

АНТИОКСИДАНТНЫЙ И МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ТАУРИНА

М. А. Огай¹, Э. Ф. Степанова², Д. Б. Холодов¹, В. А. Николаевский¹

¹ Воронежский государственный университет

² Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Поступила в редакцию 11.03.2011 г.

Аннотация. Предварительный антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффект таурина изучали на парамециях — культуре *Paramecium caudatum*. Данная статья посвящена изучению явлений, которые происходят при использовании таурина в концентрации $2,88 \cdot 10^{-3}$ моль/л на клеточном уровне. В опытах *in vitro* с использованием методики регистрации кислотных эритрограмм авторами установлено, что таурин в данной концентрации по сравнению с контрольным опытом вызывает замедление скорости гемолиза. Установлено, что таурин в концентрации, соответствующей ЕД50 обладает мембраностабилизирующей активностью. Данная мембраностабилизирующая активность может быть связана с взаимодействием таурина и белковыми структурами цитоплазматической мембраны клеток или же его способностью восстанавливать нормальный фосфолипидный состав.

Ключевые слова: таурин, сахарный диабет, парамеции.

Abstract. Preliminary antioxidant and membranostabilization effect taurine studied on parametium — culture *Paramecium caudatum*. In given article results of research of influence Taurine on structurally functional properties of membranes red blood cells with use of a method of registration acid diagram of red blood cells are presented. Authors study direct action Taurine in concentration $2,88 \cdot 10^{-3}$ mol/l on membranes red blood cells. Use of the given concentration Taurine leads to increase of acid resistance red blood cells that has found reflexion in delay of speed haemolysis, increase in a latent stage haemolysis and decrease concerning the share control haemolysis red blood cells.

Keywords: taurine, a diabetes, parametium.

ВВЕДЕНИЕ

Применение таурина в последнее время получает все большее признание. Это связано с наличием у него уникального набора положительных эффектов: мембраностабилизирующего, антиоксидантного, антиатерогенного, кардио-, радио- и гепатопротекторного. Указанные эффекты таурина связаны с его способностью подавлять перекисное окисление липидов, стабилизировать мембранную проницаемость и транспорт ионов. Также таурин способен предотвращать изменения внутриклеточного объема за счет регулирования уровня Ca^{2+} в клетке. Предполагается, что таурин способен взаимодействовать с некоторыми мембранными белками, изменяя их конформацию и как следствие этого структурно-функциональные свойства мембран клеток [1, 3, 10—12].

Универсальна защитная роль таурина при развитии оксидативного стресса (ОС): это соединение обладает антиоксидантным действием и способностью блокировать реакции неферментативного гликозилирования белков. В лейкоцитах таурин

ограничивает негативные последствия избыточной продукции свободных радикалов (СР) при «дыхательном взрыве», обладая избирательной способностью неферментативно связывать гипохлорит-анион и ингибировать миелопероксидазу [2, 7]. Обсуждается роль таурина в качестве антагониста гомоцистеина — признанного фактора риска дисфункции эндотелия и связанных с ней тромбозов. Наконец, в нормализации функции эндотелия под действием таурина может иметь значение его способность снижать биологическое действие мощнейшего вазоконстриктора — ангиотензина II [5]. Отмечена способность таурина усиливать действие инсулина, возможно, как на рецепторном, так и на пострецепторном этапах. Все вышперечисленное делает таурин весьма перспективным антиоксидантом именно при СД.

Использование таурина в нашей стране долгое время было ограничено только офтальмологией (глазные капли для профилактики и замедления прогрессирования катаракты). Лишь в последние годы в арсенале врачей появился лекарственный препарат таурина для перорального приема [1].

Кроме того, способность таурина изменять пространственную структуру белковых молекул,

© Огай М. А., Степанова Э. Ф., Холодов Д. Б., Николаевский В. А., 2011

мембранную проницаемость, предотвращать изменение объема клеток, нормализовать фосфолипидный состав мембран представляет потенциальную возможность применения таурина для увеличения кислотной резистентности клеток слизистой оболочки желудка при ulcerогенезе, вызванном применением нестероидных противовоспалительных средств.

Целью настоящего исследования явилось изучение мембранопротекторного действия трансдермальной терапевтической системы (ТТС) с таурином, предлагаемой впервые, а также влияния таурина на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов, как модели, позволяющей найти средства, предупреждающие ulcerогенное действие нестероидных противовоспалительных средств.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для определения мембранопротективного действия ТТС с таурином была использована биологическая модель, представляющая собой среду, содержащую парамеции (*Paramecium caudatum*) (А. Т. Ец, Л.Д. Ефремова). В опытах по изучению влияния ТТС с таурином на рост и развитие парамеций использовали водное извлечение из ТТС с таурином (0,05 мл 20% раствор), который добавляли в 0,05 мл среды, содержащей 5—10 парамеций. В контрольном опыте к 0,05 мл среды с парамециями добавляли 0,05 мл воды дистиллированной. В ходе эксперимента анализировали рост, размножение, характер движения, размер и форму парамеций. Для подсчета числа инфузорий использовали гемоцитометрический способ (камера Горяева).

При изучении антиоксидантной и мембраностабилизирующего действия ТТС с таурином в качестве индикатора (токсиканта), повреждающего преимущественно липидную часть мембраны, использовали 1% раствор пероксида водорода (в объеме равном взятому количеству культуры парамеций — 0,05 мл), который *in vivo* расщепляется до перекисных радикалов, инициирующих процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран. Индикатор, повреждающий преимущественно белковую структуру биомембраны, — 14% этиловый спирт (0,05 мл), приводящий к денатурации ферментных и мембранных белков (А.С. Богдан, 1989). В контрольных опытах к 0,05 мл среды, содержащей парамеции добавляли 0,05 мл дистиллированной воды и 0,05 мл токсиканта. В опытах с лекарственной формой таурина к 0,05 мл среды с парамециями

добавляли 0,05 мл водного извлечения из ТТС с таурином (0,05 мл 20% раствора таурина) и 0,05 мл токсиканта. В обоих экспериментах наблюдение за парамециями проводили с использованием микроскопа «Биомед» при увеличении 16×40, температура инкубирования — 25,5 °С.

Исследование влияния таурина на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов проводили с использованием метода регистрации кислотных эритрограмм. В качестве модифицирующего агента использовали таурин (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия, ФСП 42-0044-06) в концентрации $2,88 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Суспензии эритроцитов получали по методу Л. А. Блюменфельда [4]. В опытах использовали кровь, полученную из хвостовых вен белых беспородных крыс самцов ($n=35$ голов, $m=180$ —250 г.) в количестве 1 мл., с соблюдением требований по гуманному обращению с животными. Содержание клеток в образцах контролировали спектрофотометрически. Кинетику индуцированного таурином гемолиза эритроцитов изучали с помощью прибора КФК-3.

Степень влияния модификатора на физико-химические свойства белково-липидных комплексов плазматических мембран оценивали на модельной системе таурин — эритроциты — HCl по изменению химической резистентности эритроцитарных клеток к воздействию соляной кислоты (в концентрации 0,1 моль/л) в изотоническом растворе NaCl [6, 8, 9].

В качестве основных параметров, характеризующих кислотную резистентность эритроцитов, использовались следующие показатели: константа максимальной скорости гемолиза (K_{max}), величина Gcf эритроцитов (%), характеризующая относительное количество клеток находящихся в стадии сферуляции и тлат — показатель отражающий количество эритроцитов, находящихся в латентной стадии гемолиза. Материалы были статистически обработаны с использованием пакета статистических программ STATGRAPHICS Plus 5.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения развития парамеций на фоне применения ТТС с таурином, а также мембранопротективное действие таурина в данной лекарственной форме при использовании токсикантов приведены в табл. 1 и 2.

Анализ данных, приведенных в табл. 1, позволяет заключить, что добавление в среду обитания

Таблица 1

Влияние водного извлечения из ТТС с таурином на количество, размер, форму и характер движения *Paramecium caudatum* (хронический опыт)

Объект исследования	Исходное количество парameций в 0,05 мл	Количество парameций спустя 3 суток	Размер парameций и форма (мкм) спустя 3 суток	Характер движения спустя 3 суток
Контроль	5—10	25—35	80—90 удлинённые	активны
Водное извлечение из 0,05 ТТС с таурином	5—10	> 90*	80—90 удлинённые	активны

* — $p < 0,05$.

Таблица 2

Мембранопротективное действие ТТС с таурином на фоне применения токсикантов (острый опыт)

Наименование объекта	Время остановки парameций в 14% этаноле, мин	Время остановки парameций в 1% растворе пероксида водорода, мин
Контроль	0,25 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Водное извлечение из 0,05 ТТС с таурином	10,0 ± 0,5*	5,3 ± 0,2*

* — $p < 0,05$.

парameций водного извлечения ТТС с таурином в количестве 0,05 мл 20% раствора, сопровождается к концу 3-х суток увеличением их количества по сравнению с контролем в 3,6—2,6 раз ($p < 0,05$) и не влияет на размер, форму и характер движения. Это свидетельствует о благоприятном влиянии таурина на популяцию парameций.

Анализ данных, приведенных в табл. 2, показал, что добавление водного извлечения из ТТС с таурином приводит к увеличению времени остановки парameций в 40—66,3 раз под воздействием клеточных ядов — спирта этилового и пероксида водорода относительно контроля. Увеличение времени остановки движения парameций под воздействием спирта этилового и перекиси водорода, возможно, связано с тем, что водное извлечение из ТТС с таурином обладает мембраностабилизирующим и антиоксидантным действием.

На основании результатов экспериментального исследования влияния таурина в концентрации $2,88 \cdot 10^{-3}$ моль/л на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов белых беспородных крыс построен график зависимости величины

кислотного гемолиза от времени инкубации с раствором таурина (рис. 1).

В результате проведенных экспериментов установлено, что эритрограмма кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных таурином, имеет

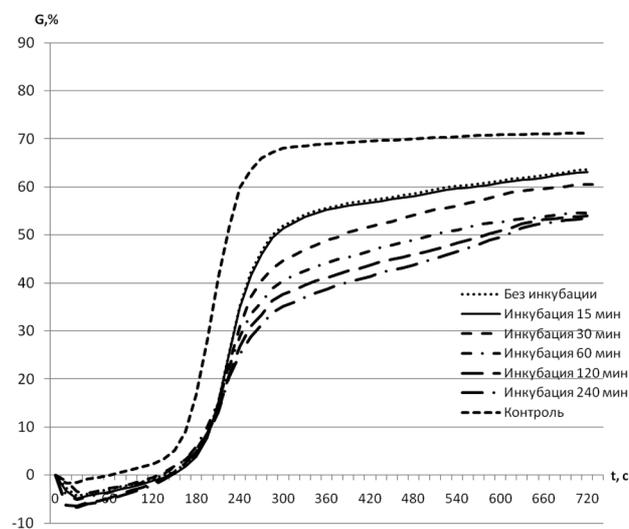


Рис. 1. Интегральная кривая кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных таурином

Таблица 3

Значения анализируемых показателей кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных таурином

Показатели		K_{\max}	$G_{\text{сф}}, \%$	$t_{\text{лат}}, \text{с}$
<i>N</i>		6	6	6
Контроль		3,8434±0,152815	-2,6851±1,47077	51±13,4164**
Опыт	Время инкубации	0	3,683±0,10956	129±8,21584**
		15	3,683±0,10956	144±8,21584**
		30	3,4554±0,2525*	126±8,21584**
		60	3,2416±0,224019*	126±8,21584**
		120	2,879±0,181296**	135±15**
		240	2,7246±0,16377**	141±8,21584**
* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$				

классический вид (рис. 1). То есть отчетливо зарегистрирована стадия сферуляции, соответственно имеется латентный период гемолиза, гемолиз основной среднестойкой популяции эритроцитов, и выход кривой на плато, характеризующий вовлечение в процесс более стойкой популяции эритроцитов.

Значения основных показателей кислотных эритрограмм приведены в табл. 3.

Анализ константы максимальной скорости кислотного гемолиза, отражающий относительное количество эритроцитов одновременно вступивших в стадию собственно гемолиза, показал что с увеличением времени контакта рабочей суспензии эритроцитов и модификатора (таурина), происходит некоторое снижение показателя K_{\max} (относительно контроля и предыдущей инкубации). За время инкубации рабочей взвеси эритроцитов и таурина от 0 до 240 минут значения K_{\max} убывают от $3,683 \pm 0,10956$ до $2,7246 \pm 0,163769$ соответственно, что на 4,2—29,1 % менее контроля (табл. 3). Однако, значение данного показателя при инкубации 0 и 15 минут одинаковые, что может быть объяснено небольшим интервалом времени между измерениями, а соответственно и временем контакта эритроцитов и таурина (табл. 3). В то время как значения K_{\max} контроля составляет $3,8434 \pm 0,152815$ (табл. 3). Анализируя значения K_{\max} настоящего исследования можно предположить, что в результате образования большего количества комплексов — модификатор-белок и как

следствие этого, увеличение порога проницаемости для ионов H^+ происходит замедление скорости кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных таурином относительно контроля и предыдущей инкубации.

Значение показателя $G_{\text{сф}}$, который отражает относительную долю сфероцитов, при модификации рабочей суспензии эритроцитов таурином, также отличается от контроля (табл. 3). Нами зарегистрировано увеличение относительной доли сфероцитов при использовании таурина по сравнению с контрольным опытом (табл. 3). И наибольшее значение характерно для 240 минут инкубации эритроцитов с таурином (табл. 3). Разница с контролем при этом составила 154,6 %. Таким образом можно предположить, что происходит замедление перехода от стадии сфероцитоза к стадии собственно гемолиза относительно контроля. А также возможно имеет место распространение большего модифицирующего действия на популяцию низкостойких эритроцитов к кислотному гемолитику.

Кроме этого из графика зависимости кислотного гемолиза эритроцитов от времени инкубации и концентрации таурина установлено увеличение значения показателя $t_{\text{лат}}$ при использовании модификатора (на 147,1—182,4 %), а соответственно и увеличение во времени латентной стадии гемолиза (табл. 3, рис. 1). Анализ эритрограммы в области отрицательных значений показал, что при использовании таурина происходит увеличение относительной

тельно контроля периода преобладания процессов модификации над деструкцией мембраны (рис. 1; табл. 3). Что также может свидетельствовать о замедленном переходе эритроцитов от фазы сферуляции к стадии собственно гемолиза относительно контрольного опыта. Вместе с этим установлено увеличение времени 50% гемолиза относительно контроля и времени инкубации (220 секунд — контроль и 705 секунд при 240 минутной инкубации с таурином), а это значит что на структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран влияет не только таурин, но и время контакта с данным модифицирующим агентом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что ТТС с таурином обладает мембраностабилизирующей и антиоксидантной активностью, о чем свидетельствует увеличение времени остановки парameций на фоне использования водного извлечения из данной лекарственной формы с таурином (0,05 мл 20% раствор) под воздействием растворов спирта этилового и перекиси водорода.

Анализ экспериментов, с использованием в качестве модели эритроцитов белых беспородных крыс показал, что таурин в концентрации $2,88 \cdot 10^{-3}$ моль/л вызывает изменение структурно-функциональных свойств мембран соматических клеток живого организма. Исходя из данных кислотных эритрограмм и показателей Kmax, Gсф, тлат можно предположить, что модифицирующее действие таурина распространяется на популяции низко-, средне, и высокостойких эритроцитов к кислотному гемолизику. В настоящем исследовании по отношению к данному контрольному опыту установлено снижение относительной скорости гемолиза (на 4,2—29,1%), увеличение доли эритроцитов, находящихся в стадии сферуляции (на 154,6%), увеличение латентной фазы гемолиза (на 147,1—182,4%) и времени 50%-го гемолиза более чем в 3 раза. Таким образом, можно предположить, что таурин в концентрации равной $2,88 \cdot 10^{-3}$ моль/л обладает непосредственной мембраностабилизирующей активностью, которая может быть связана с модификацией таурином белковых структур мембран модельных клеток.

Кроме этого повышение резистентности эритроцитов к кислотному гемолизику при использовании таурина может быть связано с его способностью восстанавливать нормальный фосфолипидный состав мембран эритроцитов. В частности таурин восстанавливает физиологическое отноше-

ние фосфатидилэтаноламина к фосфатидилхолину — основных фосфолипидов свойственных внутреннему и наружному бислою клеточной мембраны, также таурин нормализует отношение холестерина к фосфолипидам, а это в свою очередь является важнейшей характеристикой жесткости мембраны клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аметов А. С. Применение Дибикора при сахарном диабете 2 типа и сердечно-сосудистой патологии / А. С. Аметов, И. И. Кочергина // Эффективная фармакотерапия в эндокринологии. — 2007. — № 2. — С. 40—42.
2. Балаболкин М. И. / Пробл. Эндокринологии // М. И. Балаболкин, В. М. Кремская, Е. М. Клебанова. — 2005. — Т. 51, № 3. — С. 22—33.
3. Балаболкин М. И. Роль окислительного стресса в патогенезе диабетической нейропатии и возможность его коррекции препаратами α — липоевой кислоты / М. И. Балаболкин, В. М. Кремская, Е. М. Клебанова // Пробл. эндокринологии. — 2005. — Т. 51, № 3. — С. 22—33.
4. Гительзон И. И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И. И. Гительзон, И. А. Терсков. — Красноярск, 1959. — 247 с.
5. Кириченко Д. А. Применение препарата таурин в комплексной терапии кардиоваскулярной и гастроинтестинальной форм диабетической автономной нейропатии при сахарном диабете 2 типа / Д. А. Кириченко // Сиб. мед. журнал. — 2007. — Т. 73, № 6. — С. 15—18.
6. Резван С. Г. Молекулярные механизмы взаимодействия гемоглобина с серотонином / С. Г. Резван [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2004. — Т. 90., №8. — С. 46—47.
7. Северина Т. И. Эффективность α -липоевой кислоты в лечении кардиальной автономной нейропатии / Т. И. Северина, О. Л. Шилова // Тезисы докладов 3-го Всероссийского диабетологического конгресса. — 2004. — С. 314.
8. Структурные свойства эритроцитов и функциональная активность системы комплемента крови больных с различными формами нефропатии / С. Г. Резван [и др.] // Вестн. Воронеж. ун-та. Сер. Химия, биология. — 2000. — № 2. — С. 130—133.
9. Структурные свойства эритроцитов и состояние их антиоксидантной защиты у новорожденных после перенесенной гипоксии / С. Г. Резван [и др.] // Вопросы современной педиатрии. — 2008. — Т. 8, №1. — С. 270—271.
10. Aзуома I. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their precursors / I. Aзуома, В. Halliwell, В. М. Naey // Biochem.J. — 1988. — V.256, N.1. — P. 251—255.
11. Calcium-associated cytoprotective effect of taurine on the calcium and oxygen paradoxes in isolated rat hepatocytes / Nakashima T. et al. // Liver — 1990. — V.10. — P. 167—172.

12. The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by oxygen radicals / Nakamura

T. et al. // Biol. Pharm. Bull. — 1993. — V.16, N.10. — P. 970—972.

Огай Марина Алексеевна — доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; e-mail: marinfarm@yandex.ru

Ogaj Marina A. — the senior lecturer of chair of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology of pharmaceutical faculty of the Voronezh State University; e-mail: marinfarm@yandex.ru

Степанова Элеонора Федоровна — д.фарм.н., профессор кафедры технологии лекарств Пятигорской государственной фармацевтической академии; e-mail: E.F.Stepanova@mail.ru

Stepanova Eleonora F. — the doctor of pharmaceutical sciences, the professor of chair of technology of medicines of Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy; e-mail: E.F.Stepanova@mail.ru

Холодов Дмитрий Борисович — аспирант кафедры фармакологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; e-mail: holodov@pharm.vsu.ru

Holodov Dmitry B. — the post-graduate student of chair of pharmacology of pharmaceutical faculty of the Voronezh State University; e-mail: holodov@pharm.vsu.ru

Николаевский Владимир Анатольевич — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии фармацевтического факультета Воронежского государственного университета; e-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru; 394036

Nikolaevskii Vladimir A. — the doctor of medical sciences, the professor managing chair of pharmacology of pharmaceutical faculty of the Voronezh State University; an e-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru