

Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова
Факультет фундаментальной медицины

На правах рукописи

Харитоновна Екатерина Викторовна

**БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ФАРМАКОКИНЕТИКА
УБИДЕКАРЕНОНА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор О.С. Медведев

Доктор фармацевтических наук, доцент Е.И. Каленикова

Москва – 2014

СОКРАЩЕНИЯ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В ТЕКСТЕ:

Коэнзим Q₁₀ (CoQ₁₀) – 2-[-(all-E)-3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-Decamethyltetraconta-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-decaenyl]-5,6,-dimethoxy-3-methylbenzene-1,4-dion.

Убидекаренон – фармацевтическая субстанция коэнзима Q₁₀

Убихинон – окисленная форма CoQ₁₀ – убидекаренон

Убихинол (CoQ₁₀H₂) – восстановленная форма CoQ₁₀, убидекаренона

TCoQ₁₀ – общий пул в биологическом материале (убихинон + убихинол)

БАД – биологически активная добавка

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-ЭХ – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием

ВЭЖХ-СФ – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

Кудесан – препарат Кудесан[®] капли для приема внутрь 3%

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
История открытия коэнзима Q.....	13
Биосинтез коэнзима Q.....	14
Функции коэнзима Q.....	16
Физико-химические свойства коэнзима Q.....	20
Аналитические методы определения коэнзима Q₁₀	21
Анализ CoQ ₁₀ методом ВЭЖХ.....	21
Анализ CoQ ₁₀ методом капиллярного электрофореза.....	23
Анализ CoQ ₁₀ методом вольтамперометрии.....	24
Анализ CoQ ₁₀ методом полярографии.....	24
Пробоподготовка и экстракция CoQ₁₀.....	25
Фармакокинетика убидекаренона.....	26
Абсорбция и транспорт.....	26
Эндогенные уровни CoQ ₁₀	31
Захват убидекаренона тканями.....	33
Метаболизм убидекаренона.....	33
Фармакокинетические параметры убидекаренона.....	34
Применение убидекаренона в клинической практике.....	40
Побочные эффекты убидекаренона	50
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 1. Материалы и методы.....	53
Реагенты.....	53
Оборудование.....	53
Объекты исследования.....	53
Получение УФ-спектра убидекаренона.....	54
Получение УФ-спектра CoQ ₁₀ H ₂	54
Приготовление стандартных растворов.....	54
Приготовление модельных смесей стандартных разведений убидекаренона (TCoQ ₁₀) с плазмой крови крыс.....	55

Пробоподготовка тканей органов крыс.....	57
Гомогенизация биоматериала.....	57
Экстракция.....	58
Методика ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием.....	58
Методика ВЭЖХ с электрохимическим детектированием.....	59
Валидация методик ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ ($\lambda_{\text{max}}=275$ нм).....	60
Фармакокинетические исследования убидекаренона.....	62
Введение per os.....	62
Внутривенное введение.....	63
Внутримышечное введение.....	64
Расчет фармакокинетических параметров, абсолютной и относительной биодоступности при различных путях введения.....	65
Методики определения CoQ_{10} в клинических исследованиях.....	66
 ГЛАВА 2. Разработка и сравнительный анализ методик определения убидекаренона в субстанции и плазме крови, в окисленной и восстановленной формах, с помощью ВЭЖХ со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием.....	
2.1 Сравнительный анализ методик определения убидекаренона в субстанции методом ВЭЖХ-СФ при $\lambda=275$ нм и 290 нм	68
2.2 Разработка методики ВЭЖХ-СФ при $\lambda=290$ нм для убихинола и методики ВЭЖХ-СФ с переключением λ детектора с 290 на 275 нм для определения убихинона и убихинола в одной пробе.....	71
2.3 Сопоставление методик ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ для определения убидекаренона в модельных смесях с плазмой крови.....	76
 ГЛАВА 3. Оптимизация методик пробоподготовки и определения убихинона и убихинола в биоматериале.....	
3.1 ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ определение убихинона и убихинола в плазме крови крыс	79
3.2 ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ определение убихинона и убихинола в плазме крови человека: селективность и преимущества.....	82

3.3	Разработка режимов гомогенизации биоматериала с помощью ультразвукового гомогенизатора.....	86
3.4	Выбор метода детектирования CoQ ₁₀ в экстрактах биоматериала.....	92
3.5	Валидация методик ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ для количественного определения убидекаренона.....	94
 ГЛАВА 4. Изучение фармакокинетики убидекаренона при различных путях введения.....		
4.1	Фармакокинетика убидекаренона в таблетках.....	100
4.2	Фармакокинетика убидекаренона, распределение по органам и окислительно- восстановительный статус при внутривенном введении препарата Кудесан....	108
4.3	Фармакокинетика убидекаренона и распределение по органам при внутримышечном введении препарата Кудесан.....	119
4.4	Расчет фармакокинетических параметров, абсолютной и относительной биодоступности убидекаренона	125
 ГЛАВА 5. Применение методики определения CoQ₁₀ в клинических исследованиях.....		
5.1	Определение содержания CoQ ₁₀ , как возможного маркера окислительного стресса, в плазме крови и соскобах эндометрия женщин с бесплодием различного генеза.....	129
5.2	Оценка эффективности трехмесячного приема убидекаренона в составе препарата Кудесан при хронической сердечной недостаточности II-III классов по содержанию CoQ ₁₀ в плазме крови и функциональным параметрам пациентов.....	131
III.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
IV.	ВЫВОДЫ.....	134
V.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В последние годы в лечении различных патологических состояний большое значение придается вопросам коррекции метаболической дисфункции как основного патогенетического звена многих заболеваний. В связи с этим важен поиск лекарственных средств, влияющих на обмен веществ с минимальными побочными эффектами. К таким лекарственным веществам можно отнести убидекаренон.

В середине 1960-х в Японии отмечен первый удачный опыт применения убидекаренона в лечении хронической сердечной недостаточности. С тех пор, и особенно в последнее десятилетие, с каждым годом возрастает количество разделов медицины, в которых убидекаренон в дополнение к стандартной терапии улучшает как клинические, так и субъективные показатели самочувствия больных. Влияние убидекаренона применяется при хронической сердечной недостаточности [12, 110], артериальной гипертензии [19], нейродегенеративных [129], онкологических заболеваниях [82], синдроме приобретенного иммунодефицита [63], мышечной дистрофии [87], исследуется его влияние на репродуктивную функцию [211], пародонтоз [189] и др.

Коэнзим Q₁₀ синтезируется самим организмом, а также, подобно витаминам, поступает с пищей. В продуктах содержится в небольших количествах, а собственный синтез начинает снижаться после 25 лет и нарушается при заболеваниях. Убидекаренон как фармацевтический продукт выпускается в основном в виде биологически активных добавок к пище (БАД). Содержащие убидекаренон БАД и единичные лекарственные препараты предназначены для приема внутрь, биодоступность при котором крайне мала (2-4%) [251].

В последнее время множатся доказательства высокой эффективности убидекаренона в ургентной терапии сердечно-сосудистых заболеваний [4, 91, 174, 230]. Очевидно, что в острых патологических ситуациях необходимо применять лекарственные формы, гарантирующие его экстренную доставку в ткани. Быстрое повышение и длительное поддержание высоких уровней убидекаренона в плазме крови и органах могут обеспечить только парентеральные пути введения.

Солюбилизированная форма убидекаренона в препарате Кудесан® капли для приема внутрь 3% (далее по тексту Кудесан) позволяет в эксперименте вводить его не только внутрь, но и внутримышечно и внутривенно. В то же время, его фармакокинетика и распределение по органам при парентеральном введении практически не изучены.

Расширение спектра показаний к применению убидекаренона как терапевтического агента, неуклонный рост количества фармацевтических продуктов в различных лекарственных формах на основе его субстанций определяют актуальность совершенствования аналитических подходов как к оценке их качества, так и к определению в биоматериале для изучения фармакокинетики новых препаратов.

Степень разработанности

С каждым годом увеличивается количество фармацевтических композиций, содержащие различные формы убидекаренона – окисленную, восстановленную. В связи с этим повышается актуальность аналитического обеспечения контроля качества БАД и лекарственных средств на его основе, а также изучения их фармакокинетики для анализа и в процессе разработки новых фармацевтических композиций.

Все существующие на сегодня лекарственные формы убидекаренона предназначены для приема внутрь, который характеризуется низкой биодоступностью, что ограничивает показания к применению целями профиликтики либо использованием в составе комплексной терапии. Расширения показаний к применению убидекаренона можно добиться с увеличением его биодоступности, используя при этом парентеральные пути введения.

Все вышесказанное определило цели и задачи данного исследования.

Цель исследования – разработать новые аналитические и методические подходы для совершенствования фармацевтического и биофармацевтического анализа убидекаренона, а также изучить его фармакокинетику в различных лекарственных формах и при различных путях введения.

Задачи исследования:

1. Разработать методики определения CoQ_{10} в окисленной и восстановленной формах, в субстанции и биоматериале методом ВЭЖХ-СФ.
2. Сравнить анализ убидекаренона в субстанции, плазме крови крысы и человека методами ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ.
3. Определить оптимальные режимы гомогенизации биоматериала с помощью ультразвукового гомогенизатора SONOPLUS mini20 «BANDELIN electronic» для стандартизации процессов пробоподготовки.
4. Провести фармакокинетические исследования с помощью разработанных методик ВЭЖХ (Фармакокинетические исследования лекарственных форм, содержащих убидекаренон, при приеме внутрь, внутримышечно и внутривенно с использованием методики ВЭЖХ).
5. Определить CoQ_{10} методом ВЭЖХ в клинических исследованиях:
 - определить содержания CoQ_{10} в плазме крови и соскобах эндометрия пациенток с бесплодием различного генеза;
 - определить содержания CoQ_{10} в плазме крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью II-III классов до и после 6-ти месяцев ежедневного приема препарата Кудесан и сопоставить со значениями фракции выброса левого желудочка, толерантностью к физической нагрузке.

Научная новизна

Разработаны методики определения убидекаренона в окисленной и восстановленной формах на основе ВЭЖХ-СФ и в сочетании с ВЭЖХ-ЭХ для его анализа в фармацевтических субстанциях, фармацевтических продуктах и биологических образцах. Впервые определено содержание CoQ_{10} в эндометрии матки.

Впервые изучена фармакокинетика убидекаренона после внутривенного и внутримышечного введения раствора солубилизированной субстанции. Прослежена динамика редокс-статуса убидекаренона в крови после внутривенного введения: доказано интенсивное и быстрое образование его восстановленной формы, повышающей антиоксидантный резерв организма. Определена абсолютная и относительная биодоступность убидекаренона при внутримышечном и

пероральном путях введения, изучено распределение в потенциальные органы-мишени – миокард, головной мозг и печень на протяжении 2-х суток. Показана возможность преодоления гематоэнцефалического барьера и повышения уровней в мозге в результате внутривенного введения раствора солюбилизованного убидекаренона.

Практическая значимость результатов исследования

Методики определения CoQ_{10} на основе ВЭЖХ-СФ и в сочетании с ВЭЖХ-ЭХ применимы для его количественного анализа в субстанции, лекарственных препаратах на основе убихинона и убихинола, БАД и биологическом материале.

Результаты фармакокинетических исследований обосновывают перспективность разработки парентеральных лекарственных форм убидекаренона для использования в неотложной терапии острых патологических состояний миокарда и головного мозга.

Методика ВЭЖХ-определения CoQ_{10} в биоматериале использована:

- в Центре планирования семьи и репродукции для изучения состояния системы антиоксидантной защиты (CoQ_{10} , α -токоферол) у женщин с бесплодием различного генеза;
- в многоцентровом клиническом исследовании эффективности шестимесячного приема убидекаренона (препарат Кудесан) пациентами с диагнозом ХСН II-III функциональных классов, организованном ЗАО «Аквион», для определения содержания его в плазме крови пациентов.

Внедрение результатов

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и используются в материалах лекций, семинаров и практических занятий по теме «Фармакокинетика».

Публикации

По материалам диссертации опубликована 20 работ, из них 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Основные положения диссертационной работы нашли отражение в 2-х статьях, опубликованных в рекомендованных ВАК РФ журналах, 1 тезисе статьи в журнале ВАК «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии» 1 статье, опубликованной в журнале научных статей «Здоровье и образование в XXI веке», 1 статье в сборник научных трудов Всероссийской конференции посвященной 95-летию со дня рождения Алексея Ивановича Шретера «От растения к препарату: традиции и современность» и 15 тезисах, опубликованных в материалах российских и международных конференций, зарубежных периодических изданиях.

Методология исследования

Дизайн исследования согласуется с принципами проведения экспериментов на лабораторных животных, а так же разработки и валидации аналитических методов. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики.

Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации. Теоретический анализ обзора литературы подкреплялся экспериментальными лабораторными данными.

Положения, выносимые на защиту

1. Рекомендации по использованию спектрофотометрического и электрохимического детекторов при определении CoQ_{10} в субстанции и биоматериале методом ВЭЖХ.
2. Стандартизованные режимы гомогенизации образцов миокарда, печени и головного мозга с помощью УЗ-гомогенизатора.
3. Результаты изучения редокс-статуса убидекаренона в плазме крови крысы после его внутривенного введения.

4. Результаты изучения фармакокинетики убидекаренона при внутримышечном и внутривенном введении крысам: динамика плазменных уровней и содержания в миокарде, печени, головном мозге.

5. Фармакокинетические доказательства перспективности разработки парентеральных лекарственных форм убидекаренона для использования в ургентной терапии ишемических состояний (инфаркт, инсульт).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена однородностью выборки объектов эксперимента, использованием валидизированных методов количественного анализа, согласованностью с результатами опубликованных ранее исследований, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

Апробация работы проведена на совместном заседании кафедры фармакологии и кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на 21-й Европейской конференции по гипертензии и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний (Милан, Италия, 17-20 июня, 2011 г.); 2-ом Всемирном конгрессе по биодоступности и биоэквивалентности (Лас-Вегас, США, 7-8 июня, 2011 г.); XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 9-13 апреля, 2012 г.); Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 23-27 апреля, 2012 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию профессора А.А. Чумакова «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 18-20 апреля, 2012 г.); XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 8-12 апреля, 2013 г.); V ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых-2014» (Санкт-Петербург, 18 апреля 2014 г.); Международной научно-практической конференции: «От растения к препарату:

традиции и современность» к 95-летию со дня рождения проф. А. И. Шретера (Москва, 23-24 апреля 2014 г).

Результаты исследований отмечены Дипломами III и II степени на XIX и XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» в 2012 и 2013 гг.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в анализе данных литературы по теме диссертационной работы, проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных коллективным трудом, автором проведен анализ биологического материала. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от экспериментально-теоретической реализации поставленных задач до обсуждения результатов в научных публикациях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 163 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, включающей 5 глав: глава 1 – описание материалов и методов, главы 2-5 с результатами исследований и их обсуждением, а так же выводов и списка литературы. Диссертация включает 35 таблиц и 45 рисунков. Библиографический список содержит 254 источников, из них 229 на иностранном языке.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

История открытия кофермента Q

Кофермент Q был выделен из митохондрии бычьего сердца доктором Фредериком Крэйном в 1955 году (штат Висконсин, США) [49]. Профессор Мортон (Англия) выделил из клеток печени крысы то же вещество в 1957 году [163] и ввел для него имя «убихинон», то есть «вездесущий хинон». Точную химическую структуру CoQ₁₀ – производного 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинона определил профессор Карл Фолкерс и сотрудники Merck, Inc. в 1958 году (рис. 1).

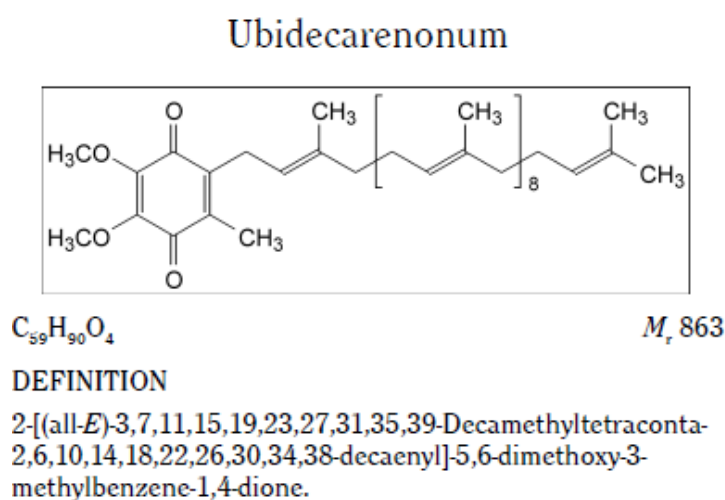


Рис. 1. Структурная формула CoQ₁₀ в соответствии Eur.Ph. 2005 version 5.2

В середине 1960-ых профессор Ямэмура (Япония) стал первым в мире, кто использовал кофермент Q₇ в лечении застойной сердечной недостаточности. Mellors и Tappel показали, что CoQ₆ является эффективным антиоксидантом [141], [142].

К середине 1970-ых в Японии усовершенствовали промышленную технологию производства чистого убидекаренона в количествах, достаточных для больших клинических испытаний.

В 1975 году Митчелл предложил описание механизма, названного «петля Митчелла», который осуществляет транспорт электронов с митохондриальных дегидрогеназ на комплекс III дыхательной цепи [150].

Первое время кофермент Q рассматривался только как переносчик электронов от комплексов I и II к комплексу III. Позже в ряде работ была доказана

незаменимая роль CoQ в этом качестве – извлечение и последующее добавление кофермента Q в субмитохондриальные частицы приводило к инактивации, а затем реактивации комплексов I и II [60].

В 1978 году за вклад в расшифровку биологических процессов превращения энергии, в том числе роли коэнзима Q₁₀ как энергетического транспортера Питеру Митчеллу была присуждена Нобелевская премия. [151-154].

Благодаря доступности чистой субстанции, производимой фармацевтической промышленностью Японии, и возможности непосредственно измерить CoQ₁₀ в крови и ткани с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с начала 1980-ых значительно возросли количество и масштаб клинических испытаний CoQ₁₀.

Биосинтез коэнзима Q

В организме человека кофермент Q₁₀ синтезируется в большинстве тканей и осуществляется в три главных этапа: (1) продукция бензохинона из аминокислот фенилаланина и тирозина (с участием витамина B6), (2) синтез боковой полиизопреновой цепи из ацетилкоэнзима A и мевалоновой кислоты, (3) присоединение бензохинона к боковой цепи, где ключевую роль играет особая редуктаза, регулирующая также образование холестерина.

Биосинтез коэнзимов Q происходит по мевалонатному пути. Мевалонатный путь включает реакции, протекающие от кофермента ацетила (ацетил-CoA) и приводящие к образованию с фарнезилпирофосфат (FPP), который является основанием для продукции холестерина, долихола и пренелирования белков (рис. 2) [79].

Таким образом, цепь преобразований ацетила-CoA в FPP характерна для всех конечных продуктов. Данная последовательность идентична для нескольких липидов и считается, что синтез одного липида влияет на образование других.

Начальная стадия мевалонатного пути включает в себя конденсацию трех молекул ацетил-CoA в 3-гидрокси-3-метил-глутарил CoA (HMG-CoA), который в последующем конвертируется в мевалонат при участии HMG-CoA редуктазы. Этот фермент является главным регулятором биосинтеза холестерина.

Мевалонат впоследствии фосфорилируется мевалонат-киназой и фосфомевалонат-киназой. Фосфат мевалоната появляется в дополнение к промежуточным звеньям, как регулятор синтеза ДНК и пролиферации клеток [51]. Декарбоксилирование мевалоната приводит к образованию изопентенил пиррофосфата (IPP), который является не только предшественником FPP, но также и блокаторм в полиизопреновом биосинтезе долихола и дальнейшего синтеза CoQ. Изомеризация IPP дает диметилпиррофосфат, который является промежуточным звеном в биосинтетическом процессе изопреноидных липидов. FPP-синтаза использует IPP и его изомер диметилпиррофосфат, чтобы создать через образование промежуточного продукта геранил пиррофосфат (GPP) [193].

Следующие ферменты в биосинтезе холестерина, долихола, CoQ и изопреновых белков, то есть скваленсинтазы, СНГ-пренилтрансфераза, транс-пренилтрансфераза и фарнезил 1-белковая трансфераза, как полагают, являются ферментами, регулирующими скорость образования конечных липидных продуктов. Транс-пренилтрансфераза катализирует уплотнение FPP (или GPP у млекопитающих) с несколькими IPPs, чтобы сформировать длинную изопреноидную цепь.

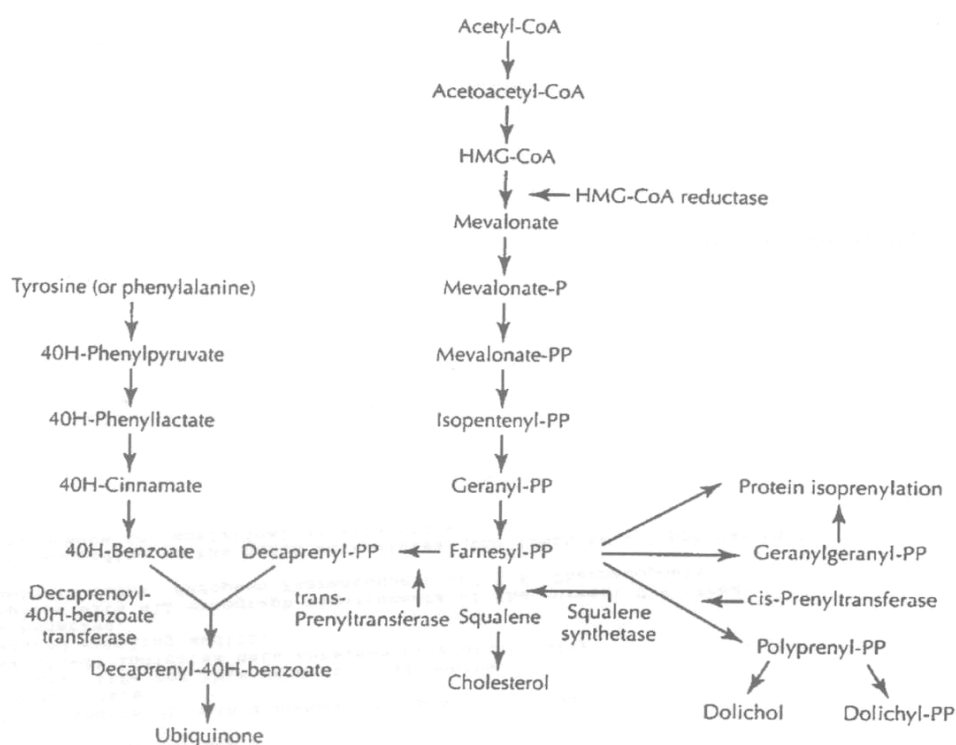


Рис. 2. Биосинтез CoQ₁₀ и других липидов мевалонатного пути [227].

Функции коэнзима Q

1. Участие в качестве переносчика электронов в дыхательной цепи митохондрий, плазматической мембране лизосомах

В эукариотических клетках существует транспортная система переноса электронов через плазматическую мембрану. НАДН-зависимая CoQ-редуктаза восстанавливает убихинон, который, в свою очередь, переносит электроны на фермент НАДН-оксидазу (NOX). Основными терминальными акцепторами электронов, восстанавливаемыми NOX, являются внеклеточные радикалы аскорбата, молекулярный кислород и белковые дисульфидные связи [227].

CoQ-зависимая NOX участвует в процессах регуляции уровня NADH в цитозоле, а также связана с регуляцией клеточного роста, дифференцировки и синтеза гормонов [42,158].

Лизосомы тоже содержат НАДН-зависимую CoQ редуктазу, которая принимает участие в образовании кислой среды лизосомального люмена [72]. В этом случае восстановление CoQ рассматривается как два последовательных одноэлектронных процесса, с участием ФАД и цитохрома b₅, а молекулярный кислород выступает в роли терминального акцептора [38].

2. Антиоксидантная функция

В митохондриях млекопитающих потребляется 80% поступающего в организм кислорода, которые расходуются на синтез АТФ. 1-2% кислорода, потребляемого митохондриями, рассматриваются как основной источник супероксид-аниона O_2^- и N_2O_2 [181, 207]. Другим источником активных форм кислорода является H_2O_2 , продуцируемая моноаминоксидазой, флавиноксидазой, а также утечка электронов с цитохрома p-450 в эндоплазматическом ретикулуме [43, 46, 80].

Свободные радикалы, образующиеся в клетке, могут повреждать липиды, белки и ДНК. Перекисное окисление липидов начинается с извлечения атома водорода из метиленовой группы полиненасыщенной жирной кислоты. Альдегидные формы являются долгоживущими, по этой причине могут распространяться на более дальние расстояния от места своего возникновения, чем свободные радикалы.

Некоторые аминокислоты имеют большую предрасположенность к окислению, чем другие. Избирательность атаки связана с металлопротеинами, которые вступают в реакцию со «слабыми» активными формами кислорода и формируют гидроксильные радикалы на металлосвязывающей стороне [210]. Последующее извлечение атома водорода и формирование пероксильных радикалов, гидропероксидаз схожи с липидным окислением. Окисленные белки распознаются специфичными протеазами, после чего распадаются до аминокислот [78, 229].

Вследствие относительно высокой продукции активных форм кислорода митохондриальная ДНК подвержена большему процессу окисления, чем ядерная ДНК [178]. Окисленная ДНК восстанавливается двумя ферментативными механизмами: удалением и последующим перемещением одиночных дезоксирибонуклеотидов и/или эксцизией 25-32 нуклеотидных длинных олигомеров от окисленных оснований, которые перенесены ДНК-полимеразой и позже запечатаны ДНК-лигазой [241].

Антиоксиданты – ферментные и неферментные агенты, предотвращающие или ликвидирующие активные формы кислорода. Антиоксиданты в организме млекопитающих представлены ферментами супероксиддисмутазой и различными пероксидазами (глутатионовая пероксидаза, каталаза, тиоредоксиновая редуктаза) [86, 242]; витамины С, Е, каротиноиды, глутатион, α -липоевая кислота, флавины и восстановленная форма CoQ_{10} являются неферментными антиоксидантами.

Митохондриальный CoQ_{10} после окисления эффективно регенерируется дыхательной цепью и обычно находится преимущественно в восстановленной форме [27]. Исследования механизма действия CoQ_{10} дали возможность предполагать, что $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ воздействует на начальный процесс и предотвращает формирование пероксильных радикалов, в то время как витамин Е блокирует их [59]. Данный момент проявляется, когда $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ отдает протон с образованием убисемихинона и H_2O_2 . Показано, что убихинон регенерирует витамин Е из α -токофероксильного радикала. Данные показатели говорят о том, что CoQ_{10} как антиоксидант более эффективен, чем витамин Е [69].

В присутствии аскорбата, α -токоферола и CoQ при окислении водорастворимым радикалом-инициатором фосфатидилхолиновых липосом

антиоксиданты используются в порядке: аскорбат – CoQ – α -токоферол. Когда используется жирорастворимый радикал-инициатор, антиоксиданты стоят в следующем порядке: CoQ – аскорбат – α -токоферол [200]. Таким образом α -токоферол защищен в обоих случаях и его кинетические данные показывают, что α -токофероксильный радикал восстанавливается CoQ₁₀H₂. Эффект защиты α -токоферола убихинолом так же был показан в исследовании на липопротеинах низкой плотности [214]. Антиоксидантная функция CoQ₁₀ не зависит от присутствия α -токоферола [67].

3. Участие в активации митохондриальных разобщающих белков

Разобщающие белки (uncoupling proteins, UCPs) находятся на внутренней мембране митохондрий и перемещают ион водорода из межмембранного пространства внутрь митохондрий. Протонный градиент в дыхательной цепи разобщен с процессом окислительного фосфорилирования, при этом сжигается больше энергии, чем образуется [168, 227].

В митохондриях многих растений и животных известно пять различных белков-разобщителей. Наиболее изученным является белок UCP1, локализованный в буром жире, он активно функционирует и ответственен за термогенез [107, 167]. Помимо термогенеза, UCPs принимают участие в подавлении генерации радикалов кислорода.

Echtaу и др. доказали, что CoQ является обязательным кофактором для функционирования UCPs белков [53, 54]. Добавление CoQ в смеси с жирными кислотами к липосомам активировало транспорт протонов разобщающими белками, и наоборот, транспорт прекращался в отсутствие CoQ. При этом коэнзим Q с маленькой длиной изопреноидного хвоста (0-2 единицы) практически не взаимодействуют с UCPs, максимальная активность наблюдалась при введении CoQ₁₀ [53]. UCP3 взаимодействует с CoQ на поверхности мембраны. Таким образом, убихинон, а не убихинол может перенести H⁺ от жирных кислот к акцепторной группе UCPs.

4. Регуляция проницаемости митохондриальных пор

Изменение проницаемости митохондриальной мембраны приводит к выходу проапоптотических белков из митохондрий в цитоплазму (цитохром с, прокаспазы-9 и др), что приводит к апоптозу клетки. Проницаемость мембраны обусловлена открытием комплекса РТР (permeability transition pore) [227].

На комплекс РТР влияют многие факторы – концентрация ионов кальция в матриксе, мембранный потенциал, рН матрикса, циклоспорин А, окисленные глутатион и пиридиновые нуклеотиды, образующиеся при окислительном стрессе, коэнзим Q и его гомологи [73].

CoQ оказывает влияние на митохондриальные поры не через окислительно-восстановительные реакции, а связываясь с неким сайтом РТР. Коэнзим Q (как ингибитор) способен предотвращать деполяризацию митохондриальной мембраны, выход цитохрома С и активацию каспазы-9 в кераноцитах в ответ на апоптотические стимулы [182]. Считается, что его ингибирующий эффект на открытие неспецифической митохондриальной поры связан с данными факторами.

5. Модуляция количества β 2-интегринов на поверхности моноцитов крови

In vitro увеличение CoQ₁₀ увеличивает устойчивость ДНК к окислению пероксидом водорода, но не останавливает разрушение ДНК цепочек [222]. In vivo прирост CoQ₁₀ в лимфоцитах сдерживает повреждение ДНК окислительным стрессом и увеличивает активность ДНК-чинящего белка в них [221]. Наблюдается значительное увеличение соотношения Т4/Т8 лимфоцитов через 2 месяца после введения CoQ₁₀ [62, 64] у людей в течение 3-х месяцев приема [34].

Компоненты крови играют важную роль в развитии атеросклероза. Моноциты прикрепляются к эндотелиальным клеткам артериальных сосудов и появляются как макрофаги после миграции [190, 208]. Согласно данной теории, главной причиной развития атеросклеротической бляшки является аккумуляция окисленного холестерина в макрофагах.

Антиатерогенный эффект CoQ₁₀ был показан на мышях с недостаточностью апополипротеина Е, которых кормили жирной пищей [220, 240]. В исследованиях отмечают не только повышение уровней аортального CoQ₁₀, α -токоферола, а также снижение концентраций гидропероксидов в атеросклеротических

повреждениях, уменьшение повреждения по всей аорте. Данные эффекты связывают не только с антиоксидантными свойствами CoQ_{10} – снижение маркеров окислительного стресса, но и с уменьшением адгезивных факторов снижению использования моноцитов в атеросклеротическом поражении, тем самым препятствует прогрессированию болезни [227].

6. Улучшение эндотелиальной дисфункции (за счет увеличения оксида азота)

Такие заболевания как диабет и кардиоваскулярные заболевания сопровождаются эндотелиальной дисфункцией артерий.

При приеме глицерил-тринитрата отмечается расширение плечевой артерии, при его совместном приеме с убидекареноном отмечено улучшение состояния эндотелиальной функции [233]. Прием убидекаренона пациентами с сахарным диабетом 2-го типа так же снижает систолическое давление и HbA_{1c} не снижая F2-изопростаны (используются в качестве индикатора окислительного стресса). Увеличение оксида азота – наиболее вероятное объяснение артериального эффекта, ведущего к расширению [85].

Физико-химические свойства коэнзима Q

По химической природе кофермент Q имеет сходство в строении молекулы с витаминами E и K. Число остатков изопрена в боковой цепи убихинона в разных организмах варьируется от 6 до 10. Такие варианты кофермента Q обозначают как CoQ_6 , CoQ_7 и т.д [13].

В клетках *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи) содержится CoQ_6 , *Escherichia coli* – CoQ_8 . В митохондриях клеток большинства млекопитающих, включая человека, доминирует убихинон с 10 изопреновыми звеньями.

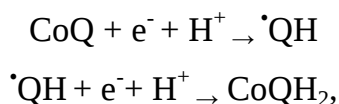
Низшие гомологи такие как Q_1 - Q_5 представляют собой маслянистые жидкости. Высшие представляют собой желто-оранжевые или ярко-оранжевые кристаллы без вкуса и запаха.

Убидекаренон – кристаллический порошок желто-оранжевого или ярко-оранжевого цвета без вкуса и запаха. Температура плавления $49-51^\circ\text{C}$. Растворим в диэтиловом эфире, очень слабо растворим в этаноле, практически нерастворим в

воде. На свету постепенно разлагается с изменением цвета. С водой образует эмульсию с концентрацией 10 %, 20 % и 40 %.

Убидекаренон имеет специфический спектр поглощения в ультрафиолетовой области (УФ-области) с характерным максимумом при 275 нм.

В организме кофермент Q существует в восстановленной (убихинол, CoQH_2) и окисленной (убихинон, CoQ_{10}) формах (рис. 3)



где $\cdot\text{QH}$ – убисемихиноновый радикал.

Именно в восстановленной форме CoQ_{10} выступает в качестве антиоксиданта, предотвращающего повреждение ДНК, липидов, белков и других молекул [36, 39, 59, 133].

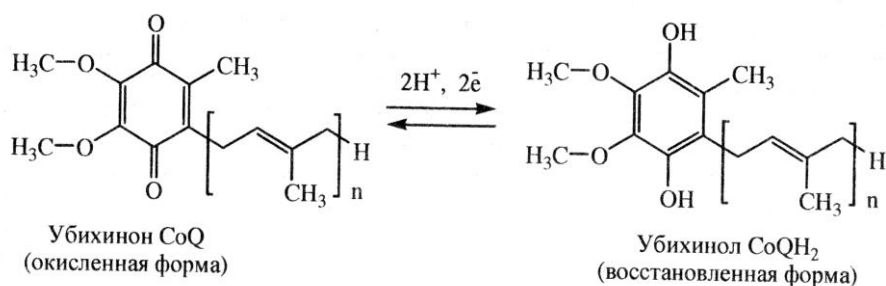


Рис. 3. Окисленная и восстановленная формы убихинона.

Аналитические методы определения коэнзима Q_{10}

Анализ CoQ_{10} методом ВЭЖХ

В химическом анализе для эффективного многоступенчатого разделения веществ применяют хроматографию. Для анализа CoQ_{10} используют метод ВЭЖХ [55, 61, 77, 96, 114, 118, 216]. В качестве подвижной фазы часто используют метанол, этанол или их смесь, иногда с добавлением уксусной, муравьиной или

трифторуксусной кислоты. CoQ₉ и CoQ₁₁ используются в качестве внутреннего стандарта для контроля проб биологического материала людей.

В Европейской фармакопее (2005 г, версия 5.2) описан метод УФ-детектирования убидекаренона при $\lambda=275$ нм. Рекомендуемая скорость потока подвижной фазы (этанол:метанол 20:80) 2 мл/мин, при которой время удерживания составляет около 12 мин (колонка C18, 150x4,6 мм, 5 μ m).

Британская фармакопея (2009 г) ссылается на методику, описанную в Европейской фармакопее (Ph. Eur. monograph 1578) и приводит те же хроматографические условия. Метод УФ-детектирования ($\lambda=275$ нм) так же используется в фармакопее Японии (выпуск 15, стр 1214).

Michael R и др. в своем эксперименте использовали методику ВЭЖХ-СФ для определения CoQ₁₀ в листьях табака, пользуясь разработанной ранее методикой Ohara и др. [173] экстракции CoQ₁₀ из плазмы. Детектирование проводили при $\lambda_{\text{max}} = 275$ нм. Авторы отмечают, что так же можно определять и CoQ₁₀H₂ в исследуемом образце переключением детектора на $\lambda_{\text{max}} = 290$ нм для убихинола [213].

В работе [191] использовали метод ВЭЖХ с ЭХ-детектированием для обнаружения убихинола и его общего количества в биологических материалах. Для определения TCoQ₁₀ в биологических образцах убихинон был преобразован в соответствующую восстановленную форму в реакции с борогидридом натрия. Этот метод был приблизительно в 70 раз более чувствительным, чем предыдущий метод ВЭЖХ с СФ-детектированием.

В работе [191] предложен метод определения CoQ₁₀ и α -токоферола в плазме крысы и митохондриях. Определение проводилось на двухэлектродной электрохимической ячейке.

Последовательное подключение ЭХ- и СФ-детекторов в работе [84] позволило определить восстановленную, окисленную форму коэнзима в биологическом материале.

Метод определения CoQ₁₀ в плазме крови людей был разработан на основе ВЭЖХ с переключением колонок [93]. После системы инжектирования авторы установили переключающий кран, на котором монтировали предколонку, а так же основную хроматографическую колонку. Инжектор соединяли с насосом,

подающим промывочную жидкость на предколону. Позицию крана, в которую установлена хроматографическая колонка, соединяли со вторым насосом, который подает элюент. Целевые соединения удерживаются на предколоне, а сопутствующие смываются метанолом. Через некоторое время поворачивают переключающий кран – целевые вещества поступают на хроматографическую колонку. Детектирование CoQ₁₀ осуществляли с помощью СФ-детектора при $\lambda = 275$ нм.

Для обнаружения CoQ₁₀ в сыворотке крови после перорального введения крысам авторы работы [130] использовали ультраэффективный жидкостной хроматомасс-спектрометр (Milford, MA, USA).

Для анализа CoQ₁₀ так же рекомендуется использовать флуоресцентные детекторы, которые обладают высокой селективностью и чувствительностью [170]. CoQ₁₀ самостоятельно не проявляет флуоресцентных свойств, поэтому необходимо введение флуофорных групп в молекулу. В работах [26, 194] в качестве флорофора использовали этилцианоацетат.

Метод работы [105, 148] основан на люминол хемилюминисцентном детектировании супероксид аниона через окислительно-восстановительную реакцию между хиноном и дитиотреитолом (как восстановителем).

Разработанный авторами работы [106] метод, позволяет проводить определение убидекаренона в фармацевтических препаратах и плазме крови человека без предварительной процедуры очистки.

Анализ CoQ₁₀ методом капиллярного электрофореза

Капиллярный электрофорез считается альтернативным подходом для анализа CoQ₁₀ в биологических объектах. Данный метод характеризуется простотой анализа, пробоподготовки, чувствительностью и низкой стоимостью.

Определение CoQ₁₀ в плазме человека проводили с использованием микроэмульсионной электрокинетической хроматографии (МЭЭКХ) [136].

МЭЭКХ была также использована для одновременного определения CoQ₁₀, аскорбиновой и фолиевой кислоты [186]. Разделение анализируемых веществ наблюдалось в пределах 4-х мин.

Анализ CoQ₁₀ методом вольтамперометрии

Для изучения окислительно-восстановительных свойств CoQ₁₀ применима вольтамперометрия.

Исследовано анодное окисление окисленных форм коэнзима Q₁₀ и Q₀ на стекловидном углеродном макроэлектроде и на волоконном углеродном микроэлектроде в уксусной кислоте. Общее число электронов, участвующих в анодном окислении CoQ₁₀, выше, чем CoQ₀, что указывает на то, что окисление протекает также в ненасыщенной боковой цепи изопрена. Меньшие окислительные потенциалы для CoQ₁₀ по сравнению с ненасыщенными жирными кислотами, такими как олеиновая, линолевая и линоленовая указывают на то, что это соединение обладает антиоксидантными свойствами. Антиоксидантная сила убихинона значительно меньше, чем у убихинола и α -токоферола. Данные результаты полезны при определении убидекаренона в биообразцах и оценке биохимических свойств CoQ₁₀ в клетках [146].

Исследовано электрохимическое восстановление CoQ₁₀ и CoQ₀ на стекловидном углеродном макроэлектроде. Для выяснения механизма электродных процессов использовали сочетание циклической вольтамперометрии и вращающегося электрода. Процессы происходят с генерацией нестабильных семихинонных радикалов [144].

Вольтамперометрический метод был применен для количественного определения убидекаренона в фармацевтических препаратах. Статистические показатели и данные исследования проявляли воспроизводимость и точность метода. Предлагаемый способ не требует предварительной пробоподготовки фармацевтических лекарственных препаратов [145].

Анализ CoQ₁₀ методом полярографии

Полярографический метод определения убидекаренона в системе с β -циклодекстрином и йодом предложили Yang и Song [85, 246]. Использование β -циклодекстрина повысило фотостабильность убидекаренона и позволило проводить его определение на свету.

Пробоподготовка и экстракция CoQ₁₀

Этап подготовки образца включает депротеинизацию гомогенатов или биологических жидкостей, таких как кровь, сыворотка или плазма. Этанол, метанол, 2-пропанол или их смеси используются для осаждения белков.

В исследованиях [130, 190] использовали 2-пропанол для осаждения белков из образцов сыворотки крыс. 1-пропанол был применен в качестве агента депротеинизации в крови [170], сыворотке человека [195] и плазме [164, 216].

Ввиду малой токсичности и доступности этанол является наиболее часто используемым агентом осаждения белка из крови человека [61, 115, 127, 157], а также из гомогената тканей [89, 103, 128, 218, 231]. Другие авторы для первичной обработки образцов крови рекомендуют использовать метанол [169, 252] и тканей [75, 184, 249] кроме того, используются смеси метанол и этанол (1:1).

Следующим шагом, после завершения процесса депротеинизации, является изоляция CoQ₁₀ от компонентов, которые могут мешать анализу. Избавление от нежелательных соединений обычно выполняют с помощью жидкостно-жидкостной экстракции. Для экстракции CoQ₁₀ наиболее часто используют n-гексан [131, 195, 234] или смесь этанол:метанол.

Извлечение CoQ₁₀ в работе [235] проводили смесью этанол:гексан (1:5). Смесью петролейного эфира, этилацетата, метанола (1:1:1) была применена для экстракции убидекаренона из поливатиминных добавок [41]. Международная ассоциация CoQ₁₀ рекомендует n-пропанол для депротеинизации и изоляции CoQ₁₀ из плазмы [164].

В эксперименте Okamoto T и др. все процессы пробоподготовки проводили без доступа света. Экстракция CoQ₁₀ из плазмы проводилась смесью метанола и n-гексана, после чего слой n-гексана отбирали пипеткой в другую пробирку, концентрировали под вакуумом при комнатной температуре и проводили анализ на ТСХ [175].

В гепаринизированную плазму добровольцев добавляли 2-пропанол. После центрифугирования спиртовой слой вводили непосредственно в систему ВЭЖХ [83].

Аликвоты плазмы людей с добавлением 1-пропанола перемешивали в течение 2-х мин на vortex, после центрифугировали. Для количественной оценки использовали ВЭЖХ [93].

К плазме пациентов добавляли метанола, смесь перемешивалась на vortex и центрифугировалась. Экстракт упаривали досуха в потоке азота при комнатной температуре, сухой остаток растворяли в метаноле, после чего проводили анализ [29].

Фармакокинетика убидекаренона

Абсорбция и транспорт

Убидекаренон плохо всасывается в желудочно-кишечном тракте: уровень абсорбции кристаллического убидекаренона примерно 3% [251]. Он абсорбируется эпителиальными клетками в тонком кишечнике и транспортируется по лимфатической системе в печень. Механизм абсорбции подобен витамину Е – другому жирорастворимому антиоксиданту. В присутствии липидов абсорбция убидекаренона увеличивается. В тонком кишечнике секрет поджелудочной железы и желчь облегчают эмульгирование и формирование мицеллы, которая облегчает последующую абсорбцию. Специфического места всасывания для него не описано. После поглощения убидекаренона сначала включается в хиломикроны и транспортируется через лимфотическую систему в кровь [102]. Далее убидекаренон обнаруживается в системе кровообращения в составе мезентериальных липопротеидов, богатых триациглицеролом. В периферической циркуляции эти частицы при участии липопротеин-липазы преобразовываются в хиломикроны и быстро захватываются печенью, где повторно «упаковываются» в частицы ЛПОНП/ЛПНП и повторно высвобождается в кровь [56, 224]. Убидекаренон характеризуется бифазной абсорбцией – первый пик подъема его уровня наблюдается в плазме спустя 2-6 ч после приема внутрь, второй через 24 часа [38]. Абсорбция убидекаренона увеличивается при употреблении его с жирами, либо в лекарственных формах с убидекареноном, включенном в мицеллы или липосомы.

К сожалению, в связи с нерастворимостью в воде, относительно небольшой растворимостью в жирах и достаточно большой молекулярной

массой убидекаренона биодоступность его, определенная в опытах на крысах, составляет всего около 2-3% [251]. Процент абсорбции убидекаренона падает с увеличением дозы, следовательно, абсорбция ограничена. При его приеме в готовой дозированной форме абсорбция зависит от таких факторов, как физическое состояние и природа субстанции [47, 149, 250]. Так солюбилизированный убидекаренон в составе препарата Кудесан обладает большей степенью всасываемости, создавая более высокие концентрации в плазме крови относительно порошка [6].

Один из наиболее популярных подходов к увеличению биодоступности заключается в уменьшении размеров лекарственных частиц до микро - и наноразмеров. Наиболее часто эта проблема решается созданием наночастиц – универсальных транспортных систем, «несущих» лекарственное вещество. Этот эффект продемонстрирован и для убидекаренона: водная дисперсия кристаллического, нерастворимого в воде убидекаренона, показала меньшую биодоступность по сравнению с наносомальной формой данного вещества [179].

В работе [143] авторы микронизировали порошок убидекаренона до наноразмеров, доводя его до сверхкритического состояния. Данная методика не предусматривает использование каких-либо токсичных органических растворителей. Размеры полученных наночастиц составляли $147,9 \pm 27,3$ нм в диаметре. По результатам физико-химических и фармакокинетических исследований на крысах наночастицы убидекаренона имели более высокую гидрофильность в воде и биодоступность относительно необработанного (рис. 4, 5).

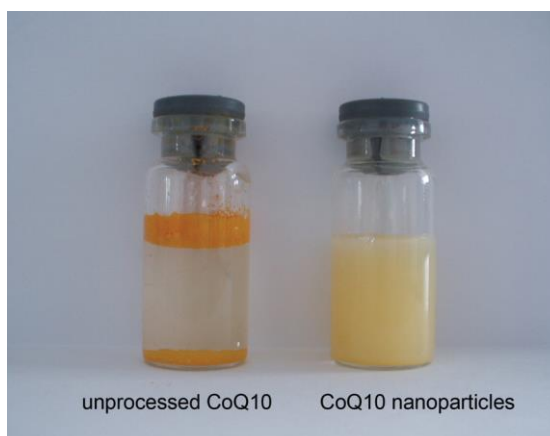


Рис. 4. Внешний вид водных суспензий убидекаренона с концентрацией 1 мг/мл: - необработанного (слева) и наноразмерного (справа).

При совместном употреблении с жиросодержащими веществами биодоступность убидекаренона так же увеличивается [39]. Была разработана его суспензия, состоящих из масла бобов и убидекаренона, которую стабилизировали лецитином и помещали в капсулы. Эксперимент по сравнению биодоступности липосомального убидекаренона и его кристаллической таблетированной формы проводился на собаках. В эксперименте показано, что биодоступность липосомального убидекаренона вдвое превысила биодоступность таблетированного кристаллического [179].

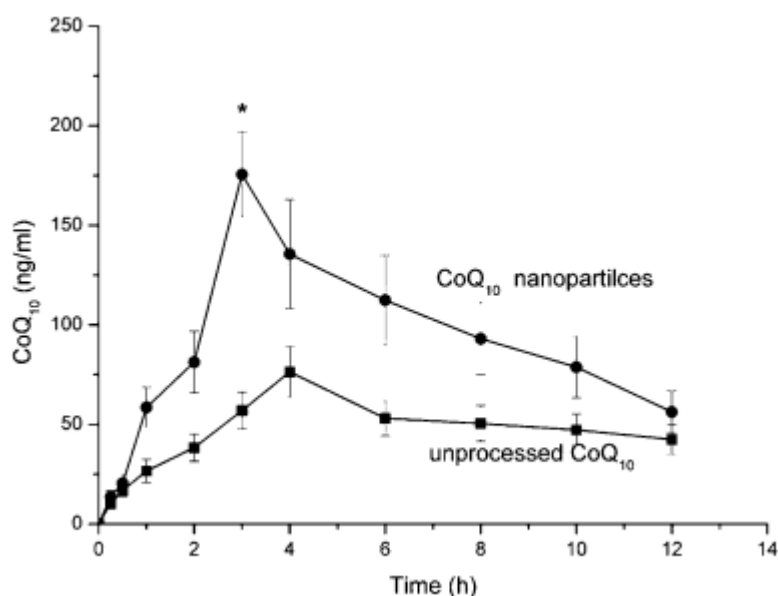


Рис. 5. Фармакокинетические кривые концентрация-время после перорального приема наночастиц и необработанного убидекаренона в дозе 50 мг/кг у крыс. Точки представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$).

* $p < 0,05$ по сравнению с необработанным убидекареноном.

Разработаны и широко используются методы увеличения водорастворимости липофильных веществ. В настоящее время повышение гидрофильности веществ с низкой растворимостью является общей фармацевтической стратегией. В ряде случаев при увеличении гидрофильности убидекаренона наблюдалось даже большее увеличение биодоступности, чем в случае использования масляных форм в желатиновых капсулах. Примерами такого подхода могут служить использование водной дисперсии твердого убидекаренона с полимером тилоксаполом [202],

разработка формул, основанных на различных солюбилизирующих агентах (таких, как лецитин), или комплексообразование с циклодекстрином.

Показано, что бета-циклодекстрин довольно сильно увеличивает биодоступность и широко используется в пищевой промышленности, в том числе и с целью обогащения продуктов убидекареноном. В исследовании [254] принимало участие 14 добровольцев, разделенных на 4 группы и принимавших разные формы убидекаренона: в форме таблетки без циклодекстрина, таблетки, содержащей убидекаренона в комплексе с циклодекстрином, мягкой желатиновой капсулы, а так же жидкой формы, разработанной USANA Health Sciences, которая имеет патентованную формулу, включающую систему солюбилизации убидекаренона на основе натуральных ингредиентов, способствующих повышению его биодоступности: среднецепочечные триглицериды, лецитин, моноолеат глицерина в твердой желатиновой капсуле [50].

Две жидкие формы продемонстрировали более высокую биодоступность по сравнению с таблетированными лекарственными формами (рис. 6). Очевидно, что кристаллический убидекаренона проигрывает в биодоступности любой из этих изучаемых форм.

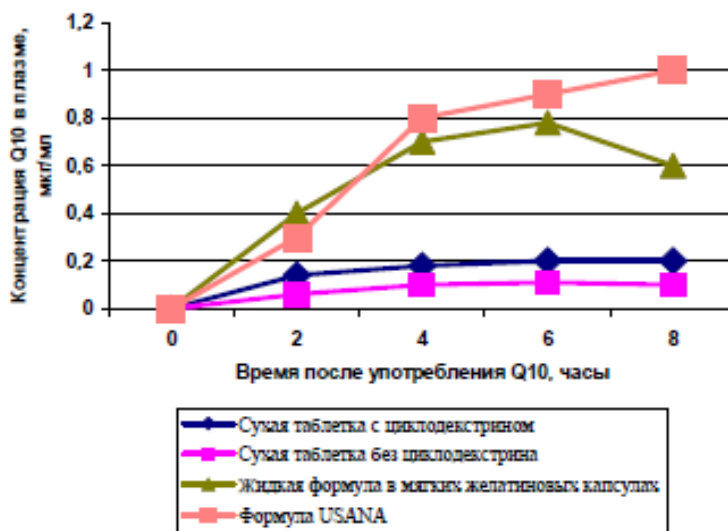


Рис. 6. Кинетические кривые концентраций убидекаренона в плазме крови добровольцев.

Ряд необходимых модификаций, позволяющих повысить растворимость убидекаренона в воде и ускорить абсорбцию, возможен при помощи технологии микрокапсулирования Actilease.

Применяя эту технологию, компания DSM Nutritional Products разработала новую форму, содержащую убидекаренон, – All-Q, которая характеризуется оптимальной биодоступностью (патент WO03068008, информация взята из открытых источников http://ep.espacenet.com/?locale=en_EP). Данная технология позволяет липофильному соединению быть более водорастворимым, обеспечивать эффективную абсорбцию и необходимую концентрацию убидекаренона в крови. Это частицы на основе полисахаридной матрицы из желатина, желатина рыб, модифицированных полисахаридов, крахмала, мальтодекстрина, сахарозы, с вкраплением частиц активного вещества – убидекаренона. Технология Actilease позволяет получить частицы диаметром от 130 до 500 нм, содержащие от 10 до 60% включений CoQ₁₀.

All-Q содержит сферические микрокапсулы размером около 300 мкм, при этом убидекаренон внутри этих капсул заключен в водорастворимую желатиновую матрицу (рис. 7)

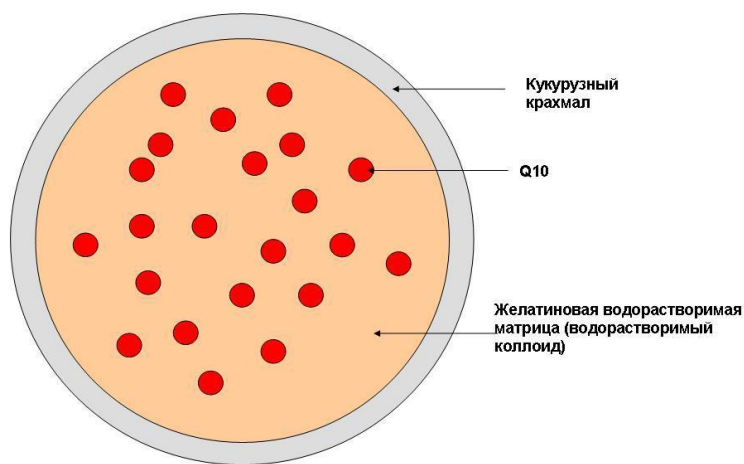


Рис. 7. Схематичное изображение частицы All-Q, содержащей гранулы убидекаренона, изготовленной по технологии Actilease.

Технология позволила добиться комбинации природных ингредиентов, обеспечивающих пролонгированное высвобождение активного вещества.

Эндогенные уровни CoQ₁₀

CoQ у людей и животных присутствует во всех тканях в различных количествах. Преобладающим гомологом у относительно недолго живущих видов животных, таких как крысы и мыши, является CoQ₉, тогда как у людей и других долгоживущих видов млекопитающих главный гомолог – CoQ₁₀. Тканевое распределение и окислительно-восстановительный статус CoQ₁₀ в тканях человека продемонстрированы в табл. 1 [27], [147].

Таблица 1. Распределение и редокс-статус CoQ₁₀ в тканях человека

Ткань/орган	Содержание CoQ ₁₀ (нмоль/г)	Редокс статус (% CoQ ₁₀ H ₂)
Сердце	132	61
Почки	77	75
Печень	63,6	95
Мышцы	46	65
Мозг	15,5	23
Кишечник	13,3	95
Легкие	9,2	25
Плазма (ммоль/мл)	1,1	96

Во взрослом человеке общий пул CoQ₁₀ оценивается приблизительно в 0,5 - 1,5 г [74]. Тканевое распределение и содержание CoQ₉ и CoQ₁₀ у крыс показаны в табл. 2 [253].

Как правило, ткани с высокоэнергетическими затратами или высокой метаболической активностью такие как сердце, почки, печень и мышцы содержат относительно высокие концентрации CoQ₁₀ [58]. Выраженная липофильность молекулы обуславливает и распределение CoQ₁₀ в тканях, которое связано не только с метаболической активностью, но также с содержанием липидов. Данные по внутриклеточному распределению CoQ₁₀ показывают, что значительная часть CoQ₁₀ (40-50%) содержится во внутренней мембране митохондрий, остальное количество – в цитозольной фракции. Высокая концентрация CoQ₁₀ в митохондриях обусловлена его важной ролью в их функционировании.

Внутриклеточное распределение коэнзимов Q в печени крысы показано в табл. 3 [253].

Таблица 2. Содержание CoQ₁₀ в различных тканях крысы

Ткань/орган	CoQ ₉ (пмоль/мг белка)	CoQ ₁₀ (пмоль/мг белка)	CoQ ₉ H ₂ + CoQ ₁₀ H ₂ (% от общего пула CoQ)
Печень	1040	99	85,4
Почки	1513	160	43,2
Сердце	2201	173	21,1
Мышцы	653	44	40,2
Мозг	642	274	27,7
Плазма	1030	72	54

Таблица 3. Внутриклеточное распределение коэнзимов Q в печени крысы

Фракция	CoQ ₉ (пмоль/мг белка)	CoQ ₁₀ (пмоль/мг белка)
Гомогенат	1040	99
Митохондрии	5919	535
Лизосомы	1126	120
Везикулы аппарата Гольджи	805	92
Плазматические мембраны	353	37
Микросомы	249	57
Ядерная фракция	188	27
Пероксисомы	121	13
Цитозоль	106	11

Основная часть CoQ₁₀ в тканях человека находится в восстановленной форме за исключением мозга и легких, что считается отражением интенсивных

окислительных процессов в этих органах. В крови человека приблизительно 95% CoQ₁₀ находятся в восстановленной форме [27] [147]. Среди клеток крови, в лимфоцитах и тромбоцитах содержится существенное количество CoQ₁₀, тогда как эритроциты, которые имеют наименьшее количество митохондрий, содержат только крошечное его количество, которое связано с мембранами.

Захват убидекаренона тканями

Тканевое содержание CoQ₁₀ меняется под действием некоторых физиологических факторов, таких как окислительный стресс и старение [58]. Также уровень CoQ₁₀ снижается при различных патологических состояниях [58, 123, 177].

В исследовании Zhang у крыс, экзогенно получавших убидекаренон, выявили увеличение содержания его в крови, печени, селезенке, и никакого прироста не наблюдалось в сердце и почках [251]. Кроме того, постоянный прием пищи, обогащенной убидекареноном, увеличивает концентрации CoQ₁₀ в сердце и митохондриальных фракциях мозга [101, 112, 140]. Дозировка и продолжительность приема убидекаренона являются важными факторами его пополнения в таких органах как сердце и мозг [7].

Метаболизм CoQ₁₀

Исследования метаболизма CoQ₁₀ у людей и животных немногочисленны. У таких животных как крысы или морские свинки возможно проводить исследования *in vivo*. В то время как CoQ₉ главный гомолог убихинона у крыс, CoQ₁₀ – основная форма убихинона у морских свинок и человека.

В одном из ранних исследований опубликованы данные по метаболизму CoQ у крыс, изученному с использованием CoQ₇ в качестве маркера [70]. При приеме внутрь радиоактивного ¹⁴C-меченного CoQ₇ в кукурузном масле максимум в крови достигался через 6 ч. Абсорбция происходила через лимфатическую систему, основной захват наблюдался в печени, а экскреция проходила с желчью. Часть радиоактивного CoQ₇ в желчи была повторно абсорбирована в кишечнике. Выделение из организма меченного CoQ₇, главным образом, происходило с фекалиями.

В эксперименте Kishi и др. у крыс [104] радиоактивность в плазме достигла максимума через 2 ч после приема внутрь ^{14}C -маркированного убидекаренона. Наибольшая радиоактивность наблюдалась в печени. При увеличении содержания радиоактивного убидекаренона в печени и плазме, наблюдалось так же и увеличение уровня CoQ_9 . Это указывает на возможность превращения экзогенного CoQ_{10} в CoQ_9 у крыс. Кроме того, это подтверждает, что введение экзогенного убидекаренона не снижает синтез эндогенного CoQ_9 у крыс [251]. В исследованиях на крысах и мышах обнаружили, что прием пищи, содержащий убидекаренон, приводит к увеличению содержания CoQ_9 в тканях у обоих видов [101, 112, 135].

По мнению Kishi и др. [104], плазменный пул CoQ_{10} отражает не только количество абсорбируемого убидекаренона, поступающего с пищей, но также и его тканевое содержание. Хотя плазменная концентрация CoQ_{10} может и не отражать тканевое содержание [52, 212], она все еще служит мерой измерения общего пула CoQ_{10} . При дегенеративных, неврологических и мышечных заболеваниях клинический контроль плазменной концентрации и редокс-статуса CoQ_{10} важны для предоставления информации относительно курса лечения [212].

Фармакокинетические параметры убидекаренона

На сегодняшний день исследований по фармакокинетике убидекаренона не достаточно. В исследовании Fujita T, проведенном на крысах, пик радиоактивности от перорального приема ^{14}C -маркированного CoQ_7 был выявлен через 6 часов [70]. Однако, в другом исследовании Kishi и др. [104] пик радиоактивности ^{14}C -маркированного CoQ_{10} отмечался через 2 часа после приема внутрь. Причины несоответствия между двумя исследованиями неясны, но стоит обратить внимание на наличие разных гомологов CoQ в этих экспериментах.

В исследовании Thelin и др. [219] крысам внутрибрюшинно вводили [3H] мевалонат – предшественник CoQ . Ткани были исследованы на содержание радиоактивного CoQ_9 . Данные, представленные в табл. 4 показывают, что CoQ_9 подвергается быстрому катаболизму, о чем свидетельствует высокий период полувыведения.

В исследовании Tomono и др. [223] после однократного перорального употребления добровольцами время достижения максимальной концентрации в

плазме ($T_{\max}$) убидекаренона наблюдался в районе 6,5 ч. Lucke и др. установили, что период полувыведения составляет 33,19 часов [236]. В обоих экспериментах убидекаренон использовали в виде порошка.

Таблица 4. Распределение CoQ_9 в тканях крысы и период его полувыведения после однократного внутрибрюшинного введения CoQ_9 крысам

Ткань	CoQ_9^* (мкг/г)	Период полувыведения (часы)
Печень	$171 \pm 11,3$	79
Сердце	$162 \pm 10,2$	59
Почки	$133 \pm 7,9$	125
Желудок	$63,4 \pm 4,7$	72
Щитовидная железа	$52,6 \pm 6,1$	49
Толстая кишка	$46,5 \pm 3,1$	54
Мышцы	$46,2 \pm 3,8$	50
Кишка	$40,1 \pm 1,9$	54
Поджелудочная железа	$32,0 \pm 2,2$	94
Яичко	$23,6 \pm 1,4$	50
Тимус	$21,7 \pm 1,8$	104
Селезенка	$20,3 \pm 2,0$	64

* $\pm$ стандартное отклонение.

В эксперименте Мили и др. [224] сравнили фармакокинетику трех различных растворов солюбилизированной субстанции убидекаренона и субстанцией убидекаренона в порошке. Результаты продемонстрировали, что $T_{\max}$ для убидекаренона, введенного в порошке и двух растворах наблюдается в интервале 6

часах, другой раствор солюбилизированный субстанции имел $T_{\max}$ на 8 часах. Фармакокинетические параметры, полученные в этом исследовании, показаны в табл. 5.

Таблица 5. Фармакокинетические параметры убидекаренона при его однократном пероральном приеме

Форма субстанции	Доза (мг)	$C_{\max}$ (ммоль/л)	$T_{\max}$ (часы)	AUC (ммоль/ч)
Порошок	180	0,14	6,70	–
Раствор 1*	180	1,16	6,20	59,85
Раствор 2*	180	1,47	8,10	64,01
Раствор 3*	180	1,16	5,80	44,94

*Солюбилизированная субстанция убидекаренона

Время достижения максимальной концентрации в плазме в районе 6 часов говорит о том, что абсорбция убидекаренона из желудочно-кишечного тракта протекает медленно в связи с нерастворимостью в воде, относительно малой растворимостью в жирах и достаточно большой молекулярной массой.

Авторы исследования [228] показали, что субстанции убидекаренона, которые содержат солюбилизаторы или комплекс с циклодекстрином, имеют более высокую биодоступность (рис. 8). Фармакокинетические параметры приведены в табл. 6.

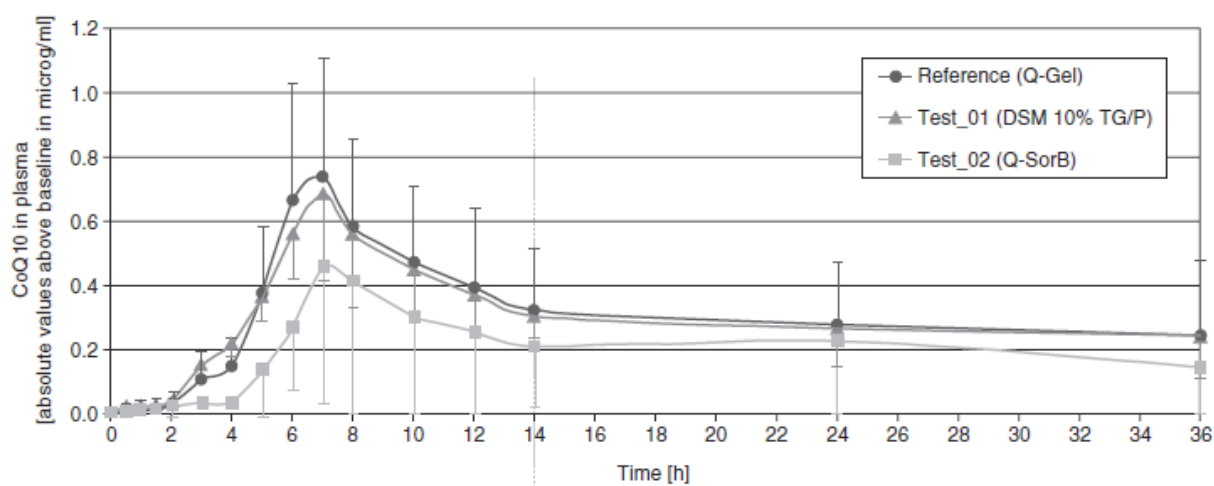


Рис. 8. Кинетические кривые убидекаренона после его приема (120 мг) в трех разных формах: Q-Gel, содержащий солюбилизованную субстанцию (Epic4Health™, Smithtown, NY), all-Q - наноразмерная субстанция 10% убидекаренона (DSM Nutritional Products Ltd, Швейцария) и Q-Sorb с солюбилизованным убидекареноном (Nature's Bounty™, Bohemia, NY).

Таблица 6. Фармакокинетические параметры трех различных форм убидекаренона ± стандартное отклонение

	$T_{1/2}$ (часы)	T_{max} (часы)	C_{max} (мкг/мл)	$AUC_{0-14ч}$ (часы*мкг/мл)
Q-Gel	$3,29 \pm 1,17$	7 ± 6	$0,7906 \pm 0,3483$	$4,9826 \pm 2,3616$
all-Q	$3,38 \pm 1,04$	7 ± 6	$0,6959 \pm 0,2127$	$4,6104 \pm 1,1751$
Q-Sorb	$2,74 \pm 1,27$	7 ± 6	$0,6230 \pm 0,4717$	$3,5605 \pm 3,168$

У четырех форм содержащих убидекаренон: жевательная вафля, жевательная вафля с витамином Е, мягкая гелевая капсула, твердая капсула. В исследовании Radu Constantinescu на людях C_{max} в плазме достигало к 6 ч, через 24 ч после приема убидекаренона наблюдался второй пик плазменных концентраций, который предположительно мог являться результатом энтерогепатической рециркуляции. По истечению 48 ч его плазменные концентрации оставались достаточно выше фонового уровня (рис.9).

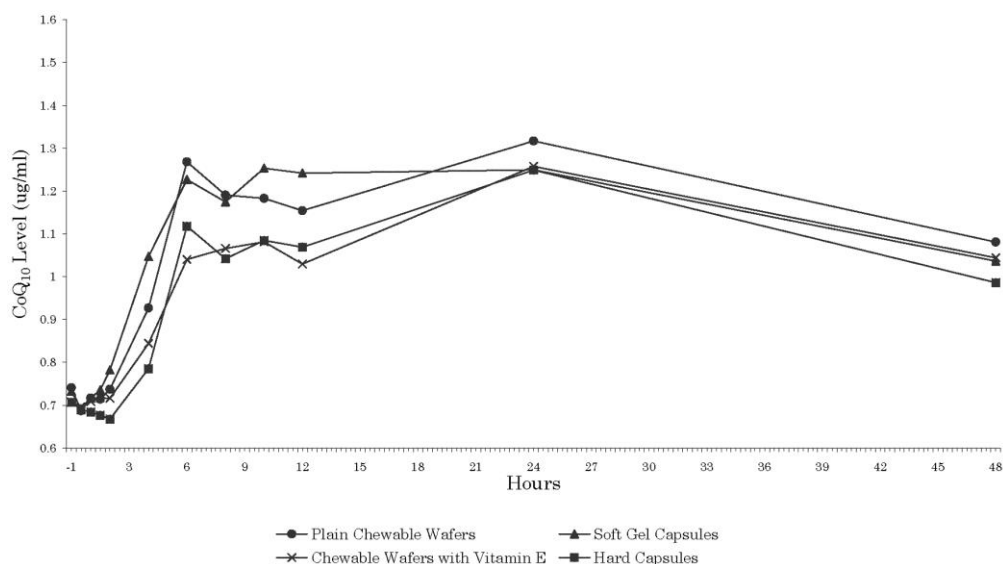


Рис. 9. Кинетические кривые для четырех разных форм убидекаренона: жевательная вафля, жевательная вафля с витамином Е, мягкая гелевая капсула, твердая капсула.

[<http://jcp.sagepub.com/content/47/12/1580.full?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=coenzyme+q10+hplc&andexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=30&resourcetype=HWCIT#F1>]

В двойном плацебо контролируемом исследовании принимали участие 20 здоровых мужчин и женщин. У добровольцев брали образцы крови на CoQ₁₀ до и после однократного приема четырех различных форм убидекаренона (120 мг) на протяжении 24 ч. Для сравнения биодоступности проводили оценку C_{max} и площади под кинетической кривой. Максимальный пик концентрации убидекаренона наблюдался у продукта А ($6,89 \pm 0,51$ мкг/мл). T_{max} у 4-х продуктов наблюдалось в интервале от 3 до 5 ч (рис.10). Фармакокинетические характеристики представлены в табл 7.

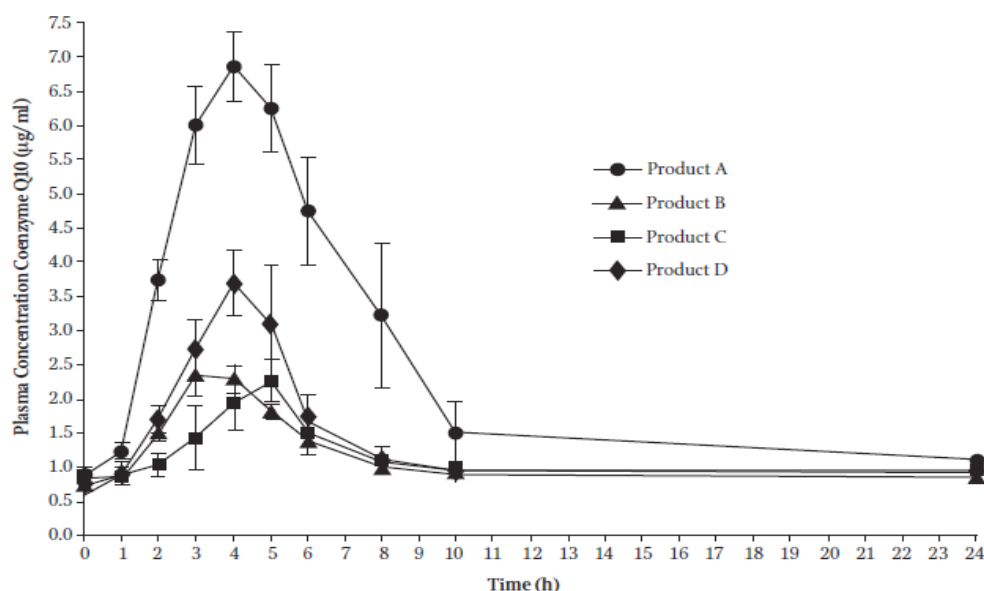


Рис. 10. Кинетические кривые плазменных концентраций 4-х препаратов убидекаренона после однократного перорального приема добровольцами в дозе 120 мг. Продукт А – капсула с коллоидным убидекареноном, продукт В – капсулы с солюбилизированным убидекареноном-1, продукт С – капсулы с убидекареноном на масляной основе, продукт D – капсулы с солюбилизированным убидекареноном-2.

Таблица 7. Фармакокинетические параметры четырех препаратов убидекаренона

	Продукт А	Продукт В	Продукт С	Продукт D
Фоновый уровень CoQ ₁₀ (мкг/мл)	0,90 ± 0,12	0,76 ± 0,11	0,82 ± 0,1	0,75 ± 0,09
T _{max} (часы)	4,20 ± 0,45	3,40 ± 0,55	5,00 ± 0,0	4,20 ± 0,45
C _{max} (мкг/мл)	6,89 ± 0,51	2,44 ± 0,31	2,24 ± 0,3	3,73 ± 0,49
AUC _{0-10ч} (часы * мкг/мл)	30,62 ± 4,24	6,14 ± 0,16	4,92 ± 1,96	10,71 ± 2, 35

Применение убидекаренона в клинической практике

Убидекаренон применяют для лечения различных заболеваний, в основном в качестве дополнительной терапии сердечно-сосудистой системы: кардиомиопатии, артериальной гипертонии [8, 25, 120, 205] хронической стенокардии [100, 159], желудочковой аритмии, наблюдается нормализация синдрома удлинённого интервала QT [111]. Показана эффективность при раке [134], пародонтозе [238], [237] и мышечной дистрофии [88].

За последние годы была проведена большая исследовательская работа, которая показала чёткую взаимосвязь между низким уровнем CoQ_{10} в крови и развитием тех или иных заболеваний, и прежде всего сердечно-сосудистой патологии [14]. Этот прорыв в изучении CoQ_{10} стал возможен благодаря успеху японских учёных, которым удалось получить само вещество в достаточном количестве, а также разработать методику определения CoQ_{10} в крови пациента с помощью метода жидкостной хроматографии.

По последним данным, накопление активных форм кислорода в миокардиальных и сосудистых клетках играет важную роль в процессах старения и патогенезе широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний [15]. Для предотвращения отрицательного воздействия активных форм кислорода клетки организма используют защитные антиоксидантные системы [11, 12].

CoQ_{10} является не только антиоксидантом, но и митохондриальным коферментом, который необходим для производства АТФ. Будучи в центре клеточных энергетических процессов, он имеет особую важность в клетках с высокими энергетическими затратами, таких как клетки сердечной мышцы, которые чрезвычайно чувствительны к дефициту CoQ_{10} , развивающемуся при различных сердечных болезнях. Таким образом, CoQ_{10} улучшает клеточную биоэнергетику в сердечной мышце при заболеваниях сердца. Кроме того, CoQ_{10} имеет антиоксидантную активность и сосудорасширяющий эффект, который может быть полезным в этом состоянии. CoQ_{10} останавливает окисление ЛПНП и таким образом тормозит прогрессию атеросклероза, уменьшает цитокины и вязкость крови, все это является полезными факторами для пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [28].

Существенные улучшения клинических и гемодинамических параметров у пациентов с сердечной недостаточностью, гипертонией, ишемической болезнью сердца, наблюдались при приеме убидекаренона дозе от 60 до 200 мг ежедневно [10]. Дальнейшие исследования убидекаренона продолжают устанавливать твердо свою роль в терапии сердечно-сосудистых заболеваний [1, 16, 17, 28, 185].

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является ведущей причиной смерти во всем мире. Цель исследования Bog-Jen Lee [126] изучение взаимосвязи между плазменными уровнями CoQ₁₀, витамина B₆ и риском ИБС. Субъекты с ИБС имели значительно более низкие плазменные уровни CoQ₁₀ и витамина B₆ по сравнению с контрольной группой. Добровольцы с более высокой концентрации CoQ₁₀ имели более низкий риск ИБС даже после поправки на факторы риска. Наблюдалась значительная корреляция между плазменными уровнями CoQ₁₀ и витамина B₆.

Изучение влияния пищевых добавок убидекаренона на маркеры воспаления (интерлейкина-6, гомоцистеина) у пациентов с ИБС проводили в исследовании [125]. Пациенты были рандомизированы на 3 группы. Первая группа получала плацебо, вторая получала убидекаренон в дозе 60 мг/день, третья – 150 мг убидекаренона в день на протяжении 12 недель. После завершения эксперимента плазменные концентрации CoQ₁₀ увеличились у пациентов обеих групп, принимавших пищевую добавку, но только в группе, употреблявшей убидекаренон в дозе 150 мг/день снизилась концентрация провоспалительного маркера интерлейкина-6.

В контролируемом исследовании, с участием 12 взрослых пациентов с хронической стенокардией, принимавших в течении 4-х недель ежедневно убидекаренон в дозе 150 мг, наблюдались повышение работоспособности и изменения графика ЭКГ при физической нагрузке [100, 159]

Исследование с участием 144 пациентов после перенесенного инфаркта миокарда показало, что 73 человека, принимавших убидекаренон (120 мг/день) в дополнении к стандартной терапии, имели редкие случаи сердечно-сосудистых событий таких как стенокардия (9,5% против 28,1%), аритмии (9,5% против 25,3%), нефатальные повторные инфаркты и сердечная смертность (15,0% против 30,9%), по сравнению с группой лиц, не принимавших убидекаренон [206].

Наблюдение за 61 пациентом с инфарктом миокарда в течение года, принимавших либо плацебо, либо убидекаренон (100 мг/день) и селен (500 мг/день) на фоне одинаковой стандартной терапии, показало, что в контрольной группе у 40% больных отмечалось удлинение интервала QT больше чем на 440 мс, и не наблюдалось в группе принимавшей убидекаренон. Стоит отметить, что предотвращение удлинения интервала Q-T способствует кардиопротекторному эффекту [111].

В своей работе Peter J и др. исследовали влияние убидекаренона и селена на уровень NT-proBNP – мозгового натрийуретического гормона, который играет важную роль в диагностике сердечной недостаточности. Пациенты в возрасте от 69 до 87 лет с различным уровнем напряжения в сердечной стенке принимали убидекаренон по 200 мг/день (Bio-Quinon 100 мг B.I.D, Pharma Nord, Vejle, Denmark) и селен по 200 мкг/день (SelenoPrecise 200 мкг, Pharma Nord) на протяжении 48 месяцев. Долгосрочный прием убидекаренона/селена снижает уровень NT-proBNP и сердечно-сосудистой смертности у пациентов с легкой и умеренной степенью нарушения сердечной функций [94].

Открытые постмаркетинговые исследования демонстрируют, что дополнительный прием убидекаренона улучшает симптомы, оцениваемые пациентом субъективно, такие как одышка или усталость, или объективные признаки, такие как повышение толерантности к физическим нагрузкам по данным 6-мин теста ходьбы, сердечный выброс [20, 90, 119, 121, 122, 161, 225].

34 пациента с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) 4 функционального класса принимавшие убидекаренон (100 мг ежедневно) в исследовании Нью-Йоркской кардиологической ассоциацией (NYHA) показали, что у 80 % больных увеличился ударный объем и сердечный индекс, а так же увеличилась выживаемость [95]. В другой серии исследований из 40 пациентов с сердечной недостаточностью II и III функциональных классов принимавших убидекаренон (100 мг ежедневно), свыше 50% показали значительные улучшения [162].

В мультицентровом исследовании наблюдали за 1715 пациентами с ХСН II и III функциональных классов, которые придерживались стандартной терапии в течение 3-х месяцев, затем в дополнении принимали убидекаренон в течении 4-х

недель (50 мг ежедневно). В результате у пациентов наблюдали уменьшение одышки в покое, цианоза, гепатомегалии, отеков и повышения давления [116].

В большом открытом постмаркетинговом исследовании в Италии с участием 2664 человек с ХСН II и III функциональных классов, принимавших убидекаренон от 50 до 150 мг/день в течение 3-х месяцев отмечали снижение цианоза (78%), уменьшение отеков (79%), уменьшение одышки (53%), аритмии (63%), бессонницы (63%), головокружения (73%) [32].

Первая половина больных в исследовании [156] принимала убидекаренон в дополнении к стандартной терапии, другая половина – плацебо. Через год у всех пациентов, принимавших убидекаренона значительно уменьшилась тяжесть симптомов и частота госпитализаций связанных с сердечной недостаточностью при отсутствии улучшений в группе, принимавших плацебо.

Замечено, что у людей с гипертонической болезнью имеются более низкие уровни CoQ_{10} относительно здоровых людей [245]. Несколько открытых исследований показывают нормализацию давления после приема убидекаренона пациентами с гипертонией [9, 18, 19].

В исследовании принимали участие 115 пациентов, из которых 60 человек страдали гипертонической болезнью, 27 имели пролапс створок митрального клапана и 28 имели синдром хронической усталости. Прием убидекаренона привел к уменьшению повышенного давления в 80% случаев и улучшению диастолической функции у всех пациентов [120].

В двойном слепом рандомизированном исследовании у пациентов с эссенциальной гипертонией и заболеванием коронарной артерии (n=59) принимающих убидекаренон (120 мг ежедневно) в течение 8 недель в дополнении к лечению антигипертензивными средствами значительно снизились следующие показатели: систолическое и диастолическое давление, уровень глюкозы, триглицеридов, пероксидов липидов в крови [205].

Итак, данные исследований на животных и пациентах свидетельствуют об эффективности применения убидекаренона при сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как сердечная недостаточность, гипертония, инфаркт миокарда.

После эпизода церебральной ишемии происходит высвобождение свободных радикалов, участвующих в развитии ишемического каскада. CoQ₁₀ – мощный антиоксидант, способный предотвратить развитие повреждающего свободнорадикального действия [5].

Grieb P, MS Ryba и др. говорят, что пероральное применение убидекаренона (10мг/кг в течение 6 дней) на модели симптоматического вазоспазма у кроликов после перевязки обеих общих сонных артерий и введения аутологичной крови в подпаутинное пространство приводило к уменьшению неврологического дефицита и гистологически определяемого повреждения ткани мозга [76].

Исследования Li H, Klein G и др. напротив, показали, что у крыс, перенесших 4-х сосудистую окклюзию (10 минут ишемии) а также у крыс, перенесших окклюзию СМА (120 минут ишемии) внутрибрюшинная инъекция убидекаренона не приводила к достоверному уменьшению повреждения нейронов и объема инфаркта [129].

В работе Ogawa N и др., было показано улучшение выживаемости монгольских песчанок при применении убидекаренона на модели односторонней окклюзии внутренней сонной артерии. Без лечения все песчанки погибали в течение 28 часов после окклюзии, а при подкожном введении капсулы с 250 мг убидекаренона – выживаемость 45 % в течение 4 недель после развития ишемического повреждения мозга [172]

Антиоксидантная роль убидекаренона изучалась Tsukahara Y, Wakatsuki A, Okatani Y на модели ишемии эмбрионального мозга крыс [225]. Исследование проводилось на эмбрионах 19-днев от начала беременности. Ишемия эмбрионального мозга проводилась путем билатеральной окклюзии маточно-яичниковой артерии в течение 20 минут с последующей реперфузией. Было показано, что эндогенный CoQ₁₀ уменьшает перекисное окисление липидов, вызванное ишемией/реперфузией.

Некоторыми авторами был оценен эффект убидекаренона на биохимические и морфологические изменения, возникающие при ишемии головного мозга на эндотелиновой модели у крыс [187]. Убидекаренон вводился интраперитонеально непосредственно перед операцией (10мг/кг), затем выполнялась инъекция эндотелина-1 или эндотелина-3 в правый латеральный желудочек мозга (20 пмоль),

что вызывало развитие ишемии головного мозга. После инъекции эндотелина обнаруживались очаги некроза и темные нейроны в церебральной коре, гиппокампе и зубчатой извилине. Вокруг некротических фокусов определялись отложения гликогена через 24 часа после ишемии. В группе с использованием убидекаренона было выявлено уменьшение лактат-ацидоза, увеличение концентрации АТФ, снижение уровня глутатиона и активности супероксиддисмутазы в стволе мозга, мозжечке и коре. Морфологически показано, что в группе с его использованием уменьшался объем очагов нейронального повреждения в коре и гиппокампальной области. Полученные данные указывают на нейропротективный эффект убидекаренона как мощного антиоксиданта, способного нивелировать действие свободных радикалов при церебральной ишемии.

Ишемия и последующая реперфузия, согласно авторам работы [188], приводит к уменьшению диаметра ядер нейронов, перикариотической зоны, а также плотности нейронов в некоторых областях коры, гиппокампе и зубчатой извилине. При применении убидекаренона отмечается нормализация размеров ядра и перикариотической зоны, уменьшается повреждение нейронов, снижается активность одного из ключевых ферментов, участвующих в апоптозе клеток – каспазы-3 (CPP32). Эффекты, которые проявил убидекаренон в данном исследовании, считают авторы, подтверждают гипотезу значимости оксидативного стресса и свободных радикалов на нейрональную патологию при ишемии. Вышеописанные результаты подтверждают важную роль апоптоза как механизма клеточной гибели и демонстрируют благоприятный эффект убидекаренона при лечении ишемических повреждений головного мозга.

Убидекаренон является потенциальным средством против рака. Исследование Folkers показало, что у пациентов с раком наблюдается дефицит CoQ₁₀ [62, 64].

В течение 18 месяцев, 32 больным в возрасте от 32 до 81 года с раком молочной железы «повышенного риска» из-за распространения метастаз по лимфе к подмышечной впадине в дополнении к хирургическому и терапевтическому лечению добавили пищевое употребление убидекаренона. Пациентам давали 90 мг

убидекаренона, антиоксиданты, витамины и минералы (витамин С 2850 мг, витамин Е 2500 IU, бета-каротин 32.5 IU, селен 387 мкг) и жирные кислоты (омега-3 и омега-6).

Ни один из пациентов не имел метастаз и ни один не умер во время исследования [134]. Исследование продолжили с увеличением дозы убидекаренона до 390 мг у 3-х из 6 пациентов. У больных принимавших убидекаренон выздоровление было зарегистрировано в течение 3-5 лет.

Имеются данные об увеличении продолжительности жизни людей с терминальной стадией рака различной локализации, принимавших антиоксиданты каждый день (витамин С 5,7 мг, α -токоферол 1,625 мг, CoQ₁₀ 300 мг, селен 487 мг, фолиевая кислота 5 мг, витамин А 25000 IU, β -каротин 76 мг). Отмечено изменение субъективных отношений пациентов к своему здоровью – подавляющее большинство пациентов отметили улучшение общего состояния после начала приема антиоксидантов [82].

В исследовании [48] приводятся обратная зависимость между циркулирующим CoQ₁₀ и риском развития рака молочной железы женщин, в то время как другое проспективное исследование коэнзима Q₁₀ обнаружили положительную корреляцию [45]. В данной статье высказывается предположение о потенциальной роли CoQ₁₀ в развитии и прогрессировании рака молочной железы при этом эпидемиологические данные отсутствуют

Robert V. Cooney предполагает, что 2 исследования не могут противоречить друг другу и указывают на возможную нелинейную (U-образную) взаимосвязь CoQ₁₀ с риском развития рака молочной железы у женщин в период постменопаузы.

В эксперименте на крысах с гепатоцеллюлярным раком печени, убидекаренон снизил перекисное окисление липидов, предотвратил снижение концентраций восстановленной формы глутатиона и активности супероксиддисмутазы так же снизил высоту концентраций фактора альфа некроза опухоли - и оксида азота в ткани печени крыс. Иммуногистохимический анализ показал, что убидекаренон значительно снизил концентрации гепатоцитарного антигена, α -фетопротейна, NO-синтазы, циклооксигеназы-2 и транскрипционного фактора NF- κ B в ткани печени крыс [68].

У больных ВИЧ отмечен низкий уровень CoQ_{10} , относительно здоровых людей. Дефицит CoQ_{10} увеличивается с увеличением тяжести заболевания отмечают авторы эксперимента [63]. В течение 4 - 7 месяцев после окончания приема убидекаренона у пациентов не наблюдались оппортунистических инфекций.

Больные ($n=14$) принимали убидекаренон в дозе 100мг/день в течение 2-х месяцев, после чего были собраны образцы крови и проведен анализ на его содержание. Авторы отмечают увеличение концентрации CoQ_{10} и соотношение T_4/T_8 лимфоцитов. Отмечено, что два пациента с диагнозом СПИД при непрерывном употреблении убидекаренона прожили в течение 4 – 5 лет без каких-либо признаков аденопатии или инфекции [62].

В 1993 Folkers и др. вводят в исследование совместное употребление убидекаренона и пиридоксина одной группе пациентов со СПИД и только убидекаренона – другой группе. Наблюдение показало увеличение в крови IgG и лимфоцитов T_4 в двух группах [64].

Исследование Ihara Y и др. показало, что уровни CoQ_{10} , витамина E, селена и альбумина у пациентов с мышечной дистрофией ниже нормы в несколько раз, а концентрация свободных радикалов, липидных пероксидов превышала норму относительно здоровых добровольцев. Авторы приходят к выводу, что повышение окислительного стресса и снижение уровня антиоксидантной активности играют важную роль в патогенезе мышечной дистрофии [88].

В 1995 г в двойном «слепом» эксперименте участвовали 12 пациентов с мышечной дистрофией в возрасте от 7 до 69 лет. Пациенты принимали убидекаренон в дозе 100 мг ежедневно в течение 3 месяцев. Было зафиксировано улучшение переносимости физической нагрузки.

Во втором двойном слепом исследовании с участием 15 пациентов с тем же уровнем дозировки убидекаренона (100 мг) имел подобные результаты. Авторы рекомендовали использовать убидекаренон в дополнении к терапии пациентов страдающих дистрофией мышц [65].

Три спорадических пациента с проксимальной мышечной слабостью и повышенным уровнем креатинкиназы были исследованы в работе [87].

Употребление высоких доз убидекарена привело к нормализации уровня креатинкиназы, улучшению субъективных ощущений и снижению утомляемости.

Исследование Noia G. и др. было выполнено для оценки плазменных уровней CoQ₁₀ при нормальной беременности, самопроизвольном аборте или угрозе выкидыша. Показано, что при беременности без патологии наблюдается нормальная кривая повышения плазменных уровней CoQ₁₀ в течение каждого триместра. Выявлена корреляция между низким уровнем CoQ₁₀ и самопроизвольный аборт. Кроме того, найдены статистически значимые различия ($p = 0,007$) между плазменной концентрацией CoQ₁₀ при нормальной беременности и при угрозе выкидыша в третий триместр. Увеличение плазменного уровня CoQ₁₀ было связано с уменьшенным спазмов утробных мышц [171].

Enrique Teran и др. опубликовали данные, которые показывают, что в амниотической жидкости беременных женщин, родивших преждевременно, был понижен уровень CoQ₁₀ относительно женщин, родивших в срок [217].

Авторы исследования [211] не рекомендуют использовать антиоксидантные комплексы во время беременности из-за увеличения концентрации маркеров окисления у крыс, которым вводили убидекарена (CoQ_{10plus}).

В эксперименте Safarinejad было показано, что добавление в рацион питания убидекарена мужчинам с идиопатической олигоастенотератозооспермией улучшило параметров спермы. Мужчины в возрасте $32,8 \pm 6,8$ ($n = 200$) принимали убидекарена в дозе 300 мг 2 раза в сутки в течение 12 месяцев. После 12-месячного приема убидекарена концентрация спермы, количество сперматозоидов с нормальной морфологией, а так же их подвижность увеличились на 113,7; 78,9; 104, 8% соответственно. Общая частота зачатия ребенка была на 34,1% выше в течение $8,4 \pm 4,7$ месяцев [198].

Подтверждение эффективности употребления убидекарена (300 мг/день, 26 недель) на параметры, функции спермы и репродуктивные гормоны у бесплодных мужчин описано в эксперименте Safarinejad [197].

Авторами двойном слепом рандомизированного эксперимента отмечено повышение активности сперматозоидов и улучшение кинетических показателей спермы у мужчин в возрасте от 27 до 39 лет ($n=60$), пораженных идиопатической

астенозооспермией и принимавших убидекаренон в дозе 200 мг/день в течение 6 месяцев [33].

В десне у пациентов с пародонтозом наблюдается снижение концентрации CoQ_{10} , в отличие от пациентов со здоровой тканью пародонта [166], [132]. CoQ_{10} подавляет окислительный стресс и может способствовать предотвращению возрастных изменений и воспалительных реакций.

Результаты исследований показали, что пероральное введение убидекаренона повышает его концентрацию в больной десне и эффективно подавляет воспаление пародонта [238]. $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ подавляет возрастные воспалительные реакции и дифференцировку остеокластов путем ингибирования окислительного стресса [248].

Совместное применение убидекаренона с препаратами, назначенными врачом, привело к скорейшему выздоровлению пациента с тяжелым пародонтозом [91, 139]. Значительные улучшения наблюдались у пациентов с пародонтозом, принимавших убидекаренон в исследованиях [81, 237, 238].

Shobha Prakash в заключении говорит, что на основе новых концепций лечения совмещения стандартной терапии с убидекареноном является эффективной и может быть средством для лечения пародонтоза [189].

Препараты статинов обладают бесспорной эффективностью при лечении гиперхолестеринемии и, как правило, хорошо переносятся большинством пациентов.

Статины ингибируют активность ГМГ-КоА редуктазы – ключевого фермента ответственного за синтез холестерина. Однако, этот фермент также участвует в синтезе CoQ_{10} . Большинство исследований показывают, что терапия статинами снижает концентрацию CoQ_{10} в крови [2, 37, 138, 183, 196], и только несколько исследований не отмечают его существенного снижения [40, 113, 137, 203]

В исследовании [37] 72 здоровых мужчины принимали эзетимиб (10 мг/день), симвастатин (40 мг/день) или комбинацию эзетимиб (10 мг/день) + симвастатин (40 мг/день) в течение 14 дней. Симвастатин и комбинация

симвастатин + эзетимиб в группах добровольцев значительно уменьшили плазменные уровни CoQ₁₀, в то время как монотерапия эзетимибом нет.

Существует значительная корреляция между снижением уровня CoQ₁₀ и снижением общего холестерина и ЛПВП во всех трех группах.

Экзогенные добавки убидекаренона предотвращают снижение концентрации убихинона в плазме крови людей, индуцированное статинами [35].

В двойном слепом исследовании [160] 45 пациентов с гиперхолестеринемией были рандомизированы на 2 группы для приема с увеличением дозы либо ловастатин (20-80 мг / день), либо правастатин (10-40 мг/день) в течение 18 недель. Дозозависимое значительное снижение общего сывороточного уровня CoQ₁₀ был найдено в группе правастатина в конце периода исследования. После терапии ловастатином снижение концентрации CoQ₁₀ было более выраженными.

Авторы исследования [71] утверждают что, лечение с помощью ГМГ-КоА-редуктазы снижает как общий холестерин так и уровень CoQ₁₀ в плазме у здоровых добровольцев и пациентов с гиперхолестеринемией. Снижение концентрации CoQ₁₀ может быть причиной деформации мембраны с последующим повреждением клеток.

Исследования [40, 113] не подтверждают гипотезу о снижении синтеза CoQ₁₀ во время приема препаратов статинов.

Добавки убидекаренона могут уменьшить боль в мышцах, связанную с приемом статинов [44, 199].

Побочные эффекты убидекаренона

Побочные эффекты, связанные с приемом CoQ₁₀ отмечаются редко. Авторы работы [82] отмечают трудность глотания и непереносимость запаха таблеток у пациентов с онкологическими заболеваниями при ухудшении состояния.

В процессе шестилетних испытаний была выявлена нейтральность убидекаренона [119].

Williams и др. в течение года исследовали возможную токсичность убидекаренона. Самцам и самкам крыс через зонд вводили препарат в дозах 100, 300, 600 и 1200 мг на кг веса. Результаты не показали никаких неблагоприятных

влияний на потребление пищи, массу тела, клинические симптомы, патологию и смертность [239].

Авторы не отмечают проявления побочных эффектов в исследовании убидекаренона на людях, получавших дозу 1200 мг/сутки с болезнью Паркинсона [201].

Без существенных побочных эффектов Singh R и др. провели эксперимент на 60 здоровых добровольцах принимавших убидекаренон в дозе 100 мг/день в течение 20 дней [204].

Больным, страдающим наследственной мозжечковой атаксией [165], назначалось до 3000 мг убидекаренона в сутки. Побочные эффекты при приеме не отмечались.

Взаимодействию убидекаренона с варфарином было описано в исследованиях [117], [209], где авторы предположительно считают, что убидекаренон может оказывать эффект, сходный с эффектом витамина К. В данный момент это не доказано и является предметом исследований [57].

Авторы статьи [10] утверждают, что Кудесан (60 мг/сутки в течение 8 недель) в дополнение к стандартной терапии больных со стенокардией достоверно улучшает клиническое состояние и не выявляет клинически значимых побочных эффектов.

Анализ литературных данных показывает, что CoQ₁₀ является чрезвычайно важным эндогенным компонентом каждой клетки организма. Собственного синтеза CoQ₁₀ не всегда достаточно для нормального функционирования, поэтому его пополнение из дополнительных источников в ряде ситуаций необходимо организму. Коэнзим Q₁₀ вовлечен в процесс выработки энергии и обладает антиоксидантными свойствами, что объясняет возможность его успешного применения в лечебной практике и профилактике широкого круга заболеваний, перечисленных выше. Не являясь панацеей от всех болезней, убидекаренон помогает организму работать более продуктивно и эффективно, стимулируя тем самым собственные процессы защиты.

Доля БАД и препаратов, содержащих убидекаренон, на фармацевтическом рынке растет с каждым годом, в связи с этим повышается актуальность их

биофармацевтического анализа, изучения и сопоставления лекарственных средств и их форм выпуска с целью выявления наиболее эффективных. Для обеспечения контроля качества фармацевтических композиций, содержащих убидекаренон, а также изучения уровней в биологическом материале используют обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ, который позволяет добиться большей селективности при совместном определении CoQ_{10} и его аналогов, относительно нормально-фазового варианта. Наиболее часто применяются спектрофотометрический, электрохимический и масс-спектрометрический методы детектирования, при этом подбирать наиболее оптимальный для анализа необходимо, учитывая их чувствительность и предел обнаружения.

Для расширения показаний к применению, а так же для использования в ургентных ситуациях необходимо искать способы увеличения биодоступности убидекаренона.

II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. Материалы и методы

Реагенты:

- Этанол «HPLC grade», MERCK
- Метанол «High Purity Solvent», Burdick & Jackson, Fluka
- Н-гексан для высокоэффективной жидкостной хроматографии, 99,85%,

«Компонент-Реактив»

- Кислота перхлорная 60% «HPLC grade», Fluka
- Натрия хлорид, MERCK
- Натрия тетрагидроборат, Aldrich
- Вода дистиллированная деионизированная

Оборудование:

- Спектрофотометр Shimadzu UV-2700 (Япония)
- Ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS mini20 (Германия)
- Весы аналитические LA-60, ACCULAB
- Центрифуга CM-50

Объекты исследования:

- Субстанция убидекаренона, Канека (Япония), чистота 98%
- Препарат Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия)

Состав препарата Кудесан:

1 мл препарата содержит:

Активное вещество: убидекаренон - 30 мг.

Вспомогательные вещества: альфа-токоферола ацетат 4,5 мг, аскорбил пальмитат 1,0 мг, макрогол глицерилгидроксистеарат (Кремофор RH-40) 105,0 мг, натрия бензоат 2,0 мг, лимонная кислота (пищевая) 1,6 мг, вода очищенная до 1 мл.

- CoQ₁₀-содержащие БАД (образцы производства ЗАО «Аквион», Москва, Россия).

Получение УФ-спектра убидекаренона

Для получения спектра готовили разведение убидекаренона (Kaneka, Япония) в этаноле. В соответствии с предписаниями Европейской фармакопеи (издание 6.0, ч. 1, раздел 2.2.24 стр. 39) навеску убидекаренона (0,005 г) отвешивали в пробирку на аналитических весах, после чего добавляли 5 мл этанола, используя водяную баню для ускорения процесса растворения субстанции. Исследуемый раствор помещали в кювету и записывали спектр убидекаренона в интервале от 220-400 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-2700 в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Получение УФ-спектра $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$

Для уточнения λ_{max} $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ использовался тот же раствор убидекаренона в этаноле (0,001% р-р), что и для обнаружения λ_{max} убихинона.

Окисленную форму убидекаренона предварительно восстанавливали с помощью добавления раствора натрия тетрагидробората в этаноле, после чего проводили анализ на спектрофотометре Shimadzu UV-2700. Полноту восстановления проверяли повторным добавлением аликвоты раствора восстановителя на ВЭЖХ-СФ.

Приготовление стандартных растворов

Серию растворов различной концентрации готовили в этаноле с использованием субстанции убидекаренона производства Kaneka (путем разбавления исходного раствора).

На аналитических весах в пробирку типа Eppendorf отвешивали навеску, равную 0,001 г и растворяли в 1 мл этанола с помощью аналитического шприца Hamilton (р-р А, концентрация 10 мг/мл). Для ускорения процесса растворения субстанции пробирку нагревали, используя водяную баню. 100 мкл р-ра А переносили в другую пробирку и доводили этанолом до 1000 мкл (р-р Б, концентрация 1 мг/мл). Концентрации 100; 10; 1; 0,1; 0,01 мкг/мл получали путем последовательного разбавления раствора исходной концентрации этанолом (1:10).

К 250 мкл раствора Б прибавляли 250 мкл этанола, что соответствовало концентрации 500 мкг/мл. Концентрации 50, 5, 0,5 мкг/мл, получали аналогичным последовательным «десятичным» способом разведения.

Приготовление модельных смесей стандартных разведений убидекаренона (TCoQ₁₀) с плазмой крови крыс

В аликвотах плазмы крови крыс методом добавок создавались концентрации убидекаренона в расчете на анализ биологических образцов на фоне его применения как лекарственного препарата, т.е. для фармакокинетических исследований.

Градуировочные графики строились методом добавки абсолютного стандарта к плазме крови.

Концентрации 750 мкг/мл и 25 мкг/мл были выбраны для отбора аликвот внешнего стандарта и внесения в пробирки с плазмой крови крыс.

0,01 г (точную навеску) убидекаренона отвешивали на аналитических весах в пробирку типа erpendorf и растворяли в 1 мл этанола (раствор с концентрацией 10 мг/мл), используя водяную баню для ускорения процесса растворения. С помощью хроматографического шприца Hamilton 750 мкл раствора (10 мг/мл) переносили в другую пробирку и добавляли 250 мкл этанола для достижения концентрации 750 мкг/мл.

100 мкл раствора с концентрацией 10 мг/мл разводили этанолом в 10 раз, после чего отбирали 25 мкл полученного раствора и доводили этанолом до 1000 мкл. Концентрация полученного раствора составляла 25 мкг/мл.

На каждую калибровочную точку отбирали по 150 мкл плазмы крови (в качестве антикоагулянта использовали раствор гепарина) крысы, к которым добавляли 5, 10, 30, 40, 50 мкл этанольного раствора убидекаренона с концентрацией 750 мкг/мл и 10 мкл раствора с концентрацией 25 мкг/мл (табл. 8).

Таблица 8. Добавки убидекаренона в плазму крови крыс

Концентрация раствора внесения (мкг/мл)	Объем аликвоты для внесения в 150 мкл плазмы	Внесено в 150 мкл плазмы (нг)	Ожидаемая добавка в 10 мкл экстракта (инжектируемая проба) (нг)
25	10	250	17
750	5	3750	250
	10	7500	500
	20	15000	1000
	30	22500	1500
	40	30000	2000
	50	37500	2500

Схема 1. Этапы пробоподготовки при ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ определении CoQ₁₀ в биоматериале



Пробоподготовка тканей органов крыс

Ткани сердца, печени и головного мозга предварительно измельчали ножницами, помещали в пробирку типа Eppendorf. ЛЖ и печень гомогенизировали в дистиллированной воде (1:4), головной мозг в этаноле (1:4). Критерием готовности гомогената была возможность дозирования его с помощью автоматической пипетки.

Разброс результатов анализа в нескольких повторностях был минимален, поэтому добавление внутреннего стандарта не являлось необходимым. Определение полноты экстракции с помощью добавок убидекаренона не может дать объективных результатов: экстрагируемый эндогенный CoQ₁₀ включен в структурные компоненты биоматериала, в то время как добавленный внутренний стандарт непредсказуемо распределится между жидким содержимым и структурными компонентами биопробы.

Гомогенизация биоматериала

Образцы миокарда (левый желудочек, ЛЖ), печени и головного мозга крысы измельчали с помощью ультразвукового гомогенизатора SONOPULS mini20 (рис. 11).



Рис. 11. Ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS mini20 (Германия).

Экстракция

Пробы плазмы, органов обрабатывались по схеме 1. Экстракцию проводили по методике Lass A. [124] с модификацией [98]. К образцам добавляли этанол и *n*-гексан (1:2:5), тщательно встряхивали в течение 10 мин, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин и отбирали верхний слой *n*-гексана. Процедуру экстракции повторяли, добавив *n*-гексан. Порции экстракта объединяли, упаривали досуха и растворяли в аликвоте этанола.

Методика ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием

Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе «Стайер» (Аквилон, Россия) методом обращеннофазовой ВЭЖХ в изократическом режиме, используя колонку Phenomenex, Luna C18, 150x4,6 мм, 5μм. Скорость подачи элюента 1,4 мл/мин (рис. 12). В качестве элюента использовали 96% этанол; время удерживания CoQ₁₀ составляло 11,85 мин (рис. 13). Хроматографические параметры рассчитывали с использованием программы МультиХром, версия 3.X.



Рис. 12. Жидкостный хроматограф «Стайер» со спектрофотометрическим детектором UVV 104M (Аквилон, Россия).

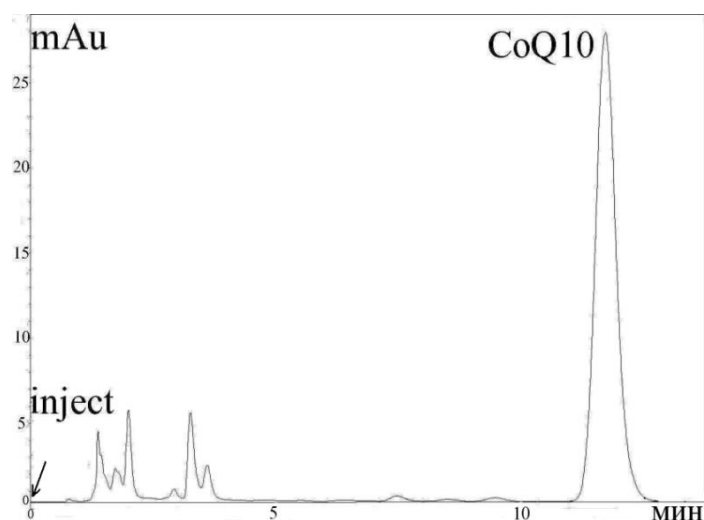


Рис. 13. Хроматограмма убидекаренона при внесении стандартного разведения в этаноле, полученная со спектрофотометрическим детектором ($\lambda_{\text{max}}=275$ нм).

Методика ВЭЖХ с электрохимическим детектированием

При электрохимическом определении CoQ_{10} использовали кулонометрический детектор «Coullocherm II» с ячейкой модели 5011 (ESA, USA), колонка Phenomenex, Luna C18, 150x4,6 мм, 5 μm . Подвижная фаза состояла из 0,3% NaCl (в/о) в смеси этанол:метанол:7% HClO_4 (975:15:10). Окисленную форму в экстракте плазмы перед внесением на колонку восстанавливали до $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ добавлением раствора натрия тетрагидробората в этаноле. Полноту восстановления проверяли повторным добавлением аликвоты раствора восстановителя. Время удерживания $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ составляло 10,0 мин (рис. 14). ЭХ-детектирование $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ осуществляли в окислительном режиме при напряжениях $-50\text{мВ}/+350\text{мВ}$ на первом/втором электродах. Регистрацию и обработку хроматографических данных проводили с помощью компьютерной программы фирмы «Environmental Sciences Associate, Inc.» (США) [98, 124].

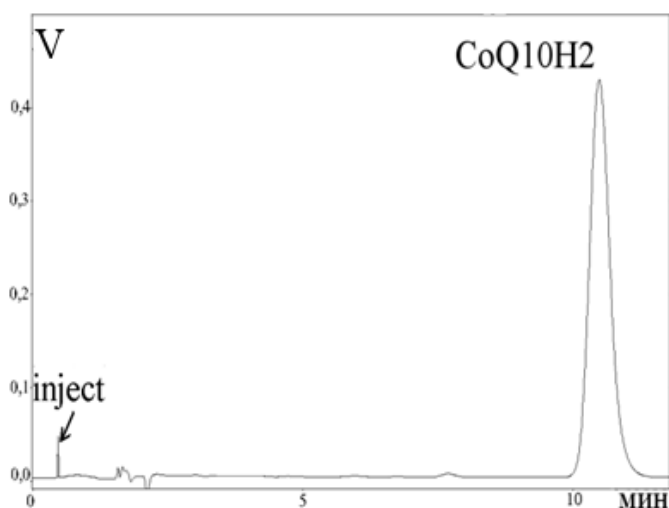


Рис. 14. Хроматограмма, полученная при анализе стандартного разведения убидекаренона в этаноле после предварительного восстановления до $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$.

Валидация методик ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ ($\lambda_{\text{max}}=275 \text{ нм}$)

Целью валидации является подтверждение того, что аналитическая методика соответствует предъявляемым к ней требованиям. Для достижения поставленной цели проводили анализ по следующим параметрам:

1) Линейность – способность аналитической методики выразить в выбранном диапазоне прямо пропорциональную зависимость между концентрацией анализируемого вещества в образце и площадью пика.

Критерии приемлемости

- График должен быть линейным;
- Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,9500

2) Предел количественного обнаружения – наименьшее количество анализируемого вещества в пробе, которое может быть определено в количественном выражении с приемлемой точностью.

Критерий приемлемости

- Соотношение сигнал/шум должно быть не менее чем 10:1

3) Предел обнаружения – наименьшее количество вещества в пробе, которое может быть обнаружено, но не оценено точно в количественном выражении.

Критерий приемлемости

- Соотношение сигнала и шума основной линии 3:1 считается достоверным.

4) Правильность – отклонение среднего результата определений, от значения, принимаемого за истинное.

Критерий приемлемости

Хроматографическая система считается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по методике (от 90%-110%).

Данный параметр рассчитывался по формуле (1):

$$R=A/B*100, \quad (1)$$

где А –измеренное содержание;

В –заданный (фактический) уровень.

5) Прецизионность – степень близости результатов для серии измерений, выполненных в одних и тех же условиях на пробах в течение небольшого промежутка времени. Прецизионность рассчитывали по формуле (2):

$$CV=S/X*100, \quad (2)$$

где X – среднее арифметическое всех определений;

S – стандартное отклонение.

Валидация разработанных методик основывалась на таких нормативных документах как ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» и фармакопея США.

Фармакокинетические исследования убидекаренона

Исследования выполнены на самцах крыс Wistar массой 230-250 г. Животных содержали в стандартных условиях согласно требованиям Council Directive 86/609/EEC (Guide for use the laboratory animals, 1996).

Все эксперименты, проводимые на животных, одобрены Комиссией по Биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Введение per os

Объектом исследования для изучения фармакокинетики и биодоступности убидекаренона после введения per os стали 5 таблетированных форм, предоставленных компанией ЗАО «Аквион», Москва, Россия и приготовленных для выявления оптимального состава. В таблетках, содержащих равную дозу убидекаренона (30 мг), были использованы различные его субстанции и различные наборы вспомогательных веществ (табл. 9).

Животным под наркозом (пентобарбитал, 50 мг/кг внутривенно) имплантировали катетер в бедренную артерию для последующего отбора образцов крови. Через сутки после операции бодрствующим животным натошак через зонд вводили в желудок порошок растертых в ступке таблеток (ЗАО «Аквион», Москва, Россия) в дозе убидекаренона 10 мг/кг в виде взвеси в 0,2% геле метилцеллюлозы (в/о; в пропорции 1 мг убидекаренона/100 мкл геля).

Животные первой группы (n=5) получали порцию взвеси растертых таблеток №1, второй (n=5) – порцию взвеси растертых таблеток №2, третьей (n=5) – порцию взвеси растертых таблеток №3, четвертой (n=5) – порцию взвеси растертых таблеток №4, пятой (n=5) – порцию взвеси растертых таблеток №5. Крысы шестой группы (контроль, n=5) получали порцию 0,2% геля метилцеллюлозы в расчете 100 мкл геля на 100 г веса животного.

Отбор проб крови (по 0,3 мл) проводили через катетер, промытый раствором гепарина, до введения препарата и спустя 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 24, 32 и 48 часов после введения. Образцы крови центрифугировали, плазму крови отбирали, замораживали и хранили при -20°C до проведения количественного анализа убидекаренона. На протяжении двух суток после введения препарата животных не кормили, не ограничивая доступ к воде.

Таблица 9. Состав исследуемых таблетированных форм, содержащих убидекаренон

Таблетки	Состав
№1 (30 мг)	Активный компонент убидекаренон 100% (субстанция фирмы Канека, Япония) Вспомогательные вещества: МКЦ 102, коллоидная двуокись кремния 380, кроскармеллоза натрия, тальк фармакопейный, стеарат магния
№2 (30 мг)	Активный компонент убидекаренон 100% (субстанция фирмы Кайова, Япония) Вспомогательные вещества: МКЦ 102, коллоидная двуокись кремния 380, кроскармеллоза натрия, тальк фармакопейный, стеарат магния
№3 (30 мг)	Активный компонент убидекаренон 10% (субстанция фирмы DSM Nutritional Products) Вспомогательные вещества: кальция цитрат 4-гидрат, коллоидная двуокись кремния, коллидон VA 64, тальк фармакопейный, стеарат магния, кроскармеллоза натрия тип А
№4 (30 мг)	Активный компонент убидекаренон 100% (субстанция фирмы Канека, Япония) Вспомогательные вещества: МКЦ 102, крахмал, кремофор, стеарат магния, аэросил, тальк
№5 (30 мг)	Активный компонент убидекаренон 100% (субстанция фирмы Кайова, Япония) Вспомогательные вещества: МКЦ 102, крахмал, кремофор, стеарат магния, аэросил, тальк

Внутривенное введение

Животным под наркозом (пентобарбитал, 50 мг/кг внутривенно) имплантировали катетеры: в бедренную вену – для введения препарата и в бедренную артерию – для последующего отбора образцов крови. Через сутки после операции бодрствующим животным натошак внутривенно вводили раствор солиubilизированного убидекаренона в дозе 10 мг/кг (препарат Кудесан, ЗАО «Аквион», Москва, Россия). На протяжении двух суток после введения убидекаренона животных не кормили, не ограничивая доступ к воде. Отбор проб крови (по 0,3 мл) проводили до и спустя 0,1; 0,25; 1; 3; 5; 7; 9; 24; 32; 48 ч после

инъекции препарата. Кровь немедленно центрифугировали, плазму отбирали, замораживали и хранили не более двух недель при -20°C до проведения анализа.

В отдельной серии экспериментов изучалась динамика уровней убидекаренона в органах после инъекции. Образцы левого желудочка сердца (ЛЖ), печени и головного мозга отбирали спустя 0,25; 0,5; 2; 6; 12; 24; 32; 48 ч после в/в введения, используя по 4 животных на каждую временную точку.

Контрольную группу составляли интактные животные, получавшие инъекцию физиологического раствора в том же объеме. Биологические материалы замораживали и хранили при -20°C до проведения анализа.

Внутримышечное введение

Животным в стерильных условиях под наркозом имплантировали катетер в бедренную вену для последующего отбора образцов крови. Через сутки после операции бодрствующим животным натошак внутримышечно вводили убидекаренон (10 мг/кг). Отбор проб крови проводили до и спустя 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 32, 48 ч после инъекции препарата. Образцы крови центрифугировали, плазму отбирали, замораживали и хранили при -20°C до проведения количественного анализа убидекаренона. На протяжении двух суток после введения препарата Кудесан животных не кормили, ограничивая доступ к воде в первые сутки.

В отдельной серии экспериментов изучалась динамика уровней убидекаренона в ЛЖ, печени и головном мозге крысы после инъекции. Образцы тканей отбирали до и спустя 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 ч после в/м введения, затем замораживали при -20°C до проведения количественного анализа убидекаренона. Контрольную группу составляли интактные животные, получавшие инъекцию физиологического раствора в том же объеме. Биологические материалы замораживали и хранили при -20°C до проведения анализа.

Расчет фармакокинетических параметров, абсолютной и относительной биодоступности при различных путях введения

Для внутримышечного, внутривенного и перорального путей введения убидекаренона были определены и рассчитаны следующие параметры фармакокинетики: $T_{\max}$ – время достижения максимальной концентрации, $C_{\max}$ – величина максимальной концентрации, AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация - время» (за вычетом величины, соответствующей концентрации до введения препарата у каждого животного), k – константа скорости снижения концентрации, $t_{1/2}$ – время двукратного снижения концентрации. Площадь под фармакокинетической кривой (AUC_{0-t}) рассчитывали методом трапеций (3).

$$AUC = (C_1/2) * \Delta t_1 + ((C_1 + C_2)/2) * \Delta t_2 + ((C_2 + C_3)/2) * \Delta t_3 \dots + AUC_{\text{ост}}, \quad (3)$$

где $AUC_{\text{ост}} = C_{\text{посл}} / K_{el}$

Оценку биодоступности солюбилизированного убидекаренона при введении внутрь проводили с привлечением данных, полученных ранее для того же препарата [99].

Расчет биодоступности (F) производится по формуле (4):

$$F = (AUC_{0-48 \text{ per os}} / AUC_{0-48 \text{ iv}}) * 100\% \quad (4)$$

Где AUC_{0-48} – площадь под кинетической кривой для внутримышечного/перорального путей введения;

$AUC_{0-48 \text{ iv}}$ – площадь под кинетической кривой при внутривенном введении той же дозы.

Константу скорости снижения концентрации (k) на конечном участке полученных кинетических кривых (24-48 ч) получали из уравнения регрессии (5), рассчитанного с использованием метода наименьших квадратов отклонений (6).

$$\ln C = \ln C_0 + k \cdot t \quad (5)$$

$$k = \frac{n \cdot \sum (x \cdot y) - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (6)$$

где n – количество экспериментальных временных точек;

x – временная точка;

y – концентрация (нг/мл), представленная в полулогарифмических значениях.

Время полувыведения определяли с учетом рассчитанного значения k по формуле:

$$t_{1/2} = 0,693 / k$$

Обработка результатов

Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка. Межгрупповые различия оценивали, используя U–критерий Манна-Уитни.

Методики определения CoQ_{10} в клинических исследованиях

В исследование были включены 24 бесплодных женщины с различными патологиями (миома матки, эндометриоз, трубно-перитонеальное бесплодие) и 10 фертильных женщин детородного возраста (контрольная группа) в возрасте от 23 до 41 года, регулярно наблюдающихся в Центре планирования семьи и репродукции.

Образцы крови отбирались в лютеиновой фазе менструального цикла (5-7 день после овуляции) до хирургического вмешательства. После центрифугирования плазму крови помещали в контейнер для транспортировки. Образцы эндометрия получали при выскабливании полости матки. Материал

доставлялся в лабораторию в течение 1-2 часов. При невозможности доставки в указанные сроки биообразцы хранили в холодильной камере.

Материал, полученный при выскабливании шейки и полости матки, собирался в отдельный контейнер. После доставки в лабораторию образцы соскобов сепарировали на предметном стекле для разделения сгустков крови, слизи и фрагментов эндометрия, подвергавшегося дальнейшей пробоподготовке. Излишки жидкости удаляли, используя фильтровальную бумагу.

Исследуемый материал (эндометрий) предварительно измельчали ножницами, помещали в пробирку типа Eppendorf, после чего гомогенизировали в дистиллированной воде (1:4) с помощью УЗ-гомогенизатора SONOPULS mini20.

Методика ВЭЖХ-ЭХ была применена к анализу CoQ_{10} в плазме крови пациентов с диагнозом ХСН II-III функциональных классов (по NYHA), участвующих в клиническом исследовании.

В основную группу вошли 9 пациентов с хронической сердечной недостаточностью II-III классов, получавших убидекаренон (в составе препарата Кудесан, 90 мг/день) дополнительно к базисной терапии в течение 6 месяцев. Группа сравнения включала 5 больных с хронической сердечной недостаточностью II-III классов, получавших базисную терапию. На первом и последнем визитах оценивалось клиническое состояние пациента.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических методов Вилкоксона (*) и Манна-Уитни (#).

ГЛАВА 2. Разработка и сравнительный анализ методик определения убидекаренона в субстанции и плазме крови, в окисленной и восстановленной формах, с помощью ВЭЖХ со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием

2.1 Сравнительный анализ методик определения убидекаренона в субстанции методом ВЭЖХ-СФ при $\lambda=275$ нм и 290 нм

В соответствии с требованиями фармакопеи Европы (издание 6.0, ч. 2, стр. 3163) хроматографический анализ убидекаренона проводят методом обращеннофазовой ВЭЖХ с детекцией в УФ-области при $\lambda=275$ нм. В то же время, Руководство по методам контроля качества и безопасности БАД Р. 4.1.1672-03, стр. 122 приводит для детектирования другую длину волны – 290 нм. Для разрешения данного противоречия необходимо провести спектральный анализ для уточнения λ_{max} убидекаренона и сопоставить чувствительность его детектирования при 275 и 290 нм.

Результаты

Полученный спектр убидекаренона в УФ-области имел максимум поглощения при $\lambda=275$ нм (рис. 15), что совпадает с данными фармакопеи Европы.

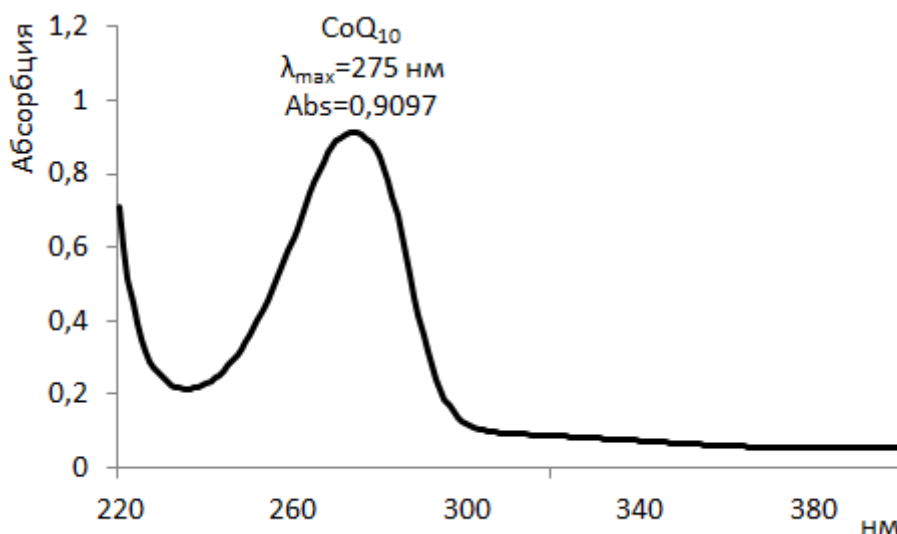


Рис. 15. УФ-спектр убидекаренона (0,001 г/мл) в этаноле (спектрофотометр Shimadzu UV-2700; $\lambda_{\text{max}}=275$ нм).

Сравнительный анализ убидекаренона методом ВЭЖХ-СФ при $\lambda=275$ нм и 290 нм

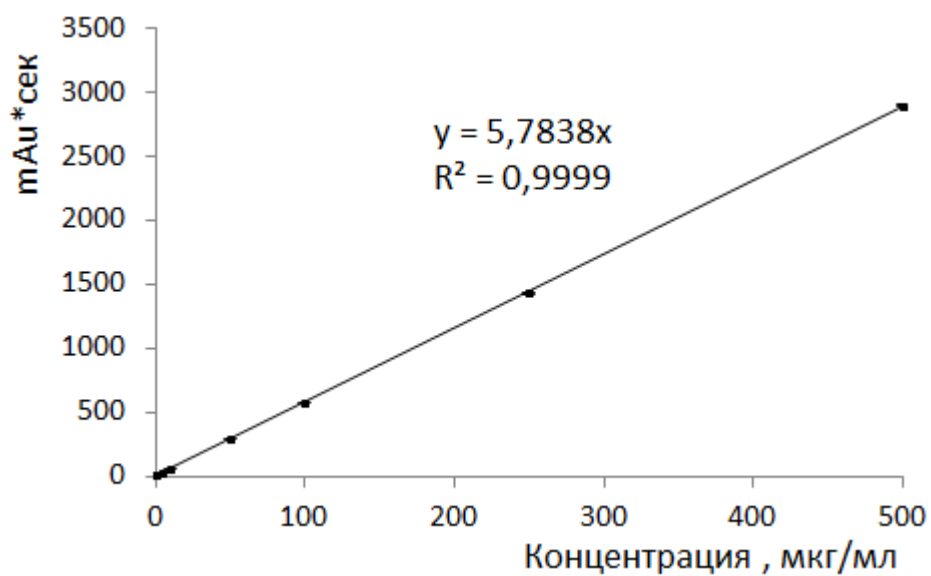
Для сопоставления чувствительности, предела обнаружения и линейности отклика детектора строились градуировочные графики для убидекаренона в стандартных спиртовых разведениях по результатам СФ-детектирования при $\lambda=275$ нм и 290 нм (табл. 10, рис. 16).

Одна и та же проба анализировалась последовательно при разных длинах волн.

Сравнение двух методик показало, что СФ-детектирование убидекаренона при 275 нм в 5 раз чувствительнее, чем при 290 нм. Предел обнаружения в инжестируемой пробе (10 мкл) составил 4 нг и 20 нг, соответственно.

Исходя из полученных результатов, в дальнейших экспериментах для ВЭЖХ-СФ анализа убидекаренона использовалась длина волны, равная 275 нм.

а



б

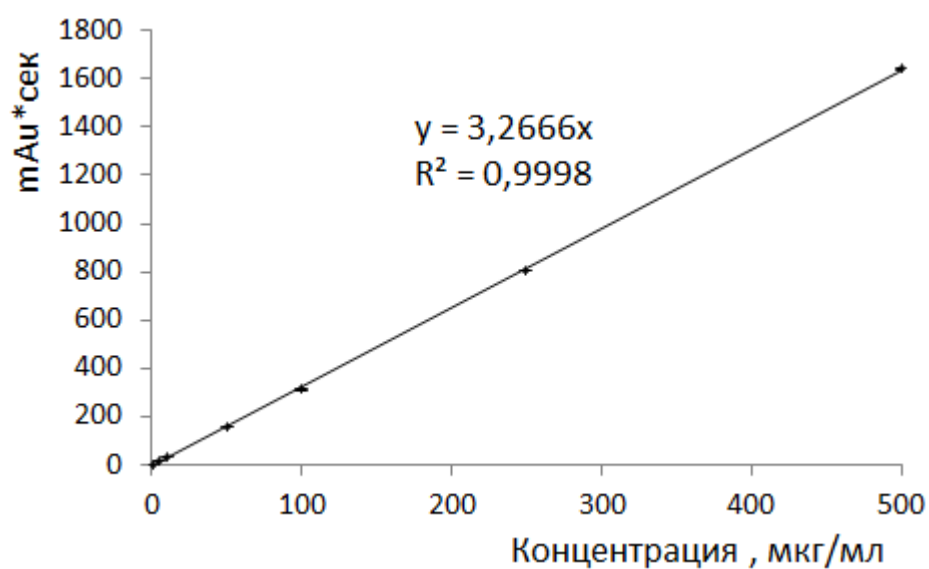


Рис. 16. Градуировочные графики, построенные для стандартных спиртовых разведений убидекаренона с использованием спектрофотометрического детектора при $\lambda_{\text{max}}=275$ нм (а) и $\lambda=290$ нм (б). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка ($n=4$).

Таблица 10. Значения, полученные по результатам СФ-детектирования убидекаренона в стандартных спиртовых разведениях при $\lambda = 275$ нм и 290 нм

Спектрофотометрическое детектирование		
Концентрация, мкг/мл	Площадь пика (mAu*сек)	
	$\lambda_{\text{max}}=275$ нм	$\lambda=290$ нм
0,2	0,86 $\pm$ 0,046	–
0,5	2,49 $\pm$ 0,09	–
1	4,53 $\pm$ 0,09	1,13 $\pm$ 0,07
5	25,83 $\pm$ 0,45	13,6 $\pm$ 0,16
10	48,43 $\pm$ 0,22	29,4 $\pm$ 0,45
50	285,5 $\pm$ 2,2	156,3 $\pm$ 0,45
100	574,8 $\pm$ 4,4	312,7 $\pm$ 2,2
250	1432 $\pm$ 5,4	806,3 $\pm$ 2,2
500	2900,2 $\pm$ 4,4	1640,4 $\pm$ 6,8

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка (n=4).

2.2 Разработка методики ВЭЖХ-СФ при $\lambda=290$ нм для убихинола и методики ВЭЖХ-СФ с переключением λ детектора с 290 на 275 нм для определения убихинона и убихинола в одной пробе

Подавляющее большинство фармацевтических продуктов содержат убидекаренон в окисленной форме. Однако некоторое количество БАД разработаны на основе убихинола – восстановленного убидекаренона, обладающего антиоксидантной активностью и повышенной биодоступностью. Поэтому актуальна разработка методик обнаружения и количественного анализа как окисленной, так и восстановленной форм убидекаренона в фармацевтических композициях и биоматериале.

Для обнаружения восстановленной и окисленной форм убидекаренона исследователи обычно используют последовательно подключенные электрохимический и СФ-детекторы [84, 118].

Спектрофотометрическое обнаружение убихинона и убихинола в одной пробе требует уточнения информации об УФ-спектре восстановленной формы убидекаренона.

Полученный спектр демонстрирует, что максимум поглощения убихинола приходится на длину волны, равную 290 нм. Для обнаружения $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в последующем использовалась данная длина волны (рис. 17).

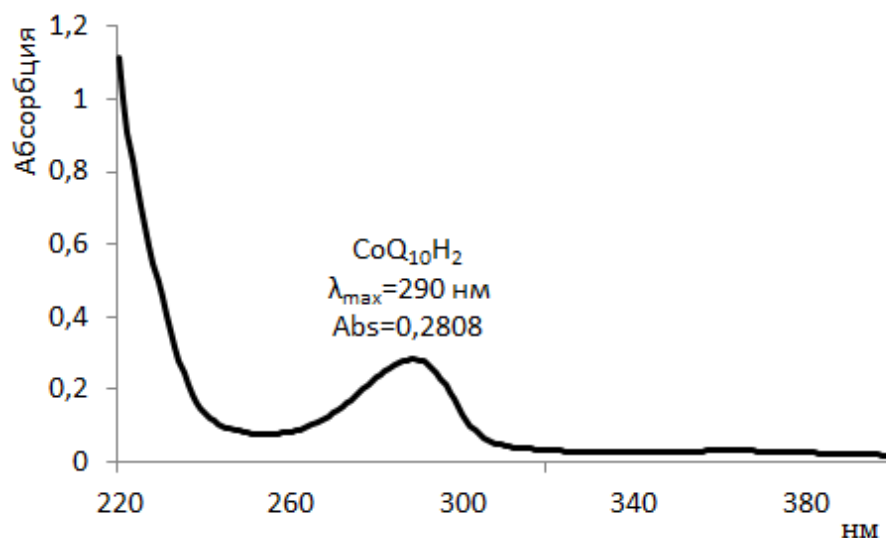


Рис. 17. УФ-спектр $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (0,001 % р-р в этаноле). Спектрофотометр Shimadzu UV-2700; $\lambda_{\text{max}}=290$ нм.

При добавлении натрия тетрагидробората к раствору убидекаренона показатель удельного поглощения снижается приблизительно в 3 раза, что сказывается на показателях чувствительности для восстановленной формы убихинона. В экстрактах биоматериала содержатся низкие концентрации убихинола, следовательно, преимущество в чувствительности остается за ВЭЖХ-ЭХ.

Для построения градуировочного графика использовались растворы убидекаренона в этаноле после предварительного восстановления натрия тетрагидроборатом (рис. 18) с концентрацией 1, 10, 50, 100, 250, 500 мкг/мл (спиртовые разведения готовились по методике, описанной в гл. материалы и методы).

Субстанция убидекаренона представлена его окисленной формой — убихиноном, что демонстрирует хроматограмма раствора, в котором отсутствует

восстановленная форма убидекаренона – убихинол (рис 18а). Внесение 10 мкл восстановителя переводит часть убихинона в убихинол (рис 18б). Повторное внесение восстановителя приводит к максимальному увеличению концентрации восстановленной формы убидекаренона в инжестируемой пробе (рис 18в).

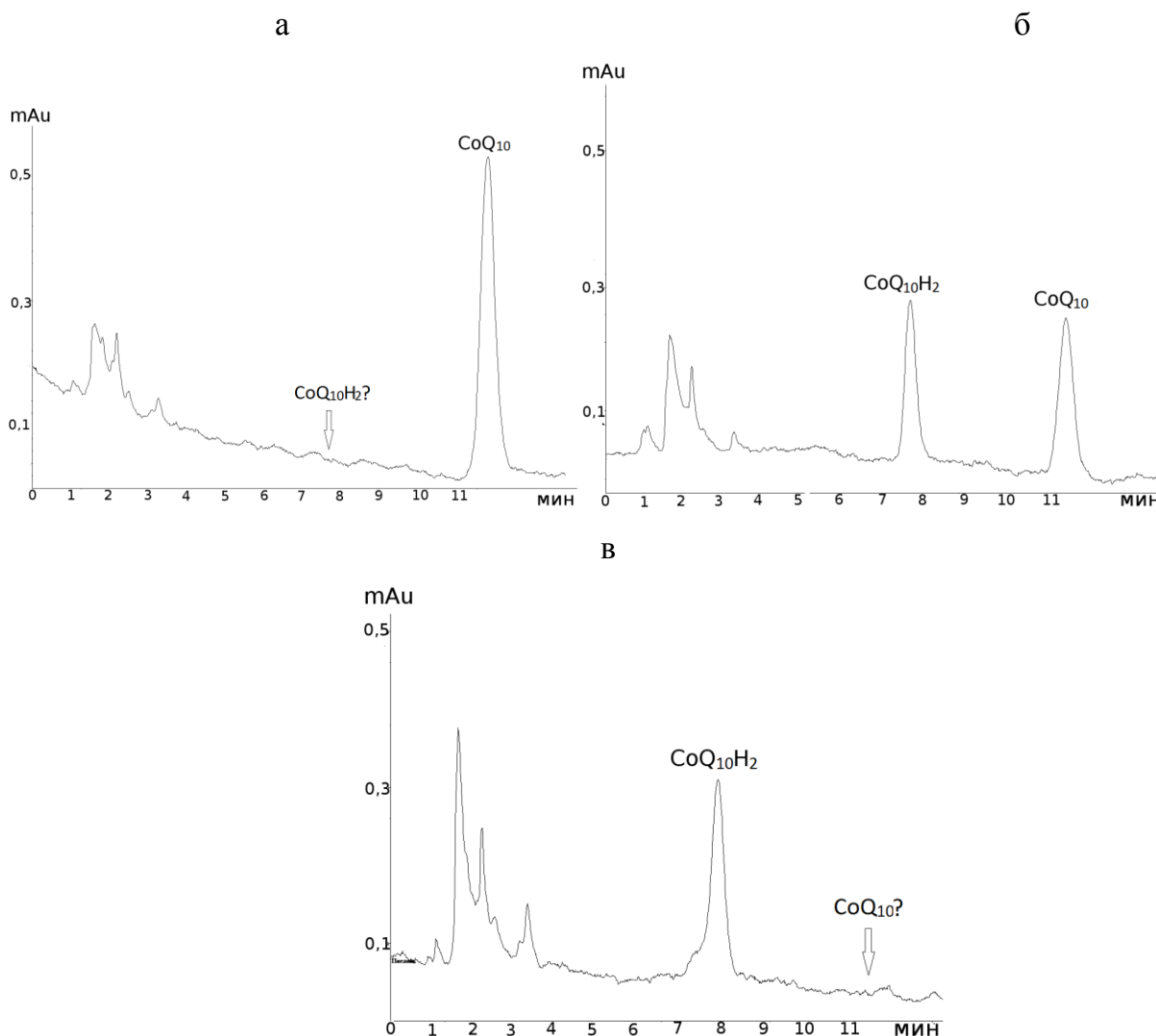


Рис.18. Хроматограммы убидекаренона при внесении стандартного разведения в этаноле (10 мкг/мл):- а) до внесения, б) с добавлением 10 мкл, в) 20 мкл натрия тетрагидробората, полученные со спектрофотометрическим детектором ($\lambda_{\text{max}}=290$ нм).

Значения, полученные по результатам ВЭЖХ с СФ-детектированием $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в стандартных спиртовых разведениях при $\lambda_{\text{max}}=290$ нм, и градуировочный график для убихинола приведены в табл. 11 и на рис. 19.

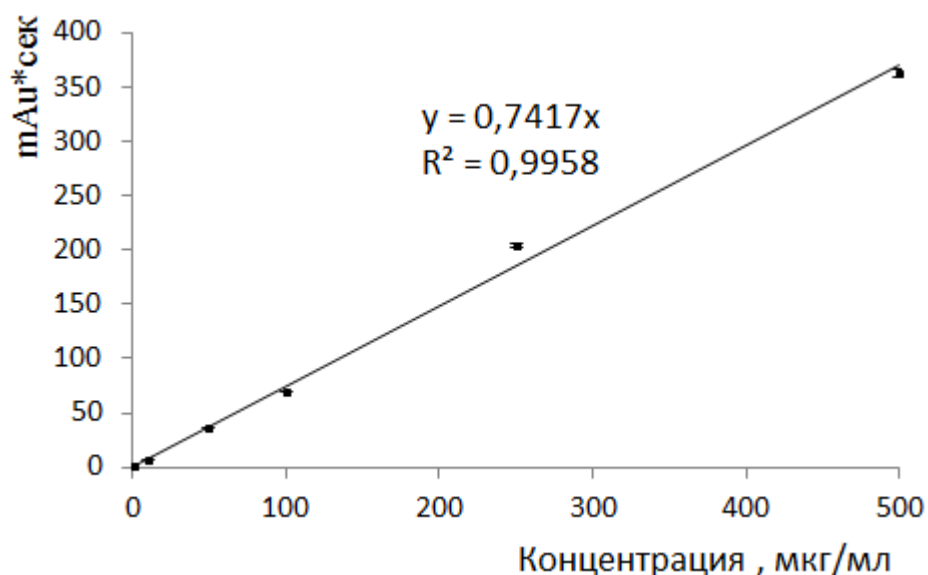


Рис. 19. Градуировочный график, построенный для стандартных спиртовых разведений $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ по результатам спектрофотометрического детектирования при $\lambda_{\text{max}}=290$ нм. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка ($n=3$).

Таблица 11. Калибровочные данные убидекаренона, полученные по результатам СФ-детектирования $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в стандартных спиртовых разведениях при $\lambda_{\text{max}}=290$ нм

Концентрация, мкг/мл	Площадь пика, mAu*сек
1	0,45±0,00
10	6,8±0,14
50	36,25±0,68
100	70,2±0,16
250	203,9±1,13
500	362,5±4,4

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка ($n=3$).

Спектрофотометрически на хроматограмме можно обнаруживать и восстановленную, и окисленную формы коэнзима Q_{10} , переключая длину волны детектора с 290 нм (λ_{max} для $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) на 275 нм (λ_{max} для CoQ_{10}) (рис. 20). Этот подход может быть применен к анализу образцов с высоким содержанием $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$

(см. предел обнаружения выше), прежде всего – к лекарственным препаратам и фармацевтическим композициям на основе убихинола.

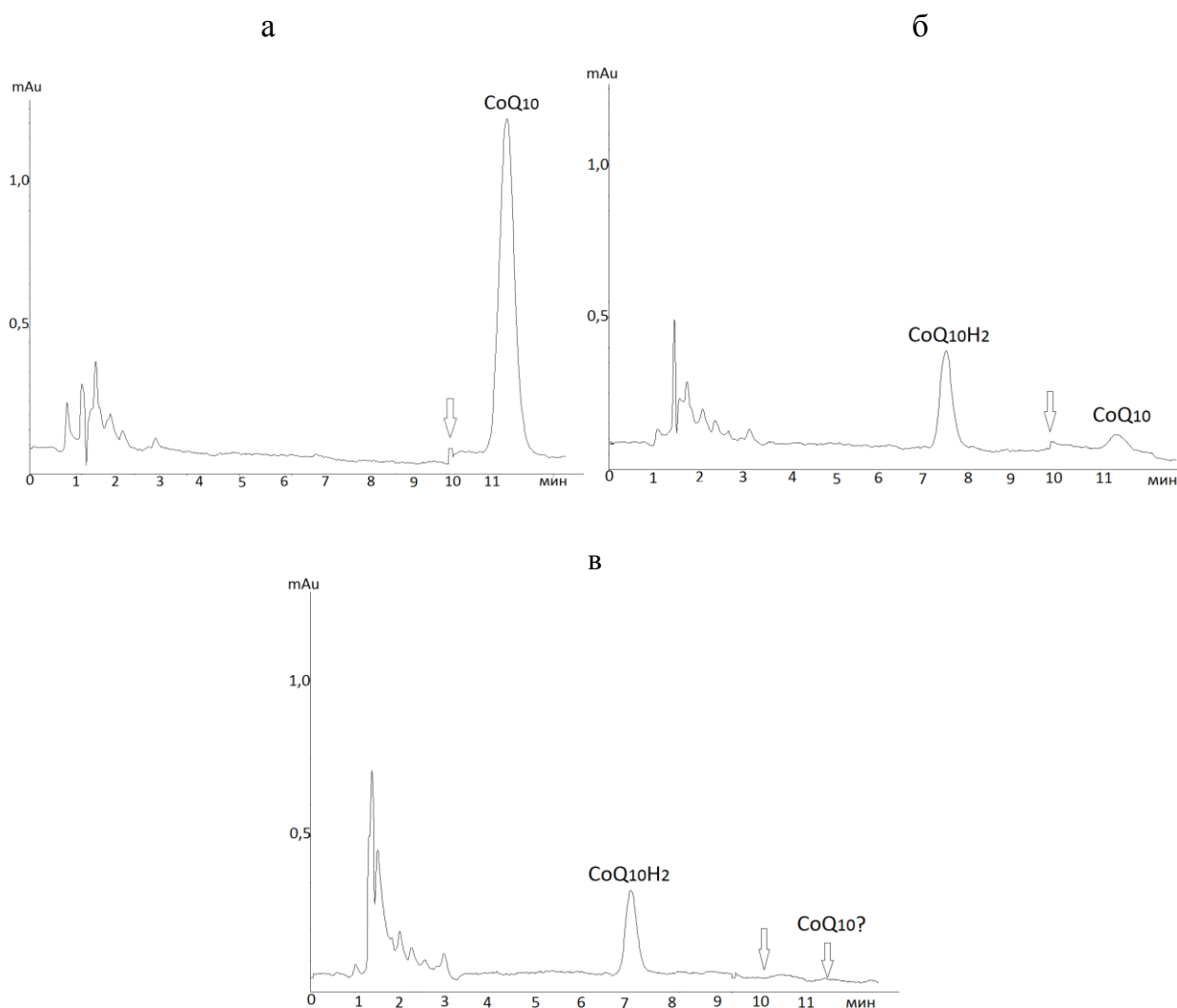


Рис. 20. Хроматограммы стандартного раствора убидекаренона в этаноле (10 мкг/мл):- а) без восстановителя б) с добавлением 10 мкл, в) 20 мкл натрия тетрагидробората. Спектрофотометрическое детектирование с переключением длины волны детектора с 290 нм на 275 нм (отмечено стрелкой).

Таким образом, ВЭЖХ-СФ методика с переключением λ с 290 нм на 275 нм позволяет одновременно определять в растворе окисленную и восстановленную формы убидекаренона, что применимо к анализу лекарственных форм на основе убихинола для его количественного определения и оценки стабильности при хранении.

2.3 Сопоставление методик ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ для определения убидекаренона в модельных смесях с плазмой крови

Определение убидекаренона (ТСоQ₁₀) методами ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ в модельных смесях с плазмой крови крыс

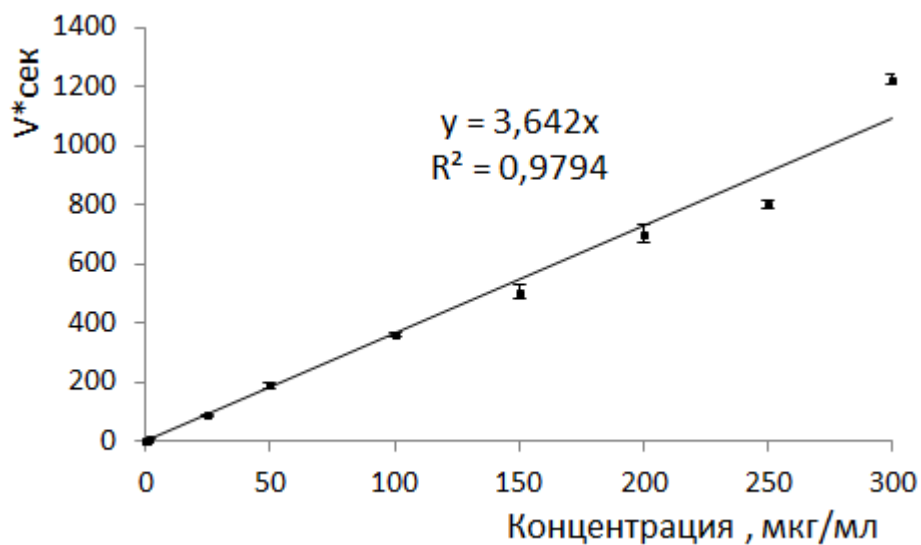
Пробы плазмы обрабатывались по схеме 1 (Гл. 1 материалы и методы), после чего экстракт делили на 2 равные части (по 75 мкл) для анализа на ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ.

По результатам анализа модельных смесей убидекаренона с плазмой крови с ЭХ- и СФ-детектированием были построены градуировочные графики (рис. 21, табл. 12).

Сопоставление данных, полученных с помощью ЭХ- и СФ-детекторов, продемонстрировало удовлетворительную сходимость результатов, что дает основание для комбинирования этих двух методик в анализе одного и того же образца плазмы крысы на содержание убидекаренона (рис. 22).

Таким образом, предел обнаружения при использовании СФ-детектора значительно выше и уступает ЭХ, но линейность в интересующем нас рабочем интервале концентраций наблюдается, что позволяет применить СФ-детектирование к анализу образцов с высоким содержанием убидекаренона в окисленной форме. Электрохимический детектор, наряду с более высокой вариабельностью отклика, обеспечивает наиболее селективное и чувствительное определение СоQ₁₀, позволяющее проводить анализ биоматериала при изучении его фармакокинетики. В биологических образцах в основном содержатся невысокие концентрации СоQ₁₀, поэтому предпочтительно использование хроматографа с ЭХ-детектированием [24].

а



б

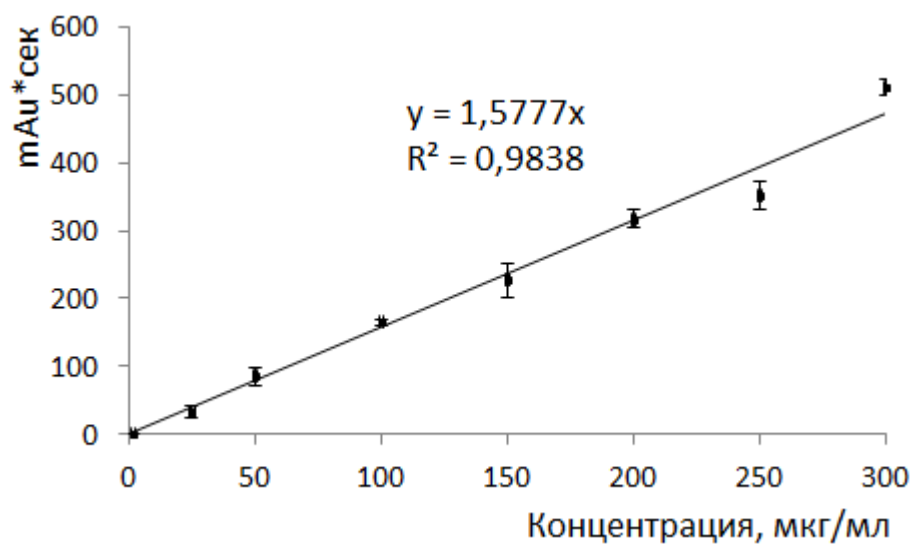


Рис. 21. Градуировочные графики, построенные по результатам ВЭЖХ-ЭХ (а) и ВЭЖХ-СФ при $\lambda_{\max}=275$ нм (б) анализа модельных смесей убидекаренона с плазмой крови. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка ($n=3$).

Таблица 12. Результаты ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ при $\lambda_{\max}=275$ нм анализа модельных смесей убидекаренона с плазмой крови*

Концентрация, мкг/мл	Площадь пика	
	ВЭЖХ-ЭХ (V*сек)	ВЭЖХ-СФ (mAu*сек)
0,01	0,03±0,001	-
0,5	1,1±0,3	-
1,7	4,45±0,67	1,14±1,14
25	86,9±3,56	33,98±9
50	189,4±9,13	86,1±13,6
100	360,9±5,57	165,4±4,53
150	503,6±24,7	226,6±25,1
200	701,9±27,85	317,2±13,6
250	799,9±15,7	351,2±20,4
300	1224±17,1	510±12

*Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка (n=3).

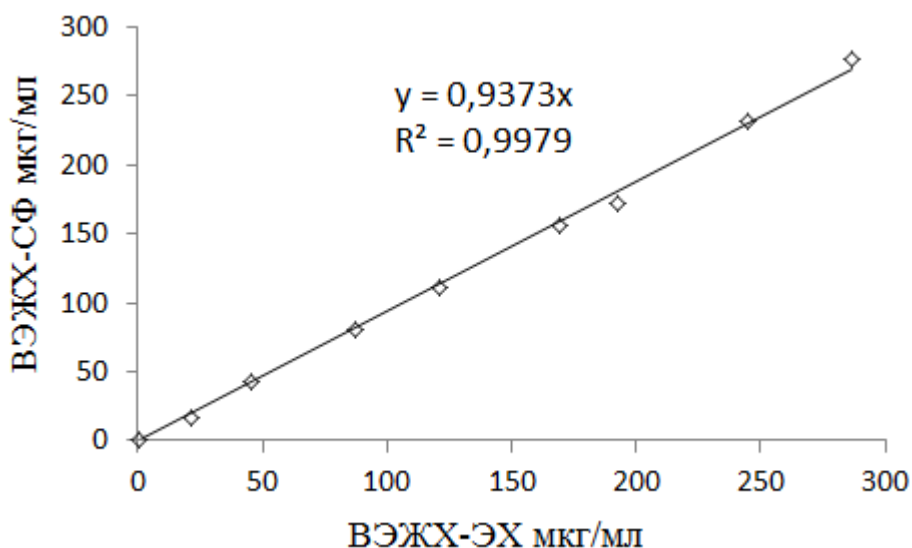


Рис. 22. Сходимость результатов определения убидекаренона в искусственных смесях с плазмой крови методом ВЭЖХ с ЭХ- и СФ-детектированием при $\lambda_{\max}=275$.

ГЛАВА 3. Оптимизация методик пробоподготовки и определения убихинона и убихинола в биоматериале

3.1 ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ определение убихинона и убихинола в плазме крови крыс

Определение соотношения окисленной и восстановленной форм CoQ_{10} в биологических объектах является отдельной аналитической задачей, так как убихинол легко окисляется до убихинона под действием различных факторов. J. Legendijk и соавт. [114] установили, что $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ нестабилен в крови, плазме и в экстракте изопропанола: соотношение $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{CoQ}_{10}$ значительно меняется уже в течении часа после отбора образцов крови. Авторы рекомендуют проводить анализ немедленно после взятия образцов, либо хранить плазму при -75°C , что в течение 13 месяцев сохраняет отношение $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{CoQ}_{10}$ неизменным. Однако есть исследования, в которых не было отмечено окисления восстановленной формы CoQ_{10} в течение определенного промежутка времени. Так, Peter H. Tang и соавт. [216] изучали стабильность $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в образцах крови. Эксперимент проводили сразу после отбора венозной крови у людей и по истечении 8 ч хранения при 4°C . Результаты показали, что в холодильной камере на протяжении 8 часов содержание $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в образцах плазмы не меняется. Wang Q и соавт. [232] также сообщают, что в свежеприготовленном спиртовом экстракте плазмы и через 12 ч сохраняется общая концентрация CoQ_{10} и соотношение убихинол/убихинон.

Изучение стабильности $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазме крови крысы при хранении

Стабильность $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазме крови при хранении в морозильной камере (-20°C) изучалась на протяжении 14 суток. Образцы плазмы крови, как фоновой, так и отобранной в первые минуты после внутривенного введения крысе раствора солубилизированного убидекаренона в дозе 10 мг/кг, были разделены на порции по 100 мкл. Определение $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и TCoQ_{10} в экстрактах плазмы проводили сразу после отбора крови и по истечении 2, 3, 4, 6, 9, 14 суток хранения порций образца при -20°C .

В этой серии экспериментов для анализа экстрактов плазмы использовали ВЭЖХ с ЭХ-детектором. Каждый экстракт анализировали дважды: до внесения восстановителя определяли концентрацию $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и затем, после полного восстановления окисленной формы раствором NaBH_4 , – общую концентрацию CoQ_{10} . Результаты количественного анализа для каждой пробы представлены как среднее значение трех измерений $\pm$ стандартная ошибка (рис. 23, 24, табл. 13,14).

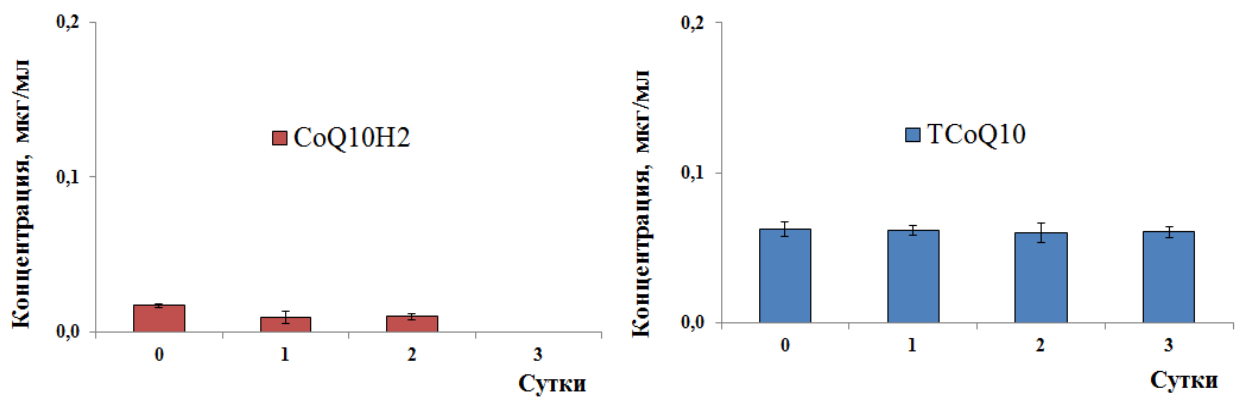


Рис. 23. Общее содержание CoQ_{10} (TCoQ_{10}) и его восстановленной формы ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) в плазме крови крыс. Представлены данные определения в аликвотах плазмы, полученные сразу после отбора образца крови и на протяжении последующих 4 суток хранения плазмы при -20°C .

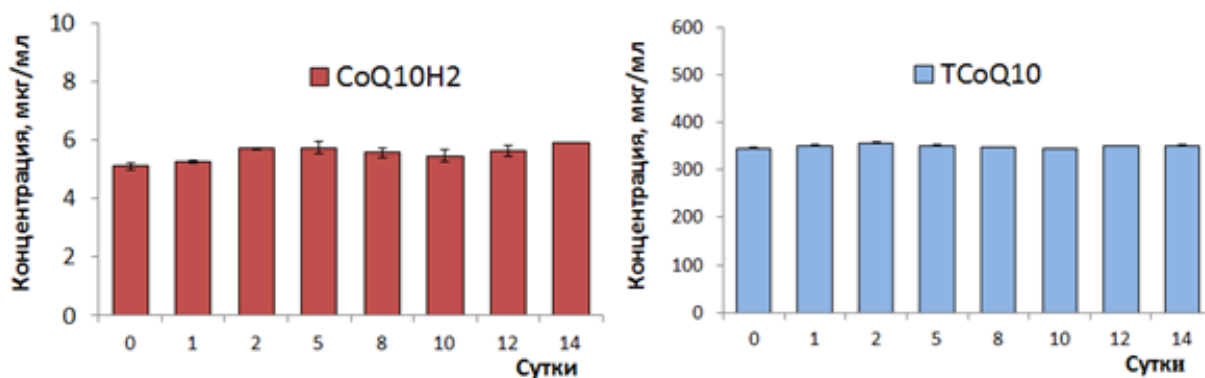


Рис. 24. Общее содержание CoQ_{10} (TCoQ_{10}) и его восстановленной формы ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) в плазме крови, отобранной после внутривенного введения крысе солубилизированного убидекаренона (10 мг/кг). Представлены данные определения в аликвотах плазмы, полученные сразу после отбора образца крови и на протяжении последующих 14 суток хранения плазмы при -20°C .

Представленные данные демонстрируют, что на протяжении 4-х дней хранения при -20°C содержание убихинола в плазме крови крыс постепенно снижается и перестает определяться к 4-м суткам, в то время как общий пул остается стабильным (рис. 23).

Таблица 13. Значения концентрации $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и TCoQ_{10} в плазме крови крысы

Сутки	$\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (мкг/мл)	TCoQ_{10} (мкг/мл)
0	$0,17 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,05$
1	$0,1 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,03$
2	$0,1 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,06$
3	–	$0,6 \pm 0,04$

Таблица 14. Значения концентрации $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и TCoQ_{10} в плазме крови, после внутри венного введения крысе препарата Кудесан (10 мг/кг)

Сутки	$\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (мкг/мл)	TCoQ_{10} (мкг/мл)
0	$5,1 \pm 0,1$	$347,1 \pm 0,2$
1	$5,3 \pm 0,1$	$352,3 \pm 2,0$
2	$5,7 \pm 0,04$	$358,1 \pm 4,1$
5	$5,7 \pm 0,02$	$352,7 \pm 2,2$
8	$5,6 \pm 0,2$	$348,4 \pm 5,4$
10	$5,5 \pm 0,2$	$346 \pm 1,8$
12	$5,6 \pm 0,2$	$351,9 \pm 8,2$
14	$5,9 \pm 0,2$	$352,4 \pm 6,2$

Общее содержание CoQ_{10} и доля $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазме крови крыс, отобранной вскоре после внутривенного введения солюбилизованного убидекаренона в течение двух недель хранения при -20°C , остаются неизменными (рис. 24). Этот результат гарантирует объективность определения TCoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в образцах

плазмы, отобранных в последующих фармакокинетических экспериментах и хранившихся до анализа в морозильной камере не более 14 суток.

Представленные результаты свидетельствуют, что физиологический уровень убихинола в плазме крови крысы снижается уже в первые сутки хранения в морозильной камере, и его полное окисление происходит к 3-м суткам хранения; при этом общее содержание CoQ_{10} остается неизменным. В то же время, хранение при -20°C плазмы крови, содержащей фармакологические концентрации убидекаренона, сохраняет общую концентрацию CoQ_{10} и его редокс-статус как минимум в течение 2-х недель.

3.2 ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ определение убихинона и убихинола в плазме крови человека: селективность и преимущества

Хроматографический анализ проводили на хроматографах с ЭХ- и СФ-детекторами с переключением длин волн СФ-детектора с 290 на 275 нм для восстановленной и окисленной форм CoQ_{10} соответственно. В исследовании использовали пробы плазмы пациентов с диагнозом хроническая сердечная недостаточность (ХСН) II-III функциональных классов (по NYHA), принимавших убидекаренон в составе препарата Кудесан (90 мг/день) в течение 6 месяцев в дополнение к стандартной терапии. Образцы плазмы обрабатывались по схеме 1. Один и тот же образец анализировался на хроматографе с СФ-, затем с ЭХ-детектированием после предварительного восстановления окисленной формы CoQ_{10} добавлением аликвоты 5% раствора натрия тетрагидробората в этаноле. Полноту восстановления проверяли повторным добавлением аликвоты раствора восстановителя. Хроматограммы экстрактов плазмы представлены на рис. 25.

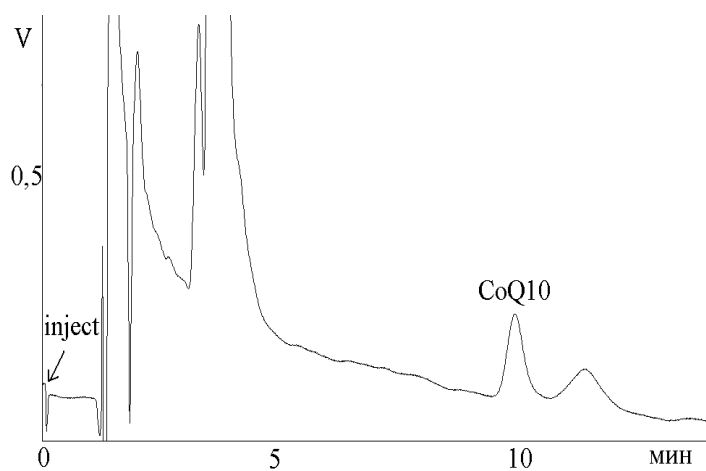
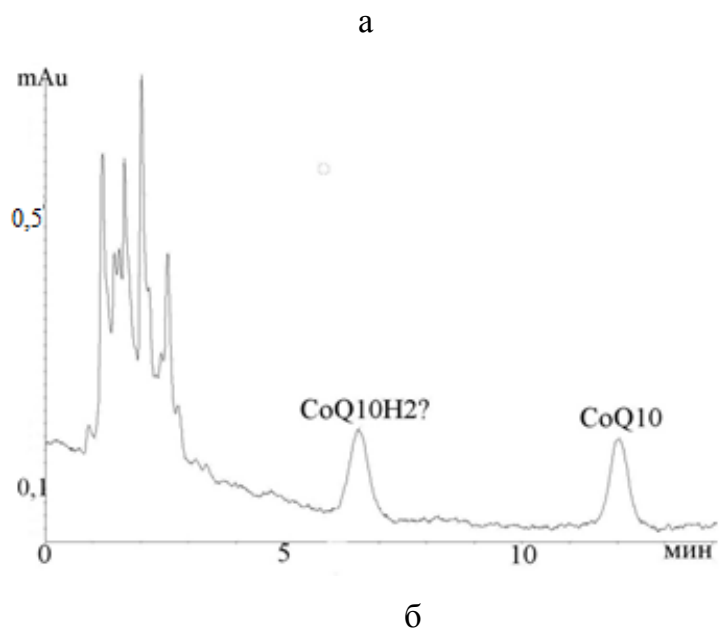


Рис. 25. Хроматограммы плазмы пациентов с ХСН II-III функциональных классов (по NYHA) с СФ- (а), ЭХ-детектированием (б).

Полученные данные свидетельствует о завышенных результатах определения общего пула CoQ_{10} при СФ-детектировании (табл. 15).

Таблица 15. Результаты анализа плазмы пациентов с ХСН II-III функциональных классов (по NYHA) на содержание убихинола и общее содержание CoQ₁₀ методами ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ

№ п/пп	ВЭЖХ-СФ			ВЭЖХ-ЭХ
	CoQ ₁₀ H ₂ (мкг/мл)	убихинон (мкг/мл)	TCoQ ₁₀ (мкг/мл)	TCoQ ₁₀ (мкг/мл)
1	1,8	1,8	3,6	2,1
2	1,2	1,9	3,1	2,2
3	4,7	1,8	6,5	2,7
4	2,2	1,6	3,8	2,3
5	0,7	1,0	1,7	1,3
6	2,0	1,3	3,2	1,3
7	2,7	1,0	3,7	1,3

Пациенты в данном исследовании принимали убидекаренон на фоне стандартной терапии, поэтому существовала возможность наложения пика лекарственного средства и/или его метаболита на пики восстановленной или окисленной форм CoQ₁₀. Для проверки данной гипотезы был проведен анализ плазмы здоровых добровольцев, не принимавших никаких препаратов, на содержание CoQ₁₀H₂ и CoQ₁₀.

Для анализа использовались образцы плазмы крови 7 здоровых добровольцев женского пола в возрасте 20 лет ± 1 год.

Результаты анализа этих образцов, приведенные в табл. 16, демонстрируют, что общее содержание CoQ₁₀, определенное с помощью СФ-детектора, в 6-ти из 7-ми случаев так же завышено по сравнению с результатами ЭХ-детектирования.

Таблица 16. Содержание убихинола ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) и общее содержание CoQ_{10} (мкг/мл) в экстрактах плазмы здоровых добровольцев: сравнение ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ

Пациенты № П/П	ВЭЖХ- СФ			ВЭЖХ-ЭХ
	$\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$	CoQ_{10}	Total Q	Total Q
1	2,4	1,1	3,5	1,8
2	2	1,4	3,4	1,6
3	3,2	1,0	4,2	2,2
4	1,6	0,8	2,4	1,2
5	2,4	0,7	3,1	1,3
6	0	1,0	1,0	1,8
7	1,6	0,7	2,3	1,0

В отдельной серии экспериментов, нами была предпринята попытка разделения пика убидекаренона и накладывающегося на него пика эндогенного происхождения. Для этого модифицировали подвижную фазу добавлением дистиллированной воды к 96% этанолу (3, 5, или 7 мл к 100 мл спирта этилового) для увеличения полярности. Используемая модификация подвижной фазы приводила к увеличению времени удерживания CoQ_{10} на колонке, при этом деформации пика не происходило, показатели симметрии сохранялись. Таким образом нам не удалось достичь увеличения селективности анализа.

Следовательно, при использованном нами способе пробоподготовки СФ-детектирование не дает правильных данных при определении убихинона и убихинола в плазме крови человека, в подавляющем большинстве случаев завышая результат. Поэтому при разработке ВЭЖХ-СФ методик определения CoQ_{10} в биоматериале необходимо проводить их сравнение с более селективным методом, например, ВЭЖХ-ЭХ. Для определения эндогенного общего пула коэнзима Q_{10} , а также его окисленной и восстановленной форм надежнее использовать более селективное ЭХ-детектирование.

3.3 Разработка режимов гомогенизации биоматериала с помощью ультразвукового гомогенизатора

Эффективность и воспроизводимость экстракции веществ из биоматериала напрямую зависит от качества их гомогенизации, поэтому стандартизация процесса получения гомогенатов тканей будет способствовать повышению точности анализа. В нашей работе использовался ультразвуковой гомогенизатор SONOPLUS mini20 «BANDELIN electronic», GmbH Co. KG, Германия (рис. 11).

Разработчиками прибора предусмотрено, что режим гомогенизации подбирается индивидуально: с учетом вида ткани и контейнера, в котором проходит процесс гомогенизации. Следовательно, очередной задачей явился подбор режимов гомогенизации образцов тканей миокарда, печени, головного мозга крыс для применения в фармакокинетическом эксперименте.

Исследованы все стадии мощности (2,5-8,5 Pw (Вт)) с шагом в 0,5 Pw (Вт), различные временные интервалы воздействия (10, 15, 20 сек.) и их количество. Всего опробовано 36 режимов гомогенизации (табл. 17, 18, 19) и выбрано 3 наиболее оптимальных по следующим физическим параметрам: максимальное раздробление тканей без видимой денатурации белков при минимальных временных воздействиях.

Количественное определение CoQ₁₀ методом ВЭЖХ с ЭХ-детектированием выявило статистически значимые различия между режимами. Результаты анализа экстрактов из гомогенатов образцов биоматериалов на содержание CoQ₁₀ отображены в табл. 20, 21, 22.

Таблица 17. Отработка режимов гомогенизации ЛЖ крысы

№ п/п	Мощность	Длительность интервалов воздействия/ количество интервалов
1	2,5 P _W (ВТ)	10 сек/68 (11,3 мин)
2	2,5 P _W (ВТ)	15 сек/65 (16,3 мин)
3	2,5 P _W (ВТ)	20 сек/65 (21,6 мин)
4	3,0 P _W (ВТ)	10 сек/62 (10,3 мин)
5	3,0 P _W (ВТ)	15 сек/ 60 (20 мин).
6	3,0 P _W (ВТ)	20 сек/60 (20 мин)
7	3,5 P _W (ВТ)	10 сек/60 (10 мин).
8	3,5 P _W (ВТ)	15 сек/55 (18,3 мин)
9	3,5 P _W (ВТ)	20 сек/55 (18,3 мин)
10	4,0 P _W (ВТ)	10 сек/50 (8,3 мин).
11	4,0 P _W (ВТ)	15 сек/50 (12,5 мин)
12	4,0 P _W (ВТ)	20 сек/50 (16,6 мин).
13	4,5 P _W (ВТ)	10 сек/50 (8,3 мин)
14	4,5 P _W (ВТ)	15 сек/48 (16 мин)
15	4,5 P _W (ВТ)	20 сек/48 (16 мин)
16	5,0 P _W (ВТ)	10 сек/48 (8 мин)
17	5,0 P _W (ВТ)	15 сек./44 (11 мин)
18	5,0 P _W (ВТ)	20 сек/44 (14,7 мин)
19	5,5 P _W (ВТ)	10 сек/40 (6.6 мин)
20	5,5 P _W (ВТ)	15 сек/40 (10 мин)
21	5,5 P _W (ВТ)	20 сек/40 (13,3 мин)
22	6,0 P _W (ВТ)	10 сек/35 (5,8 мин)
23	6,0 P _W (ВТ)	15 сек/38 (12,7 мин)
24	6,0 P _W (ВТ)	20 сек/38 (12,7 мин)
25	6,5 P_W (ВТ)	10 сек/36 (6 мин)
26	6,5 P _W (ВТ)	15 сек/35 (8,8 мин)
27	6,5 P _W (ВТ)	20 сек/38 (12,7 мин)
28	7,0 P _W (ВТ)	10 сек/28 (4,6 мин)
29	7,0 P _W (ВТ)	15 сек/30 (7,5 мин)
30	7,0 P _W (ВТ)	20 сек/30 (10 мин)
31	7,5 P _W (ВТ)	10 сек/28 (4,7 мин)
32	7,5 P _W (ВТ)	15 сек/23 (5,8 мин)
33	7,5 P _W (ВТ)	20 сек./ 19 (6,3 мин)
34	8,0 P_W (ВТ)	10 сек/25 (4,20 мин)
35	8,0 P_W (ВТ)	15 сек/25 (6,25 мин)
36	8,0 P _W (ВТ)	20 сек/20 (6,6 мин)

Таблица 18. Отработка режимов гомогенизации печени крысы

№ п/п	Мощность	Длительность интервалов воздействия/ количество интервалов
1	2,5 P _W (Вт)	10 сек/30 (5 мин)
2	2,5 P _W (Вт)	15 сек/30 (7,5 мин)
3	2,5 P _W (Вт)	20 сек/30 (10 мин)
4	3,0 P _W (Вт)	10 сек/29 (4,8 мин)
5	3,0 P _W (Вт)	15 сек/29 (7,25 мин)
6	3,0 P _W (Вт)	20 сек/29 (9,7 мин)
7	3,5 P _W (Вт)	10 сек/25 (4,2 мин)
8	3,5 P _W (Вт)	15 сек/25 (6,25 мин)
9	3,5 P _W (Вт)	20 сек/25 (8,3 мин)
10	4,0 P _W (Вт)	10 сек/23 (3,83 мин)
11	4,0 P _W (Вт)	15 сек/23 (5,7 мин)
12	4,0 P _W (Вт)	20 сек/23 (7,6 мин)
13	4,5 P _W (Вт)	10 сек/22 (3,6 мин)
14	4,5 P _W (Вт)	15 сек/ 22 (5,5 мин)
15	4,5 P _W (Вт)	20 сек/ 21 (7 мин)
16	5,0 P _W (Вт)	10 сек/21 (3,5 мин)
17	5,0 P _W (Вт)	15 сек/21 (5,25 мин)
18	5,0 P _W (Вт)	20 сек/20 (6,7 мин)
19	5,5 P _W (Вт)	10 сек/19 (3,2 мин)
20	5,5 P _W (Вт)	15 сек/19 (4,75 мин)
21	5,5 P _W (Вт)	20 сек/19 (6,3 мин)
22	6,0 P _W (Вт)	10 сек/18 (3 мин)
23	6,0 P _W (Вт)	15 сек/16 (4 мин)
24	6,0 P _W (Вт)	20 сек/16 (5,3 мин)
25	6,5 P _W (Вт)	10 сек/17 (2,8 мин)
26	6,5 P _W (Вт)	15 сек/16 (4 мин)
27	6,5 P _W (Вт)	20 сек/15 (5 мин)
28	7,0 P _W (Вт)	10 сек/16 (2,7 мин)
29	7,0 P _W (Вт)	15 сек/13 (3,25 мин)
30	7,0 P _W (Вт)	20 сек/13 (4,3 мин)
31	7,5 P_W (Вт)	10 сек/15 (2,5 мин)
32	7,5 P _W (Вт)	15 сек/13 (3,25 мин)
33	7,5 P _W (Вт)	20 сек/13 (4,3 мин)
34	8,0 P_W (Вт)	10 сек/12 (2 мин)
35	8,0 P_W (Вт)	15 сек/10 (2,5 мин)
36	8,0 P _W (Вт)	20 сек/10 (3,3 мин)

Таблица 19. Отработка режимов гомогенизации головного мозга крысы

№ п/п	Мощность	Длительность интервалов воздействия/ количество интервалов
1	2,5 P _W (ВТ)	10 сек/33 (5,5 мин)
2	2,5 P _W (ВТ)	15 сек/34 (8,5 мин)
3	2,5 P _W (ВТ)	20 сек/34 (11,3 мин)
4	3,0 P _W (ВТ)	10 сек/30 (5 мин)
5	3,0 P _W (ВТ)	15 сек/29 (7,25 мин)
6	3,0 P _W (ВТ)	20 сек/29 (9,7 мин)
7	3,5 P _W (ВТ)	10 сек/25 (4,2 мин)
8	3,5 P _W (ВТ)	15 сек/24 (6 мин)
9	3,5 P _W (ВТ)	20 сек/24 (8 мин)
10	4,0 P _W (ВТ)	10 сек/22 (3,7 мин)
11	4,0 P _W (ВТ)	15 сек/23 (5,7 мин)
12	4,0 P _W (ВТ)	20 сек/23 (7,6 мин)
13	4,5 P _W (ВТ)	10 сек/21 (3,5 мин)
14	4,5 P _W (ВТ)	15 сек/ 22 (5,5 мин)
15	4,5 P _W (ВТ)	20 сек/ 21 (7 мин)
16	5,0 P _W (ВТ)	10 сек/20 (3,3 мин)
17	5,0 P _W (ВТ)	15 сек/20 (5 мин)
18	5,0 P _W (ВТ)	20 сек/20 (6,7 мин)
19	5,5 P _W (ВТ)	10 сек/19 (3,2 мин)
20	5,5 P _W (ВТ)	15 сек/17 (4,25 мин)
21	5,5 P _W (ВТ)	20 сек/16 (5,3 мин)
22	6,0 P _W (ВТ)	10 сек/18 (3 мин)
23	6,0 P _W (ВТ)	15 сек/16 (4 мин)
24	6,0 P _W (ВТ)	20 сек/16 (5,3 мин)
25	6,5 P _W (ВТ)	10 сек/17 (2,8 мин)
26	6,5 P _W (ВТ)	15 сек/15 (3,8 мин)
27	6,5 P _W (ВТ)	20 сек/15 (5 мин)
28	7,0 P _W (ВТ)	10 сек/15 (2,5 мин)
29	7,0 P _W (ВТ)	15 сек/13 (3,25 мин)
30	7,0 P _W (ВТ)	20 сек/13 (4,3 мин)
31	7,5 P_W (ВТ)	10 сек/14 (2,3 мин)
32	7,5 P _W (ВТ)	15 сек/13 (3,25 мин)
33	7,5 P _W (ВТ)	20 сек/11 (3,7 мин)
34	8,0 P_W (ВТ)	10 сек/12 (2 мин)
35	8,0 P_W (ВТ)	15 сек/10 (2,5 мин)
36	8,0 P _W (ВТ)	20 сек/11 (3,7 мин)

Таблица 20. Оптимальные режимы гомогенизации миокарда крысы и результаты количественного определения CoQ₁₀ методом ВЭЖХ-ЭХ

Режимы № п/п	Мощность Pw (Вт)	Длительность интервалов воздействия/кол-во интервалов	№ образца	CoQ ₁₀ (мкг/г)	Ср. зн ± ст.откл (мкг/г)
25	6,5	10 сек/36 (6 мин)	1	13,2	13,5±0,3
			2	13,8	
			3	13,3	
			4	13,9	
			5	13,5	
34	8,0	10 сек/25 (4,20 мин)	1	16,3	*16,8±0,3 p<0,05
			2	16,8	
			3	17,1	
			4	16,8	
			5	16,8	
35	20,	15 сек/25 (6,25 мин)	1	14,7	15,3±1
			2	14,3	
			3	15,4	
			4	16,9	
			5	15,3	

Таблица 21. Оптимальные режимы гомогенизации печени крысы и результаты количественного определения CoQ_{10} методом ВЭЖХ-ЭХ

Режимы № п/п	Мощность P_w (Вт)	Длительность интервалов воздействия/кол- во интервалов	№ образца	CoQ_{10} (мкг/г)	Ср. зн $\pm$ ст.откл (мкг/г)
31	7,5 P_w (Вт)	10 сек/15 (2,5 мин)	1	16,5	16,3 $\pm$ 0,24
			2	16,0	
			3	16,6	
			4	16,2	
			5	16,4	
34	8,0 P_w (Вт)	10 сек/12 (2 мин)	1	16,5	16,5 $\pm$ 0,15
			2	16,3	
			3	16,7	
			4	16,4	
			5	16,5	
35	8,0 P_w (Вт)	15 сек/10 (2,5 мин)	1	16,4	16,4 $\pm$ 0,11
			2	16,4	
			3	16,6	
			4	16,3	
			5	16,5	

Концентрация CoQ_{10} в печени, по данным источника [227], составляет 21 мкг/г, что несколько расходится с данными, полученными в нашем исследовании. Отклонение концентрации CoQ_{10} в данном органе, возможно, связано с особенностями крыс Wistar, использованных нами в данном и в последующих фармакокинетических исследованиях.

Таблица 22. Оптимальные режимы гомогенизации головного мозга крысы и результаты количественного определения CoQ_{10} методом ВЭЖХ-ЭХ

Режимы № п/п	Мощность P_w (Вт)	Длительность интервалов воздействия/кол- во интервалов	№ образца	CoQ_{10} (мкг/г)	Ср. зн $\pm$ ст.откл (мкг/г)
31	7,5 P_w (Вт)	10 сек/14 (2,3 мин)	1	22,3	20,5 $\pm$ 1,2*
			2	20,0	
			3	20,0	
			4	20,9	
			5	19,2	
34	8,0 P_w (Вт)	10 сек/12 (2 мин)	1	21,5	20,9 $\pm$ 0,6*
			2	20,8	
			3	20,9	
			4	20,0	
			5	21,1	
35	8,0 P_w (Вт)	15 сек/10 (2,5 мин)	1	21,0	21,1 $\pm$ 0,7*
			2	21,3	
			3	21,5	
			4	19,9	
			5	21,8	

*Полученные данные совпадают с литературными [227].

Применение выбранного оптимального режима гомогенизации тканей с помощью ультразвукового гомогенизатора SONOPULOS mini20 стандартизует этот этап пробоподготовки, что способствует лучшей воспроизводимости результатов анализа.

3.4 Выбор метода детектирования CoQ_{10} в экстрактах биоматериала

Содержание убихинона во внутренних органах (миокарде, печени, головном мозге) достаточно высокое (10^{-5} - 10^{-4} г/г ткани), поэтому была поставлена задача оценить возможность применения ВЭЖХ с СФ-детектированием для анализа CoQ_{10} в биоматериале, пользуясь выбранной методикой экстракции.

Анализируя экстракты ЛЖ, мозга и печени крыс мы получили хроматограммы, представленные на рис. 26, где видно, что пиков,

соответствующих по времени выхода окисленной и восстановленной формам CoQ_{10} , не наблюдается.

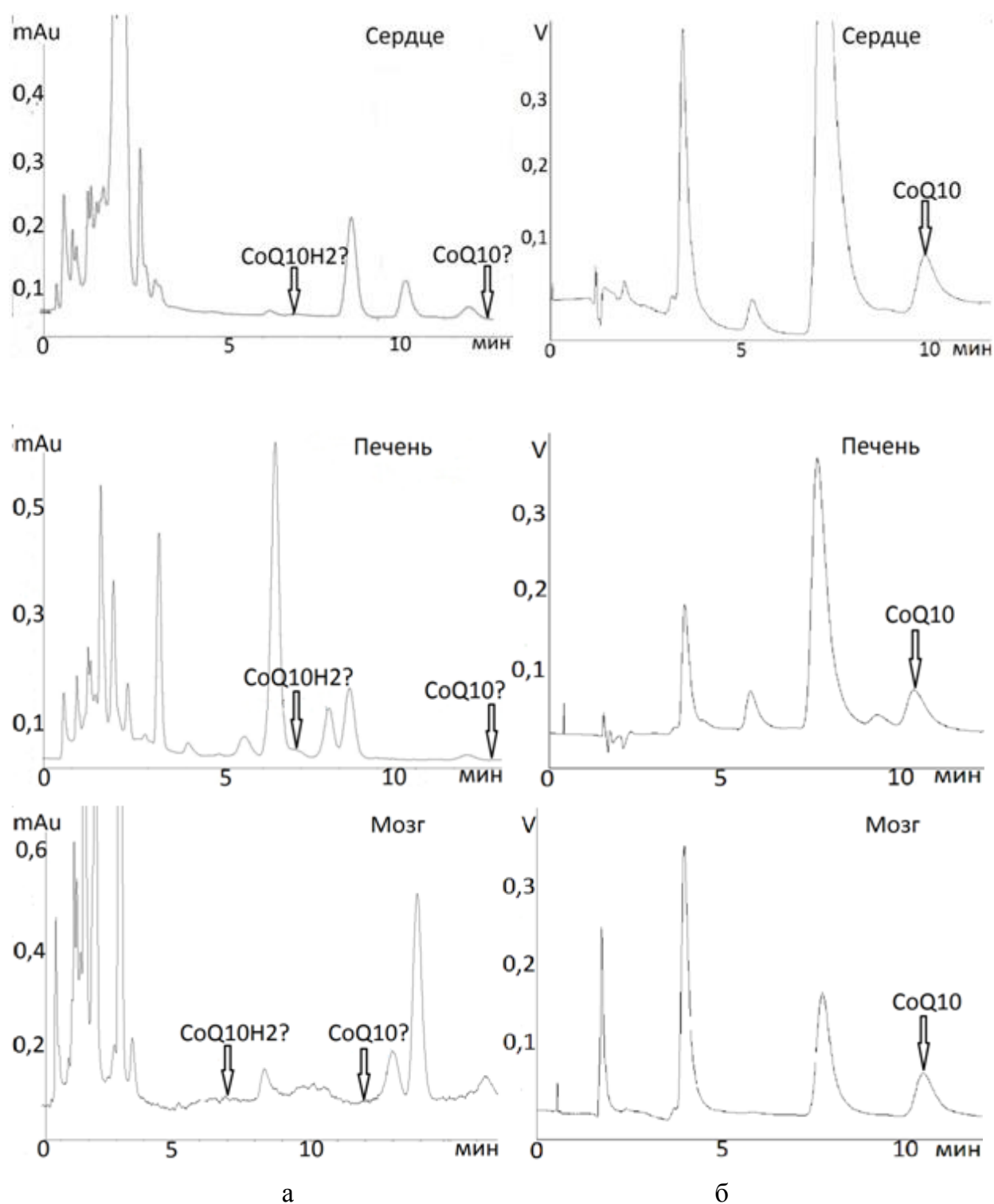


Рис. 26. Хроматографическое разделение CoQ_{10} , его окисленной и восстановленной форм методом ВЭЖХ-СФ (а), ВЭЖХ-ЭХ (б).

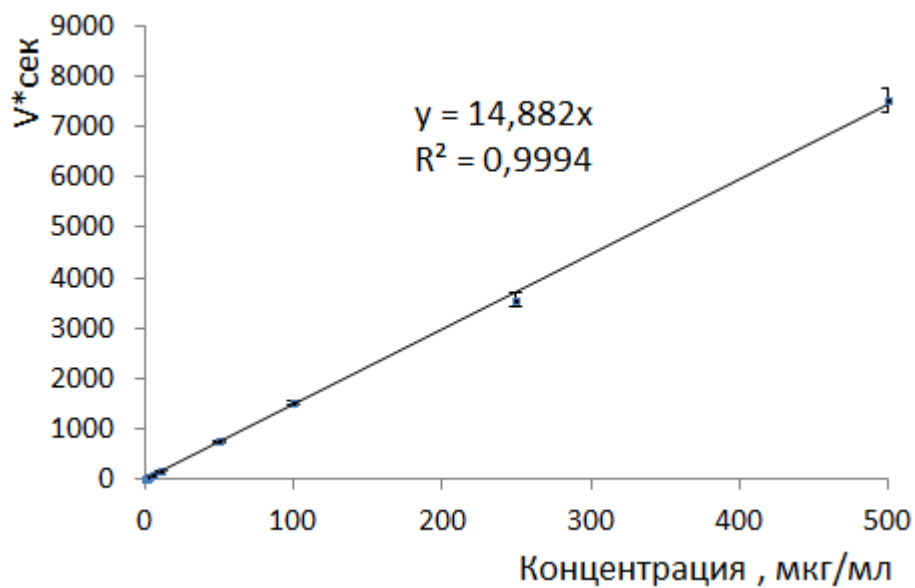
Возможными причинами могут быть низкая селективность и/или неподходящий для этого метод экстракции. Поэтому в дальнейшем мы проводили определение CoQ₁₀ в образцах тканей с использованием ЭХ-детектора, согласно разработанной методике (Гл. 1 материалы и методы).

3.5 Валидация методик ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ ($\lambda_{\text{max}}=275$ нм) для количественного определения убидекаренона

Для определения линейности были проанализированы стандартные разведения убидекаренона в этаноле, в которых его концентрация составляла от 0,01 мкг/мл до 500 мкг/мл. Каждый из растворов анализировался 4 раза, после чего строили графическую зависимость площади пика убидекаренона от концентрации (рис. 27, табл. 23, 24). Приготовление стандартных растворов описано в гл. 1 материалы и методы.

Линейность хроматографической системы наблюдалась в интервале от 0,01 мкг/мл до 500 мкг/мл для ВЭЖХ-ЭХ и 0,5 мкг/мл - 500 мкг/мл для ВЭЖХ-СФ. Коэффициент аппроксимации для двух методик составил не менее чем 0,999.

а



б

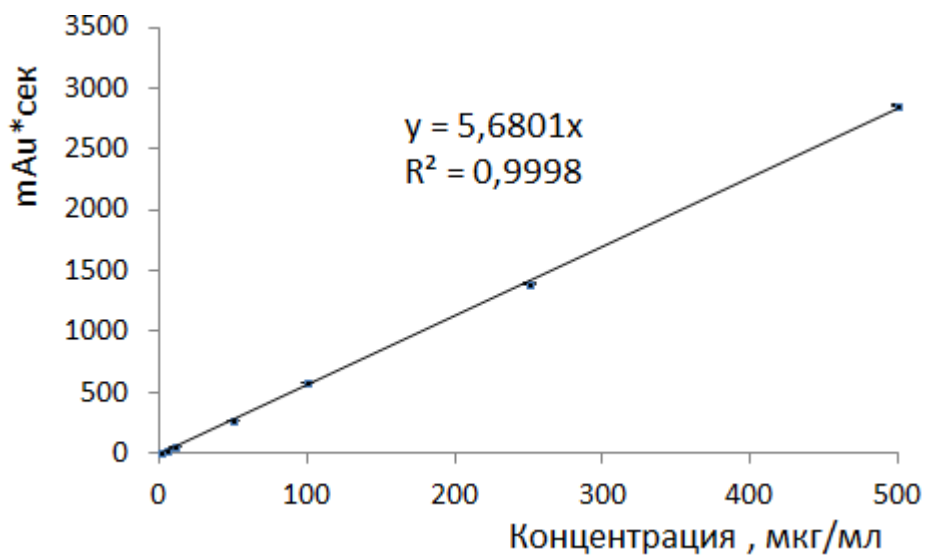


Рис. 27. Градуировочные графики, построенные для стандартных спиртовых разведений убидекаренона с использованием электрохимического детектора (а) и спектрофотометрического детектора при $\lambda_{\text{max}}=275$ нм (б). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка ($n=4$).

Таблица 23. Значения, полученные по результатам ЭХ-детектирования убидекаренона в стандартных спиртовых разведениях*

Концентрация, мкг/мл	Площадь пика, V*сек
0,01	0,22±0,01
0,1	2,2±0,05
1	18±0,15
2	356±0,63
5	758±0,98
10	149,3±2,6
50	753±15,6
100	1508,5±47,9
250	3560±144
500	7516,5±238,5

*Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка (n=4).

Таблица 24. Значения, полученные по результатам СФ-детектирования убидекаренона в стандартных спиртовых разведениях при $\lambda = 275$ нм

Спектрофотометрическое детектирование ($\lambda_{\max}=275$ нм)	
Концентрация, мкг/мл	Площадь пика (mAu*сек)
0,5	2,7±0,1
1	4,2±0,2
5	27,2±0,2
10	45,5±1,1
50	269,2±3
100	577±4
250	1390±6,2
500	2855±9

Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка (n=4).

Для исследования такого параметра, как предел количественного обнаружения в хроматографическую систему вводили растворитель (этанол) и определяли высоту шума базовой линии, после чего инжестировали раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл (ВЭЖХ-ЭХ) и 0,5 мкг/мл (ВЭЖХ-СФ) и определяли соотношение сигнал/шум по высоте.

Для двух методик данный параметр являлся не менее чем 10:1, следовательно, содержание анализируемого вещества, которое может быть определено в количественном выражении с приемлемой точностью составляет 0,01 мкг/мл и 0,5 мкг/мл для ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ соответственно.

Предел обнаружения для ВЭЖХ-ЭХ составил 0,005 мкг/мл, для ВЭЖХ-СФ – 0,1 мкг/мл.

Правильность изучалась в пределах применения аналитической методики и выражалась в процентах. Полученные экспериментальные данные лежат в доверительном интервале (90%-110%), что соответствует критериям приемлемости (табл. 25).

Прецизионность - степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях, которая характеризуется рассеянием результатов, которая рассчитывалась по формуле приведенной в гл. 1 (табл. 25).

В результате проведенной валидации подтверждено соответствие аналитических характеристик метода ВЭЖХ-ЭХ, ВЭЖХ-СФ (275 нм) количественного определения убидекаренона нормативным значениям.

Таблица 25. Сводная таблица валидационных параметров для методик ВЭЖХ-ЭХ и ВЭЖХ-СФ*

Истинная концентрация, мкг/мл	ВЭЖХ-ЭХ			ВЭЖХ-СФ		
	Расчетная концентрация, мкг/мл	Правильность, %	Прецизионность, %	Расчетная концентрация, мкг/мл	Правильность, %	Прецизионность, %
0,01	0,009±0,004	90	44,4	-	-	-
0,1	0,09±0,02	90	22	-	-	-
0,5	0,48±0,15	90	31	0,5±0,13	100	26
1	1,03±0,05	103	4,85	0,98±0,02	98	2,04
5	5,3±0,2	106	3,8	5,1±0,2	102	3,9
10	9,9±0,5	99	5,1	10,6±0,3	106	2,8
100	99,3±0,7	99,3	0,7	101,4±1,2	101,4	1,2
500	496±5	99,2	1,0	503±3	100,6	0,6

*Данные приведены как среднее значение±стандартное отклонение (n=4).

ГЛАВА 4. Изучение фармакокинетики убидекаренона при различных путях введения

Разработанные нами методики ВЭЖХ-анализа были использованы для изучения у крыс фармакокинетики убидекаренона в различных лекарственных формах.

Для изучения фармакокинетики препаратов убидекаренона необходима оценка стабильности фонового уровня эндогенного CoQ₁₀ в плазме крови крыс на протяжении исследуемого промежутка времени.

Динамика фоновых концентраций CoQ₁₀ в плазме крови крыс не показала статистически значимых колебаний уровней в контрольной группе на протяжении 48 часов, что позволяет объективно изучать прирост его концентраций в плазме крыс после введения препарата (табл. 26, рис. 33).

Таблица 26. Динамика фоновых концентраций CoQ₁₀ в плазме крови крыс контрольной группы. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка (n=4)

Время, часы	Концентрация CoQ ₁₀ , нг/мл
0	88,8±18,4
2	80,0±19,3
3	71,6±13,8
4	82,2±18,4
5	75,0±16,0
6	67,2±15,1
7	70,6±16,4
9	68,8±19,3
24	66,9±17,3
32	75,0±22,0
48	87,8±37,9

4.1 Фармакокинетика убидекаренона в таблетках

В настоящее время на фармацевтическом рынке представлены различные лекарственные формы убидекаренона: масляный раствор убидекаренона, мягкий гель убидекаренона, жевательные таблетки убидекаренона, в виде тягучего витамина, мягкие желатиновые капсулы с масляным раствором убидекаренона, таблетки с убидекареноном, твердые желатиновые капсулы с порошкообразным убидекареноном, мягкие желатиновые капсулы с раствором убидекаренона и т.д.

Для увеличения биодоступности убидекаренона применяют ряд стратегий, таких как использование масляных растворов убидекаренона [108], самостоятельной эмульгирующей системы доставки убидекаренона [109, 180], этерификация убидекаренона [226], совместное введение убидекаренона с экстрактом перца [31], включение убидекаренона в комплексы с циклодекстрином [247], липосомальные формы убидекаренона [230, 243, 244].

Количественный анализ убидекаренона

Количественный анализ убидекаренона в плазме крови проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием по методике, описанной в гл. материалы и методы

Результаты и обсуждение

Средние значения прироста концентраций убидекаренона над фоновым уровнем для каждой экспериментальной группы животных представлены в табл. 27; фармакокинетические параметры – в табл. 28.

Индивидуальные кинетические кривые концентрация-время (за вычетом фоновых значений концентраций) для таблеток убидекаренона №№ 1-5 приведены на рис. 28-32. Кинетические кривые концентрация-время, построенные по среднегрупповым значениям, для таблеток убидекаренона №№ 1-5 представлены на рис. 33.

Таблица 28. Параметры фармакокинетики убидекаренона. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка

	Таблетки №1	Таблетки №2	Таблетки №3	Таблетки №4	Таблетки №5
AUC₀₋₄₈ (нг*час/мл)	4334 $\pm$ 733	6951 $\pm$ 1134	7423 $\pm$ 2957	4794 $\pm$ 839	5373 $\pm$ 928
C_{max} (нг/мл)	282 $\pm$ 59	301 $\pm$ 36	314 $\pm$ 73	240 $\pm$ 58	256 $\pm$ 39
T_{max} (час)	5,4 $\pm$ 0,9	6 $\pm$ 1,3	9,8 $\pm$ 3,8	6 $\pm$ 1,3	7,2 $\pm$ 1,1

Таблица 27. Среднегрупповые значения прироста концентраций убидекаренона (нг/мл) в плазме крыс после приема пяти таблетированных лекарственных форм, содержащих убидекаренон

Время после приема (ч) Таблетки	2	3	4	5	6	7	9	24	32	48
№1	152±37	137±13	138±20	156±30	241±64	192±46	191±28	107±21	52±18	22±12
№2	167±23	179±28	117±38	165±58	181±49	184±42	253±45	168±33	97±22	67±19
№3	229±60	177±36	146±30	163±37	180±57	175±75	240±96	151±70	142±74	83±54
№4	153±39	105±31	124±48	198±68	167±39	139±24	195±30	82±19	70±15	41±20
№5	75±20	107±39	116±40	113±37	110±25	137±37	223±50	127±32	69±24	52±31

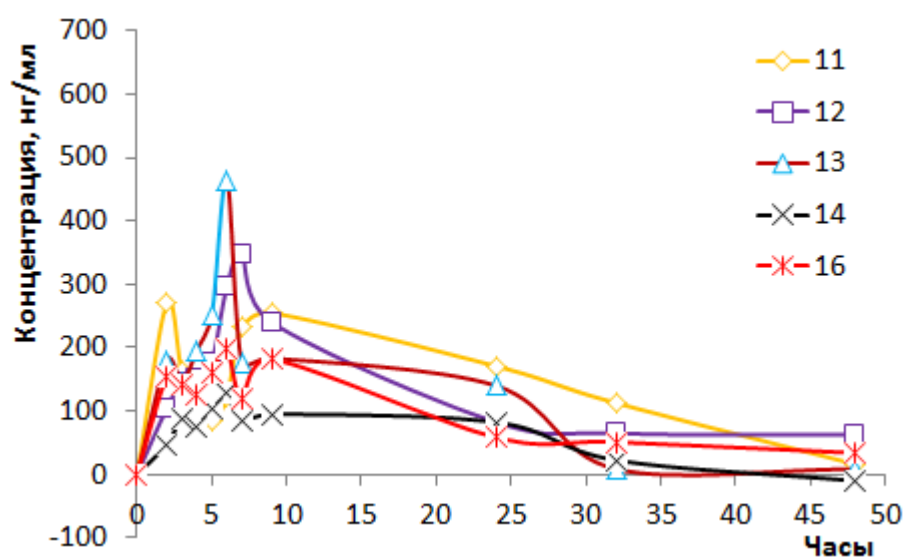


Рис. 28. Индивидуальные кинетические кривые концентрация-время для таблеток убидекаренона №1. По оси ординат - прирост концентраций убидекаренона.

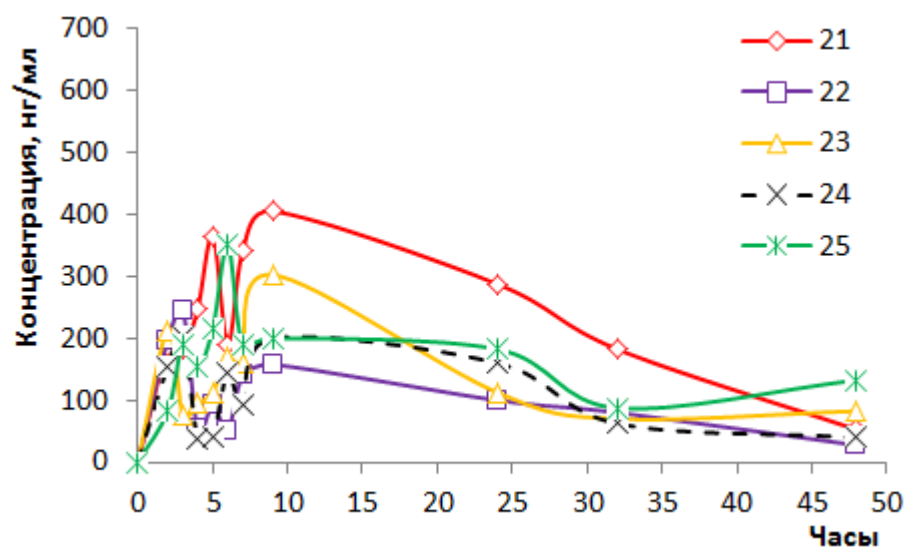


Рис. 29. Индивидуальные кинетические кривые концентрация-время для таблеток убидекаренона №2. По оси ординат - прирост концентраций убидекаренона.

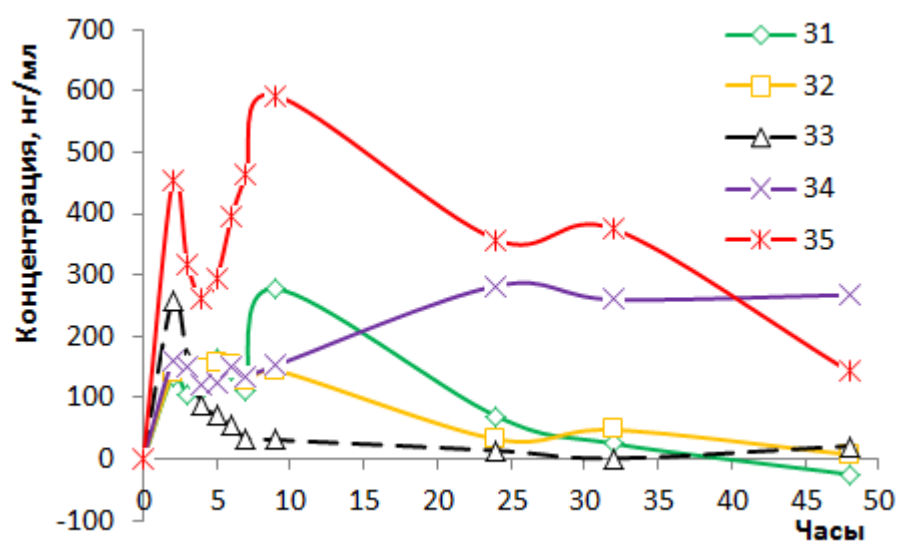


Рис. 30. Индивидуальные кинетические кривые концентрация-время для таблеток убидекаренона №3. По оси ординат - прирост концентраций убидекаренона.

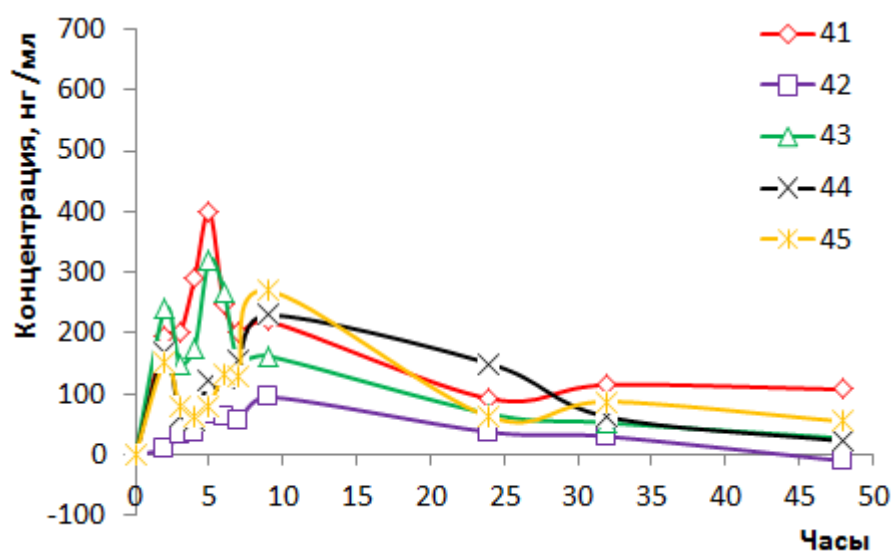


Рис. 31. Индивидуальные кинетические кривые концентрация-время для таблеток убидекаренона №4. По оси ординат - прирост концентраций убидекаренона.

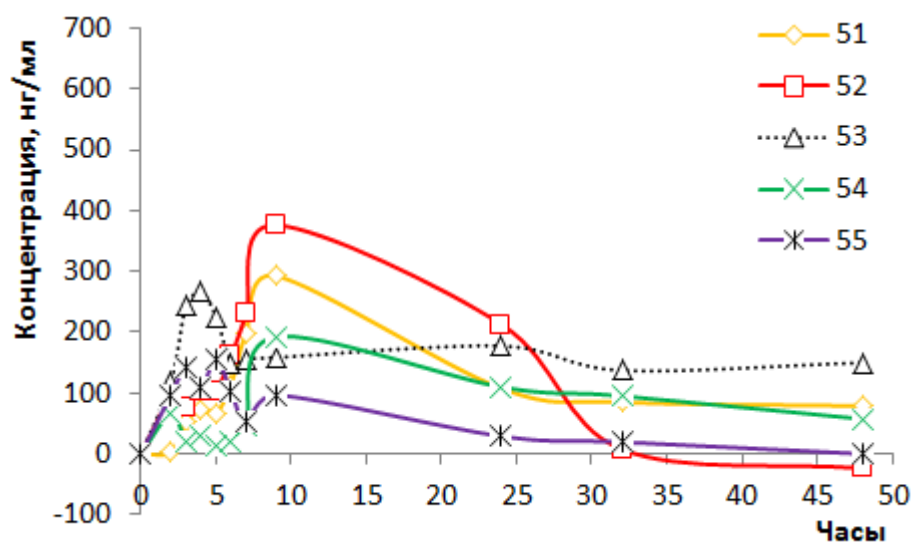


Рис. 32. Индивидуальные кинетические кривые концентрация-время для таблеток убидекаренона №5. По оси ординат - прирост концентраций убидекаренона.

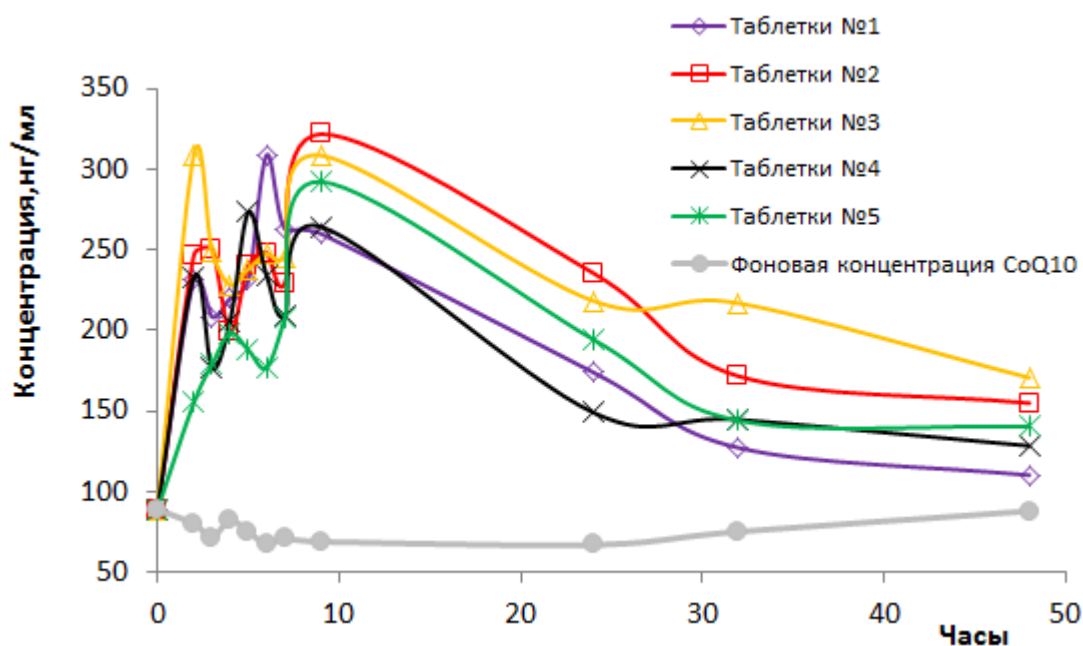


Рис. 33. Динамика фоновых концентраций CoQ_{10} в плазме крови крыс контрольной группы и кинетические кривые концентрация-время для таблеток убидекаренона №№ 1-5, построенные по среднегрупповым значениям.

Фармакокинетические параметры таблеток № 1 и 4, содержащих субстанции убидекаренона одного производителя (Канека), статистически значимых различий не показали. Максимальная концентрация CoQ_{10} в крови после введения крысам таблеток 1 составляла 282 ± 59 нг/мл и 240 ± 58 нг/мл для таблеток 4, содержащих дополнительно кремофор (солубилизатор), который направлен на увеличение биодоступности убидекаренона; площади под кинетическими кривыми составили 4334 ± 733 против 4794 ± 839 нг•час/мл, соответственно.

Более высокой биодоступности можно было ожидать и от таблеток № 5 (содержащих кремофор) относительно таблеток № 2. В состав образцов входили субстанции убидекаренона фирмы Кайова. Однако площади под кинетическими кривыми не имели достоверных различий, как и максимальная концентрация в крови.

Для фармакокинетики всех пяти образцов таблеток была характерна значительная вариабельность показателей, однако максимально выражена она была для таблеток №3.

Кинетические кривые всех представленных пяти образцов таблеток имели от одного до трех пиков концентраций во временном интервале от 2-х до 9-и часов после введения, при этом величина максимальной концентрации убидекаренона (C_{max}) и время ее достижения (T_{max}) достоверно не различались.

Ломаный характер кинетических кривых, наличие нескольких пиков концентраций в разные временные интервалы не дали возможность корректно рассчитать величину константы элиминации.

Среднегрупповые значения площади под кинетическими кривыми концентрация-время (AUC_{0-t}), рассчитанные для пяти групп, достоверно не различались между собой.

Поскольку площади под кинетическими кривыми для всех пяти исследуемых форм убидекаренона не различались, исследованные образцы обладают равной биодоступностью.

Роль вспомогательных веществ в технологии приготовления лекарственных средств очень велика. Эти вещества могут увеличивать биодоступность, изменять органолептические свойства, являются носителями лекарственных веществ и т.д.

Кроскармеллоза натрия, входящая в состав таблеток № 1-3, способствует растворению и служит дезинтегратором в твердых лекарственных формах.

В состав таблетированных форм убидекаренона № 3 и 4 входит кремофор, который является солюбилизатором и эмульгатором.

Добавляя в состав таблеток эти компоненты производители рассчитывали на увеличение растворимости убидекаренона и, соответственно, на увеличение его биодоступности.

Входящая в состав практически всех предоставленных таблеток (кроме 3) микрокристаллическая целлюлоза 102 (МКЦ 102) выполняет роль связующего компонента. Сорт 102 обладает хорошей сыпучестью и прессуемостью. В водной среде (в том числе в жидком содержимом желудочно-кишечного тракта) метилцеллюлоза смачивается и набухает, увеличиваясь в объеме в 40 р. Такие растворы характеризуются высокой эмульгирующей, диспергирующей способностью, а так же обладают способностью к пролонгированию высвобождения лекарственного вещества.

Таблетки № 1, 2, 3 содержали коллоидную двуокись кремния (аэросил), которая улучшает текучесть порошков; с ее добавлением уменьшается разброс веса капсул и таблеток, так же ускоряется распад таблеток, увеличивается производительность оборудования для производства твердых лекарственных форм.

В состав экспериментальных таблеток № 3 введена субстанция производителя DSM Nutritional Products. Технология микрокапсулирования Actilease, разработанная данной компанией, позволяет получить частицы, содержащие от 10 до 60% включений убидекаренона с диаметром частиц от 130 до 500 нм. Данная методика рассчитана на увеличение биодоступности для достижения оптимальной концентрации убидекаренона в крови.

В составе таблеток, содержащих субстанцию производителя DSM, присутствует кальция цитрат 4-гидрат. В промышленности данный компонент используется в качестве регулятора кислотности и стабилизатора (консерванта). Коллидон VA 64 является детоксицирующим компонентом, входящим в состав таблеток 3.

В качестве наполнителей во всех таблетках использовался тальк. В таблетках № 4, 5 в дополнение к этому добавляли крахмал.

Компоненты, входящие в состав таблетированных форм, содержащих убидекаренон, предоставленных фирмой Аквион, были направлены на увеличение его биодоступности, но поскольку площади под кинетическими кривыми для всех пяти исследуемых форм убидекаренона не различаются, представленные пять образцов таблеток обладают равной биодоступностью. Статистических различий не наблюдалось, возможно, и в связи с небольшой выборкой в группах животных. Представленные данные также демонстрируют, что межиндивидуальная вариабельность фармакокинетики убидекаренона при приеме внутрь, достигающая кратных величин по параметрам $C_{\max}$ и AUC_{0-t} , может маскировать незначительные преимущества одних составов над другими. Существенного увеличения биодоступности убидекаренона, качественно скажущегося на его клинической эффективности и расширяющего перечень показаний к применению, можно добиться лишь с использованием парентеральных форм.

4.2 Фармакокинетика убидекаренона, распределение по органам и окислительно-восстановительный статус при внутривенном введении препарата Кудесан

Внутривенное введение лекарственного вещества обеспечивает практически мгновенное повышение его концентрации в крови, что оказывает немедленное действие и обеспечивает более точную дозировку, особенно у лекарственных веществ с низкими показателями абсорбции в желудочно-кишечном тракте, к которым относятся убидекаренон.

А.В. Иванов и др. показали, что внутривенное введение убидекаренона как до, так и после наступления ишемии миокарда, обеспечивает кардиопротекторный эффект у крыс [3, 4, 91]. В этих экспериментах выявлена отрицательная корреляционная зависимость между содержанием убидекаренона в постинфарктном миокарде и размером зоны некроза.

Следовательно, повышенное содержание убидекаренона может быстро обеспечить защиту тканей от ишемии в ургентных ситуациях (инфаркт, инсульт). Однако фармакокинетика убидекаренона при парентеральном введении не изучена и отсутствуют данные о возможности его быстрого поступления и

продолжительности пребывания в органах-мишенях (сердце, головной мозг). Солюбилизированная форма убидекаренона в составе препарата Кудесан раствор позволяет в эксперименте вводить его внутривенно и внутримышечно и оценить фармакокинетические параметры.

Общее содержание CoQ_{10} (TCoQ_{10}) в плазме после введения препарата определяли с помощью электрохимического детектора, содержание окисленной формы – с использованием спектрофотометрического детектора. Концентрации убихинола рассчитывали для каждой пробы по разнице данных электрохимического и спектрофотометрического определений. В образцах плазмы, отобранных до введения препарата, содержание коэнзима Q_{10} было ниже предела количественного определения СФ-детектора. Поэтому к этим пробам применяли метод ВЭЖХ-ЭХ, анализируя каждый экстракт дважды: до и после восстановления раствором натрия тетрагидробората. По разнице данных двух определений рассчитывали концентрации убихинона (окисленной формы).

Для определения убидекаренона в образцах плазмы использовались градуировочные графики, построенные по результатам анализа модельных смесей убидекаренона с плазмой крови с ЭХ- и СФ-детектированием (рис. 21).

Результаты и обсуждение

Данные, представленные в полулогарифмической шкале, демонстрируют, что на протяжении 48 ч динамика плазменных концентраций убидекаренона, введенного внутривенно, удовлетворительно описывается моноэкспоненциальной функцией ($R^2=0,994$; рис. 34а). Однако, практически полное соответствие экспериментальных данных аппроксимирующему их уравнению в пределах от 0 до 32 часов ($R^2=0,999$) допускает возможность последующего замедления темпа снижения концентрации, неявно выраженного за прослеженный период (рис. 34б). Содержание убидекаренона в плазме крови крыс на протяжении 48 ч после в/в инъекции препарата Кудесан представлено в табл. 29.

Концентрации убидекаренона в органах (мкг/г) для каждой экспериментальной группы животных представлены в табл. 30.

В миокарде после в/в введения в течение первых 2-х часов наблюдался прирост убидекаренона в пределах 37-44%, относительно фоновой концентрации

(рис. 35). Через 6 ч после в/в введения концентрация убидекаренона достигала своего максимума и составляла 173% относительно фоновых значений. К концу первых суток отмечено некоторое снижение содержания убидекаренона до уровня первых двух часов после введения и поддержание этого уровня вплоть до 48 ч.

Таблица 29. Содержание убидекаренона в плазме крови крыс на протяжении 48 ч после в/в инъекции препарата Кудесан (10 мг CoQ₁₀/кг)

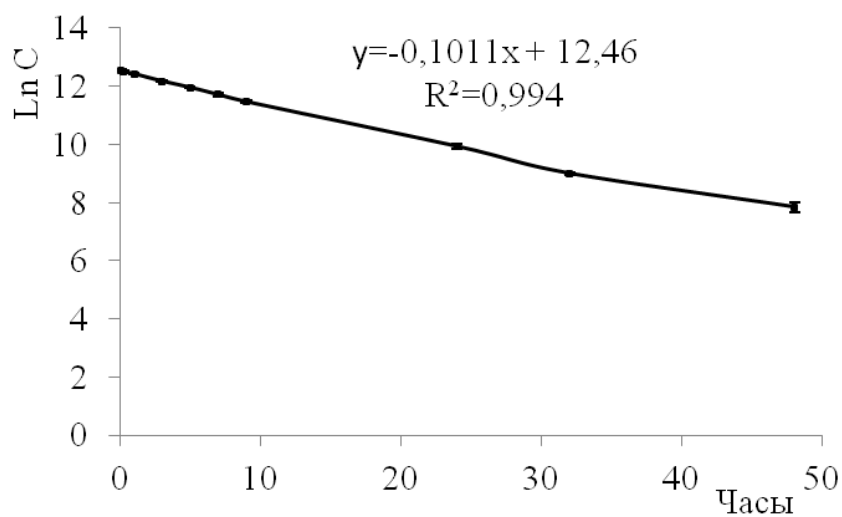
Время, часы	Концентрация, мкг/мл	Концентрация, LnC*
0	0,05±0,01	3,9±2,3
0,1	282,6±5,3	12,6±0,02
0,25	269,8±12,3	12,5±0,05
1	248,5±2,7	12,4±0,01
3	193,7±7,7	12,2±0,04
5	155,9±5,1	12,0±0,03
7	121,6±5,5	11,7±0,04
9	95,4±4,2	11,5±0,04
24	20,6±1,4	9,9±0,07
32	8,1±0,4	9,0±0,05
48	2,7±0,5	7,8±0,2

* Содержание убидекаренона представлено в виде натурального логарифма от концентраций, представленных в нг/мл.

В печени динамика концентраций убидекаренона носила накопительный характер: после в/в введения концентрация постепенно нарастала. Максимальный прирост убидекаренона наблюдался спустя 48 часов (783%). Полученные данные демонстрируют, что печень является органом, депонирующим убидекаренон (рис. 36). Высокий прирост в печени связан, по-видимому, с его липофильными свойствами. Липофильность убидекаренона определяет и основной путь его экскреции – с желчью [227]. Следовательно, за период наблюдения снижение концентраций убидекаренона в плазме крови происходит в основном за счет поступления в печень, а представленная на рис. 34 кинетическая функция

описывает фазу распределения при в/в введении солюбилизованного убидекаренона [23].

а



б

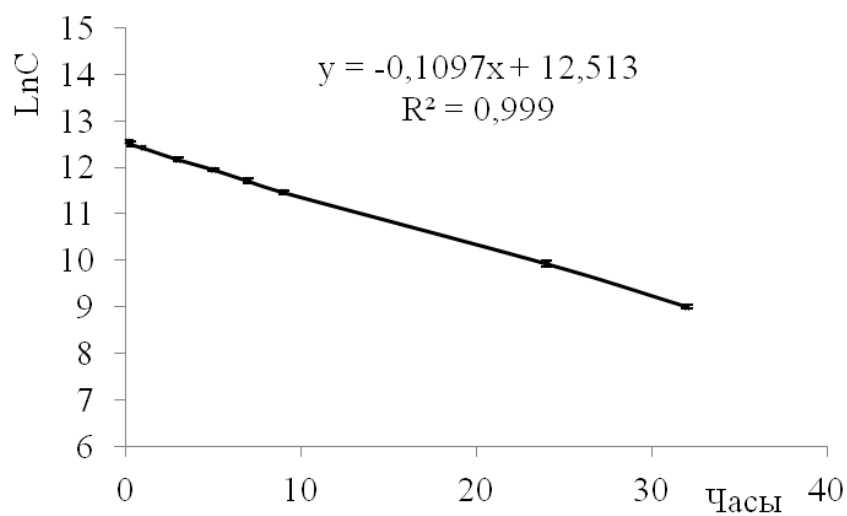


Рис. 34. Кинетические кривые убидекаренона в плазме крови крыс при внутривенном (в/в) введении в пределах от 0 до 48 ч (а) и от 0 до 32 ч (б).

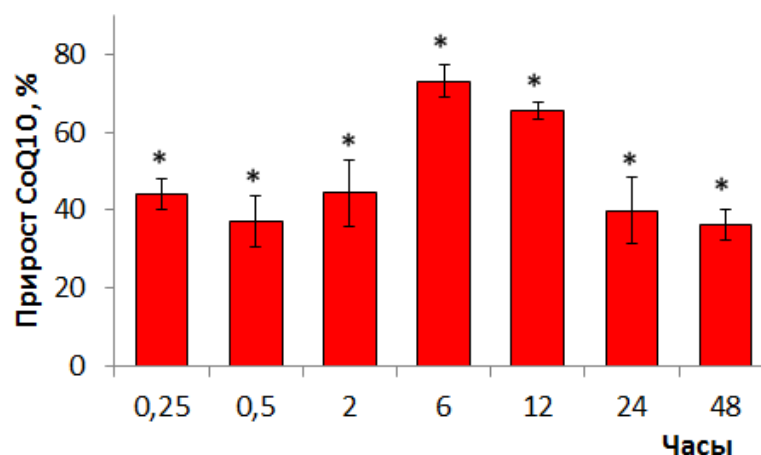


Рис. 35. Прирост содержания убидекаренона (относительно контроля) в миокарде крыс после внутривенного введения препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия) в дозе 10 мг/кг.

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка.

* - $p < 0,05$ относительно контроля.

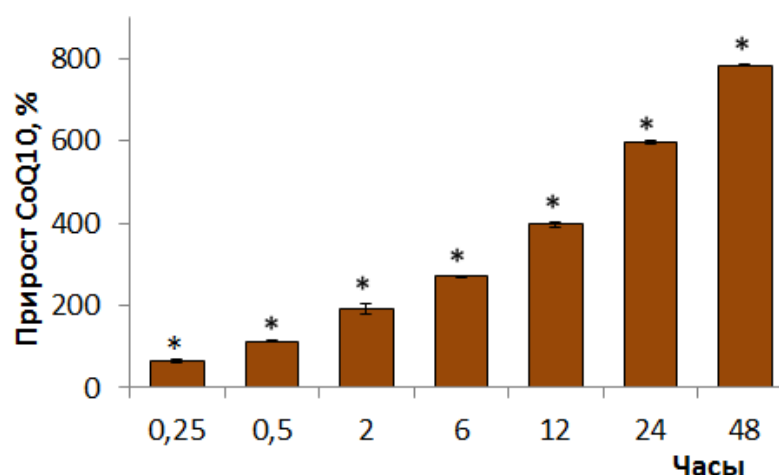


Рис 36. Прирост содержания убидекаренона (относительно контроля) в печени крыс после внутривенного введения препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия) в дозе 10 мг/кг.

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка.

* - $p < 0,05$ относительно контроля.

Известно, что при длительном употреблении убидекаренона per os (4-12 недель) происходит накопление его в отдельных органах, в основном в печени, может повыситься его содержание в сердечной мышце [66, 101, 251], но

проникновения через гематоэнцефалический барьер не происходит: уровни в мозге остаются неизменными.

Важным результатом в/в введения убидекаренона явился прирост его концентрации в головном мозге уже через 15 мин (12 %). Максимальный прирост наблюдался на 30-й минуте и составлял 24% относительно контроля. Увеличение содержания в ткани мозга оставалось статистически достоверным на протяжении минимум 6 ч (рис. 37).

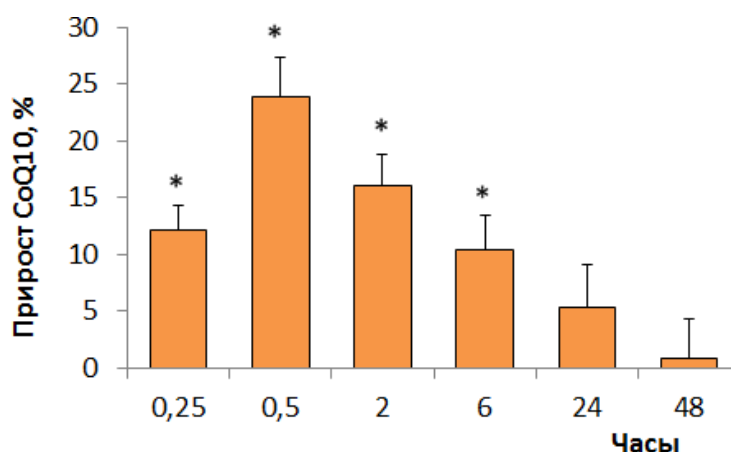


Рис. 37. Прирост содержания убидекаренона (относительно контроля) в мозге крыс после внутривенного введения препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия) в дозе 10 мг/кг.

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка.

* - $p < 0,05$ относительно контроля.

Таблица 30. Содержание убидекаренона в органах (мкг/г) после внутривенного введения препарата Кудесан

Органы	Время после инъекции, часы							
	0	0,25	0,5	2	6	12	24	48
ЛЖ	16,5±0,8	23,8±0,9	22,7±1,5	23,9±2,0	28,6±1,2	27,3±0,6	23,1±2,0	22,5±0,9
Печень	17,2±0,6	28,5±1,3	36,6±1,1	50,4±6,7	63,8±1,4	85,7±5,7	119,9±5,0	152±3,2
Мозг	20,3±0,7	22,7±0,5	25,1±0,9	23,5±0,7	22,4±0,7	17,6±0,7	21,4±0,7	20,5±1,1

Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка.

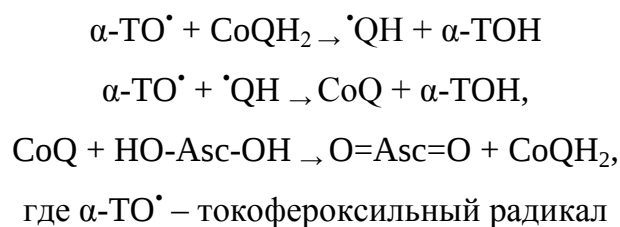
По результатам анализа образцов плазмы, отобранных на протяжении 2-х суток после внутривенной инъекции убидекаренона, построены кинетические кривые общего содержания CoQ_{10} , его окисленной и восстановленной форм (рис. 38а). Кинетическая кривая общего содержания убидекаренона после внутривенного введения хорошо описывается моноэкспоненциальной функцией ($R^2 = 0,9932$), его окисленной формы – биэкспоненциальной (рис. 38б). Первая фаза кинетической кривой окисленной формы – убихинона продолжается на протяжении суток и обусловлена, преимущественно, его интенсивным восстановлением (рис. 39); к 24 часам доля убихинола достигает максимума, и далее скорость снижения концентрации убихинона в плазме замедляется.

Концентрации TCoQ_{10} , $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и окисленной формы (мкг/мл) в плазме крови крыс после внутривенного введения представлена в табл. 31.

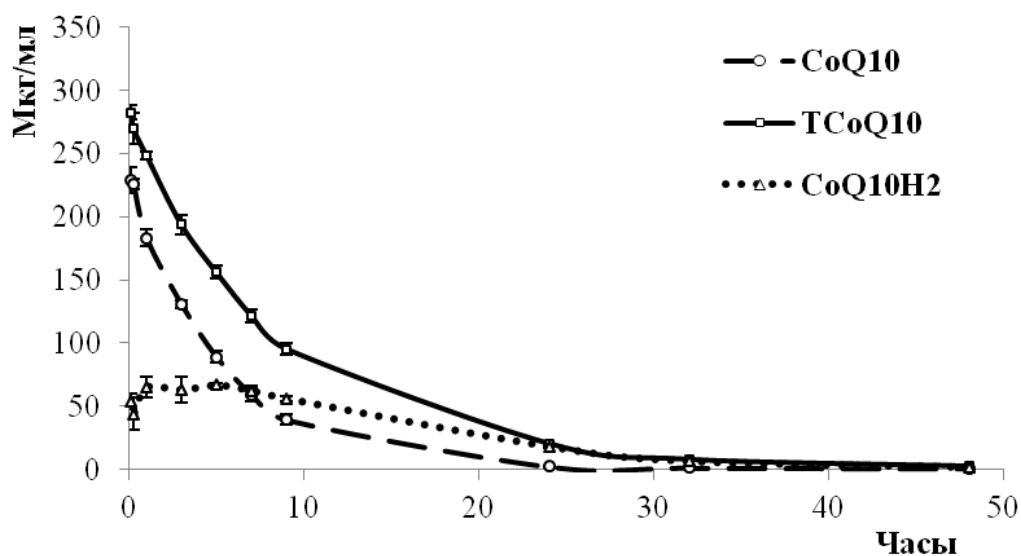
Максимальная общая концентрация (TCoQ_{10}) в плазме крови через 5 мин после инъекции составляла $282,6 \pm 5,3$ мкг/мл. Время двукратного снижения концентрации во временном интервале 24-48 ч составило $8,3 \pm 1,5$ ч (табл. 34). Аналогичные результаты для пероральных форм убидекаренона, введенных внутривенно, были получены в работе Asako Nishimura и др, где $t_{1/2} = 7-8$ ч [30].

Известно, что у человека плазменный пул CoQ_{10} более чем на 90% представлен его восстановленной формой – убихинолом [27]. У крыс, по данным различных исследований доля убихинола составляет 54% [38] – 65,3% [215]. В нашем исследовании в исходной плазме крыс доля $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (33,3%) ниже, чем приводимая в литературе, что связано с неизбежным окислением в процессе пробоподготовки. После в/в инъекции убидекаренона в окисленной форме относительное содержание $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в общем пуле в первые 15 мин снижается, достигая 19,5%. Затем на протяжении суток наблюдается постепенный рост доли $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ на фоне снижения общей концентрации CoQ_{10} .

Убихинол плазмы распределен преимущественно в липопротеидах различной плотности для защиты их от окисления. Считается, что важнейшей функцией $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в липопротеидах является регенерация α -токофероксильного радикала – продукта окисления α -токоферола в реакции с липидными радикалами [155]. Восстановление окисленных форм убидекаренона в плазме крови происходит при участии аскорбиновой кислоты.



а



б

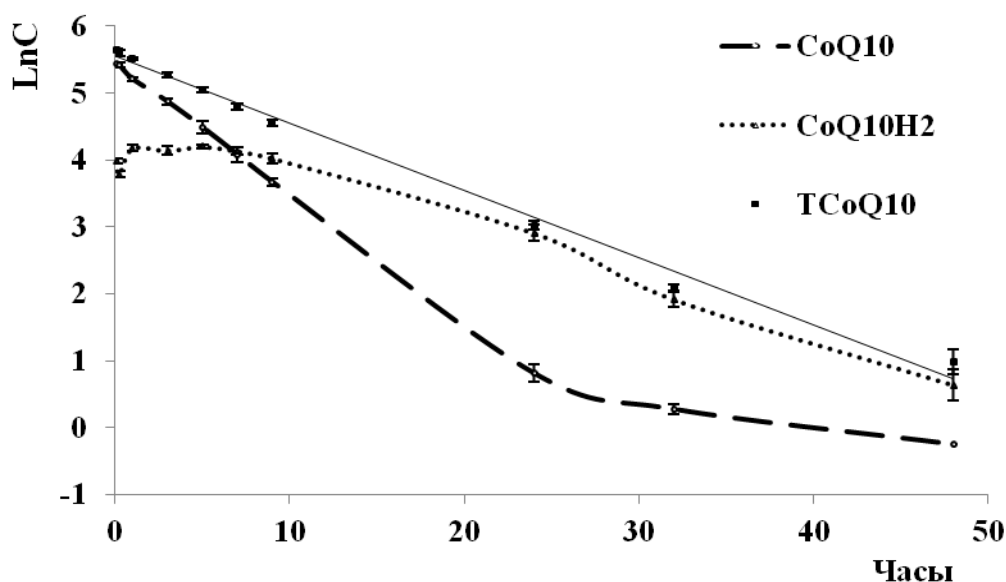


Рис. 38. Кинетические кривые плазменных концентраций убихинона (CoQ_{10}), убихинола ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) и общего пула (TCoQ_{10}) убидекаренона при внутривенном введении препарата Кудесан в дозе 10 мг/кг (а). Кинетические кривые общего содержания убидекаренона, его восстановленной и окисленной форм в полулогарифмических координатах (б).

Таблица 31. Прирост общей концентраций убидекаренона, его окисленной формы (CoQ_{10}) и восстановленной формы ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) (мкг/мл) в плазме крови крыс после внутривенной инъекции препарата Кудесан (10 мг CoQ_{10} /кг)

Время после в/в инъекции, часы	Концентрация в плазме, мкг/мл*		
	TCoQ_{10} ¹	CoQ_{10} ²	$\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ³
0	0,06±0,01	0,04±0,01 ⁵	0,02±0,01 ⁴
0,1	282,6±5,3	228,8±10,4	53,8±6,4
0,25	269,8± 2,3	225,7±3,8	44,0±12,6
1	248,5±2,7	183,4±7,0	65,1±8,4
3	193,7±7,7	130,7±3,4	62,9±10,3
5	155,9±5,1	89,1±4,2	66,7±1,9
7	121,6±5,5	59,2±5,3	62,3±3,4
9	95,4±4,2	39,3±4,1	56,1±1,8
24	20,6±1,4	2,2±0,1	18,3±1,5
32	8,1±0,4	1,3±0,2	6,8±0,4
48	2,7±0,5	0,8 ±0,1	1,9±0,5

*Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка.

¹ Результаты ВЭЖХ-ЭХ определения с внесением восстановителя.

² Результаты ВЭЖХ-СФ определения окисленной формы убидекаренона.

³ Результаты расчета по разнице концентраций общего пула (TCoQ_{10}) и окисленной формы (CoQ_{10}).

⁴ Результаты ВЭЖХ-ЭХ определения до внесения восстановителя.

⁵ Результаты расчета по разнице концентраций общего пула (TCoQ_{10}) и восстановленной формы ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$).

Внутривенное введение убидекаренона в окисленной форме, создающее в плазме крови крысы концентрации, на три порядка превышающие эндогенный

уровень CoQ_{10} , является своеобразной проверкой емкости восстанавливающих механизмов.

Результаты, полученные в данном исследовании показали, что в первые минуты после внутривенного введения значительное количество убидекаренона в плазме восстанавливается до убихинола, и спустя 7 часов концентрация $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ становится преобладающей. На фоне снижения общего содержания убидекаренона доля $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ постепенно возрастает с 19% на 15-й минуте до своего максимума (89%) через сутки (рис. 40). По истечении 48 ч общая концентрация убидекаренона в плазме крыс все еще многократно превышает фоновую.

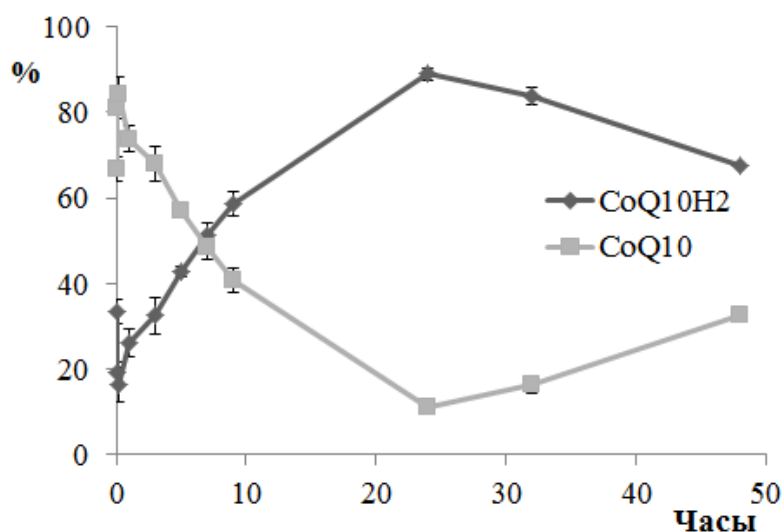


Рис. 39. Изменения соотношения окисленной (CoQ_{10}) и восстановленной ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) форм убидекаренона в плазме крыс на протяжении 48 ч после внутривенного введения препарата Кудесан. По оси ординат: процент от общей концентрации убидекаренона в плазме. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка.

Следовательно, внутривенное введение раствора солюбилизированного убидекаренона дает возможность мгновенно достичь его высоких концентраций, который, восстанавливаясь, в течение нескольких часов поддерживает стабильный повышенный плазменный уровень убихинола — одного из самых эффективных и безопасных антиоксидантов эндогенной природы.

Полученные результаты показывают, что внутривенное введение раствора солюбилизированного убидекаренона быстро и надолго (на двое суток) создает в крови высокие концентрации, обеспечивая его поступление в миокард и головной мозг крыс. Повышенное содержание убидекаренона в сердечной мышце вскоре и на протяжении 48 ч после введения, в головном мозге уже через 15 мин (>10%) и на протяжении 6-ти часов может быстро обеспечить защиту тканей от ишемии в urgentных ситуациях (инфаркт, инсульт).

Таким образом, изучена фармакокинетика общего пула убидекаренона, его окисленной и восстановленной форм в плазме крови крыс на протяжении 48 ч после однократного внутривенного введения препарата Кудесан (10 мг/кг). Результаты, полученные методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием, доказывают способность организма трансформировать высокие концентрации окисленной формы убидекаренона в эффективную антиоксидантную восстановленную форму, что обосновывает перспективность разработки парентеральных лекарственных форм убидекаренона для применения в терапии острых патологических состояний [97].

4.3 Фармакокинетика убидекаренона и распределение по органам при внутримышечном введении препарата Кудесан

Результаты и обсуждение

На основании полученных данных с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектированием строили кинетические кривые, отмечая на оси абсцисс время после инъекции, а на оси ординат – фактические значения концентрации убидекаренона в плазме крови (рис. 40). Концентрации убидекаренона (мкг/мл) в плазме крови крыс после внутримышечного введения приведены в табл. 32.

Максимальная концентрация в плазме крови ($C_{\max}=17\pm2,14$ мкг/мл) достигалась через 10-12 ч после инъекции. Время полуэлиминации ($t_{1/2}$) во временном интервале 24-48 ч составило $7,6\pm1,1$ ч (табл. 34).

После в/м введения убидекаренона его концентрация в ЛЖ спустя 2 часа была увеличена на 41%, достигала максимального значения (160%) через сутки и значимо

не менялась в последующие 24 часа: по истечении 48 ч прирост убидекаренона в миокарде составлял 54% по отношению к контрольным животным (рис. 41).

Таблица 32. Прирост концентраций убидекаренона (мкг/мл) в плазме крови крыс после внутримышечного введения препарата Кудесан в дозе CoQ₁₀ 10 мг/кг

№ п/п	Время после инъекции, часы										
	1	1,5	2	4	6	8	10	12	24	32	48
1	0,2	0,2	0,3	1,3	7,7	14,6	17,0	18,8	18,3	11,6	2,4
2	0,3	0,5	1,2	5,6	11,0	13,2	16,5	14,4	11,3	6,8	1,7
3	0	0,2	0,6	5,7	11,9	16,3	18,5	16,6	11,0	7,2	1,6
4	0	0,2	0,4	3,3	6,5	8,5	10,5	11,9	14,2	8,0	1,8
Ср.зн ± ст.ош.	0,2	0,3	0,6	4,0	9,3	13,1	15,6	15,4	13,7	8,4	1,8
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,1	0,1	0,2	1,1	1,3	1,7	1,8	1,5	1,7	1,1	0,2

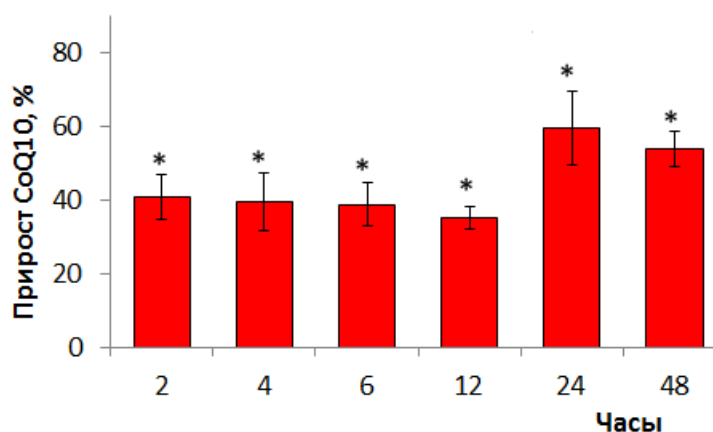


Рис. 41. Прирост содержания убидекаренона в левом желудочке сердца крыс после внутримышечного введения препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия). Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка.
* - $p < 0,05$ относительно контроля.

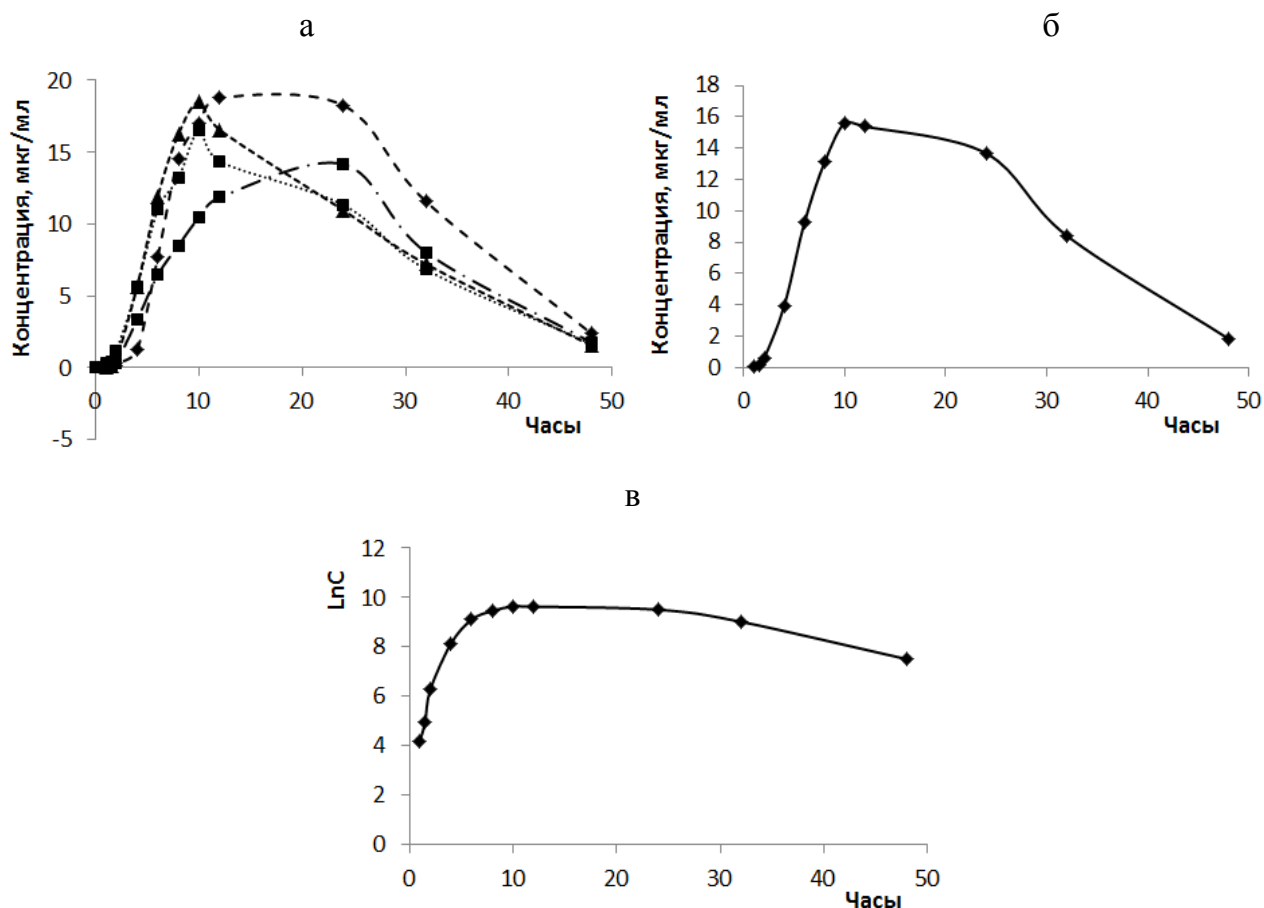


Рис. 40. Индивидуальные кинетические кривые убидекаренона после внутримышечного введения препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия) в дозе 10 мг/кг (а), среднегрупповая кинетическая кривая CoQ₁₀ (б), кинетическая кривая CoQ₁₀ в полулогарифмических координатах (в).

Содержание убидекаренона в печени постепенно нарастало и через сутки после инъекции составило 486% относительно контроля, статистически достоверно не меняясь вплоть до 48 часов (рис.42).

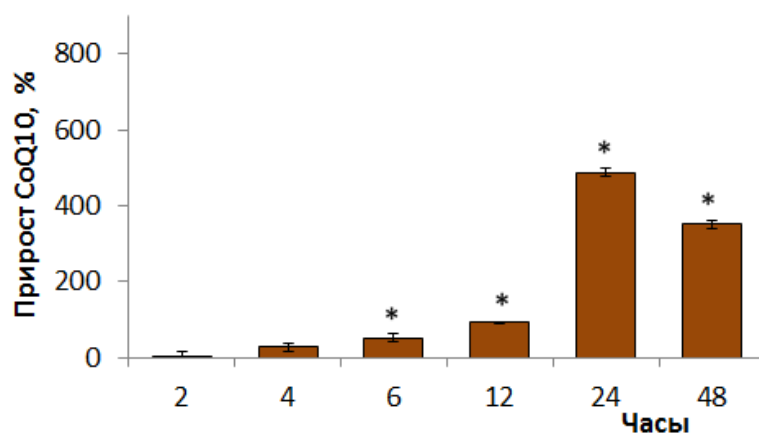


Рис. 42. Прирост содержания убидекаренона в печени крыс после внутримышечного введения препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка.

* - $p < 0,05$ относительно контроля.

Вариации содержания убидекаренона в мозге были статистически не достоверны (рис. 43).

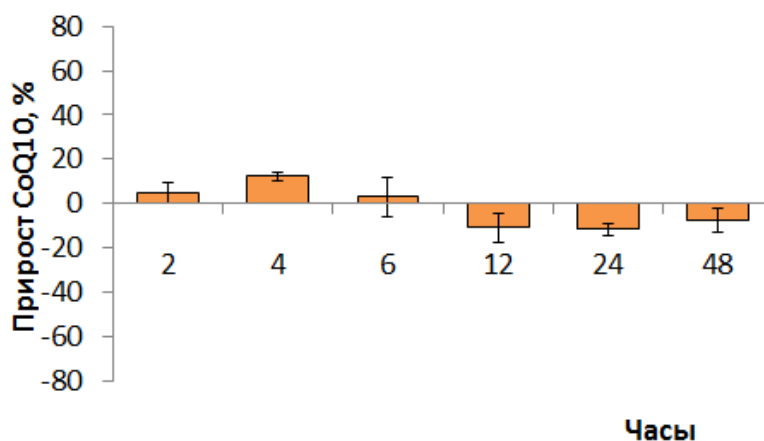


Рис. 43. Содержание убидекаренона в головном мозге крыс после внутримышечного введения препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка.

* - $p < 0,05$ относительно контроля.

Концентрации убидекаренона в органах (мкг/г) после в/м введения препарата Кудесан для каждой экспериментальной группы животных представлены в табл. 33.

Таким образом, препарат Кудесан при внутримышечном введении обеспечивает повышенный уровень убидекаренона в плазме крови на протяжении 2-х суток, а также повышение и длительное поддержание высоких уровней убидекаренона в сердечной мышце и печени [22].

Таблица 33. Концентрации убидекаренона в органах крыс (мкг/г) после внутримышечного введения препарата Кудесан в дозе CoQ₁₀ 10 мг/кг

Органы	Время после инъекции, часы						
	0	2	4	6	12	24	48
ЛЖ	16,5±1,3	23,3±1,4	23,1±1,8	23,0±1,4	22,4±0,7	26,4±2,7	25,5±1,3
Печень	16,1±1,9	16,5±2,0	20,4±2,1	24,3±2,6	31,0±0,8	94,3±10,7	72,4±8,3
Мозг	24,1±1,1	25,2±1,2	27,0±0,6	24,8±2,2	21,4±1,4	21,3±0,6	22,2±1,2

Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка.

4.4 Расчет фармакокинетических параметров, абсолютной и относительной биодоступности убидекаренона

Биодоступность при внутривенном введении равна 100%. Абсолютная биодоступность убидекаренона при пероральном введении препарата Кудесан составила 0,3%, при внутримышечном – 17% (рис. 44, табл. 34).

Относительная биодоступность убидекаренона при в/м введении по сравнению с введением per os той же дозы препарата равна $(445 \times 100) / 7 = 6357\%$.



Рис. 44. Биодоступность солюбилизированного убидекаренона в составе препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия) после введения крысам внутрь (а), внутримышечно (б) и внутривенно (в).

Таблица 34. Фармакокинетические характеристики солюбилизированного убидекаренона в составе препарата Кудесан (ЗАО «Аквион», Москва, Россия)

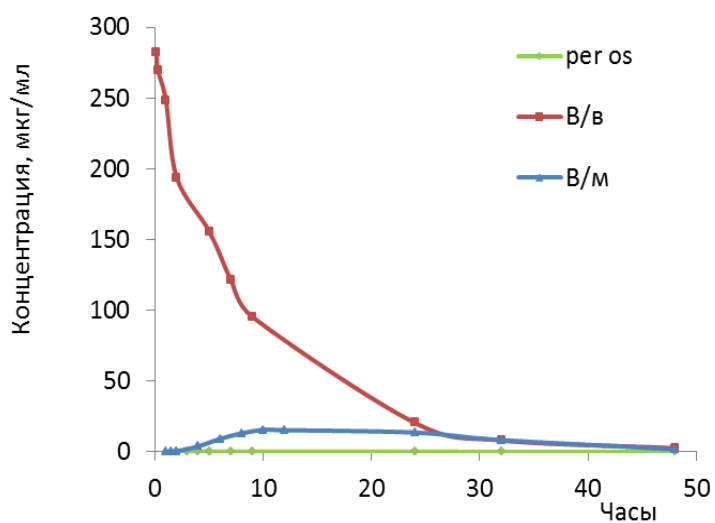
Путь введения	T_{max} (часы)	C_{max} (мкг/мл)	k (ч⁻¹)	T_{1/2} (ч)	AUC_{0→48 ч} (мкг·ч/мл)	Абсолютная биодоступность (%)
Введение внутрь (per os)	3,3 ± 0,3	0,7 ± 0,5			7 ± 0,9	0,3
Внутримышечное введение	13,2 ± 2,7	16* ± 3,5	0,093 ± 0,02	7,6 ± 1,1	445* ± 73,8	17
Внутривенное введение			0,085 ± 0,01	8,3 ± 1,5	2606* ± 133,5	100

± стандартное отклонение от средних значений

* - достоверное отличие относительно введения внутрь. Статистическая обработка по методу Манн-Уитни.

На рис. 45 изображены фармакокинетические кривые убидекаренона (общий пул) при различных путях введения.

а



б

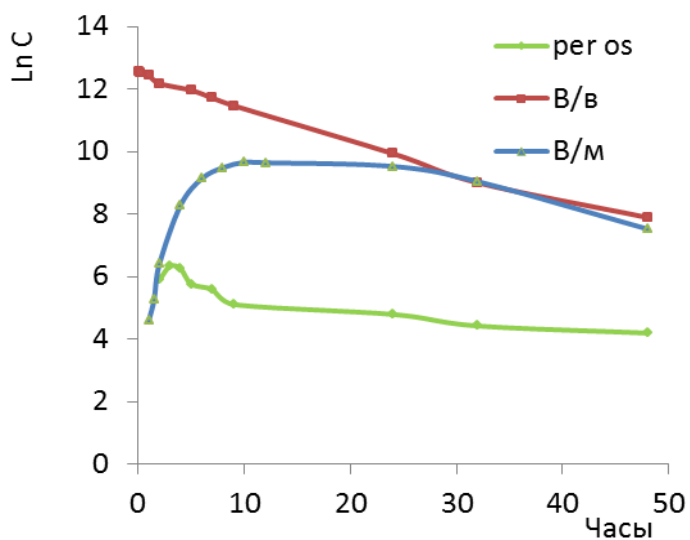


Рис. 45. Фармакокинетические кривые убидекаренона (общий пул) при различных путях введения – шкала абсолютных значений (а), логарифмическая шкала (б).

Максимальная концентрация в крови при введении внутрь составляла менее 1 мкг/мл, при внутримышечном введении - в 27 раз больше.

Таким образом, парентеральные пути введения солюбилизированного убидекаренона уже в первые минуты создают в крови высокие концентрации

убихинона и убихинола, повышая антиоксидантный статус плазмы и организма в целом.

ГЛАВА 5. Применение методики определения CoQ₁₀ в клинических исследованиях

Важнейшим приложением биофармацевтического анализа является аналитическое сопровождение клинических исследований лекарственных препаратов. Первым и до сегодняшнего дня наиболее частым показанием к применению убидекаренона являются заболевания сердечно-сосудистой системы. По прежнему актуальны клинические исследования его эффективности при атеросклерозе, гипертонии, острой и хронической сердечной недостаточности. Одним из новых изучений к применению убидекаренона является коррекция репродуктивной функции у мужчин и женщин.

Анализ биообразцов на содержание CoQ₁₀ проводили с использованием ВЭЖХ-ЭХ. Пробоподготовку проводили по схеме 1 (Гл. 1 материалы и методы).

5.1 Определение содержания CoQ₁₀, как возможного маркера окислительного стресса, в плазме крови и соскобах эндометрия женщин с бесплодием различного генеза

Бесплодные женщины с эндометриозом имеют дисбаланс между системами перекисного окисления липидов и антиоксидантной защитой, что приводит к интенсификации процесса окислительного стресса. Такой дисбаланс может негативно влиять на фертильность женщины, блокируя овуляцию, уменьшая частоту оплодотворения.

Целью исследования стало изучить антиоксидантный статус у женщин с эндометриозом по показателям содержания CoQ₁₀ в плазме крови и эндометрии.

Результаты определения содержания CoQ₁₀ в эндометрии пациенток приведены в табл. 35.

Таблица 35. Содержание CoQ₁₀ (мкг/г) в эндометрии пациенток с различными диагнозами, наблюдающихся в Центре планирования семьи и репродукции

№ П/П	Концентрация CoQ ₁₀ (мкг/г)
1	10,1
2	14,1
3	11,9
4	11,9
5	12
6	16
7	9,2
8	20,8
9	13
10	18,2
11	15
12	5,6
13	12,3
14	12,2
15	11,7
16	15,5
17	13,4
18	10,2
19	16,6
20	4,8
21	6
22	7,7
23	12
24	4,4
25	7,7
26	8,6
27	6
28	2,3
Ср.зн	11,1±4,5*

*± стандартное отклонение от средних значений

Значительная вариабельность содержания CoQ_{10} в эндометрии пациенток свидетельствует о возможной его роли в патологическом процессе, для доказательства которой требуется увеличение количества наблюдений.

В плазме крови у 24 женщин с бесплодием различного генеза концентрация CoQ_{10} оказалась ниже относительно 10 женщин в контрольной группе (1,18 мкг/мл против 1,57 мкг/мл, $p \leq 0,01$).

Снижение CoQ_{10} как проявление окислительно-восстановительного дисбаланса может привести к повреждению эндометрия свободными радикалами и негативно отразиться на имплантации эмбриона, что позволяет рассматривать этот параметр как возможный объект для терапевтической коррекции.

5.2 Оценка эффективности трехмесячного приема убидекаренона в составе препарата Кудесан при хронической сердечной недостаточности II-III классов по содержанию CoQ_{10} в плазме крови и функциональным параметрам пациентов

Для выяснения эффективности введения препарата Кудесан в комплексную терапию ХСН было проведено многоцентровое рандомизированное исследование Кудесник. Аналитическая часть исследования состояла в определении уровней CoQ_{10} в плазме крови пациентов с диагнозом ХСН II-III классов.

Результаты (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) продемонстрировали повышение содержания убидекаренона в плазме пациентов, принимавших препарат Кудесан: $1,4 \pm 0,8$ мкг/мл на первом визите и $2,3 \pm 1,3$ мкг/мл после 6 месяцев его приема ($p < 0,001^*$) и его неизменность в группе контроля ($1,3 \pm 0,6$ мкг/мл и $1,5 \pm 0,5$ мкг/мл на 1-ом и 3-ем визите, соответственно).

ХСН ассоциируется с повышенной утомляемостью, приводящей к ограничению переносимости физической нагрузки и снижению сократительной способности сердца, которую оценивают по величине фракции выброса левого желудочка ($< 45\%$). Данные критерии были выбраны как основные для изучения динамики состояния больных на протяжении 6 месяцев терапии.

Показатели фракции выброса левого желудочка основной группы пациентов увеличились с $33,24 \pm 7,75\%$ до $40,0 \pm 4,04\%$ ($p < 0,05^\#$), у пациентов в группе

стандартной терапии статистически значимого улучшения получено не было ($28,6 \pm 4,34\%$ vs $31,99 \pm 3,15\%$ 1-ый и 3-ий визиты, соответственно).

Тест 6-минутной ходьбы с регистрацией дистанции продемонстрировал увеличение толерантности к физической нагрузке ($p < 0,001^*$) только в группе, принимавшей убидекаренон ($281,0 \pm 69,1$ м и $275,0 \pm 70,3$ м на 1-ом визите, $311,6 \pm 70,5$ м и $289,3 \pm 113,5$ м на 3-ем визите в основной и контрольной группах, соответственно).

Больные, получавшие Кудесан в течение 6-ти месяцев, преодолевали расстояние на $30,5 \pm 37,2$ м больше относительно исходных показателей. В контрольной группе данный прирост составил вдвое меньше – $14,3 \pm 60,5$ м, и статистически значимых изменений по данному параметру достигнуто не было.

Представленные результаты свидетельствуют, что повышение содержания убидекаренона в плазме крови больных ХСН в результате его приема на протяжении 6 месяцев в дополнение к стандартной терапии сопровождается достоверно большим приростом фракции выброса ЛЖ и повышением переносимости физической нагрузки пациентов. На основании этого можно сделать вывод о повышении эффективности основной терапии ХСН в комплексе с убидекареноном [21].

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

CoQ₁₀ - эндогенное вещество, при биофармацевтическом анализе которого необходимо уделять внимание фоновому содержанию в биоматериале и, исходя из целей исследования, выбирать соответствующие физико-химические методы анализа. Для изучения фармакокинетики убидекаренона и содержания CoQ₁₀ в биоматериале успешно применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию. Сочетание СФ- и ЭХ- детектирования расширяет аналитические возможности исследователя в отношении убидекаренона, давая возможность оценивать его редокс-статус. Проведена валидация ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ методов количественного определения CoQ₁₀ в биологических образцах и фармацевтических композициях, что позволяет использовать их и их комбинации для изучения фармакокинетики препаратов, содержащих убидекаренон. Предложенные методики пробоподготовки биоматериала с помощью УЗ-гомогенизатора характеризуются высокой воспроизводимостью и способствуют максимальному извлечению коэнзима Q₁₀.

Результаты экспериментальных фармакокинетических исследований показали, что пероральное введение убидекаренона характеризуется крайне низкой биодоступностью (~0,3%), в то время как парентеральные пути позволяют быстро и надолго обеспечить его прирост в плазме крови и органах.

Впервые была изучена динамика редокс-статуса убидекаренона в плазме животных после его внутривенной инъекции на протяжении 48 ч. Показано, что уже в первые минуты происходит восстановление введенной окисленной формы, и уровень убихинола достигает своего максимума к 24 ч. Впервые выявлено, что именно внутривенный путь введения позволяет увеличивать концентрации убидекаренона в головном мозге крыс, что не характерно для внутримышечного и перорального введений.

Полученные нами данные демонстрируют возможность быстрого пополнения содержания коэнзима Q₁₀ в органах и тканях, который может обеспечить защиту от ишемии в urgentных ситуациях, что обосновывает перспективность разработки парентеральных лекарственных форм на основе убидекаренона.

IV. ВЫВОДЫ:

1. Разработаны методики количественного определения убидекаренона в окисленной и восстановленной формах с помощью ВЭЖХ-СФ. Методика с переключением длины волны детектора с 290 нм на 275 нм позволяет одновременно определять окисленную и восстановленную формы убидекаренона; применима в фармацевтическом анализе лекарственных форм убихинола и фармакокинетических исследованиях для анализа убихинона и убихинола в одной пробе.

2. Спектрофотометрическое детектирование убидекаренона в 40 раз уступает по чувствительности электрохимическому. Использование СФ-детектора в биофармацевтическом ВЭЖХ-анализе убидекаренона требует на этапе разработки аналитической методики сопоставления результатов с более селективным методом детекции, например, электрохимическим. Удовлетворительная сходимость результатов СФ- и ЭХ-определения убидекаренона в плазме крови в концентрациях более 2 мкг/мл предоставляет возможность комбинирования этих двух методик в анализе одного и того же образца для изучения его редокс-статуса.

3. Разработаны оптимальные режимы гомогенизации миокарда, печени и мозга с помощью ультразвукового гомогенизатора SONOPLUS mini20 «BANDELIN electronic», что стандартизует этот этап пробоподготовки и способствует лучшей воспроизводимости результатов анализа.

4. Фармакокинетические исследования убидекаренона показали, что при введении внутрь преимущества его модифицированных субстанций не очевидны из-за крайне низкой биодоступности (~0,3%) и высокой межиндивидуальной вариабельности. Абсолютная биодоступность убидекаренона в растворе солюбилизированной формы, введенном внутримышечно, составляет 17%.

5. Общее содержание и редокс-статус убидекаренона в плазме крови, отобранной в фармакокинетическом эксперименте, сохраняются неизменными на протяжении как минимум 2-х недель хранения при -20°C. Фоновые уровни убихинола полностью окисляются за 3 суток хранения в морозильной камере при сохранности общего пула убихинона.

6. Внутривенное введение убидекаренона в окисленной форме уже в первые минуты создает высокие плазменные уровни убихинола, обеспечивая повышенный антиоксидантный статус организма на протяжении нескольких часов.

7. Повышенное содержание убидекаренона в сердечной мышце (>40%) вскоре и на протяжении 48 ч после в/в и в/м введения, в головном мозге (>10%) через 15 мин и в течение 6 часов после в/в введения может быстро обеспечить защиту тканей от ишемии в urgentных ситуациях (инфаркт, инсульт).

8. Определение фоновых концентраций CoQ₁₀ в плазме крови пациенток с бесплодием различного генеза выявило сниженные его уровни в группе с патологиями относительно группы фертильных женщин, что позволяет рассматривать этот параметр как возможный объект для терапевтической коррекции.

9. Прием внутрь препарата Кудесан в дозе 90 мг/день увеличивает содержание убидекаренона в плазме крови пациентов с диагнозом ХСН II-III функциональных классов. Комбинирование основной терапии с приемом убидекаренона повышает эффективность лечения больных: в большей степени (относительно группы плацебо) увеличивает показатель фракции выброса левого желудочка и повышает толерантность к физическим нагрузкам по данным теста 6-минутной ходьбы.

Научно-практические рекомендации

1. Методики ВЭЖХ-ЭХ, ВЭЖХ-СФ, а также их сочетание рекомендуются к использованию для биофармацевтического анализа убидекаренона.

2. Фармакокинетические параметры, полученные в ходе исследования могут быть применены при дальнейших доклинических, клинических и биофармацевтических исследованиях и использованы для разработки парентеральных форм убидекаренона.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в ходе исследования результаты обосновывают перспективность разработки парентеральных лекарственных форм убидекаренона и дальнейшего изучения их эффективности на различных моделях патологических состояний.

V. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аронов Д.М. Рандомизированное проспективное исследование лекарственного препарата Кудевита (Коэнзима Q10) в лечении пациентов с ишемической болезнью сердца с сердечной недостаточностью II–III функционального класса / Д.М. Аронов, Д.Г. Иоселиани, В.Б. Красницкий, Е.В. Ярных, Т.В. Ковтун // Consilium Medicum = Врачебный консилиум. – 2012. – Т.14, № 1. – с. 55-60.
2. Драпкина О.М. Статины и миопатия: молекулярные механизмы / О.М. Драпкина, Е.М. Чернова, О.Н. Корнеева // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2012. – Т. 8, № 3. – с. 469-473.
3. Иванов А.В. Коэнзим Q10, введенный однократно внутривенно, защищает миокард от последующей ишемии-реперфузии / А.В. Иванов, Е.А. Городецкая, Е.И. Каленикова, О.С. Медведев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76. № 2. – с. 6-8.
4. Иванов А.В. Городецкая Е.А., Каленикова Е.И., Медведев О.С. Однократное внутривенное введение коэнзимаQ10 защищает миокард, подвергшийся необратимой ишемии / А.В. Иванов, Е.А. Городецкая, Е.И. Каленикова, О.С. Медведев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155. № 6. – с. 736-739.
5. Иллариошкин С.Н. Нарушения клеточной энергетики при заболеваниях нервной системы / С.Н. Иллариошкин // Нервные болезни. – 2012. – № 1. – С. 34-38.
6. Каленикова Е.И. Фармакокинетика коэнзима Q10 / Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая, О.С. Медведев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. –2008. – Т. 146. № 9. – с. 288-291
7. Каленикова Е.И. Коэнзим Q10: длительное введение и отмена / Е.И. Каленикова, Г.Г. Коновалова, О.С. Медведев, Э.К. Рутге, В. Ланкин // Фармация. – 2009. – №2. – с. 38-41.

8. Ключников С.О. Убихинон (Коэнзим Q10): теория и клиническая практика / С.О. Ключников, Е.С. Гнетнева // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2008. – Т. 87 № 3. – с. 20.
9. Ковалева М.А. Эффективность убидеаренона при метаболическом синдроме и артериальной гипертензии в эксперименте / М.А. Ковалева, А.И. Селезнева, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, А.А. Забозлаев, Г.И. Дьячук // Профилактическая и клиническая медицина. – 2012. – № 4. – с. 81-84.
10. Куимов А.Д. Некоторые аспекты метаболической терапии у больных с ишемической болезнью сердца / А.Д. Куимов, Т.А. Мурзина // Сибирское медицинское обозрение. 2 – 012. – Т. 75. № 3. – с. 59-63.
11. Лакомкин В.Л. Изменение антиоксидантного статуса миокарда под влиянием коэнзима Q10 при окислительном стрессе / В.Л. Лакомкин, Г.Г. Коновалова, Е.И. Каленикова, И.В. Заббарова, А.И. Каминный, А.К. Тихазе, В.З. Ланкин, Э.К. Рууге, В.И. Капелько // Биохимия – 2005. – Т. 70. № 1. – с. 97-104.
12. Ланкин В.З. Перспективы использования коэнзима Q при атеросклерозе и хроническо сердечной недостаточности / В.З. Ланкин // Consilium Medicum = Врачебный консилиум. – 2013. – Т. 15. № 1. – с. 44-49.
13. Макарова Т.П. Коэнзим Q10: перспективы применения в клинической практике / Т.П. Макарова, С.В. Батыршина, Н.И. Данилова, А.Н. Акулов, Л.А. Хаертдинова, С.Н. Серов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им Н. Э. Баумана. – 2011. – № 206. – с. 138-147.
14. Медведев О.С. Коэнзим Q10 в кардиологической практике – теоретические основы и результаты клинических исследований / О.С. Медведев, Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая, Д.А. Шашурин // Русский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17. № 18. – с. 1177-1181.
15. Медведев О.С. Замедление процесса старения: в фокусе коэнзим Q10 / О.С. Медведев // Трудный пациент. – 2012. – Т. 10. № 4. – с. 50-58.
16. Михин В.П. Эффективность применения коэнзима Q 10 на фоне традиционной терапии хронической формы ишемической болезни сердца / В.П. Михин, А.В. Харченко, В.Г. Шарова, М.А. Чернятина, Е.В. Мальцева // Кардиология. – 2012. – Т. 52. № 10. – с. 4-8.

17. Перепонов Ю.П. Возможности применения коэнзима Q10 (Кудесан) в комплексной терапии ишемической болезни сердца (обзор литературы) / Ю.П. Перепонов // Русский медицинский журнал. – 2011. – Т. 19. № 4. – с. 244-247.
18. Перепонов Ю.П. Применение коэнзима Q10 в комплексной терапии артериальной гипертонии / Ю.П. Перепонов // Российский кардиологический журнал. – 2011. – № 5. – с. 89-92.
19. Сизова Ж.М. Возможности применения убихинона в лечении артериальной гипертонии / Ж.М. Сизова // Российский кардиологический журнал. – 2010. – № 4. – с. 49-54.
20. Сизова Ж.М. Возможности применения различных доз коэнзима Q10 у больных хронической сердечной недостаточностью / Ж.М. Сизова, Т.Н. Фарафонова, О.С. Медведев, Е.И. Каленикова, А.Л. Коротаева // Журнал сердечная недостаточность. – 2010. – Т. 11. № 4. – с. 218-222.
21. Токарева О.Г. Влияние коэнзима Q10 в составе стандартной терапии больных хронической сердечной недостаточностью на плазменные уровни мозгового натрийуретического пептида / О.Г. Токарева, Е.В. Харитонов, Е.И. Каленикова, О.С. Медведев // Фундаментальные исследования. 2014. (в печати).
22. Харитонов Е.В. Прирост CoQ10 в органах крыс при внутримышечном введении солюбилизованного CoQ10 в составе препарата кудесан / Е.В. Харитонов, Е.А. Городецкая, Е.И. Каленикова // Здоровье и образование в XXI веке. – 2012. – Т. 14 [1], № 2. – с. 248-249.
23. Харитонов Е.В. Фармакокинетика солюбилизованного CoQ10 в составе препарата Кудесан при парентеральных путях введения / Е.В. Харитонов, Е.А. Городецкая, Е.И. Каленикова, О.С. Медведев // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – № 6 (84). – с. 26-29.
24. Харитонов Е.В. Определение убидекаренона в окисленной и восстановленной формах методом ВЭЖХ с электрохимическим и спектрофотометрическим детектированием / Е.В. Харитонов, Е.И. Каленикова, О.С. Медведев // От растения к препарату: традиции и современность. Сборник научных трудов Всероссийской конференции посвященной 95-летию со дня рождения Алексея Ивановича Шретера 23-24 апреля 2014 г. – 2014. – с. 295-298.

25. Шилов А. Коэнзим Q10 и витамин Е в комплексной терапии пациентов с ХСН / А. Шилов, М. Мельник, Е. Воеводина // Врач. – 2011. – № 1. – с. 49-52.
26. Abe K. Determination of ubiquinone in serum and liver by high-speed liquid chromatography / K. Abe, K. Ishibashi, M. Ohmae, K. Kawabe, G. Katsui / K. Abe // J Nutr Sci Vitaminol. – 1978. – V.24 (6). – P.555-567.
27. Aberg F. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues / F. Aberg, E. L. Appelkvist, G. Dallner, L. Ernster // Arch Biochem Biophys. – 1992. – V.295 (2) . – P.230-234.
28. Adarsh Kumara H. K. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome / H. K. Adarsh Kumara, Pushpa Devic, Varun Mohan // Pharmacol Ther. – 2009. – V. 124 (3). – P. 259-268.
29. Arias A. Analysis of coenzyme Q(10) in lymphocytes by HPLC-MS/MS / A. Arias, J. Garcia-Villoria, A. Rojo, N. Bujan, P. Briones, A. Ribes // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2012. – V. 908. – P. 23-26.
30. Asako Nishimura H. Y. Pharmacokinetic Profiles of Coenzyme Q10: Absorption of Three Different Oral Formulations in Rats / H. Y. Asako Nishimura, Naoko Fujikawa, Akiko Kiriyaama, Nobuhito Shibataa // J Health Sci – 2009. – V. 55(4). – P. 540-548.
31. Badmaev V. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q10 following oral supplementation / V. Badmaev, M. Majeed, L. Prakash // J Nutr Biochem. – 2000. – V. 11 (2). – P. 109-113.
32. Baggio E. Italian multicenter study on the safety and efficacy of coenzyme Q10 as adjunctive therapy in heart failure. CoQ10 Drug Surveillance Investigators / E. Baggio, R. Gandini, A. C. Plancher, M. Passeri, G. Carmosino // Mol Aspects Med. – 1994. – V. 15 Suppl. P. – s287-94.
33. Balercia G. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial / G. Balercia, E. Buldreghini, A. Vignini, L. Tiano, F. Paggi, S. Amoroso, G. Ricciardo-Lamonica, M. Boscaro, A. Lenzi, G. Littarru // Fertil Steril. – 2009. – V. 91 (5). – P. 1785-1792.
34. Barbieri B. Coenzyme Q10 administration increases antibody titer in hepatitis B vaccinated volunteers a single blind placebo-controlled and randomized clinical study /

B. Barbieri, B. Lund, B. Lundstrom, F. Scaglione// *BioFactors*. – 1999. – V. 9 (2-4). –P. 351-357.

35. Bargossi A.M. Exogenous CoQ10 preserves plasma ubiquinone levels in patients treated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors / A.M. Bargossi, M. Battino, A. Gaddi, P.L. Fiorella, G. Grossi, G. Barozzi, R. Di Giulio, G. Descovich, S. Sassi, M. L. Genova // *Int j clin lab research*. – 1994. – V. 24 (3). – P. 171-176.

36. Belliere J. Prerequisites for ubiquinone analogs to prevent mitochondrial permeability transition-induced cell death / J. Belliere, F. Devun, C. Cottet-Rousselle, C. Batandier, X. Leverve, E. Fontaine // *J Bioenerg Biomembr*. – 2012. – V. 44 (1). – P. 207-212.

37. Berthold H.K. Effect of ezetimibe and/or simvastatin on coenzyme Q10 levels in plasma: a randomised trial / H.K. Berthold, A. Naini, S. Di Mauro, M. Hallikainen, H. Gylling, W. Krone, I. Gouni-Berthold // *J Med Toxicol*. – 2006. – V. 29 (8). – P. 703-712.

38. Bhagavan H.N. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics / H.N. Bhagavan, R.K. Chopra // *Free Radic Res*. – 2006. – V. 40 (5). – P. 445-453.

39. Bhagavan H.N. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations / H.N. Bhagavan, R.K. Chopra // *Mitochondrion*. – 2007. – V. 7 Suppl. – P. S78-88.

40. Bleske B.E. The effect of pravastatin and atorvastatin on coenzyme Q10 / B.E. Bleske, R.A. Willis, M. Anthony, N. Casselberry, M. Datwani, V.E. Uhley, S. G. Secontine, M.J. Shea // *Am Heart J*. – 2001. – V. 142 (2). – E2.

41. Breithaupt D. E. Simultaneous determination of the vitamins A,E, their esters and coenzyme Q10 in multivitamin dietary supplements using an RP-C30 phase / D. E. Breithaupt, S. Kraut // *Eur. Food Res. Technol*. – 2006. – P. 643–649.

42. Brightman A.O. A growth factor- and hormone-stimulated NADH oxidase from rat liver plasma membrane / A.O. Brightman, J. Wang, R.K. Miu, I.L. Sun, R. Barr, F.L. Crane, D.J. Morre // *Biochimica et biophysica acta*. – 1992. – V. 1105 (1). – P. 109-117.

43. Cadenas E. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells / E. Cadenas, P. Hochstein, L. Ernster // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* – 1992. – V. 65. – P. 97-146.

44. Caso G. Effect of coenzyme q10 on myopathic symptoms in patients treated with statins / G. Caso, P. Kelly, M.A. McNurlan, W.E. Lawson // *Am J Cardiol.* – 2007. – V. 99 (10). – P. 1409-1412.

45. Chai W. Plasma coenzyme Q10 levels and postmenopausal breast cancer risk: the multiethnic cohort study / W. Chai, R.V. Cooney, A.A. Franke, Y. B. Shvetsov, C.P. Caberto, L.R. Wilkens, L. Le Marchand, B.E. Henderson, L.N. Kolonel, M.T. Goodman // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2010. – V. 19 (9). – P. 2351-2356.

46. Chance B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiol Rev.* – 1979. – V. 59 (3). – P. 527-605.

47. Chopra R.K. Relative bioavailability of coenzyme Q10 formulations in human subjects / R.K. Chopra, R. Goldman, S.T. Sinatra, H.N. Bhagavan // *Int J Vitam Nutr Res.* – 1998. – V. 68 (2). – P. 109-113.

48. Cooney R.V. Low plasma coenzyme Q (10) levels and breast cancer risk in Chinese women / R.V. Cooney, Q. Dai, Y.T. Gao, W.H. Chow, A.A. Franke, X.O. Shu, H. Li, B. Ji, Q. Cai, W. Chai, W. Zheng // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2011. – V. 20 (6). – P. 1124-30.

49. Crane F.L. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria / F.L. Crane, Y. Hatefi, R.L. Lester, C. Widmer // *Biochim Biophys Acta.* – 1957. – V. 25 (1). – P. 220-221.

50. Cuomo J. Comparative Bioavailability of Coenzyme Q10 in Four Formulations / J. Cuomo, A. Rabovsky // *USANA Clin Res Bulletin.* USANA Health Sci, Inc. SLC, UT. 2000.

[http://www.usana.com/media/File/dotCom/company/science/crb/USANA_CRB_CoQ10_Bioavailability.pdf]

51. Cuthbert J.A. Negative regulation of cell proliferation by mevalonate or one of the mevalonate phosphates / J.A. Cuthbert, P.E. Lipsky // *J Biol Chem.* – 1991. – V. 266 (27). – P. 17966-17971.

52. Duncan A.J. Determination of coenzyme Q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q10 as an

internal standard / A.J. Duncan, S.J. Heales, K. Mills, S. Eaton, J. M. Land, I.P. Hargreaves // Clin chem. – 2005. – V. 51 (12). – P. 2380-2382.

53. Echta K.S. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone) / K.S. Echta, E. Winkler, K. Frischmuth, M. Klingenberg // Proc Natl Acad Sci U S A– 2001. – V. 98 (4). – P. 1416-1421.

54. Echta K.S. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function / K.S. Echta, E. Winkler, M. Klingenberg // Nature. – 2000. – T. 408 (6812). – P. 609-613.

55. Edlund P.O. Determination of coenzyme Q10, alpha-tocopherol and cholesterol in biological samples by coupled-column liquid chromatography with coulometric and ultraviolet detection / P.O. Edlund // J Chromatogr A– 1988. – V. 425 (1). – P. 87-97.

56. Elmberger P.G. Discharge of newly-synthesized dolichol and ubiquinone with lipoproteins to rat liver perfusate and to the bile / P.G. Elmberger, A. Kalen, U.T. Brunk, G. Dallner // Lipids. – 1989. – V. 24 (11). – P. 919-930.

57. Engelsen J. Effect of coenzyme Q10 and Ginkgo biloba on warfarin dosage in stable, long-term warfarin treated outpatients. A randomised, double blind, placebo-crossover trial / J. Engelsen, J.D. Nielsen, K. Winther // Thromb Haemost. – 2002. – V. 87 (6). – P. 1075-1076.

58. Ernster L. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function / L. Ernster, G. Dallner // Biochim Biophys Acta. – 1995. – V. 1271 (1). – P. 195-204.

59. Ernster L. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms / L. Ernster, P. Forsmark-Andree // Clin Investig.. – 1993. – V. 71 (8 Suppl). – P. S60-65.

60. Ernster L. Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles. Essentiality of ubiquinone for the interaction of succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, and cytochrome b / L. Ernster, I.Y. Lee, B. Norling, B. Persson // Eur J Biochem / FEBS. – 1969. – V. 9 (3). – P. 299-310.

61. Finckh B. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection / B. Finckh, A. Kontush, J.

Commentz, C. Hubner, M. Burdelski, A. Kohlschutter // *Anal Biochem.* – 1995. – V. 232 (2). – P. 210-216.

62. Folkers K. Coenzyme Q10 increases T4/T8 ratios of lymphocytes in ordinary subjects and relevance to patients having the AIDS related complex / K. Folkers, T. Hanioka, L.J. Xia, J.T. McRee, P. Jr. Langsjoen // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1991. – V. 176 (2). – P. 786-791.

63. Folkers K. Biochemical deficiencies of coenzyme Q10 in HIV-infection and exploratory treatment / K. Folkers, P. Langsjoen, Y. Nara, K. Muratsu, J. Komorowski, P.C. Richardson, T.H. Smith // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1988. – V. 153 (2). – P. 888-896.

64. Folkers K. The activities of coenzyme Q10 and vitamin B6 for immune responses / K. Folkers, M. Morita, J. McRee, Jr // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1993. – V. 193 (1). – P. 88-92.

65. Folkers K. Two successful double-blind trials with coenzyme Q10 (vitamin Q10) on muscular dystrophies and neurogenic atrophies / K. Folkers, R. Simonsen // *Biochim et biophys acta.* – 1995. – V. 1271 (1). – P. 281-286.

66. Folkers K. Biochemical rationale and myocardial tissue data on the effective therapy of cardiomyopathy with coenzyme Q10 / K. Folkers, S. Vadhanavikit, S.A. Mortensen // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1985. – V. 82 (3). – P. 901-904.

67. Forsmark P. Inhibition of lipid peroxidation by ubiquinol in submitochondrial particles in the absence of vitamin E / P. Forsmark, F. Aberg, B. Norling, K. Nordenbrand, G. Dallner, L. Ernster // *FEBS letters.* – 1991. – V. 285 (1). – P. 39-43.

68. Fouad A. A. Therapeutic effect of coenzyme Q10 against experimentally-induced hepatocellular carcinoma in rats / A. A. Fouad, A. S. Al-Mulhim, I. Jresat // *Environ Toxicol Pharmacol.* – 2013. – V. 35 (1). – P. 100-108.

69. Frei B. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations / B. Frei, M.C. Kim, B.N. Ames // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1990. – V. 87 (12). – P. 4879-4883.

70. Fujita T. Metabolic fate of ubiquinone-7. I. Absorption, excretion and tissue distribution in rats / T. Fujita, S. Tanayama, Y. Shirakawa, Z. Suzuoki // *J biochem.* – 1971. – V. 69 (1). – P. 53-61.

71. Ghirlanda G. Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study / G. Ghirlanda, A. Oradei, A. Manto, S. Lippa, L. Uccioli, S. Caputo, A. V. Greco, G. P. Littarru // *J Clin Pharmacol.* –1993. – V. 33 (3). – P. 226-229.
72. Gille L. The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone / L. Gille, H. Nohl // *Arch Biochem Biophys.* – 2000. – V. 375 (2). – P. 347-54.
73. Green D. R. Mitochondria and apoptosis / D. R. Green, J. C. Reed // *Science.* – 1998. – V. 281 (5381). – P. 1309-1312.
74. Greenberg S. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease / S. Greenberg, W. H. Frishman // *J clinl pharmacol.* – 1990. – V. 30 (7). – P. 596-608.
75. Greenspan M.D. Separation and identification of triglycerides, cholesteryl esters, cholesterol, 7-dehydrocholesterol, dolichol, ubiquinone, alpha-tocopherol, and retinol by high performance liquid chromatography with a diode array detector / M.D. Greenspan, C.Y. Lo, D.P. Hanf, J.B. Yudkovitz // *J Lipid Res.* – 1988. – V. 29 (7). – P. 971-976.
76. Grieb P. Oral coenzyme Q10 administration prevents the development of ischemic brain lesions in a rabbit model of symptomatic vasospasm / P. Grieb, M.S. Ryba, J. Sawicki, S.J. Chrapusta // *Acta Neuropathol.* – 1997. – V. 94 (4). – P. 363-368.
77. Grossi G. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of coenzyme Q10 in plasma / G. Grossi, A. M. Bargossi, P.L. Fiorella, S. Piazzzi, M. Battino, G.P. Bianchi // *J Chromatogr A.* – 1992. – V. 593 (1-2). – P. 217-26.
78. Grune T. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells / T. Grune, T. Reinheckel, K.J. Davies // *FASEB j.* – 1997. – V. 11 (7). – P. 526-534.
79. Grunler J. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins / J. Grunler, J. Ericsson, G. Dallner // *Biochim Biophys Acta.* – 1994. – V. 1212 (3). – P. 259-277.
80. Halliwell B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease / B. Halliwell, J.M. Gutteridge // *Biochem J.* – 1984. – V. 219 (1). – P. 1-14.
81. Hanioka T. Effect of topical application of coenzyme Q10 on adult periodontitis / T. Hanioka, M. Tanaka, M. Ojima, S. Shizukuishi, K. Folkers // *Mol Aspects Med.* –1994. – V. 15 Suppl. – P.s241-8.

82. Hertz N. Improved survival in patients with end-stage cancer treated with coenzyme Q(10) and other antioxidants: a pilot study / N. Hertz, R.E. Lister // *J Int Med Res.* – 2009. – V. 37 (6). – P. 1961-1971.
83. Hirayama A. High-sensitivity simultaneous analysis of ubiquinol-10 and ubiquinone-10 in human plasma / A. Hirayama, H. Kubo, M. Mita, O. Shirota, Y. Yamamoto // *J Chromatogr Sci.* – 2008. – V. 46 (8). – P. 717-721.
84. Hiroshima O. Determination of ubiquinones in biological material by high performance liquid chromatography / O. Hiroshima, M. Shino // *Nihon rinsho.* – 1993. – V. 51 (4). – P. 952-958.
85. Hodgson J.M. Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes / J.M. Hodgson, G.F. Watts, D.A. Playford, V. Burke, K.D. Croft // *Eur J Clin Nutr.* – 2002. – V. 56 (11). – P. 1137-1142.
86. Holmgren A., Bjornstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase / A. Holmgren // *Methods Enzymol.* – 1995. – V. 252. – P. 199-208.
87. Horvath R. Coenzyme Q10 deficiency and isolated myopathy / R. Horvath, P. Schneiderat, B.G. Schoser, K. Gempel, E. Neuen-Jacob, H. Ploger, J. Muller-Hocker, D.E. Pongratz, A. Naini, S. DiMauro, H. Lochmuller // *Neurology.* – 2006. – V. 66 (2). – P. 253-255.
88. Ihara Y. Free radicals, lipid peroxides and antioxidants in blood of patients with myotonic dystrophy / Y. Ihara, A. Mori, T. Hayabara, R. Namba, K. Nobukuni, K. Sato, S. Miyata, R. Edamatsu, J. Liu, M. Kawai // *J Neurol.* – 1995. – V. 242 (3). – P. 119-122.
89. Ikenoya S. Studies on reduced and oxidized ubiquinones. I. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones in tissues and mitochondria by high performance liquid chromatography / S. Ikenoya, M. Takada, T. Yuzuriha, K. Abe, K. Katayama // *Pharm Bull.* – 1981. – V. 29 (1). – P. 158-164.
90. Ishiyama T. A clinical study of the effect of coenzyme Q on congestive heart failure / T. Ishiyama, Y. Morita, S. Toyama, T. Yamagami, N. A. Tsukamoto // *Nihon Rinsho.* – 1976. – V. 17 (1). – P. 32-42.
91. Ivanov A. Cardioprotection with Intravenous Injection of Coenzyme Q10 is limited by time of administration after onset of myocardial infarction in rats / A. Ivanov,

O. Tokareva, E. Gorodetskaya, E. Kalenikova, O. Medvedev // J Clin Exp Cardiol. – 2014. – V. 5 (4).

92. Iwamoto Y. Study of periodontal disease and coenzyme Q / Y. Iwamoto, R. Nakamura, K. Folkers, R. F. Morrison // Res Commun Chem Pathol Pharmacol. – 1975. – V. 11 (2). – P. 265-271.

93. Jiang P. Analysis of coenzyme Q(10) in human plasma by column-switching liquid chromatography / P. Jiang, M. Wu, Y. Zheng, C. Wang, Y. Li, J. Xin, G. Xu // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2004. – V. 805 (2). – P. 297-301.

94. Johansson P. Effect of selenium and Q10 on the cardiac biomarker NT-proBNP / P. Johansson, O. Dahlstrom, U. Dahlstrom, U. Alehagen // Scand Cardiovasc J. – 2013. – V. 47 (5). – P. 281-288.

95. Judy W.V. Myocardial preservation by therapy with coenzyme Q10 during heart surgery / W.V. Judy, W.W. Stogsdill, K. Folkers // Clin invest. – 1993. – V. 71 (8) Suppl. – P. S155-161.

96. Kaikkonen J. Determinants of plasma coenzyme Q10 in humans / J. Kaikkonen, K. Nyysönen, T.P. Tuomainen, U. Ristonmaa, J.T. Salonen // FEBS letters. – 1999. – V. 443 (2). – P. 163-166.

97. Kalenikova E.I. HPLC estimation of coenzyme Q10 redox status in plasma after intravenous coenzyme Q10 administration / E.I. Kalenikova, E.V. Kharitonova, E.A. Gorodetskaya, O.G. Tokareva, O.S. Medvedev // Biochem (Moscow) Supplement Ser B Biomed Chem. – 2014. – V. 8 (3). – P. 267-272

98. Kalenikova E.I. Chronic administration of coenzyme Q10 limits postinfarct myocardial remodeling in rats / E.I. Kalenikova, E.A. Gorodetskaya, E.G. Kolokolchikova, D.A. Shashurin, O.S. Medvedev // Biochemistry. – 2007. – V. 72 (3). – P. 332-338.

99. Kalenikova E.I. Pharmacokinetics of coenzyme q10 / E.I. Kalenikova, E.A. Gorodetskaya, O.S. Medvedev // Bull Exp Biol Med. – 2008. – V. 146 (3). – P. 313-316.

100. Kamikawa T. Effects of coenzyme Q10 on exercise tolerance in chronic stable angina pectoris / T. Kamikawa, A. Kobayashi, T. Yamashita, H. Hayashi, N. Yamazaki // Am J Cardiol. – 1985. – V. 56 (4). – P. 247-251.

101. Kamzalov S. Coenzyme Q intake elevates the mitochondrial and tissue levels of Coenzyme Q and alpha-tocopherol in young mice / S. Kamzalov, N. Sumien, M. J. Forster, R.S. Sohal // *J Nutr.* – 2003. – V. 133 (10). – P. 3175-3180.
102. Katayama K. Studies on lymphatic absorption of 1',2'-(3 H)-coenzyme Q 10 in rats / K. Katayama, T. Fujita // *Pharm Bull.* – 1972. – V. 20 (12). – P. 2585-2592.
103. Katayama K. Simultaneous determination of ubiquinone-10 and ubiquinol-10 in tissues and mitochondria by high performance liquid chromatography / K. Katayama, M. Takada, T. Yuzuriha, K. Abe, S. Ikenoya // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1980. – V. 95 (3). – P. 971-977.
104. Kishi H. Metabolism of exogenous coenzyme Q10 in vivo and the bioavailability of coenzyme Q10 preparations in Japan / H. Kishi, N. Kanamori, S. Nishii, E. Hiraoka, T. Okamoto, T. Kishi // *Biomed clin aspec Co Q.* – 1964. – P. 131–142.
105. Kishikawa N. Chemiluminescence assay for quinones based on generation of reactive oxygen species through the redox cycle of quinone / N. Kishikawa, N. Ohkubo, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda // *Anal Bioanal Chem.* – 2009. – V. 393 (4). – P. 1337-1343.
106. Kishikawa N. Selective determination of ubiquinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence reaction based on the redox cycle of quinone / N. Kishikawa, N. Ohkubo, K. Ohyama, K. Nakashima, N. Kuroda // *Anal Bioanal Chem.* – 2011. – V. 400 (2). – P. 381-385.
107. Klingenberg M. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view / M. Klingenberg, K.S. Echtay // *Biochim Biophys Acta.* – 2001. – V. 1504 (1). – P. 128-143.
108. Kommuru T.R. Stability and bioequivalence studies of two marketed formulations of coenzyme Q10 in beagle dogs / T.R. Kommuru, M. Ashraf, M.A. Khan, I.K. Reddy // *Pharm Bull.* – 1999. – V. 47 (7). – P. 1024-1028.
109. Kommuru T.R. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment / T.R. Kommuru, B. Gurley, M.A. Khan, I.K. Reddy // *Int J Pharm.* – 2001. – V. 212 (2). – P. 233-246.

110. Kuimov A.D. Coenzyme q10 in complex therapy of patients with ischemic heart disease / A.D. Kuimov, T.A. Murzina // *Kardiologiya*. – 2013. – V. 53 (8). – P. 40-43.
111. Kuklinski B. Coenzyme Q10 and antioxidants in acute myocardial infarction / B. Kuklinski, E. Weissenbacher, A. Fahnrich // *Mol Aspects Med*. – 1994. – V. 15 Suppl. – P. s143-147.
112. Kwong L.K. Effects of coenzyme Q(10) administration on its tissue concentrations, mitochondrial oxidant generation, and oxidative stress in the rat / L.K. Kwong, S. Kamzalov, I. Rebrin, A.C. Bayne, C.K. Jana, P. Morris, M.J. Forster, R.S. Sohal // *Free rad biol med*. – 2002. – V. 33 (5). – P. 627-638.
113. Laaksonen R. The effect of simvastatin treatment on natural antioxidants in low-density lipoproteins and high-energy phosphates and ubiquinone in skeletal muscle / R. Laaksonen, K. Jokelainen, J. Laakso, T. Sahi, M. Harkonen, M.J. Tikkanen, J.J. Himberg // *Am J Cardiol*. – 1996. – V. 77 (10). – P. 851-854.
114. Lagendijk J. Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress / J. Lagendijk, J.B. Ubbink, W.J. Vermaak // *J Lipid Res*. – 1996. – V. 37 (1). – P. 67-75.
115. Laguna T.A. Decreased total serum coenzyme-Q10 concentrations: a longitudinal study in children with cystic fibrosis / T.A. Laguna, M.K. Sontag, I. Osberg, J.S. Wagener, F.J. Accurso, R.J. Sokol // *J Pediatr*. – 2008. – V. 153 (3). – P. 402-407.
116. Lampertico M. Italian multicenter study on the efficacy and safety of coenzyme Q10 as adjuvant therapy in heart failure / M. Lampertico, S. Comis // *Clin invest*. – 1993. – V. 71 (8 Suppl). – P. S129-133.
117. Landbo C. Interaction between warfarin and coenzyme Q10 / C. Landbo, T.P. Almdal // *Ugeskrift for laeger*. – 1998. – V. 160 (22). – P. 3226-3227.
118. Lang J.K. Quantitative determination of vitamin E and oxidized and reduced coenzyme Q by high-performance liquid chromatography with in-line ultraviolet and electrochemical detection / J.K. Lang, L. Packer // *J Chromatogr A*. – 1987. – V. 385. – P. 109-117.
119. Langsjoen P.H. Long-term efficacy and safety of coenzyme Q10 therapy for idiopathic dilated cardiomyopathy / P.H. Langsjoen, K. Folkers // *Am J Cardiol*. – 1990. – V. 65 (7). – P. 521-523.

120. Langsjoen P.H. Isolated diastolic dysfunction of the myocardium and its response to CoQ10 treatment / P.H. Langsjoen, K. Folkers // Clin invest. – 1993. – V. 71 (8 Suppl). – P. S140-144.
121. Langsjoen P.H. Pronounced increase of survival of patients with cardiomyopathy when treated with coenzyme Q10 and conventional therapy / P.H. Langsjoen, K. Folkers, K. Lyson, K. Muratsu, T. Lyson, P. Langsjoen // Int J Tissue React. – 1990. – V. 12 (3). – P. 163-168.
122. Langsjoen P.H. Treatment of hypertrophic cardiomyopathy with coenzyme Q10 / P.H. Langsjoen, A. Langsjoen, R. Willis, K. Folkers // Mol Aspects Med. – 1997. – V. 18 Suppl. – P. S145-151.
123. Langsjoen P.H. Overview of the use of CoQ10 in cardiovascular disease / P.H. Langsjoen, A.M. Langsjoen // BioFactors. – 1999. – V. 9 (2-4). – P. 273-284.
124. Lass A. Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species / A. Lass, R.S. Sohal // Free Radic Biol Med. – 1999. – V. 27 (1-2). – P. 220-226.
125. Lee B.J. Effects of coenzyme Q10 supplementation on inflammatory markers (high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, and homocysteine) in patients with coronary artery disease / B.J. Lee, Y.C. Huang, S.J. Chen, P.T. Lin // Nutrition. – 2012. – V. 28 (7-8). – P. 767-772.
126. Lee B.J. A significant correlation between the plasma levels of coenzyme Q10 and vitamin B-6 and a reduced risk of coronary artery disease / B.J. Lee, C.H. Yen, H.C. Hsu, J.Y. Lin, S. Hsia, P.T. Lin // Nutr Res. – 2012. – V. 32 (10). – P. 751-756.
127. Lee B.L. Comprehensive high-performance liquid chromatographic method for the measurements of lipophilic antioxidants in human plasma / B.L. Lee, C.N. Ong // J Chromatogr A. – 2009. – V. 1216 (15). – P. 3131-3137.
128. Leray C. Simultaneous determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of alpha-tocopherol oxidation / C. Leray, M.D. Andriamampandry, M. Freund, C. Gachet, J.P. Cazenave // J Lipid Res. – 1998. – V. 39 (10). – P. 2099-2105.
129. Li H. CoQ10 fails to protect brain against focal and global ischemia in rats / H. Li, G. Klein, P. Sun, A. M. Buchan // Brain Res. – 2000. – V. 877 (1). – P. 7-11.

130. Li L. Analysis of CoQ10 in rat serum by ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry after oral administration / L. Li, D. Pabbisetty, P. Carvalho, M. A. Avery, B. A. Avery // *J Pharm Biomed Anal.* – 2008. – V. 46 (1). – P. 137-142.
131. Li L. Urinary excretion study of coenzyme Q10 in rats by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry / L. Li, D. Pabbisetty, S. Zhu, M. A. Avery, B. A. Avery // *J Chromatogr Sci.* – 2008. – V. 46 (3). – P. 215-219.
132. Littarru G. P. Deficiency of coenzyme Q 10 in gingival tissue from patients with periodontal disease / G. P. Littarru, R. Nakamura, L. Ho, K. Folkers, W. C. Kuzell // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1971. – V. 68 (10). – P. 2332-2335.
133. Littarru G.P. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments / G.P. Littarru, L. Tiano // *Mol biotechn.* – 2007. – V. 37 (1). – P. 31-37.
134. Lockwood K. Apparent partial remission of breast cancer in 'high risk' patients supplemented with nutritional antioxidants, essential fatty acids and coenzyme Q10 / K. Lockwood, S. Moesgaard, T. Hanioka, K. Folkers // *Mol Aspects Med.* – 1994. – T. 15 Suppl. – P. s231-240.
135. Lonnrot K. The effects of lifelong ubiquinone Q10 supplementation on the Q9 and Q10 tissue concentrations and life span of male rats and mice / K. Lonnrot, P. Holm, A. Lagerstedt, H. Huhtala, H. Alho // *Biochem Mol Biol Int.* – 1998. – V. 44 (4). – P. 727-737.
136. Lucangioli S. A capillary electrophoretic system based on a novel microemulsion for the analysis of coenzyme Q10 in human plasma by electrokinetic chromatography / S. Lucangioli, S. Flor, M. Contin, V. Tripodi // *Electrophoresis.* – 2009. – V. 30 (11). – P. 1899-1905.
137. Mabuchi H. Effects of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10 levels in patients with familial hypercholesterolemia. – 1981 / H. Mabuchi, T. Haba, R. Tatami, S. Miyamoto, Y. Sakai, T. Wakasugi, A. Watanabe, J. Koizumi, R. Takeda // *Atherosclerosis. Suppl.* – 2004. – V. 5 (3). – P. 51-55.
138. Mabuchi H. Reduction of serum ubiquinol-10 and ubiquinone-10 levels by atorvastatin in hypercholesterolemic patients / H. Mabuchi, T. Higashikata, M.

Kawashiri, S. Katsuda, M. Mizuno, A. Nohara, A. Inazu, J. Koizumi, J.Kobayashi // *J Atheroscler Thromb.* – 2005. – V. 12 (2). – P. 111-119.

139. Matsumura T. Evidence for enhanced treatment of periodontal disease by therapy with coenzyme Q / T. Matsumura, S. Saji, R. Nakamura, K. Folkers // *Int J Vitam Nutr Res.* – 1973. – V. 43 (4). – P. 537-548.

140. Matthews R. T. Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects / R. T. Matthews, L. Yang, S. Browne, M. Baik, M. F. Beal // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V. 95 (15). – P. 8892-8897.

141. Mellors A. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol / A. Mellors, A.L. Tappel // *J Biol Chem.* – 1966. – V. 241 (19). – P. 4353-4356.

142. Mellors A. Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation / A. Mellors, A. L. Tappel // *Lipids.* – 1966. – V. 1 (4). – P. 282-284.

143. Meng X. Characterization and pharmacokinetics of coenzyme Q10 nanoparticles prepared by a rapid expansion of supercritical solution process / X. Meng, Y. Zu, X. Zhao, Q. Li, S. Jiang, M. Sang // *Pharmazie.* – 2012. – V. 67 (2). – P. 161-167.

144. Michalkiewicz S. Cathodic reduction of coenzyme Q10 on glassy carbon electrode in acetic acid-acetonitrile solutions / S. Michalkiewicz // *Bioelectrochemistry.* – 2007. – V. 70 (2). – P. 495-500.

145. Michalkiewicz S. Voltammetric determination of coenzyme Q10 in pharmaceutical dosage forms / S. Michalkiewicz // *Bioelectrochemistry.* – 2008. – V. 73 (1). – P. 30-36.

146. Michalkiewicz S. Anodic oxidation of oxidized forms of coenzymes Q(10) and Q(0) on carbon electrodes in acetic acid solutions / S. Michalkiewicz // *Bioelectrochemistry.* – 2011. – V. 82 (2). – P. 103-111.

147. Miles M.V. Plasma coenzyme Q10 reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults / M.V. Miles, P.S. Horn, J.A. Morrison, P.H. Tang, T. DeGrauw, A.J. Pesce // *Clinica chimica acta.* – 2003. – V. 332 (1-2). – P. 123-132.

148. Miles M.V. Age-related changes in plasma coenzyme Q10 concentrations and redox state in apparently healthy children and adults / M.V. Miles, P.S. Horn, P.H. Tang,

J.A. Morrison, L. Miles, T. DeGrauw, A.J. Pesce // *Clinica chimica acta*. – 2004. – V. 347 (1-2). – P. 139-144.

149. Miles M.V. Bioequivalence of coenzyme Q10 from over-the-counter supplements / M.V. Miles, L. Miles, P. Tang, P. Steele, T. DeGrauw // *Nutr Res*. – 2002. – P. 919–929.

150. Mitchell P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle / P. Mitchell // *FEBS letters*. – 1975. – V. 56 (1). – P. 1-6.

151. Mitchell P. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems / P. Mitchell // *J Theor Biol*. – 1976. – V. 62 (2). – P. 327-367.

152. Mitchell P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences / P. Mitchell // *Science*. – 1979. – V. 206 (4423). – P. 1148-1159.

153. Mitchell P. K. Respiratory chain systems in theory and practice / P. K. Mitchell // *Adv Membr Biochem Bioenerget*. – 1988. – P. 25-52.

154. Mitchell P. The vital protonmotive role of coenzyme Q / P. Mitchell, G.P. Littarru, T. Yamagami // *Biomed Clin Asp CoQ*. – 1991. – V. 6. – P. 3-10.

155. Mohr D. Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation / D. Mohr, V.W. Bowry, R. Stocker // *Biochim Biophys Acta*. – 1992. – V. 1126 (3). – P. 247-254.

156. Morisco C. Effect of coenzyme Q10 therapy in patients with congestive heart failure: a long-term multicenter randomized study / C. Morisco, B. Trimarco, M. Condorelli // *J Clin Invest*. – 1993. – V. 71 (8 Suppl). – P. S134-136.

157. Morita M. A new method to determine the level of coenzyme Q10 in one drop of human blood for biomedical research / M. Morita, K. Folkers // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1993. – V. 191 (3). – P. 950-954.

158. Morre D. J. Hormone- and growth factor-stimulated NADH oxidase / D. J. Morre // *J Bioenerg Biomembr*. – 1994. – V. 26 (4). – P. 421-433.

159. Mortensen S. A. Perspectives on therapy of cardiovascular diseases with coenzyme Q10 (ubiquinone) / S. A. Mortensen // *J Clin invest*. – 1993. – V. 71 (8) Suppl. – P. S116-123.

160. Mortensen S.A. Dose-related decrease of serum coenzyme Q10 during treatment with HMG-CoA reductase inhibitors / S.A. Mortensen, A. Leth, E. Agner, M. Rohde // *Mol Aspects Med.* – 1997. – V. 18 Suppl. – P. S137-144.
161. Mortensen S.A. Long-term coenzyme Q10 therapy: a major advance in the management of resistant myocardial failure / S.A. Mortensen, S. Vadhanavikit, U. Baandrup, K. Folkers // *Drugs Exp Clin Res.* – 1985. – V. 11 (8). – P. 581-593.
162. Mortensen S.A. Coenzyme Q10: clinical benefits with biochemical correlates suggesting a scientific breakthrough in the management of chronic heart failure / S.A. Mortensen, S. Vadhanavikit, K. Muratsu, K. Folkers // *Int J Tissue React.* – 1990. – V. 12 (3). – P. 155-162.
163. Morton R.A. Ubiquinone / R.A. Morton, J.S. Lowe, W.M.F. Leat // *Chem Ind.* – 1957. – P. 1649.
164. Mosca F. Assay of coenzyme Q(10) in plasma by a single dilution step / F. Mosca, D. Fattorini, S. Bompadre, G. P. Littarru // *Anal Biochem.* – 2002. – V. 305 (1). – P. 49-54.
165. Musumeci O. Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency / O. Musumeci, A. Naini, A.E. Slonim, N. Skavin, G.L. Hadjigeorgiou, N. Krawiecki, B.M. Weissman, C.Y. Tsao, J.R. Mendell, S. Shanske, D.C. De Vivo, M. Hirano, S. DiMauro // *Neurology.* – 2001. – V. 56 (7). – P. 849-855.
166. Nakamura R. Deficiency of coenzyme Q in gingiva of patients with periodontal disease / R. Nakamura, G.P. Littarru, K. Folkers, E.G. Wilkinson // *Int J Vitam Nutr Res.* – 1973. – V. 43 (1). – P. 84-92.
167. Nedergaard J. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency / J. Nedergaard, V. Golozoubova, A. Matthias, A. Asadi, A. Jacobsson, B. Cannon // *Biochim Biophys Acta.* – 2001. – V. 1504 (1). – P. 82-106.
168. Nicholls D.G. Thermogenic mechanisms in brown fat / D.G. Nicholls, R.M. Locke // *Physiol reviews.* – 1984. – V. 64 (1). – P. 1-64.
169. Niklowitz P. Coenzyme Q10 in plasma and erythrocytes: comparison of antioxidant levels in healthy probands after oral supplementation and in patients suffering from sickle cell anemia / P. Niklowitz, T. Menke, T. Wiesel, E. Mayatepek, J. Zschocke, J. G. Okun, W. Andler // *Clin Chim Acta.* – 2002. – V. 326 (1-2). – P. 155-161.

170. Nohara Y. Determination of ubiquinone in blood by high-performance liquid chromatography with post-column fluorescence derivatization using 2-cyanoacetamide / Y. Nohara, J. Suzuki, H. Kubo // *J Fluoresc.* – 2011. – V. 21(6). – P. 2093-2100.
171. Noia G. Coenzyme Q10 in pregnancy / G. Noia, G.P. Littarru, M. De Santis, A. Oradei, C. Mactromarino, C. Trivellini, A. Caruso // *Fetal Diagn Ther.* – 1996. – V. 11 (4). – P. 264-270.
172. Ogawa N. Survival effect of coenzyme Q10 and naloxone on experimental stroke gerbils / N. Ogawa, S. Tsukamoto, Y. Hirose, H. Kuroda // *Pharmacol Biochem Behav.* – 1986. – V. 24 (2). – P. 315-317.
173. Ohara K. Engineering of ubiquinone biosynthesis using the yeast *coq2* gene confers oxidative stress tolerance in transgenic tobacco / K. Ohara, Y. Kokado, H. Yamamoto, F. Sato, K. Yazaki // *Plant J.* – 2004. – V. 40 (5). – P. 734-743.
174. Okamoto F. Reperfusate composition: supplemental role of intravenous and intracoronary coenzyme Q10 in avoiding reperfusion damage / F. Okamoto, B.S. Allen, G.D. Buckberg, J. Leaf, H. Bugyi // *J Thorac Cardiovasc Surg.* – 1986. – V. 92 (3). – P. 573-582.
175. Okamoto T. High-performance liquid chromatography of coenzyme Q-related compounds and its application to biological materials / T. Okamoto, K. Fukui, M. Nakamoto, T. Kishi, T. Okishio, T. Yamagami, N. Kanamori, H. Kishi, E. Hiraoka // *J Chromatogr A.* – 1985. – V. 342 (1). – P. 35-46.
176. Okamoto T. Determination of reduced and total ubiquinones in biological materials by liquid chromatography with electrochemical detection / T. Okamoto, Y. Fukunaga, Y. Ida, T. Kishi // *J Chromatogr A.* – 1988. – V. 430 (1). – P. 11-19.
177. Overvad K. Coenzyme Q10 in health and disease / K. Overvad, B. Diamant, L. Holm, G. Holmer, S.A. Mortensen, S. Stender // *Eur J Clin Nutr.* – 1999. – V. 53 (10). – P. 764-770.
178. Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging / T. Ozawa // *Physiol reviews.* – 1997. – V. 77 (2). – P. 425-464.
179. Ozawa Y. Intestinal absorption enhancement of coenzyme Q10 with a lipid microsphere / Y. Ozawa, Y. Mizushima, I. Koyama, M. Akimoto, Y. Yamagata, H. Hayashi, H. Murayama // *Arzneimittelforschung.* – 1986. – V. 36 (4). – P. 689-690.

180. Palamakula A. Evaluation of cytotoxicity of oils used in coenzyme Q10 Self-emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) / A. Palamakula, M.A. Khan // *Int J Pharm.* – 2004. – V. 273 (1-2). – P. 63-73.
181. Papa S. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging / S. Papa, V.P. Skulachev // *Mol Cell Biochem.* – 1997. – V. 174 (1-2). – P. 305-319.
182. Papucci L. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property / L. Papucci, N. Schiavone, E. Witort, M. Donnini, A. Lapucci, A. Tempestini, L. Formigli, S. Zecchi-Orlandini, G. Orlandini, G. Carella, R. Brancato, S. Capaccioli // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278 (30). – P. 28220-28228.
183. Passi S. Statins lower plasma and lymphocyte ubiquinol/ubiquinone without affecting other antioxidants and PUFA / S. Passi, A. Stancato, E. Aleo, A. Dmitrieva, G. P. Littarru // *BioFactors.* – 2003. – V. 18 (1-4). – P. 113-124.
184. Pastore A. Simultaneous determination of ubiquinol and ubiquinone in skeletal muscle of pediatric patients / A. Pastore, G.D. Giovamberardino, E. Bertini, G. Tozzi, L.M. Gaeta, G. Federici, F. Piemonte // *Anal biochem.* – 2005. – V. 342 (2). – P. 352-355.
185. Pepe S. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease / S. Pepe, S.F. Marasco, S. J. Haas, F.L. S heeran, H. Krum, F.L. Rosenfeldt // *Mitochondrion.* – 2007. – V. 7 Suppl. – P. S154-167.
186. Piepel G. Mixture-process variable approach to optimize a microemulsion electrokinetic chromatography method for the quality control of a nutraceutical based on coenzyme Q10 / G. Piepel, B. Pasquini, S. Cooley, A. Heredia-Langner, S. Orlandini, S. Furlanetto // *Talanta.* – 2012. – V. 97. – P. 73-82.
187. Piotrowski P. The effect of coenzyme Q10 on lactate acidosis at the beginning of experimental cerebral ischemia in rats after the use of endothelin 1 (preliminary results) / P. Piotrowski, R.P. Ostrowski, T. Pankowska, M. Smialek // *Neurol Neurochir Pol.* – 1998. – V. 32 (6). – P. 1397-1404.
188. Piotrowski P. Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants / P. Piotrowski, K. Wierzbicka, M. Smialek // *Folia neuropathologica / Folia Neuropathol.* – 2001. – V. 39 (3). – P. 147-154.

189. Prakash S. Role of coenzyme Q(10) as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases / S. Prakash, J. Sunitha, M. Hans // *Indian J Pharmacol.* – 2010. – V. 42 (6). – P. 334-337.
190. Qiao J.H. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice / J.H. Qiao, J. Tripathi, N.K. Mishra, Y. Cai, S. Tripathi, X.P. Wang, S. Imes, M.C. Fishbein, S.K. Clinton, P. Libby, A.J. Lusis, T.B. Rajavashisth // *Am J Pathol.* – 1997. – V. 150 (5). – P. 1687-1699.
191. Qu F. Determination of coenzyme Q and alpha-tocopherol in mouse plasma and tissue mitochondria by liquid chromatography with electrochemical detection / F. Qu, J.M. Lin // *Se pu / Zhongguo hua xue hui.* – 2001. – V. 19 (6). – P. 489-492.
192. Redalieu E. Determination and levels of coenzyme Q10 in human blood / E. Redalieu, I.M. Nilsson, T.M. Farley, K. Folkers, F.R. Koniuszy // *Anal biochem.* – 1968. – V. 23 (1). – P. 132-140.
193. Rilling H.C. Eukaryotic prenyltransferases / H.C. Rilling // *Methods Enzymol.* – 1985. – V. 110. – P. 145-152.
194. Rokos J.A. Determination of ubiquinone in subnanomole quantities by spectrofluorometry of its product with alkaline ethylcyanoacetate / J.A. Rokos // *Anal biochem.* – 1973. – V. 56 (1). – P. 26-33.
195. Ruiz-Jimenez J. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress / J. Ruiz-Jimenez, F. Priego-Capote, J.M. Mata-Granados, J.M. Quesada, M. D. Luque de Castro // *J Chromatogr A.* – 2007. – V. 1175 (2). – P. 242-248.
196. Rundek T. Atorvastatin decreases the coenzyme Q10 level in the blood of patients at risk for cardiovascular disease and stroke / T. Rundek, A. Naini, R. Sacco, K. Coates, S. DiMauro // *Arch Neurol.* – 2004. – V. 61 (6). – P. 889-892.
197. Safarinejad M. R. Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men / M. R. Safarinejad // *J Urol.* – 2009. – V. 182 (1). – P. 237-248.
198. Safarinejad M.R. The effect of coenzyme Q(1)(0) supplementation on partner pregnancy rate in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: an open-

label prospective study / M. R. Safarinejad // *Int Urol Nephrol.* – 2012. – V. 44 (3). – P. 689-700.

199. Schaars C.F. Effects of ubiquinone (coenzyme Q10) on myopathy in statin users / C.F. Schaars, A.F. Stalenhoef // *Curr Opin Lipidol.* – 2008. – V. 19 (6). – P. 553-557.

200. Shi H. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation / H. Shi, N. Noguchi, E. Niki // *Free Radic Biol Med.* – 1999. – V. 27 (3-4). – P. 334-346.

201. Shults C.W. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline / C.W. Shults, D. Oakes, K. Kieburtz, M.F. Beal, R. Haas, S. Plumb, J.L. Juncos, J. Nutt, I. Shoulson, J. Carter, K. Kompoliti, J.S. Perlmutter, S. Reich, M. Stern, R.L. Watts, R. Kurlan, E. Molloy, M. Harrison, M. Lew // *Arch Neurol.* – 2002. – V. 59 (10). – P. 1541-1550.

202. Siekmann B. Preparation and physicochemical characterization of aqueous dispersions of coenzyme Q10 nanoparticles / B. Siekmann, K. Westesen // *Pharm Res.* – 1995. – V. 12 (2). – P. 201-208.

203. Silver M.A. Effect of atorvastatin on left ventricular diastolic function and ability of coenzyme Q10 to reverse that dysfunction / M.A. Silver, P.H. Langsjoen, S. Szabo, H. Patil, A. Zelinger // *Am J Cardiol.* – 2004. – V. 94 (10). – P. 1306-1310.

204. Singh R.B. Effect on absorption and oxidative stress of different oral Coenzyme Q10 dosages and intake strategy in healthy men / R.B. Singh, M.A. Niaz, A. Kumar, C.D. Sindberg, S. Moesgaard, G.P. Littarru // *BioFactors.* – 2005. – V. 25 (1-4). – P. 219-224.

205. Singh R.B. Effect of hydrosoluble coenzyme Q10 on blood pressures and insulin resistance in hypertensive patients with coronary artery disease / R.B. Singh, M.A. Niaz, S.S. Rastogi, P.K. Shukla, A.S. Thakur // *J Hum Hypertens.* – 1999. – V. 13,(3). – P. 203-208.

206. Singh R.B. Randomized, double-blind placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in patients with acute myocardial infarction / R.B. Singh, G.S. Wander, A. Rastogi, P.K. Shukla, A. Mittal, J.P. Sharma, S.K. Mehrotra, R. Kapoor, R.K. Chopra // *Cardiovasc Drugs Ther.* – 1998. – V. 12 (4). – P. 347-353.

207. Skulachev V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics / V.P. Skulachev // *Biochim Biophys Acta*. – 1998. – V. 1363 (2). – P. 100-124.
208. Smith J.D. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E / J.D. Smith, E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian, M. Miyata // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1995. – V. 92 (18). – P. 8264-8268.
209. Spigset O. Reduced effect of warfarin caused by ubidecarenone / O. Spigset // *Lancet*. – 1994. – V. 344 (8933). – P. 1372-1373.
210. Stadtman E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences / E.R. Stadtman // *Free Radic Biol Med*. – 1990. – V. 9 (4). – P. 315-325.
211. Staicu M.L. Effects of exogenous antioxidants on oxidative stress in pregnancy / M.L. Staicu, A. Muresan, S. Tache, R. Moldovan // *J Med Life*. – 2011. – V. 4 (2). – P. 163-167.
212. Steele P.E. Clinical laboratory monitoring of coenzyme Q10 use in neurologic and muscular diseases / P.E. Steele, P.H. Tang, A.J. DeGrauw, M.V. Miles // *Am J Clin Pathol*. – 2004. – V. 121 Suppl. – P. S113-120.
213. Stiff M.R. Analysis of CoQ10 in cultivated tobacco by a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method / M.R. Stiff, A.K. Weissinger, D.A. Danehower // *J Agric Food Chem*. – 2011. – V. 59 (17). – P. 9054-9058.
214. Stocker R. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol / R. Stocker, V.W. Bowry, B. Frei // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1991. – V. 88 (5). – P. 1646-1650.
215. Takada M. Simultaneous determination of reduced and oxidized ubiquinones / M. Takada, S. Ikenoya, T. Yuzuriha, K. Katayama // *Methods Enzymol*. – 1984. – V. 105. – P. 147-155.
216. Tang P.H. HPLC analysis of reduced and oxidized coenzyme Q(10) in human plasma / P.H. Tang, M.V. Miles, A. DeGrauw, A. Hershey, A. Pesce // *Clin chem*. – 2001. – V. 47 (2). – P. 256-265.
217. Teran E. Maternal plasma and amniotic fluid coenzyme Q10 levels in preterm and term gestations: a pilot study / E. Teran, M. Racines-Orbe, J. Toapanta, L.

Valdivieso, Z. Vega, S. Vivero, W. Moya, P. Chedraui, F.R. Perez-Lopez // Arch Gynecol Obstet. – 2011. – V. 283 Suppl 1. – P. 67-71.

218. Teshima K. Analytical method for ubiquinone-9 and ubiquinone-10 in rat tissues by liquid chromatography/turbo ion spray tandem mass spectrometry with 1-alkylamine as an additive to the mobile phase / K. Teshima, T. Kondo // Anal Biochem. – 2005. – V. 338 (1). – P. 12-19.

219. Thelin A. Half-life of ubiquinone-9 in rat tissues / A. Thelin, S. Schedin, G. Dallner // FEBS letters. – 1992. – V. 313 (2). – P. 118-120.

220. Thomas S.R. Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q(10) inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice / S.R. Thomas, S.B. Leichtweis, K. Pettersson, K.D. Croft, T.A. Mori, A.J. Brown, R. Stocker // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2001. – V. 21 (4). – P. 585-593.

221. Tomasetti M. R. In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage / M. Tomasetti, R. Alleva, B. Borghi, A. R. Collins // FASEB J. – 2001. – V. 15 (8). – P. 1425-1427.

222. Tomasetti M. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes / M. Tomasetti, G.P. Littarru, R. Stocker, R. Alleva // Free Radic Biol Med. – 1999. – V. 27 (9-10). – P. 1027-1032.

223. Tomono Y. Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man / Y. Tomono, J. Hasegawa, T. Seki, K. Motegi, N. Morishita // Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol. – 1986. – V. 24 (10). – P. 536-541.

224. Traber M.G. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins / M.G. Traber, J.C. Lane, N.R. Lagmay, H.J. Kayden // Lipids. – 1992. – T. 27 (9). – P. 657-663.

225. Tsukahara Y. Antioxidant role of endogenous coenzyme Q against the ischemia and reperfusion-induced lipid peroxidation in fetal rat brain / Y. Tsukahara, A. Wakatsuki, Y. Okatani // Acta Obstet Gynecol Scand. – 1999. – V. 78 (8). – P. 669-674.

226. Turunen M. Blood concentration of coenzyme Q(10) increases in rats when esterified forms are administered / M. Turunen, E.L. Appelkvist, P. Sindelar, G. Dallner // J Nutr. – 1999. – V. 129 (12). – P. 2113-2118.

227. Turunen M. Metabolism and function of coenzyme Q / M. Turunen, J. Olsson, G. Dallner // Biochim Biophys Acta. – 2004. – V. 1660 (1-2). – P. 171-199.

228. Ullmann U. A new Coenzyme Q10 tablet-grade formulation (all-Q) is bioequivalent to Q-Gel and both have better bioavailability properties than Q-SorB / U. Ullmann, J. Metzner, C. Schulz, J. Perkins, B. Leuenberger // *J Med Food*. – 2005. – V. 8 (3). – P. 397-399.

229. Ullrich O. Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones / O. Ullrich, T. Reinheckel, N. Sitte, R. Hass, T. Grune, K.J. Davies // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1999. – V. 96 (11). – P. 6223-6228.

230. Verma D.D. Protective effect of coenzyme Q10-loaded liposomes on the myocardium in rabbits with an acute experimental myocardial infarction / D.D. Verma, W.C. Hartner, V. Thakkar, T.S. Levchenko, V.P. Torchilin // *Pharm Res*. – 2007. – V. 24 (11). – P. 2131-2137.

231. Wakabayashi H. Simultaneous determination of oxidized and reduced coenzyme Q and alpha-tocopherol in biological samples by high performance liquid chromatography with platinum catalyst reduction and electrochemical detection / H. Wakabayashi, S. Yamato, M. Nakajima, K. Shimada // *Biol Pharm Bull*. – 1994. – V. 17 (8). – P. 997-1002.

232. Wang Q. Automated high-performance liquid chromatographic method with precolumn reduction for the determination of ubiquinol and ubiquinone in human plasma / Q. Wang, B.L. Lee, C.N. Ong // *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. – 1999. – V. 726 (1-2) – P. 297-302.

233. Watts G.F. Coenzyme Q(10) improves endothelial dysfunction of the brachial artery in Type II diabetes mellitus / G.F. Watts, D.A. Playford, K.D. Croft, N.C. Ward, T.A. Mori, V. Burke // *Diabetologia*. – 2002. – V. 45 (3). – P. 420-426.

234. Weber C. Coenzyme Q10 in the diet daily intake and relative bioavailability / C. Weber, A. Bysted, G. Holmer // *Mol Aspects Med*. – 1997. – V. 18 Suppl. – P. S251-254.

235. Weber C. Intestinal absorption of coenzyme Q10 administered in a meal or as capsules to healthy subjects / C. Weber, A. Bysted, G. Holmer // *Nutr Res*. – 1997. – V. 17. – P. 941-945.

236. Weber C. Antioxidative effect of dietary coenzyme Q10 in human blood plasma / C. Weber, T. Sejersgard Jakobsen, S.A. Mortensen, G. Paulsen, G. Holmer // *Int J Vitam Nutr Res*. – 1994. – V. 64 (4). – P. 311-315.

237. Wilkinson E.G. Bioenergetics in clinical medicine. VI. adjunctive treatment of periodontal disease with coenzyme Q10 / E.G. Wilkinson, R.M. Arnold, K. Folkers // *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* – 1976. – V. 14 (4). – P. 715-719.
238. Wilkinson E.G. Bioenergetics in clinical medicine. II. Adjunctive treatment with coenzyme Q in periodontal therapy / E.G. Wilkinson, R.M. Arnold, K. Folkers, I. Hansen, H. Kishi // *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* – 1975. – V. 12 (1). – P. 111-123.
239. Williams K.D. 52-Week oral gavage chronic toxicity study with ubiquinone in rats with a 4-week recovery / K.D. Williams, J.D. Maneke, M. AbdelHameed, R.L. Hall, T.E. Palmer, M. Kitano, T. Hidaka // *J Agric Food Chem.* – 1999. – V. 47 (9). – P. 3756-3763.
240. Witting P.K. Anti-atherogenic effect of coenzyme Q10 in apolipoprotein E gene knockout mice / P.K. Witting, K. Pettersson, J. Letters, R. Stocker // *Free Radic Biol Med.* – 2000. – V. 29 (3-4). – P. 295-305.
241. Wood R.D. DNA repair in eukaryotes / R.D. Wood // *Annu Rev Biochem.* – 1996. – V. 65. – P. 135-167.
242. Wood Z.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling / Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus // *Science.* – 2003. – V. 300 (5619). – P. 650-653.
243. Xia S. Optimization in the preparation of coenzyme Q10 nanoliposomes / S. Xia, S. Xu, X. Zhang // *J Agric Food Chem.* – 2006. – V. 54 (17). – P. 6358-6366.
244. Xia S. Effect of coenzyme Q(10) incorporation on the characteristics of nanoliposomes / S. Xia, S. Xu, X. Zhang, F. Zhong // *J Phys Chem B.* – 2007. – V. 111 (9). – P. 2200-2207.
245. Yamagami T. Bioenergetics in clinical medicine. Studies on coenzyme Q10 and essential hypertension / T. Yamagami, N. Shibata, K. Folkers // *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* – 1975. – V. 11 (2). – P. 273-288.
246. Yang H.Y. High-sensitive determination of coenzyme Q(10) in iodinate-beta-cyclodextrin medium by inclusion reaction and catalytic polarography / H.Y. Yang, J.F. Song // *Anal Biochem.* – 2006. – V. 348 (1). – P. 69-74.

247. Yang H.Y. Inclusion of coenzyme Q10 with beta-cyclodextrin studied by polarography / H.Y. Yang, J.F. Song // Yao xue xue bao. – 2006. – V. 41 (7). – P. 671-674.
248. Yoneda T. Anti-aging Effects of Co-enzyme Q10 on Periodontal Tissues / T. Yoneda, T. Tomofuji, D. Ekuni, T. Azuma, Y. Endo, K. Kasuyama, T. Machida, M. Morita // J Dent Res. – 2013. – V. 92 (8). – P. 735-739.
249. Yoshida Y. Evaluation of the dietary effects of coenzyme Q in vivo by the oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid and its stereoisomer ratio / Y. Yoshida, M. Hayakawa, Y. Habuchi, E. Niki // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V. 1760 (10). – P. 1558-1568.
250. Zaghloul A.A. Bioavailability assessment of oral coenzyme Q10 formulations in dogs / A.A. Zaghloul, B. Gurley, M. Khan, H. Bhagavan, R. Chopra, I. Reddy // Drug Dev Ind Pharm. – 2002. – V. 28 (10). – P. 1195-1200.
251. Zhang Y. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats / Y. Zhang, F. Aberg, E.L. Appelkvist, G. Dallner, L. Ernster // J Nutr. – 1995. – V. 125 (3). – P. 446-453.
252. Zhang Y. Analysis of ubiquinone and tocopherol levels in normal and hyperlipidemic human plasma / Y. Zhang, M. Eriksson, G. Dallner, E.L. Appelkvist // Lipids. – 1998. – V. 33 (8). – P. 811-815.
253. Zhang Y. Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of alpha-tocopherol into rat organs and cells / Y. Zhang, M. Turunen, E.L. Appelkvist // J Nutr. – 1996. – V. 126 (9). – P. 2089-2097.
254. Zmitek J. Relative bioavailability of two forms of a novel water-soluble coenzyme Q10 / J. Zmitek, A. Smidovnik, M. Fir, M. Prosek, K. Zmitek, J. Walczak, I. Pravst // Ann Nutr Metab. – 2008. – V. 52 (4). – P. 281-287.