

УДК 621.926.47+668.411+674.032.14+678.029

DOI: 10.15372/ChUR20150510

## Создание антигельминтных препаратов повышенной эффективности на основе межмолекулярных комплексов действующих веществ с водорастворимыми полимерами, в том числе с полисахаридами

С. С. ХАЛИКОВ<sup>1</sup>, Ю. С. ЧИСТЯЧЕНКО<sup>2</sup>, А. В. ДУШКИН<sup>2</sup>, Е. С. МЕТЕЛЕВА<sup>2</sup>, Н. Э. ПОЛЯКОВ<sup>3</sup>, И. А. АРХИПОВ<sup>4</sup>,  
А. И. ВАРЛАМОВА<sup>4</sup>, И. И. ГЛАМАЗДИН<sup>4</sup>, Н. В. ДАНИЛЕВСКАЯ<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН,  
ул. Вавилова, 28, Москва 119991 (Россия)

E-mail: salavatkhalikov@mail.ru

<sup>2</sup>Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН,  
ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

E-mail: dushkin@solid.nsc.ru

<sup>3</sup>Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского Сибирского отделения РАН,  
ул. Институтская, 3, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: polyakov@kinetics.nsc.ru

<sup>4</sup>Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных  
и растений им. К. И. Скрябина РАН,  
ул. Б. Черемушкинская, 28, Москва 117218 (Россия)

E-mail: vigis@ncport.ru

<sup>5</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К. И. Скрябина,  
ул. Академика Скрябина, 23, Москва 109472 (Россия)

E-mail: rector@mgavm.ru

### Аннотация

Путем твердофазной механохимической обработки субстанций ряда бензимидазольных антигельминтных лекарственных веществ с водорастворимыми полимерами – поливинилпирролидоном, гидроксипропилкрахмалом, полисахаридом арабиногалактаном (из древесины лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii*) получены межмолекулярные комплексы типа “гость – хозяин”, обладающие повышенной водорастворимостью. Проведены их физико-химические исследования. Обнаружено повышение антигельминтной активности полученных препаратов на разных лабораторных моделях гельминтозов, которая подтверждена в производственных опытах на овцах, спонтанно инвазированных нематодами желудочно-кишечного тракта, при снижении дозировки субстанции в 9–10 раз.

**Ключевые слова:** механохимия, антигельминтные препараты, Drug Delivery, медамин, альбендазол, фенбендазол, полисахариды, арабиногалактан, межмолекулярные комплексы, растворимость, биодоступность, эффективность, гельминты

### ВВЕДЕНИЕ

Гельминтозы относятся к особо опасным паразитарным болезням человека, животных и растений, вызываемым паразитическими

червями-гельминтами [1]. По данным ВОЗ, ежегодно почти каждый человек на планете заражается одним из трех основных видов гельминтов, что приводит к энтеробиозу (1.2 млрд чел.), анкилостомозу (900 млн) и

трихоцефалезу (до 700 млн). Гельминтозы распространены от арктических широт до экватора, а общее число заболеваний и смертей от кишечных гельминтозов выше, чем от бактериальных, вирусных инфекций и других паразитарных болезней, вместе взятых. Пораженность населения России кишечными гельминтозами составляет в среднем почти 2 %, а в некоторых южных и северных районах страны она достигает 7–10 %.

Известные методы лечения гельминтозов животных базируются на применении широкого ассортимента [1] антигельминтных препаратов, многие из которых из-за плохой растворимости зачастую не обеспечивают необходимую эффективность. По этой причине приходится использовать завышенные дозировки препаратов, что осложняется риском нежелательных побочных эффектов. Для улучшения растворимости в водных/физиологических средах плохо растворимых лекарственных веществ часто используются способы, основанные на образовании их межмолекулярных комплексов с водорастворимыми синтетическими и природными полимерами или олигомерами [2–5]. В последние годы публикации на эту тему преобладают [6].

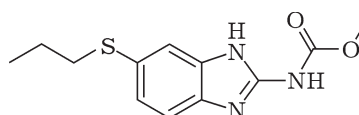
Ранее мы показали возможность повышения эффективности антигельминтных препаратов на примере механохимической модификации субстанции “контактного” препарата медамина с помощью яблочного пектина [7]. Показано, что, изменяя растворимость субстанции медамина с 8 до 45 мг/л в супрамолекулярном комплексе медамин/пектин (1 : 9), можно сохранить активность против нематод при девятикратном уменьшении дозы действующего вещества. Также выявлено, что, в отличие от исходного медамина, полученный комплекс проявляет высокую эффективность и хорошую переносимость на модели личинок эхинококкоза белых крыс, которая наиболее близка соответствующей патологии человека. Механохимический путь получения таких комплексов имеет значительные преимущества по сравнению с традиционным жидкофазным, как в части “прочности” образующихся комплексов, так и в отсутствии необходимости применения токсичных органических растворителей в процессе их приготовления [8].

Цель работы – исследование перспективности использования природных и синтетических полимеров для механохимической модификации антигельминтных субстанций из ряда производных бензимидазола.

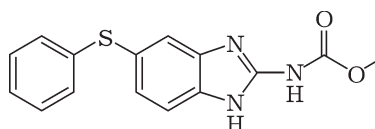
#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В продолжение работы [4] расширен спектр бензимидазольных препаратов:

1) альбендазол (АБЗ) – метил[5-(пропилтио)-1*H*-бензимидазол-2-ил]-карбамат. Субстанция серии 140823 (Changzhou Jialing Medicine Industry Co. Ltd, КНР). Брутто-формула  $C_{12}H_{13}N_3O_2S$ . Структурная формула:



2) фенбендазол (ФБЗ) – метил[6-(фенилтио)-1*H*-бензимидазол-2-ил]карбамат. Субстанция серии 60111706 (Renzin Chemicals Ltd., КНР). Брутто-формула  $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ . Структурная формула:



К ранее описанным [4] полисахаридам – арабиногалактану (АГ, ТУ 9363-021-39094141-08) и гидроксипропилкрахмалу 200/0.5 (ГЭК, НД 42-14769-07) – добавлен поливинилпирролидон (ПВП, ФСП 42-0345-4368-03) с молекулярной массой  $M_w \sim 12$  кДа.

Процесс получения межмолекулярных комплексов проводили при совместной обработке компонентов в измельчителях-активаторах ударно-стирающего типа с регулируемой энергонапряженностью [4]. Полученные при этом межмолекулярные комплексы исследованы, в первую очередь, на растворимость в воде, а также методами РФА, термического анализа, ИК-спектроскопии и электронной микроскопии. Молекулярная динамика комплексов в растворе изучена с помощью  $^1H$  ЯМР-спектроскопии. Стабильность лекарственных веществ в комплексах контролировалась методом ВЭЖХ. Изменение антигель-

минтной активности изучено *in vitro* и *in vivo* на лабораторных животных и овцах.

ИК-спектральные исследования исходных лекарственных субстанций и их комплексов с полимерами проведены с использованием спектрофотометра Shimadzu-2600 (Япония).

Электронные микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi ТМ-1000 (Япония).

Рентгенофазовый анализ (РФА) полученных продуктов проводили с помощью дифрактометра ДРОН-4 ( $\text{CuK}_\alpha$ -излучение), скорость вращения счетчика 2 град/мин,  $I = 1000$ .

Термический анализ исследуемых образцов проводился методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью прибора DSC-550 (Instrument Scientific Specialists Inc., USA) в атмосфере Ar. Температурная программа: 20–250 °С, скорость нагрева 10 °С/мин.

Для определения растворимости антигельминтных веществ навески комплексов 0.33, 0.6 и 0.8 г для массовых соотношений лекарственное вещество (ЛВ)/полимер, равных 1 : 5, 1 : 10 и 1 : 20 соответственно, растворяли в 10 мл дистиллированной воды при перемешивании в шейкере-инкубаторе (25 °С, 180 мин<sup>-1</sup>) в течение 3 ч. Во всех случаях ЛВ в растворе находилось в равновесии с осадком нерастворившегося ЛВ. Концентрации ЛВ в растворе определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 с колонкой Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 × 50 мм; температура колонки 30 °С; детектор диодно-матричный. В качестве элюента применяли систему ацетонитрил – ацетатный буфер с рН 3.4 (1 : 1), скорость потока 1 мл/мин, объем пробы 5 мкл, детектирование на длине волны 230.8 нм. Концентрации ЛВ определялись относительно их специально приготовленных растворов в ДМСО.

Гранулометрический состав осадков исходных ЛВ и их межмолекулярных комплексов определяли с помощью лазерного анализатора размера частиц Microsizer-201a (“ВА Инсалт”, Россия). В модуль пробоподготовки (объем жидкости 150 см<sup>3</sup>) засыпали 1–5 г исследуемого порошка в количестве, достаточном для достижения 70–75 % светопропускания через кювету. Измерения проводились после перемешивания в течение 1–2 мин при одновременной ультразвуковой обработке суспензии для разрушения агломератов. Дан-

ные обрабатывались с помощью встроенной в анализатор программы расчета. Результаты представлены в виде гистограмм массового распределения по размерам частиц.

<sup>1</sup>H ЯМР-спектры в растворах регистрировались на спектрометре AVHD-500X (500 МГц, Bruker BioSpin AG). Измерение времен фазовой релаксации  $T_2$  проводилось с использованием стандартной последовательности Кара – Парсела – Мебума – Гилла (CPMG) следующего вида:  $P1(90^\circ) - (\tau - P2(180^\circ) - \tau)_n$  – регистрация, где  $\tau = 0.6$  мс – фиксированная временная задержка, а  $n$  изменялась от 0 до 3000.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение ИК-спектров исходных и механообработанных образцов показало, что в условиях механохимической обработки деструкции молекул ЛВ не происходит. Совместная обработка АБЗ и ФБЗ с арабиногалактаном (АГ) приводит к тому, что характеристичные полосы ЛВ уширяются за счет равномерного распределения их микронизированных частиц в матрице полимера. Эти данные также указывают на отсутствие химических взаимодействий с участием ЛВ. В то же время возможно образование межмолекулярных комплексов за счет сил ван-дер-ваальсового взаимодействия между молекулами ЛВ и полимера. Данные ИК-спектроскопии об отсутствии химических взаимодействий между ЛВ и полимерами согласуются с данными ВЭЖХ по анализу содержания основного вещества в образцах после механической обработки.

Изменение фазового состояния ЛВ и полимеров во время механической обработки исследовано методами ДСК и РФА. На примере альбендазола (АБЗ) показано, что в результате механического воздействия интенсивность рефлексов РФА АБЗ существенно уменьшается. Следовательно, механическая обработка АБЗ приводит к потере кристалличности (рис. 1, а).

На термограммах ДСК АБЗ после механической обработки (см. рис. 1, б) наблюдаются две его полиморфные модификации, отличающиеся температурой плавления (205 и 216 °С), причем их соотношение изменяется

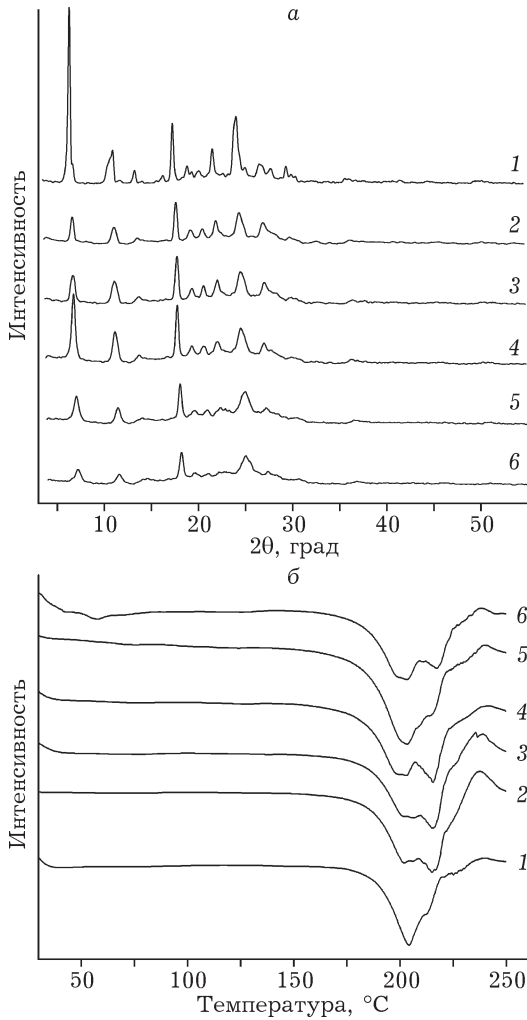


Рис. 1. Дифрактограммы (а) и термограммы ДСК (б) альбендазола: 1 – исходный, 2–6 – обработанный в ВМ-1 в течение 2 (2), 4 (3), 8 (4), 16 (5) и 24 ч (6).

в зависимости от времени обработки [11]. Однако интегральные теплоты плавления полученных образцов оказались близки ( $351 \pm 35$ ) Дж/г). Таким образом, данные ДСК и РФА противоречат друг другу: результаты ДСК указывают на сохранение кристалличности обработанных образцов АБЗ, а данные РФА свидетельствуют об обратном. Возможно, это связано с тем, что аморфный АБЗ, образовавшийся во время механической обработки, кристаллизуется при последующем нагревании образца во время термического анализа. Таким образом, для количественной оценки изменения степени кристалличности соединения с такой высокой температурой плавления, как АБЗ, недостаточно привлекать только термический анализ.

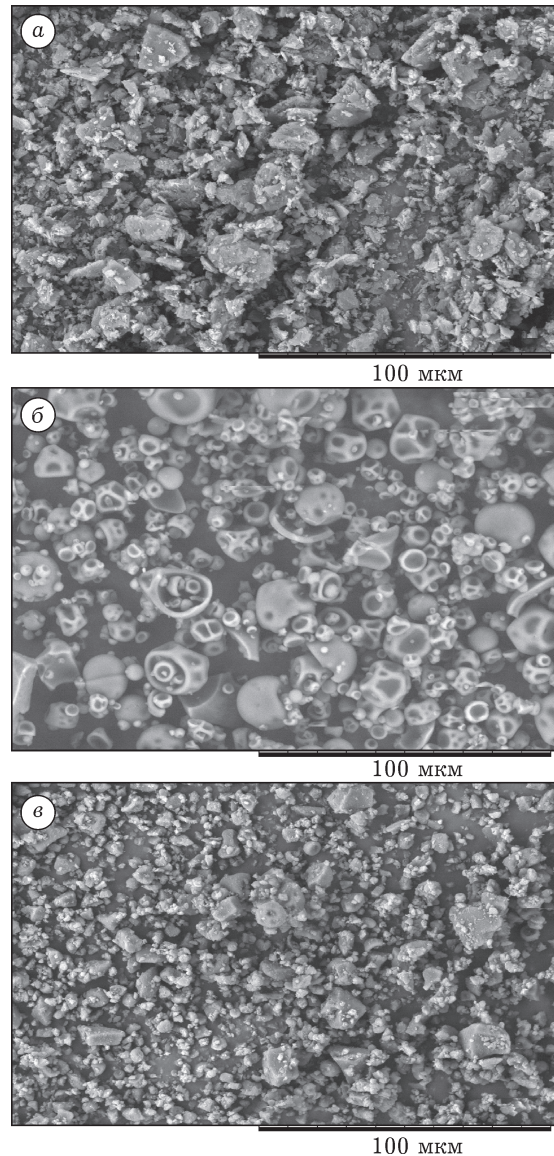


Рис. 2. Электронные микрофотографии: а – альбендазол (АБЗ); б – арабиногалактан (АГ); в – смесь АБЗ/АГ (1 : 10), обработанная в мельнице ВМ-1 в течение 24 ч.

Морфология и размеры частиц порошкообразных исходных веществ, а также механохимически обработанных композиций исследованы методами электронной микроскопии. Субстанция АБЗ представляет собой частично аморфизованный порошок со средним размером частиц 20–30 мкм, полисахарид АГ состоит из сферических частиц со средним размером 5–20 мкм. При механохимической обработке кристаллические частицы АБЗ и сферических частиц АГ разрушаются и образуется полидисперсный порошкообразный материал, который преимущественно состо-



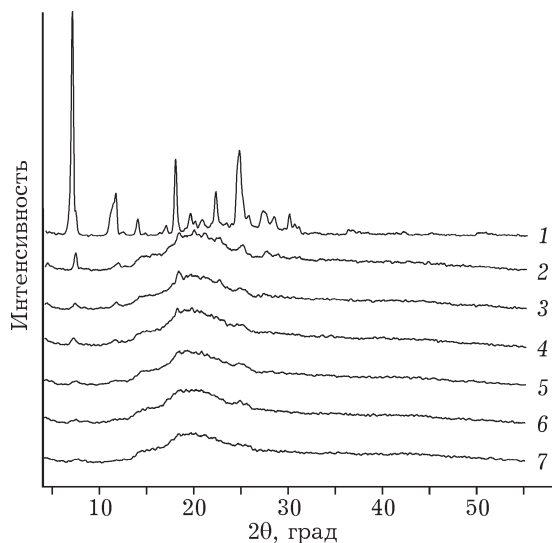


Рис. 3. Дифрактограммы АБЗ (1), смеси АБЗ/АГ (1 : 10) (2) и смеси АБЗ/АГ (1 : 10), обработанной в мельнице ВМ-1 в течение 2 (3), 4 (4), 8 (5), 16 (6) и 24 ч (7).

ит из частиц неправильной формы размером 5–20 мкм и их агрегатов (рис. 2).

В результате механохимической обработки интенсивности рефлексов РФА АБЗ существенно уменьшаются, т. е. происходит потеря кристалличности фазы (рис. 3).

#### ТАБЛИЦА 1

Растворимость альбендазола (АБЗ), фенобендазола (ФБЗ) и их межмолекулярных комплексов с арабиногалактаном (АГ) в воде (погрешность анализа  $\pm 3\%$ )

Состав образца (массовые соотношения), условия обработки	Растворимость в воде, мг/л	Увеличение растворимости, разы
Исходный АБЗ	1.0	–
Исходный ФБЗ	6.0	–
АБЗ, после м/о, 2 ч	1.0	–
АБЗ, после м/о, 24 ч	1.0	–
АБЗ/АГ (1 : 5), без м/о	12	12
ФБЗ/АГ (1 : 5), без м/о	17	2.8
АБЗ/АГ (1 : 5), после м/о, 16 ч	30	30
ФБЗ/АГ (1 : 5), после м/о, 24 ч	50	8.3
АБЗ/АГ (1 : 10), без м/о	12	12
ФБЗ/АГ (1 : 10), без м/о	6.0	–
АБЗ/АГ (1 : 10), после м/о, 2 ч	38	38
ФБЗ/АГ (1 : 10), после м/о, 24 ч	55	9.2
АБЗ/АГ (1 : 20), без м/о	12	12
ФБЗ/АГ (1 : 20), без м/о	11	1.8
АБЗ/АГ (1 : 20), после м/о, 16 ч	40	40
ФБЗ/АГ (1 : 20), после м/о, 16 ч	43	7.2

При расчете теплот плавления по результатам ДСК получены близкие величины. Вероятно, это обусловлено кристаллизацией АБЗ при нагревании, как и в случае исходного АБЗ.

Обнаружено, что растворимость в воде исходных субстанций ЛВ и их межмолекулярных комплексов сильно варьирует. В табл. 1 приведены данные о растворимости ЛВ на примере полисахарида АГ.

Во всех случаях наблюдается увеличение растворимости ЛВ, что указывает на образование межмолекулярных комплексов ЛВ и АГ. Изменение растворимости зависит от массового соотношения ЛВ/АГ и времени обработки в мельнице.

На рис. 4 и в табл. 2 приведены результаты анализа гранулометрического состава водных суспензий полученных твердых дисперсий ЛВ с полимерами, когда полимеры полностью растворялись и измерению подвергались нерастворившиеся частицы ЛВ.

Видно, что совместная обработка АБЗ с АГ в мельнице способствует значительному уменьшению размера нерастворившихся частиц. В результате растворения комплекса и дальнейшего осаждения ЛВ из пересыщенного раствора комплекса образуются мелкодисперсные

ТАБЛИЦА 2

Массовая (объемная) доля частиц в водных суспензиях АБЗ и его твердых дисперсий с АГ, %

Состав твердой дисперсии	Размер частиц, мкм		
	<1.8	<5.5	<16.6
АБЗ исходный	18.9	49.4	85.4
АБЗ/АГ (1 : 5)	35.4	88.5	100.0
АБЗ/АГ (1 : 10)	40.9	95.4	100.0
АБЗ/АГ (1 : 20)	28.2	84.8	100.0

осадки ЛВ. По нашему мнению, их образование определяет повышение “контактной” активности ЛВ в отношении кишечных гельминтозов. На рис. 5 представлены данные для осадка, полученного после растворения твердой дисперсии АБЗ с АГ в воде. Из них следует, что АБЗ, скорее всего, находится в частично аморфизованном состоянии.

Известно, что времена спиновой релаксации магнитных ядер молекул в растворе очень чувствительны к межмолекулярному взаимодействию и к диффузионной подвиж-

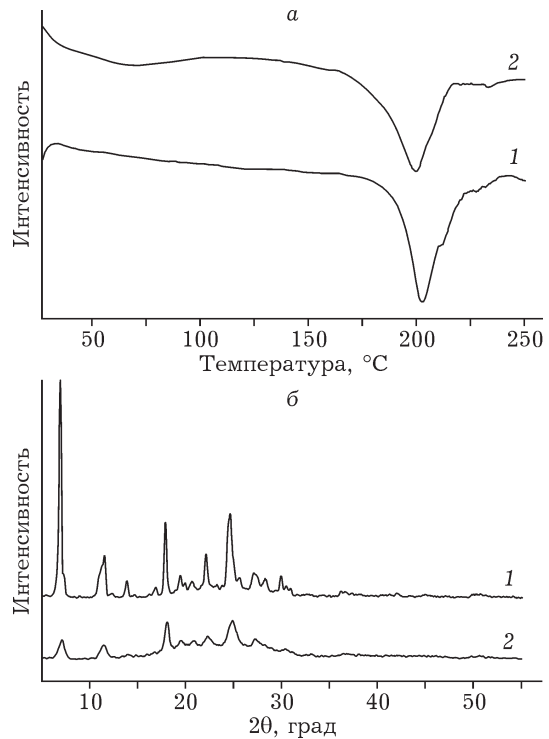


Рис. 5. Термограмма (а) и диффрактограмма (б) осадка, полученного после растворения твердой дисперсии АБЗ/АГ (1 : 10) в воде: 1 – исходный АБЗ, 2 – осадок.

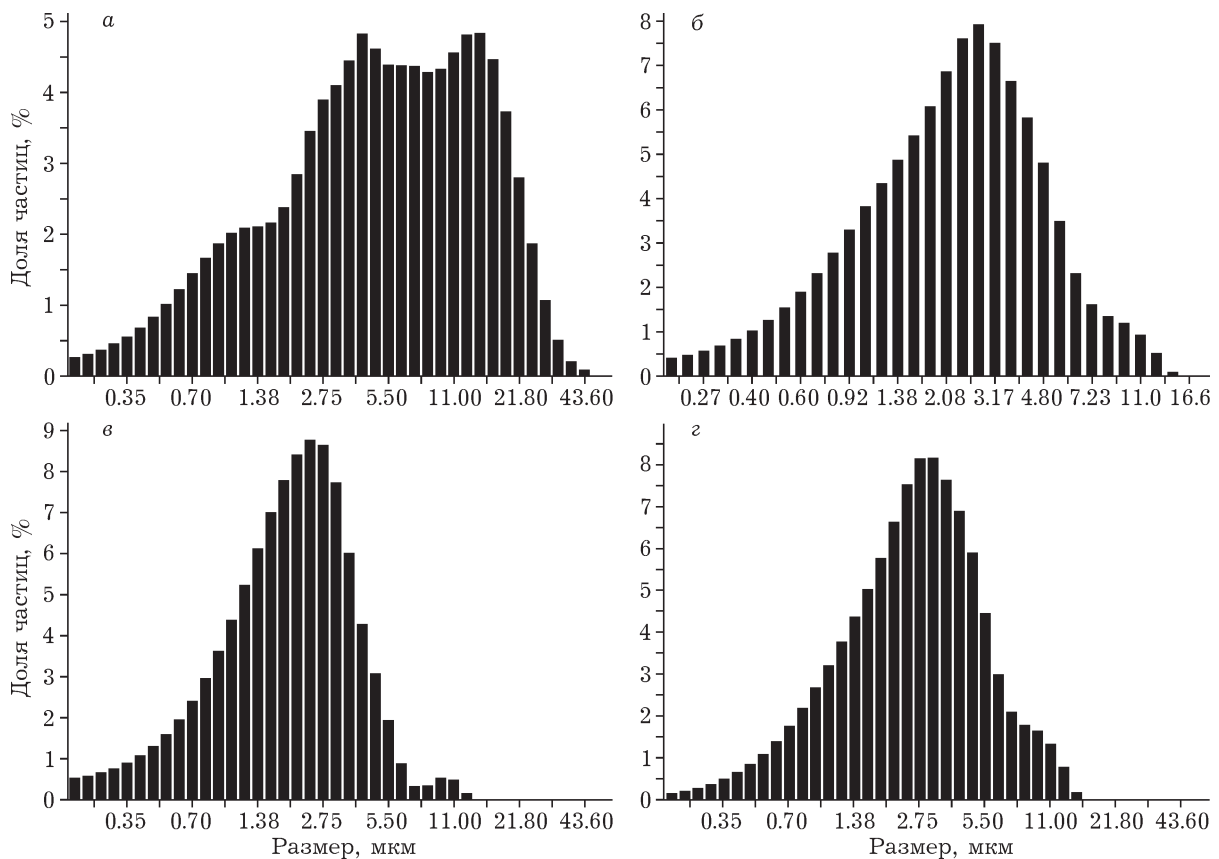


Рис. 4. Гранулометрический состав осадков АБЗ (а) и его механохимически полученных твердых дисперсий АБЗ/АГ с соотношением 1 : 5 (б), 1 : 10 (в) и 1 : 20 (з).

ности молекул [9, 10]. Это обусловлено изменением времени вращательной переориентации молекул в комплексе ( $\tau_c$ ), которое оценивается по формуле Стокса – Эйнштейна – Дебая:  $\tau_c = 4\pi a^3 \eta / 3kT$ . При попадании молекулы внутрь комплекса времена релаксации протонов существенно сокращаются из-за замедления диффузионной и вращательной подвижности. По этой причине мы использовали метод  $^1\text{H}$  ЯМР-релаксации для доказательства образования межмолекулярных комплексов. Этот метод также удобен в случае, когда другие физические параметры (растворимость, спектральные параметры) очень незначительны [12–16]. Из-за низкой растворимости АБЗ нам не удалось исследовать методом ЯМР его водные растворы при нейтральных значениях pH, а также в смеси с органическими растворителями вода/метанол и вода/ДМСО. С другой стороны, АБЗ растворим в кислых водных растворах, поэтому мы исследовали комплексообразование при pH 1.2, что соответствует кислотности желудочной среды [17]. В работе измерялись времена релаксации ароматических и метильных протонов АБЗ в чистом виде и в комплексах с АГ, ГЭК и ПВП в  $\text{D}_2\text{O}$  с добавкой DCl для достижения требуемой кислотности раствора.

Обнаружено, что кинетика спада сигнала эха протонов АБЗ в комплексе ускоряется по сравнению с чистым раствором АБЗ. Так, время релаксации ароматических протонов АБЗ в водных растворах в чистом виде при температуре  $27^\circ\text{C}$  и pH 1.2 составляет  $(1.47 \pm 0.05)$  с, комплексов АБЗ/ПВП (1 : 10) –  $(0.16 \pm 0.01)$  с, АБЗ/АГ (1 : 10) –  $(0.83 \pm 0.02)$  с, АБЗ/ГЭК (1 : 20) –  $(0.30 \pm 0.02)$  с (20 %) и  $(1.55 \pm 0.10)$  с (80 %). Концентрация комплекса в водном растворе равна 7.5 мг/мл.

Уменьшение времени релаксации указывает на уменьшение подвижности молекулы АБЗ и может служить доказательством образования межмолекулярного комплекса. При этом время релаксации протонов АБЗ в комплексе с ПВП минимальное и примерно соответствует ранее наблюдаемым временам для полностью закомплексованной молекулы “гостя” (50–200 мс) [15–16]. Это говорит о том, что в данной системе все молекулы АБЗ находятся в комплексе. Кинетика спада сигнала эха для комплекса с АГ (1 : 10) также описы-

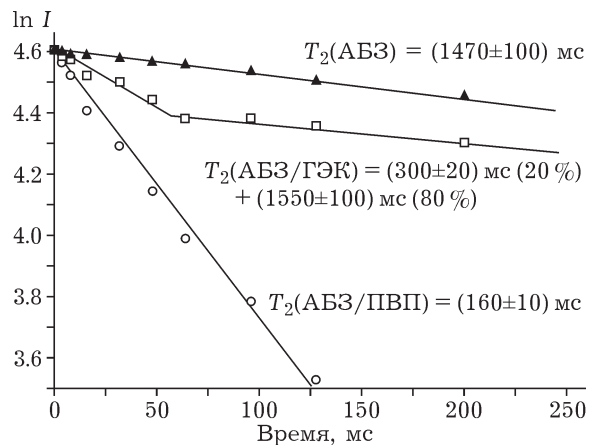


Рис. 6. Зависимости интенсивности сигнала эха ароматических протонов альбендазола (АБЗ) от времени при  $300\text{ K}$  для исходного АБЗ и его межмолекулярных комплексов с АГ, ПВП и ГЭК при концентрации комплексов 7.5 мг/мл в водном растворе, pH 1.2.

вается моноэкспоненциальным законом, однако наблюдаемое время релаксации в этом случае существенно выше (830 мс), что свидетельствует о быстром обмене (по сравнению со временем релаксации) молекулами “гостя” между комплексом и раствором. Иная картина наблюдается при анализе времен релаксации протонов АБЗ в комплексе с ГЭК. Наблюдаемая кинетика спада сигнала “эха” носит биэкспоненциальный характер, что указывает на медленный обмен между комплексом и раствором. При этом 80 % АБЗ находится в растворе и только 20 % – в комплексе. В качестве примера на рис. 6 приведены кривые кинетики спада сигнала эха ароматических протонов АБЗ при  $300\text{ K}$  для чистого вещества и механохимически синтезированных комплексов с ПВП (1 : 10) и ГЭК (1 : 20).

Таким образом, данные физико-химических исследований подтвердили образование межмолекулярных комплексов включения типа “гость – хозяин”, вероятно, за счет так называемых гидрофобных взаимодействий.

На основе данных физико-химических исследований выделены перспективные комплексы. Критериями отбора служила возможность повышения водорастворимости (обеспечивает повышение биодоступности) и антигельминтной активности. Выбранные комплексы подвергались фармакологическому скринингу на лабораторных моделях.

ТАБЛИЦА 3

Нематодоцидная эффективность композиций альбендазола (АБЗ) с полимерами при трихинеллезе и гименолепидозе белых мышей в дозе 10 мг/кг (по композиции). Количество животных в группе – 5 особей

Группа животных	Состав композиции	Количество гельминтов при вскрытии, экз./особь		Эффективность, %	
		Трихинелл	Гименолеписов	Трихинеллез	Гименолепидоз
Подопытная	АБЗ/ПВП (1 : 10)	0	2.5±0.4	100	90.64
«	АБЗ/АГ (1 : 10)	0	0	100	100
«	АБЗ/ГЭК (1 : 10)	6.3±0.9	20.4±2.6	97.47	23.60
«	АБЗ (базовый)	66.6±6.2	24.2±2.7	73.12	10.12
Контрольная	–	248.4±6.3	26.7±3.0	–	–

#### Изучение антигельминтной активности композиций на различных моделях

**Модель *Trichinella spiralis*.** Изучение нематодоцидной активности композиций АБЗ с полисахаридами (АГ, ГЭК) и ПВП проводили на лабораторной модели трихинеллеза на белых мышах, экспериментально инвазированных *T. spiralis*, в возрасте 1.5–2 мес. в дозе 250 личинок на животное [18–20]. Животных заражали через рот введением суспензии с личинками с помощью шприца с канюлей. На 3-и сут после заражения мышам подопытных групп (по 5 особей в каждой) вводили перорально однократно композиции АБЗ с полимерами (табл. 3). Мыши четвертой группы получали базовый АБЗ. Все композиции применяли в дозе 10 мг/кг. Животные контрольной группы получали дистиллированную воду в соответствующих объемах.

Животных подвергали декапитации на 2-е сут после введения композиций. Нематодоцидную активность исследуемых композиций определяли по результатам гельминтологического вскрытия кишечника, взятия соскобов слизистой оболочки, переваривания в растворе искусственного желудочного сока и подсчета под бинокулярной лупой. Учитывали обнаруженное при этом количество трихинелл. Эффективность препаратов оценивали по типу “контрольный тест” с расчетом среднего количества обнаруженных нематод и эффективности [1]. Полученные результаты, обработанные статистически с использованием Microsoft Excel, представлены в табл. 3.

Видно, что композиции альбендазола с АГ и ПВП характеризуются 100 % активностью, а композиция АБЗ/ГЭК (1 : 10) оказывает

нематодоцидный эффект, равный 97.47 %. Эффективность базового АБЗ оказалась значительно ниже, на что указывает обнаружение в кишечнике у мышей в среднем по (66.6±6.2) экземпляров трихинелл.

**Модель *Hymenolepis nana*.** Испытание на цестодоцидную активность АБЗ и его композиций с полисахаридами в сравнении с АБЗ в равных дозах (по 10 мг/кг) проводили на белых мышах, экспериментально инвазированных *H. nana* [18, 19]. Мышей заражали перорально с помощью шприца, снабженного специальной канюлей, из расчета 200 инвазионных яиц на животное. Для этого собранных от предшествующего заражения цестод *H. nana* растирали пестиком в ступке или разрушали в небольшом объеме водопроводной воды посредством неоднократного насасывания в шприц с насаженной на него иглой-канюлей для перорального заражения. На 13-е сутки после заражения в желудок мышей разных групп вводили тестируемые композиции однократно в дозе 10 мг/кг в 1 % крахмальном геле. Животным контрольной группы вводили крахмальный гель в соответствующих объемах. На 4-е сутки после введения композиций мышей убивали декапитацией. Активность композиций учитывали по результатам гельминтологического вскрытия кишечника. Извлеченных при вскрытии цестод подсчитывали. Учет эффективности препаратов проводили по типу “контрольный тест” [1]. Полученные результаты представлены в табл. 3.

100 % эффективность при гименолепидозе мышей демонстрирует композиция АБЗ/АГ (1 : 10), которая активна как против имагинальных, так и против неполовозрелых цестод. При вскрытии кишечника мышей, полу-



ТАБЛИЦА 4

Эффективность композиций альбендазола (АБЗ) с полимерами при фасциолезе белых крыс в дозе 10 мг/кг (по композиции). Количество животных в группе – 6 особей

Группа животных	Состав композиции	Количество фасциол при вскрытии, экз./особь	Эффективность, %
Подопытная	АБЗ/АГ (1 : 10)	0.16	95.2
«	АБЗ/ГЭК (1 : 10)	0.16	95.2
«	АБЗ (базовый)	1.8±0.4	45.5
Контрольная	–	3.3±0.6	–

чавших эту композицию, цестоды не обнаружены. После введения композиции АБЗ/ПВП (1 : 10) в кишечнике животных находили нежизнеспособных гименолеписов и единичные экземпляры подвижных цестод (эффективность 90.64 %). Композиция АБЗ/ГЭК (1 : 10) оказалась недостаточно эффективной против изученных гельминтов. Базовый АБЗ в испытанной дозе не проявил активности против *H. nana*. В кишечнике животных контрольной группы обнаружено в среднем по (26.7±3.0) экз./гол. *H. nana*, из них 35 % – неполовозрелые цестоды.

**Изучение антигельминтной активности композиций на модели *Fasciola hepatica*.** Испытание на трематодоцидную активность (экспериментальный фасциолез белых крыс, доза заражения 20 адолексариев *Fasciola*

*hepatica* на животное) композиций АБЗ с полимерами проводили в дозах 10 мг/кг (по композиции). Результаты испытаний показали эффективность композиций АБЗ/АГ (1 : 10) и АБЗ/ПВП (1 : 10), равную 95.2 %, тогда как эффективность базового АБЗ составила 45.5 %, что в 2 раза ниже эффективности комплексов (табл. 4).

Из данных лабораторных тестов (см. табл. 3, 4) следует, что композиция АБЗ/АГ (1 : 10) имеет 100 % эффективность как против нематод *T. spiralis* и цестод *H. nana*, так и против фасциол *F. hepatica*, т. е. демонстрирует широкий спектр антигельминтного действия.

Параметры острой токсичности композиций (ЛД<sub>50</sub>) определяли по методу Литчфилда – Вилкоксона на белых мышах при введении исследуемых композиций в желудок жи-

ТАБЛИЦА 5

Эффективность композиций альбендазола (АБЗ) с полимерами при нематодозах овец

Группы	Композиция	Доза по АБЗ, мг/кг	Число животных в группе, особей	Освободилось от инвазии, особей	Количество яиц нематод в 1 г фекалий, экз.		Эффективность, %	Уменьшение количества яиц нематод, %
					до опыта	после лечения		
<i>Нематодироз</i>								
П	АБЗ/АГ (1 : 10)	0.9	9	8	118.3±7.2	6.3±0.8	88.9	95.01
П	АБЗ/ПВП (1 : 10)	0.9	9	7	120.5±7.6	15.7±1.6	77.8	87.57
П	АБЗ	1.0	9	0	122.0±7.5	117.3±7.6	0	7.13
П	АБЗ	10.0	9	9	119.7±8.0	0	100	100
К	–	–	9	0	121.4±7.8	126.3±8.1	–	–
<i>Другие желудочно-кишечные стронгилятозы</i>								
П	АБЗ/АГ (1 : 10)	0.9	9	9	131.2±8.3	0	100	100
П	АБЗ/ПВП (1 : 10)	0.9	9	8	129.6±7.8	7.6±0.8	88.9	94.32
П	АБЗ	1.0	8	0	131.7±7.7	127.3±8.3	0	4.79
П	АБЗ	10.0	8	8	132.4±8.2	0	100	100
К	–	–	8	0	130.3±8.7	133.7±8.4	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 6: П – подопытная группа животных, К – контрольная.

ТАБЛИЦА 6

Эффективность композиций на основе фенбендазола (ФБЗ) при нематодозах овец

Группы	Композиция	Доза по АБЗ, мг/кг	Число животных в группе, особей	Освободилось от инвазии, особей	Количество яиц нематод в 1 г фекалий, экз.		Эффективность, %	Уменьшение количества яиц нематод, %
					до опыта	после лечения		
<i>Нематодироз</i>								
П	ФБЗ/АГ (1 : 10)	0.9	9	8	138.3±7.8	60	88.9	95.67
П	ФБЗ	1.0	9	0	140.6±7.9	122.8±7.9	0	11.21
П	ФБЗ	10.0	9	8	139.4±8.2	5	88.9	96.39
К	–	–	9	0	139.2±7.9	138.3±8.0	–	–
<i>Другие желудочно-кишечные стронгилятозы</i>								
П	ФБЗ/АГ (1 : 10)	0.9	9	9	144.3±8.63	0	100	100
П	ФБЗ	1.0	9	0	142.7±9.2	125.2±8.5	0	12.70
П	ФБЗ	10.0	9	9	143.4±8.4	0	100	100
К	–	–	9	0	142.3±8.8	143.4±8.6	–	–

Примечание. Обозн. см. табл. 5.

вотных [21]. Композиция АБЗ с АГ более чем в 2 раза менее токсична по сравнению с базовым АБЗ (для композиции АБЗ/АГ = 1 : 10 ЛД<sub>50</sub> = 5000, для АБЗ – 2450).

Выявленная высокая эффективность на лабораторных моделях композиций АБЗ с полимерами подтверждена результатами испытаний в производственных условиях, которые проводили в экспериментальном хозяйстве “Курилово” Подольского района Московской обл. в ноябре–декабре 2013 г. на 45 помесных овцах разного возраста, спонтанно инвазированных нематодирозами и другими видами желудочно-кишечных стронгилят. Спонтанно инвазированных овец отбирали для опытов по результатам предварительных копроовоскопических исследований методом флотации и эфир-формалиновым методом. Овец разделили на пять равноценных групп по 8–9 голов в каждой. Животным первой группы вводили перорально однократно композицию состава АБЗ/АГ (1 : 10) в дозе 1.0 мг/кг по АБЗ. Овцы второй группы получали композицию состава АБЗ/ПВП (1 : 10). Овцы третьей и четвертой групп получали базовый АБЗ в дозах 1 и 10 мг/кг. Животные контрольной группы композиции не получали. Эффективность композиций оценивали по результатам копроовоскопических исследований методом флотации и эфир-формалиновым методом до дегельминтизации и спустя 18 сут. Учет эффективности

композиций проводили по типу “контрольный тест” [1] с расчетом среднего количества обнаруженных яиц нематод. Полученные результаты представлены в табл. 5.

Видно, что базовый АБЗ в дозе 10 мг/кг проявил 100 % эффект против нематодирозов и других желудочно-кишечных стронгилят овец, а в дозе 1.0 мг/кг он практически неэффективен. Композиции АБЗ/АГ и АБЗ/ПВП испытаны в дозах 0.9 мг/кг по АБЗ, поэтому их эффективность выше базового АБЗ при нематодирозе в 9.5 и 8.7 раза соответственно и в 10 раз – при других желудочно-кишечных стронгилятозах овец. Животные хорошо переносили препараты, побочного их действия на организм не отмечено.

Аналогичным образом испытаны композиции ФБЗ. Исследование проводили на 45 овцах, спонтанно инвазированных нематодирозами и другими видами желудочно-кишечных стронгилят. Овцам разных групп по 8–9 голов в каждой вводили однократно перорально композиции ФБЗ в дозе 1.0 мг/кг по ФБЗ в сравнении с базовым ФБЗ в дозах 1.0 и 10 мг/кг. Животные контрольной группы препаратов не получали. Эффективность композиций учитывали по результатам копроовоскопических исследований фекалий методом флотации до дегельминтизации и спустя 18 сут. Учет эффективности композиций проводили по типу “контрольный тест” с расчетом сред-

него количества обнаруженных яиц нематод [1]. Результаты испытаний представлены в табл. 6. Видно, что композиция ФБЗ/АГ (1 : 10) характеризуется 95.67 % эффективностью при нематодирозе и 100 % эффективностью против стронгилят других видов. Базовый ФБЗ в дозе 10 мг/кг проявил 96.39 % эффективность против нематодирозов и 100 % – против других желудочно-кишечных стронгилят овец, а в дозе 1.0 мг/кг он практически неэффективен. Учитывая, что композиция ФБЗ/АГ (1 : 10) испытана в дозе 1.0 мг/кг по ФБЗ, можно предположить, что ее эффективность на порядок превышает эффективность базового ФБЗ. Животные хорошо переносили препараты, побочного действия на организм не отмечалось.

Таким образом, в производственных опытах на овцах, спонтанно инвазированных нематодами подотряда *Strongylata*, композиции АБЗ и ФБЗ в 8.5–10 раз эффективнее соответствующих базовых препаратов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Путем расширения спектра исходных антигельминтных веществ из ряда бензимидазолов подтверждена универсальность разработанной нами [4] твердофазной механохимической технологии модификации свойств лекарственных веществ при их совместной обработке с полимерами в измельчителях-активаторах с регулируемой энергонапряженностью. Образование межмолекулярных комплексов доказано с помощью современных физико-химических методов. Высокая антигельминтная эффективность полученных комплексов подтверждена на лабораторных моделях и в производственных условиях. Экспериментальные данные подтвердили широкий спектр антигельминтной активности композиций АБЗ/АГ и ФБЗ/АГ при нематодозах овец: их эффективность почти в 10 раз выше по сравнению с базовыми АБЗ и ФБЗ. Животные хорошо переносили препараты, побочного их действия на организм не отмечалось.

Полученные результаты подтверждают возможность создания инновационных антигельминтных препаратов широкого спектра действия путем механохимической модифи-

кации субстанций плохорастворимых антигельминтных веществ и полимеров, в частности полисахаридов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-16-00026) и РФФИ (грант № 15-04-02538).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Архипов И. А. Антигельминтики: фармакология и применение. М.: РАСХН, 2009. 406 с.
- 2 Krishnaiah Y. S. R. // J. Bioequiv. Bioavailab. 2010. Vol. 2. P. 28–36.
- 3 Marchessault R. H., Ravenelle F., Zhu X. X. Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications. Vol. 934. Washington, DC: Am. Chem. Soc., 2006. 365 p.
- 4 Халиков С. С., Халиков М. С., Метелева Е. С., Гуськов С. А., Евсеенко В. И., Душкин А. В., Буранбаев В. С., Фазлаев Р. Г., Галимова В. З., Галиуллина А. М. // Химия уст. разв. 2011. Т. 19, № 6. С. 699–703.
- 5 Душкин А. В., Сунцова Л. П., Халиков С. С. // Фунд. исследования. 2013. № 1, Ч. 2. С. 448–457.
- 6 De Jong W. H., Borm P. J. A. // Inter. J. Nanomedicine. 2008. Vol. 3, No. 2. P. 133–149.
- 7 Aripov Kh. N., Pominova T. Yu., Pereverseva E. I., Khalikov S. S., Khodzhaeva M. A., Karimov A., Musaev U. N. // Chem. Natural Compds. 1995. No. 6. P. 753–756.
- 8 Душкин А. В., Метелева Е. С., Толстикова Т. Г., Хвостов М. В., Толстиков Г. А. // Химия уст. разв. 2010. Т. 18, № 6. С. 719–728.
- 9 Emsley J. W., Freeney J., Sutcliffe L. H. High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Oxford: Pergamon Press, 1965.
- 10 Popova M. V., Tchernyshev Y. S., Michel D. // Langmuir. 2004. Vol. 20. P. 632–636.
- 11 Pranzo M. B., Cruickshank D., Coruzzi M., Caira M. R., Bettini R. // J. Pharm. Sci. 2010. Vol. 99. P. 3731–3742.
- 12 Gluschenko O. Y., Polyakov N. E., Leshina T. V. // Appl. Magn. Res. 2011. Vol. 41. P. 283–294.
- 13 Polyakov N. E., Khan V. K., Taraban M. B., Leshina T. V. // J. Phys. Chem. B. 2008. Vol. 112. P. 4435–4440.
- 14 Apanasenko I. E., Selyutina O. Yu., Polyakov N. E., Suntsova L. P., Meteleva E. S., Dushkin A. V., Vachali P., Bernstein P. S. // Archives of Biochem. Biophys. 2015. Vol. 572. P. 58–65.
- 15 Chistyachenko Yu. S., Dushkin A. V., Polyakov N. E., Khvostov M. V., Tolstikova T. G., Tolstikov G. A., Lyakhov N. Z. // Drug Delivery, Early Online. 2014. P. 1–8.
- 16 Dushkin A. V., Meteleva E. S., Tolstikova T. G., Tolstikov G. A., Polyakov N. E., Medvedeva E. N., Neverova N. A., Babkin V. A. // Russ. Chem. Bull. 2008. Vol. 6. P. 1299–1307.
- 17 Kohri N., Yamayoshi Y., Iseki K., Sato N., Todo S., Miyazaki K. // Pharm. Pharmacol. Commun. 1998. Vol. 4. P. 267–270.
- 18 Астафьев Б. А., Яроцкий Л. С., Лебедева М. Н. Экспериментальные модели паразитов в биологии и медицине. М.: Наука, 1989. 279 с.
- 19 Кротов А. И. Основы экспериментальной терапии гельминтозов. М.: Медицина, 1973. 272 с.
- 20 Pozio E. // Parasitol. Today. 1998. Vol. 14, No. 1. P. 35–38.
- 21 Беленский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Госмедиздат, 1963. 146 с.