование местнораздражающего действия проводили при подкожном введении крысам масляных растворов препарата в концентрациях 0,1; 1,0 и 10,0% и при субконъюнктивальном введении кроликам 50 мг субстанции препарата.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента и критерия «U» Вилкоксона–Манн–Уитни. Статистические данные обрабатывали с помощью программы Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При доклиническом исследовании специфической фармакологической активности в опытах *in vitro* установлено наличие у эвкалимина значительного ингибирующего эффекта в концентрациях 0,24–62,5 мкг/мл в отношении различных штаммов стафилококка, стрептококка, туберкулезных микобактерий, дифтерийных палочек и других грамположительных тест-микроорганизмов. Ингибирующий эффект эвкалимина был ниже в отношении мицелиальных грибов рода *Microsporum* и *Trichophyton*, дрожжеподобных грибов рода *Candida* (250–1000 мкг/мл) и в дозах 1000–1500 мкг/мл – в отношении грамотрицательных микроорганизмов рода *Escherichia*, *Proteus* и *Pseudomonas* (табл. 1).

При исследовании эффективности в отношении 160 клинических штаммов микроорганизмов с высокой степенью полирезистентности к широко применяемым антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам, выделенным от стационарных больных, установлена высокая антимикробная активность эвкалимина в отношении *Staphylococcus aureus* (1,95–31,2 мкг/мл), *Streptococcus pneumoniae* и *Str. viridans* (1,95–31 мкг/мл), *Str. faecalis* (0,49–1,95 мкг/мл), *Corynebacterium diphtheriae* (3,9–62,5 мкг/мл). Из 60 клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов относительно более чувствительными к эвкалимину оказались бактерии рода *Acinetobacter* и *Serratia* (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) <125 мкг/мл).

Таблица 1. Антимикробный спектр эвкалимина

Наименование штаммов	МИК, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i> “Жаев”	0,98
<i>Staphylococcus aureus</i> “Турі”	15,6
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	0,98–7,8
<i>Staphylococcus aureus</i> 69-P	31,2
<i>Staphylococcus aureus</i> 20-P	1,95
<i>Staphylococcus aureus</i> 18-P	62,5
<i>Streptococcus haemolyticus</i> 295	0,98
<i>Streptococcus pyogenes</i> 1512 группы А	0,98–1,95
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	3,9–7,8
<i>Bacillus anthracoides</i> 96	0,49
<i>Corynebacterium diptheriae gravis</i> 75	7,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H-37 Rv	62,5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> “Academia”	7,8–31,2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1500
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6896	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1000
<i>Microsporium canis</i> 352	250
<i>Trichophyton mentagrophytes granulatum</i> (gypseum)	500
<i>Trichophyton mentagrophytes granulatum</i> 3/4	1000
<i>Trichophyton mentagrophytes interdigitale</i> 41/2922	1000
<i>Trichophyton rubrum</i>	1000
<i>Candida albicans</i>	125–250

Учитывая высокую эффективность эвкалимина в отношении патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, обладающих моно- и полирезистентностью, было целесообразно изучить возможность развития устойчивости к эвкалимину данного вида микроорганизмов. В условиях метода непрерывного воздействия и метода серийных пассажей (в течение 20 пассажей) не выявили воз-

растания устойчивости обоих штаммов стафилококка (лабораторный чувствительный и клинический полирезистентный) к эвкалимину, что позволило предположить малую вероятность снижения чувствительности патогенных бактерий к эвкалимину при его применении в практической медицине. Впоследствии полученные результаты были подтверждены результатами многочисленных клинических исследований [6].

При изучении химиотерапевтического действия эвкалимина на различных моделях локализованного инфекционного процесса (исследования *in vivo*) установлена высокая эффективность 1%-ного спиртового раствора эвкалимина: на модели инфицированной стафилококком раны белых крыс сроки заживления ран, леченых эвкалимином в разведении 1:50 ($15,6 \pm 1,4$ суток) достоверно ниже в сравнении с контрольными группами (этиловый спирт 1:50 – $19,10,01$ суток и без лечения – $18,3 \pm 0,49$ суток); на модели гнойной язвы белых крыс, инфицированной стафилококком, сроки заживления ран леченых эвкалимином в разведении 1:5 ($13,3 \pm 1,91$ суток) площади поражения $577,1 \text{ мм}^2$ были достоверно ниже в сравнении с контрольными группами (1%-ный раствор хлорофиллипта 1:5 – $15,4 \pm 1,4$ суток и $653,8 \text{ мм}^2$; без лечения – $16,3 \pm 0,57$ суток и $647,7 \text{ мм}^2$); на модели экспериментального стафилококкового вагинита белых крыс показано статистически достоверное преимущество суппозиториев эвкалимина по эффективности перед хлорофиллиптом (масляный раствор) при сравнении их в одинаковых дозах при интравагинальном введении (сроки высеваемости стафилококка составили 2,7 и 4,5 суток соответственно; контроль без лечения – 6,0 суток).

По данным ряда авторов, исследование механизма действия эвкалимина с использованием некоторых биохимических моделей (бактериальная нуклеаза, вирусная нейраминидаза, биосинтез ДНК) и электронно-микроскопическое изучение показали, что первичной клеточной мишенью эвкалимина является фосфолипидный бислой клеточных мембран, а одним из механизмов антимикробного действия эвкалимина может являться разобщение процессов митохондриального дыхания и фосфорилирования [7].

При однократном внутривнутрибрюшинном введении эвкалимина мышам, крысам и морским свинкам не установлено существенных различий в чувствительности животных к препарату. Кроме того, самцы и самки проявляли одинаковую чувстви-

тельность к препарату. При введении эвкалимина в желудок мышам и крысам показатели средне- смертельных доз возрастали в 15–25 раз; по срав-

нению с внутрибрюшинным введением и у крыс они были статистически достоверно выше, чем у мышей (табл. 2).

Таблица 2. Показатели средних смертельных доз (мг/кг) эвкалимина при однократном введении различным видам лабораторных животных

Вид и пол животных	Способ введения	
	Внутрибрюшинно	Внутрижелудочно
Мыши-самцы	180±14	2820±152
Мыши-самки	170±15	2300±207
Крысы-самцы	230±26	5450±563*
Крысы-самки	198±20	5200±538*
Морские свинки-самцы	190±15	–

Примечание: * – достоверность различий с контролем $p < 0,05$.

Таблица 3. Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов крыс при 30-дневном введении эвкалимина

Группа животных, доза	Исследуемый показатель			
	Число фагоцитирующих клеток на 100 лейкоцитов	Число фагоцитирующих микробов на 100 лейкоцитов	Среднее количество микробов на 1 фагоцитирующую клетку	Опсоно-фагоцитарный индекс
Контроль, растительное масло	48,0±3,0	144,8±18,0	3,0±0,2	1,5±0,1
Эвкалимин, 50 мг/кг	50,0±2,5	198,6±12,6	4,3±0,2*	2,7±0,2*
Эвкалимин, 500 мг/кг	50,4±1,1	229,0±16,7*	4,7±0,4*	3,5±0,3*

Примечание: * – см. табл. 2.

В соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТу 12.1.007-76, по показателям ЛД₅₀ при однократном внутрибрюшинном введении лабораторным животным эвкалимин относится к умеренно токсичным, а при введении в желудок – к малотоксичным веществам [8].

Изучение кумулятивных свойств показало, что эвкалимин хорошо переносился лабораторными животными при повторном внутрибрюшинном введении в возрастающих дозах; средне- смертельная доза при этом режиме введения в несколько раз превышала соответствующий показатель при однократном внутрибрюшинном введении мышам. Коэффициент кумуляции составил 3,05, что свидетельствует об отсутствии у эвкалимина кумулятивных свойств.

Токсичность эвкалимина в условиях подострого эксперимента определялась при воздействии достаточно высоких доз препарата в течение 30 дней с целью выявления органов-мишеней наиболее чувствительных к действию эвкалимина,

а также проверки адекватности, используемых тестов и оценки возможности их применения при введении препарата в меньших дозах в условиях хронического эксперимента.

Проведенные исследования показали, что в условиях подострого эксперимента эвкалимин в дозах 5, 50 и 500 мг/кг не влиял на общее состояние, поведение и динамику массы тела животных. Препарат не влиял на функциональное состояние центральной нервной (по ориентировочным реакциям) и сердечно-сосудистой (ЭКГ-исследования) системы крыс, не оказывал повреждающего действия на гематологические показатели периферической крови и функциональное состояние печени, почек и поджелудочной железы. Установлено, что эвкалимин в дозах 50 и 500 мг/кг повышал фагоцитарную активность лейкоцитов, увеличивая почти в 2 раза опсоно-фагоцитарный индекс по сравнению с контролем (табл. 3).

Большинство побочных эффектов лекарственных препаратов, проявляющихся при их медицинском применении, можно спрогнозировать и пре-

дупредить, исходя из результатов, полученных в эксперименте на лабораторных животных, В связи с этим возрастает роль доклинического изучения безопасности новых лекарственных средств в условиях их длительного введения лабораторным животным (хроническая токсичность).

В результате 90-дневного введения эвкалимина в желудок крысам в дозах 5, 50 и 250 мг/кг не установлено повреждающего действия препарата на основные интегральные показатели животных (общее состояние, поведение, потребление корма и воды, динамику массы тела). Длительное введение эвкалимина не оказывало токсического действия на функциональное состояние сердечно-сосудистой и центральной нервной системы крыс. Так, электрокардиографические исследования, проведенные через 30, 60 и 90 дней введения эвкалимина не выявили кардиотоксического действия, при этом регистрировали правильное чередование интервалов QR, PQ, QRS, ST, TP и были хорошо выражены зубцы P, R и T. Длительность сердечного цикла R-R составляла 0,124–0,140 с, что соответствовало частоте сердечных сокращений 450–520 уд/мин. Функциональное состояние проводящей системы характеризовалось следующими показателями: продолжительность предсердно-желудочковой проводимости PQ – 0,040–0,045 с и внутрижелудочковой проводимости QRS – 0,020 с. Величина зубцов P, R и T составляла соответственно 0,40–0,70 мВ, 0,68–0,69 мВ и 0,07–0,11 мВ, что соответствовало стандартным величинам, характерным для крыс контрольной группы.

Длительное введение в желудок крысам эвкалимина в дозах 5, 50 и 250 мг/кг не влияло на их ориентировочные реакции (количество вставаний на задние лапы, число заглядываний в «норки», груминг, число пересекаемых квадратов за 3 мин).

Исследование функционального состояния почек в условиях водной нагрузки, проведенное в те же сроки введения эвкалимина не выявило нарушений как в динамике диуреза, так и в суммарном количестве мочи (%), выделившейся в течение 5 ч проведения пробы: 110,6±15,2 в контроле, 108,6±10,6, 109,5±11,4 и 107,7±13,2 в группах животных, получавших эвкалимин в дозах 5, 50 и 250 мг/кг соответственно.

В условиях хронического эксперимента препарат не оказывал повреждающего действия на гематологические показатели периферической крови экспериментальных животных (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень

гемоглобина, гематокрит), а также на уровень миелокариоцитов костного мозга бедра крыс ($10^9/л$): в контроле 122,3±10,6 и соответственно в группах животных – 127,1±12,5; 107,2±9,2 и 107,9±8,2.

Длительное введение эвкалимина в желудок крысам в дозах 5, 50 и 250 мг/кг не выявило его влияния на параметры свертывания цельной крови экспериментальных животных по методу Моравица.

Исследование коэффициентов массы внутренних органов крыс, получавших в желудок длительно эвкалимин в дозах 5,50 и 250 мг/кг, не зарегистрировало статистически достоверных различий изученных параметров по сравнению с соответствующими показателями в контроле. Патоморфологические исследования, проведенные в конце хронического эксперимента, подтвердили отсутствие токсического действия эвкалимина на основные внутренние органы крыс (сердце, легкие, печень, почки, селезенка, надпочечники, поджелудочная железа, желудок, тонкий и толстый кишечник, семенники).

Исследование потенциальных аллергизирующих свойств показало, что в экспериментах на морских свинках-альбиносах эвкалимин при внутрикожном введении сенсибилизирующей дозы (5 мг/кг) с последующим накожным нанесением через 12 дней разрешающей дозы не обладал кожно-сенсибилизирующим действием, т.е. проявлений патофизиологической фазы не было. При использовании модели изолированного отрезка тонкой кишки морских свинок, сенсибилизированных эвкалимином, установлено, что процент дегрануляции тучных клеток интактных крыс при контакте с эвкалимином и сывороткой крови сенсибилизированных к нему морских свинок, не превышал допустимых пределов (8%), что позволило исключить наличие патохимической фазы развития аллергической реакции. Таким образом, результаты исследований свидетельствовали об отсутствии у эвкалимина аллергизирующих свойств.

Исследование фагоцитарной активности лейкоцитов крыс, получавших в условиях хронического эксперимента эвкалимин в дозах 50 и 500 мг/кг, выявило увеличение этого показателя в 1,5–2,0 раза у крыс, которым вводили препарат в дозе 50 мг/кг. Этот факт свидетельствовал об усилении общей резистентности организма экспериментальных животных под действием препарата (табл. 4).

При исследовании влияния эвкалимина на процессы антителообразования в эксперименте на крысах, получавших в течение 90 дней препарат в дозах 5, 25 и 250 мг/кг, отмечена значительная активация гуморального иммунитета животных. Она сопровождалась статистически достоверным увеличением числа АОК в селезенке и титра гемагглютининов в сыворотке крови крыс, получавших эвкалимин в до-

зах 25 и 250 мг/кг, по сравнению с контролем. Наиболее выраженный эффект отмечен в группе животных, получавших препарат в дозе 25 мг/кг, где отмечено увеличение количество АОК в селезенке и титра гемагглютининов в сыворотке крови более чем в 2 раза. В дозе 250 мг/кг иммуностимулирующий эффект сохранялся, но был несколько ниже, чем при введении дозы 25 мг/кг (табл. 5).

Таблица 4. Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов крыс при 90-дневном введении эвкалимина

Группа животных, доза	Исследуемый показатель			
	Число фагоцитирующих клеток на 100 лейкоцитов	Число фагоцитирующих микробов на 100 лейкоцитов	Среднее количество микробов на 1 фагоцитирующую клетку	Опсоно-фагоцитарный индекс
Контроль, растительное масло	38,4,0±3,3	130,4±10,5	3,3±0,2	1,3±0,1
Эвкалимин, 50 мг/кг	56,2±5,9	324,2±38,8*	5,8±0,5*	3,2±0,4*
Эвкалимин, 500 мг/кг	54,2±4,3*	207,0±20,4	3,8±0,3	2,1±0,3

Примечание: * – см. табл. 2.

Таблица 5. Показатели гуморального иммунного ответа крыс при 90-дневном введении эвкалимина

Группа животных, доза	Исследуемый показатель	
	Абсолютное количество АОК в селезенке	Обратный титр гемагглютининов в сыворотке
Контроль, интактный	9200±1012	18,0±1,5
Эвкалимин, 5 мг/кг	11000±1900	22,2±3,6
Эвкалимин, 25 мг/кг	23200±2500*	44,0±6,3*
Эвкалимин, 250 мг/кг	15140±2101*	32,0±2,2*

Примечание: * – см. табл. 2.

Таблица 6. Показатели гуморального иммунного ответа мышей линии СВА при пятикратном в/б введении эвкалимина

Группа животных, доза	Исследуемые показатели	
	Количество АОК в селезенке	Обратный титр гемагглютининов в сыворотке крови
Контроль	21750±1623	38,6±3,1
Эвкалимин, 0,5 мг/кг	24600±2053	44,5±5,2
Эвкалимин, 5,0 мг/кг	28730±2590	59,2±7,4*
Эвкалимин, 25,0 мг/кг	41470±3616*	68,2±9,4*

Примечание: * – см. табл. 2.

Однократное внутрибрюшинное введение эвкалимина мышам линии *СВА* в дозах 0,5, 5,0 и 25,0 мг/кг сопровождалось также значительной стимуляцией иммунного ответа у животных. Это вызывало статистически достоверное увеличение количества АОК в селезенке и в 2 раза – показателя обратного титра гемагглютининов в сыворотке крови в группе животных, получавших эвкалимин в дозе 25,0 мг/кг, по сравнению с контролем (табл. 6).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у эвкалимина в дозах 5,25 и 250 мг/кг иммуностимулирующего действия на гуморальное звено иммунитета экспериментальных животных [3, 9].

Изучение влияния эвкалимина на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ у мышей линии *СВА* не выявило его действия на эффекторы клеточного иммунитета.

Потенциальные мутагенные свойства эвкалимина оценивали при анатомофазном анализе хромосомных aberrаций клеток костного мозга белых нелинейных крыс. Показано, что в испытанных дозах 5, 50 и 250 мг/кг при 90-дневном внутрижелудочном введении крысам эвкалимин не обладал мутагенными свойствами, не влиял на митотический индекс клеток костного мозга и уровень хромосомных aberrаций в нем. Митотический индекс клеток костного мозга крыс всех экспериментальных групп соответствовал физиологической норме 2,2–2,4% для данного вида животных. Хромосомные aberrации представлены фрагментами, слиянием, хромосомными и хроматидными мостами, однако их уровень существенно не отличался от уровня спонтанных мутаций, характерных для данного вида лабораторных животных: $4,9 \pm 1,3\%$ (контроль) и $2,1 \pm 1,4$, $2,3 \pm 1,5$ и $3,9 \pm 1,4\%$ в группах животных, получавших эвкалимин в дозах 5, 50 и 250 мг/кг соответственно.

При внутрижелудочном введении крысам в дозах 5, 50 и 250 мг/кг с 1-го по 19-й дни беременности эвкалимин не обладал эмбриотоксическими и тератогенными свойствами. Препарат не влиял на продолжительность беременности, количество желтых тел и мест имплантации, число эмбрионов, их массу тела и краниокаудальный размер. Анализ состояния внутренних органов 20-дневных эмбрионов по методу Вильсона показал, что процент аномалий (кровоизлияния в брюшную и грудную полости) в опытных группах (23,5–26,1%) не превышал спонтанного уровня в контроле (24,8 и 30,1%). У плодов, подвергавшихся в антенаталь-

ном периоде развития воздействию эвкалимина в указанных дозах, при исследовании костей скелета на тотальных препаратах, окрашенных по Доусону, не выявлено аномалий и пороков развития. Во всех испытанных дозах эвкалимин не влиял на число родившихся крысят, их массу тела, а также смертность в течение первых двух месяцев постнатального развития.

При подкожном введении крысам масляных растворов эвкалимина в концентрациях 0,1, 1,0 и 10,0% и при субконъюнктивальном введении кроликам 50 мг субстанции препарата у него не выявлено раздражающих свойств.

Таким образом, результаты проведенных экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что эвкалимин обладает широким спектром антимикробной активности, в том числе в отношении клинических антибиотикорезистентных штаммов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus*, спорообразующих бактерий, возбудителей дифтерии и туберкулеза. В экспериментах на животных на различных моделях локализованного инфекционного процесса установлена высокая химиотерапевтическая эффективность эвкалимина в двух лекарственных формах (1%-ный спиртовой раствор и суппозитории). Доклиническое токсикологическое исследование свидетельствует о том, что отечественный препарат растительного происхождения эвкалимин малотоксичен при однократном и длительном введении лабораторным животным и обладает хорошей переносимостью. Экспериментальная оценка потенциально возможных специфических видов токсичности эвкалимина, испытанного в широком диапазоне доз, показала, что у препарата отсутствуют эмбриотоксические, тератогенные, мутагенные, аллергизирующие и раздражающие свойства. Эвкалимин в экспериментах на животных в широком диапазоне доз 5–250 мг/кг стимулировал образование антител к тимус-зависимому антигену, повышая активность эффекторов гуморального иммунитета, проявляя максимум иммуностимулирующего действия в дозах, близких к терапевтическим. Эвкалимин повышал неспецифическую резистентность у крыс, увеличивая опсоно-фагоцитарный индекс, который является важным показателем его эффективности, как лечебного средства антимикробного действия.

Высокая эффективность и низкая токсичность эвкалимина, впоследствии, были подтверждены результатами клинических исследований.

ВЫВОДЫ

1. В опытах *in vitro* выявлена высокая антимикробная активность эвкалимина в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов.
2. Показано отсутствие потенциальной возможности развития резистентности штаммов стафилококка к препарату.
3. В опытах *in vivo* на различных моделях локализованных экспериментальных инфекций установлено выраженное химиотерапевтическое действие эвкалимина: сроки заживления ран, общая площадь поражения и сроки высеваемости возбудителя достоверно ниже у экспериментальных животных, получавших лечение эвкалимином по сравнению с контрольными животными.
4. По показателям ЛД₅₀ при однократном введении в желудок лабораторным животным эвкалимин относится к малотоксичным веществам.
5. Эвкалимин при повторных введениях мышам не обладал кумулятивными свойствами. Коэффициент кумуляции равен 3,05.
6. В хроническом 90-дневном эксперименте при пероральном введении крысам в дозах 5, 50 и 250 мг/кг эвкалимин не проявлял токсических свойств по всем исследуемым показателям.
7. Эвкалимин не проявлял аллергенности, мутагенности, эмбриотоксичности и тератогенности.
8. Эвкалимин в широком диапазоне доз 5–250 мг/кг стимулировал гуморальное звено иммунитета и не влиял на эффекторы клеточного иммунитета у крыс и мышей линии

СВА. Эвкалимин повышал неспецифическую резистентность у крыс, увеличивая в 1,5–2,0 раза опсоно-фагоцитарный индекс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Инфекционные болезни у детей / Под ред. Д. Мару. М.: Практика. 2006. 927 с.
2. *Enioutina E.Y., Job K.M., Sherwin C.M.T., Brown J.C.S., Teng L., Fateeva T.V., Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Gubarev M.I.* Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: Combating microbial resistance// Expert Review of Clinical Pharmacology. 2017. V. 10. № 11. P. 1203–1214.
3. Патент № 2410112 (РФ). Лекарственные средства для профилактики и лечения нарушений нормальной микрофлоры (дисбактериозы) / С.А. Вичканова, Т.А. Сокольская, Н.М. Крутикова, В.В. Бортникова, Л.В. Крепкина, В.К. Колхир, В.А. Быков.
4. Вичканова С.А., Крутикова Н.М. Новые аспекты применения эвкалимина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. № 1. С. 214–220.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К. 2012. 941 с.
6. Вичканова С.А., Колхир В.К., Сокольская Т.А., Воскобойникова И.В., Быков В.А. Лекарственные средства из растений. М.: Адрис. 2009. С. 353–370.
7. Спиридонов Н.А., Фогель А.Г., Фомкина М.Г., Архипов В.В., Шипулина Л.Д. О механизмах действия некоторых антимикробных препаратов растительного происхождения // Химико-фармацевтический журнал. 1996. Т. 30. № 6. С. 44–46.
8. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 3. С. 32–34.
9. Бортникова В.В., Крепкина Л.В., Сокольская Т.А., Шкаренков А.А., Кузнецов Ю.Б., Боровкова М.В. Токсикологическая оценка нового антимикробного препарата эвкалимин // VI Междунар. съезд «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». 2002. С. 366–369.

Поступила 19 марта 2018 г.

PRECLINICAL STUDY OF EUCALYMINUM – DRUG OF ANTIMICROBIAL ACTION

© Authors, 2018

V.V. Bortnikova

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, Toxicology Department, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: bortnikova.v@yandex.ru

L.V. Krepkova

Ph.D. (Biol.), Head of Toxicology Department, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: krepkova2011@yandex.ru

N.M. Krutikova

Ph.D. (Biol.), Leading Expert, Federal State Budgetary Institute «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» Ministries of Health of the Russian Federation
E-mail nat.krutickova@yandex.ru

T.V. Fateeva

Head of Microbiological Department, All-Russian Scientist Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Russia)

E-mail: fateeva2151@mail.ru

Presents Purpose. Experimental study of antimicrobial properties of eucalimin, obtained from medicinal plants and preclinical assessment of its security.

Methods. Eucalyptus leaves and shoots are obtained from eucalyptus (*Eucalyptus viminalis* Labill.) family (Myrtaceae). Substance eucalimin is a standardized purified amount of terpenoid phenolaldehydov phloroglucinol number (euglobals) and triterpenoids. The antimicrobial spectrum of the substance of eucalimin was studied in experiments *in vitro* by the method of double serial dilutions in liquid nutrient media corresponding to each micro-organism. The study of the potential development of resistance of microorganisms to eucalimin was carried out by the method of continuous action and by the method of serial passages using laboratory and clinical strains of *Staphylococcus aureus*. The chemotherapeutic efficacy of the finished dosage forms of eucalimin (1% alcohol solution, suppositories 0.05 g and 0.03 g) was studied in experiments *in vivo* on experimental models of localized infectious process of white rats caused by *Staphylococcus aureus* (infected wound, purulent ulcer and staphylococcal vaginitis). Preclinical study of the safety of eucalimin conducted at single and long-term administration of laboratory animals. Cumulative properties of eucalimin was studied by Lima. General toxic effect of eucalimin was studied at 30 and 90 day introduction into the stomach of rats-males in doses of 5, 50, 250 and 500 mg/kg was determined hematological and biochemical parameters, enzyme activity of blood serum. Allergizing, immunomodulatory, embryotoxic and teratogenic, mutagenic properties were studied.

Results. The results of experimental studies indicate that eucalimin has a broad spectrum of antimicrobial activity, including against clinical strains of antibiotic-resistant *Staphylococcus* genus, *Streptococcus*, spore-forming bacteria, causative agents of diphtheria and tuberculosis. In animal experiments on various models of localized infectious process, high chemotherapeutic efficacy of eucalimin in two dosage forms (1% alcohol solution and suppositories) was established. Preclinical toxicological study suggests that eucalimin low toxicity at single and long-term administration in laboratory animals and is well tolerated. The drug has no cumulative, embryotoxic, teratogenic, mutagenic, allergenic and irritant properties. Eucalimin in doses of 5-250 mg/kg stimulated the formation of antibodies to thymus-dependent antigen. Eucalimin increased nonspecific resistance of rats, increasing 2 times opsonophagocytic index.

Conclusions. *In vitro* experiments revealed a high antimicrobial activity of eucalimin against a wide range of pathogenic microorganisms, the absence of the potential for the development of resistance of *Staphylococcus* strains to the drug.

In experiments *in vivo* on different experimental models of localized infections found expressed chemotherapeutic action of dosage forms of eucalimin.

Eucalimin showed no systemic toxicity, allergenicity, mutagenicity, embryotoxicity, teratogenicity. Stimulated humoral immunity.

Key words: *experimental study of antimicrobial properties of eucalyminum, preclinical Toxicological study.*

For citation: Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Krutikova N.M., Fateeva T.V. Preclinical study of eucalyminum – drug of antimicrobial action. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(2):35–45. DOI: 10.29296/25877313-2018-04-07

REFERENCES

1. Infekcionnye bolezni u detej / Pod red. D. Mari. M.: Praktika. 2006. 927 s.
2. Enioutina E.Y., Job K.M., Sherwin C.M.T., Brown J.C.S., Teng L., Fateeva T.V., Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Gubarev M.I. Phytotherapy as an alternative to conventional antimicrobials: Combating microbial resistance// Expert Review of Clinical Pharmacology. 2017. V. 10. № 11. P. 1203–1214.
3. Patent № 2410112 (RF). Lekarstvennye sredstva dlja profilaktiki i lechenija narushenij normal'noj mikroflory (disbakteriozy). / S.A. Vichkanova, T.A. Sokol'skaja, N.M. Krutikova, V.V. Bortnikova, L.V. Krepkova, V.K. Kolhir, V.A. Bykov.
4. Vichkanova S.A., Krutikova N.M. Novye aspekty pri-me-nenija jevkalimina // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2012. № 1. S. 214–220.
5. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Ch. 1. M.: Grif i K. 2012. 941 s.
6. Vichkanova S.A., Kolhir V.K., Sokol'skaja T.A., Voskoboynikova I.V., Bykov V.A. Lekarstvennye sredstva iz rastenij. M.: Adris. 2009. S. 353–370.
7. Spiridonov N.A., Fogel' A.G., Fomkina M.G., Arhipov V.V., Shipulina L.D. O mehanizmah dejstvija nekotorykh antimikrobnnykh preparatov rastitel'nogo proishozhdenija // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 1996. T. 30. № 6. S. 44–46.
8. Berezovskaja I.V. Klassifikacija himicheskikh veshhestv po parametram ostroj toksichnosti pri parenteral'nyh sposobah vvedenija // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2003. T. 37. № 3. S. 32–34.
9. Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Sokol'skaja T.A., Shkarenkov A.A., Kuznecov Ju.B., Borovkova M.V. Toksikologicheskaja ocenka novogo antimikrobnogo preparata jevkalimin // VI Mezhdunar. s#ezd «Aktual'nye problemy sozdaniya novykh lekarstvennykh preparatov prirodnoho proishozhdenija». 2002. S. 366–369.