

К ВОПРОСУ О ФАРМАКОКИНЕТИКЕ “ЭССЕНЦИАЛЕ Н”

Д. Д. Мориков², В. И. Горбачев¹, В. В. Дворниченко²,
В. А. Семибратова³, С. А. Михайлов³

В работе представлены данные исследования по изучению оптимизации времени экспозиции гепатопротектора “Эссенциале Н” с клетками эритроцитарно-лейкоцитарной взвеси. Исследование проводили с кровью здоровых доноров (*in vitro*) по методике ультрафиолетовой абсорбционной спектроскопии, которая позволяет определить распределение препарата в крови при различных временных экспозициях. Установлено, что оптимальная экспозиция “Эссенциале Н” с эритроцитарно-лейкоцитарной взвесью составляет 10 мин. Именно в этот период отмечается минимальная концентрация препарата в супернатанте, свидетельствующая о максимальном насыщении препаратом клеточного состава при данной временной экспозиции, а степень гемолиза не превышает физиологическую норму.

Ключевые слова: эссенциальные фосфолипиды, спектр поглощения, гемолиз, ультрафиолетовая абсорбционная спектроскопия

ВВЕДЕНИЕ

“Эссенциале Н” (“Sanofi-Aventis”) — препарат, оказывающий гепатопротекторное, гиполипидемическое и гипогликемическое действие. Регулирует проницаемость биомембран, активность мембраносвязанных ферментов, обеспечивая физиологическую норму процессов фосфорилирования в клеточном метаболизме. Восстанавливает мембраны гепатоцитов путем структурной регенерации и посредством конкурентного ингибирования перекисных процессов. Ненасыщенные жирные кислоты, встраиваясь в биомембраны, принимают на себя токсикогенные воздействия вместо мембранных липидов печени, нормализуют функцию печени, повышают ее дезинтоксикационную роль [5, 6].

В литературных источниках и инструкции к препарату описаны рекомендации по введению парентеральной формы препарата с аутокровью [6], однако конкретных указаний на время его экспозиции в этом составе не имеется. Кроме того, нами не найдено данных об отрицательных эффектах создаваемой композиции. Именно это инициировало проведение настоящей работы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили с кровью здоровых доноров (*in vitro*) по описанной ниже методике. У исследуемого производили эксфузию 450 мл крови, после чего ее центрифугировали в рефрижераторной центрифуге Мультифуга-4 в течение 15 мин при скорости 2000 оборотов в минуту. После разделения крови на компоненты нативная плазма возвращалась исследуемому. Исследование про-

водили при временной экспозиции: 0, 10, 20, 30, 60 мин. К эритроцитарно-лейкоцитарной взвеси добавляли “Эссенциале Н” в объеме 5 мл. Полученную смесь помещали в термостат при температуре 37 °С, после чего взвесь отмывали центрифугированием при помощи физиологического раствора в режимах, указанных ранее. Исследования супернатанта и “Эссенциале Н” включали запись спектров поглощения (зависимость коэффициента поглощения от длины волны) в ультрафиолетовой спектральной области и компьютерное преобразование полученных спектров в энергетическую шкалу с последующим математическим анализом контуров полос [4]. УФ спектральная область была выбрана в связи с тем что белковые фракции супернатанта и фосфолипиды “Эссенциале Н” в этом диапазоне имеют интенсивные электронные переходы, включающие и колебательно-вращательные.

Коэффициент поглощения k [см⁻¹] определялся по формуле Бугера — Ламберта — Бэра:

$$I = I_0 e^{-kl},$$

где I_0 — падающая интенсивность излучения с длиной волны λ на измеряемый образец (кювету с жидкостью), I — интенсивность излучения с этой же длиной волны на выходе из образца, $e = 2,71828\dots$ — натуральное число, l — оптическая длина пути (толщина слоя) [2].

Так как коэффициент поглощения эссенциале в ультрафиолетовой области находится в пределах от 0,2 см⁻¹ до 12000 см⁻¹, то для записи длинноволновой УФ компоненты спектра поглощения (далее просто спектр) приходилось разводить “Эссенциале Н” дистиллированной водой. Разведенный “Эссенциале Н” помещали в кварцевую кювету толщиной 1 см и пропускали через него УФ монохроматизированное излучение от дейтериево-дуговой лампы ДДС-30 (190 – 360 нм). Использовался монохроматор МДР-12. Запись спектра поглощения “Эссенциале Н” разделяли на две части. Первую часть спектра — коротковолновая область (190 – 240 нм) с высоким коэффициентом поглощения — регистрировали обычно в разведении 1:10000. Вторую часть спектра — длинноволно-

¹ Кафедра анестезиологии и реаниматологии (зав. — проф. В. И. Горбачев) Иркутского государственного института усовершенствования врачей, 664079, Иркутск, м/р Юбилейный, 100.

² Иркутский областной онкологический диспансер, 664031, Иркутск, ул. Фрунзе, 32.

³ Кафедра экспериментальной физики (зав. — проф. Е. А. Раджабов) Иркутского государственного университета, 664003, Иркутск, ул. Карла Маркса, 1.

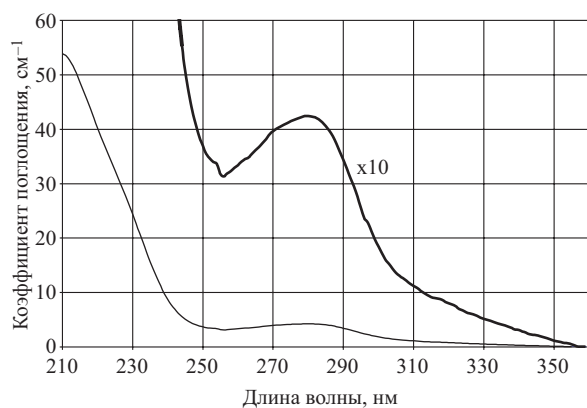


Рис. 1. Спектр поглощения супернатанта.

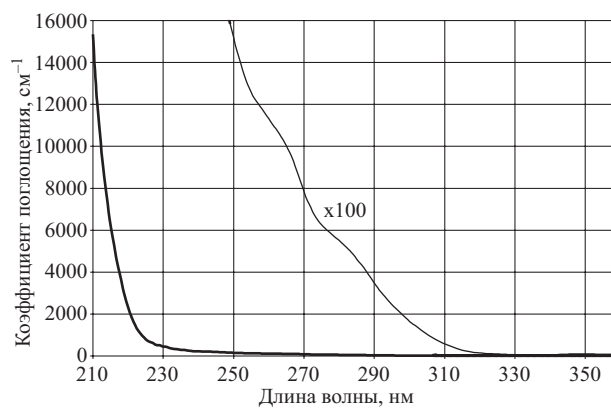


Рис. 2. Спектр поглощения “Эссенциале Н”.

вая область (241 – 360 нм) с более низким коэффициентом поглощения — регистрировали в разведении 1:200 [1]. Это было сделано для более качественной записи спектра поглощения “Эссенциале Н”, имеющего большой динамический диапазон. После получения результатов каждую часть спектра умножали на величину разведения.

В ходе исследования были отмечены признаки гемолиза. Для выявления времени наступления гемолиза выполнен анализ процентного содержания внеэритроцитарного гемоглобина относительно уровня гемоглобина в цельной крови [3]. Использовали те же временные интервалы, что и при УФ-спектроскопии.

При исследовании степени гемолиза в качестве контроля использовали водный раствор гемоглобина трижды отмытых в физиологическом растворе эритроцитов. Степень гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\text{ИДсЭ} = \frac{\text{ВЭГ}}{\text{Нб}} \cdot 100,$$

где ИДсЭ (%) — индекс деструкции эритроцитов, ВЭГ (г/л) — уровень внеэритроцитарного гемоглобина, Нб (г/л) — концентрация гемоглобина в крови.

Пробу взвеси для исследования уровня гемоглобина, используемого в приведенной формуле, забирали из “гемокона” с эритроцитарной массой после добавления 100 мл физиологического раствора и изучали обычным методом.

Расчеты площадей под пиками производили с использованием программного пакета Origin 8 модуль Spectroscopy.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica for Windows v. 6.0. При статистической обработке данных для каждой выборки проверяли гипотезу о нормальности распределения. Анализ проводили непараметрическими статистическими методами. Данные представляли в виде медианы с верхним и нижним квартилями (25-й и 75-й процентиля). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании надосадочной жидкости, не содержащей Эссенциале, спектр поглощения имеет две полосы поглощения (их максимумы находятся на длинах волн < 210 нм и 282 нм), рис. 1.

Вследствие поглощения воды на длинах волн короче 210 нм можно записать только длинноволновый склон первой полосы; он имеет экспоненциальный спад в энергетических координатах. Моделирование ожидаемого экспоненциального спада и его вычитание из спектра поглощения позволяет выделить две дополнительные полосы. Максимум второй полосы приходится на длину волны 282 нм (35461 см^{-1}) и составляет $k_{\text{max}} = 3,52 \text{ см}^{-1}$.

Спектр поглощения “Эссенциале Н” имеет пять полос с их максимумом на следующих длинах волн: < 200 нм, 247, 260, 285, 351 нм.

Вследствие поглощения воды на длинах волн короче 210 нм записывается только длинноволновый склон первой полосы, который имеет экспоненциальный спад в энергетических координатах. Максимум второй полосы приходится на длину волны 247 нм (40486 см^{-1}), k_{max} которой равен $79,65 \text{ см}^{-1}$. На третьей полосе с максимумом 260 нм (38462 см^{-1}) k_{max} составляет $79,10 \text{ см}^{-1}$, k_{max} четвертой полосы на длине волны 285 нм (35088 см^{-1}) равен $39,95 \text{ см}^{-1}$. Максимум пятой полосы находится на длине волны 351 нм (28490 см^{-1}) и k_{max} составляет $0,79 \text{ см}^{-1}$. На длинах волн больше 350 нм поглощение не учитывалось в связи с их незначительностью (рис. 2).

При исследовании надосадочной жидкости, содержащей “Эссенциале Н”, спектр поглощения имеет три полосы для разных времен экспозиции (их максимумы находятся на длинах волн 215 – 220 нм, 277 – 282 нм и 332 – 344 нм), табл. 1.

Вследствие поглощения воды на длинах волн короче 210 нм можно записать только длинноволновый склон первой полосы, имеющий экспоненциальный спад в энергетических координатах. Моделирование ожидаемого экспоненциального спада и его вычитание из спектра поглощения позволяет также выделить две дополнительные полосы. Максимум второй полосы приходится на 279,5 нм (35778 см^{-1}) и составляет k_{max} — от 5,8 до $186,24 \text{ см}^{-1}$. Максимум третьей полосы приходится на

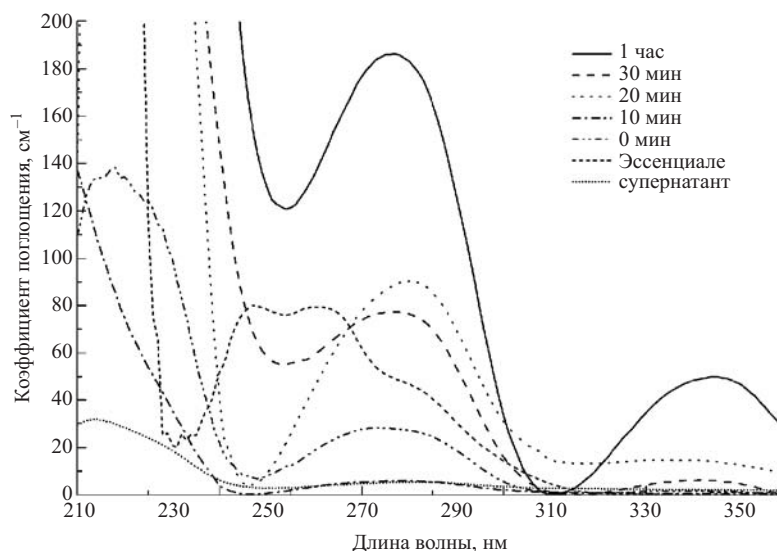


Рис. 3. Спектр поглощения супернатанта и эссенциале в различных временных отрезках экспозиции.

338 нм (29586 см^{-1}) и составляет k_{\max} — от 1,43 до $49,93 \text{ см}^{-1}$. На длинах волн больше 345 нм поглощение несущественно.

Для более точного описания спектра поглощения его пришлось анализировать в энергетической шкале, выраженной в [эВ] или в волновых числах ν [см^{-1}] по формуле $\nu = 1/\lambda$, где длина волны выражена в сантиметрах. Перевод спектра поглощения супернатанта осуществляется в диапазоне от 210 нм, что соответствует волновому числу, равному 48000 см^{-1} , до 360 нм ($\nu = 28000 \text{ см}^{-1}$), рис. 3.

Числовые данные площадей под пиком кривой, рассчитанные с помощью программы Origin 8 модуль Spectroscopy и демонстрирующие концентрацию препарата в супернатанте представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2 площадь под пиком (концентрация) при экспозиции “Эссенциале Н” в течение 10 мин составляет $216,1 \text{ см}^{-2}$ и приближается к показателям чистого супернатанта, что говорит о факте максимального связывания препарата с клетками крови в данный интервал времени.

Необходимо отметить, что при выполнении данного исследования нами был выявлен факт появления гемолиза при связывании изучаемого препарата с клетками крови.

Для изучения этого была проведена оценка индекса деструкции эритроцитов, уровня внеэритроцитарного гемоглобина и концентрации гемоглобина в крови.

При исследовании степени гемолиза выявлено, что при экспозиции препарата с эритроцитарной взвесью менее 10 мин ИДсЭ составляет $0,27 (0,26 - 0,27) \text{ г/л}$ и не превышает физиологическую норму. Уровень ИДсЭ при дальнейшей экспозиции в течение 20 мин увеличивается и достигает $1,84 (1,81 - 1,85) \text{ г/л}$, превышая физиологическую норму. В дальнейшем рост гемолиза происходит неравномерно (табл. 3).

Полученные результаты показывают, что минимальная концентрация препарата в супернатанте, следовательно и степень связывания “Эссенциале Н” с клетками крови, является максимальной при экспозиции “Эссенциале Н” с эритроцитарно-лейкоцитарной взвесью в течение 10 мин.

Исследование процентного содержания внеэритроцитарного гемоглобина относительно уровня гемоглобина в цельной крови доказывает, что степень гемолиза при 10-минутной экспозиции препарата достоверно не превышает физиологическую норму. При дальнейшей экспозиции препарата с клетками крови происходит увеличение степени гемолиза, говорящее о невозможности применения композиции препарата с цельной кровью при превышении данной временной экспозиции. В дальнейшем ИДсЭ и концентрация препарата увеличивается непропорционально, что, вероятно, обусловлено конкурентным встраиванием ненасыщенных жирных кислот в биомембрану эритроцитов [5].

Таблица 1. Полосы поглощения смеси супернатанта и “Эссенциале Н”

Время экспозиции, мин	215 – 220 нм (45977 см^{-1})		277 – 282 нм (35778 см^{-1})		332 – 344 нм (29586 см^{-1})	
	$k_{\max}, \text{ см}^{-1}$	$\lambda, \text{ нм}$	$k_{\max}, \text{ см}^{-1}$	$\lambda, \text{ нм}$	$k_{\max}, \text{ см}^{-1}$	$\lambda, \text{ нм}$
60	1209,63	216	186,24	277	49,93	344
30		< 210	77,21	277	6,25	342
20	544,16	220	80,16	280	4,78	332
10		< 210	5,8	279		
Без экспозиции	138,21	218	27,91	282	1,43	340

Таблица 2. Площади под пиком смеси супернатанта и “Эссенциале Н” при различных временных отрезках экспозиции

Время экспозиции	Площадь под пиком (концентрация), см ⁻²	Начало пика, нм	Конец пика, нм	Центр пика, нм	Максимум пика, см ⁻¹
1 час	6301,3	257	309	277	186,25
30 мин	1906,5	253	281	277	77,26
20 мин	3155,3	255	307	280	90,16
10 мин	216,1	255	307	279	5,97
0 мин	1010,8	246	297	273	28,21
“Эссенциале Н”	800,1	240	251	247	79,95
Супернатант	161,4	251	287	282	5,52

Таблица 3. Уровень количественных показателей периферической красной крови у больных в различных временных интервалах экспозиции

Показатель	Сроки исследования, мин					
	Физиологическая норма	0	10	20	30	60
Гемоглобин, г/л	201,44 (200,47 – 202,03)	200,69 (199,93 – 201,06)	201,52 (200,98 – 202,53)	194,41 (193,88 – 195,14)	196,35 (195,67 – 196,89)	192,34 (191,92 – 192,85)
ВЭГ, г/л	0,47 (0,46 – 0,48)	0,43 (0,43 – 0,43)	0,54 (0,53 – 0,55)	3,56 (3,53 – 3,59)**	2,12 (2,11 – 2,14)*	5,58 (5,55 – 5,68)**
ИДсЭ, %	0,23 (0,23 – 0,24)	0,22 (0,21 – 0,22)	0,27 (0,26 – 0,27)	1,84 (1,81 – 1,85)**	1,08 (1,07 – 1,09)*	2,90 (2,87 – 2,94)**

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по сравнению с физиологической нормой.

ВЫВОДЫ

1. Наличие оригинального спектра поглощения у “Эссенциале Н” позволяет при исследованиях препарата использовать методику ультрафиолетовой абсорбционной спектроскопии.

2. Оптимальная экспозиция “Эссенциале Н” с эритроцитарно-лейкоцитарной взвесью составляет 10 мин.

3. Степень гемолиза при экспозиции препарата в течение 10 мин не превышает физиологическую норму.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Гиллем, *Электронные спектры поглощения органических веществ*, Наука, Москва (1957).

- Л. И. Карнаухова, *Ультрафиолетовая спектроскопия*, Саратов: СГУ (1994).
- И. А. Шперлинг, В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева и др., *Сибирский мед. журн.*, **21**(1), 28 – 30 (2006).
- Е. Д. Югдурова, Г. Г. Николаева, Л. А. Нагаслаева и др., *Методика УФ-спектрофотометрия в количественном определении суммы флавоноидов в чае “Байкальский-6”*, *Сибирский мед. журн.*, **45**(4), 71 – 74 (2004).
- Г. Л. Вышковский, *Энциклопедия лекарств*, (Серия РЕГИСТР ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РОССИИ) М., № 12, 1037 – 1038 (2004).
- А. Т. Бурбелло, А. В. Шабров, П. П. Денисенко, *Современные лекарственные средства*, Нева, Санкт-Петербург (2006).

Поступила 25.02.09

STUDYING THE PHARMACOKINETICS OF ESSENTIALE N

D. D. Morikov¹, V. I. Gorbachev², V. V. Dvornichenko¹, V. A. Semibratova³, and S. A. Mikhailov³

¹ Irkutsk Regional Oncologic Hospital, Irkutsk, 664031, Russia

² Irkutsk State Institute of Post-Graduate Medical Training, Irkutsk, 664079, Russia

³ Irkutsk State University, Irkutsk, Russia 664003

The optimum time of exposure of the Essentiale N hepatoprotector with an erythrocyte – leukocyte suspension has been determined *in vitro* using the blood of healthy donors. Variation of the drug distribution in the blood depending on the exposure time was studied by the method of UV absorption spectroscopy. It is established that the optimum exposure of Essentiale N with an erythrocyte – leukocyte suspension is about 10 min. This corresponds to a minimum concentration of Essentiale N in the supernatant phase, which is evidence for the maximum saturation of the cell composition by the preparation. At the same time, the degree of hemolysis does not exceed the normal physiological level.

Key words: Essential phospholipids, hemolysis, optical absorption spectrum, ultraviolet absorption spectroscopy