

УДК 544.032.2:615.284

DOI: 10.15372/KhUR2024597

EDN: RTIHX

Физико-химические свойства супрамолекулярного комплекса артесуната с глицирризинатом натрия и его описторхицидная активность *in vitro* в отношении трематоды *Opisthorchis felineus*

Д. В. ПОНОМАРЁВ¹, М. Н. ЛЬВОВА¹, Д. Ф. АВГУСТИНОВИЧ^{1,2}, Е. С. МЕТЕЛЕВА², В. И. ЕВСЕЕНКО²,
О. Ю. СЕЛЮТИНА^{2,3}, Н. Э. ПОЛЯКОВ^{2,3}, А. В. ДУШКИН^{2,4}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

E-mail: avgust@bionet.nsc.ru

²Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН,
Новосибирск, Россия

E-mail: dushkin@solid.nsc.ru

³Институт химической кинетики и горения СО РАН,
Новосибирск (Россия)

⁴Чжэцзянский технологический университет,
Ханчжоу, Китай

(Поступила 21.05.2024; после доработки 10.07.2024; принята к печати 30.08.2024)

Аннотация

Механохимическим методом получены супрамолекулярные композиции потенциального антигельминтика – артесуната (АРС) с глицирризинатом натрия ($\text{Na}_2\text{ГК}$) в разных массовых соотношениях компонентов, входящих в комплекс АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 5, 1 : 10 и 1 : 20). Образование комплекса включения АРС с мицеллами $\text{Na}_2\text{ГК}$ подтверждено методами ЯМР-релаксации и ядерного эффекта Оверхаузера (NOESY). Установлено, что комплекс АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 10) обладает оптимальными физико-химическими свойствами для дальнейших биологических исследований на гельминтах *Opisthorchis felineus*, вызывающих описторхоз у людей и животных. В экспериментах *in vitro* показано, что комплекс АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 10) оказывает более выраженное угнетение подвижности как у инвазионных особей *O. felineus* (метацеркарии), так и у половозрелых трематод (мариты) по сравнению с чистым АРС, причем у марит даже при малых концентрациях (0.1–10 мкг/мл). Несмотря на то, что доза АРС в составе АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 10) снижена в 11 раз, показатель эффективности (IC_{50}) был всего в 2.4 раза (для метацеркарий) и 1.45 раза (для марит) меньше, чем у чистого АРС. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования нового комплекса для дальнейших исследований на *O. felineus*-инфицированных животных.

Ключевые слова: артесунат, глицирризинат натрия, супрамолекулярный комплекс, растворимость, гельминты *O. felineus*, *in vitro*, подвижность, смертность

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время заболевания, вызываемые “описторхозной триадой” гельминтов (*Opisthor-*

chis felineus, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*) из семейства Opisthorchidae, регистрируются по всему миру [1]. Примерно 9–10 млн человек инфицированы *O. viverrini*, 1.2–1.6 млн

заражены *O. felineus* и 20 млн – *C. sinensis* [2]. Многочисленными исследованиями показано, что Обь-Иртышский бассейн, включающий территории 12 областей и округов Западной Сибири и Казахстана, является самым крупным очагом описторхоза, вызванного *O. felineus*, где заболеваемость может достигать 85 % [3]. Длительное паразитирование гельминтов вызывает серьезные заболевания гепатобилиарной системы вплоть до рака печени, желчных протоков и поджелудочной железы – органов, в которых паразитируют гельминты [4, 5].

Единственным терапевтическим средством при описторхозе человека и животных остается празиквантел (ПЗК) – производное изохинолина. Однако этот препарат широкого спектра действия с частотой 35–65 % может вызывать нежелательные побочные реакции: головные боли, головокружение, слабость, аллергию, лихорадку, тошноту, боли в правом подреберье и эпигастрии и др. [6]. Кроме того, несмотря на широкое использование, его противоописторхозный эффект не достигает 100 % [7].

Поэтому клиницисты и экспериментаторы озадачены поиском новых антигельминтных препаратов с максимальной эффективностью при минимальных побочных эффектах у хозяина паразитов. Большой интерес вызывают производные сесквитерпенового лактона артемизинина – артесунат (АРС) и артемизинин. Они нашли широкое применение в качестве эффективных противомаларийных средств [8]. Позже была показана их эффективность при экспериментальных трематодозах у крыс и сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*), вызванных *C. sinensis* и *O. viverrini* соответственно [9]. Однако максимальный антигельминтный эффект при описторхозе у артемизинина был 65.5 %, а у артесуната – 77.6 %. Кроме того, повышение дозы артемизинина ≥ 400 мг/кг вызывало токсический эффект у *O. viverrini*-инфицированных хомячков.

Первые результаты по антигельминтному действию артесуната и артемизинина у сирийских хомячков, инфицированных *O. felineus*, показали снижение числа описторхов при пероральном введении растворенных в 7 % Tween 80 (Полисорбат 80) 300 мг/кг артесуната и 300 мг/кг артемизинина на 83.8 и 81.5 % соответственно [10]. Причем у половины животных из группы, получивших артесунат, была полная элиминация гельминтов. Более высокая описторхицидная активность артесуната по сравнению с артемизинином была установлена и в экспериментах *in vitro* [11].

Несмотря на лучшую растворимость АРС в воде по сравнению с ПЗК, при внутрижелудочном введении он обладает коротким периодом полураспада (0.47–1.79 ч) и низкой биодоступностью (23.3–29.5 %) [12]. При пероральном введении максимальная концентрация АРС в плазме крови наблюдается через 1–2 ч. [13], при этом из всех производных артемизинина он быстрее всех выводится из организма – менее чем за 0.5 ч [14]. Поэтому для повышения эффективности АРС представляется важным пролонгирование его действия параллельно с повышением растворимости.

Одним из методов, который может улучшить химико-фармакологические свойства АРС, является механохимический способ получения супрамолекулярных образований (мицелл) лекарственного вещества с растительным сапонином – глицирризиновой кислотой (ГК) и ее солями щелочных металлов, например глицирризинатом натрия ($\text{Na}_2\text{ГК}$), который обладает высокой растворимостью в воде и малой вязкостью растворов. Было показано, что $\text{Na}_2\text{ГК}$, входящий в состав комплекса с ПЗК, способствует повышению растворимости, а значит и лучшей биодоступности лекарства [15]. Причем комплекс ПЗК- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 10), содержащий в 11 раз меньшее количество ПЗК, оказывал сопоставимое по эффективности действие с чистым ПЗК как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Поэтому целью данной работы было создание супрамолекулярного комплекса АРС с $\text{Na}_2\text{ГК}$ (АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$) при разных соотношениях (по массе) входящих в него компонент, выбор наилучшей композиции согласно физико-химическим характеристикам для исследования антигельминтного действия полученного комплекса в отношении *O. felineus* в условиях *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В состав исследуемого комплекса входили: артесунат (АРС, содержание основного вещества 98 %, Technology Co., Ltd., КНР) и $\text{Na}_2\text{ГК}$ (Sipanier Biological Technology Co., Ltd., КНР).

Приготовление композиций и физико-химические исследования

Получение твердых композиций АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ составов 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 по массе осуществляли обработкой смесей субстанций в шаровой

мельнице. Растворимость APC из композиций, отсутствие примесей, изменение трансмембранной проницаемости методом ПАМПА (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) исследовали по методикам, описанным авторами ранее [16, 17]. На основании полученных данных была выбрана композиция для дальнейшего биологического исследования.

Образование комплекса включения APC с мицеллами $\text{Na}_2\text{ГК}$ подтверждалось методами ЯМР-релаксации и ядерного эффекта Оверхаузера (selective NOESY). Спектры ЯМР ^1H регистрировали на спектрометре Bruker AVANCE III 500 (Германия) на частоте 500 МГц при 30 °С. Измерение времен фазовой релаксации (T_2) проводилось с использованием стандартной последовательности Кара-Парсела-Мебума-Гилла (CPMG) вида

$$P_1(90^\circ) - (\tau - P_2(180^\circ) - \tau)n$$

где P_1 , P_2 – радиочастотные импульсы при угле поворота 90° и 180° соответственно; τ – фиксированная временная задержка, равная 0.5 мс; n – количество циклов, варьируемое от 0 до 2000.

Дополнительно для доказательства включения APC в мицеллу $\text{Na}_2\text{ГК}$ были проведены эксперименты ЯМР с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (selective NOESY). В данном эксперименте селективно насыщали протоны APC с химическим сдвигом 5.77 м. д. и следили за появлением кросс-пиков на протонах $\text{Na}_2\text{ГК}$.

Биологические исследования

Антигельминтные свойства нового комплекса APC- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 10) оценивали по его способности ингибировать двигательную активность: а) на инвазионной стадии развития *O. felineus* – эксцистированные метацеркарии, полученные путем искусственной стимуляции выхода личинок из цист; б) у половозрелых трематод (мариты), выделенных из желчных протоков печени и желчного пузыря сирийских хомячков, инфицированных путем внутрижелудочного введения 100 метацеркарий/животное за 3 мес. до экспериментов *in vitro*. В обоих случаях использовали 6 концентраций APC- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 мкг/мл). Кроме того, действие нового комплекса сравнивали с эффектом чистого APC (0.1, 1, 10, 100, 1000 мкг/мл). Комплекс растворяли в дистиллированной воде, APC – в диметилсульфоксиде (ДМСО, Sigma-Aldrich, США).

Метацеркарии *O. felineus* получали из инфицированных язей, выловленных из реки Обь

в Новосибирской области, по ранее описанному протоколу [18]. Под световым микроскопом оценивали их жизнеспособность перед добавлением в ячейки культурального планшета. Для оценки подвижности эксцистированных метацеркарий *O. felineus* личинки тщательно промывали стерильным фосфатно-солевым буфером, содержащим антибиотики (100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина). Метацеркарии переносили в культуральный планшет по 30–60 особей на лунку, добавляли 0.25 % раствор трипсина с 0.03 % ЭДТА в буфере Дульбекко (DPBS). Планшет помещали в CO_2 -инкубатор (37 °С, 5 % CO_2) на 15–30 мин для стимуляции выхода личинок из цист. После 5-кратного промывания эксцистированных червей инкубационной средой в лунки добавляли либо растворители (вода/0.5 % ДМСО), либо оцениваемые препараты (APC- $\text{Na}_2\text{ГК}$ /APC) в нужных концентрациях.

Половозрелых марит *O. felineus* выделяли из печени сирийских хомячков. Червей тщательно промывали в стерильном физиологическом растворе, оценивая их состояние и подвижность, и распределяли по 5 активно двигающихся особей в лунку 12-луночного стерильного планшета (Corning® Costar®, Sigma-Aldrich), содержащую 1 мл среды RPMI 1640 с L-глутамином (Life Technologies, США) при добавлении 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл амфотерицина В и 1 % глюкозы. Планшет помещали в CO_2 -инкубатор. Через сутки, после 5-кратного промывания всех марит инкубационной средой, в контрольные лунки добавляли растворители (вода/0.5 % ДМСО), в опытные – растворы APC- $\text{Na}_2\text{ГК}$ или APC в разных концентрациях. На каждую концентрацию использовали 5 марит в двух повторах (2 лунки). После добавления препаратов планшет с гельминтами вновь помещали в CO_2 -инкубатор. На следующие сутки под микроскопом Axiovert 40CFL (CarlZeiss, Германия) при (10–50)-кратном увеличении оценивали подвижность особей в каждой лунке по общепринятому методу [19] с использованием 4-балльной шкалы: 1 – неподвижные, 2 – слабые движения в области ротовой присоски, 3 – слабо выраженные волнообразные движения всего тела червя, 4 – активные движения червя. Баллы подвижности в ячейках с добавлением веществ нормировали по показателю в контрольной группе (растворители).

Через сутки после добавления препаратов вычисляли среднюю эффективную концентрацию

каждого, при которой происходило полное прекращение подвижности у 50 % червей (IC_{50}), с помощью программного обеспечения CompuSyn [20]. Значение индекса относительной подвижности (RM) рассчитывали по формулам [21]:

$$RM (\%) = (MI_{\text{опыт}}) / (MI_{\text{контроль}}) \cdot 100$$

$$MI = (\sum nN_n) / (\sum N_n)$$

где MI – индекс подвижности отдельной выборки, n – балл подвижности; N_n – количество трематод с баллом n .

Кроме того, под микроскопом анализировали влияние препаратов на морфологию марит в течение трех суток. Деструкция тела и внутренних органов особей одновременно с помутнением тела свидетельствовали о смертности гельминтов. Каждый день в одно и то же время суток в каждой лунке подсчитывали число погибших трематод. Умерших особей на вторые и третьи сутки суммировали с предыдущим показателем и выражали в процентах относительно исходного числа гельминтов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические исследования

Во всех полученных механохимическим путем композициях APC- $Na_2ГК$ было увеличение растворимости APC, что представлено в табл. 1.

Как было показано ранее [22], в водных растворах $Na_2ГК$ образует мицеллы, в которые, наиболее вероятно, и включаются молекулы APC, за счет чего и увеличивается растворимость последнего. Для доказательства включения APC в мицеллы $Na_2ГК$ мы применили методы ЯМР-релаксации и ядерного эффекта Оверхаузера. Известно, что времена спин-спиновой релаксации магнитных ядер молекул в растворе очень чувствительны к межмолекулярному взаимодействию и к диффузионной подвижности молекул. Это обусловлено изменением времени вращательной переориентации молекул (τ_c) в комплексе,

которое оценивается по формуле Стокса–Эйнштейна–Дебая: $\tau_c = 4\pi r^3 \eta / (3kT)$, где r – размер молекул, η – вязкость, T – температура, k – постоянная Больцмана. При попадании молекулы лекарства внутрь комплекса или мицеллы, времена релаксации протонов существенно сокращаются из-за замедления диффузионной и вращательной подвижности.

На рис. 1 представлены результаты измерения времени релаксации протонов APC ($\delta = 5.77$ м. д.) в растворе и комплексе APC- $Na_2ГК$. Видно, что время релаксации в комплексе примерно вдвое ниже, чем в растворе APC.

Дополнительно для доказательства включения APC в мицеллу $Na_2ГК$ были проведены эксперименты ЯМР с использованием ядерного эффекта Оверхаузера [23]. В данном эксперименте мы селективно насыщали протоны APC ($\delta = 5.77$ м. д.) и следили за появлением кросс-пиков на протонах $Na_2ГК$ (рис. 2). В экспериментах NOESY кросс-пики наблюдаются при расстояниях между взаимодействующими протонами менее 5 Е. Наличие кросс-пиков с протонами тритерпеновой части $Na_2ГК$ (0.8–2.8 м. д.) и их отсутствие с протонами сахаров (3–4 м. д.) однозначно свидетельствуют о вхождении молекулы APC внутрь мицеллы $Na_2ГК$.

Для дальнейших биологических исследований была выбрана композиция APC- $Na_2ГК$ (1 : 10), которая обладала оптимальным сочетанием свойств при оценке содержания вспомогательного вещества ($Na_2ГК$) и увеличения растворимости APC.

Результаты измерений трансмембранного переноса по методу РАМРА приведены на рис. 3. Видно, что скорость диффузии/переноса молекул APC из растворов композиции APC- $Na_2ГК$ ниже по сравнению с аналогичной характеристикой исходного APC, т. е. включение молекул APC в мицеллы $Na_2ГК$ замедляет абсорбцию свободных молекул APC. Это, предположительно, должно способствовать пролонгированию действия препарата в живых организмах.

ТАБЛИЦА 1

Растворимость образцов APC и его композиций

Состав образцов, массовое соотношение	Растворимость APC в воде, г/л	Увеличение растворимости, раз	Сохранность* APC, %
Исходный APC	0.43	–	–
APC- $Na_2ГК$, 1 : 5	6.14	14	100
APC- $Na_2ГК$, 1 : 10	7.52	18	100
APC- $Na_2ГК$, 1 : 20	7.04	16	99

* Содержание APC относительно теоретически рассчитанного.

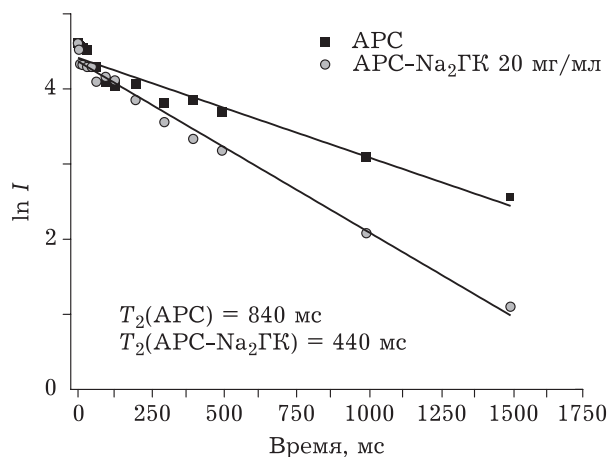


Рис. 1. Зависимости интенсивности сигнала эха в эксперименте СРМГ (в логарифмическом масштабе) протонов APC от времени в водном растворе 2 мг/мл и в растворе комплекса APC-Na₂ГК (1 : 10, концентрация комплекса 20 мг/мл) при температуре 30 °С, рН 3.6. Точки – эксперимент, сплошные линии – расчет. Погрешность расчета не превышает 5 %.

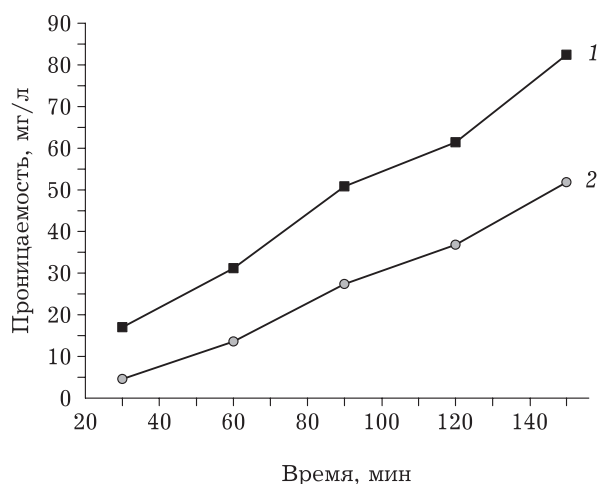


Рис. 3. Мембранная проницаемость APC: 1 – в исходном растворе APC; 2 – в механохимически полученном супрамолекулярном комплексе APC-Na₂ГК (1 : 10).

Биологические исследования

На инвазионных особях *O. felineus* установлено, что комплекс APC-Na₂ГК дозозависимо угнетал двигательную активность и изменял морфологию паразитов (укорачивание тела, вздутие экскреторного пузыря), особенно при концентрации комплекса 1000 мкг/мл (рис. 4, E). Аналогичное действие наблюдалось при концентрации 100 мкг/мл чистого APC (см. рис. 4, д). Учитывая, что содержание APC в комплексе составляет 11-ю часть от всей массы, можно судить

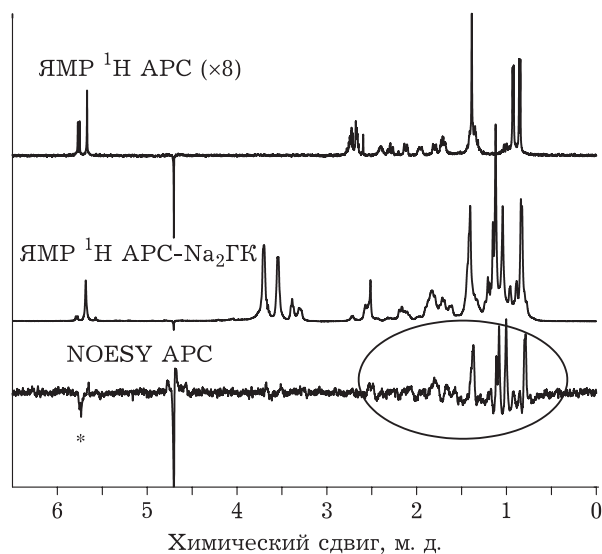


Рис. 2. Спектры ЯМР ¹H APC и его комплекса APC-Na₂ГК (концентрация 10 мг/мл), а также одномерный спектр NOESY с селективным насыщением протонов APC на 5.77 м. д. (*).

о сопоставимости полученных эффектов двух сравниваемых препаратов при одинаковом количестве действующего вещества. При дальнейшем повышении дозы (10000 мкг/мл APC-Na₂ГК и 1000 мкг/мл APC) все особи погибали (см. рис. 4, Ж и е соответственно). При всех дозах комплекса расчетный индекс относительной подвижности гельминтов был несколько ниже, чем у APC при сопоставимых концентрациях. Особенно заметно это проявлялось при дозах APC-Na₂ГК 10, 100 и 1000 мкг/мл (RM = 66.4, 52.5, 33.2 соответственно). Для APC эти значения были выше: 81.4, 64, 47 соответственно. Полагаем, что лучшее угнетение подвижности гельминтов в группе APC-Na₂ГК может быть обусловлено мицеллярностью комплекса, способствующей более пролонгированному действию на метацеркарии *O. felineus*.

На маритах действие комплекса APC-Na₂ГК было более выраженным: в среде с малыми концентрациями комплекса (0.1–10 мкг/мл) (рис. 5, Б–Г) и при сопоставимых концентрациях APC (см. рис. 5, б–г) они внешне не различались, но на фоне действия APC-Na₂ГК они двигались медленнее. Морфологические изменения наступали при концентрации комплекса 100 мкг/мл, далее с ростом концентрации они усугублялись: у большинства особей было помутнение паренхимы, укорочение и деформация тела (см.

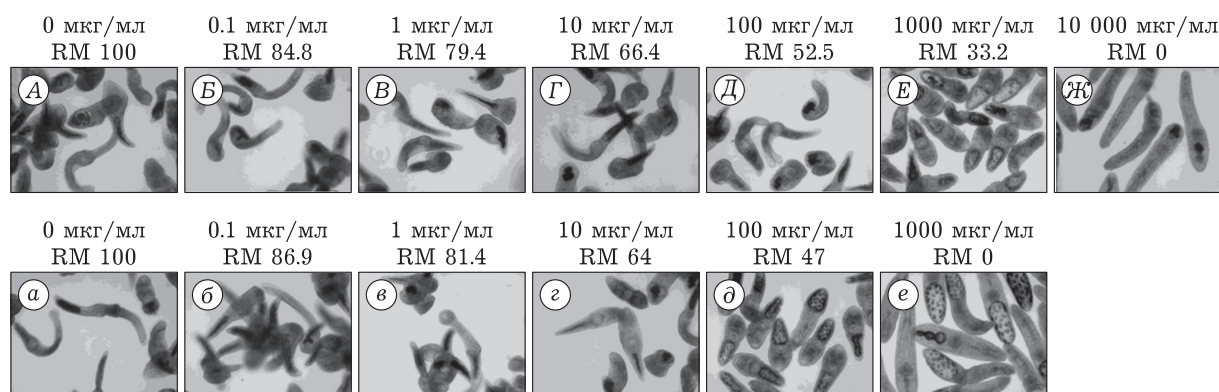


Рис. 4. Морфологические изменения и оценка относительной подвижности эксцистированных метацеркарий *O. felineus* при добавлении возрастающих доз комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (верхний ряд) и чистого раствора АРС (нижний ряд).

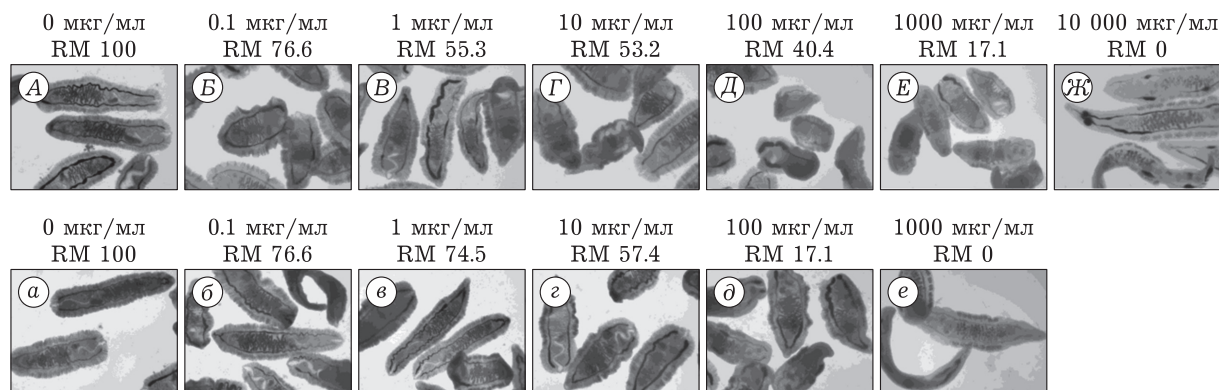


Рис. 5. Морфологические изменения и оценка относительной подвижности марит *O. felineus* при добавлении возрастающих доз комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (верхний ряд) и чистого раствора АРС (нижний ряд).

рис. 5, Д). Все особи погибали при концентрациях 10000 мкг/мл комплекса и 1000 мкг/кг АРС (см. рис. 5, Ж и е соответственно).

Индекс относительной подвижности для АРС (100 мкг/мл) и комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1000 мкг/мл), содержащего такое же количество действующего вещества, были одинаковыми: $\text{RM} = 17.0$ (см. рис. 5, Е и д соответственно), что ниже показателей в отношении эксцистированных метацеркарий. Следовательно, анализируемые вещества эффективнее действуют против марит *O. felineus*, чем метацеркарий. Следует подчеркнуть, что комплекс обуславливал более выраженное угнетение подвижности марит, чем чистый АРС, особенно на малых концентрациях. Возможно, что АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ даже при малых дозах окажется эффективнее исходного АРС при терапии животных, инвазированных *O. felineus*, и существенно уменьшит токсическое воздействие на организм хозяина.

При оценке показателей IC_{50} , которые приведены в табл. 2, установлено более существенное влияние АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ и АРС на марит *O. felineus*, чем на метацеркарии. Следует подчер-

кнуть, что, несмотря на значительно меньшее содержание действующего вещества в составе комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$, значения IC_{50} были не в 11 раз, а всего в 2.4 раза (для метацеркарий) и в 1.45 раза (для марит) ниже, чем у чистого АРС. Учитывая ранее полученные данные о том, что $\text{Na}_2\text{ГК}$ не оказывает никакого антигельминтного эффекта на метацеркарии и мариты *O. felineus* [7], можно судить о повышении эффективности действия АРС, находящегося в составе супрамолекулярного комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$.

ТАБЛИЦА 2

Значения IC_{50} исследуемых веществ против эксцистированных метацеркарий и марит *O. felineus*

Вещество	IC_{50} , мкг/мл	
	Эксцистированные метацеркарии	Мариты
АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$, 1 : 10 по массе	8.4 мкг/мл	2.9 мкг/мл
АРС	3.5 мкг/мл	2.0 мкг/мл

ТАБЛИЦА 3

Трехдневная динамика смертности марит на фоне действия растворителей и разных концентраций АРС и комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$

Дозы веществ	Исходное число марит	Оставшееся число живых марит / смертность марит (%), через		
		24 ч	48 ч	72 ч
0.5 % ДМСО	10	10/0	10/0	6/40
Вода	10	10/0	10/0	8/20
АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$, 1 : 10				
0.1 мкг/мл (0.01 мкг/мл)*	10	10/0	9/10	7/30
1 мкг/мл (0.1 мкг/мл)*	10	10/0	8/20	4/60
10 мкг/мл (1 мкг/мл)*	10	10/0	7/30	4/60
100 мкг/мл (10 мкг/мл)*	10	9/10	4/60	2/80
1000 мкг/мл (100 мкг/мл)*	10	4/60	0/100	0/100
10000 мкг/мл (1000 мкг/мл)*	10	0/100	0/100	0/100
АРС				
0.1 мкг/мл	10	10/0	8/20	4/60
1 мкг/мл	10	10/0	8/20	4/60
10 мкг/мл	10	10/0	9/10	0/100
100 мкг/мл	10	6/40	0/100	0/100
1000 мкг/мл	10	0/100	0/100	0/100

* В скобках приведено содержание АРС в комплексе.

Полученные значения IC_{50} нового комплекса уступают ранее полученным значениям IC_{50} для ПЗК (0.22 мкг/мл – метациркулярии и 0.16 мкг/мл – мариты) [7]. Возможно, это связано с разными механизмами действия у производных артемизинина и ПЗК. Известно, что артемизинин и его производные содержат пероксидный мостик, при разрушении которого образуются свободные радикалы, повреждающие клеточные мембраны и внутриклеточные белки паразитов [8]. Так, АРС эффективно ингибирует важный для паразита белок – мембранную глутатион-S-трансферазу, относящуюся к антиоксидантной системе. Механизм действия ПЗК связан с потенциал-управляемыми Ca^{2+} -каналами на мембране клетки паразитов [24]. Однако действие ПЗК в организме млекопитающих временное и краткосрочное, и при неполном изгнании паразитов из печени на фоне ПЗК оставшиеся гельминты восстанавливаются и продолжают существовать в организме хозяина дальше. Поэтому в настоящее время встает вопрос о комбинировании антигельминтиков с разными механизмами действия. Обнаружено, что последовательное введение малых доз АРС и ПЗК оказывает лучший антигельминтный эффект при клонорхозе, чем монотерапия каждого вещества по отдельности [25].

Трехдневная динамика смертности представлена в табл. 3. Установлено, что при высоких концентрациях АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1000 и 10000 мкг/мл)

и АРС (100 и 1000 мкг/мл) 100%-ная смертность марит наступает в первые двое суток. При малых концентрациях обоих веществ через трое суток выживало 40–70 % марит. Учитывая это, можно прогнозировать эффективное антигельминтное действие высоких доз комплекса у *O. felineus*-инфицированных людей и животных. Очевидно, что использование супрамолекулярной композиции АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ в этом случае будет предпочтительнее, принимая во внимание его более пролонгированное действие.

Ранее в экспериментах *in vivo* было продемонстрировано преимущество супрамолекулярного комплекса ПЗК- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (400 мг/кг) по сравнению с чистым ПЗК (400 мг/кг). Оба вещества имели одинаковый антигельминтный эффект, но при этом в составе комплекса действующего вещества было в 11 раз меньше [7]. При этом не выявлено побочного влияния на физиологический статус хозяина паразитов, что очень важно, поскольку при лечении описторхоза необходимо учитывать возможное токсическое действие больших доз антигельминтиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механохимическим путем получена твердая (порошкообразная) композиция субстанций артезуната и динатриевой соли глицирризиновой кислоты (АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$), обладающая повышенной

растворимостью по АРС. Методом динамической ЯМР-спектроскопии показано образование супрамолекулярных систем типа гость-хозяин, в которых молекулы АРС включаются в мицеллы глицирризиновой кислоты за счет нековалентных (гидрофобных) взаимодействий. На модельных мембранах методом РАМРА изучена трансмембранная проницаемость АРС из растворов полученных композиций. Показано замедление трансмембранного переноса АРС из растворов его супрамолекулярных комплексов, что должно способствовать оптимизации его фармакокинетического профиля.

Показана высокая противоописторхозная эффективность комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 10) в условиях *in vitro*. На инвазионных особях и особенно маритах *O. felineus* установлено угнетение подвижности, более эффективное, чем у чистого АРС, что может быть обусловлено мицеллярностью комплекса, способствующей более пролонгированному действию. Результаты свидетельствуют о перспективности использования нового комплекса АРС- $\text{Na}_2\text{ГК}$ (1 : 10) для дальнейших исследований на модельных животных. Считаем необходимым и многообещающим создание супрамолекулярных композиций, содержащих антигельминтики с разными механизмами действия (например, АРС-ПЗК- $\text{Na}_2\text{ГК}$), которые позволяют существенно снижать содержание лекарственных субстанций при сохранении высокой антигельминтной эффективности.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИХТТМ СО РАН (проект № 121032500061-7), ИХКГ СО РАН (проект № FWGF-2021-0003) и ИЦиГ СО РАН (проект № FWN-2022-0021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Fried B., Abruzzi A. Food-borne trematode infections of humans in the United States of America // *Parasitol. Res.* 2010. Vol. 106, No. 6. P. 1263–1280.
- 2 Chai J.-Y., Jung B.-K. General overview of the current status of human foodborne trematodiasis // *Parasitology*. 2022. Vol. 149, No. 10. P. 1262–1285.
- 3 Chernikova E. Food-borne trematodes: a focus on Russia // *Neglected Tropical Diseases – Europe and Central Asia* / P. Steinmann, J. Utzinger (Eds.). Cham: Springer, 2021. P. 37–67.
- 4 Pakharukova M. Y., Mordvinov V. A. The liver fluke *Opisthorchis felinus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2016. Vol. 110, No. 1. P. 28–36.
- 5 Domatskiy V. N., Sivkova E. I. Opisthorchiasis – is an urgent medical and social problem in Russia // *J. Biochem. Technol.* 2022. Vol. 13, No. 4. P. 20–29.
- 6 Цуканов В. В., Тонких Ю. Л., Гилюк А. В., Васютин А. В., Коленчукова О. А., Ржавичева О. С., Борисов А. Г., Савченко А. А., Масленникова Н. А. Диагностика, клиника и лечение описторхоза // *Доктор.Ру*. 2019. № 8 (163). С. 49–53.
- 7 Avgustinovich D., Tsyganov M., Vishnivetskaya G., Kovner A., Sorokina I., Orlovskaya I., Toporkova L., Goiman E., Tolstikova T., Dushkin A., Lyakhov N., Mordvinov V. Effects of supramolecular complexation of praziquantel with disodium glycyrrhizinate on the liver fluke *Opisthorchis felinus*: an *in vitro* and *in vivo* study // *Acta Trop.* 2019. Vol. 194. P. 1–12.
- 8 Van Agtmael M. A., Eggelte T. A., van Boxtel C. J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication // *Trends Pharmacol. Sci.* 1999. Vol. 20, No. 5. P. 199–205.
- 9 Keiser J., Shu-Hua X., Jian X., Zhen-San C., Odermatt P., Tesana S., Tanner M., Utzinger J. Effect of artesunate and artemether against *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* in rodent models // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2006. Vol. 28, No. 4. P. 370–373.
- 10 Львова М. Н., Пономарев Д. В., Августинович Д. Ф. Эффективность производных артемизинина и куркумина при экспериментальном описторхозе // *Современные проблемы общей и частной паразитологии: материалы IV Междунар. паразитолог. симп., Санкт-Петербург, 7–9 дек. 2022 г.* СПб.: Изд-во СПбГУВМ, 2022. С. 147–150.
- 11 Пономарев Д. В., Львова М. Н., Августинович Д. Ф. Влияние производных артемизинина на *Opisthorchis felinus*: исследования *in vitro* // *Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке: материалы VII Межрегион. науч. конф. (с междунар. участием) паразитологов Сибири и Дальнего Востока, Новосибирск, 29–31 авг. 2022 г.* Новосибирск, 2022. С. 29.
- 12 Keiser J., Utzinger J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007. Vol. 20, No. 6. P. 605–612.
- 13 Utzinger J., Keiser J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control // *Expert Opin. Pharmacother.* 2004. Vol. 5, No. 2. P. 263–285.
- 14 Na-Bangchang K., Karbwang J., Congpoung K., Thanavibul A., Ubalee R. Pharmacokinetic and bioequivalence evaluation of two generic formulations of oral artesunate // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1998. Vol. 53, No. 5. P. 375–376.
- 15 Метелева Е. С., Чистяченко Ю. С., Сунцова Л. П., Цыганов М. А., Вишневская Г. Б., Августинович Д. Ф., Хвостов М. В., Поляков Н. Э., Толстикова Т. Г., Мордвинов В. А., Душкин А. В., Ляхов Н. З. Физико-химические свойства и противоописторхозное действие механохимически синтезированных твердых композиций празиквантела и динатриевой соли глицирризиновой кислоты // *Докл. Акад. наук*. 2018. Т. 481, № 6. С. 694–697.
- 16 Kong R., Zhu X., Meteleva E. S., Chistyachenko Yu. S., Suntsova L. P., Polyakov N. E., Khvostov M. V., Baev D. S., Tolstikova T. G., Yu J., Dushkin A. V., Su W. Enhanced solubility and bioavailability of simvastatin by mechanochemically obtained complexes // *Int. J. Pharm.* 2017. Vol. 534, No. 1–2. P. 108–118.
- 17 Meteleva E. S., Chistyachenko Yu. S., Suntsova L. P., Khvostov M. V., Polyakov N. E., Selyutina O. Yu., Tolstikova T. G., Frolova T. S., Mordvinov V. A., Dushkin A. V., Lyakhov N. Z. Disodium salt of glycyrrhizic acid – a novel supramolecular delivery system for anthelmintic drug praziquantel // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2019. Vol. 50. P. 66–77.
- 18 Lvova M. N., Ponomarev D. V., Tarasenko A. A., Kovner A. V., Minkova G. A., Tsyganov M. A., Li M., Lou Y.,

- Evseenko V. I., Dushkin A. V., Sorokina I. V., Tolstikova T. G., Mordvinov V. A., Avgustinovich D. F. Curcumin and its supramolecular complex with disodium glycyrrhizinate as potential drugs for the liver fluke infection caused by *Opisthorchis felineus* // Pathogens. 2023. Vol. 12, No. 6. Art. 819.
- 19 Keiser J., Adelfio R., Vargas M., Odermatt P., Tesana S. Activity of tribendimidine and praziquantel combination therapy against the liver fluke *Opisthorchis viverrini* in vitro and in vivo // J. Helminthol. 2013. Vol. 87, No. 2. P. 252–256.
- 20 Chou T.-C., Martin N. CompuSyn for Drug Combinations: User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determinations of IC_{50} and ED_{50} and LD_{50} Values. Paramus: ComboSyn, 2004. 55 p.
- 21 Tansatit T., Sahaphong S., Riengrojpitak S., Viyanant V., Sobhon P. *Fasciola gigantica*: the in vitro effects of artesunate as compared to triclabendazole on the 3-weeks-old juvenile // Exp. Parasitol. 2012. Vol. 131, No. 1. P. 8–19.
- 22 Душкин А. В., Метелева Е. С., Толстикова Т. Г., Хвостов М. В., Поляков Н. Э., Ляхов Н. З. Супрамолекулярные системы доставки молекул лекарственных веществ на основе водорастворимых растительных метаболитов. Физико-химические, фармакологические свойства и особенности механохимического получения // Химия в интересах устойчивого развития. 2019. Т. 27, № 3. С. 233–244.
- 23 Su W., Mastova A. V., Ul'yanova M. A., Kononova P. A., Selyutina O. Yu., Evseenko V. I., Meteleva E. S., Dushkin A. V., Su W., Polyakov N. E. NMR study of water-soluble carotenoid crocin: formation of mixed micelles, interaction with lipid membrane and antioxidant activity // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25, No. 6. Art. 3194.
- 24 Cioli D., Pica-Mattoccia L. Praziquantel // Parasitol. Res. 2003. Vol. 90, No. 1. P. S3–S9.
- 25 Keiser J., Xiao S.-H., Smith T. A., Utzinger J. Combination chemotherapy against *Clonorchis sinensis*: experiments with artemether, artesunate, OZ78, praziquantel, and tribendimidine in a rat model // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. Vol. 53, No. 9. P. 3770–3776.