

УДК 577.325.5:57.021

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ТВЕРДЫХ ДИСПЕРСИЙ И КРИСТАЛЛОВ ФЕНБЕНДАЗОЛА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2023 г. И. А. Архипов*, С. О. Мовсесян**, С. С. Халиков***, Е. А. Хакина***, А. И. Варламова*.,@, М. С. Халиков*.,***, М. М. Ильин***

*Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал ФГБНУ “Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН”, ул. Большая Черемушкинская, 28, Москва, 117218 Россия

**Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

***Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, ул. Вавилова, д. 28, стр. 1, Москва, 119334 Россия

@E-mail: arsphoeb@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 19.12.2022 г.

Фенбендазол (ФБЗ) – является одним из наиболее широко применяемых препаратов в ветеринарной практике. Модификация его физико-химических свойств, в частности параметра растворимости, способствует изменению его биологической активности, что показано на модели трихинеллеза белых мышей. В работе представлен анализ методов получения новых препаратов фенбендазола: твердых дисперсий фенбендазола с полимерами, а также комбинаций с полимерами и янтарной кислотой (ЯК) и смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК; изучено содержание действующего вещества, стабильность и влияние на биологическую активность.

Ключевые слова: фенбендазол, сульфоксид, твердая дисперсия, смешанные кристаллы, стабильность, полимеры, биологическая активность, белые мыши

DOI: 10.31857/S1026347022600856, **EDN:** MOPEWD

В связи с расширением возможностей механохимической технологии для модификации плохо растворимых субстанций лекарственных препаратов и проблемой достаточно широкого распространения гельминтозов жвачных животных и необходимостью их профилактики и терапии актуальным явилось привлечение в сферу исследований субстанций антигельминтных препаратов. В результате были получены твердые дисперсии (ТД) фенбендазола, альбендазола, празиквантела, триклабендазола и др. с водорастворимыми полимерами (поливинилпирролидон, арабиногалактан) и другими вспомогательными компонентами для повышения их растворимости. Полученные ТД можно рассматривать как альтернативные лекарственные формы, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с обычными лекарственными формами, в частности, получение в одну стадию, удобство применения и низкая себестоимость (Гламаздин и др., 2013; Халиков и др., 2015; Chistyachenko *et al.*, 2015; Мусаев и др., 2017; Arkh-

ipov *et al.*, 2017, 2019; Avgustinovitch *et al.*, 2019; Khalikov *et al.*, 2019; Meteleva *et al.*, 2019). Анализ растворимости полученных ТД указывает на возможность регулирования этого показателя путем варьирования условий твердофазной механохимической модификации субстанций лекарственных веществ с помощью полимеров, а по данным ИК-спектроскопии сделано предположение об образовании комплексов включения (внутримолекулярные или супрамолекулярные) при формировании ТД и их дальнейшем использовании при приготовлении лекарственных форм. Полученные ТД обладали повышенной биологической активностью, что позволяет считать метод твердофазной механохимической модификации лекарственных веществ перспективным в получении инновационных препаратов (Khalikov *et al.*, 2019; Varlamova *et al.*, 2020).

Однако существует другой подход для получения альтернативных форм на основе фенбендазола (ФБЗ). Сузов с соавт. (Surov *et al.*, 2021) сообщили о

получении со-кристаллов солей ФБЗ с некоторыми сульфокислотами. Новые твердые формы ФБЗ показали значительное повышение растворимости по сравнению с субстанцией ФБЗ, что представляло интерес для изучения их антигельминтной активности с целью оценки перспектив применения таких форм ФБЗ. Принимая во внимание возможность получения со-кристаллов бетулина методами механохимии (Мызь и др., 2020), нами была предпринята попытка получения кристаллов ФБЗ с янтарной кислотой (ЯК), обладающей широким спектром активности. Известно, что ЯК является эндогенным внутриклеточным метаболитом цикла Кребса с энергосинтезирующей функцией. При участии кофермента флавинадениндинуклеотида ЯК митохондриальным ферментом сукцинатдегидрогеназой быстро трансформируется в fumarовую кислоту и далее в другие метаболиты цикла трикарбоновых кислот. Таким образом, ЯК стимулирует аэробный гликолиз и синтез АТФ в клетках. Конечным продуктом метаболизма янтарной кислоты в цикле Кребса является двуокись углерода и вода. ЯК улучшает тканевое дыхание за счет активации транспорта электронов в митохондриях. Механизм действия янтарной кислоты определяет прежде всего ее антиоксидантные свойства, способность стабилизировать биомембраны клеток, модулировать работу рецепторных комплексов и прохождение ионных токов, усиливать связывание эндогенных веществ, улучшать синаптическую передачу. Соли ЯК – сукцинаты способны предотвращать или устранять постгипоксические нарушения энергетического метаболизма в организме и метаболический ацидоз (Папуниди и др., 2000; Евглевский и др., 2013).

В связи с этим целью работы было проведение анализа методов получения новых препаратов фенбендазола (твердые дисперсии ФБЗ с полимерами, твердые дисперсии ФБЗ с полимерами и ЯК, смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК), изучение содержания в них действующего вещества, стабильности и влияния на биологическую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проводили на базе Центра паразитологии Института проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН, Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиала ФГБНУ “Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН”. В опытах использовали: фенбендазол (ФБЗ) – 5-(фенилтио)-2-бензимидазолкарбамаг (99.0%) производства Changzhou Yabang Pharmaceuticals Co. Ltd (Китай); янтарную кислоту (ЯК) производства ООО “Верфарм” (Москва); поливинилпирролидон

(ПВП) – 1 этенилпирролидин-2-он марки К-30, производитель – Boai NKY Pharmaceuticals Ltd. (КНР), Batsch number P160828002-0; арабиногалактан (АГ) марки “Левитол-арабиногалактан” ТУ 9325-008-70692152-08, производитель – АО “Аметис” (Россия, Благовещенск); экстракт солодки (ЭС) – с содержанием 24.9% глицирризиновой кислоты производства ООО “Вистерра”, Алтайский край (Декларация соответствия ТСН RU Д–RU.AF96.V.00958).

Механохимическое получение твердой дисперсии состава ФБЗ : ПВП (1 : 9) проводили в металлическом барабане валковой мельницы LE-101 (Hungary) путем загрузки 10.0 г субстанции ФБЗ, 90.0 г ПВП и 1600 г металлических шаров (30 шаров с диаметром 25 мм компании ООО “Техно-Центр”, г. Рыбинск) с последующей механообработкой при следующих условиях: объем загрузки – 80%; модуль – 1 : 16; скорость вращения барабана 60–70 об./мин. Механообработку проводили в течение 6 часов с отбором проб через 1 ч для анализа на изменение растворимости. Аналогично были получены ТД следующих составов, соответственно: ФБЗ : АГ (1 : 9), ФБЗ:ЭС (1 : 9). Для получения ТД ФБЗ с ПВП и ЯК в металлический барабан валковой мельницы была загружена предварительно приготовленная физическая смесь из 10.0 г ФБЗ, 10.0 г ЯК и 30.0 г полимера (ПВП или АГ соответственно), которая подвергалась механообработке при следующих условиях: модуль 1 : 16, скорость вращения барабана 60–70 об./мин, время обработки 5 ч.

Получение образцов смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК проводили аналогично методики (Мызь и др., 2020) с некоторыми изменениями, а именно, вместо планетарно-центробежной мельницы АГО, нами механообработка компонентов проводилась в агатовой ступке путем перетиравания 460 мг ФБЗ и 460 мг ЯК в течение 10 мин. Добавив в содержимое ступки 10 мл диоксиана, механообработка была продолжена еще в течение 5 мин. Содержимое ступки переносили в колбу на 50 мл и проводили нагревание при перемешивании на магнитной мешалке. Через 5 мин нагревания белая суспензия превращалась в прозрачный светло-розовый раствор, который оставляли в закрытой колбе. В растворе в течение суток выпало 0.78 г мелкодисперсного осадка светло-желтого цвета. Аналогично получали смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК с добавлением в качестве растворителей ацетонитрила и изопропанола.

Для определения растворимости полученных ТД фенбендазола с полимерами и ЯК использовали методику С.С. Халикова с соавт. с погрешностью анализа $\pm 3\%$ (Халиков и др., 2015).

Изучение содержания действующего вещества и возможных процессов окисления при получении ТД и смешанных кристаллов ФБЗ проводили

Таблица 1. Растворимость образцов смешанных кристаллов ФБЗ

Наименование образца	Растворимость	
	абсолютная, мг/кг	увеличение, раз
Фенбендазол, исходная субстанция	0.33	–
Смешанные кристаллы ФБЗ и ЯК, полученные в диоксане (22% ФБЗ и 16% СО ФБЗ)	0.20	0.6
Смешанные кристаллы ФБЗ и ЯК, полученные в ацетонитриле (95% ФБЗ и 3% СО ФБЗ)	0.73	2.2
Смешанные кристаллы ФБЗ и ЯК, полученные в изопропаноле (75% ФБЗ и 3% СО ФБЗ)	1.1	3.2

с помощью ВЭЖХ-МС анализа по собственной методике с помощью жидкостного хромато-масс-спектрометра Shimadzu LCMS-2020 с ионизацией электрораспылением и одноквадрольным детектором масс. В качестве стационарной фазы использовали колонку Shim-pack GIST 3 μ m C18 3 \times 150 мм с предколонкой Shim-pack GIST (G) 5 μ m C18 4 \times 10 мм. Элюирование проводили в изократическом режиме смесью 60 об. % ацетонитрила (99.9%) и 40 об. % раствора муравьиной кислоты (0.1 об. %) в воде (Milli-Q), скорость потока 0.7 мл/мин. Температуры термостата колонок, нагревательного блока и линии десольватации составляли 40°C, 250°C и 400°C, соответственно. В качестве осушающего и распыляющего газа использовался азот (99.999%), скорость потока 15 и 3 л/ч соответственно. Разность потенциалов между капилляром распыления и капилляром ввода составляла 4.5 кВ. Навеску анализируемой лекарственной субстанции (0.1–0.7 мг) растворяли в 1 мл ацетонитрила с использованием вортекса, перед анализом пробы центрифугировали в течение 2 мин при 5000 об./мин для осаждения нерастворенной части образца. Объем ввода пробы составил 2 μ л. Для проведения количественного анализа содержания ФБЗ в лекарственных субстанциях использовали метод внешнего стандарта. Готовили исходный раствор ФБЗ в ацетонитриле с концентрацией 0.66 мг/мл, затем методом разбавления исходного раствора получали растворы с концентрациями 0.33, 0.165, 0.0825 и 0.04125 мг/мл. Полученные растворы анализировали с использованием указанных выше условий анализа и строили зависимость площади под пиком фенбендазола от концентрации для получения калибровочного графика. Для расчетов использовали программу LabSolutions и Microsoft Excel.

Изучение биологической активности различных форм на основе ФБЗ проводили на лабораторной модели трихинеллеза белых мышей, экспериментально инвазированных *Trichinella spiralis* в возрасте 1.5–2 мес. в дозе 200 личинок. На третьи сутки после заражения мышам шести опытных групп (по 10 особей в каждой) вводили перорально однократ-

но субстанции ФБЗ, полученные с различными компонентами в дозе по 2.0 мг/кг по действующему веществу (ДВ), т.е. по фенбендазолу. Мыши седьмой группы получали базовый препарат – субстанцию ФБЗ в дозе 2.0 мг/кг. Животные контрольной группы препарат не получали. Животных убивали декапитацией на вторые сутки после введения препаратов. 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°C, после чего осадок исследовали под бинокулярной лупой, подсчитывая число обнаруженных *T. spiralis* и рассчитывая интенсивность (ИЭ) (Астафьев и др., 1989; Архипов и др., 2019).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении растворимости твердой дисперсии ФБЗ с полимерами, было установлено повышение растворимости до 24 раз для композиции ФБЗ : ПВП (1 : 9); для ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9) – увеличение растворимости в 12 раз; ТД состава ФБЗ : ЭС (1 : 9) – увеличение растворимости в 37 раз, что подтверждено результатами наших предыдущих исследований. Полученные ТД многокомпонентных составов ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3) и ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3) обладали повышенной растворимостью – в 19 и 11 раз соответственно. Данные по растворимости смешанных кристаллов ФБЗ и ЯК, полученных в различных растворителях представлены в табл. 1.

Анализ данных табл. 1 позволил выбрать для проведения биологических испытаний образцы смешанных кристаллов с наибольшей растворимостью, т.е. образцы смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК, полученных в ацетонитриле и изопропаноле.

Надо отметить, что ТД с полимерами представляют собой стабильные по ДВ тонкодиспергированные порошки, которые не подвергаются процессам деструкции ни в условиях механообработки, ни в течение 5–6 лет хранения, что подтверждается данными ВЭЖХ-МС исследований (рис. 1).

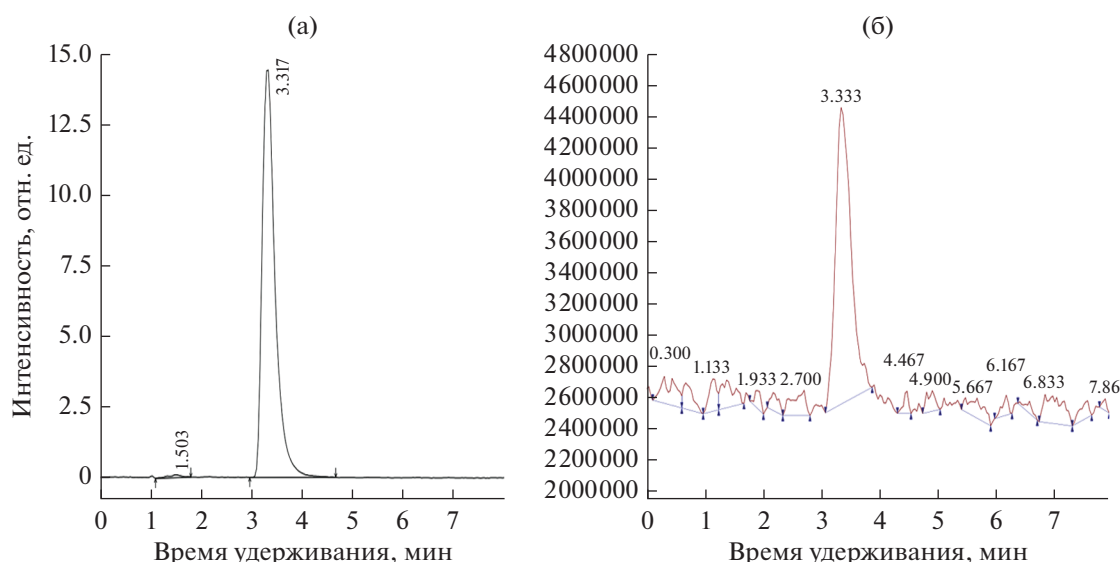


Рис. 1. Хроматограмма ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9), 2015 г. производства, спектрофотометрический детектор, 295 нм (а); хроматограмма тока для положительных ионов ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9), 2015 г. производства (б).

Анализ данных рис. 1 показывает, что в масс-спектре время 3.33 мин соответствует чистому ФБЗ, а сульфоксида ФБЗ – это основной метаболит фенбендазола, образующийся в реакции его сульфокисления, в образце обнаружено не было даже при сроках хранения более 7 лет.

Анализ ВЭЖХ-МС образцов ТД фенбендазола с ПВП и с ЭС (табл. 2) также показал отсутствие примесей в целевых продуктах.

Анализ многокомпонентных твердых дисперсий составов ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3) и ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3) методом ВЭЖХ-МС подтвердил ста-

бильность субстанции ФБЗ при его твердофазной механообработке с ЯК (рис. 2).

Масс-спектры обоих образцов при 3.33 мин соответствуют чистому ФБЗ, а продукта его окисления – сульфоксида ФБЗ (СО ФБЗ) – в образцах не обнаружено.

При изучении кристаллов ФБЗ с ЯК, полученных с использованием в качестве растворителя диоксана, ВЭЖХ-МС анализ осадка показал, что они представляет собой смесь из 22% ФБЗ, 16% СО ФБЗ, около 7% не идентифицированных примесей, остальное – ЯК (рис. 3). При этом продукта присоединения не обнаружено.

Таблица 2. Содержание фенбендазола (%) в его продуктах, полученных различными методами

Образец, условия и дата получения	ФБЗ теор.	ФБЗ* найденное
ТД состава ФБЗ : АГ (1 : 9), 27.02.2015	10	15 ¹
ТД состава ФБЗ : ПВП (1 : 9), 30.06.2020	10	14 ¹
ТД состава ФБЗ : ЭС (1 : 9), м/о** 0.5 час, 20.11.2019	10	5 ²
ТД состава ФБЗ : ЭС (1 : 9), м/о 1,5 час, 20.11.2019	10	11 ¹
ТД состава ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3), 07.04.2022	20	23 ¹
ТД состава ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3), 07.04.2022	20	21 ¹
Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК, полученные в диоксане с содержанием 16% СО ФБЗ, 29.04.2022	98	22
Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК, полученные в ацетонитриле с содержанием 3% СО ФБЗ, 29.04.2022	98	95
Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК, полученные в изопропанолe с содержанием 3% СО ФБЗ, 29.04.2022	98	75

Примечание. * различие между теоретическим и найденными значениями можно объяснить увеличением растворимости в воде¹ и не полным растворением ТД в ацетонитриле², ** м/о – механохимическая обработка.

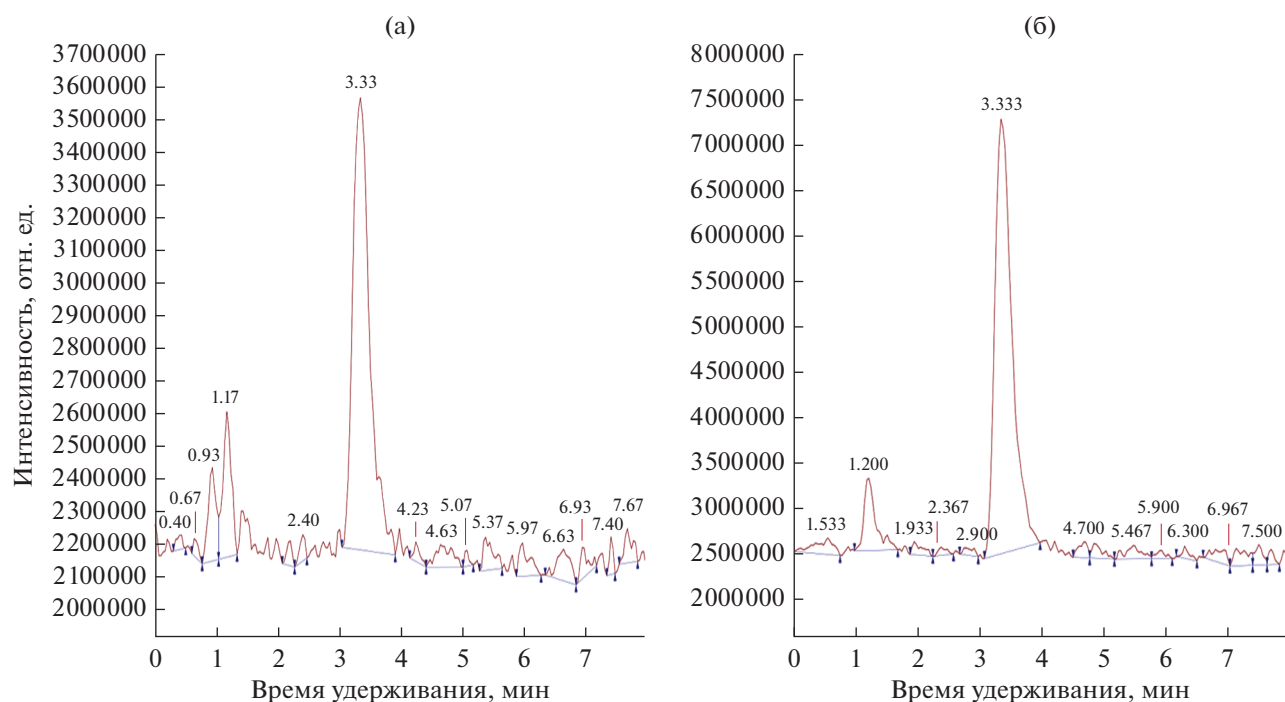


Рис. 2. Хроматограммы тока для положительных ионов ТД составов: а) ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3), полученной при твердофазной механообработке компонентов (ФБЗ, ПВП и ЯК) в апреле 2022 г.; б) ФБЗ : ЯК : АГ (1 : 1 : 3), полученной при твердофазной механообработке компонентов (ФБЗ, АГ и ЯК) в апреле 2022 г.

Из данных на рис. 3 видно, что при проведении реакции в кипящем диоксане получается продукт, который представляет собой смесь исходного ФБЗ (в масс-спектре время 3.33 мин) и СО ФБЗ (в масс спектре время 1.57 мин).

Аналогично были изучены смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК, полученные при добавлении ацетонитрила. Установлено, что выпавший осадок состоял из 95% ФБЗ, 3% СО ФБЗ, остальное – ЯК. Продукта присоединения не найдено. Смешанные кристаллы, в процессе получения которых добавляли изопропанол, состояли из 75% ФБЗ, 3% СО ФБЗ, остальное – ЯК. Продукта присоединения не найдено.

Стоит отметить, что изучение эффективности и безопасности нового лекарственного препарата, внедряемого в ветеринарную практику, является необходимым важным условием. Стабильность лекарственного вещества и его качество тесно связаны между собой. Основным критерий стабильности – это сохранение качества лекарственного средства. Снижение активности лекарственного вещества говорит о его нестабильности и уменьшении количества активно действующего вещества. Процессы, происходящие при хранении лекарственных веществ, могут привести к изменению их химического состава или физических свойств, что может привести к постепенной потере фармакологической активности и накоплению посторонних примесей. Из физических факторов

наибольшее влияние оказывают температура, свет и влажность. Химические процессы, происходящие при хранении лекарственных веществ, тесно связаны с влиянием физических факторов, к ним можно отнести: реакции окисления-восстановления, декарбоксилирования, гидролиз, фотохимическую деструкцию, изомеризацию и др. Так, в работе (Fan *et al.*, 2021) была показана возможность превращения ряда сульфидов, в том числе альбендазола (АБЗ) и ФБЗ в соответствующие сульфоксиды в смеси MeOH и H₂O (об./об. 2/1) под действием света, а именно, синглетный кислород играет важную роль в фотосульфоксидировании сульфидов. Надо отметить, что в наших более ранних работах (Халиков и др., 2015; Chistyachenko *et al.*, 2015) по получению ТД на основе АБЗ и ФБЗ с водорастворимыми полимерами методами механохимии не наблюдалось образования соответствующих сульфонов и сульфоксидов, что было подтверждено методом ВЭЖХ анализа продуктов механообработки. В то же время известно, что высокая антигельминтная активность ФБЗ объясняется образованием первичных метаболитов, в частности, сульфоксида и сульфона ФБЗ, которые были обнаружены в крови и молоке обработанных животных (Кочетков и др., 2016; Varlamova *et al.*, 2020). Известно, что при поступлении в организм фенбендазол в печени последовательно метаболизируется до сульфоксида и затем до сульфона фенбендазола под действием микросо-

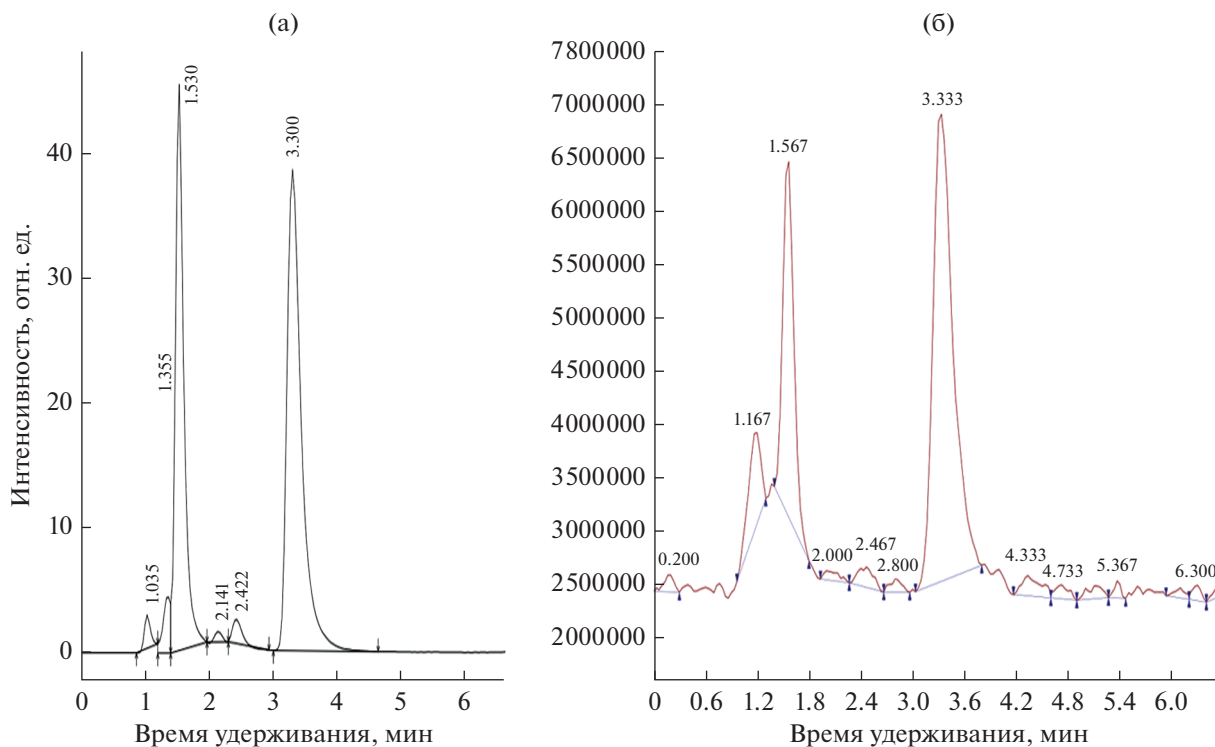


Рис. 3. Хроматограмма смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК (механохимия твердых компонентов с последующим кипячением композиции в диоксане), спектрофотометрический детектор, 295 нм (а); хроматограмма тока для положительных ионов этого же образца (б).

мальных ферментов. Для жвачных при этом характерна энтерогепатическая циркуляция, сульфоксид попадая в рубец, трансформируется микрофлорой в фенбендазол, что приводит к более длительному воздействию на гельминтов и говорит о корреляции между уровнем препарата в плазме, содержанием пищеварительного тракта жвачных и тканях гельминта (Riviere, Papich, 2009).

Образование сульфоксида ФБЗ нами было впервые обнаружено при попытках модифицировать ФБЗ с целью получения смешанных кристаллов ФБЗ и ЯК с использованием условий, описанных в работе (Мызь и др., 2020), в которой сначала проводят механохимическое взаимодействие компонентов бетулина с адипиновой кислотой в присутствии следов растворителя с последующим кипячением полученной массы в соответствующем растворителе. И если в указанной работе с использованием планетарно-центробежной мельницы «АГО-2» наблюдается образование целевого продукта — со-кристалла бетулина с адипиновой кислотой, то в нашем эксперименте при механообработке в агатовой ступке с последующим кипячением в различных растворителях, наблюдалось образование продукта деструкции ФБЗ. Степень деструкции зависит, по-видимому, от природы растворителя, их температур кипения и других физико-химических параметров. В тоже

время при твердофазной обработке субстанции ФБЗ с полимерами с последующим хранением в плотно закрытой таре не наблюдается окисления ФБЗ даже в образцах 2015 и 2020 гг.

Из данных табл. 2 видно, что при твердофазной механообработке ФБЗ (основание) с ЯК (кислота) и полимером не наблюдается окисления ФБЗ.

Если при проведении механообработок с получением твердых дисперсий регистрировали стабильность субстанции ФБЗ, отсутствие химических взаимодействий, то при проведении комбинированных механообработок с использованием растворителей и получением смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК, отмечали процессы окисления ФБЗ до его сульфоксида. При этом в зависимости от растворителя изменялся количественный состав полученных продуктов. Максимальное окисление ФБЗ до СО ФБЗ происходило в диоксане, а наибольшее содержание ФБЗ отмечено в ацетонитриле.

Результаты изучения нематодоцидной активности при экспериментальном трихинеллезе различных форм на основе ФБЗ представлены в табл. 3.

Анализ данных табл. 3 позволяет сделать выводы о том, что наиболее активными формами применения ФБЗ являются его ТД с ПВП и с АГ, то-

Таблица 3. Нематодоцидная активность комплексных твердых дисперсий антигельминтиков при экспериментальном трихинеллезе

Препарат и его состав	Содержание ДВ, %	Доза по массе порошка, мг/кг	Доза по ДВ мг/кг	Обнаружено <i>T. spiralis</i> , экз./гол.	ИЭ, %
ФБЗ : ПВП (1 : 9)	10	10	2	0	100.0
ФБЗ : АГ (1 : 9)	10	10	2	4.5 ± 0.8	94.9
ФБЗ : ЭС (1 : 9)	10	10	2	12.3 ± 1.0	86.60
ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3)	20	10	2	79.2 ± 7.1	54.17
Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК (растворитель—ацетонитрил)	75	—	—	120.0 ± 9.8	30.56
Смешанные кристаллы ФБЗ : ЯК (растворитель—изопропанол)	95	—	—	108.0 ± 8.5	37.50
ФБЗ субстанция	98	2	2	132.0 ± 9.7	23.62
Контрольная группа	—	—	—	172.8 ± 12.2	—

гда как с ЭС продукт оказывался менее активным. ТД на основе ФБЗ с ЯК оказалась менее активной, вопреки нашим ожиданиям на том основании, что при совместной механообработке ФБЗ с кислотами должны были образовываться более растворимые солевые формы. Смешанные кристаллы ФБЗ с ЯК обладали слабой активностью, несмотря на высокое содержание ФБЗ (75% и 95% соответственно).

Наибольшую активность ТД ФБЗ с полимерами, что можно объяснить образованием мелкодисперсных порошков, которые при растворении в воде образуют супрамолекулярные комплексы с повышенной растворимостью, что в свою очередь, увеличивает биодоступность и антигельминтную активность препарата (Arkhipov *et al.*, 2019).

По предложенной технологии ранее получены препараты не только на основе ФБЗ и других бензимидазолкарбаматов (альбендазол, триклабендазол) (Чистяченко и др., 2014; Мусаев и др., 2017; Лагерева и др., 2019; Khalikov *et al.*, 2020), но и субстанций антигельминтиков из других классов органических соединений — фенасал, празиквантел, ивермектин и пр. (Arkhipov *et al.*, 2017; Марченко и др., 2019; Avgustinovitch *et al.*, 2019; Metel'eva *et al.*, 2019; Мусаев и др., 2020; Marchenko *et al.*, 2020, 2021). В наших работах было показано, что метод механохимической модификации плохо растворимых антигельминтных субстанций из различных классов органических соединений с помощью полимеров и растительных метаболитов позволил существенно изменить растворимость, биодоступность и эффективность препаратов (Khalikov *et al.*, 2015; Мусаев и др., 2017; Arkhipov *et al.*, 2019; Metel'eva *et al.*, 2019).

Так, супрамолекулярный комплекс фенбендазола с АГ в уменьшенной дозе 3.0 мг/кг по ДВ показал 100%-ю эффективность при диктиокаулезе, стронгилоидозе и стронгилятозах пищеварительного тракта и 98.3%-ную активность при трихоцефалезе овец (Варламова и др., 2016). Тогда как комплекс ФБЗ с ПВП при нематодозах овец в дозе 2.0 мг/кг по ДВ в форме 10%-ного порошка показал эффективность, равную 98.7% против нематодуриусов и 99.2% против других видов стронгилят пищеварительного тракта, а также оказался эффективным в дозе 2.0 мг/кг по ДВ против стронгилят пищеварительного тракта овец, т.е. комплекс обладал в 2.5 раза большей антигельминтной активностью по сравнению с базовым препаратом — субстанцией фенбендазола. По результатам испытаний были сделаны рекомендации по использованию комплекса в ветеринарной практике при нематодозах овец (Arkhipov *et al.*, 2019; Варламова и др., 2020, 2021).

Комплекс ФБЗ с экстрактом солодки обладал повышенной растворимостью, повышенным уровнем абсорбции и поступления в кровь ФБЗ и его метаболитов и увеличением в 2.3–2.5 раза их максимальной концентрации в крови и времени достижения этой концентрации. В результате эффективность комплекса на лабораторной модели *T. spiralis* составила 96.27% в дозе 2 мг/кг по ДВ по сравнению с 13.70%-й эффективностью самой субстанции ФБЗ в этой же дозе. Высокая эффективность комплекса наблюдалась против нематод при сниженной (в 2.5 раза) дозе по ДВ (Архипов и др., 2020; Varlamova *et al.*, 2020).

Изучение нематодоцидной активности супрамолекулярных комплексов альбендазола с полисахаридами (АГ, ГЭК) и ПВП, проведенные на

лабораторной модели трихинеллеза на белых мышях, экспериментально инвазированных *T. spiralis*, подтвердило их высокую эффективность (97.47–100.0%). Комплекс с АГ проявил 100%-ю эффективность при гименолепидозе мышей, он оказался активен против имагинальных цестод (Чистяченко и др., 2014; Халиков и др., 2015; Chistyachenko *et al.*, 2015).

Эти данные указывают на то, что продукты механомодификации проявляют высокую эффективность в дозе, которая более чем в 3 раза меньше терапевтической дозы исходной субстанции, что мы объясняем увеличением растворимости и биодоступности ФБЗ.

При этом добавление ЯК в состав твердой дисперсии ФБЗ с ПВП не привело к ожидаемому росту биологической активности, не смотря на высокую растворимость (увеличение растворимости в 19 раз). Возможно в данном случае нам не удалось достигнуть повышения биодоступности комплекса ФБЗ : ПВП : ЯК. Хроматографический анализ показал стабильность ФБЗ в ТД состава ФБЗ : ЯК : ПВП (1 : 1 : 3). В случае использования растворителей и процессов нагревания для получения смешанных кристаллов в хроматограммах были детектированы пики, характерные для метаболита ФБЗ и отмечено уменьшение концентрации ДВ. Значительного повышения антигельминтного действия на лабораторной модели не установлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования подтверждают возможность получения новых препаратов фенбендазола с полимерами и низкомолекулярными веществами. При этом наряду с сохранением действующего вещества в одних случаях, наблюдаются также процессы окисления фенбендазола до его метаболита — сульфоксида фенбендазола при получении смешанных кристаллов ФБЗ с ЯК. Этот процесс зависит как от природы растворителя, так и условий проведения реакции взаимодействия ФБЗ с кислотами (в твердой фазе или в растворителе). Было установлено, что в субстанциях ФБЗ с полимерами, полученными по методу твердофазной механохимической модификации, не отмечено процессов окисления исходного действующего вещества, а также химических взаимодействий между лекарственным веществом и полимерами. ТД при растворении в воде образуют супрамолекулярные комплексы с большей биологической активностью, что и было подтверждено нами на лабораторной модели трихинеллеза белых мышей в отношении ТД ФБЗ с ПВП и ФБЗ с АГ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-20055), при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ с использованием научного оборудо-

вания центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Архипов И.А., Варламова А.И., Одоевская И.М. Методические рекомендации по испытанию и оценке эффективности препаратов при трихинеллезе и гименолепидозе на лабораторной модели // Рос. паразитол. журн. 2019. Т. 13(2). С. 58–63.
- Архипов И.А., Варламова А.И., Халиков С.С., Садов К.М., Душкин А.В. Влияние механохимической технологии на антигельминтную эффективность супрамолекулярных комплексов фенбендазола с экстрактом солодки // Рос. паразитол. журн. 2020. Т. 14(1). С. 70–74.
- Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедева М.Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. М.: Наука, 1989. 278 с.
- Варламова А.И., Лимова Ю.В., Садов К.М., Садова А.К., Белова Е.Е., Радионов А.В., Халиков С.С., Чистяченко Ю.С., Душкин А.В., Скира В.Н., Архипов И.А. Эффективность супрамолекулярного комплекса фенбендазола при нематодозах овец // Рос. паразитол. журн. 2016. Т. 35(1). С. 76–81.
- Варламова А.И., Архипов И.А., Садов К.М., Халиков С.С. Эффективность супрамолекулярного комплекса фенбендазола против нематод при комиссионном производственном испытании // Рос. паразитол. журн. 2020. Т. 14(2). С. 93–97.
- Варламова А.И., Архипов И.А., Садов К.М., Халиков С.С., Арисов М.В., Борзунов Е.Н. Эффективность твердой дисперсии фенбендазола при желудочно-кишечных стронгилятозах молодняка крупного рогатого скота // Рос. паразитол. журн. 2021. Т. 15(1). С. 92–97.
- Гламаздин И.И., Архипов И.А., Одоевская И.М., Хиллота Н.В., Халиков С.С., Чистяченко Ю.С., Душкин А.В. Антигельминтная эффективность лекарственных форм альбендазола, полученных по механохимической технологии с использованием адресной доставки Drug Delivery System на лабораторной модели // Рос. паразитол. журн. 2013. № 3. С. 92–95.
- Евглевский Г.Ф., Рыжкова Е.П., Евглевская Н.В., Ванина И.И., Михайлова А.В. Денисова Н.Ф., Ерыженская Н.Ф. Биологическая роль и метаболическая активность янтарной кислоты // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. С. 67–69.
- Кочетков П.П., Варламова А.И., Абрамов В.Е., Мисюра И.А., Абрамова Е.В., Абрамов С.В., Кошечкина Н.И., Архипов И.А. Определение фенбендазола и его метаболитов в молоке коров методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // Рос. паразитол. журн. 2016. Т. 38(4). С. 554–562.
- Лагерева Е.В., Абрамов В.Е., Мусаев М.Б., Халиков С.С. Эффективность супрамолекулярного комплекса на основе албендазола и триклабендазола при фасциолезе и нематодозах пищеварительного тракта овец // Рос. паразитол. журн. 2019. Т. 13(2). С. 82–88.

- Марченко В.А., Халиков С.С., Ефремова Е.А., Василенко Ю.А., Халиков М.С. Эффективность твердых дисперсий ивермектина и альбендазола при кишечных гельминтозах овец в Республике Алтай // Вестник НГАУ. 2019. № 3. С. 82–90.
- Мусаев М.Б., Миленина М.В., Архипов И.А., Халиков С.С., Михайлицин Ф.С., Варламова А.И. Эффективность супрамолекулярных комплексов триклабендазола с полимерными наполнителями при фасциолезе // Рос. паразитол. журн. 2017. Т. 41(3). С. 271–276.
- Мусаев М.Б., Зацепкина В.В., Вацаев Ш.В., Джамалова А.З., Ильин М.М., Халиков С.С. Эффективность супрамолекулярного комплекса ивермектина в условиях производства при нематодозах пищеварительного тракта лошадей табунного содержания // Рос. паразитол. журн. 2020. Т. 14(3). С. 104–108.
- Мызь С.А., Михайленко М.А., Михайловская А.В., Политова А.А., Кузнецова С.А., Шахтинейдер Т.П. Механохимический синтез смешанных кристаллов бетулина с адипиновой кислотой // Журн. Сибирского федерального университета. Химия. 2020. Т. 13(4). С. 511–524.
- Папуниди К.Х., Иванов А.В., Зухрабов М.Г. Патология обмена веществ и пути его коррекции // Ветеринарный врач. 2000. № 1. С. 62–65.
- Халиков С.С., Чистяченко Ю.С., Душкин А.В., Метелева Е.С., Поляков Н.Э., Архипов И.А., Варламова А.И., Гламаздин И.И., Данилевская Н.В. Создание антигельминтных препаратов повышенной эффективности на основе межмолекулярных комплексов действующих веществ с водорастворимыми полимерами, в том числе с полисахаридами // Химия в интересах устойчивого развития. 2015. Т. 23(5). С. 567–577.
- Чистяченко Ю.С., Хвостов М.В., Белоусов А.И., Жукова Н.А., Пахарукова М.Ю., Катохин А.В., Халиков С.С., Толстикова Т.Г., Душкин А.В., Мордвинов В.А., Ляхов Н.З. Физико-химические свойства и противоопистархозное действие механохимически синтезированных супрамолекулярных комплексов албендазола и полисахарида арабиногалактана из лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* // Доклады Академии Наук. 2014. Т. 456(6). С. 741–743.
- Arkhipov I.A., Sadvov K.M., Limova Y.V., Sadvova A.K., Varlamova A.I., Khalikov S.S., Dushkin A.V., Chistyachenko Y.S. The efficacy of the supramolecular complexes of niclosamide obtained by mechanochemical technology and targeted delivery against cestode infection of animals // Veterinary Parasitology. 2017. V. 246. P. 25–29.
- Arkhipov I.A., Khalikov S.S., Sadvov 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. Advanced Veterinary and Animal Research. 2019. V. 6(1). P. 133–141.
- Avustinovitch 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 disodiumglycyrrhizinate on the liver fluke *Opisthorchis felinus*: an in vitro and in vivo study // Acta Tropica. 2019. V. 194. P. 1–12.
- Chistyachenko Y.S., Meteleva E.S., Pakharukova M.Y., Katochin A.V., Khvostov M.V., Varlamova A.I., Glamazdin I.I., Khalikov S.S., Polyakov N.E., Arkhipov I.A., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A., Dushkin A.V., Lyakhov N.Z. Physicochemical and pharmacological study of the newly synthesized complex of albendazole and polysaccharide arabinogalactan from larch wood // Current Drug Delivery. 2015. V. 12 (5). P. 477–490.
- Fan Q., Zhu L., Li X., Ren H., Wu G., Zhu H., Sun W. Catalyst-free visible light-mediated selective oxidation of sulfides into sulfoxides under clean conditions // Green Chem. 2021. V. 23. P. 7945–7949.
- Khalikov S.S., Lokshin B.V., Ilyin M.M., Varlamova A.I., Musaev M.B., Arkhipov A.I. Methods for obtaining solid dispersions of drugs and their properties // Rus. Chem. Bull. 2019. V. 68(10). P. 1924–1932.
- Khalikov S.S., Lokshin B.V., Ilyin M.M. Solid dispersions of medamine and albendazole with water-soluble polymers: preparation and properties // Pharm. Chem. J. 2020. V. 54(8). P. 816–821.
- Marchenko V.A., Khalikov S.S., Efremova E.A., Ilyin M.M. Efficiency of novel formulations of ivermectin and albendazole in parasitic infections of sheep in the Altai Mountains of Russia // Iran J Parasitol. 2021. V. 16(2). P. 198–208.
- Marchenko V.A., Khalikov S.S., Vasilenko Y.A., Ilyin M.M., Kravchenko I.A. Innovative anthelmintic based on mechanochemical technology and their efficacy against parasitic infection of sheeps // J. advanced veterinary and animal research. 2020. V. 7(4). P. 718–8725.
- Meteleva E.S., Chistyachenko Y.S., Suntsova 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 // J. Drug Delivery Science and Technology. 2019. V. 50. P. 66–77.
- Riviere J.E., Papich M.G. Veterinary pharmacology & Therapeutics / 9thed. Hoboken: Willey-Blackwell, 2009. 1541 p.
- Surov A.O., Vasilev N.A., Vener M.V., Parashchuk O.D., Churakov A.V., Magdysyuk O.V., Perlovich G.L. Pharmaceutical salts of fenbendazole with organic counterions: structural analysis and solubility performance // Crystal Growth & Design. 2021. V. 21(8). P. 4516–4530.
- Varlamova A.I., Movsesyan S.O., Arkhipov I.A., Khalikov S.S., Arisov M.V., Kochetkov P.P., Abramov A.E., Ilyin M.M., Lokshin B.V. Biological activity and pharmacokinetic behavior of fenbendazole integrated into a supramolecular delivery system with licorice Extract and Sodium Dioctyl Sulfosuccinate // Biology Bulletin. 2020. V. 47(6). P. 565–574.

Influence of Different Methods of Obtaining of Solid Dispersions and Crystals of Fenbendazole on Biological Activity

**I. A. Arkhipov¹, S. O. Movsesyan², S. S. Khalikov³, E. A. Khakina³, A. I. Varlamova^{1, #},
M. S. Khalikov^{1, 3}, and M. M. Ilyin³**

¹ *All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV”,
Bolshaya Cheremushkinskaya street, 28, Moscow, 117218 Russia*

² *Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the RAS, Leninsky Prospect, 33, Moscow, 119071 Russia*

³ *Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of the RAS, Vavilova street, 28, Moscow, 119334 Russia*
[#]*e-mail: arspheob@mail.ru*

Fenbendazole (FBZ) is one of the most widely used drugs in veterinary medicine. Modification of its physicochemical properties, in particular the parameter of solubility, contributes to a change of its biological activity, that is shown on the model of trichinellosis of white mice. The analysis of methods of obtaining new preparations of fenbendazole is presented: solid dispersions of fenbendazole with polymers, as well as the combinations with polymers and succinic acid (SA) and mixed crystals of FBZ with SA. The concentration of the active substance, stability and effect on biological activity were studied.

Keywords: fenbendazole, sulfoxide, solid dispersion, mixed crystals, stability, polymers, biological activity, white mice