

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ И КАПИЛЛЯРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕЛЯ ХИТОЗАНА С ТАУРИНОМ И АЛЛАНТОИНОМ

П. А. Федосов, В. А. Николаевский, А. И. Сливкин, А. В. Бузлама

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 12.04.2016 г.

Аннотация. В эксперименте на белых беспородных крысах на модели формалинового отека установлено, что гель на основе хитозана с таурином и аллантоином (ХТА) достоверно уменьшает отек лапы крыс через 180 минут на 16.6 % относительно контроля. Противовоспалительный эффект геля ХТА незначительно уступает по действию препарату сравнения гелю «Вольтарен эмульгель», но превосходит гель «Солкосерил» и мазь «Левомеколь». Нанесение на поверхность депилированной кожи геля ХТА в течение четырех дней ведёт к уменьшению проницаемости капилляров в среднем на 41.13 %, что сравнимо с эффективностью геля «Троксевазин».

Ключевые слова: хитозан, таурин, аллантоин, гель, противовоспалительное, капилляропротекторное.

Abstract. In the experiment on white rats on a model of formalin edema has been found, that a gel based on chitosan with taurine and allantoin (CTA) significantly reduced paw edema in rats after 180 minutes compare to 16.6 % of control. Anti-inflammatory effect of the gel CTA slightly lesscomparisonto the effect of the gel "Voltaren®Emulgel®," but over to gel "Solcoseryl®" and ointment "Levomecol®". Applying to the surface of the depilatedskin CTA gel within four days leads to reduction of capillary permeability in average of 41.13 %, which is efficiency comparable to the gel "Troxevasin®".

Keywords: chitosan, taurine, allantoin, gel, anti-inflammatory, capillaries protection action.

Воспаление является ведущим патогенетическим звеном в раневом процессе. Значительную роль в патогенезе воспаления играют медиаторы – гистамин, серотонин, простагландины, лейкотриены, а также продукты перекисного окисления липидов, в связи с чем одним из способов лечения может являться использование антиоксидантов различной химической структуры, проявляющих в том числе противовоспалительное действие при внутреннем и наружном применении [1]. Одним из таких антиоксидантов является таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) – полузаменимая аминокислота, способствующая улучшению обменных процессов, содержащаяся в высоких концентрациях в нейтрофилах, нормализующая функцию клеточных мембран и стимулирующая репаративные процессы [2]. Аллантоин – низко-

молекулярное гетероциклическое вещество обладающее антиоксидантным и антимуtagenным действием [3]. Хитозан – природный полимер оказывающий положительное влияние на репаративные процессы тканей, а также обладающий антибактериальным действием [4].

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования являлось изучение противовоспалительной и капилляропротекторной активности разработанного впервые хитозанового геля с таурином и аллантоином. Введение в состав геля вышеописанных действующих веществ было обосновано наличием у них противовоспалительного, ранозаживляющего и антиоксидантного действия, известного по данным литературы и собственных исследований [5].

Гель хитозана с таурином и аллантоином (ХТА) разработан на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии Воронежского государственного университета под руко-

водством д.фарм.н. профессора Сливкина А.И., к.фарм.н. Провоторовой С.И. Предварительные исследования показали, что наиболее перспективной является комбинация содержащая 4.0 % таурина, 1.0 % хитозана, 0.5 % аллантаина, обладающая выраженным ранозаживляющим действием [6]. Представляет интерес выяснение наличия противовоспалительного эффекта разработанной композиции, для чего можно использовать общепринятый тест отека лапы крыс. Одним из механизмов противовоспалительного эффекта лекарственных средств является изменение проницаемости капилляров, индикатором проницаемости которых может выступать трипановый синий.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для оценки местного антиэкссудативного противовоспалительного действия геля ХТА использовали модель отека лапы крыс. Эксперименты проведены на белых беспородных крысах самцах (n=48), массой тела 280.0 ± 20.0 г. Животных разделяли на 8 групп по 6 голов в каждой. Во всех группах воспалительную реакцию моделировали субплантарным введением 0.1 мл 2.0 % раствора формалина в правую заднюю лапу животного. Первая группа была контрольной, без лечения. Во второй экспериментальной группе на правую заднюю лапу наносили гель «Вольтарен эмульгель» (ООО Новартис Консьюмер Хелс, Швейцария). В третьей группе лапа была обработана гелем «Солкосерил» (Legacy Pharmaceuticals Switzerland GmbH, Швейцария). В четвертой группе заднюю правую лапу обрабатывали мазью «Левомеколь» (ОАО Нижфарм, Россия). В пятой группе лапу обрабатывали гелем ХТА. В шестой группе наносили животным на заднюю лапу 4.0 % раствор таурина (ЗАО «Вектон», Россия). В седьмой группе обрабатывали правую заднюю лапу 0.5 % раствором аллантаина (Acros Organics, Бельгия). В восьмой группе на лапу животным наносили 1.0 % гель хитозана (Sigma-Aldrich, Япония) в монокомпозиции.

Экспериментальным животным гели, мазь и растворы наносили в количестве 0.5 мл за 2 часа, 1 час и третий раз непосредственно до индукции воспаления. Измерение объема конечности осуществляли онкометрическим способом через 30, 180 минут после введения формалина, объем выражали в см^3 [7]. Анализ результатов проводили путем сравнения исходных и последующих показателей объема конечности опытных и контрольных групп. Об эффективности применения пре-

паратов судили по уменьшению отека конечности. Эффективность действия лекарственных средств выражали в процентах, как предотвращение отека, рассчитывали разницу между исходными и последующими показателями опытной и контрольной группы, по формуле [8]:

$$E = \frac{V_{к_n} \times 100\%}{V_{к_0}} + \frac{V_{о_n} \times 100\%}{V_{о_0}}$$

где E – эффективность изучаемого ЛВ, выраженная в процентах как предотвращение отека, $V_{к_0}$ – исходный объем конечности в контрольной группе; $V_{к_n}$ – объем конечности через n часов в контрольной группе; $V_{о_0}$ – исходный объем конечности в опытной группе, $V_{о_n}$ – объем конечности через n часов в опытной группе.

Капилляропротекторное действие геля на основе хитозана с таурином и аллантаином (ХТА) изучали на белых беспородных мышях самцах (n=36) массой 18.8 ± 2.0 г. Мышей разделяли на 6 групп по 6 особей в каждой. Первая группа была контрольной, никакие лекарственные вещества на поверхность кожи не наносили. Во второй группе на предварительно депилированную кожу передней брюшной стенки в течение трех дней, предшествовавших опыту, один раз в сутки и за 30 мин до начала эксперимента, наносили 2.0 % гель «Троксевазин» (ООО «Актавис», Россия) в дозе 0.2 г. В третьей группе по аналогичной схеме наносили гель ХТА, в четвертой группе 4% раствор таурина, в пятой группе 0.5 % раствор аллантаина. В шестой группе кожу брюшной стенки животных обрабатывали 1.0 % гелем, содержащим только хитозан в монокомпозиции. Ангиопротекторный эффект изучали на четвертый день от начала нанесения гелей. В день эксперимента через 30 минут после заключительного нанесения геля, внутрибрюшинно вводили 250 мкл 1.0 % раствора трипановой сини (ЗАО «Вектон», Россия). Через 10 минут на кожу передней брюшной стенки наносили 50 мкл ксилола (ЗАО «Вектон», Россия). Регистрировали выход трипановой сини в очаг воспаления, по времени появления и отчетливого окрашивания места нанесения ксилола [7,9,10].

Все эксперименты были проведены с соблюдением этических принципов биомедицинских исследований в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных [11]. Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием программ «Microsoft Excel», «Statistica 10.0». Для оценки достоверности экспериментальных результатов использовали t – критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов по изучению противовоспалительных свойств гелей, мазей и растворов приведены на (Рис. 1). Анализ результатов исследования, показал что средний по всем группам объем здоровой конечности составил $1.52 \pm 0.03 \text{ см}^3$ и не имел значимых различий в контрольной и опытных группах, что совпадает с данными литературы [8].

В контрольной группе животных было выявлено достоверное увеличение объема конечности через 30 минут после введения формалина на 15.9 % по отношению к исходному объему по группе, через 180 минут на 21.2 %, что подтверждает развитие острого экссудативного воспаления при субплантарном введении формалина [1]. Во второй группе предварительное нанесение геля «Вольтарен эмульгель» снижало выраженность отека через 30 минут после введения формалина на 15.2 % по сравнению с относительными к исходным по группе изменениями, через 180 минут на 21.2 % ($p < 0.05$). В третьей и четвертой группе предварительное нанесение геля «Солкосерил» и мази «Левомеколь», не сопровождалось достоверным уменьшением объема конечности, по отношению к контролю. В пятой группе предварительное применение геля на основе хитозана с таурином и аллантоином достоверно уменьшало отек конечности через 30 минут на 13.9 %, через 180 минут – на 16.6 % ($p < 0.05$). В шестой группе предварительная обработка лапы 4.0 % раствором таурина обеспечивала тенденцию к предотвращению отека конечности через 30 минут на 7.9 % и через 180 мин на 10.6 % по сравнению с контролем ($p < 0.05$). В седьмой группе нанесение раствора аллантоина не приводило к достоверному снижению отека конечности. В восьмой группе нанесение 1.0 % геля хитозана в монокомпозиции через 180 минут после введения флоггена снижало выраженность отека конечности на 5.4 % от-

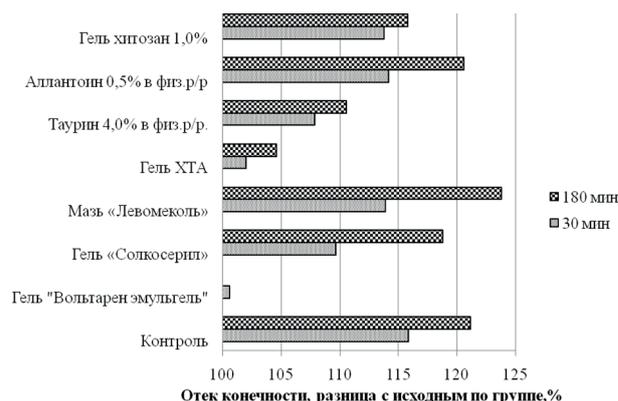


Рис. 1. Сравнительная оценка противовоспалительной активности геля ХТА, геля «Вольтарен эмульгель», геля «Солкосерил», мази «Левомеколь», 4.0 % раствора таурина, 0.5 % раствора аллантоина, 1.0 % геля хитозана на модели формалинового отека лапы крыс.

носителем контроля ($p < 0.01$).

Результаты проведенного исследования по оценке капилляропротекторного действия геля ХТА, геля «Троксевазин», растворов таурина и аллантоина и геля содержащего только хитозан представлены в табл. 1.

Установлено, что в контрольной группе время появления окрашивания на передней брюшной стенке составило 81.17 ± 0.75 секунд, а время появления отчетливого окрашивания 122.33 ± 1.03 секунд. Во второй группе животных предварительное нанесение геля «Троксевазин» увеличивало время появления слабого и отчетливого окрашивания на 45.2 % и 42.0 % соответственно, относительно контроля ($p < 0.05$). В третьей группе гель на основе хитозана с таурином и аллантоином увеличивал время появления слабого окрашивания на 40.0 % и время отчетливого окрашивания на 42.8 % относительно контроля ($p < 0.05$). В четвертой группе предварительное нанесение 4.0 % раствора таурина в физиологическом растворе увеличивало время появления трипановой сини в очаг воспаления на 23.0 % и время отчетливого

Таблица 1

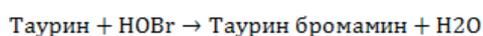
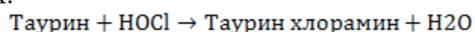
Влияние геля «Троксевазин», геля ХТА, растворов таурина и аллантоина и геля хитозанового в монокомпозиции на уменьшение сосудистой проницаемости у мышей

Группа животных	Время появления окрашивания, с.	Разница с контролем, %	Время отчетливого окрашивания, с.	Разница с контролем, %
Контроль	81.17 ± 0.75	-	122.33 ± 1.03	-
Гель «Троксевазин»	$117.83 \pm 2.32^*$	45.2	$173.67 \pm 2.50^*$	42.0
Гель ХТА	$113.67 \pm 0.82^*$	40.0	$174.67 \pm 1.51^*$	42.8
Таурин 4,0% в физ.р/р.	$99.83 \pm 2.32^*$	23.0	$162.00 \pm 3.58^*$	32.4
Аллантоин 0,5% в физ.р/р.	$86.00 \pm 1.67^*$	6.0	$127.50 \pm 1.64^*$	4.2
Гель хитозан 1,0%	$83.17 \pm 1.94^{**}$	2.5	$125.00 \pm 2.61^{**}$	2.2

Примечание: * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$ – достоверность различий в опытной группе по сравнению с контролем.

окрашивания на 32.4 % по сравнению с контролем. Пятой и шестой группе предварительное местное применение 0.5 % раствора аллантаина в физиологическом растворе и 1.0 % геля содержащего только хитозан увеличивало время появления слабого окрашивания на 6.0 % ($p < 0.05$) и 2.5 % ($p < 0.01$) соответственно. Таким образом, установлено что нанесение на поверхность депиллированной кожи геля ХТА вело к уменьшению проницаемости капилляров, что нашло отражение в увеличении времени появления слабого окрашивания трипановым синим на 40.0 % и время отчетливого окрашивания на 42.8 % ($p < 0.05$), сравнимое с влиянием геля «Троксевазин» на проницаемость капилляров. Полученные результаты свидетельствуют о капилляропротекторном действии геля на основе хитозана с таурином и аллантаином, проявляющееся в увеличении времени появления трипановой сини, в очаге воспаления вызванного нанесением ксилола.

Согласно литературным данным известно, что противовоспалительное действие таурина может быть связано с антиоксидантным действием, в частности с нейтрализацией хлорноватистой кислоты (НОСl) и бромноватистой кислоты (НОBr), которые в свою очередь продуцируются миелопероксидазой, в результате чего происходит реакция НОСl/НОBr с таурином приводящая к образованию таурин хлорамина (TauCl) и таурин бромамина (TauBr) обладающих противовоспалительным эффектом, данная реакция протекает в нейтрофилах.



Таурин хлорамин снижает продукцию провоспалительных медиаторов, таких как простогландины, оксид азота и цитокины. Таурин находится в высоких концентрациях в тканях, подвергшихся воздействию окислителей для ослабления окислительного стресса, так как является эффективным ингибитором генерации активных форм кислорода [12,13].

Известно, что хитозан способен оказывать противовоспалительный эффект, заключающейся в супрессии продукции ФНО- α , ингибировании образования простагландина E_2 и оксида азота в макрофагах [14]. Аллантаин, в свою очередь, так же способствует снижению воспаления, что находит отражение в уменьшении воспалительных клеток [15]. Указанные сведения дают основание полагать, что создание комбинации хитозана с таурином и аллантаином может приводить к уси-

лению противовоспалительного действия геля. На основании полученных данных было установлено, что предварительное нанесение геля хитозанового с таурином и аллантаином оказывает комплексный эффект, обусловленный главным образом действием таурина, что проявляется в способности уменьшать отек конечности через 180 минут на 16.6 % относительно контрольной группы, данный эффект уступает по силе препарату сравнения гелю «Вольтарен эмульгель» на 4.6 %, но превосходит гель «Солкосерил» и мазь «Левомеколь». Таким образом, гель на основе хитозана с таурином и аллантаином обладает умеренным противовоспалительным действием, что предположительно связано в определенной степени с его влиянием на проницаемость капилляров.

ВЫВОДЫ

1. Предварительное нанесение геля ХТА приводит к уменьшению отека конечности, вызванного введением формалина через 180 минут на 16.6 % ($p < 0.05$), что свидетельствует о наличии умеренного противовоспалительного действия, которое незначительно уступает по действию препарату сравнения гелю «Вольтарен эмульгель», но превосходит гель «Солкосерил» и мазь «Левомеколь»

2. Нанесение геля ХТА ведёт к достоверному уменьшению проницаемости капилляров, в тесте выхода трипанового синего в место воспаления в среднем на 41.1 % ($p < 0.05$) относительно контроля, сравнимое с гелем «Троксевазин», что характеризует капилляропротекторное действие изучаемого геля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Казайшвили Ю.Г. Исследование противовоспалительной активности новых производных тиадиазола при формалиновом отеке лапы у крыс / Ю.Г. Казайшвили, Н.С. Попов // Современные проблемы науки и образования. — 2013. — № 3. — URL: www.science-education.ru/ru/article/view?id=9598 (дата обращения: 11.01.2016).
2. Меркулов С.А. Лекарственно-индуцированные поражения печени у больных туберкулезом легких: оптимизация лечения и профилактики : дис. ... канд. мед. наук / С.А. Меркулов ; Волгоградский гос. мед. университет. — Волгоград, 2014. — 196 с.
3. Генетика окислительного стресса / Е.П. Гуськов [и др.]. — Ростов н/Д : Изд-во СКНЦВШ ЮФУ, 2009. — 156 с.

4. Изучение ранозаживляющего действия геля на основе хитозана с таурином и аллантоином / П.А Федосов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 4. — URL: www.science-education.ru/127-21247 (дата обращения: 11.01.2016).
5. Обоснование выбора компонентов и их совместимости для разработки ранозаживляющего геля на основе хитозана / П.А Федосов [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. — 2015. — №9 (40), Часть 4. — С. 83-85.
6. Решение о выдаче патента РФ на изобретение от 01.02.2016 по заявке № 2015115144. Состав ранозаживляющего геля (хитозан, таурин, аллантоин) / В.Ф. Тупикин, А.И. Сливкин, С.И. Провоторова, П.А. Федосов, А.С. Беленова, М.А. Веретенникова; заявитель и патентообладатель ЗАО Воронежский инновационно-технологический центр, заявл. 23.04.2015.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. / под ред. А.Н. Миронова. — М. : Гриф и К, 2012. — 944 с.
8. Экспериментальная фармакология – принципы, модели, анализ / А.В. Бузлама [и др.]. – Воронеж : ИПЦ ВГУ, 2013. — 363 с.
9. Изучение капилляроукрепляющего действия геля с экстрактом лабазника вязолистного / И.В. Жилина [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина, Фармация. — 2010. — № 22 (93). — Вып. 12/2. — С. 29-31.
10. Плотников М.Б. Лекарственные препараты на основе диквертина / М.Б. Плотников, Н.А. Тюкавкина, Т.М. Плотникова. — Томск : Изд-во Том. ун-та, 2005. — 228 с.
11. Европейская конвенция «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». — 1986. — URL: https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDC_TMCContent?documentId=090000168007аба8 (дата обращения: 11.01.2016).
12. Marcinkiewicz J. Taurine and inflammatory diseases / J. Marcinkiewicz, E. Kontny // Amino Acids. — 2014. — Vol. 46, № 1. — P. 7-20.
13. A molecular mechanism for the anti-inflammatory effect of taurine-conjugated 5-aminosalicylic acid in inflamed colon / H. Kim [et al.] // Mol Pharmacol. — 2006. — Vol. 69, № 4. — P. 1405-1412.
14. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells / E.J. Yang [et al.] // Central European Journal of Biology. — 2010. — Vol. 5, № 1. — P. 95-102.
15. Profile of wound healing process induced by allantoin / L.U. Araujo [et al.] // Acta Cir. Bras. — 2010. — Vol.25, № 5. — P. 460-466.

*Воронежский государственный университет
Федосов П. А., аспирант кафедры фармакологии
E-mail: fedosov91@gmail.com*

*Николаевский В. А., д.мед.н., профессор кафедры фармакологии
Тел.: (473) 2530380
E-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru*

*Сливкин А. И., д.фармацевт.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии
Тел.: (473) 2731-895
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Бузлама А. В., д.мед.н., доцент, зав. кафедрой фармакологии фармацевтического факультета
Тел.: (473) 2530380
E-mail: buzlamaa@yandex.ru*

*Voronezh State University
Fedosov P. A., post-graduate student, department of pharmacology
E-mail: fedosov91@gmail.Com*

*Nikolaevsky V. A., doctor of medicine, professor of the department of pharmacology
Ph.: (473) 2530380
E-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru*

*Slivkin A. I., doctor of pharm. sciences, professor, manager faculty of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology
Ph.: (473) 2731-895
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Buzlama A. V., doctor of medicine, associate professor, head of the department of pharmacology
Ph.: (473) 2530380
E-mail: buzlamaa@yandex.ru*