*М.Б. Мусаев¹, М.В. Миленина¹, М.С. Халиков², И.А. Архипов¹
А.И. Варламова¹, И.М. Одоевская¹ Новик Т.С.¹
M.B. Musaev¹, M.V. Milenina¹, M.S. Khalikov², I.A. Arkhipov¹
A.I. Varlamova¹, I.M. Odоеvskaya¹, Novik T.S.¹*

**АНТИГЕЛЬМИНТНАЯ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ТРИКЛАБЕНДАЗОЛА
(ANTHELMINTIC AND TOXICOLOGICAL ASSESSMENT
OF SUPRAMOLECULAR TRICLABENDAZOLE COMPLEXES)**

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрыбина (ФАНО России, ФГБНУ «ВНИИП им. К.И. Скрыбина») Москва.

¹ All-Russian scientific research Institute of fundamental and applied Parasitology of animals and plants named after K. I. Scriabin (FANO of Russia, FEDERAL state scientific institution «VNIP them. K. I. Skryabin») Moscow.

² Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва.

² Elementary the Institute Coding. A. N. Nesmeyanov Academy of Sciences, Moscow.

Из 10 супрамолекулярных комплексов триклабендазола с разными полимерными наполнителями (гидроксиэтилкрахмал, поливинилпирролидон, арабиногалактан фармакопейный, технический, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, двуокись кремния -SiO₂, ламинария, фукус), по данным токсикологических, гельминтологических исследований и экономическим характеристикам перспективным для внедрения в ветеринарную практику был выбран комплекс триклабендазола с арабиногалактаном техническим под названием триклафасцид, который представляет собой, комплекс триклабендазола на основе полисахарида арабиногалактана технического выделяемого из лиственницы сибирской в соотношении 1:10.

Триклафасцид, в отличие от субстанции триклабендазола, растворяется в воде, более удобен в применении и обладает высокой антигельминтной эффективностью в 5 раз меньшей терапевтической дозе, чем субстанция триклабендазола. При этом снижается стоимость обработки животного по сравнению с субстанцией триклабендазола. Препарат имеет высокую биологическую доступность к па-

разитам, он в организме животных распадается на метаболиты и выводится с фекалиями и мочой из организма в мизерных количествах.

Доклинические токсикологические исследования триклафасцида показали, что по параметрам острой токсичности, острой кожной токсичности при энтеральном пути введения белым мышам и крысам он относится к IV классу безопасных веществ, не оказывает отрицательного раздражающего действия на неповрежденную кожу, относится к группе веществ, обладающих слабо выраженными кумулятивными свойствами, не проявляет иммунотоксической, эмбриотоксической и тератогенной активности.

Триклафасцид применяют при остром и хроническом фасциолёзе: овцам в терапевтической дозе 2,0 мг/кг индивидуально в форме водного раствора; групповым методом в смеси с кормом в терапевтической дозе 3,0 мг/кг; крупному рогатому скоту соответственно 2,5 и 3,0 мг/кг.

Ключевые слова: 10 супрамолекулярных комплексов триклабендазола, токсикологические, гельминтологические исследования

Out of 10 supramolecular triclabendazole complexes with various polymeric excipients (hydroxyethyl starch, polyvinyl pyrrolidone, pharmacopoeian arabinogalactan, technical, sodium carboxymethyl cellulose, silicon dioxide -SiO₂, kelp, fucus), on the basis of toxicological and helminthological research and economic prospects for introduction into veterinary practice, a triclabendazole – arabinogalactan (technical grade) complex (triclofascide) was selected. This is an arabinogalactan (technical grade) polysaccharide-based complex of triclabendazole extracted from Siberian larch in the ratio 1:10.

Triclofascide, in contrast to the substance of triclabendazole, is soluble in water, more easy to use and has a high anthelmintic efficiency in a 5 times smaller therapeutic dose. This reduces the cost of animal treatment in comparison to the treatment with triclabendazole substance. The drug has a high biological availability to the parasite. In the animal's organism the drug dissociates into metabolites and having been excreted in faeces and urine in miniscule amounts.

Triclofascide preclinical toxicology trial showed that in the parameters of acute toxicity, acute cutaneous toxicity at enteral routes of administration to white mice and rats it may be classified as IV hazard class. It has no adverse irritating effect on intact skin, and belongs to a group of substances with slightly pronounced cumulative properties. It does not show immunotoxic, embryotoxic and teratogenic activity.

Triclofascide used for treatment of an acute and chronic fascioliasis: for sheep in a therapeutic dose of 2.0 mg/kg individually in the form of an aqueous solution; by group method mixed with food in a therapeutic dose of 3.0 mg/kg; for cattle, respectively, 2.5 and 3.0 mg/kg.

Key words: 10 supramolecular complexes of triclabendazole, toxicological, helminthological researches

К числу наиболее распространённых и опасных паразитарных заболеваний животных и человека является фасциолёз, который широко распространён в мире и на территории России. Заболевание протекает, как остро, так и хронически, нередко с тяжёлым клиническим течением, наносит значительный экономический ущерб животноводству.

Единственным в ветеринарной и медицинской практике активным против молодых фасциол является импортный препарат фирмы «Сибя-Гейги» триклабендазол (фазинекс-5% суспензия), который в нашей стране не производится [1]. Недостатком субстанции триклабендазола является его высокая стоимость, плохая растворимость в воде и то, что до 70,0% выводится из организма в неизменном виде с фекалиями в течение 30 суток, загрязняя окружающую среду.

В связи с этим, для получения наиболее оптимальной лекарственной формы с высокой антигельминтной и экономической эффективностью, совместно с Институтом элементоорганических соединений им. Н.А. Несмеянова (ИНЭОС РАН, г. Москва), были разработаны 10 инновационных препаратов с применением современных нанотехнологий, в виде супрамолекулярных комплексов, полученных путём механохимической обработки триклабендазола в одну стадию без участия жидких фаз с использованием разных водорастворимых полимеров в соотношении 1:10 до образования частиц размером от 0,1 до 10 микрон, представляющие собой порошки: [2,4].

- 1) Триклабендазол/гидроксиэтилкрахмал (ТКБ/ГЭК 1:10);
- 2) Триклабендазол/поливинилпирролидон (ТКБ/ПВП 1:10);
- 3) Триклабендазол/арабиногалактан/фармакопейный (ТКБ/АГФ 1:10);
- 4) Триклабендазол/арабиногалактан/технический (ТКБ/АГТ 1:10);
- 5) Триклабендазол/натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (ТКБ/НаКМЦ 1:2);
- 6) Триклабендазол/диоксид кремния марки (вулкасил) (ТКБ/SiO₂) = 1:2;
- 7) Триклабендазол/фукус (ТКБ/Ф) = 1:4 и 1:10;
- 8) Триклабендазол/ламинария (ТКБ/Л) = 1:4 и 1:10.

Также в валковой мельнице были получены суспензионные формы триклабендазола с использованием различных вспомогательных компонентов (ПАВы, структурообразователи и др.) и полимеров:

9) Триклабендазол/поливинилпирролидон, 10%-я суспензия.

10) Триклабендазол/арабиногалактан, 10%-я суспензия.

Одним из важных параметров, разрабатываемых и внедряемых в практику лекарственных препаратов, становится определение их токсичности. Оценка биологической активности химических веществ и их токсичность признаны важнейшими задачами современной токсикологии. Антигельминтики являются токсическими веществами, убивающих гельминтов, паразитирующих в живом организме. Опасность представляют отдалённые последствия антигельминтных препаратов получением неполноценного приплода, но и для человека при употреблении продуктов животноводства от дегельминтизированных животных, поэтому перед испытанием их на домашних животных необходима проверка, несущая необходимую информацию.

Целью исследования является проведение токсикологического скрининга препаратов по параметрам острой токсичности, изучение накожной токсичности, раздражающего действия, кумулятивных, иммунотоксических, эмбриотропных свойств, субхронической токсичности, а также испытание на антигельминтную эффективность отобранного путём титрации наиболее перспективного препарата.

Материалы и методы. Исследования проводили в соответствии Методическими рекомендациями Фармакологического государственного комитета «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под общей редакцией чл.-корр. РАМН, Р.У. Хабриева, Москва, 2005) [14].

Опыт проводили в виварии Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрябина (ВНИИП им. К.И. Скрябина).

Для экспериментов использовали белых беспородных мышей и крыс, полученных из питомника «Филиал Андреевка ГУ НЦ биомедицинских технологий РАМН».

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10% [13].

Убой лабораторных животных проводили в газовой камере, усыпляя их под воздействием углекислого газа.

В исследованиях использовали опытные образцы супрамолекулярных комплексов триклабендазола с различными полимерными наполнителями в форме порошков и суспензий.

Для определения параметров острой токсичности нами были испытаны вышеотмеченные образцы супрамолекулярных комплексов триклабендазола с различными полимерными наполнителями на 400 белых беспородных мышах, массой 18-20 г и 60 белых крысах массой 150-160 г

Определение параметров острой токсичности проводили методом Личфильда и Уилкоксона в модификации Рота (М.Л. Бельский, 1963) [3], Оценку степени опасности препаратов проводили согласно ГОСТ 12.1.007-76.

Оценку острой накожной токсичности и раздражающего действия супрамолекулярного комплекса триклабендазола «ТКБ/АГТ» проводили на 12 беспородных белых крысах –самцах массой 250-300 г.

Оценку местно-раздражающего действия препарата при аппликации на кожу проводили, согласно «Методическим указаниям к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны (1980)» [6,7]. Оценка функционального состояния кожи проводилась с помощью шкалы кожных проб по С.В. Суворову.

Для выявления кумулятивных свойств новой отечественной лекарственной формы супрамолекулярного комплекса триклабендазола «ТКБ/АГТ» было отобрано 20 беспородных белых крыс, массой 150-160 г. Для определения коэффициента кумуляции использовали метод основанный на учете гибели животных при повторном введении препарата – тест субхронической токсичности (Лим и соавт. 1961) [5].

Изучение эмбриотропного действия супрамолекулярного комплекса триклабендазола проводили на 40 белых беспородных крысах – самках массой 220-260 г и 10 самцах, в соответствии с Методическими рекомендациями по оценке влияния препарата на генеративную функцию животных.

Антигельминтик вводили беременным самкам перорально в трехкратной терапевтической дозе 6,0 мг/кг (60 мг/кг по препарату), в основные периоды эмбриогенеза крыс: 1-7; 7-14 и с 14-20 дни беременности (образования зиготы, период нейруляции и органогенеза), четвертая группа служила контролем и получала 1% крахмальный гель.

На 20-й день беременности крыс убивали (в камере под воздействием углекислого газа) и вскрывали брюшную полость, извлекали матку с плодами. Показателями эмбриотоксического эффекта

служили общая эмбриональная смертность. Показателями тератогенного эффекта являются аномалий в развитии плодов определяемые по методу J.G. Wilson (1965) (в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР) [15], изучение костной системы проводили после ее окрашивания по методу A.B. Dawson (1926) [16].

Для изучения иммунотоксических свойств супрамолекулярного комплекса триклабендазола (ТКБ/АГТ) проведено два опыта на 60 мышах-самцах линии СВАхС57ВL/6 массой 18-20 г с целью определения влияния (ТКБ/АГТ) на гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Реакция гемагглютинации. Опыт проводили на 30 мышах линии СВАхС57ВL/6 массой 18-20 г. (11).

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ). Влияние препарата на клеточный иммунитет определяли в реакции ГЗТ. Опыт проводили на 30 мышах линии СВАхС57ВL/6 массой 18-20 г. О степени выраженности воспалительной реакции вместе инъекции разрешающей дозы антигена судили по приросту массы лап через 24 часа. Определяли сдвиг индекса воспаления (ИВ) по формуле:

$$\frac{\text{опыт-контроль}}{\text{контроль}} \times 100\%$$

Исследования на субхроническую токсичность. Для выявления субхронической токсичности супрамолекулярного комплекса триклабендазола провели на 40 крысах-самцах с исходной массой тела 200-220 г. Животных разделили на 4 равные группы. Препарат вводили крысам на протяжении 7 суток ежедневно перорально в желудок с помощью зонда в дозах 1/5, 1/10 и 1/20 от ЛД₅₀ (13000 мг/кг), что соответствует 2600 мг/кг; 1300 мг/кг и 650 мг/кг массы тела. Животные контрольной группы получали 1% крахмальный клейстер. На 8-й сутки животных всех групп убивали методом декапитации.

Гематологические показатели крови крыс определяли со стабилизатором ЭДТА, на автоматическом анализаторе «Hema Screen Vet» с определением уровня гематологических показателей у крыс подопытных и контрольной групп. Для биохимических показателей крови крыс сыворотку подвергали исследованию на автоматическом анализаторе «SuperZ» с определением уровня биохимических показателей у крыс во всех группах.

Клинические испытание триклафасцида при фасциолёзе овец

Из разработанных и испытанных образцов препарата был отобран один образец под условным названием «триклафасцид» на основе отечественного полисахарида арабиногалактана технического (ТКБ/АГТ), который оценивался по таким параметрам, как антигельминтная и экономическая эффективность, транспортировка, хранение, растворимость в воде; запах, вкус, доступность для приобретения отечественного полимерного компонента с целью внедрения его в ветеринарную практику.

Титрация терапевтической дозы триклафасцида. Испытание триклафасцида проводили в Южном Федеральном округе в хозяйствах, неблагополучных по фасциолёзу овец. Для титрации терапевтической дозы триклафасцида были отобраны 40 спонтанно инвазированных фасциолами овец тушинской породы, которые по принципу аналогов были распределены на 4 подопытные группы по 10 (n=10) животных в каждой. Первая группа овец получала триклафасцид в дозе 10 мг/кг по препарату (по ДВ 1,0 мг/кг), вторая - 15 (по ДВ 1,5 мг/кг), третья - 20 мг/кг (по ДВ 2,0 мг/кг), четвёртая группа овец получала базовый препарат субстанцию триклабендазола в терапевтической дозе 10 мг/кг, согласно инструкции по его применению. Препараты вводили индивидуально перорально, однократно в форме суспензии.

В течение опыта после приема препаратов животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления, за ними проводили клинические наблюдения.

Учёт эффективности проводили через 25 суток после дачи препаратов по данным копроовоскопических исследований, методом «критический тест».

Испытание эффективности триклафасцида против преимагинальных (неполовозрелых) фасциол. Для определения эффективности препарата против неполовозрелых форм фасциол, использовали метод оценки эффективности испытуемых препаратов с определением содержания яиц фасциол в фекалиях у подопытных животных в процессе лечения и по выраженному увеличению содержания яиц после начала лечения и последующему их исчезновению в фекалиях леченых животных, выявляя эффективность препарата.

Это метод основан на феномене раннего и выраженного повышения концентрации яиц гельминтов в фекалиях инвазированных животных под влиянием эффективных антигельминтных препаратов [14]. У животных, инвазированных фасциолами, но не достигших половой зрелости, яйца фасциол в фекалиях сперва не регистрируются, а после лечения, в результате разложения фасциол под действием препарата, в фекалиях отмечаются не сформировавшиеся

яйца серого цвета. При их исчезновении можно считать, что животное излечилось, а испытываемый препарат рассматривается как эффективный.

С целью эксперимента с сентября на неблагополучных по фасциолёзу пастбищах было отобрано 76 молодых животных первого года выпаса, у которых в фекалиях не было обнаружено яиц фасциол, но предполагалось инвазирование фасциолами. Животные были дегельминтизированы триклафасцидом в дозе 1,0 мг/кг по ДВ.

Эффективность препарата определяли при помощи копроовоскопии, через 3; 7; 14 и 25 суток после дачи препарата. Учёт эффективности препаратов проводили методом «критический тест» согласно Руководству, одобренному Всемирной Ассоциацией за прогресс ветеринарной парази- тологии (1995 г).

Результаты и обсуждение. Доклинические токсикологические исследования фармакологиче- ских веществ проводят для установления побочного действия на организм животных для его безопасности в зависимости от токсических эффектов от дозы и длительности применения препарата.

В результате титрации по параметрам острой токсичности все 10 образцов ТКБ с разными полимерными наполнителями при энтеральном пути введения белым мышам согласно ГОСТ 12.1.007-76 относятся к IV классу безопасных веществ, из них наименьшую токсичность оказал ТКБ/АГТ на мышах- (ЛД50 = 9583 –**11500**– 13800) и на крысах (9352 – **13000** – 18070) (Табл.1).

Таблица 1 Результаты изучения супрамолекулярных комплексов ТКБ по параметрам острой токсичности при введении в желудок белым мышам и крысам

Наименование препарата	ЛД ₀	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄	ЛД ₁₀₀
Субстанция ТКБ	4300	6800	7567 –(8400)– 9324	10500	14000
ТКБ/ГЭК=1:10	4800	7400	8245 – (9400) – 10716	11500	16000
ТКБ/NaKMЦ=1:10	2800	5800	7000 – (8400) – 10080	12000	20000
ТКБ/SiO ₂ =1:10	3300	6800	8135 – (9600) – 11328	13500	22000
ТКБ/АГТ=1:10	4500	8600	9583 –(11500)– 13800	17500	23500
ТКБ/Л=1:10	3500	7000	8130 –(10000) – 12300	14000	22000
ТКБ/Ф=1:10	2850	5800	9051 – (10500)– 12180	16000	25000
10% сусп. ТКБ/ПВП	900	3000	3880 – (5200) – 6968	9200	19500
10% сусп. ТКБ/АГ	1700	3900	4754 – (5800) – 7076	8600	14500
ТКБ/АГФ=1:10	3500	7000	7812 – (10000)– 12800	14500	22000
ТКБ/ПВП=1:10	2800	6800	7863 –(10300) – 13493	16000	27000
Параметры острой токсичности при введении в желудок крысам					
Субстанция, ТКБ	2800	6800	7863 – 10300 – 13493	16000	27000
Триклафасцид	2800	7800	9352 – 13000 – 18070	21000	35000

По предварительным данным, испытания вышеуказанных образцов триклабендазола при фас- циолёзе овец, супрамолекулярный комплекс триклабендазола с арабиногалактаном техническим (ТКБ/АГТ) проявил более высокую эффективность [7, 8, 9].

Так как ТКБ/АГТ по сравнению с другими образцами оказал более высокую активность про- тив фасциол, наименьшую токсичность и экономичность, дальнейшие исследования проводили с этим образцом, которому дали условное название «**триклафасцид**».

Результаты оценки острой накожной токсичности. В результате оценки острой накожной токсичности при нанесении на кожу крыс однократно в максимальной дозе 20000 мг/кг по пре- парату гибель животных отсутствовала. Следовательно, значения LD₅₀ триклафасцида составля- ет 20000 мг/кг (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76).

При оценке раздражающего действия. Судя по поведению животных, после нанесения на кожу супрамолекулярного комплекса ТКБ/АГТ- «триклафасцид» аппликации не вызывали у них беспокойства. Через 2 недели на месте аппликации препаратов, выстриженные участки покрылись здоровым шерстным покровом.

Таким образом супрамолекулярный комплекс ТКБ/АГТ- триклафасцид по результатам оценки острой накожной токсичности относится к классу малоопасных веществ (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76) и не оказывает отрицательного раздражающего действия на неповрежденную кожу.

Результаты изучения кумулятивных свойств триклафасцида.

Выявление кумулятивных свойств является важным этапом в токсикологической оценке для получения более развернутой характеристики нового препарата. Выяснение степени кумулятивного эффекта вещества указывает на возможность развития хронической интоксикации. При многократном поступлении в организм вещество может накапливаться в нем непосредственно в исходном виде или в виде метаболитов (материальная кумуляция), либо вызывать суммирование патологических эффектов (функциональная кумуляция).

Результаты изучения кумулятивных свойств супрамолекулярного комплекса (триклафасцид) показали, что за период введения препарата в суммарной дозе 107348 мг/кг по ДВ на 24 сутки пало 11 крыс из 20-ти (55%), таким образом коэффициент кумуляции по формуле Ю.С. Кагана, В.В. Станкевича равен: $K_{\text{кум}} = \text{ЛД}_{50n} (107348 \text{ мг/кг}) : \text{ЛД}_{50i} (13000 \text{ мг/кг}) = 8,2$.

По принятой классификации (Л.И. Медведь, 1964) супрамолекулярный комплекс ТКБ/АГТ-триклафасцид относится к группе веществ обладающих слабо выраженными кумулятивными свойствами, так как коэффициент кумуляции равен 8,2 т.е. более (>5).

Результаты эмбриотоксического и тератогенного действия триклафасцида. На протяжении периода введения препарата, у крыс-самок не наблюдали признаков токсикоза, видимых нарушений беременности, нарушения физиологических функций. Прирост массы у опытных животных не отличался от контроля. При лапаротомии на 20-й день беременности не было обнаружено никаких видимых патологий развития. Результаты исследования эмбрионального материала после введения препарата триклафасцида в дозе 6,0 мг/кг в различные периоды эмбриогенеза сведены в таблице № 2.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что препарат триклафасцид не оказывает отрицательного влияния на эмбриональное развитие плода. По значениям пред- и постимплантационной и общей эмбриональной смертности опытных животных, в сравнении с контрольными значениями, можно сказать, что препарат не индуцировал гибель эмбрионов в различные периоды эмбриогенеза. Масса и размеры плодов также не отличались от контроля, что говорит об отсутствии эмбриотоксического эффекта.

При тщательном визуальном осмотре плодов во всех опытных группах не было обнаружено каких-либо внешних аномалий развития, в сравнении с контролем. По результатам выполнения девяти сагиттальных разрезов внутренних уродств, аномалий развития внутренних органов, нарушения топографии не было обнаружено.

При изучении костной системы: размеры зачатков лопаточной; плечевой; локтевой; лучевой; бедренной; большой и малой берцовых костей у опытных и контрольных эмбрионов были близки по показателям (длина, мм) (Табл. №3).

На основании проведенных исследований можем сделать вывод, что триклафасцид в трёхкратно увеличенной терапевтической дозе 6,0 мг/кг не оказал эмбриотоксической и тератогенной активности при воздействии в "критические" периоды эмбриогенеза крыс.

Результаты иммунотоксических свойств триклафасцида. В эксперименте зарегистрировать повреждения в иммунной системе под воздействием химических или фармакологических средств с получением достоверных результатов можно при использовании модели антигенной стимуляции, т.е. при использовании антигенов различной природы, реакцию на которые лекарственное средство может изменять. Однократное введение исследуемого препарата одновременно с антигеном эритроцитов барана (ЭБ) позволяет выявить прямое воздействие на клетки иммунной системы [3].

При исследовании сывороток крови контрольных животных значение титров антител установлены на уровне $7,11 \pm 0,31$ ($\log_2$).

Пероральное однократное введение испытуемого препарата в терапевтической 30,0 и десятикратно увеличенной дозе 300 мг/кг не привело к достоверному изменению титров агглютининов в сыворотке крови животных обеих групп, и они составили соответственно $7,37 \pm 0,18$ и $8,0 \pm 0,00$ ($\log_2$), индекс реакции составил соответственно 1,04 и 1,12, что укладывается в рамки оценки препарата как не оказывающего отрицательного воздействия на выработку агглютининов.

Существует высокая степень корреляции между активацией антителообразования с активацией системы фагоцитов и общим влиянием на резистентность организма к инфекциям [7, 14].

Результаты исследования по изучению влияния испытуемого препарата на индукцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) показывает, что триклафасцид, введенный мышам перорально однократно в терапевтической (30 мг/кг) и десятикратно увеличенной дозе (300 мг/кг) хотя и тормозит индукцию ГЗТ – сдвиги индекса реакции воспаления у животных составили соответственно $6,12 \pm 0,87$ и $6,64 \pm 1,38\%$, т.е. интенсивность воспалительной реакции, по сравнению с контрольным значением была незначительно ниже. Этот показатель у контрольных животных - $8,11 \pm 0,93\%$, но эта разница в результатах статистически недостоверна ($P \geq 0,05$).

Таблица №2 - Результаты исследования эмбрионального материала после введения беременным крысам триклафасцида в дозах 6,0 мг/кг в различные периоды эмбриогенеза

Показатели	Периоды введения препарата			Контроль
	1 - 6	7 - 14	15 - 19	1 - 19
Число самок	10	10	10	10
Среднее число плодов на одну самку	9,14±1,14	10,45±0,78	9,80±0,58	9,84±1,11
Среднее число резорбций на одну самку	0,50±0,29	0,70±0,71	0,31±0,09	0,69±0,35
Предимплантационная гибель, %	10,41±2,57	9,12±1,49	7,69±2,45	8,33±2,21
Постимплантационная гибель, %	11,32±2,11	10,21±3,05	8,31±2,53	9,09±2,96
Общая эмбриональная смертность, %	11,11±2,83	18,18±3,01	15,38±2,78	16,67±3,25
Число случаев полной внутриутробной гибели	0	0	0	0
Масса плода, г	2,57±0,3	2,77±0,1	2,89±0,04	2,59±0,03
Краниокаудальный размер плода, см	2,93±0,07	2,95±0,06	2,86±0,06	2,98±0,08
Масса плаценты, г	0,73±0,04	0,74±0,05	0,62±0,04	0,71±0,03
Диаметр плаценты, см	1,41±0,09	1,54±0,02	1,42±0,03	1,45±0,01
Плодоплацентарный эффект %	28,4	26,71	21,45	27,00
Число эмбрионов с аномалиями развития: внешними внутренними	0	0	0	0
	0	0	0	0
Примечание: во всех случаях $P \geq 0,05$				

Таблица №3 - Средние размеры зачатков костной системы у плодов после введения триклафасцида в дозе 6,0 мг/кг в различные периоды эмбриогенеза

Название кости		Размер кости (длина, мм)			Контроль
		1-6	7-14	15-19	
Плечевая	Левая	2,4±0,02	2,39±0,02	2,45±0,02	2,35±0,02
	Правая	2,28±0,6	2,36±0,02	2,44±0,01	2,31±0,03
Локтевая	Левая	2,29±0,06	2,32±0,04	2,36±0,04	2,37±0,01
	Правая	2,37±0,03	2,35±0,02	2,31±0,03	2,38±0,01
Лучевая	Левая	1,95±0,04	1,94±0,01	1,89±0,03	1,91±0,02
	Правая	1,97±0,04	1,92±0,03	1,93±0,03	1,87±0,01
Бедренная	Левая	1,65±0,04	1,59±0,12	1,71±0,01	1,69±0,02
	Правая	1,61±0,05	1,63±0,04	1,68±0,02	1,68±0,13
Большая берцовая	Левая	2,05±0,02	2,12±0,01	1,98 ±0,02	1,96±0,03
	Правая	2,08±0,02	2,03±0,14	1,99±0,03	2,11±0,02
Малая берцовая	Левая	1,98±0,02	2,02±0,01	1,95±0,02	1,94±0,10
	Правая	1,96±0,02	1,99±0,03	1,97±0,01	2,01±0,12
Лопатка	Левая	2,48±0,02	2,55±0,01	2,57±0,02	2,51±0,03
	правая	2,49±0,01	2,54±0,11	2,61±0,01	2,56±0,02
Примечание: во всех случаях $P \geq 0,05$					

Таким образом, однократное введение супрамолекулярного комплекса триклабендазола (Триклафасцид) в терапевтической и десятикратно увеличенной дозе не оказывает угнетающего влияния на антителогенез. Титр агглютининов в сыворотке крови опытных животных, достоверно не отличался от такового в контроле (индекс действия препарата составил 1,04 и 1,12), что оценивается как отсутствие отрицательного влияния на гуморальный иммунный ответ. Статистически значимой разницы между результатами оценки влияния испытуемого препарата на клеточный иммунитет между опытными и контрольными животными также не установлено.

По результатам проведенных исследований можно сказать об отсутствии у триклафасцида иммуноотоксичности в диапазоне испытанных доз и кратности введения.

В результате субхронической токсичности триклафасцида при введении препарата в трех тестируемых дозах 1/5 от ЛД₅₀ (2600 мг/кг); 1/10 от ЛД₅₀ (1300 мг/кг); 1/20 от ЛД₅₀ (650 мг/кг) общее состояние и поведение животных было в норме, животные были активны, принимали корм и воду, признаки интоксикации отсутствовали. Динамика прироста массы тела крыс у трех опытных (132,96; 132,06; 135,35%) и контрольной группы (124,56%) по проценту прироста к исходной массе можно судить, что триклафасцид критически не влияет на прирост массы тела, а входящий в состав препарата биологически активный полисахарид арабиногалактан, обладает заметными гепатопротекторными свойствами, очищает организм, нормализует пищеварительный тракт, повышает иммунитет. После вскрытия при макроскопическом исследовании внутренних органов опытных животных отклонений от нормы выявлено не было.

Внешний вид, форма и консистенция органов, характер и степень кровенаполнения соответствовали контролю.

Коэффициенты внутренних органов (печень, почки, сердце, тимус, легкие, селезенка, поджелудочная железа, надпочечники, семенники, головной мозг) у крыс опытных и контрольной групп достоверно не отличаются друг от друга.

Результаты гематологических показателей при введении препарата в дозах 1/5 (2600 мг/кг) и 1/10 (1300 мг/кг) от ЛД₅₀ наблюдалось незначительное понижение уровня гемоглобина по отношению к контролю 111,3±4,59 и 116,5±4,08 (при контроле 124,4±12,48). Количество эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, СОЭ достоверных изменений не претерпели. Можно сказать, что препарат триклафасцид не оказывает влияния на основные гематологические показатели крови, при многократном введении.

А значения биохимических показателей сыворотки крови крыс после введения триклафасцида в различных дозах не оказал значимого влияния на концентрацию общего белка (г/л- 58,4±3,8 t=3,04; 60,8±3,55 t=1,65; 59,9±2,33 t=2,7, контроль - 63,4±3,09), глюкозы (ммоль/л- 5,87±0,39 t=1,96; 6,07±0,91 t=1,8; 5,64±0,69 t=0,86; контроль- 5,39±0,58). Функциональное состояние почек оценивали по уровню мочевины (ммоль/л- 8,1±0,95, t=2,42; 8,6±1,15, t=0,75; 7,57±1,02, t=3,13, контроль-9,11±0,68) и креатинина (ммоль/л- 44,55±1,81 t=0,79; 47,11±1,61 t=1,27; 43,33±3,04 t=2,11 контроль-45,5±3,04), оба показателя, по значению, на уровне с контролем. Следует обратить внимание на то, что активность аспартат- (Ед/л- 166,75±15,29 t=1,09; 184,23±19,93 t=0,90; 172,54±15,34 t=0,44; контроль-175,5±14,64) и аланинаминотрансфераз (Ед/л- 52,22±7,17 t=0,31; 58,11±6,35 t=1,23; 50,88±6,31 t=0,68, контроль-53,44±8,61) не подверглась значительным изменениям, после введения препарата в тестируемых дозах, что говорит о том, что функциональное состояние печени остается в норме.

На основании данных исследования можно заключить, что препарат триклафасцид в дозах 1/5(2600), 1/10 (1300) и 1/20 (650) мг/кг от ЛД₅₀, при пероральном введении в течение 7 дней отклонений в клиническом состоянии животных не вызывает. Массовые коэффициенты внутренних органов находятся в пределах нормы. Гематологические и биохимические показатели не подвергаются значительным изменениям.

Результаты титрации терапевтической дозы триклафасцида сведены в таблицу № 4, из которой следует, что в первой подопытной группе (n=10) среднее количество яиц фасциол в г/фек. составляло 30,4±2,35 экз., после дачи триклафасцида в дозе 1,0 мг/кг по ДВ (10 мг/кг по препарату) у 9 из 10-ти овец яиц фасциол не обнаружено, у одной овцы обнаружено в г/фек. 2,6±0,08 экз. яиц, т.е. среднее количество яиц в г/фек снизилось на 91,5%, а экстенс-эффективность составила 90,0%. Во второй группе (n=10) среднее количество яиц в г/фек. составляло 32,5±2,70 экз., после дачи триклафасцида в дозе 1,5 мг/кг по ДВ (15 мг/кг по препарату), 9 из 10-ти животных полностью освободились от фасциол, у одной среднее количество яиц в г/фек. составило 1,1 экз. В результате среднее количество яиц в г/фек. снизилось на 96,6%, а экстенс-эффективность составила 90,0%. В третьей группе (n=10) после дачи препарата в дозе 2,0 мг/кг по ДВ (по препарату ДВ 20 мг/кг) была отмечена 100%-я эффективность против половозрелых фасциол, это в 5 раз уменьшенная доза по сравнению с субстанцией триклабендазола. Субстанция триклабендазола в дозе 10 мг/кг проявила 80,0%-ю экстенсэффективность.

Таким образом, исходя из проведенного опыта, наименьшая доза триклафасцида, при которой получена 100%-я эффективность является 2,0 мг/кг по ДВ (20 мг/кг по препарату) и она установлена нами, как терапевтическая против половозрелых фасциол овец, при индивидуальном назначении.

Результаты эффективности триклафасцида на неполовозрелые формы фасциол. Проведена оценка эффективности препарата по выраженному увеличению содержания яиц фасциол после начала лечения по сравнению с исходным показателем и последующему исчезновению яиц в фекалиях леченых животных было установлено, что у 76 животных первого года выпаса, которые были свободны от яиц фасциол по данным копроовоскопии, после дачи препарата Триклафасцид в дозе 1,0 мг/кг у 30 из них на 3 суток были обнаружены незрелые яйца (серого цвета) фасциол в среднем г/фек. 266,0 экз. На 7-е – 158,0 экз.; 14 – 0,93 экз., на 25 сутки яиц фасциол не обнаружено.

Таблица № 4 - Титрация терапевтической дозы триклафасцида при фасциолёзе овец (копроовоскопия, критический тест)

№ гр	Препарат	Доза мг/кг по преп./ ДВ	Ж-х в группе	Освобо-дилось от фасц.	Среднее количество яиц в г/фекалий		% сниж. яиц г/фек	ЭЭ %
					до лечения	после лечения		
1	Триклафасцид	10/1,0	10	9	30,4±2,35	2,6±0,08	91,5	90,0
2	Триклафасцид	15/1,5	10	9	32,5±2,70	1,1±0,08	96,6	90,0
3	Триклафасцид	20/2,0	10	10	31,9±2,84	0	100	100
4	ТКБ базовый	10	10	8	30,8±2,53	2,2±0,22	94,3	80,0

Следовательно, триклафасцид в дозе 1,0 мг/кг по ДВ проявил 100%-ю эффективность против преимагинальных (неполовозрелых) фасциол.

По клиническим признакам, после дачи препарата побочных действий нами не отмечены: температура тела, пульс, дыхание и жвачка были в пределах нормы, животные были активны в движениях, принимали корм и воду.

Закключение. Из 10 супрамолекулярных комплексов триклабендазола с разными полимерными наполнителями, по данным токсикологических, антигельминтных исследований и экономического характеристикам, перспективным для внедрения в ветеринарную практику был выбран комплекс триклабендазола (ТКБ/АГТ) под условным названием триклафасцид.

Триклафасцид представляет собой, супрамолекулярный комплекс триклабендазола на основе полисахарида арабиногалактан выделяемого из листовницы сибирской в соотношении 1:10, в виде сыпучего порошка размером от 0,1 - 10 микрон, светло-бежевого цвета с лёгким хвойным запахом и сладковатым вкусом.

В пользу данного образца говорит и тот факт, что арабиногалактан, как известный биологически активный полисахарид используется для повышения биодоступности, очищает организм, нормализует пищеварительный тракт, повышает иммунитет при иммунодефицитах, поддерживает нормальный баланс микрофлоры пищеварительного тракта. Фасциолы локализуясь в желчных протоках вызывают их утолщение (обызвествление), жировую дистрофию и цирроз печени, а арабиногалактан обладает заметными гепатопротекторными и мембранотропными свойствами, его применяют в качестве терапевтического средства (БАД), для лечения печени.

Триклафасцид, в отличие от субстанции триклабендазола, растворяется в воде, более удобен для применения и обладает следующими преимуществами:

За счёт уменьшения терапевтической дозы, снижается стоимость обработки животного триклафасцидом по сравнению с субстанцией триклабендазола в 5 раз.

Известно, что нерастворимая в воде субстанция триклабендазола, применяемое животным перорально, до 70,0% выводится во внешнюю среду в неизменном виде с фекалиями, загрязняя окружающую среду. Триклафасцид, применяемый в 5 раз сниженной дозе, обеспечивает высокую биологическую доступность к паразитам. В дальнейшем, препарат распадается на метаболиты и выводится в основном с фекалиями и мочой из организма в мизерных количествах.

Доклинические токсикологические исследования триклафасцида по параметрам острой токсичности, острой накожной токсичности при энтеральном пути введения белым мышам и крысам согласно ГОСТ 12.1.007-76 относятся к IV классу безопасных веществ, не оказывает отрицательного раздражающего действия на неповрежденную кожу, относится к группе веществ обладающих слабо выраженными кумулятивными свойствами, не проявил иммунотоксической, эмбриотоксической и тератогенной активности.

Антигельминтик в дозах 1/5(2600), 1/10 (1300) и 1/20 (650) мг/кг от ЛД₅₀, при пероральном введении в течение 7 суток отклонений в клиническом состоянии животных не вызывает. Масовые коэффициенты внутренних органов находятся в пределах нормы. Гематологические и биохимические показатели не подвергаются значительным изменениям.

Триклафасцид применяют при остром и хроническом фасциолёзе:

овцам в терапевтической дозе 2,0 мг/кг индивидуально в форме водного раствора; групповым методом в смеси с кормом в терапевтическая доза увеличивается до 3,0 мг/кг, так как учитывается потеря препарата; крупному рогатому скоту соответственно 2,5 и 3,0 мг/кг.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ, проект 14-16-00026

ЛИТЕРАТУРА

1. *Архипов И.А.* Антигельминтики: фармакология и применение//М.- 2009. - 406 с. [Arkhipov I. A. Anthelmintic: pharmacology and application//М - 2009. -406 S.]
2. *Архипов И.А., Халиков С.С., Душкин А.В., Поляков Н.А., Мусаев М.Б., Варламова А.И., Садов К.М., Лимова Ю.В.* Применение нано-и механохимической технологии, и адресной доставки для разработки антигельминтных препаратов//Мат. докл. научной конференции “Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями” вып.17, М.2016- С. 30-36. [Arkhipov I. A., Khalikov, S. S., Dushkin A.V., Polyakov N. A. Musayev M. B., Varlamov A. I., K. M. Sadov, Yu. V. Limova The Use of nano-mechano-chemical technology, and targeted delivery for the development of anthelmintic drugs//Mat. Dokl. scientific conference “Theory and practice of combating parasitic diseases” vol.17, 2016 M. S. 30-36.]
3. *Беленький М.Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта//Издат. Мед. Литературы, Ленинград, 1963, -149 с. [Belenky M. L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect//Izdat. Med. Literature, Leningrad, 1963, p. -149]
4. *Диденко П.П., Архипов И.А., Успенский А.В., Мусаев М.Б.* Способ получения растворимых комплексных препаратов из нерастворимых в воде субстанций лекарственных средств//Патент №2524652, Бюл. № 21, 27.07.2014 г. [Didenko P.P/, Arkhipov I. A., Uspensky, A. V., Musayev, M. B. A method of producing a soluble complex preparations of water-insoluble substances drugs//Patent No. 2524652, Bull. No. 21, 27.07.2014]
5. *Медведь Л.И., Казан Ю.С., Спыну Е.И.* // Вестник Всес. хим. о-ва им. Менделеева. – 1968. – Т. 13, №3. – С. 263-27. [Medved, L.I., Kagan, J.S., Spinu, E.I. Bulletin Of All-Union Conf. chem. o-VA im. Mendeleev. – 1968. – Vol. 13, No. 3. – Pp. 263-27.]
6. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств. – М., 1997. [Methodical recommendations for the study of General toxic action of pharmacological agents. – М., 1997.]
7. *Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Остроухова Л.А.* Арабиногалактан лиственницы- свойства и перспективы использования (Обзор)//Химия растительного сырья, 2003, №1, -С.27-37. [Medvedeva E. N., Babkin VA, Ostroukhova L. A. larch Arabinogalactan - properties and prospects (Review)//Chemistry of vegetable raw materials, 2003, №1, -Pp. 27-37.]
8. *Медведева С.А., Александрова Г.П., Сайботалов М.Ю.* Арабиногалактан лиственницы сибирской – природный иммуномодулятор // Материалы 5 Междунар. съезда «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». СПб.; Петродворец, 2001. С. 104–105. [Medvedeva S.A., Alexandrova G. P., Saibatalov Yu. M. Arabinogalactan of Siberian larch – a natural immunomodulator // materials of the 5th Intern. Congress “Actual problems of creation of new medicinal preparations of natural origin”. SPb.; Petrodvorets, 2001. S. 104-105.]
9. *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 фасциолёзе//Российский паразитологический журнал. - М. 2017.- Том. 41. -Вып. 3- С. 271-276. [Musayev M. B., Milenin M. V., Arkhipov I. A., Khalikov S. S., Mikhailitsin F. S., Varlamov A. I. Efficiency of supramolecular complexes of triclabendazole with polymeric fillers with fasciolata//Russian parasitological magazine. - М. 2017.- Том. 41. -Vol. 3 - p. 271-276.]
10. *Саноцкий И.В., Иванов Н.Г.* Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе и рабочей зоны. – М., 1980, Минздрав №2196-80. [Sanotsky I. V., Ivanov N. G. Guidelines for the formulation of studies irritant properties and justification of maximum permissible concentrations selectively acting irritants in the air and working area. – М., 1980, The Ministry of Health No. 2196-80.]
11. Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». [The order of MH of the USSR № 755 from 12.08.77 G. “Rules of works using experimental animals”].
12. *Хабриев Р.У.* Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, - М., 2005, С. 54. [Khabriev R. U. Guidance on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances, Moscow, 2005, p. 54.]
13. *Dawson A.B.* //A not the staining of the Sceletion of cleared Specimens with alizarin red s.-Staintech.-1926.-1.-P.123-124.
14. *Wilson J.G.* //Methods for administering and detecting malformations in experimental animals. In Teratology; Principles and Tichigues [Wilson J.G. and Warkani J. Tds. University of Chicago Press, Chicago.-1965.-P.262-277.

Поступила 18.10.18