

Антигельминтные препараты

УДК 619:615.284

doi: 10.15389/agrobiology.2020.4.830rus

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕНБЕНДАЗОЛА НА ОСНОВЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ С ДИНАТРИЕВОЙ СОЛЬЮ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А.И. ВАРЛАМОВА, И.А. АРХИПОВ

Вследствие широкого распространения гельминтозов животных возникает необходимость применения инновационных противопаразитарных препаратов. Фенбендазол широко используется во всем мире для химиотерапии гельминтозов, однако в ряде случаев эффективен только в повышенной дозе. В настоящей работе нами впервые показано изменение физико-химических свойств, параметров фармакокинетики и повышение антигельминтной эффективности фенбендазола, полученного посредством механохимической обработки с использованием для адресной доставки динатриевой соли глицирризиновой кислоты. Целью наших исследований было повышение биологической активности твердой дисперсии фенбендазола с динатриевой солью глицирризиновой кислоты (ТДФ с Na₂ГК), оценка растворимости композиций ТДФ с Na₂ГК, параметров фармакокинетики и их антигельминтной эффективности на лабораторных моделях *Trichinella spiralis* и *Hymenolepis nana* и в полевых условиях на овцах, спонтанно зараженных желудочно-кишечными нематодами и мониезиями. ТДФ с Na₂ГК была применена в одну стадию механохимического процесса в шаровой мельнице LE-101 (Венгрия). Соотношение фенбендазола («Changzhou Yabong Pharmaceuticals Co., Ltd.», Китай) и динатриевой соли глицирризиновой кислоты («Yuli County Jinxing Licorice Products Co.», Китай) было равным 1:10. Процесс продолжался в течение 4 ч при 90 об/мин. Параметры фармакокинетики фенбендазола и его метаболитов в организме овец породы ставропольский меринос изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Сформировали две группы клинически здоровых овец (по 5 гол. в каждой), в одной животные однократно перорально получали ТДФ с Na₂ГК, в другой — субстанцию фенбендазола (ФБЗ) (дозы 2 мг/кг). Пробы крови отбирали из яремной вены до и через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 33, 48, 72 и 144 ч после введения ТДФ с Na₂ГК и базового препарата. Рассчитывали константу скорости абсорбции, время всасывания в кровь половины введенной дозы, клиренс, максимальную концентрацию в сыворотке крови, время достижения максимальной концентрации, период полувыведения, площадь под кривой «концентрация–время» и время удержания в кровотоке. Для оценки эффективности ТДФ с Na₂ГК против *Hymenolepis nana* и *Trichinella spiralis* использовали по 50 белых инбредных мышей-самок линии BALB/c массой 16-18 г. Яйца *H. nana* вводили животным внутрижелудочно с помощью шприца (по 200 яиц на особь). На 13-е сут после заражения в желудок мышей I, II и III групп (по 10 особей в каждой) однократно вводили ТДФ с Na₂ГК в дозах соответственно 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг по д.в. в 1 % крахмальном геле. Базовым препаратом служила субстанция ФБЗ, которую задавали в дозе 2,0 мг/кг (IV опытная группа). Животные контрольной группы получали крахмальный гель в том же объеме. Изолят *T. spiralis* получали посредством серийного пассажа личинок I стадии самкам крыс. До заражения мышей содержали в течение 12 ч на голодной диете, затем им в желудок вводили по 200 личинок с помощью туберкулинового шприца. На 3-и сут после заражения мышей разделили на четыре опытные и одну контрольную группы (по 10 особей в каждой). ТДФ с Na₂ГК вводили в желудок мышам I, II и III опытных групп в дозах соответственно 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг по д.в. в 1 % крахмальном геле. Субстанцию ФБЗ вводили особям IV опытной группы в дозе 2 мг/кг. Контрольные животные получали 1,5 % крахмальный гель в той же дозе. Эффективность испытываемых средств против *H. nana* и *T. spiralis* определяли по данным вскрытия. Антигельминтную активность ТДФ с Na₂ГК на молодняке овец породы ставропольский меринос изучали в производственных условиях ООО «Агроресурс» (Самарская обл., Пестравский р-н) летом 2016-2017 годов. При каждой инвазии животным подопытных групп назначали однократно перорально ТДФ с Na₂ГК в дозах 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг по действующему веществу в сравнении с субстанцией ФБЗ в дозе 2,0 мг/кг. Контрольной группе животных препарат не вводили. Антигельминтную активность лекарственных форм определяли по данным вскрытия кишечника мышей и результатам исследований проб фекалий овец методом McMaster до и после введения препаратов. Данные физико-химических исследований показали повышение растворимости, уменьшение размеров частиц композиций ТДФ с Na₂ГК и образование агрегатов неправильной формы. Результаты изучения параметров фармакокинетики свидетельствовали о значительном повышении скорости абсорбции ТДФ с Na₂ГК и поступления их в кровь, повышении в 2,5 раза максимальной концентрации фенбендазола и его метаболитов в крови, а также снижении скорости выведения препарата из организма по сравнению с субстанцией ФБЗ. ТДФ с Na₂ГК в дозах 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг проявляла соответ-

ственно 100; 98,05 и 92,74 % активность против *T. spiralis*; 100; 98,67 и 89,04 % — против *H. nana*; 100; 95,37; 92,07 — против *Nematodirus* spp.; 100; 95,42 и 90,75 % — против желудочно-кишечных стронгилят; 96,44; 91,61 и 81,12 % — против *Moniezia expansa*. Антигельминтная активность субстанции ФБЗ в дозе 2,0 мг/кг оказалась в 3,4 раза ниже, чем у ТДФ с Na₂ГК в той же дозе при экспериментальном трихинеллезе мышей. При экспериментальном гименолепидозе его эффективность составила 28,88 %. Слабая эффективность субстанции ФБЗ была отмечена против *Nematodirus* spp. (33,33 %), других желудочно-кишечных стронгилят (39,14 %) и *Moniezia* spp. (17,55 %). На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что дальнейшие исследования твердой дисперсии фенбендазола с динатриевой солью глицирризиновой кислоты перспективны, а технология производства может быть воспроизводимой в больших объемах.

Ключевые слова: фенбендазол, твердая дисперсия, динатриевая соль глицирризиновой кислоты, эффективность, фармакокинетика, гельминтозы.

Фенбендазол (панакур) — антигельминтик широкого спектра действия из группы бензимидазолкарбаматов (1, 2). Он обладает высокой активностью против нематод животных в дозе 7,5-10 мг/кг, против *Protostrongylus* spp. — в дозе 15 мг/кг, против фасциол и дикроцелиев — в дозе 100 мг/кг (3), менее эффективен против трихоцефал и стронгилоидов (1). Механизм антигельминтного действия фенбендазола заключается в разрушении цитоплазматических микротубул в клетках паразита. Это сопровождается нарушением абсорбции и транспорта глюкозы, а также снижением активности фумаратредуктазы, что в дальнейшем приводит к гибели гельминта (2). В настоящее время фенбендазол широко используется во всем мире в рекомендованных дозах (4-7). Согласно международной классификации The Biopharmaceutics classification system (BCS) guidance, Food and Drug Administration (FDA, США) (<https://www.fda.gov/>), он принадлежит к IV классу средств с малой проницаемостью и плохой растворимостью, то есть имеет малую биодоступность. Следовательно, повышение его водорастворимости повлияет на антигельминтные свойства.

В последние годы повсеместно разрабатываются так называемые средства доставки (drug delivery systems, DDS) биологически активных молекул с целью улучшения растворимости лекарственных веществ и их биодоступности за счет повышения абсорбции, увеличения концентрации в крови и повышения проницаемости лекарственного вещества через биологические мембраны к активным центрам соответствующих рецепторов. Технологии DDS позволяют повысить эффективность применяемых лекарственных средств, снизить их терапевтическую дозу и возможные побочные эффекты. Для улучшения растворимости препаратов применяют разные методы: измельчение и изменение формы кристаллической решетки, создание твердых дисперсий лекарственных веществ с наполнителями, изменение размеров частиц и кристаллической структуры (8-10). Наиболее часто в качестве средств доставки лекарственных препаратов используют циклодекстрины, полисахариды, липосомы, мицеллы и наноразмерные неорганические частицы, с помощью которых образуются супрамолекулярные системы (11-13).

Одна из технологий DDS — механохимическая модификация твердых лекарственных субстанций и вспомогательных веществ. Под действием давления и сдвиговых деформаций в мельницах кристаллическая структура веществ может разупорядочиваться до полной аморфизации. Происходят полиморфные переходы и химические реакции с образованием комплексов или мицелл с повышенной растворимостью (14, 15).

О.Yu. Selyutina с соавт. (16) установили, что производные глицирризиновой кислоты (ГК) способны встраиваться в биологические мембраны клеток, обеспечивая подвижность липидов. Вследствие амфифильности ГК может образовывать мицеллы с гидрофобными лекарственными соединениями и участвовать в их трансмембранном переносе (17-20).

Ранее мы исследовали влияние механохимической технологии на антигельминтную эффективность твердой дисперсии фенбендазола с поливинилпирролидоном и выявили ее высокое терапевтическое действие на лабораторных моделях паразитозов и в производственных условиях в сниженной дозе. Данные физико-химических исследований показали повышение растворимости полученной дисперсии примерно в 3 раза, уменьшение размеров частиц до 5-20 мкм и аморфизацию субстанции фенбендазола (21).

В настоящей работе нами впервые показано изменение физико-химических свойств, параметров фармакокинетики и повышение антигельминтной эффективности фенбендазола, полученного посредством механохимической обработки с использованием динатриевой соли глицирризиновой кислоты для его адресной доставки.

Целью наших исследований было повышение биологической активности твердой дисперсии фенбендазола с динатриевой солью глицирризиновой кислоты, оценка растворимости композиций твердой дисперсии фенбендазола (ТДФ) с Na₂ГК, параметров фармакокинетики и антигельминтной эффективности на лабораторных моделях *Trichinella spiralis* и *Hymenolepis nana* и в полевых условиях на овцах, спонтанно зараженных желудочно-кишечными нематодами и мониезиями.

Методика. Исследования на животных проводили согласно Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических субстанций (22), Правилам надлежащей лабораторной практики РФ (Приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики») и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS 123, Страсбург, 1986).

Твердая дисперсия фенбендазола (methyl 5-(phenylthio)-2-benzimidazole carbamate, 99,0 %, молекулярная масса ~ 299,35) с динатриевой солью глицирризиновой кислоты (ТДФ с Na₂ГК) была получена в Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (г. Москва) в одну стадию механохимического процесса в шаровой мельнице LE-101 (Венгрия). Соотношение фенбендазола («Changzhou Yabong Pharmaceuticals Co., Ltd.», Китай) и динатриевой соли глицирризиновой кислоты («Yuli County Jinxing Licorice Products Co.», Китай) в опытах было равным 1:10. Процесс продолжался в течение 4 ч при 90 об/мин до образования агрегатов частиц размером 0,1-10 мкм.

Для изучения растворимости фенбендазола с Na₂ГК в воде были получены образцы с соотношением компонентов 1:5, 1:10 и 1:20 после 4 ч механообработки, а также использована исходная субстанция фенбендазола. Растворимость определяли после перемешивания в шейкере-инкубаторе GFL-3031 («GFL», Германия) при 25 °С и 180 об/мин в течение 3 ч. Затем суспензионную массу центрифугировали (5810R, «Eppendorf AG», Германия) и оценивали концентрацию препарата в растворе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на Agilent 1100 («Agilent Technologies», Германия) с колонкой Hypersil C18 (длина 150 мм, диаметр 4,6 мм, температура термостата колонки 30 °С, детектор на диодной матрице). Элюент — ацетонитрил-ацетатный буфер, pH 3,4 (1:1); скорость потока — 1 мл/мин. Детектирование проводили при $\lambda = 290$ нм. Объем вводимой пробы — 1 мкл (23).

Параметры фармакокинетики фенбендазола и его метаболитов в организме овец породы ставропольский меринос изучали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектро-

метрическим детектированием (24). Для опыта сформировали две группы клинически здоровых овец (по 5 гол. в каждой), одной однократно перорально задавали ТДФ с Na₂ГК, другой — субстанцию фенбендазола (ФБЗ) (дозы 2 мг/кг). В период опыта животных содержали в одинаковых условиях (Подольский отдел ВНИИП — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН). Пробы крови отбирали из яремной вены до и через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 33, 48, 72 и 144 ч после введения ТДФ с Na₂ГК и базового препарата. Анализ проводили на жидкостном хроматографе высокого давления Agilent 1290 («Agilent Technologies», Германия) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6430 при хроматографическом разделении на колонке Kromasil Eternity XT-2.5-C18 («Nouryon», Швеция) (длина 100 мм, внутренний диаметр 2,1 мм, размер зерна сорбента 2,5 мкм) с предколонкой Kromasil Eternity (2,1×10 мм). Детектирование аналитов и внутреннего стандарта осуществляли с помощью тандемной масс-спектрометрии в режиме записи сигналов выбранных ионных реакций для отрицательно заряженных ионов при температуре ионизации 350 °С, потоке газа 10 л/мин и давлении небулайзера 40 psi. На основании результатов анализа содержания фенбендазола, сульфоксида фенбендазола и сульфона фенбендазола в сыворотке крови овец рассчитывали константу скорости абсорбции, время всасывания в кровь половины введенной дозы, клиренс, максимальную концентрацию, время достижения максимальной концентрации, период полувыведения, площадь под кривой «концентрация–время» и время удержания в кровотоке.

Для оценки эффективности ТДФ с Na₂ГК против *Hymenolepis nana* и *Trichinella spiralis* использовали по 50 белых инбредных мышей-самок линии BALB/c массой тела 16–18 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская обл.). Мышей содержали в карантине в течение 7 сут, а затем распределяли в поликарбонатные клетки по 10 особей. Животные получали стандартный корм (ООО «Лабораторкорм», Россия) в соответствии с нормами кормления РФ (Приказ МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 года «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения») и находились в виварии с естественным и искусственным освещением, контролируемой температурой 20–22 °С и влажностью 60–70 %.

Hymenolepis nana вводили животным внутрижелудочно с помощью шприца по 200 яиц на особь. Для получения яиц цестоды *H. nana* разрушали в небольшом количестве водопроводной воды многократным пипетированием, используя шприц с иглой-канюлей для перорального заражения. На 13-е сут после заражения в желудок мышей I, II и III групп (по 10 особей в каждой) однократно вводили ТДФ с Na₂ГК в дозах соответственно 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг по д.в. в 1 % крахмальном геле. Базовым препаратом служила субстанция ФБЗ, которую 10 особей получали в дозе 2,0 мг/кг (IV опытная группа). Животные контрольной группы (10 особей) получали крахмальную гелевую массу в том же объеме. На 4-е сут после назначения лекарств мышей подвергали декапитации. Эффективность антигельминтиков определяли по данным вскрытия тонкого кишечника, учитывая среднее число обнаруженных цестод и рассчитывая интенсэффективность (25).

Изолят *Trichinella spiralis* получали посредством серийного пассажа личинок I стадии на самках крыс. Инвазионных личинок получали перевариванием мышечной ткани крыс. Материал помещали на 12 ч в жидкость для переваривания (1 л физиологического раствора, 20 мл концентрированной соляной кислоты и 20 г пепсина) при температуре 37 °С в условиях постоянного смешивания в механическом встряхивателе RK-1D

(«DAIHAN Scientific», Южная Корея). После этого суспензию центрифугировали 2 мин при 1000 об/мин (5810R, «Eppendorf AG», Германия). Осадок отмывали физраствором (0,9 % NaCl) с центрифугированием, а затем ресуспендировали в 1,5 % желатине на физрастворе для получения стабильной суспензии. Для подсчета необходимого числа личинок для заражения мышей использовали гемоцитометр («МиниМед», Россия). До заражения мышей содержали в течение 12 ч на голодной диете, затем им в желудок вводили по 200 личинок с помощью туберкулинового шприца (25).

На 3-и сут после заражения мышей разделили на четыре опытные и одну контрольную группы (по 10 особей в каждой). ТДФ с Na₂GК вводили в желудок мышам I, II и III опытных групп в дозах соответственно 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг по д.в. в 1 % крахмальном геле. Субстанцию ФБЗ вводили особям IV опытной группы в дозе 2 мг/кг. Контрольные животные получали 1,5 % крахмальную гелевую в той же дозе. На 2-е сут после введения антигельминтиков животных декапитировали. Эффективность испытываемых средств против нематод определяли по результатам вскрытия. Тонкий кишечник мышей разрезали ножницами по всей длине и помещали в аппарат Бермана в физиологическом растворе. Пробы ставили в термостат на 2 ч при 37-39 °С, после чего осадок исследовали под бинокулярной лупой и подсчитывали число обнаруженных *T. spiralis*. Активность ТДФ с Na₂GК оценивали в сравнении с контрольными животными, рассчитывая среднее число выявленных нематод и интенсэфективность.

Антигельминтную активность ТДФ с Na₂GК изучали на молодняке овец породы ставропольский меринос в производственных условиях ООО «Агроресурс» (Самарская обл., Пестравский р-н), где была зарегистрирована высокая степень заражения гельминтами. Опыты проводили летом 2016-2017 годов (в период максимальной зараженности овец) на 141 особи с массой тела 17-34 кг, включая 50 овец, естественно зараженных *Nematodirus* spp., 52 — другими желудочно-кишечными нематодами подотряда *Strongylata*, 39 — цестодами *Moniezia expansa*. При каждой инвазии животным I, II и III опытных групп назначали однократно перорально ТДФ с Na₂GК в дозах 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг по д.в. в сравнении с субстанцией фенбендазола в дозе 2,0 мг/кг (IV опытная группа). Контрольной группе животных препарат не вводили. Пробы фекалий овец исследовали методом McMaster (26) до и через 15 сут после введения препаратов. Эффективность препаратов рассчитывали на основе сравнения числа яиц гельминтов в фекалиях овец опытных и контрольной групп (27).

Статистическую обработку осуществляли в компьютерной программе SAS/Stat №9.4 SAS System for Windows (https://www.sas.com/en_us/software/sas9.html). Данные полученных фармакокинетических кривых обчитывали с использованием однокамерной модели (Microsoft Excel PKSolver 2.0) (28). Математический анализ проводили по среднему числу гельминтов/яиц (*M*) с определением стандартной ошибки средней (\pm SEM), относительного стандартного отклонения (RSD) при расчете фармакокинетических параметров и уровня значимости (*p*) с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Физико-химические свойства антигельминтиков с натриевой солью глицирризиновой кислоты в качестве средства адресной доставки были детально изучены на примере альбендазола (АБЗ), празиквантела (ПЗК) и фенбендазола (ФБЗ) Е.С. Метелевой с соавт. (19), Е.С. Метелевой с соавт. (29) и И.А. Архиповым с соавт. (23). Показано, что для систем АБЗ/Na₂GК растворимость АБЗ может увеличиваться в 300 раз (300 мг/л), для систем ПЗК/Na₂GК — в 3,5 раза, для ФБЗ/Na₂GК — в 71

раз. Однако в пересчете на концентрации лекарственных веществ (ЛВ) в водных растворах были выбраны композиции ПЗК/Na₂ГК и АБЗ/Na₂ГК с массовым соотношением компонентов 1:10, поскольку увеличение доли ЛВ ведет к понижению растворимости, а Na₂ГК — «перегружает» массу лекарственной формы, предназначенной для перорального приема (19). Нами установлено, что растворимость ТДФ с Na₂ГК в соотношении 1:5; 1:10 и 1:20 повышалась соответственно в 31,2; 40,6 и 70,9 раза (табл. 1).

1. Растворимость чистого албендазола (АБЗ), празиквантела (ПЗК), фенбендазола (ФБЗ) и их твердых дисперсий с динатриевой солью глицирризиновой кислоты (Na₂ГК) в воде (погрешность анализа ±3 %) (19, 23, 29)

Образец (массовое соотношение)	Растворимость в воде, г/л	Увеличение растворимости, разы
Исходный АБЗ	0,001	
АБЗ/Na ₂ ГК (1:5)	0,042	42
АБЗ/Na ₂ ГК (1:10)	0,200	200
АБЗ/Na ₂ ГК (1:20)	0,300	300
Исходный ПЗК	0,234	
ПЗК/Na ₂ ГК (1:5)	0,557	2,38
ПЗК/Na ₂ ГК (1:10)	0,687	2,94
ПЗК/Na ₂ ГК (1:20)	0,819	3,49
Исходный ФБЗ	0,19	
ФБЗ/Na ₂ ГК (1:5)	12,1	31,20
ФБЗ/Na ₂ ГК (1:10)	17,4	40,63
ФБЗ/Na ₂ ГК (1:20)	34,5	70,96

Методами рентгенофазового, термического анализа и электронной микроскопии было установлено, что происходит измельчение частиц и образование их агрегатов неправильной формы (23, 29). Е.С. Meteleva с соавт. (19) на основании результатов фазовых диаграмм растворимости и динамической ¹Н ЯМР-спектроскопии отмечали возникновение межмолекулярного взаимодействия празиквантела с мицеллами с молекулярной массой ~ 80 кДа, которые образуются в водном растворе Na₂ГК. Исследование проницаемости ПЗК через искусственную мембрану по методу РАМРА (parallel artificial membrane permeability assay) через монослой клеток Сасо-2 показало, что скорость диффузии молекул ПЗК с Na₂ГА намного выше, чем у исходного ПЗК (19).

2. Фармакокинетические параметры фенбендазола (ФБЗ) и его метаболитов в организме овец породы ставропольский меринос после введения базового ФБЗ и твердой дисперсии фенбендазола с динатриевой солью глицирризиновой кислоты (ТДФ с Na₂ГК) в дозе 2,0 мг/кг по д.в. (модельный опыт)

Показатель	Фенбендазол		Сульфоксид		Сульфон	
	<i>M</i>	RSD	<i>M</i>	RSD	<i>M</i>	RSD
	Базовый ФБЗ (n = 5)					
ka, ч ⁻¹	0,031	6,7	0,038	1,7	0,034	3,2
t _{1/2ka} , ч	25,62	6,7	18,36	1,6	19,08	3,2
CL, л/ч	0,92	6,6	1,56	3,2	1,36	3,3
C _{max} , нг/мл	19,86	1,6	16,68	1,6	18,14	1,7
T _{max} , ч	40,64	6,2	27,62	2,4	27,84	3,0
T _{1/2} , ч	28,84	6,5	20,12	3,0	21,60	3,1
AUC _{0-t} , нг/(мл·ч)	1156,26	7,0	930,10	2,2	1012,16	3,5
MRT, ч	61,62	8,2	55,26	2,5	56,24	3,2
	ТДФ с Na ₂ ГК (n = 5)					
ka, ч ⁻¹	0,058	5,6	0,032	2,2	0,024	4,2
t _{1/2ka} , ч	13,90	8,4	21,54	1,8	26,34	4,4
CL, л/ч	0,20	7,2	0,48	5,4	0,38	6,5
C _{max} , нг/мл	50,80	4,2	41,76	4,2	42,12	4,8
T _{max} , ч	42,84	9,4	31,70	2,4	40,16	4,2
T _{1/2} , ч	102,26	12,3	24,62	3,5	28,63	3,6
AUC _{0-t} , нг/(мл·ч)	3042,82	3,6	2484,70	4,0	2468,26	4,7
MRT, ч	364,26	9,5	69,10	2,5	80,44	4,2

Примечание. ka — константа скорости абсорбции, t_{1/2ka} — время всасывания в кровь 1/2 введенной дозы, CL — клиренс, C_{max} — максимальная концентрация, T_{max} — время достижения максимальной концентрации, T_{1/2} — период полувыведения, AUC_{0-t} — площадь под кривой «концентрация–время», MRT — время удержания в кровотоке; *M* — средняя величина, RSD — относительное стандартное отклонение, %.

Опыты, проведенные нами на овцах, показали существенную разницу в кинетике фенбендазола после введения животным базового препарата и супрамолекулярного комплекса в дозе по 2,0 мг/кг по д.в. (табл. 2, 3). Фенбендазол и его метаболиты (сульфоксид и сульфен) начали обнаруживаться в сыворотке крови через 2 ч после однократного перорального введения ТДФ с Na₂ГК и только через 4-6 ч после применения базового ФБЗ. Концентрация ФБЗ и его метаболитов после введения ТДФ с Na₂ГК была в 2-3 раза выше. Максимальное содержание фенбендазола, сульфоксида фенбендазола и сульфена в сыворотке крови отмечали через 33 ч. После введения ТДФ с Na₂ГК оно составляло соответственно 58,4; 64,0 и 54,0 нг/мл, базового ФБЗ — 22,1; 16,6 и 18,6 нг/мл.

3. Содержание (нг/мл) фенбендазола и его метаболитов в сыворотке крови овец породы ставропольский меринос после введения базового фенбендазола (ФБЗ) и твердой дисперсии фенбендазола с динатриевой солью глицирризиновой кислоты (ТДФ с Na₂ГК) в дозе 2,0 мг/кг по д.в. (модельный опыт)

Время после введения, ч	Фенбендазол		Сульфоксид		Сульфен	
	M	RSD, %	M	RSD, %	M	RSD, %
Базовый ФБЗ (n = 5)						
0	< LOQ		< LOQ		< LOQ	
1	< LOQ		< LOQ		< LOQ	
2	< LOQ		< LOQ		< LOQ	
4	6,4	3,1	< LOQ		< LOQ	
6	6,6	8,2	6,2	4,6	6,0	4,6
8	6,7	6,0	8,4	6,2	8,5	6,0
12	8,2	11,6	12,5	6,8	13,0	6,5
24	15,8	6,2	19,4	9,6	20,8	3,6
33	22,1	7,0	16,6	8,2	18,6	4,0
48	23,3	6,4	12,4	6,0	15,4	4,2
72	12,4	9,6	8,8	4,6	8,2	8,4
ТДФ с Na ₂ ГК (n = 5)						
0	< LOQ		< LOQ		< LOQ	
1	< LOQ		< LOQ		< LOQ	
2	9,8	8,0	6,4	6,0	6,0	6,4
4	12,4	7,2	16,2	8,4	8,0	7,2
6	20,0	10,4	16,4	7,8	13,0	8,4
8	26,6	11,2	17,6	9,2	20,4	9,3
12	34,2	13,6	28,2	10,0	22,2	10,6
24	41,2	12,6	30,6	11,6	30,8	11,4
33	58,4	12,2	64,0	12,8	54,0	12,2
48	49,6	11,0	37,8	10,6	44,2	11,4
72	44,2	10,3	24,6	9,8	32,0	9,6

Примечание. LOQ — предел количественного определения вещества, RSD — относительное стандартное отклонение, %.

4. Эффективность твердой дисперсии фенбендазола с динатриевой солью глицирризиновой кислоты при экспериментальном трихинеллезе и гименолепидозе белых мышей линии BALB/c (n = 10, M±SEM)

Группа	Среднее число гельминтов, экз.	Эффективность, %	p
Трихинеллез (<i>Trichinella spiralis</i>)			
I	0	100	< 0,0001
II	2,1±0,2	98,05	< 0,001
III	7,8±0,8	92,74	< 0,001
IV	76,5±7,0	28,71	< 0,01
Контроль	107,3±5,6		
Гименолепидоз (<i>Hymenolepis nana</i>)			
I	0	100	< 0,0001
II	0,05±0,002	98,67	< 0,001
III	0,41±0,06	89,04	< 0,001
IV	2,66±0,3	28,88	< 0,01
Контроль	3,74±0,4		

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

Результаты антигельминтного действия ТДФ с Na₂ГК при экспериментальном трихинеллезе белых мышей свидетельствовали о повышении

5. Эффективность твердой дисперсии фенбендазола с динатриевой солью глицирризиновой кислоты при гельминтозах овец породы ставропольский меринос в опыте «контрольный тест» ($M \pm SEM$, производственные условия, ООО «Агроресурс», Самарская обл., Пестравский р-н, 2016-2017 годы)

Группа	Доза по д.в., мг/кг	Заражено до начала опыта, гол.			Среднее число яиц гельминтов в 1 г фекалий, экз.						Эффективность, %		
					до опыта			после лечения					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
I	3,0	10	9	7	266,0±9,8	328,3±8,9	356,2±9,3	0	0	13,6±1,4	100*	100*	96,44*
II	2,0	10	12	8	260,8±9,3	334,0±9,5	364,0±9,4	12,1±1,1	15,3±1,4	32,0±2,3	95,37*	95,42*	91,61*
III	1,0	11	10	9	257,2±9,6	341,4±9,8	357,8±9,2	20,4±1,9	31,6±2,1	72,0±4,7	92,07*	90,75*	81,12
IV	2,0	10	11	8	270,4±8,8	325,3±8,9	370,3±9,1	180,3±5,1	198,0±5,3	314,3±8,8	33,33**	39,14**	17,55**
Контроль		9	10	7	265,4±9,0	330,6±9,2	364,0±8,9	271,0±8,8	342,3±9,6	381,2±9,4			

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика»; 1 — *Nematodirus* spp., 2 — *Strongylata*, 3 — *Moniezia* spp.

*, ** Различия с контролем (животные, не получавшие лекарственного вещества) статистически значимы соответственно при $p < 0,001$ и $p < 0,01$.

эффективности образцов препарата, полученных по механохимической технологии, по сравнению с базовым препаратом — субстанцией фенбендазола (табл. 4). С повышением дозы ТДФ с Na₂GК эффективность против *T. spiralis* увеличивалась. Так, 100 % эффект получили при применении ТДФ с Na₂GК в дозе 3,0 мг/кг по д.в. В дозах 2,0 и 1,0 мг/кг ТДФ с Na₂GК проявил высокую нематодоцидную эффективность (соответственно 98,05 и 92,74 %). У базового препарата в дозе 2,0 мг/кг этот показатель был в 3,4 раза ниже, чем у ТДФ с Na₂GК в той же дозе. У мышей в контрольной группе находили в среднем по 107,3±5,6 экз. *T. spiralis*. При изучении цестодоцидного действия ТДФ с Na₂GК установили 100; 98,67 и 89,04 % эффективность препарата против *H. nana* в дозах соответственно 3,0; 2,0 и 1,0 мг/кг. Эффективность субстанции ФБЗ в дозе 2,0 мг/кг составила 28,88 %. У контрольных животных обнаруживали в среднем по 3,74±0,4 экз. *H. nana*.

Полученные результаты на лабораторных моделях показали повышение эффективности ТДФ с Na₂GК по сравнению с базовым препаратом. В связи с этим мы провели испытание ТДФ с Na₂GК в полевых условиях на овцах против *Nematodirus* spp., желудочно-кишечных стронгилят и *Moniezia* spp. (табл. 5). По результатам копроовоскопических исследований было установлено значительное повышение эффективности ТДФ с Na₂GК по сравнению с субстанцией ФБЗ. ТДФ с Na₂GК в дозе 2,0 мг/кг по д.в. показал 2,8-, 2,4- и 5,2-кратную эффективность против нематодирусов, других желудочно-кишечных стронгилят и мониезий по сравнению с субстанцией фенбендазола в той же дозе. В дозе 3,0 мг/кг ТДФ с Na₂GК имел самую высокую антигельминтную активность. Субстанция ФБЗ показала слабую эффективность.

Повышение эффективности ТДФ с Na₂GК в наших опытах было достигнуто за счет увеличения ее растворимости, абсорбции и, как следствие, биодоступности при получении твердой дисперсии фенбендазола с Na₂GК. Аналогичное проявление эффекта отмечали для твердых композиций лекарственных веществ и Na₂GК (18, 20, 30-32). Поскольку в составе глицирризиновой кислоты присутствуют гидрофильные и гидрофобные составляющие, она способна формировать комплексы с органическими молекулами (33) и образовывать самоассоциаты в водно-спиртовых и водных растворах (34, 35). Производные глицирризиновой кислоты увеличивают подвижность липидов биологических мембран (17, 34), что способствует проникновению молекул лекарственных веществ внутрь клетки. Исследование проницаемости антигельминтика празиквантела на искусственной мембране методом РАМРА Assay показало, что скорость диффузии молекул препарата из его композиции с Na₂GК существенно увеличивается по сравнению с исходным празиквантелом. Включение молекул празиквантела в мицеллы Na₂GК обеспечивает повышенную концентрацию молекул празиквантела в предмембранном слое, то есть доставка препарата происходит быстрее, способствуя ускорению абсорбции лекарственного средства в кровотока (19). При этом динатриевая соль ГК действовала как солюбилизующий агент и носитель для молекул лекарственного вещества, поскольку в нативном виде она не проникает через стенки желудочно-кишечного тракта, а подвергается ферментативному гидролизу в кишечнике (20). Кроме того, взаимодействие ГК с липидным бислоем клеток также может способствовать повышению биодоступности (16), в том числе благодаря взаимодействию с кишечным эпителием. Это может усилить его проницаемость для молекул лекарственного средства и способствовать увеличению градиента концентрации антигельминтика

непосредственно на клеточной стенке, что, в свою очередь, приводит к увеличению абсорбции. Такое повышение биодоступности способствует значительному снижению дозы лекарственного вещества (19, 36).

Таким образом, предложенная технология получения твердой дисперсии фенбендазола (ТДФ) отличается простотой и проводится в одну технологическую стадию посредством активного механохимического процесса (смешивание порошкообразной субстанции лекарственного средства — фенбендазола и динатриевой соли глицирризиновой кислоты $\text{Na}_2\text{ГК}$ в измельчителе ударно-стирающего типа до образования частиц размерами 0,1-10 мкм). Полученный порошок представляет собой твердую дисперсию компонентов, образующих супрамолекулярные комплексы при растворении в воде, и имеет повышенную водорастворимость, степень абсорбции и эффективность. Так, ТДФ с $\text{Na}_2\text{ГК}$ проявляет большую антигельминтную эффективность в дозе меньше терапевтической в 2,5-3,5 раза в опытах на мышах, экспериментально зараженных *Trichinella spiralis*, *Hymenolepis nana*, и на овцах, спонтанно зараженных желудочно-кишечными нематодами и мониезиями, по сравнению с базовой субстанцией фенбендазола. Это происходит вследствие того, что в процессе механохимической обработки молекулы субстанции антигельминтика распределяются в порах и на стенке макромолекул носителя. При этом улучшается всасываемость действующего вещества в пищеварительном тракте при пероральном приеме из-за быстрого высвобождения и доставки через биологические мембраны. Увеличение эффективности ТДФ с $\text{Na}_2\text{ГК}$ обусловлено повышением скорости поступления и увеличением (в 2,5-2,9 раза) максимальной концентрации фенбендазола и его метаболитов в крови, снижением скорости выведения препарата из организма и увеличением времени удерживания препарата в системном кровотоке.

Авторы выражают благодарность д.т.н. С.С. Халикову (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва) за предоставление образцов твердых дисперсий фенбендазола, а также П.П. Кочеткову (ФГБНУ Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К.И. Скрябина — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) за помощь при проведении фармакокинетических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Holsback L., Luppi P.A.R., Silva C.S., Negrão G.C., Conde G., Gabriel H.V., Balestrieri J.V., Tomazella L. Anthelmintic efficiency of doramectin, fenbendazole, and nitroxynil, in combination or individually, in sheep worm control. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2016, 25(3): 353-358 (doi: 10.1590/S1984-29612016025).
2. Riviere J.E., Papich M.G. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. Wiley-Blackwell, Hoboken, 2009.
3. Архипов И.А. *Антигельминтики: фармакология и применение*. М., 2009.
4. Torres-Acosta J.F.J., Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 2008, 77(2-3): 159-173 (doi: 10.1016/j.smallrumres.2008.03.009).
5. Islam M., Islam S., Howlader M.R., Lucky N.S. Comparative efficacy of Albendazole, Fenbendazole and Levamisole against gastrointestinal nematodiasis in cattle of Bangladesh. *International Journal of Biological Research*, 2015, 3(1): 25-35.
6. Trambo S.R., Shahardar R.A., Allaie I.M., Wani Z.A., Abbas M. Efficacy of ivermectin, closantel and fenbendazole against gastrointestinal nematodes of sheep in Kashmir valley. *J. Parasit. Dis.*, 2017, 41(2): 380-382 (doi: 10.1007/s12639-016-0810-5).
7. Bushra M., Shahardar R.A., Allaie I.M., Wani Z.A. Efficacy of closantel, fenbendazole and ivermectin against GI helminths of cattle in central Kashmir. *J. Parasit. Dis.*, 2019, 43(2): 289-293 (doi: 10.1007/s12639-019-01091-w).
8. Kalpana P., Manish S., Dinesh S.K., Surendra J.K. Solid dispersion: approaches, technology involved, unmet need & challenges. *Drug Invent. Today*, 2010, 2(7): 349-357.

9. Krishnaiah Y.S.R. Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J. Bioequiv. Availab.*, 2010, 2(2): 28-36 (doi: 10.4172/jbb.1000027).
10. Ye Y., Zhang X., Zhang T., Wang H., Wu B. Design and evaluation of injectable niclosamide nanocrystals prepared by wet media milling technique. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2015, 41(9): 1416-1424 (doi: 10.3109/03639045.2014.954585).
11. *Polysaccharides for drug delivery and pharmaceutical applications. ACS Symposium Series, vol. 934* /R.H. Marchessault, F. Ravenelle, X.X. Zhu (eds.). Washington DC, 2006 (doi: 10.1021/bk-2006-0934.fw001).
12. Kang J., Kumar V., Yang D., Chowdhury P.R., Hohl R.J. Cyclodextrin complexation: influence on the solubility, stability and cytotoxicity of camptothecin, an antineoplastic agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 15(2): 163-170 (doi: 10.1016/s0928-0987(01)00214-7).
13. Loftsson T., Vogensen S.B., Brewster M.E., Konráðsdóttir F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 96(10): 2532-2546 (doi: 10.1002/jps.20992).
14. Shakhshneider T.P., Boldyrev V.V. Mechanochemical synthesis and mechanical activation of drugs. In: *Reactivity of molecular solids* /E.V. Boldyreva, V.V. Boldyrev (eds.). John Wiley & Sons, New York, 1999.
15. Душкин А.В., Сунцова Л.П., Халиков С.С. Механохимическая технология для повышения растворимости лекарственных веществ. *Фундаментальные исследования*, 2013, 1(часть 2): 448-457.
16. Selyutina O.Yu., Polyakov N.E., Korneev D.V., Zaitsev B.N. Influence of glycyrrhizin on permeability and elasticity of cell membrane: perspectives for drugs delivery. *Drug Delivery*, 2016, 23(3): 848-855 (doi: 10.3109/10717544.2014.919544).
17. Селютина О.Ю., Апанасенко И.Е., Поляков Н.Э. Исследование мембраномодифицирующей активности глицирризиновой кислоты. *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2015, 64(7): 1555-1559.
18. Dushkin A.V., Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Tolstikov G.A. Complexes of polysaccharides and glycyrrhizic acid with drug molecules. Mechanochemical synthesis and pharmacological activity. In: *The complex world of polysaccharides* /D.N. Karunaratn (ed.). InTech, Rijeka, 2012.
19. Meteleva E.S., Chistyachenko Y.S., Sunstova L.P., Khvostov M.V., Polyakov N.E., Selyutina O.Y., 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. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019, 50: 66-77 (doi: 10.1016/j.jddst.2019.01.014).
20. Graebn C.S. The pharmacological activities of glycyrrhizinic acid (“glycyrrhizin”) and glycyrrhetic acid. In: *Sweeteners. Reference series in phytochemistry* /J.M. Merillon, K. Ramawat (eds.). Springer, Cham, 2016 (doi: 10.1007/978-3-319-26478-3_15-1).
21. Arkhipov I.A., Khalikov S.S., Sadov K.M., Dushkin A.V., Meteleva E.S., Varlamova A.I., Odoevskaya I.M., Danilevskaya N.V. Influence of mechanochemical technology on anthelmintic efficacy of the supramolecular complex of fenbendazole with polyvinylpyrrolidone. *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, 2019, 6(1): 133-141 (doi: 10.5455/javar.2019.f323).
22. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических субстанций* /Под ред. Р.У. Хабриева. М., 2005.
23. Архипов И.А., Халиков С.С., Душкин А.В., Варламова А.И., Мусаев М.Б., Поляков Н.Э., Чистяченко Ю.С., Садов К.М., Халиков М.С. *Супрамолекулярные комплексы антигельминтных бензимидазольных препаратов. Получение и свойства*. М., 2017.
24. Кочетков П.П., Варламова А.И., Абрамов В.Е., Мисюра Н.С., Абрамова Е.В., Абрамов С.В., Кошеваров Н.И., Архипов И.А. Определение фенбендазола и его метаболитов в молоке коров методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Российский паразитологический журнал*, 2016, 38(4): 554-562 (doi: 10.12737/23082).
25. Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедева М.Н. *Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине* /Под ред. И.В. Тарасевича. М., 1989.
26. Ministry of Agriculture Fisheries and Food (MAFF). *Manual of veterinary parasitological laboratory techniques*. Reference Book 418, Her Majesty's Stationery Office, London, 1986.
27. Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Dunkan J.L., Kassai T., Malone J.B., Pancavich J.A., Reinecke R.K., Slocombe O., Taylor S.M., Vercruyse J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 1995, 58(3): 181-213 (doi: 10.1016/0304-4017(95)00806-2).
28. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 2010, 99(3): 306-314 (doi: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007).
29. Метелева Е.С., Чистяченко Ю.С., Сунцова Л.П., Цыганов М.А., Вишневская Г.Б., Августиневич Д.Ф., Хвостов М.В., Поляков Н.Э., Толстикова Т.Г., Мордвинов В.А., Душ-

- кин А.В., Ляхов Н.З. Физико-химические свойства и противоописторхозное действие механохимически синтезированных твердых композиций празиквантела и динатриевой соли глицирризиновой кислоты. *Доклады Академии наук*, 2018, 481(6): 694-697 (doi: 10.31857/S086956520002111-5).
30. Wang Y., Zhao B., Wang S., Liang Q., Cai Y., Yang F., Li G. Formulation and evaluation of novel glycyrrhizic acid micelles for transdermal delivery of podophyllotoxin. *Drug Delivery*, 2016, 23(5): 1623-1635 (doi: 10.3109/10717544.2015.1135489).
 31. Kong R., Zhu X., Meteleva E.S., Chistyachenko Y.S., Sunstova 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. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 534(1-2): 108-111 (doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.011).
 32. Deese A.J., Dratz E.A., Hymel L., Fleischer S. Proton NMR T₁, T₂, and T_{1ρ} relaxation studies of native and reconstituted sarcoplasmic reticulum and phospholipid vesicles. *Biophys. J.*, 1982, 37(1): 207-216 (doi: 10.1016/s0006-3495(82)84670-5).
 33. Sakamoto S., Nakahara H., Uto T., Shoyama Y., Shibata O. Investigation of interfacial behavior of glycyrrhizin with a lipid raft model via a Langmuir monolayer study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, 2013, 1828(4): 1271-1283 (doi: 10.1016/j.bbamem.2013.01.006).
 34. Kornievskaya V.S., Kruppa A.I., Leshina T.V. NMR and photo-CIDNP investigations of the glycyrrhizic acid micelles influence on solubilized molecules. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2008, 60(1): 123-130 (doi: 10.1007/s10847-007-9360-x).
 35. Matsuoka K., Miyajima R., Ishida I., Karasawa S., Yoshimura T. Aggregate formation of glycyrrhizic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005, 500: 112-117 (doi: 10.1016/j.colsurfa.2016.04.032).
 36. Kong R., Zhu X., Meteleva E.S., Chistyachenko Y.S., Sunstova 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. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 534(1-2): 108-118 (doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.011).

ФГБНУ Всероссийский НИИ фундаментальной
и прикладной паразитологии животных и растений
им. К.И. Скрябина — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН,
117218 Россия, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28,
e-mail: arsphoeb@mail.ru ✉, arkipovhelm@mail.ru

Поступила в редакцию
11 ноября 2019 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2020, V. 55, № 4, pp. 830-842

BIOLOGICAL ACTIVITY OF FENBENDAZOLE BASED ON SUPRAMOLECULAR DELIVERY SYSTEM WITH DISODIUM SALT OF GLYCYRRHIZIC ACID

A.I. Varlamova, I.A. Arkhipov

Skryabin All-Russian Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants — Branch of Federal Science Center Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary RAS, 28, Bolshaya Chermushkinskaya ul., Moscow, 117218 Russia, e-mail arsphoeb@mail.ru (corresponding author ✉), arkipovhelm@mail.ru
ORCID:

Varlamova A.I. orcid.org/0000-0001-8364-5055

Arkhipov I.A. orcid.org/0000-0001-5165-0706

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The authors are grateful to D.Sc. S.S. Khalikov (Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds RAS) for providing samples of solid dispersions of fenbendazole, and to P.P. Kochetkov (Skryabin All-Russian Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants) for his help in pharmacokinetic studies.

Received November 11, 2019

doi: 10.15389/agrobiology.2020.4.830eng

Abstract

Due to the wide spread of animal helminthiasis, it becomes necessary to use innovative antiparasitic drugs. Fenbendazole is widely used all over the world for chemotherapy of helminthiasis, but in some cases, it is effective only in a high dose. This study, for the first time, has shown changes of physicochemical properties, pharmacokinetic parameters and an increase in the anthelmintic efficacy of mechanochemically obtained complexes of fenbendazole with disodium salt of glycyrrhizic acid for targeted delivery. Our research aimed to increase the biological activity of a solid dispersion of fenbendazole with disodium salt of glycyrrhizic acid (SDF with Na₂GA), to evaluate the solubility of SDF compositions with Na₂GA, pharmacokinetic parameters, and anthelmintic efficacy for laboratory models of *Trichinella spiralis* and *Hymenolepis nana* and in field tests on sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes and moniesia. SDF with Na₂GA was obtained in one-stage pro-

cess in LE-101 ball mill (Hungary). The ratio of fenbendazole (Changzhou Yabong Pharmaceuticals Co., Ltd., China) and disodium salt of glycyrrhizic acid (Yuli County Jinxing Licorice Products Co., China) was 1:10. The process continued for 4 hours at 90 rpm. Pharmacokinetic parameters of fenbendazole and its metabolites in sheep were studied by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. SDF with Na₂GA and the substance of fenbendazole (FBZ) was administered to two groups of clinically healthy sheep (5 animals each) once per or at the dose of 2 mg/kg of active substance. Blood samples were taken from the jugular vein 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 33, 48, 72, and 144 hours after administration of SDF with Na₂GA and the basic drug. The absorption rate constant, absorption half-life, clearance of the drug from the blood plasma, maximum drug concentration, time to reach maximum plasma drug concentration following drug administration, elimination half-life, area under the concentration-time curve and mean residence time were calculated. The efficacy of SDF with Na₂GA against *Hymenolepis nana* and *Trichinella spiralis* was studied with 50 white inbred female BALB/c mice weighing 16-18 g. The eggs of *H. nana* were administered intragastrically with a syringe, 200 eggs per animal. On day 13 after infection, SDF with Na₂GA in 1 % starch gel was administered into the stomach of mice of I, II and III groups (10 animals each) at doses of 3.0; 2.0 and 1.0 mg/kg of active substance, respectively. FBZ was the basic drug which was applied at the dose of 2.0 mg/kg (experimental group IV). The animals of the control group received the same volume of the starch gel. *Trichinella spiralis* was isolated by serial passages of the first stage larvae to female rats. Before infection, the mice were kept on a starvation diet for 12 hours, and then 200 larvae were injected into their stomachs using a tuberculin syringe. On day 3 after infection, the mice were divided into four experimental and one control groups (10 animals each). SDF with Na₂GA in 1 % starch gel was administered into the stomachs of mice of experimental groups I, II, and III at doses of 3.0; 2.0 and 1.0 mg/kg of active substance, respectively. The FBZ substance was administered to mice of IV experimental group at the dose of 2 mg/kg. Control group of animals received 1,5 % starch gel at the same dose. The efficacy of the drugs against *H. nana* and *T. spiralis* was determined from necropsy data. The anthelmintic activity of SDF with Na₂GA was also studied on young Stavropol merino sheep in field tests (LTD Agroresurs, Samara Province, Pestravsky District) in the summer 2016-2017. SDF with Na₂GA was administered per or to the animals of the experimental groups (a single application per or at the doses of 3.0; 2.0 and 1.0 mg/kg of active substance vs. FBZ at the dose of 2.0 mg/kg. The control group of animals did not receive the drugs. Anthelmintic activity of drugs was determined according to the data of necropsy of the intestines of mice and the results of studies of sheep feces samples by the McMaster method before and after administration of the drugs. The data of physicochemical studies have shown an increase in solubility, a decrease in the particle size of the compositions of SDF with Na₂GA, and the formation of irregularly shaped aggregates. The pharmacokinetic parameters indicated a significant increase in the rate of absorption of SDF with Na₂GA and their entry into the blood, a 2,5-fold increase in the maximum concentration of fenbendazole and its metabolites in the blood, as well as a decrease in the rate of drug elimination from the body compared to the FBZ. SDF with Na₂GA (3.0; 2.0 and 1.0 mg/kg) showed 100; 98,05 and 92,74 % activity against *T. spiralis*, 100, 98.67 and 89.04 % against *H. nana*, 100, 95.37 and 92.07 % against *Nematodirus* spp., 100, 95.42 and 90.75 % against gastrointestinal strongylates, and 96.44, 91.61 and 81.12 % against *Moniezia expansa*. The FBZ (2.0 mg/kg) anthelmintic activity was 3.4 times lower than that of the same dose of SDF with Na₂GA upon experimental trichinellosis of mice. Its efficacy was 28.88 % against experimental hymenolepiasis of mice. The FBZ substance showed low efficacy against *Nematodirus* spp. (33.33 %), other gastrointestinal strongylates (39.14 %) and *Moniezia* spp. (17.55 %). These findings allow us to conclude that the development of drugs based on fenbendazole solid dispersion with glycyrrhizic acid disodium salt is promising, and the production technology can be scaled up.

Keywords: fenbendazole, solid dispersion, disodium salt of glycyrrhizic acid, efficacy, pharmacokinetics, helminthiasis.