

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ С ТАУРИНОМ

Н. А. Дьякова¹, И. Н. Пузырева², М. А. Огай², А. И. Сливкин¹, А. С. Беленова¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

²ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет»

Поступила в редакцию 11.01.2016 г.

Аннотация. Разработаны лекарственные формы с таурином. Современные трансдермальные терапевтические системы получают всё большее распространение благодаря экономичности целенаправленного использования лекарственных субстанций, что позволяет существенно снизить необходимое их количество при сохранении эффекта. Это делает лечение дешевле, а уникальные препараты - доступнее. Разработана трансдермальная терапевтическая система с таурином для профилактики и лечения метаболических нарушений. Вторая лекарственная форма с гепатопротекторным эффектом - комплексный препарат с растительными экстрактами расторопши пятнистой, астрагалом серпоплодным и таурином.

Ключевые слова: таурин, трансдермальная терапевтическая система, расторопша пятнистая, астрагал серпоплодный, парамеции.

Abstract. Developed dosage forms with taurine. Modern transdermal therapeutic systems are increasingly common due to the efficiency of purposeful use of medicinal substances, which can significantly reduce the necessary number when you save the effect, which makes treatment cheaper and unique drugs more affordable. We have developed a transdermal therapeutic system with taurine for the prevention and treatment of metabolic disorders. The second form of the drug with hepatoprotective effect of a complex drug with herbal extracts milk Thistle, Astragalus carboplatinum and taurine.

Keywords: taurine, transdermal therapeutic system, milk Thistle, Astragalus secepatnya, the Paramecia.

Актуальны исследования в области разработки наружных и пероральных лекарственных форм, содержащих таурин для профилактики и лечения метаболических нарушений и обладающих гепатопротекторным эффектом.

В 1988 г. G. Reaven описал симптомокомплекс, включавший гиперинсулинемию, нарушение толерантности к глюкозе (НТГ), гипертриглицеридемию, низкий уровень липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), под названием синдром X, в настоящее время известный как метаболический синдром [1].

Современные трансдермальные терапевтические системы (ТТС) получают всё большее распространение благодаря экономичности целенаправленного использования лекарственных субстанций, позволяющие снизить необходимое количество действующего вещества в 100 раз

(иногда в 1000 раз) при сохранении эффекта, что делает лечение дешевле, а уникальные препараты - доступнее. В настоящее время ни один другой тип существующих систем не обеспечивает такого простого регулирования дозы лекарственного вещества (ЛВ), как ТТС [2, 3].

ТТС обладают многочисленными достоинствами как биофармацевтического, так и технологического характера.

Таурин - жизненно необходимая сульфаминокислота, которая была найдена практически у всех видов животных. В растениях таурин не встречается. В настоящее время в России и в других странах для лекарственных препаратов используют синтетический таурин, что продиктовано экономической целесообразностью. Таурин - оказывает ретинопротекторное, противокатарактное, а также метаболическое действие при местном введении, при системном воздействии проявляет метаболический эффект, обладает гепатопротекторными действиями, кардиотонически-

© Дьякова Н. А., Пузырева И. Н., Огай М. А., Сливкин А. И., Беленова А. С., 2016

ми и гипотензивными свойствами, способствует образованию новых клеток в гиппокампе мозга, регенерации мозга при закрытых травмах головы.

Таурин обладает также детоксицирующими свойствами. Еще одно показание к применению препарата — это интоксикации, вызванные сердечными гликозидами. В последнем случае он устраняет аритмии, диспептические расстройства, рвоту и другие симптомы [4].

У препарата замечен гепатопротекторный эффект. Он восстанавливает кровоток в печени и уменьшает цитолитическую активность ряда ферментов, которая увеличивается у больных с хроническими диффузными заболеваниями печени [5, 6].

Известны работы И.М. Кахновского, Т.В. Королевой, В.Н. Захарченко в отношении влияния таурина на эритроцитарную мембрану [7]. Изучено, что при длительном применении малых доз таурина в клинике на больных с сахарным диабетом обоих типов восстанавливается нормальный фосфолипидный состав эритроцитов, а также отношение холестерина к фосфолипидам. В крови при этом снижается уровень триглицеридов. Стабилизация течения болезни и в некоторых случаях уменьшение уровня сахара в крови являлось следствием мембранных изменений и, соответственно, метаболизма углеводов [8].

Влияние таурина на окислительный стресс при сахарном диабете, а также влияние магниевой соли на устойчивость к гипоксии отмечена в работах В.Е. Погорелого, Л.М. Макаровой, В.Е. Гузенко, О.Н. Олейниковой [9, 10].

Анализ выше изложенного, дает основание считать, что перспективным является включение таурина в состав трансдермального пластыря, как новой лекарственной формы, обладающей активностью, связанной со всеми эффектами таурина.

Трансдермальная доставка ЛС имеет такие неоспоримые преимущества как: обеспечение по сравнению с пероральным введением возможность избежать проблем, связанных с инактивацией или снижением активности в результате первого пассажа и желудочного метаболизма, а также связанные с этим неблагоприятные реакции; возможность немедленного прекращения воздействия; обеспечение постоянной концентрации ЛС в крови, без колебаний концентрации; уменьшение кратности приема за счет доставки необходимой дозы в более продолжительный период времени; улучшение комплаентности пациентов (легкий способ применения); уменьшение

необходимой дозы, так как снижаются потери связанные с метаболизмом. Молекулярная масса и гидрофильные свойства таурина позволяют вводить его в состав ТТС.

Использование таурина в виде пероральной лекарственной формы также является актуальной проблемой. В этом плане, на наш взгляд, была интересной разработка комплексного препарата с растительными экстрактами расторопши пятнистой, астрагалом серпоплодным и таурином.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Модельные образцы трансдермального пластыря получали путем суспендирования таурина в этаноле с последующей гомогенизацией с пластификатором, пенетратором и пролонгатором до получения однородной вязкой массы, вакуумировали. Пластырную массу наносили методом полива, сушили в вакуумных шкафах при температуре 40 °С [11].

Суспензии эритроцитов получали по методу Л.А. Блюменфельда.

В опытах использовали кровь, полученную из хвостовых вен белых беспородных крыс самцов (n=35 голов, m=250-300 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 [12]. В качестве основных параметров, характеризующих осмотическую резистентность эритроцитов, использовались следующие показатели: константа максимальной скорости гемолиза (K_{max}), величина $G_{сф}$ эритроцитов (%), характеризующая относительное количество клеток находящихся в стадии сферуляции и тлат - показатель отражающий количество эритроцитов, находящихся в латентной стадии гемолиза [13].

Эксперимент по определению биологической активности и токсичности веществ был проведен на парамециях - культуре *Paramecium caudatum*.

Изучение протективной активности по отношению к клеточным ядам проводили со спиртом

этиловым и водорода пероксидом, которые создают патологическую модель повреждения мембраны клетки. Этиловый спирт повреждает белковую часть биомембраны, пероксид водорода инициирует ПОЛ мембраны (Э.Ф. Степанова и др., 2000).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании проведенных экспериментальных биофармацевтических, технологических, а также микробиологических исследований, нами был сконструирован трансдермальный пластырь с таурином (табл. 1).

Табл. 1

Состав трансдермального пластыря с таурином, ч
(на один пластырь)

Таурин	1.0
ПЭГ – 400	1.5
Пропиленгликоль 1,2	0.25
ПВП К-30	2.0
Спирт этиловый 95 %	10.0

Технологическая схема трансдермального пластыря с таурином представлена на рис. 1.

Определение внешнего вида трансдермального пластыря: трансдермальный пластырь с таурином представляет собой полосу полиэтилентерефталатной металлизированной пленки-подложки с равномерным слоем пластырной массы прозрачного, слегка с беловатым оттенком цвета, своеобразного запаха, покрытый сверху защитным слоем бумаги холодносвариваемой по ТУ 9453-037-21032843-96 или бумаги силиконизированной по ТУ 13-0281020-125-93. Трансдермальный пластырь с таурином не должен иметь складок пленки-подложки, комков пластырной массы, посторонних механических включений в массе и непокрытых пластырной массой мест. Размеры трансдермального пластыря с таурином: ширина 5.0 ± 0.2 см, длина 5.0 ± 0.2 см, ширина защитного слоя 6.0 ± 0.2 см.

Проведены исследования влияния таурина на структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов с использованием метода регистрации кислотных эритрограмм. Изучено непосредственное действие таурина в концентрации $2,88 \cdot 10^{-3}$ моль/л на мембраны эритроцитов. Использование данной концентрации таурина приводит к повышению кислотной резистентности эритроцитов, что нашло отражение в замедлении скорости гемолиза, увеличении латентной стадии гемолиза и снижении относительно контроля доли гемолизированных эритроцитов.

Известно, что при длительном лечении малыми дозами таурина восстанавливается нормальный фосфолипидный состав эритроцитов, а также отношение холестерина к фосфолипидам [8].

В крови при этом снижается уровень триглицеридов. Стабилизация течения болезни и в некоторых случаях уменьшение уровня глюкозы в крови явилось следствием мембранных изменений и, соответственно, метаболизма углеводов.

Одна из основных задач данного исследования – получение новых знаний в механизме мембранстабилизирующей активности таурина, которая может быть связана с взаимодействием таурина и белковыми структурами мембран модельных клеток [13].

На основании данных, полученных в эксперименте, построен график зависимости величины гемолиза эритроцитов от времени инкубации при использовании таурина в концентрации $2.88 \cdot 10^{-3}$ моль/л (рис. 2).

Анализ 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 ± 0.10956 до 2.7246 ± 0.163769 соответственно. 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. В то время как значения K_{\max} контроля составляет 3.8434 ± 0.152815 . 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. Зарегистрировано увеличение относительной доли сфероцитов при использовании таурина по сравнению с контрольным опытом. И наибольшее значение характерно для 240 минут инкубации эритроцитов с таури-

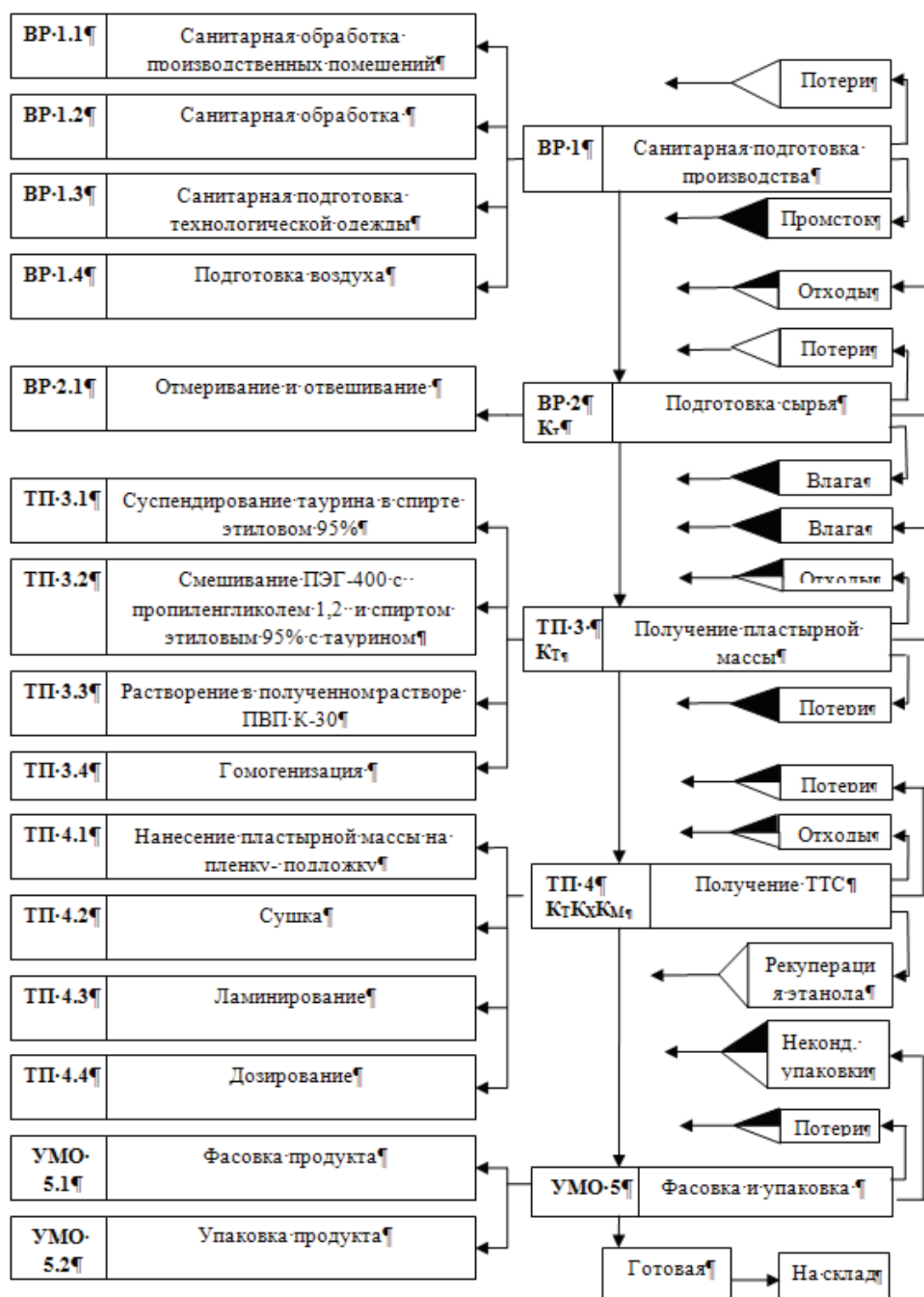


Рис. 1. Технологическая схема получения ТТС с таурином. Обозначения: K_т, K_х, K_м – контроль технологический, химический и микробиологический соответственно.

ном. Таким образом, можно предположить, что происходит замедление перехода от стадии сфероцитоза к стадии собственно гемолиза относительно контроля. А также возможно имеет место быть распространение большего модифициру-

щего действия на популяцию низкостойких эритроцитов к кислотному гемолизу.

Кроме этого, при анализе графика зависимости кислотного гемолиза эритроцитов от времени инкубации и концентрации таурина установлено

увеличение значения показателя тлат при использовании модификатора, а соответственно и увеличение во времени латентной стадии гемолиза (рис. 2). Анализ эритрограммы в области отрицательных значений показал, что при использовании таурина происходит увеличение периода преобладания процессов модификации над деструкцией мембраны относительно контроля (рис. 2). Этот факт 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 таурин 240 минут инкубации), а это значит что на структурно – функциональные свойства эритроцитарных мембран влияет не только таурин, но и время контакта с данным модифицирующим агентом.

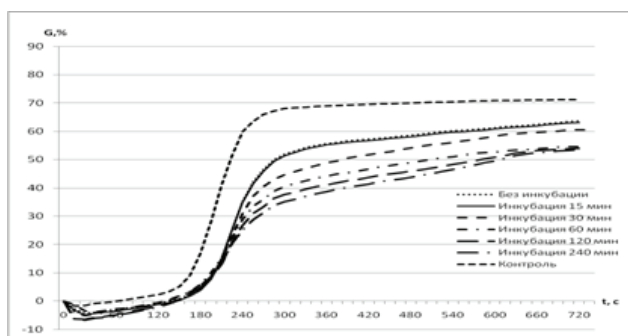


Рис. 2. Интегральная кривая кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных таурином

В ходе проведенных экспериментов, с использованием в качестве модели эритроцитов белых беспородных крыс, было установлено, что таурин в дозе ЕД50 вызывает изменение структурно-функциональных свойств мембран соматических

клеток живого организма. Исходя из данных кислотных эритрограмм и показателей K_{max} , $G_{сф}$, тлат можно предположить, что модифицирующее действие таурина распространяется на популяции низко-, средне, и высокостойких эритроцитов к кислотному гемолитику. В настоящем исследовании по отношению к данному контрольному опыту установлено снижение относительной скорости гемолиза, увеличение доли эритроцитов, находящихся в стадии сферуляции, увеличение латентной фазы гемолиза и времени 50%-го гемолиза. Таким образом можно предположить, что таурин в концентрации равной ЕД50 специфической активности обладает непосредственной мембранстабилизирующей активностью, которая может быть связана с модификацией таурином белковых структур мембран модельных клеток.

С целью оптимизация состава разрабатываемой пероральной лекарственной формы с таурином в качественном и количественном соотношении, использовали эксперимент на парамециях. В процессе наблюдения за культурой клеток фиксировали число особей в одной капле и средний (преобладающий) размер клеток. Для подсчета числа парамеций (инфузорий) использовали гемцитометрический способ (камера Горяева). Различие в концентрации живых парамеций в опытной и контрольной пробах, а также в их размере являлось критерием токсичности или экологически благоприятной среды для одноклеточного организма. В результате проведенных исследований, было установлено, что наиболее оптимальной является композиция расторопша пятнистая : астрагал серпоплодный : таурин в соотношении 8:1:4.

По шкале активности именно при таком соотношении компонентов парамеции очень активны

Табл.2

Значения анализируемых показателей кислотного гемолиза эритроцитов, модифицированных таурином

Показатели		K_{max}	$G_{сф}$, %	тлат, с	
N		6	6	6	
Контроль		3.8434±0.152815	-2.6851±1.47077	51±13.4164**	
Опыт	Время инкубации	0	3.683±0.10956	-4.37081±1.16757	129±8.21584**
		15	3,683±0,10956	-4.5943±0.93722*	144±8.21584**
		30	3.4554±0.2525*	-3.69385±1.08472	126±8.21584**
		60	3.2416±0.224019*	-5.13643±1.05149*	126±8.21584**
		120	2.8794±0.181296**	-6.44579±1.33385*	135±15**
		240	2.7246±0.163769**	-6.83668±1.27631*	141±8.21584**

Примечание - * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,001$

и к 3 суткам их количество превосходит исходное количество особей в среднем в 3 раза.

Следующим этапом наших исследований было изучение протективной активности изучаемых композиций по отношению к клеточным ядам: спирту этиловому 14% и водорода пероксида 1% (табл. 3).

Разработанные композиции существенно удлиняли время остановки парамеций под воздействием клеточных ядов – спирта этилового и пероксида водорода.

Удлинение времени остановки движения парамеций под воздействием спирта этилового 14%, характеризует мембраностабилизирующую активность разработанных композиций, компоненты, которых препятствуют повреждению белковой части биомембраны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение резистентности эритроцитов к кислотному гемолизу при использовании таурина может быть связано с его способностью восстанавливать нормальный фосфолипидный состав мембран эритроцитов. В частности таурин восстанавливает физиологическое отношение 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.

Активность разработанной композиции с таурином, проверена по удлинению времени движения парамеций под воздействием 1% раствора перекиси водорода. По-видимому, это связано со

способностью компонентов разработанной композиции тормозить ПОЛ мембраны, то есть окислительную деградацию липидов, происходящую, в основном, под действием свободных радикалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутрова, С.А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению / С.А. Бутрова // Рус. Мед. журн. — 2001. — Т.9, № 2. — С. 56-65.
2. Чрескожные системы доставки лекарственных веществ в организм: создание препаратов, разработка технологии, перспективы развития / И.Н. Андреева [и др.]. — Пятигорск, 2003. — С. 36.
3. Vasiliev, A.E. Proc. 1 st World Meeting on Pharmaceutics / A.E. Vasiliev, M.M. Feldstein, M.E. Poudel // Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology — Budapest, 1995. — P. 683-684.
4. Заволовская, Л.И. Клиническая эффективность тауфона в комбинированном лечении больных с хронической недостаточностью кровообращения / Л.И. Заволовская, Е.П. Елизарова, В.А. Орлов // Эксперим. и клинич. фармакология. — 1995. — Т. 58. — № 6 — С. 29-32.
5. Паландова, Т.Ю. Сравнительное фармакологическое изучение таурина и триметазида: дис. ...канд. фарм. наук: 14.00.25/ Т.Ю. Паландова. — Пятигорск, 2009. — 121 с.
6. Фармакокинетика таурина / Е.П. Елизарова [и др.] // Кардиология. — 1995. — № 4. — С. 69-70.
7. Таурин в лечении сахарного диабета [Электронный ресурс] /Кахновский И.М., Королева Т.В., Захарченко В.Н./ — Режим доступа: <http://www.e-apteka.ru/preparats/atik/3-letters5.htm>

Табл. 3

Изучение степени защиты парамеций от действия токсикантов по времени остановки ($n=5$)

Наименование объекта	Время остановки парамеций в 14% этаноле, мин	Время остановки парамеций в 1% растворе пероксида водорода, мин
Контроль	0.2±0.02	0.09±0.01
Композиция Расторопша:астрагал:таурин (1:1:1)	0.35±0.02 P≤0.05*	0.17±0.01 P≤0.05*
Композиция Расторопша:астрагал:таурин (2:1:2)	0.49±0.01 P≤0.05*	0.23±0.01 P≤0.05*
Композиция Расторопша:астрагал:таурин (2:1:1)	0.46±0.02 P≤0.05*	0.22±0.01 P≤0.05*
Композиция Расторопша:астрагал:таурин (8:1:4)	0.64±0.01 P≤0.05*	0.36±0.02 P≤0.05*

Примечание - p – достоверность различий по отношению к контролю; *

8. Пат. 2054936 Российской Федерации, 6А 61К31/185. Мембраностабилизирующее средство для лечения больных с инсулинзависимым и инсулиннезависимым сахарным диабетом / Е.П. Елизарова, [и др.] (РФ). — № 94012067/14; заявл. 07.04.1994; опубл. 27.02.1996., Бюл. № 6 — 4 с.

9. Гузенко, В.Е. Окислительный стресс при сахарном диабете и его фармакологическая коррекция / В.Е. Гузенко, Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Рос. Педиатр. журн. — 2010. — №5. — С. 42-50.

10. Сравнительная оценка влияния таурина, производного его магниевои соли и магний сульфата на устойчивость к гипоксии разного происхождения / О.Н. Олейникова [и др.]. // Токсикол. вест. — 2009. — № 4. — С. 19-22.

*Воронежский государственный университет
Дьякова Н. А., к.б.н., асс. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета
Тел.: (920) 4125352
E-mail: ninochka_v89@mail.ru*

*Сливкин А. И., д.фарм.н., проф., зав. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии
Тел.: 255-47-76
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Беленова А. С., к.б.н., младший научный сотрудник кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии
Тел.: 253-07-89
E-mail: belenova@pharm.vsu.ru*

*Омский государственный медицинский университет
Пузырева И. Н., ассистент кафедры фармтехнологии с курсом биотехнологии
Тел.: +7(913)6119904
E-mail: avtoprofil_55@mail.ru,*

*Огай М. А., д.фарм.н., доц., заведующая кафедрой фармтехнологии с курсом биотехнологии
Тел.: +7(983)621-76-55
E-mail: marinfarm@yandex.ru*

11. Огай, М.А. Биофармацевтические исследования разработанного пластыря с таурином in vitro и ИК-спектроскопия / М.А. Огай, Э.Ф. Степанова, Н.А. Великанова// *Фундаментальные исследования*. — 2011. — №11 (часть 1). — С. 208-211.

12. 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.

13. Структурные свойства эритроцитов и функциональная активность системы комплемента крови больных с различными формами нефропатии / С.Г. Резван [и др.] // *Вестн. Воронеж. унта. Сер. Химия, биология*. — 2000. — № 2. — С. 130 – 133.

*Voronezh State University
Dyakova N. A., the candidate of biological sciences, the assistant at the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department
Ph.: (920) 4125352
E-mail: Ninochka_V89@mail.ru*

*Slivkin A. Y., Full Professor, PhD, Dsci, Head of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department
Ph.: 255-47-76
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Belenova A. S., candidate of biology science, junior researcher of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department
Тел.: 253-07-89
E-mail: belenova@pharm.vsu.ru*

*Omsk state medical University
Puzyreva I. N., assistant Professor of promtekhologii with the rate of biotechnology
Ph.: +7(913)611-99-04
E-mail: avtoprofil_55@mail.ru*

*Ogay M. A., PhD, head of Department of promtekhologii with the rate of biotechnology
Tel.: +7(983)621-76-55
E-mail: marinfarm@yandex.ru,*