

Коротке повідомлення

**ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ  
КОМБІНОВАНОЇ МАЗІ  
НА ОСНОВІ ЕКСТРАКТУ ГОРІХА  
ВОЛОСЬКОГО**

**Іван Можасв, Тетяна Носальська, Інна Довга,  
Вікторія Євсюкова, Віктор Казмірчук**

**Інститут мікробіології та імунології  
ім. І. І. Мечникова НАМН**

**Вступ.** Актуальною проблемою сучасної медицини, особливо військової, є лікування ранової інфекції та її ускладнень. Вогнепальні та осколкові поранення відрізняються найбільшою важкістю, множинним, поєднаним і багатокомпонентним характером пошкоджень. Гнійно-септичні ускладнення цих поранень розвиваються в 50 – 75 % випадків [1, 2]. У зв'язку з цим велика увага приділяється розробці та застосуванню антимікробних засобів для місцевого лікування гнійно-запальних процесів, насамперед на основі рослинних екстрактів. Фітотерапія активно застосовується для лікування широкого спектру хвороб, у тому числі мікробного генезу. Перевагою використання в медичній практиці лікарських рослин і фітопрепаратів є їх мала токсичність і відсутність вираженої побічної дії. В ДУ «ІМІ НАМН України» розроблено комбінований лікарський засіб для лікування ранової інфекції у формі мазі на основі рослинної сировини – екстрактів горіху чорного або горіху волоського, антисептика мірамістину і анестетика лідокаїну гідрохлориду [3]. Токсичність, як і біологічна активність, екстрактів горіху волоського обумовлена їх основним діючим компонентом – юглоном. Юглон є токсичним щодо клітин ссавців у дослідах *in vitro* та по відношенню до дрібних тварин [4]. [5]. У дослідах *in vitro* встановлено, що юглон володіє цитотоксичною дією, викликаючи руйнування клітинних мембран. Вказане обумовлює його протипухлинну активність [6]. [7]. Юглон при пероральному введенні викликав загибель лабораторних тварин. Так, для щурів його LD<sub>50</sub> становить 112 мг/кг, для мишей – 25 мг/кг. Органом-мішенню токсичної дії юглону є нирки. Після 7-денного введення мишам у дозі 1 мг/кг тільки у нирках тварин відзначалися негативні гістологічні зміни [8]. Юглон має токсикологічний потенціал для людини при застосуванні у складі лікарських препаратів та біодобавок. Але відзначається, що його вміст в екстрактах горіху волоського невеликий (близько 0,1 %), що визначає безпеку цих засобів. Інші біологічно активні компоненти екстракту – флавоноїди, фенольні кислоти та ефірні олії – мають нижчі концентрації і менш виражену токсичність [9]. [10]. Слід відмітити, що при нашкодженні юглон слабо абсорбується. У дослідах на щурах при нашкодженні аплікаціях <sup>14</sup>C-юглону протягом 24 годин загалом виявлялося 96 % мітки, у тому числі елімінація із сечею складала 2,5 %, з фекаліями – 1,3 %,

у тканинах організму виявили 6,4 %, у шкірі в місці аплікації – 2,9 % мітки. Більша частина юглону (80 %) не підлягала абсорбції [11], Тобто юглон - найбільш активний і токсичний компонент екстракту, практично не всмоктується при нашкодженні, тому його системні ефекти та прояви токсичності мало ймовірні.

**Мета дослідження.** Метою даного дослідження було вивчення можливої токсичної дії комбінованої мазі на основі екстракту горіху волоського вуглекислотного, мірамістину та лідокаїну. Об'єктом дослідження була мазь наступного складу (на 100 г): мірамістин – 0,5 г; екстракт горіху волоського вуглекислотний – 3,0 г; лідокаїну гідрохлорид – 5,0 г; диметилсульфоксид – 3,0 г; полісорбат – 3,0 г; поліетиленоксид 1500 – 20,0 г; поліетиленоксид 400 – до 100 г. У даному дослідженні було вивчено гостру та хронічну (3 місяці нанесення) токсичність мазі у порівнянні з групою плацебо-контролю.

**Матеріали і методи.** Дослідження гострої токсичності проведено на 20 білих безпородних щурах обох статей з вихідною масою тіла 190 – 245 г. Дію засобу досліджували при нашкодженні нанесенні. Щурам вистригали шерсть на спині, боках і животі. Ділянка без шерсті складала приблизно 50 % поверхні тіла. Аплікації проводили однократно в дозі 3000 мг/кг. В якості контролю використовували групу щурів, яким проводили депіляцію і наносили 3000 мг/кг маzewої основи. Критеріями токсичності слугували клінічна картина інтоксикації, виживання тварин, споживання їжі та води, динаміка маси тіла (вихідні дані, 3, 7, 14 діб). Спостереження за тваринами проводили протягом двох тижнів. На 14 добу після нанесення мазі щурів виводили з експерименту. Проводили макроскопічну оцінку стану внутрішніх органів з визначенням їх відносної маси. [12].

Дослідження хронічної токсичності було проведено на 28 статевозрілих нелінійних білих щурах обох статей, з вихідною масою тіла 245 – 295 г. Всі тварини були розподілені на групи. Кожна експериментальна група налічувала по 14 щурів (7 самців та 7 самиць). Засоби наносили на вистрижену поверхню шкіри тварин. Ділянка розміром 4 x 4 см, на яку наносили мазь, складала близько 5 % від загальної поверхні шкіри. При виборі дози керувалися експериментальними даними, які були отримані при вивченні гострої токсичності. Доза досліджуваної мазі становила 300 мг/кг (1/10 від максимальної дози, отриманої в гострому експерименті). Контролем слугували тварини, яким наносили основу мазі у тій самій дозі. Аплікації здійснювали щодня, 1 раз на день протягом 3 місяців. Депіляцію ділянки нанесення засобів повторювали 1 раз на тиждень.

Оцінку токсичного впливу мазі на організм експериментальних тварин проводили за наступними параметрами: клінічні спостереження, виживання, споживання їжі та води, динаміка маси тіла, гематологічні показники крові, біохімічні показники

крові та сечі, клінічний аналіз сечі, електрофізіологічна активність міокарда, функціональний стан центральної нервової системи (ЦНС). У кінці експерименту тварин піддавали евтаназії для проведення макроскопії внутрішніх органів. Клінічні спостереження за тваринами проводили щодня протягом експерименту, реєструючи зміни в їх загальному стані, масі тіла, поведінці, у вживанні їжі та води. Усі показники знімали в динаміці: початкові дані, 1, 2, 3 місяць. Під час посмертного дослідження було визначено вагові коефіцієнти внутрішніх органів: серця, легенів, печінки, селезінки, нирок, наднирників, сім'яників і тимуса. [13]. В рамках дослідження хронічної токсичності вивчено також можливу місцево подразнюючу дію комбінованої мазі. Оцінка місцево подразнюючої дії включала: щоденний макроскопічний контроль стану місць нанесення мазі (вистрижені ділянки), а також макроскопічне дослідження шкіри в місцях нанесення досліджуваних засобів після закінчення експерименту. [14]. Статистична обробка отриманих даних проведена із використанням програми Excel (MS Office 2007). Усі дослідження були проведені на лабораторних тваринах із дотриманням вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей». [15].

#### **Результати та обговорення.**

В результаті проведених досліджень гострої токсичності встановлено, що після нанесення на шкіру тварин досліджуваного засобу і мазевої основи в дозі 3000 мг/кг токсичних проявів не спостерігалось. Поведінка щурів дослідної групи не відрізнялася від поведінки тварин групи контролю. Загибелі тварин обох груп, а також відхилень в їх загальному стані, поведінці, споживанні їжі та води протягом 14-денного періоду досліджень не відзначалось.

Аналіз отриманих даних показав, що при нанесенні на шкіру щурів досліджуваної мазі та мазевої основи у тварин до кінця періоду спостереження відзначався статистично достовірний приріст маси тіла. В кінці експерименту відмінностей між двома групами за даним показником не виявлено. Результати біохімічних досліджень показали, що досліджувана мазь не впливала на вміст загального білку, альбуміну та активність печінкових трансаміназ обох експериментальних груп. Достовірні відмінності між показниками тварин, що зазнали впливу мазі та мазевої основи, були відсутні.

Після евтаназії тварини були ретельно обстежені на предмет видимих патологічних ознак. За даними розтину відмінностей від норми виявлено не було. Усі макроскопічно досліджені органи (серце, легені, тимус, шлунок, печінка, нирки, надниркові залози, підшлункова залоза, селезінка, статеві залози) мали звичайні розміри, колір і консистенцію. Відносна маса внутрішніх органів щурів, які отримували дослідну мазь на основі екстракту горіха та мазевої основи залишалася в

межах фізіологічної норми. На підставі результатів вивчення гострої токсичності комбінованої мазі на основі ЕГВВ зроблено висновок, що мазь при однократному нанесенні щурам у дозі 3000 мг/кг: не викликає загибелі тварин; не чинить токсичного впливу на загальний стан, поведінку, споживання їжі і води, масу тіла; не викликає видимих змін внутрішніх органів; не впливає на абсолютну та відносну масу внутрішніх органів.

В хронічному досліді комбіновану мазь наносили на депільовану поверхню шкіри щурів протягом 3 місяців. Термін дослідження визначено у відповідності із можливим довгим терміном застосування мазі у разі лікування ран, що тривало не загоюються. Спостереження протягом експерименту не виявили клінічних ознак токсичного впливу досліджуваної мазі на загальний стан і поведінку експериментальних тварин. Візуальне спостереження показало, що зовні вони виглядали нормально, щурів з ознаками виснаження або ожиріння не виявлено. Протягом експерименту загибелі щурів не відзначалось. Вивчення хронічної токсичності комбінованої мазі на основі екстракту горіха волоського вуглекислотного у дозі 300 мг/кг (1/10 від максимальної дози в гострому досліді) встановило, що мазь: не викликає загибелі щурів; не чинить токсичного впливу на їх загальний стан, поведінку та динаміку маси тіла; не впливає на показники функціонального стану центральної нервової системи та фізіологічну активність міокарда; не чинить негативного впливу на показники периферичної крові; не змінює біохімічні показники, що характеризують функціональний стан печінки і нирок.

При вивченні можливої місцево подразнюючої дії мазі на основі екстракту горіха, виявлено відсутність ознак луцення, гіперкератозу, еритематозного висипання, геморагії, не спостерігалися явища депігментації та інші видимі сліди ураження, шерсть, що відростала, була густою і рівномірною.

Мазь на основі ЕГВВ не вплинула на товщину шкірної складки щурів, що вказує на відсутність негативного впливу на шкіру і підшкірножирову клітковину.

Таким чином, в результаті проведених на щурах досліджень можна зробити висновок, що мазь на основі ЕГВВ при хронічному нашкірному нанесенні не чинить місцево подразнюючої дії.

#### **Висновки.**

Отримані результати дослідження нешкідливості дозволяють зробити висновок, що комбінована мазь на основі екстракту горіха волоського вуглекислотного за параметрами гострої та хронічної токсичності, а також місцево подразнюючої дії, є цілком безпечною.

**Перспективи подальших наукових досліджень** полягають у оптимізації створення мазі на основі ЕГВВ для поліпшення антимікробної терапії та покращення лікування ран та ранових інфекцій, можливості клінічних випробувань, і, в разі успіху,

практичну реалізацію нового лікарського засобу для створення нового вітчизняного антимікробного препарату.

**Конфлікт інтересів.** Автори не мають конфлікту інтересів, про який слід було б заявити.

#### **Preclinical studies of the combined ointment based on walnut extract**

**Mozhaiev Ivan, Nosalska Tetyana, Dovha Inna, Yevsiukova Viktoriia, Kazmyrchuk Victor**

Currently, the treatment of wound infection and its complications is an urgent problem in medicine. Gunshot and shrapnel injuries are characterized by the greatest severity, multiple, combined and multi-component nature of damage. In this regard, much attention is paid to the development and use of antimicrobial agents for the local treatment of purulent-inflammatory processes, primarily based on plant extracts. The advantage of using medicinal plants and phytopreparations in medical practice is their low toxicity and absence of pronounced side effects. A combined medicinal product for the treatment of wound infection in the form of an ointment based on plant raw materials - extracts of black walnut or walnut, antiseptic miramistin and anesthetic lidocaine hydrochloride has been developed at the State University "IMI NAMN of Ukraine" It is known that the toxicity, as well as the biological activity, of walnut extracts is due to their main active component - juglone. In vitro experiments have shown that juglone has a cytotoxic effect, causing the destruction of cell membranes. At the same time, when applied to the skin, juglon is poorly absorbed, so its systemic effects and manifestations of toxicity are unlikely. In this regard, a study of the harmlessness of the developed composition of the ointment with walnut carbonic acid extract (EGV) was conducted. The study was performed on outbred white rats in accordance with methodological recommendations for the experimental study of the toxic effect of potential medicinal products. It was established that the combined ointment based on walnut extract with carbonic acid does not have a negative effect on the body of experimental animals, does not affect biochemical and hematological indicators, when used once or chronically. In addition, the ointment does not have a local irritating effect when applied chronically. Thus, the obtained results of the harmlessness study allow us to conclude that the combined ointment based on carbonic walnut extract is completely safe in terms of acute and chronic toxicity, as well as local irritant effect.

**Key words:** walnut carbonicum extract, acute toxicity, chronic toxicity, local irritant effect.

#### **References**

1. Kamynina I. V. Military medicine - theory and practice of health care of the Armed Forces: bibliographic index of literature. ZSMU, scientific library. Zaporizhzhia, 2016. 26 c.

2. Turker T., Capdarest-Arest N. Management of gunshot wounds to the hand: a literature review. *J. Hand Surg.* 2013. 38, №8. P. 1641-1650.
3. Mozhaev I., Dovga I., Nosalskaya T., Chastiy T., Ivankik V., Bomko T. Preclinical study of a combined ointment based on black walnut tincture. Communication 1: microbiological studies. Collection of scientific papers «SCIENTIA», Lisbon, Portugal. 2022. C. 162-166.
4. Soderquist C.J. Juglone and allelopathy. *J Chem Educ.* 1973. № 50. P. 782 – 783.
5. Strugstad M.P., S. Despotovski. A summary of extraction, synthesis, properties, and potential uses of juglone: A literature review. *J. Ecosystems Management.* 2012. 13, №3. P. 1–16.
6. Montenegro R.C., Araújo A.J., Molina M.T. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-Omethyl derivative. *Chem Biol Interact.* 2010. № 184(3). P. 439 – 448.
7. Inbaraj J. J., Chignell C. F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chem. research toxicol.* 2004. 17, №1. P. 55-62.
8. Aithal B. K. et al Evaluation of pharmacokinetic, biodistribution, pharmacodynamic, and toxicity profile of free juglone and its sterically stabilized liposomes. *J Pharm Sci.* 2011. № 100. P. 3517 – 3528.
9. Aithal B. K. et al. Evaluation of pharmacokinetic, biodistribution, pharmacodynamic, and toxicity profile of free juglone and its sterically stabilized liposomes. *J. Pharm. sci.* 2011. 100, №8. P. 3517-3528.
10. Assessment report on *Juglans regia* L., folium. Final. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). EMA/HMPC/346740/2011. July 2013.
11. Chen L.J., Lebetkin E.H., Burka L.T. Metabolism and disposition of juglone in male F344 rats xenobiotica. 2005. № 35(10 – 11). P. 1019– 1034.
12. Volkova V.A., Kononenko N.M., Hnatiuk V.V. et al. Pathologic anatomy: a textbook for students of higher educational institutions / - Kharkiv: NUPh: Golden pages, 2013. — 392 c.
13. Kovalenko V.M. et al. Experimental study of the toxic effect of potential drugs: guidelines; edited by corresponding member of the Academy of Medical Sciences of Ukraine OV Stefanov. Kyiv: Avicenna, 2001. C. 74-97.
14. Preclinical study of local irritant effect of medicinal products: guidelines, Kyiv, 2007. 58 c.
15. Bioethical examination of preclinical and other scientific research performed on animals: guidelines. Kyiv, 2006. 26 c.