

В. И. Горбачев<sup>1</sup>Д. Д. Мориков<sup>2</sup>В. Н. Ковалистова<sup>2</sup>В. А. Семибратова<sup>3</sup><sup>1</sup>Иркутский государственный институт усовершенствования врачей<sup>2</sup>Иркутский областной онкологический диспансер<sup>3</sup>Иркутский государственный университет

## О фармакокинетике «Эссенциале Н»

В работе представлены данные исследования по фармакокинетике гепатопротектора «Эссенциале Н». Установлено, что оптимальная экспозиция «Эссенциале Н» с эритроцитарно-лейкоцитарной взвесью составляет 10 мин. Именно в этот временной период отмечается минимальная концентрация препарата в супернатанте, говорящая о максимальном насыщении препаратом клеток при данной временной экспозиции, а степень гемолиза не превышает физиологическую норму.

### Введение

Наиболее известным представителем лекарственных препаратов эссенциальных фосфолипидов является препарат «Эссенциале Н». Препарат оказывает гепатопротекторное, гиполлипдемическое и гипогликемическое действие. Он регулирует проницаемость биомембран, активность мембраносвязанных ферментов и восстанавливает мембраны гепатоцитов. В литературных источниках и инструкции к препарату описаны рекомендации по введению парентеральной формы данного препарата с аутокровью, однако конкретных указаний на время его экспозиции в этом составе не имеется [1]. Кроме этого, нами не найдено данных и об отрицательных эффектах создаваемой композиции. Именно это и инициировало проведение настоящей исследовательской работы.

### Материалы и методы

Исследование проводили с кровью здоровых доноров (*in vitro*): 450 мл крови центрифугировалось в течение 15 мин при скорости 2000 об/мин. После разделения крови на компоненты нативная плазма возвращалась исследуемому. Исследование проводили при временной экспозиции 0, 10, 20, 30, 60 мин. К эритроцитарно-лейкоцитарной взвеси добавляли 5 мл «Эссенциале Н». Полученную смесь помещали в термостат (37°C), затем отмывали раствором хлорида натрия 9 г/л и центрифугированием (15 мин, 2000 об/мин).

Для изучения эффективности связывания «Эссенциале Н» с клетками крови и определения оптимальной концентрации препарата разработана методика на основе прецизионных измерений и последующего компьютерного анализа спектров поглощения супернатанта и «Эссенциале Н» в УФ-области (210–360 нм) [2,3].

В ходе исследования были отмечены признаки гемолиза. Для выявления времени наступления гемолиза выполнен анализ

процентного содержания внеэритроцитарного гемоглобина относительно уровня гемоглобина в цельной крови [4]. Использовали те же временные интервалы, что и при УФ-спектроскопии.

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

$$\text{ИДсЭ} = \frac{\text{ВЭГ}}{\text{Hb}} \times 100,$$

где ИДсЭ — индекс деструкции эритроцитов, %; ВЭГ — уровень внеэритроцитарного гемоглобина, г/л; Hb — концентрация гемоглобина в крови, г/л.

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 обсуждение

Белковые фракции супернатанта и фосфолипиды «Эссенциале Н» в УФ-диапазоне имеют интенсивные электронные переходы, включающие и колебательно-вращательные. На рис. 1 представлен характерный спектр поглощения супернатанта и супернатанта, содержащего «Эссенциале Н», при разном времени экспозиции в термостате.

При использовании компьютерного анализа для математической обработки спектров поглощения в УФ-области были выявлены следующие особенности. Спектр поглощения «Эссенциале Н» имеет характерные полосы, максимумы которых приходятся на длины волн: < 200 нм, 247 нм ( $k_{max} = 79,65 \text{ см}^{-1}$ ), 260 нм ( $k_{max} = 79,10 \text{ см}^{-1}$ ), 285 нм ( $k_{max} = 39,95 \text{ см}^{-1}$ ) и 351 нм ( $k_{max} = 0,79 \text{ см}^{-1}$ ). Спектр поглощения

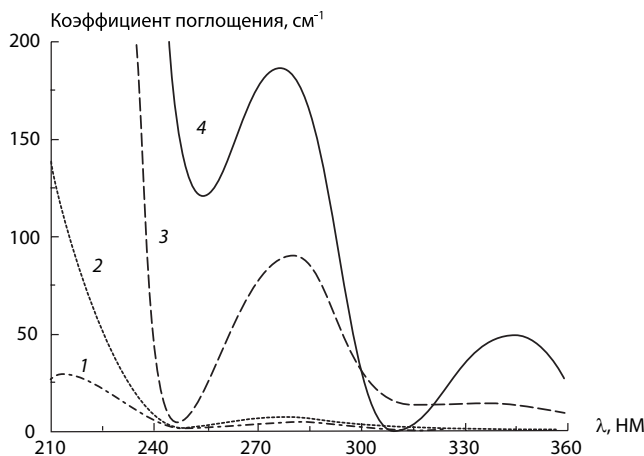


Рис. 1. Спектр поглощения супернатанта (1) и супернатанта, содержащего «Эссенциале Н», при экспозиции в термостате 10 мин (2), 20 мин (3), 60 мин (4)

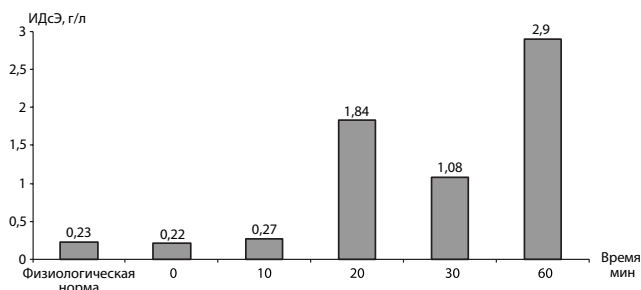


Рис. 2. Уровень индекса деструкции эритроцитов в зависимости от времени экспозиции

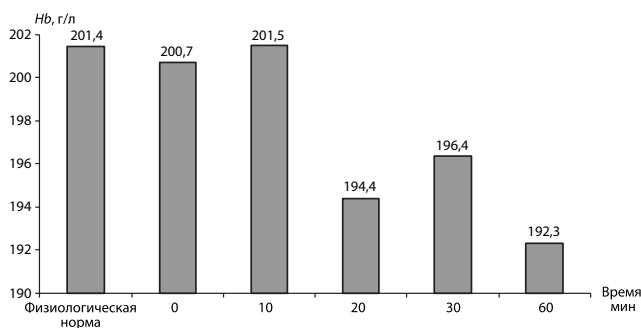


Рис. 3. Уровень гемоглобина крови в зависимости от времени экспозиции

супернатанта имеет характерные полосы в области <210 нм и 282 нм ( $k_{max} = 3,52 \text{ см}^{-1}$ ), которые не перекрываются с полосами поглощения «Эссенциале Н» [1]. Для характеристики эффективности связывания «Эссенциале Н» клетками крови определено относительное увеличение концентрации препарата в супернатанте при разном времени экспозиции смеси в термостате. Уровень «Эссенциале Н» при экспозиции в 60 мин увеличился в 39 раз; при 20 мин — в 19,5 раза; при 10 мин — в 1,3 раза и без экспозиции — в 6,3 раза. Отсюда следует, что минимальная концентрация препарата в надосадочной жидкости и, соответственно, степень связывания «Эссенциале Н» с клетками крови является максимальной при экспозиции в течение 10 мин. Дальнейшее увеличение экспозиции приводит к разрушению клеток крови и осво-

бождению «Эссенциале Н». Это позволяет регистрировать препарат в спектре поглощения супернатанта и определять количественное содержание «Эссенциале Н» [2].

Необходимо отметить, что при выполнении данного исследования нами был выявлен факт появления гемолиза при связывании «Эссенциале Н» с клетками крови.

Для изучения этого была проведена оценка индекса деструкции эритроцитов (ИДсЭ), уровня внеэритроцитарного гемоглобина и концентрация 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) г/л и достоверно не превышает физиологическую норму. Уровень ИДсЭ при экспозиции в течение 20 мин увеличивается и достигает 1,84 (1,81–1,85) г/л, превышая физиологическую норму ( $p < 0,05$ ). В дальнейшем, рост гемолиза происходит неравномерно (рис. 2).

Дополнительно выявлено снижение уровня гемоглобина крови, имеющее прямо пропорциональную зависимость от роста ИДсЭ. При 20-минутной экспозиции отмечается уменьшение показателей гемоглобина до 194,4 (193,9–195,1) г/л (физиологическая норма — 201,4 (200,5–202,0)), рис. 3.

Полученные результаты показывают, что минимальная концентрация препарата в супернатанте, а 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 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 данного временного промежутка. В дальнейшем, ИДсЭ и концентрация препарата увеличиваются непропорционально, что, вероятно, обусловлено конкурентным встраиванием ненасыщенных жирных кислот в биомембраны эритроцитов.

## Выводы

Наличие оригинального спектра поглощения у «Эссенциале Н» позволяет при исследованиях препарата использовать методику ультрафиолетовой абсорбционной спектроскопии.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что оптимальная экспозиция «Эссенциале Н» с эритроцитарно-лейкоцитарной взвесью составляет 10 мин.

Степень гемолиза при экспозиции препарата до 10 мин не превышает физиологическую норму.

## Литература

1. Бурбелло А. Т., Шабров А. В., Денисенко П. П. Современные лекарственные средства. СПб.: Нева, 2006.
2. Гиллем А. Электронные спектры поглощения органических веществ. М.: Наука, 1957.
3. Карнаухова Л. И. Ультрафиолетовая спектроскопия. Саратов: СГУ, 1994.
4. Шерлинг И. А., Новицкий В. В., Рязанцева Н. В. и др. Подход к определению интенсивности внутрисосудистого гемолиза // Сиб. мед. журн. 2006. Т. 21. № 1. С. 28–30.