

В. И. Горбачев¹Д. Д. Мориков²В. Н. Ковалистова²В. А. Семибратова³¹Иркутский государственный институт усовершенствования врачей²Иркутский областной онкологический диспансер³Иркутский 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, гиполлипидемическое 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

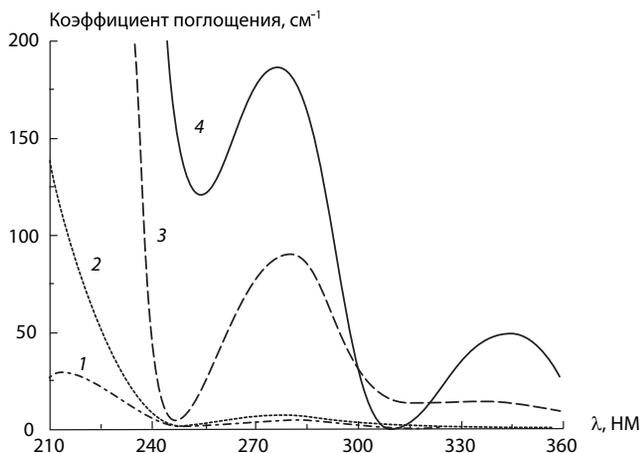


Рис. 1. Спектр поглощения супернатанта (1) и супернатанта, содержащего «Эссенциале Н», при экспозиции в термостате 10 мин (2), 20 мин (3), 60 мин (4)

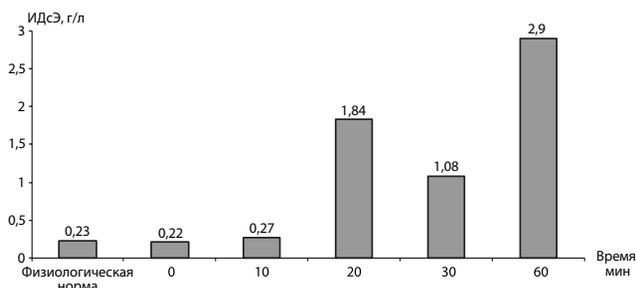


Рис. 2. Уровень индекса деструкции эритроцитов в зависимости от времени экспозиции

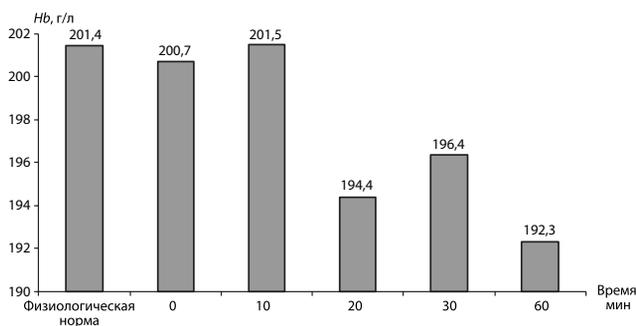


Рис. 3. Уровень гемоглобина крови в зависимости от времени экспозиции

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.