

Е. И. Каленикова^{1*}, Е. А. Городецкая¹, О. Н. Оболенская¹, Н. С. Шаповал¹,
В. Г. Макаров², О. С. Медведев¹

ДИНАМИКА ТКАНЕВЫХ УРОВНЕЙ И РЕДОКС-СТАТУС КОЭНЗИМА Q10 У КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ УБИХИНОЛА

¹ ФГБОУ "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова", Россия, 119991 Москва;

* e-mail: eikaleni@yandex.ru

² ЗАО НПО "ДОМ ФАРМАЦИИ", Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмолловский, 245; e-mail: spbpharm@mail.ru

Оценивали способность убихинола, введенного внутривенно, влиять на содержание и редокс-статус CoQ10 (отношение концентрации убихинола к общей концентрации CoQ10) в тканях крысы. Содержание убихинола и общего пула CoQ10 до и в течение 8 сут после внутривенного введения 1 % водного раствора солиubilизированной субстанции убихинола в дозе 30 мг/кг определяли методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Впервые показано, что, независимо от изменений концентрации CoQ10 в органах в результате внутривенного введения убихинола, редокс-статус в миокарде и головном мозге остается неизменным, а в печени постепенно возрастает. В плазме крови доля убихинола в общем содержании CoQ10 постоянна на протяжении, как минимум, 2 сут после введения и максимальна среди всех изученных тканей. Различия редокс-статуса CoQ10 в плазме и органах свидетельствуют о частичном окислении убихинола при поступлении из крови в органы до уровня их эндогенного тканевого редокс-баланса.

Ключевые слова: коэнзим Q10, убихинол, редокс-статус, миокард, головной мозг.

Коэнзим Q10 (CoQ10) — эндогенное соединение, присутствующее в митохондриях клеток организма в качестве кофактора дыхательной цепи в 2 формах: окисленной (убихинон) и восстановленной (убихинол). Убихинол проявляет антиоксидантные свойства, окисляясь до убихинона в реакциях со свободными радикалами, ограничивая перекисное окисление липидов. Обратное восстановление до убихинола происходит с помощью эндогенных систем регенерации (аскорбата, токоферола) [1–3]. Соотношение окисленной и восстановленной форм CoQ10 *in vivo* рассматривается в качестве биомаркера окислительного стресса [4]. При многих заболеваниях, включающих этот патогенетический фактор, многократно продемонстрирована терапевтическая эффективность убихинона при приеме внутрь [1, 5]. При этом пути введения особенностью CoQ10 является его низкая биодоступность [6, 7]. Внутривенное введение убихинона обеспечивает мгновенный рост плазменных концентраций и максимально быстрое пополнение его тканевых уровней [7, 8], что принципиально важно для коррекции окислительно-восстановительного дисбаланса при острых ишемических состояниях [9, 10].

В последние годы накапливаются результаты, демонстрирующие эффективность применения убихинола как самостоятельного фармакологического препарата для приема внутрь при заболеваниях, сопряженных с окислительным стрессом [11]. Разработка новой лекарственной формы убихинола для внутривенного введения предполагает изучение его фармакокинетики, включая тканевое распределение и окислительно-восстановительный баланс.

Целью работы было определение содержания и редокс-статуса CoQ10 в тканях крысы и оценка способ-

ности убихинола, введенного внутривенно, влиять на эти показатели.

Экспериментальная часть

Исследование проводили на крысах-самцах Wistar массой 300–350 г, полученных из питомника "Столбовая" ФГБУ НЦБМТ ФМБА России, в соответствии с приказом Минздрава России от 01.04.2016 №199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики" и разрешением комитета по биоэтике МГУ им. М. В. Ломоносова. Препарат (1 % водный раствор солиubilизированной субстанции убихинола, патент #RU2635993-C1)) вводили однократно внутривенно в дозе 30 мг/кг. Отбор проб крови осуществляли до и через 0,25, 2, 8, 24, 48, 96 и 192 ч после введения препарата. Образцы тканей потенциальных органов-мишеней (миокарда, головного мозга) и органа-депо для CoQ10 (печени) отбирали до и через 2, 24, 96 и 192 ч после введения препарата, используя по 3–5 животных на каждую временную точку.

Последующие пробоподготовку и хроматографический анализ проводили по валидированной методике [12] непосредственно после получения образцов для предотвращения потерь, связанных с возможным окислением убихинола в процессе заморозки/разморозки и хранения. Плазму крови отделяли центрифугированием, а образцы тканей гомогенизировали в соотношении 1:4 м/В в воде (миокард, печень) или спирте (мозг). Для экстракции аналита из плазмы, гомогенатов миокарда и печени к 100 мкл плазмы/гомогената добавляли 220 мкл этанола и 550 мкл n-гексана; для экстракции из гомогената мозга к 220 мкл спиртового гомогената добавляли 550 мкл n-гексана. Смесь тщательно встряхивали в течение 10 мин, цен-

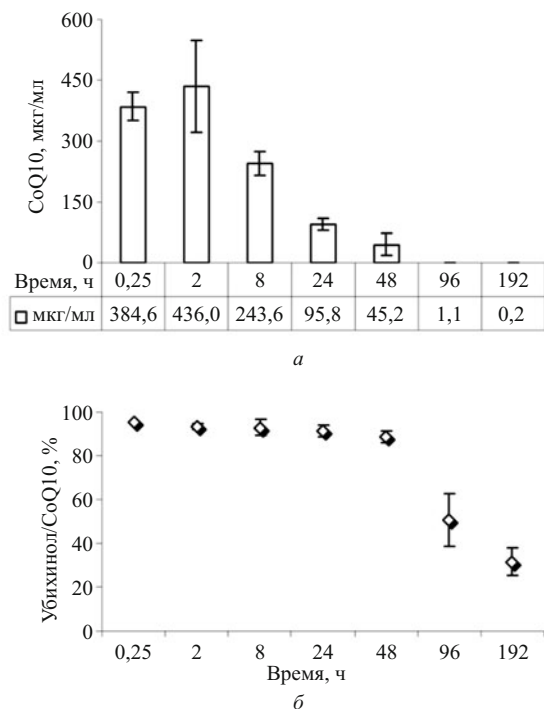


Рис. 1. Концентрация (а) и редокс-статус (б) коэнзима Q10 в плазме крови крысы в различные временные интервалы после внутривенного введения убихинола (30 мг/кг).

трифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин и верхний слой *n*-гексана отбирали в объеме 500 мкл. К остатку добавляли еще 550 мкл *n*-гексана и повторяли процедуру экстракции и отбора экстракта. Объединенный экстракт упаривали досуха и растворяли в этаноле. Количественный анализ CoQ10 в плазме проводили методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием на оборудовании фирмы “Environmental Sciences Associate, Inc.”, (США): насос модели 580 и электрохимический детектор “Coulchem II”, в изократическом режиме на колонке Luna 150 × 4,6 мм с сорбентом C18 (5 мкм) при скорости потока элюента 1,3 мл/мин. Подвижная фаза — 0,3 % NaCl в смеси этанол — метанол — 7 % HClO₄ (970:20:10). Электрохимическое детектирование осуществляли в окислительном режиме с помощью аналитической ячейки (model 5011) при напряжении на первой паре электродов – 50 мВ и + 350 мВ — на второй. Регистрацию и обработку хроматографических данных проводили с помощью компьютерной программы фирмы “Environmental Sciences Associate, Inc.” (США). Экстракт анализировали дважды: до и после полного восстановления до убихинола (с помощью добавления раствора натрия тетрагидробората в этаноле). Уровни убихинола, регистрируемые до восстановления, соответствовали концентрации нативного, неокисленного препарата в плазме крови крысы. Добавление восстановителя переводило окисленную форму в восстановленную и позволяло определить общую концентрацию CoQ10 в плазме. Редокс-статус CoQ10 рассчитывали как отношение концентрации убихинола к общей

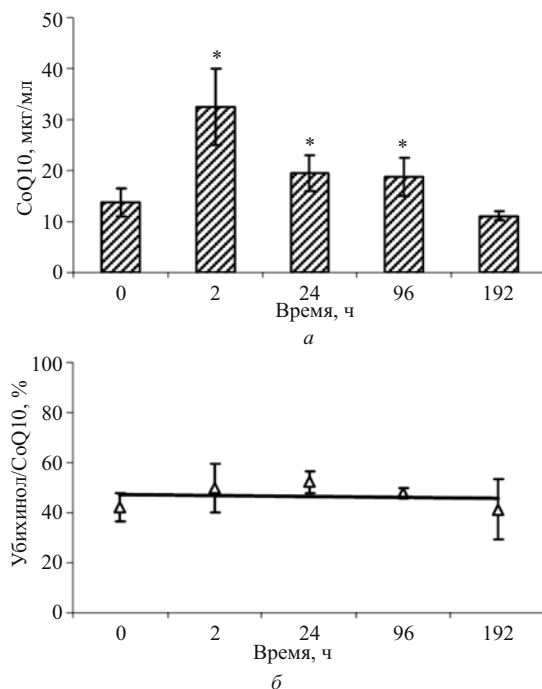


Рис. 2. Тканевые уровни (а) и редокс-статус (б) коэнзима Q10 в миокарде крысы до и в различные временные интервалы после внутривенного введения убихинола (30 мг/кг). Здесь и на рис. 3, 4: приведена линия тренда. * Значимые различия с фоновыми значениями ($p < 0,05$).

концентрации CoQ10 в пробе, выраженное в процентах.

По данным литературы и собственным результатам [12, 13], содержание эндогенного CoQ10 в плазме крови крысы составляет менее 0,1 мкг/мл. Такая концентрация находится за пределами валидированного диапазона методики (нижний предел количественного определения — 0,25 мкг/мл), поэтому количественная оценка исходных концентраций CoQ10 в плазме не проводилась.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы “Statistica for Windows 6.0”. Данные приведены в виде средних значений ± стандартное отклонение. Достоверность отличий определяли с использованием непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Внутривенное введение убихинола приводило к мгновенному повышению уровней CoQ10 в плазме, которые, постепенно снижаясь, оставались повышенными в течение всего периода наблюдения (рис. 1, а). Величина редокс-статуса оставалась практически неизменной в течение первых 48 ч и составляла $(92,2 \pm 1,4)$ % (рис. 1, б), что превышает максимальное из приведенных в литературе значений (таблица). Этот результат мог бы рассматриваться как следствие введения в плазму большого количества восстановленного CoQ10. Однако, как нами было показано ранее, после однократного внутривенного введения

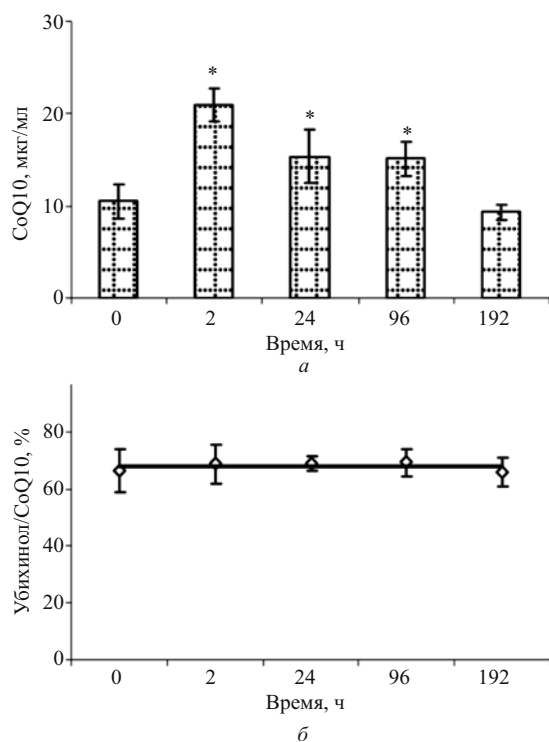


Рис. 3. Тканевые уровни (а) и редокс-статус (б) коэнзима Q10 в мозге крысы до и в различные временные интервалы после внутривенного введения убихинола (30 мг/кг).

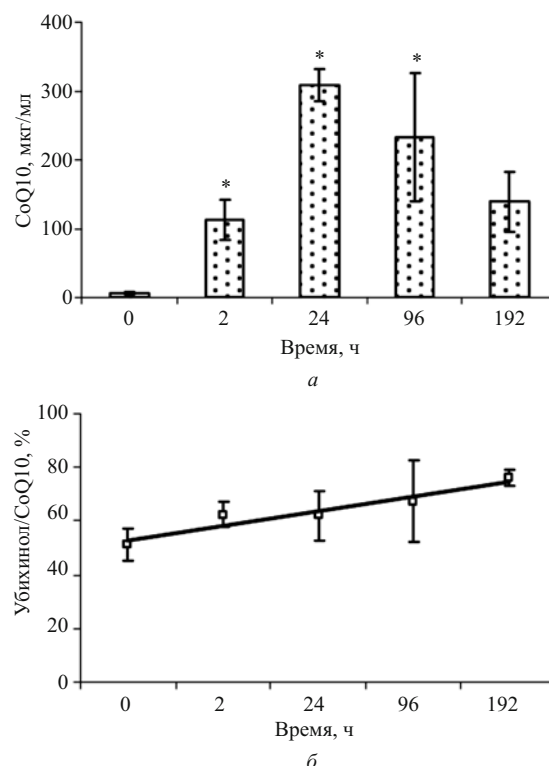


Рис. 4. Тканевые уровни (а) и редокс-статус (б) коэнзима Q10 в печени крысы до и в различные временные интервалы после внутривенного введения убихинола (30 мг/кг).

окисленной формы CoQ10 в крови происходит его постепенное восстановление, и к концу первых суток доля убихинола достигает того же уровня — 89 % [14]. Можно предположить, что этот уровень отражает эндогенный редокс-баланс CoQ10 в плазме крови крысы и близок к этому показателю у человека — 96 – 99 % [4, 15]. В плазме крови человека на протяжении 6 ч были прослежены общая концентрация CoQ10 и уровни убихинола после однократного перорального приема 100 мг убихинона. Выявленное постоянство редокс-статуса CoQ10 на фоне меняющихся абсолютных концентраций позволило авторам сделать вывод о наличии механизмов строгого контроля этого показателя в крови [16].

Через 96 и 192 ч концентрация CoQ10 в плазме снизилась до уровня менее 1 мкг/мл — 0,63 и 0,25 мкг/мл. Доля восстановленной формы CoQ10 в этих образцах оказалась ниже, чем в предыдущих, и составила 50 и 31 %, соответственно. Поскольку в процессе пробоподготовки неизбежно происходит окисление некоторого количества содержащегося в пробе убихинола, то результаты его количественного анализа всегда несколько занижены. Очевидно, что при снижении концентраций CoQ10 вклад этих потерь в результат анализа возрастает. Возможно, это является причиной снижения доли восстановленной формы CoQ10 в образцах плазмы с его минимальным содержанием.

Полученные нами фоновые значения редокс-статуса CoQ10 в тканях крысы до введения убихинола отличаются от немногочисленных данных [6, 17, 18], имеющихся в литературе (табл. 1). По нашим данным,

доля восстановленного CoQ10 в миокарде и головном мозге значительно выше, что может быть обусловлено использованным режимом анализа on-line. В исследовании [19] образцы мозга мышей также не замораживали перед анализом, и редокс-статус CoQ10 (60 %) практически совпал с нашим результатом — $(66,4 \pm 7,6)$ %.

Внутривенное введение убихинола приводило к быстрому увеличению содержания CoQ10 в миокарде, головном мозге и печени. Повышенные тканевые уровни сохранялись в миокарде и головном мозге на протяжении 4 сут и в печени в течение всего периода наблюдения (рис. 2, а, 3, а, 4, а). Оказалось, что в миокарде и головном мозге доля восстановленной формы CoQ10 поддерживалась относительно неизменной на протяжении всего периода наблюдения: до введения убихинола, на фоне повышенных тканевых уровней в первые 96 ч и после возвращения к исходным к концу 8 сут (рис. 2, б, 3, б).

В печени до введения препарата доля восстановленной формы неожиданно оказалась ниже, чем по данным других авторов (таблица). Этот факт не может быть связан с потерями при пробоподготовке, которая проводилась аналогично для всех органов. После введения препарата на протяжении 8 сут доля восстановленной формы постепенно возрастала (рис. 4, б), достигая значений, приводимых в литературе (таблица).

Выяснение причин различной динамики редокс-статуса CoQ10 в печени, миокарде и головном мозге требует дополнительных исследований.

Таким образом, после внутривенного введения убихинола общее содержание CoQ10 в миокарде, головном мозге и печени увеличивается. В плазме крови доля убихинола в общем содержании CoQ10 постоянна на протяжении, как минимум, 2 сут после введения и максимальна среди изученных тканей. Впервые показано, что независимо от общей концентрации CoQ10 доля его восстановленной формы в миокарде и головном мозге остается неизменной, а в печени возрастает. Очевидные различия редокс-статуса CoQ10 в плазме и органах свидетельствуют о частичном окислении убихинола при поступлении из крови в органы до уровня их эндогенного тканевого редокс-баланса, что может отражать включение препарата в локальные окислительно-восстановительные процессы. Полученные результаты доказывают способность убихинола при внутривенном введении быстро и эффективно повышать антиоксидантный резерв тканей, что может найти применение в ургентной терапии ишемических состояний миокарда и головного мозга.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 14-15-00126.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Ayer, P. Macdonald, and R. Stocker, *Annu. Rev. Nutr.*, **35**, 175 – 13 (2015).
2. M. Turunen, J. Olsson, and G. Dallner, *Biochim. Biophys. Acta*, **1660**, 171 – 199 (2004).
3. H. Bhagavan and R. Chopra, *Free Radical Res.*, **40**(5), 445 – 453 (2006).
4. K. Matsuo, K. Kasai, K. Hosoe, and I. Funahashi, *Biomedical. Chromatography*, **30**, 500 – 502 (2016).
5. P. Littarru and L. Tiano, *Nutrition*, **26**(3), 250 – 254 (2010).
6. Y. Zhang, M. Turunen, and E.-L. Appelkvist, *J. Nutr.*, **126**(9), 2089 – 2097 (1996).
7. Е. В. Харитонов, Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. С. Медведев, *Сиб. мед. обозрение*, **84**(6), 26 – 29 (2013).
8. М. А. Белусова, О. Г. Токарева, Е. А. Городetskaya, et al., *J. Cardiovascular. Pharmacol.*, **67**(2), 103 – 109 (2016).
9. S. Hernandez-Resendiz, K. Chinda, O. Bing, et al., *Cur. Med. Chem.*, **25**, 1 – 19 (2018).
10. A. Neuhaus, Y. Couch, G. Hadley, and A. Buchan, *BRAIN*, **140**, 2079 – 2092 (2017).
11. Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **80**(11), 39 – 42 (2017).
12. E. I. Kalenikova, E. A. Gorodetskaya, O. Yu. Kulyak, et al., *Pharm. Chem. J.*, **51**(11), 949 – 953 (2018).
13. W. Ibrahim, H. Bhagavan, R. Chopra, and C. Chow, *J. Nutr.*, **130**(9), 2343 – 2348 (2000).
14. Е. И. Каленикова, Е. В. Харитонов, Е. А. Городецкая и др., *Биомед. химия*, **61**(1), 125 – 131 (2015).
15. M. Miles, P. Horn, J. Morrison, et al., *Clin. Chim. Acta*, **332**(1 – 2), 123 – 132 (2003).
16. D. Mohr, V. Bowry, and R. Stocker, *Biochim. Biophys. Acta*, **1126**, 247 – 254 (1992).
17. T. Takahashi, T. Okamoto, K. Mori, et al., *Lipids*, **28**, 803 – 809 (1993).
18. F. Aberg, E. Appelkvist, G. Dalner, and L. Emster, *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**, 230 – 234 (1992).
19. Y. Tatsuta, K. Kasai, C. Maruyama, C., et al., *Scientific Reports*; doi: 10.1038 / s41598 – 017 – 13257 – 8 (2017).

Поступила 20.04.18

Tissue level dynamics and redox status of coenzyme Q10 after intravenous administration of ubiquinol in rats.

E. I. Kalenikova 1*, E. A. Gorodetskaya 1, O. N. Obolenskaia 1, N. S. Shapoval 1, V. G. Makarov 2, and O. S. Medvedev

The ability of ubiquinol administered intravenously was evaluated to influence the content and redox status of CoQ10 (the ratio of ubiquinol concentration to total CoQ10 concentration) in rat tissues. The content of ubiquinol and the total CoQ10 pool before and for 8 days after intravenous administration of a 1 % aqueous solution of the solubilized substance of ubiquinol at a dose of 30 mg/kg was determined by HPLC with electrochemical detection. First showed that regardless of changes in CoQ10 concentration in organs after intravenous administration of ubiquinol, the redox status in the myocardium and brain remains unchanged, and in the liver gradually increases. In blood plasma, the proportion of ubiquinol in the total CoQ10 content is constant for at least 2 days after administration and is maximal among the tissues studied. Differences in the redox status of CoQ10 in plasma and organs indicate a partial oxidation of ubiquinol on admission from the blood to the organs to the level of their endogenous tissue redox balance.

Key words: coenzyme Q10; ubiquinol; redox status; myocardium; brain.