

Московский Государственный Университет

имени М.В. Ломоносова

Факультет фундаментальной медицины

*На правах рукописи*

**Куляк Олеся Юрьевна**

**Доклиническое исследование фармакокинетики  
инновационного препарата коэнзима Q<sub>10</sub>**

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Научные руководители:

Доктор фармацевтических наук Каленикова Елена Игоревна

Доктор медицинских наук Медведев Олег Стефанович

Москва 2018

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ II	Ангиотензин II
BNP	Мозговой натрийуретический пептид
CoQ <sub>10</sub>	Коэнзим Q <sub>10</sub>
CoQ <sub>9</sub>	Коэнзим Q <sub>9</sub>
TCoQ <sub>10</sub>	Общее содержание коэнзима Q <sub>10</sub>
LV <sub>ind</sub>	Индекс массы левого желудочка
mPTR	Высокопроводящие каналы внутренней мембраны митохондрий
CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub>	Убихинол
QH	Семихинон
RV <sub>ind</sub>	Индекс массы правого желудочка
АФК	Активные формы кислорода
ВЭЖХ-ЭХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием
ИП	Ишемическое preconditioning
И/Р	Ишемия/Реперфузия
ЛЖ	Левый желудочек
РААС	Ренин-ангиотензин-альдостероновая система
РП	Реперфузионные повреждения
СНС	Симпатическая нервная система
ТТХ	Трифенилтетразолина хлоридом
ТЦПЭ	Транспортная цепь переноса электронов
CRP	С-реактивный белок
IL-6	Интерлейкин-6
TNF- $\alpha$	Фактор некроза опухоли
TGF- $\beta$	Трансформирующий фактор роста- $\beta$
NT-proBNP	N-концевой натрийуретический пептид
vs	Относительно (лат.)

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>13</b>
1. Коэнзим Q <sub>10</sub> .....	13
История открытия коэнзимаQ <sub>10</sub> .....	15
Биосинтез коэнзима Q <sub>10</sub> .....	15
Промышленное производство коэнзима Q <sub>10</sub> .....	18
Общий пул коэнзима Q <sub>10</sub> .....	18
Функции коэнзима Q <sub>10</sub> .....	21
Лекарственные средства, содержащие CoQ <sub>10</sub> , представленные на Российском фармацевтическом рынке .....	23
2. Убихинон .....	24
Механизмы всасывания.....	25
Содержание в тканях .....	26
Метаболизм .....	28
Фармакокинетика.....	29
Применение убихинона.....	33
3. Убихинол .....	35
Фармакокинетика и биодоступность убихинола.....	35
Применение убихинола.....	40
<b>II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>44</b>
1. Материалы и методы .....	44
Реактивы .....	44
Оборудование .....	44
Объекты исследования .....	45

2. Протоколы исследований.....	57
2.1. Протокол валидации биоаналитической методики ВЭЖХ-ЭХ анализа CoQH <sub>2</sub> .....	57
2.2. Протокол фармакокинетического исследования препарата убихинола при однократном внутривенном введении в 3-х различных дозах (5мг/кг, 10мг/кг и 20 мг/кг) .....	59
2.3. Протокол исследования распределения CoQ10 в органах крыс после внутривенного введения препарата убихинола (10мг/кг) .....	59
2.4. Протокол изучения экскреции CoQ10 после однократного внутривенного введения препарата на основе убихинола в дозе 10мг/кг	60
2.5. Протокол фармакокинетического исследования препарата убихинола после трехкратного внутривенного введения в 2-х дозах (5мг/кг и 10мг/кг) .....	60
2.6. Протокол изучения кардиопротекторной эффективности препарата убихинола для внутривенного введения .....	61
<b>III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>62</b>
3.1. Физико-химические свойства убихинола.....	62
3.2. Валидационные характеристики биоаналитической методики ВЭЖХ-ЭХ анализа CoQH <sub>2</sub> .....	67
3.3. Фармакокинетика препарата убихинола при однократном внутривенном введении в 3-х различных дозах (5, 10 и 20 мг/кг) .....	75
3.4. Распределение CoQ10 по органам крысы после внутривенного введения препарата убихинола в дозе 10 мг/кг .....	88
3.5. Количественное определение убихинола в моче и фекалиях после однократного внутривенного введения препарата на основе убихинола в дозе 10мг/кг.....	98

3.6. Фармакокинетика препарата убихинола при трехкратном внутривенном введении в 2-х дозах (5мг/кг и 10мг/кг).....	100
3.7. Кардиопротекторная эффективность препарата убихинола в инновационной лекарственной форме для внутривенного введения.....	106
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>112</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>117</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

С внедрением федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» важнейшей задачей фармацевтической науки становятся разработка и внедрение новых, и прежде всего инновационных отечественных препаратов на фармацевтический рынок.

Инфаркт миокарда (ИМ) по данным Всемирной организации здравоохранения занимает первое место в структуре причин смертности, опережая онкологические и инфекционные болезни. Многочисленные исследования демонстрируют перспективность использования антиоксидантов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, включая ИМ [3], в том числе препаратов на основе коэнзима  $Q_{10}$  [71, 72]. Его исследования ведутся уже более 60 лет. Он играет важную роль в обеспечении клеток необходимой энергией, так как является кофактором в дыхательной цепи переноса электронов (ДЦПЭ) [30]. В живых системах коэнзим  $Q_{10}$  содержится в окисленной ( $CoQ_{10}$ ) и восстановленной ( $CoQ_{10}H_2$ ) формах [106] и функционирует как окислительно-восстановительный агент, перенося электроны и протоны в ДЦПЭ.

Препараты, содержащие коэнзим  $Q_{10}$ , представлены только пероральными лекарственными формами с крайне низкой биодоступностью [139], что связано с низкой растворимостью и большой молекулярной массой вещества. Данный способ введения не обеспечивает быстрого повышения уровней убихинола в плазме и органах, что возможно только при использовании парентеральных лекарственных форм. Внутривенное введение препарата  $CoQ_{10}$  уже через 15 минут повышает концентрацию  $CoQ_{10}$  в плазме и позволяет использовать парентеральную лекарственную форму  $CoQ_{10}$  в urgentных ситуациях [48–50].

Так как антиоксидантным эффектом обладает восстановленная форма коэнзима Q<sub>10</sub> (убихинол), в ЗАО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия была разработана инъекционная форма восстановленного коэнзима Q<sub>10</sub> (1% водный раствор убихинола) для внутривенного введения с целью использования его в терапии острых сердечно-сосудистых состояний.

Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения убихинола, изучение его фармакокинетики и эффективности использования препарата на его основе являются основными этапами в доклиническом изучении нового лекарственного препарата. Работа явилась составной частью доклинических исследований препарата (государственный контракт Минпромторга № 14411.2049999.19.068) при частичном финансировании гранта Российского научного фонда «Изучение потенциала и механизмов нейро- и кардиопротективного действия коэнзима Q<sub>10</sub> в острых ишемических состояниях» (проект № 14-15-00126).

#### **Степень разработанности темы**

К настоящему времени имеются экспериментальные данные, подтверждающие противоишемическую эффективность внутривенного введения 3% водного раствора солубилизованного коэнзима Q<sub>10</sub> в окисленной форме [48–50].

Разработанная инновационная лекарственная форма – 1 % водный раствор солубилизованной восстановленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> – убихинола нуждалась в разработке и валидации биоаналитической методики количественного определения в биологических жидкостях и тканях, детального фармакокинетического исследования, изучении механизмов экскреции и оценке эффективности препарата на модели острого инфаркта миокарда у крыс.

### **Цель работы:**

Разработка и валидация методики определения убихинола в растворе, препарате и биоматериале и доклиническое фармакокинетическое исследование инновационной лекарственной формы препарата на основе коэнзима Q<sub>10</sub> для внутривенного введения.

### **Задачи исследования:**

1. Рассчитать и сравнить физико-химические характеристики молекул окисленной и восстановленной форм коэнзима Q<sub>10</sub> *in silico*;
2. Разработать и валидировать методику количественного определения убихинола в плазме крови крысы с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием;
3. Изучить фармакокинетику препарата убихинола в плазме при однократном и многократном внутривенном введении в диапазоне доз 5-20 мг/кг;
4. Изучить распределение препарата убихинола после однократного внутривенного введения по органам крысы в дозе 10мг/кг;
5. На основе результатов количественного анализа коэнзима Q<sub>10</sub> в образцах мочи и кала после однократного внутривенного введения препарата убихинола в дозе 10 мг/кг выявить основные пути его экскреции;
6. Оценить кардиопротекторную эффективность препарата убихинола на 21 сутки после однократного внутривенного введения в дозе 10 мг/кг в первые минуты после начала ишемии миокарда у крыс.

### **Научная новизна**

С помощью программных интернет-ресурсов Millisian 2.1, ALOGPS 2.1 и PubChem Search рассчитаны основные физико-химические характеристики молекулы убихинола. Разработана и валидирована биоаналитическая методика определения убихинола в плазме крови и тканях. Впервые изучена фармакокинетика препарата убихинола в инновационной лекарственной форме для внутривенного введения. Произведена оценка фармакокинетических параметров, выявлены основные пути экскреции препарата, проверена гипотеза линейности в изучаемом диапазоне доз 5-20

мг/кг. Прослежена динамика редокс-статуса коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме крови крыс после внутривенного введения препарата убихинола.

Показана способность препарата убихинола, введенного однократно внутривенно после начала ишемии, ограничивать размер зоны повреждения, повышать выживаемость животных и ограничивать размер постинфарктной гипертрофии миокарда.

### **Научно-практическое значение и внедрение результатов исследования**

Разработаны внутрилабораторные методики экспресс-анализа для контроля качества внутривенной лекарственной формы препарата убихинола.

Валидирована методика количественного определения коэнзима Q<sub>10</sub> в восстановленной форме (убихинола) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием в плазме крови крысы.

Результаты изучения фармакокинетики являются составной частью отчета по государственному контракту от 20 августа 2014 года № 14411.2049999. 19.068 с Минпромторгом России в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме: «Доклинические исследования кардиопротекторного лекарственного средства на основе коэнзима Q<sub>10</sub> для внутривенного введения с целью коррекции острых ишемических состояний миокарда», Шифр «2.1 Острая ишемия 2014».

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела и кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова.

### **Степень достоверности результатов исследования**

Первичные результаты в ходе данного исследования получены с помощью современных методов анализа и валидированных методик, которые

являются точными и достоверными. Оборудование, использованное в эксперименте, имело действующие свидетельства о поверке и зарегистрировано в реестре средств измерений, что обеспечило правильность результатов. Все выводы основаны на результатах статистической обработки первичных данных с использованием различных статистических критериев, соответствующих характеру данных. Высокая степень достоверности результатов подтверждается достаточным объемом проведенных исследований в рамках данного проекта; полученные данные согласуются с опубликованными ранее.

### **Методология исследования**

План проведения доклинического исследования фармакокинетики соответствует рекомендациям Руководства по проведению доклинических испытаний лекарственных средств [6]. Основным аналитическим методом послужила высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимическим детектированием – наиболее селективный и чувствительный метод для определения коэнзима Q<sub>10</sub> в биоматериале. Дизайн исследования согласуется с принципами проведения валидации биоаналитической методики, а также с принципами проведения экспериментов на лабораторных животных. Теоретические заключения и выводы сделаны на основе анализа имеющихся данных литературы и собственных исследований.

### **Апробация работы**

Апробация диссертационной 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 представлены на XXIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016» МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 11-15 апреля 2016; IX Научно-практической конференции «Современные технологии и методы

лабораторного анализа в доклинических и клинических исследованиях эффективности и безопасности лекарственных средств и медицинских изделий», Москва, Россия, 12 мая 2016; на 4th World Congress on Acute Heart Failure «Heart Failure 2017» Paris, Франция, 29 апреля - 2 мая 2017; на 5th World Congress on Acute Heart Failure «Heart Failure 2018», г. Вена, Австрия, 26-29 мая 2018.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит ведущая роль в анализе данных литературы по теме диссертационной работы, проведении экспериментальных фармакокинетических исследований и оценке кардиопротективной эффективности, анализе, обработке и обобщении полученных результатов. Автором лично проведены валидация методики количественного определения убихинола в плазме крови крысы методом ВЭЖХ-ЭХ, изучение фармакокинетики и оценка кардиопротективной эффективности изучаемого препарата. В экспериментальных исследованиях, выполненных коллективным трудом, автором проведена пробоподготовка биологического материала и произведена оценка количественного содержания убихинола и общего содержания коэнзима Q<sub>10</sub>. Вклад автора является определяющим на всех этапах доклинического исследования: от экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях конференциях.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанная методика количественного определения убихинола и общего пула коэнзима Q<sub>10</sub> в образцах плазмы крови и биоматериале соответствует требованиям FDA и EMA по валидационным характеристикам

селективности, линейности, правильности, прецизионности и пределу количественного определения.

2. Фармакокинетика препарата убихинола в плазме при внутривенном введении в диапазоне доз 5-20 мг/кг описывается двухчастевой моделью распределения, нелинейна, общий клиренс снижается в диапазоне доз. Однократное внутривенное введение препарата убихинола в дозе 10 мг/кг через 15 минут повышает тканевые уровни коэнзима Q<sub>10</sub> в миокарде, головном мозге, печени, почках и селезенке, которые остаются повышенными как минимум на протяжении 32 часов. Экскреция препарата в неизмененном виде осуществляется печенью.
3. Препарат убихинола в дозе 10 мг/кг оказывает кардиопротекторное действие при внутривенном введении в первые минуты ишемии миокарда крысы на 21 сутки, уменьшая длину аневризмы левого желудочка и предотвращая развитие гипертрофии межжелудочковой перегородки миокарда, улучшая показатели насосной функции сердца.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 131 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора имеющихся литературных данных, раздела с описанием используемых материалов и методов, включающего 6 протоколов исследований, раздела, посвященного результатам собственных исследований и их обсуждению, заключения, выводов и списка литературы, включающего 143 источника, из них 8 отечественных и 135 зарубежных публикаций. Диссертационная работа включает 36 рисунков и 34 таблицы.

# I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1. Коэнзим Q<sub>10</sub>

Коэнзим Q (CoQ) является липидорастворимым мощным антиоксидантом и кофактором в окислительном фосфорилировании [58, 59, 127]. Представители гомологичного ряда коэнзима Q различаются количеством изопренильных звеньев в боковой цепи. У человека и дрожжей вида *Schizosaccharomyces pombe* обнаружен коэнзим Q с 10 изопренильными фрагментами (CoQ<sub>10</sub>) (рис. 1), у крыс и мышей, а также растения вида *Arabidopsis thaliana* содержится 9 фрагментов (CoQ<sub>9</sub>), у бактерий вида *Escherichia coli* – 8 фрагментов (CoQ<sub>8</sub>), у дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* – 6 (CoQ<sub>6</sub>) [59].

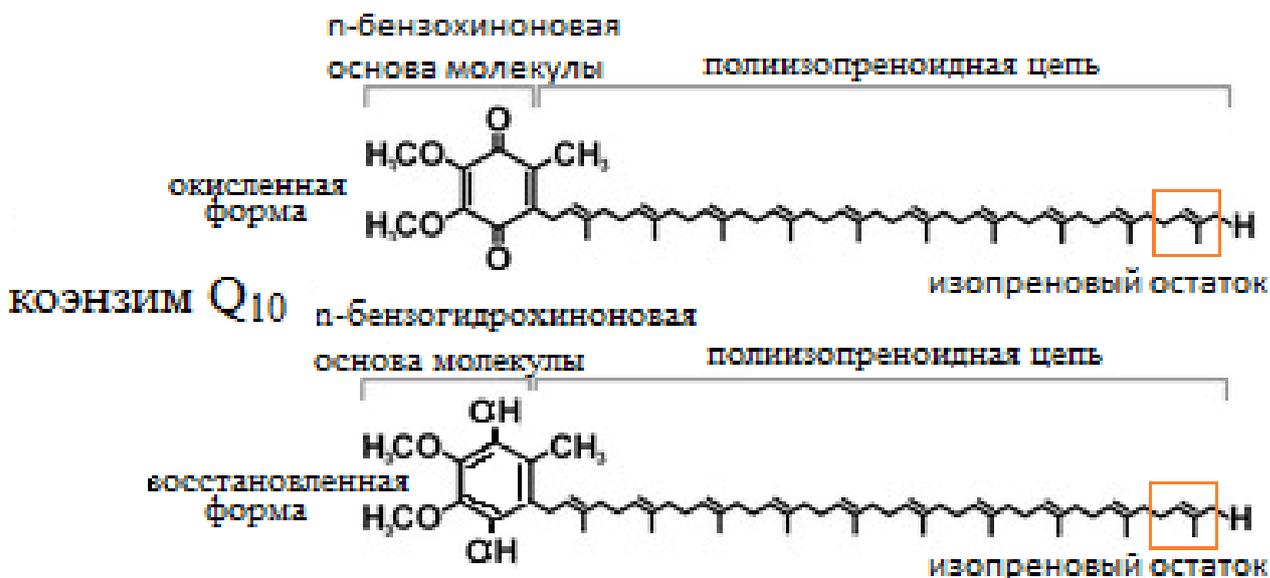


Рисунок 1. Химическая структура коэнзима Q<sub>10</sub>.

Изопреноидная боковая цепь молекулы отвечает за гидрофобные свойства и растворимость в липидах, хинон – гидрохиноновая структура обеспечивает перенос электронов. Способность связывать электроны и протоны обуславливает присутствие в организме как окисленной – убихинон (CoQ<sub>10</sub>), так и восстановленной – убихинол (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) формы коэнзима Q<sub>10</sub>, взаимопревращение которых обеспечивает его антиоксидантные свойства, препятствуя перекисному окислению липидов и липопротеинов [67, 69], окислению сульфидов, сдерживает проницаемость

митохондриальных пор, способствует переносу  $H^+$  и ионов  $Ca^{2+}$  через биологические мембраны [19, 64]. Наряду с другими антиоксидантами (витаминами С и Е) коэнзим  $Q_{10}$  борется со свободнорадикальными повреждениями митохондрий [39, 62], запускает механизм клеточной сигнализации и экспрессию генов.

Коэнзим  $Q_{10}$  имеет сходную химическую структуру с витамином К, но сам по себе не является витамином, потому что синтезируется в организме и локализуется в каждой мембране, начиная от митохондриальных мембран, в липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП) [17]. Учитывая физиологическое значение коэнзима  $Q_{10}$  его дефицит может привести к различным заболеваниям.

Основная биохимическая роль коэнзима  $Q_{10}$  – это участие в дыхательной цепи переноса электронов и продукции молекул АТФ. Являясь основным переносчиком электронов, он транспортирует их с комплекса I (НАДН дегидрогеназный комплекс) на комплекс III (цитохром- $bc_1$ -комплекс), с комплекса II (сукцинатдегидрогеназа) - на комплекс III (рис. 2). Комплекс III переносит электроны на IV комплекс (цитохром с-оксидаза). АТФ-синтетаза, или V комплекс, выкачивает протоны наружу и, используя энергию протонов, синтезирует молекулы АТФ [113].

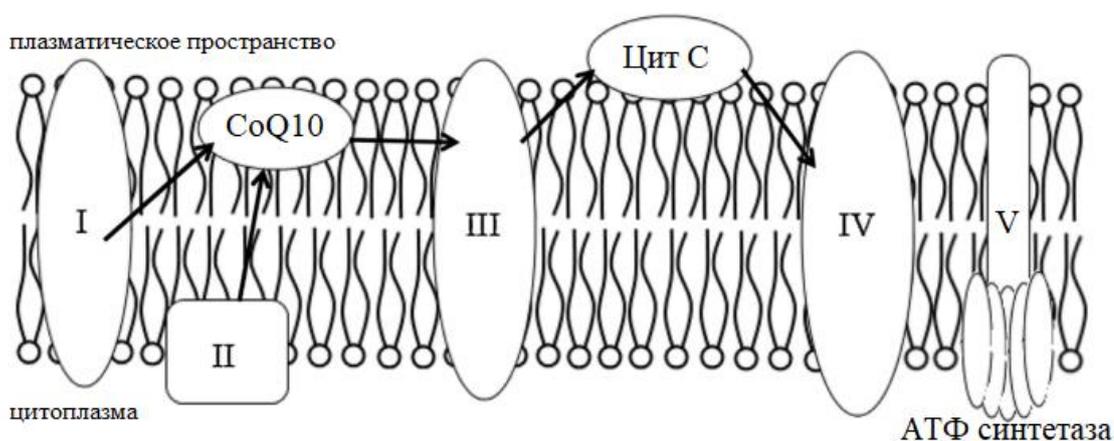


Рисунок 2. Дыхательная цепь переноса электронов. I – НАДН дегидрогеназа, II – сукцинатдегидрогеназа, III - цитохром- $bc_1$ -комплекс, IV – цитохром с-оксидаза, V –  $H^+$ -транспортирующая АТФ-синтетаза. CoQ10 – коэнзим  $Q_{10}$ , Цит С – цитохром с.

## **История открытия коэнзима Q<sub>10</sub>**

Впервые коэнзим Q<sub>10</sub> был выделен из митохондрий бычьего сердца в 1957г. доктором Фредом Крейном и его коллегами в институте энзимологии Винсконзин-Мэдисон [26]. Уже в 1958 г. Карл Фолкерс с коллегами из компании Мерк установили химическую структуру коэнзима Q<sub>10</sub>. Данной группе первой удалось не только синтезировать его, но и выработать достаточное количество CoQ<sub>10</sub> за счет ферментации [99].

Работы японского профессора Ямамуры, проведенные в середины 1960-ых годов, впервые показали успешное применение коэнзима Q<sub>7</sub>, родственного соединения, при лечении застойной сердечной недостаточности. В 1966 г. Меллорс и Таппель доказали, что восстановленная форма CoQ<sub>6</sub> является эффективным антиоксидантом [75].

Карл Фолкерс и Литгарру Д.П. продемонстрировали, что недостаток коэнзима Q<sub>10</sub> является одной из причин сердечных заболеваний [99]. В этот период было затруднительно проводить обширные клинические испытания из-за слабо развитого промышленного производства этого препарата.

Начиная с этого момента, произошел значительный рост работ, нацеленных на применение коэнзима Q<sub>10</sub> в различных областях медицины.

На сегодняшний момент интерес к CoQ<sub>10</sub> не гаснет. Возможные области медицинского применения данного кофермента увеличиваются из года в год.

## **Биосинтез коэнзима Q<sub>10</sub>**

Этапы биосинтеза коэнзима Q<sub>10</sub> зависят от организма и включают две различные стадии синтеза: получение ароматической головки хинона и синтез изопренового хвоста, с последующими этапами синтеза для получения конечного продукта CoQ<sub>10</sub> [51, 59]. В эукариотических клетках биосинтез преимущественно проходит на внутренней мембране митохондрий [131], а также в аппарате Гольджи [92].

Нативные субстраты для синтеза молекулы являются видоспецифичными. В прокариотической клетке хиноновая головка

образуется из предшественника хоризмата (5-карбоксивинил-шикимат-3-фосфат) в шикиматном пути, в эукариотической клетке из тирозина (рис.3). Некоторые дрожжи могут использовать *p*-аминобензойную кислоту или *p*-гидроксибензоат в качестве предшественника хинона, в отличие от млекопитающих, у которых предшественником является *p*-гидроксибензоат [81, 105]. Синтез полиизопрной цепи в эукариотических клетках происходит по мевалоновому (MEV) пути, исходным субстратом является ацетил-СоА, в прокариотических клетках и пластидах растительных клеток синтез идет по немевалонатному пути (MEP, 2-С-метил-d-эритритол-4-фосфата), с использованием глицеральдегида-3-фосфата и пирувата [23, 58].

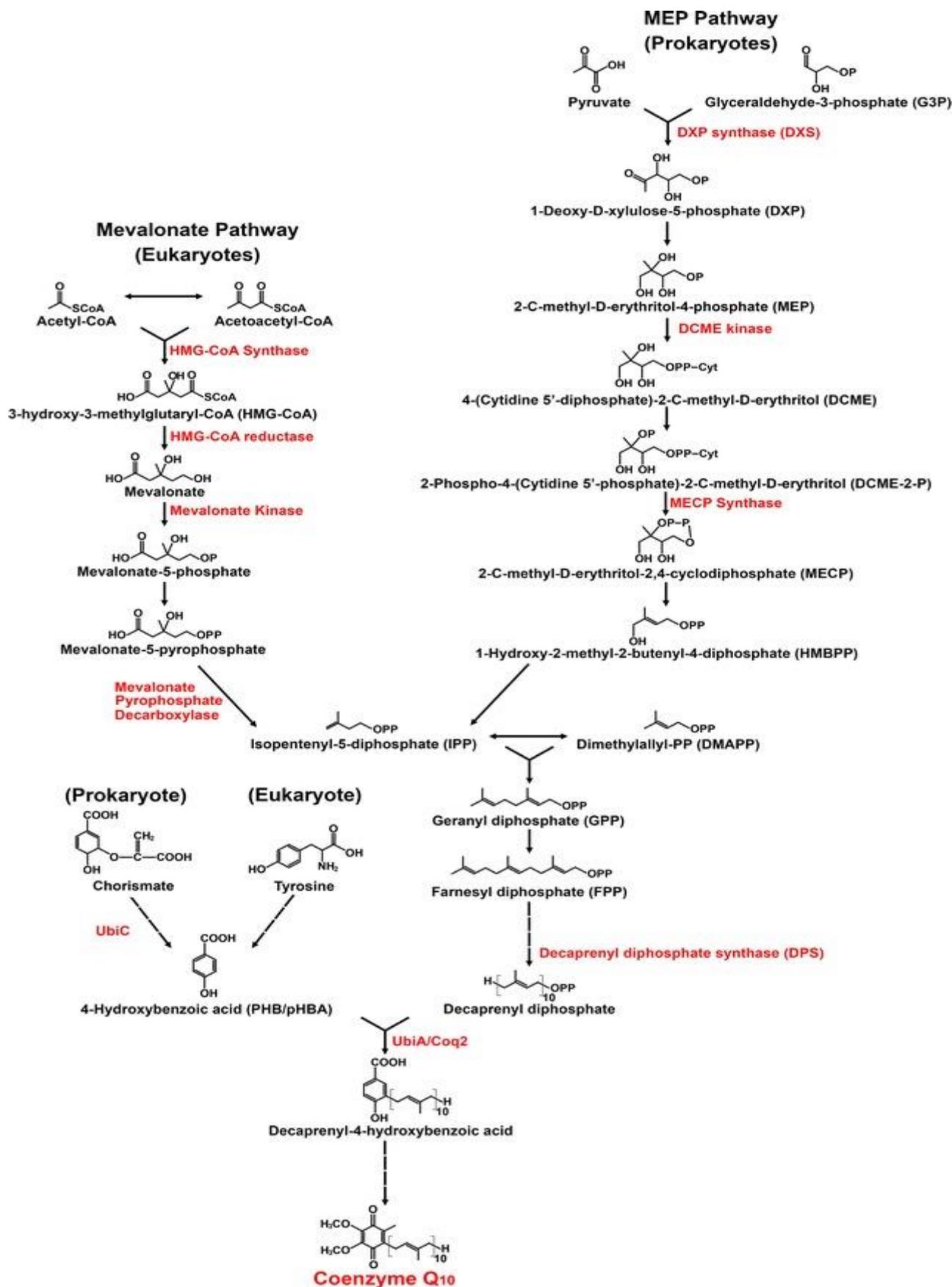


Рисунок 3. Схема этапов биосинтеза CoQ<sub>10</sub> в клетках [70].

## **Промышленное производство коэнзима Q<sub>10</sub>**

Промышленное производство коэнзима Q<sub>10</sub> связано с выделением его из животных тканей, полухимическим синтезом и ферментацией [28, 57].

На сегодняшний момент еще ведутся поиски наиболее оптимальных производителей коэнзима Q<sub>10</sub> и субстратов для его синтеза. Непосредственно CoQ<sub>10</sub> является эндогенной молекулой не для всех организмов [58, 131] и до сих пор остается не до конца ясным, могут ли вовлекаться в метаболические реакции человека молекулы, содержащие более короткие изопреновые хвосты [43, 98]. Организмы, производящие нативную молекулу CoQ<sub>10</sub>, имеют ряд преимуществ, включающих отсутствие гомологичных молекул CoQ (CoQ<sub>8</sub>-CoQ<sub>9</sub>), которые могут конкурировать за химический субстрат и снижать выход желаемого продукта [51]. Затраты, необходимые на очистку от побочных продуктов, смещают баланс в пользу использования организмов, производящих CoQ<sub>10</sub>: *Sporidiobolus johnsonii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Acrobacterium tumefaciens* [29, 78, 90, 137].

При химическом синтезе коэнзима Q<sub>10</sub> используют солансол (нонаизопренол, C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>O) в качестве субстрата для получения изопреноидного хвоста, который присоединяют к хиноновой головке [91]. Однако в качестве субстратов используют дорогостоящие реактивы, а образование большого числа побочных продуктов и отходов [94, 107, 114], получение оптических изомеров затрудняет процесс химического синтеза [123].

## **Общий пул коэнзима Q<sub>10</sub>**

Коэнзим Q<sub>10</sub> в организме присутствует в двух формах: окисленной – убихинон (CoQ<sub>10</sub>) и восстановленной – убихинол (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) [38]. Восстановление молекулы хинона до молекулы хинола происходит в два последовательных этапа присоединения электрона, при которых возможно образование короткоживущего свободного радикала коэнзима Q<sub>10</sub> – семихинона (SQ). Однако в организме имеются ферменты, например НАДН,

которые восстанавливают  $\text{CoQ}_{10}$  до  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в один двухэлектронный шаг (рис. 4) [44].

Радикал семихинон является каталитическим промежуточным продуктом в комплексе I дыхательной цепи переноса электронов [109]. При изучении замороженных клеток *E. Coli* (с добавлением ингибиторов процесса восстановления и без него, при обнаружении как  $\text{CoQ}_{10}$ , так и  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ) не выявили наличие радикала семихинона [130].

Общий пул коэнзима  $\text{Q}_{10}$  в организме состоит из суммы убихинона и убихинола. Именно восстановленная форма –  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  защищает ДНК, липиды и белки от повреждения [14, 76].

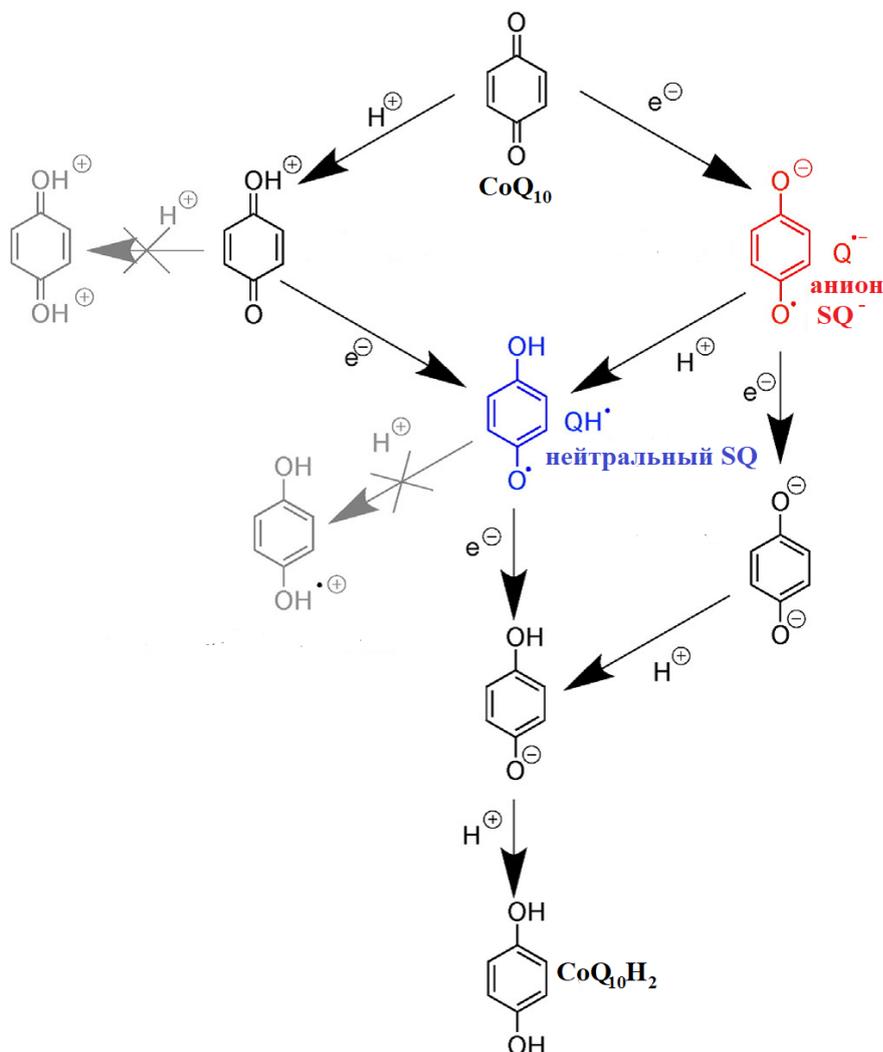


Рисунок 4. Схема возможных путей восстановления убихинона ( $\text{CoQ}_{10}$ ) до убихинола ( $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ ) [44].

Повышение доли окисленной формы является маркером окислительного стресса в организме [84, 134, 143]. Окислительный стресс – нарушение прооксидантного и антиоксидантного баланса в пользу повышения уровня прооксидантов [115]. Восстановленная форма коэнзима Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) реагирует со свободными радикалами и превращается в окисленную форму – убихинон (CoQ<sub>10</sub>). Эксперименты с добавлением чистой меди (5мкМ) к плазме человека и ее инкубацией при 37°С в аэробных условиях сопровождались сначала резким снижением уровня витамина С (аскорбиновой кислоты) [133], а затем быстрым снижением CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> и эквивалентным повышением уровня CoQ<sub>10</sub>. Стоит отметить, что уровень витамина Е (VitE) оставался неизменным на протяжении всего эксперимента [20] (рис. 5).

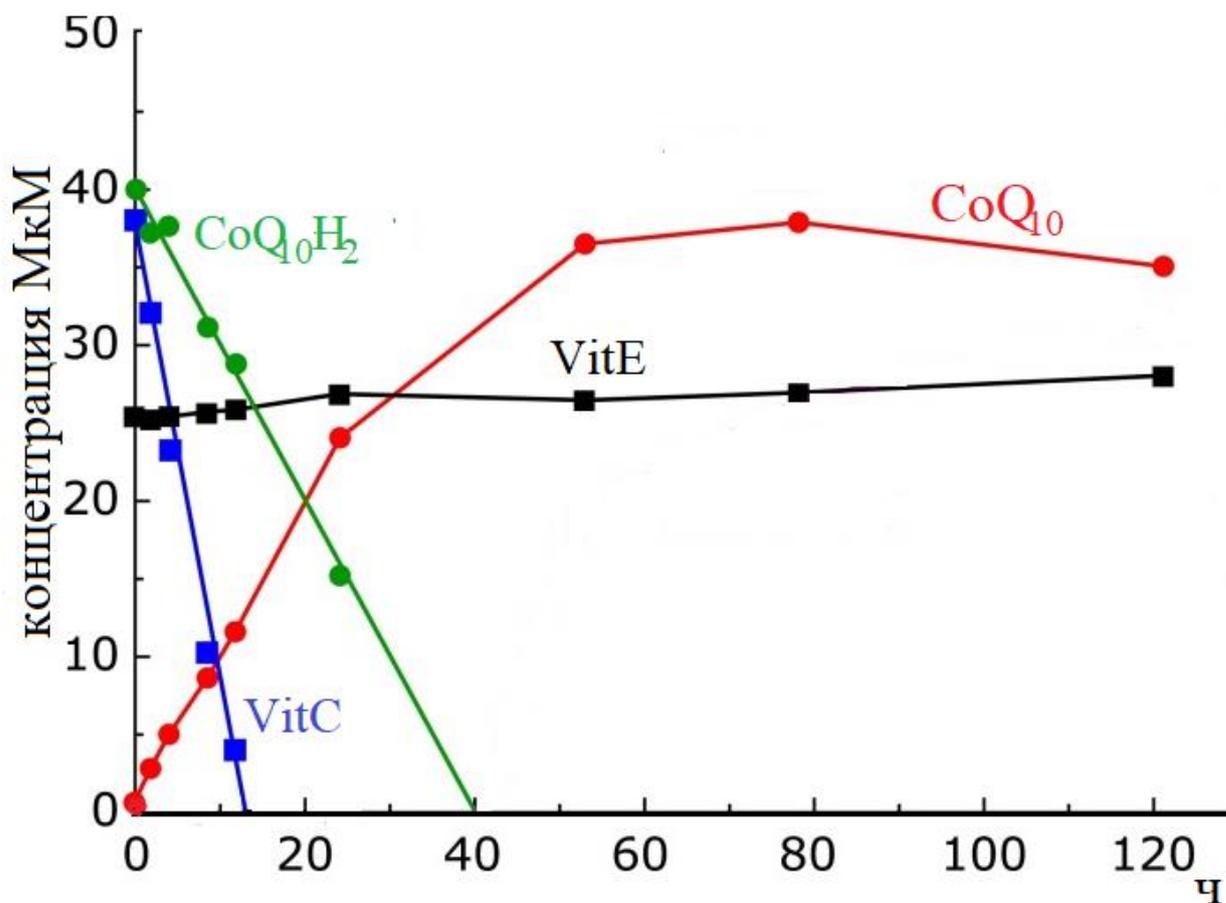


Рисунок 5. Изменение концентрации витамина Е (VitE), витамина С (VitC), убихинона (CoQ<sub>10</sub>) и убихинола (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) в плазме крови человека, инкубированной при 37°С с добавлением 5мкМ чистой меди (Cu) [134].

Данные демонстрируют возможность использования редокс–статуса коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме как маркера окислительного стресса на ранних стадиях [118]. Снижение уровня CoQ<sub>10</sub> наблюдается у пациентов с гепатитом и циррозом печени [119, 132], фибромиалгией [89], инфарктом миокарда [50] и другими заболеваниями.

### **Функции коэнзима Q<sub>10</sub>**

#### ***Энергетический обмен***

CoQ<sub>10</sub> содержится во всех клетках организма и принимает участие в энергетическом обмене. Он расположен во внутренней мембране митохондрий, где происходит основной синтез молекул АТФ, необходимых клеткам. CoQ<sub>10</sub> транспортирует электроны от комплекса I к комплексу III, совершая при этом циклические превращения, называемые Q-циклом. Таким образом НАДН (комплекс I) восстанавливает CoQ (убихинон) до CoQH<sub>2</sub> (убихинол), а на комплексе III происходит его обратное окисление. Цитохром C, находящийся в комплексе III, выступает акцептором электронов, а убихинон – донором (CoQH<sub>2</sub>). Каждая молекула CoQH<sub>2</sub> за один Q-цикл переносит протоны из матрикса в межмембранное пространство, создавая тем самым электронный потенциал, используемый для синтеза АТФ [113].

#### ***Антиоксидантное действие***

В большинстве мембран клеток животных организмов найдены ферменты, окисляющие убихинол и восстанавливающие убихинон. Концентрация CoQ<sub>10</sub> меньше, чем концентрация CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>. Убихинол имеет свободные электроны и легко отдает их для нейтрализации свободных радикалов.

Восстановленная форма CoQ<sub>10</sub> обладает сильнейшим антиоксидантным действием. Антиоксидантное свойство CoQ<sub>10</sub> способствует сдерживанию перекисного окисления липидов [80, 116].

#### ***Антиатерогенное действие***

CoQ<sub>10</sub> имеет прямое антиатерогенное действие, продемонстрированное на аполипопротеин E-дефицитных мышцах, получавших корм с повышенным

содержанием жиров. В данной модели добавки CoQ<sub>10</sub> способствовали уменьшению абсолютных концентраций окисленных липидов в атеросклеротических поражениях, с уменьшением атеросклеротических поражений во всей аорте [76].

### ***Влияние на экспрессию генов***

Окисление убихинола в плазматической мембране может привести к выработке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, инициирующего производство тирозин-киназы и раннюю экспрессию генов.

Результаты, полученные Linnane в 2002 году [74], показали, что прием CoQ<sub>10</sub> в дозе 300 мг в день на протяжении 4-х недель оказывает влияние на экспрессию 115 генов у 6 различных объектов исследования. Для 47 генов наблюдалось увеличение экспрессии, для 68 - подавление в сравнении с контрольной группой, получавшей плацебо. Результаты продемонстрировали, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, появляющийся в результате деятельности CoQ<sub>10</sub>, действует в качестве посредника для регуляции экспрессии генов и клеточного метаболизма.

### ***Ингибитор временных митохондриальных пор (mPTP)***

В митохондриях при повышенном содержании ионов Ca<sup>2+</sup> может увеличиться проницаемость мембраны, приводящая к гибели клетки.

CoQ<sub>10</sub> оказывает влияние на mPTP. Взаимодействуя через сайт связывания на внутренней мембране митохондрий, он ингибирует открытие временных митохондриальных пор, приводящее к уменьшению мембранного потенциала и переходу митохондрии в состояние высокой проницаемости, что вызывает гибель всей клетки [102].

### ***Антиаритмическое действие***

Антиаритмическое действие CoQ<sub>10</sub> основано на восстановлении гомеостаза клетки, продукции молекул АТФ. Во время ишемии происходит Ca<sup>2+</sup> и Na<sup>+</sup> перегрузка; восстановление необходимого уровня АТФ возобновляет активность АТФаз, необходимых для выведения Ca<sup>2+</sup> и Na<sup>+</sup> из клетки, и вызывает уменьшение частоты возникновения аритмий [9].

## Лекарственные средства, содержащие CoQ<sub>10</sub>, представленные на Российском фармацевтическом рынке

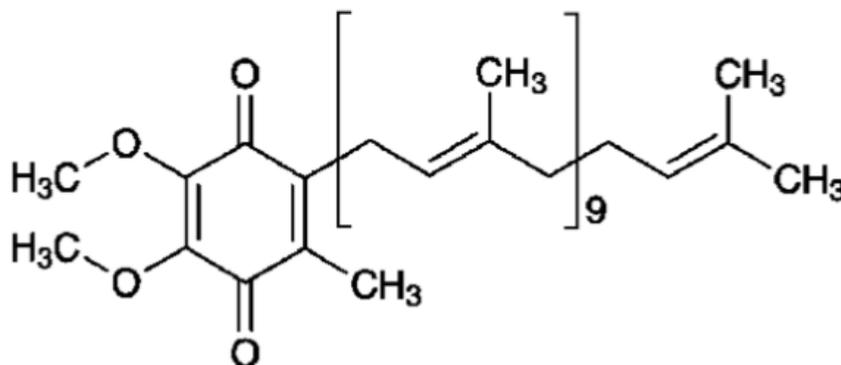
На сегодняшний момент в Российской Федерации зарегистрированы 3 лекарственных препарата, содержащих субстанцию коэнзима Q<sub>10</sub> – убидекаренон (МНН коэнзима Q<sub>10</sub>). Все препараты содержат CoQ<sub>10</sub> в виде окисленного коэнзима Q<sub>10</sub> и являются пероральными лекарственными формами (табл. 1, данные из Государственного реестра ЛС).

Таблица 1. Препараты убидекаренона, зарегистрированные в РФ

<b>Торговое наименование</b>	<b>Форма выпуска</b>	<b>Производитель</b>	<b>Регистрационный номер</b>	<b>Дата государственной регистрации</b>
Кудевита®	Капсулы	ООО «ПИК-ФАРМА»	ЛП-000019	28.10.2010 Переоформлено 23.11.2015
Кудесан®	Капли для приема внутрь 3%	ООО «Русфик»	ЛСР-003092/10	12.04.2010 Переоформлено 26.09.2013
Кудесан® для детей	Таблетки жевательные	ООО «Русфик»	ЛП-001101	03.11.2011 Переоформлено 30.07.2015

## 2. Убихинон

По химической номенклатуре CoQ<sub>10</sub> – 2,3-диметокси-5-метил-6-декапренил-1,4-бензохинон (рис. 6), МНН субстанции – убидекаренон.



C<sub>59</sub>H<sub>90</sub>O<sub>4</sub> (Mr 863,34)

(2*E*,6*E*,10*E*,14*E*,18*E*,22*E*,26*E*,30*E*,34*E*,38*E*)-2-(3,7,11,15,19,23,27,31,35,39-Decamethyltetraconta-2,6,10,14,18,22,26,30,34,38-decaen-1-yl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-1,4-benzoquinone

CAS-303-98-0

Рисунок 6. Химическая структура CoQ<sub>10</sub> в соответствии с JP XVI.

Фармакопейные статьи на субстанцию убидекаренона представлены в ведущих фармакопеех мира: Японской (JP XVI), Британской (BP 2009), Европейской (EP 7.0), Американской (USP 32-NF27). В фармакопейной статье JP приведены требования к чистоте субстанции (не менее 98%), в то время как в EP, BP и USP эти требования иные – 97,0-103,0%. Описание внешнего вида субстанции убидекаренона – желто-оранжевый кристаллический порошок – имеет одинаковую характеристику во всех 4 фармакопеех. Различия имеются в пункте растворимости субстанции. Так, растворимость в диэтиловом эфире, 99,5% этаноле и воде представлена в JP, а растворимость в воде, ацетоне и этаноле в BP, EP, USP. Указание на разложение под действием света и температура плавления (48°C) приведены во всех рассматриваемых фармакопеех. Два способа идентификации субстанции убихинола представлены в JP: 1. реакция идентификации с

использованием диметилмалоната и калия гидроксида; 2. сравнение ИК спектра, полученного по стандартной методике дисков KBr, с эталонным спектром или спектром стандартного образца субстанции убидекаренона. В оставшихся фармакопеях так же представлено по два способа идентификации: 1. ИК спектрофотометрия; 2. сравнение времени удерживания основного пика убидекаренона на полученной ВЭЖХ хроматограмме (по методике, представленной для оценки посторонних примесей) и хроматограмме стандартного образца. Хроматографический анализ субстанции убидекаренона проводят методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детекцией при 275 нм.

Анализируя требования, предъявляемые к субстанции в EP, USP, BP, JP фармакопеях, можно сделать вывод об их полной гармонизации в EP, USP, BP фармакопеях и небольшом отличии в предъявляемых требованиях к субстанции в JP.

#### **Механизмы всасывания**

CoQ<sub>10</sub> является липофильной молекулой, его механизм всасывания из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) аналогичен витамину E и усиливается в присутствии липидов. В тонком кишечнике происходит эмульгирование жиров желчью с образованием мицелл. CoQ<sub>10</sub>, подобно другим липофильным веществам, включается в хиломикроны [56]. Убихинон восстанавливается до убихинола во время или после абсорбции в кишечнике. Это подтверждает исследование на культуре человеческих клеток Caco-2 [55]. После расщепления хиломикронов липопротеинлипазой остатки хиломикрона поглощаются печенью, где CoQ<sub>10</sub> упаковывается в липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеины низкой плотности (ЛПНП). Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) также могут содержать небольшое количество CoQ<sub>10</sub> [110, 126]. Общая концентрация CoQ<sub>10</sub> в плазме зависит от количества липопротеинов в ней [63], при этом около 95% CoQ<sub>10</sub> находится в восстановленной форме [10, 85]. Абсорбция при пероральном

введении убихинона низкая, лишь 2 – 3% [139], солюбилизированные формы CoQ<sub>10</sub> обладают более высокой биодоступностью [24, 88, 138].

### Содержание в тканях

В организме человека и животных CoQ присутствует во всех тканях в различных количествах, с преобладанием той или иной формы (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, CoQ<sub>10</sub>). Распределение и процентное содержание восстановленной формы CoQ<sub>10</sub> в тканях человека представлено в таблице 2 [10, 86].

Таблица 2. Тканевое распределение и процентное содержание восстановленной формы CoQ<sub>10</sub> у человека [10, 86]

Ткань/органы	Общий пул CoQ <sub>10</sub> (нмоль/г)	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> , (%)
Сердце	132,0	61
Почки	77,0	75
Печень	63,6	95
Мышцы	46,0	65
Мозг	15,5	23
Кишечник	13,3	95
Легкие	9,2	25
Плазма	1,1	96

Большая часть коэнзима Q<sub>10</sub> в тканях находится в восстановленной форме в виде убихинола, за исключением мозга и легких, где доля восстановленной формы 25% и менее. Предположительно это связано с физиологически повышенным окислительным стрессом, происходящим в этих двух тканях. CoQ<sub>10</sub> также присутствует в цереброспинальной жидкости в виде восстановленной формы, но с очень низкой концентрацией (около 9 пмоль/л) по сравнению с плазмой крови [77]. Клетки крови, такие как лимфоциты и тромбоциты, содержат высокие концентрации CoQ<sub>10</sub>, в то

время как эритроциты содержат его в небольшом количестве, что связано с меньшим содержанием митохондрий в них [124].

Общее содержание  $\text{CoQ}_{10}$  в теле взрослого человека составляет 0,5-1,5г [37]. В организме некоторых животных, например у крыс и мышей, преимущественно присутствует  $\text{CoQ}_9$ , а также  $\text{CoQ}_{10}$ , их содержание в тканях представлено в таблице 3(а,б) [45, 140].

Таблица 3. Тканевое содержание  $\text{CoQ}_9$  и  $\text{CoQ}_{10}$ , а также процентное содержание их восстановленных форм у крыс (а) [140] и мышей (б) [84]

<b>а)</b> <b>Орган/ткань</b>	<b><math>\text{CoQ}_9</math></b> <b>(пмоль/мг белка)</b>	<b><math>\text{CoQ}_{10}</math></b> <b>(пмоль/мг белка)</b>	<b><math>\text{CoQ}_9 + \text{CoQ}_{10}</math></b> <b>(% содержание)</b>
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 (нмоль/л)	1030	72	54,0

<b>б)</b> <b>Орган/ Ткань</b>	<b><math>\text{CoQ}_9</math></b> <b>(нмоль/г белка)</b>	<b><math>\text{CoQ}_9\text{H}_2</math></b> <b>(нмоль/г белка)</b>	<b><math>\text{TCoQ}_9</math></b> <b>(нмоль/г белка)</b>	<b><math>\text{CoQ}_{10}</math></b> <b>(нмоль/ г белка)</b>	<b><math>\text{CoQ}_{10}\text{H}_2</math></b> <b>(нмоль/г белка)</b>	<b><math>\text{TCoQ}_{10}</math></b> <b>(нмоль/г белка)</b>
Мышца	153,9±10,7	106,5±3,3	260,4±12,0	6,5±0,5	4,6±0,2	11,1±0,7
Сердце	896,6±53,3	598,7±34,5	1495,3±85,4	83,7±5,4	53,9±3,4	137,6±8,6
Печень	281,1±21,3	46,7±3,9	327,7±22,3	4,6±0,4	0,6±0,06	5,2±0,4
Мозг	92,1±41	203,3±5,1	295,4±6,9	26,7±1,0	49,0±1,4	75,7±1,8

В тканях с высокой метаболической активностью (сердце, печень, почки и мышцы) наблюдается наибольшее содержание  $\text{CoQ}_{10}$  [30]. Данные о внутриклеточном распределении  $\text{CoQ}_{10}$  показывают, что основная часть  $\text{CoQ}_{10}$  (40-50%) локализована на внутренней мембране митохондрий (что

связано с его основной функцией). Внутриклеточное распределение CoQ<sub>9</sub> и CoQ<sub>10</sub> в печени крысы представлено в таблице 4[140].

Таблица 4. Внутриклеточное распределение CoQ<sub>9</sub> и CoQ<sub>10</sub> в ткани печени крысы [140]

<b>Фракция</b>	<b>CoQ<sub>9</sub> (пмоль/мг белка)</b>	<b>CoQ<sub>10</sub> (пмоль/мг белка)</b>
Гомогенат	1040	99
Митохондрия	5919	535
Микросома	249	57
Аппарат Гольджи	805	92
Лизосома	1126	120
Плазматические мембраны	353	37
Ядра	188	27
Пероксисома	121	13
Цитозоль	106	11

### **Метаболизм**

На сегодняшний момент нет полных данных о метаболизме CoQ<sub>10</sub> в организме человека и животных. Исследования Nakamura Т. [96], проведенные на морских свинках при помощи меченого <sup>14</sup>C-CoQ<sub>10</sub>, показали, что в/в введение <sup>14</sup>C-CoQ<sub>10</sub> приводит к увеличению его содержания в желчи на 4,8%. Основным метаболитом является глюкуронид-Q кислота (GQA) I – 2,3диметокси-5-метил-6-(3'-метил-5'-карбокси-2-пентил)-1,4-бензогидрохинон, образованная в печени. В моче за 48 часов содержание метаболитов <sup>14</sup>C-CoQ<sub>10</sub> возросло на 8,3% и состояло из смеси GQA I и GQA II (2,3диметокси-5-метил-6-(3'-карбоксипропил)-1,4-бензохинон) в свободном, а также сопряженных с гидрохиноном формах.

Bentinger M. [16] сделал интересное наблюдение в идентификации фосфорилированных метаболитов CoQ<sub>10</sub>. Использовался меченный <sup>3</sup>H-CoQ<sub>10</sub> в первой метиленовой группировке для количественной идентификации метаболитов с коротким остатком боковой цепи. Меченный CoQ<sub>10</sub> вводили крысам внутрибрюшинно, его высокие концентрации были обнаружены в селезенке, печени, белых клетках крови, более низкие концентрации были также обнаружены в надпочечниках, яичниках, тимусе и сердце. Большая часть метаболитов выводилась через почки. Фекальные выделения содержали небольшую часть метаболитов и неизмененный меченный CoQ<sub>10</sub>.

### Фармакокинетика

Есть только несколько исследований по фармакокинетике CoQ<sub>10</sub> в живом организме. В исследовании, проведенном Fujita T. [34], пероральное введение меченного <sup>14</sup>C-CoQ<sub>7</sub> крысам приводило к максимальной концентрации CoQ<sub>7</sub> в крови через 6 часов после введения. В исследовании Kishi и др. [61] крысам перорально вводили меченный <sup>14</sup>C-CoQ<sub>10</sub>, пик концентрации наблюдался через 2 часа после введения. Причины расхождения в полученных данных неизвестны, можно предположить, что это связано с использованием разных гомологов (<sup>14</sup>C-CoQ<sub>7</sub> и <sup>14</sup>C-CoQ<sub>10</sub>).

Приводятся данные о времени полуэлиминации (t<sub>1/2</sub>) CoQ<sub>9</sub> в различных тканях. В исследовании, проведенном Thelin [122], крысам внутрибрюшинно вводили меченый мевалонат (предшественник CoQ), после чего наблюдали за выведением радиоактивного CoQ<sub>9</sub> из ткани (табл. 5).

Таблица 5. Время полувыведения (t<sub>1/2</sub>) радиоактивного CoQ<sub>9</sub> из тканей крысы [122]

Ткань (орган)	t <sub>1/2</sub> (ч)	Ткань (орган)	t <sub>1/2</sub> (ч)
Сердце	59	Мозг	90
Почки	125	Кишечник	54
Печень	79	Поджелудочная железа	94
Мышцы	50	Щитовидная железа	49

Результаты исследования представленные в таблице демонстрируют, что наименьшим временем полувыведения обладает щитовидная железа (49 часов), а самым длительным (125 часов) почки. Это показывает, что CoQ<sub>9</sub> подвергается быстрому катаболизму во всех тканях.

Пероральная добавка кристаллической формы CoQ<sub>10</sub> крысам привела к повышению плазменного уровня коэнзима Q<sub>10</sub> до 0,22±0,042 мкг/мл с биодоступностью 0,44%. В то же время, самоэмульгированная форма CoQ<sub>10</sub> (CoQ<sub>10/s</sub>-SEDDS) продемонстрировала лучшие результаты: плазменный уровень у крыс повысился до 1,1±0,25 мкг/мл с биодоступностью 2,2% (табл.6) [100].

Таблица 6. Фармакокинетические параметры перорального и парентерального введения CoQ<sub>10</sub> [100]

Препарат	C <sub>max</sub> (мкг/мл)	T <sub>max</sub> (ч)	AUC <sub>0-∞</sub> (мкг*ч/мл)	F (%)
Кристаллический CoQ <sub>10</sub> (100мг/кг, per os)	0,22±0,042	8,3±1,7	3,2±0,54	0,44
CoQ <sub>10/s</sub> -SEDDS (100мг/кг, per os)	1,1±0,25*	7±1*	16±3,04*	2,2*
Раствор CoQ <sub>10</sub> (100мг/кг, в/в)	-	-	2,6±0,28	100

\*-достоверность различий между фармакокинетическими показателями CoQ<sub>10/s</sub>-SEDDS и кристаллической формы препарата (p<0,01).

В работах Калениковой Е.И. и соавт. изучали фармакокинетические характеристики однократного перорального введения порошка и солюбилизированной формы CoQ<sub>10</sub> крысам [54] (табл. 7).

Таблица 7. Фармакокинетические параметры солюбилизированной формы и порошка СоQ<sub>10</sub>, введенного перорально крысе [54]

Препарат	C <sub>max</sub> (нГ/мл)	T <sub>max</sub> (ч)	AUC <sub>0-∞</sub> (мкг*ч/мл)	F (%)
Раствор солюбилизированной формы СоQ <sub>10</sub> , 10мг/кг	654±52	3,3±0,3	6922±887	329
Взвесь порошка СоQ <sub>10</sub> в 0,2% растворе метилцеллюлозы, 10мг/кг	199±29	4,3±0,5	2627±350	-
Достоверность различий, P	<0,00001	-	<0,001	

Данные по фармакокинетике СоQ<sub>10</sub>, полученные Харитоновой Е.В. с соавт. [7], показывают, что в/м и в/в введение солюбилизированного СоQ<sub>10</sub> в дозе 10 мг/кг обеспечивает биодоступность в плазме крови крыс на 2-3 порядка выше, чем при введении того же препарата внутрь (табл. 8).

Таблица 8. Фармакокинетические показатели солюбилизированного СоQ<sub>10</sub> при различных способах введения [7]

Введение	AUC, %	C <sub>max</sub> <sup>*</sup> (ЛЖ), %	T <sub>max</sub> (ЛЖ), ч	t <sub>1/2</sub> , ч	C <sub>max</sub> <sup>*</sup> (печень), %	T <sub>max</sub> (печень), ч
Внутри	0,3	-	-	-	-	-
В/М	17	160	24	48	487	24
В/В	100	173	6	48	783	48

Исследование, проведенное нами ранее [4], продемонстрировало, что при однократном в/в введении крысам препарата Кудесан<sup>®</sup> максимальная концентрация СоQ<sub>10</sub> в плазме увеличилась в десять тысяч раз относительно фонового уровня. На протяжении 16-х суток эксперимента концентрация СоQ<sub>10</sub> в плазме была повышена и к концу все еще оставалась выше фоновой в 2 раза [4]. По полученным данным были рассчитаны кинетические параметры (табл. 9). Фармакокинетика СоQ<sub>10</sub> при в/в введении

соответствовала двухкамерной фармакокинетической модели. В табл. 8 представлены параметры распределения  $CoQ_{10}$  в тканях на протяжении 8 суток.

Таблица 9. Фармакокинетические показатели  $CoQ_{10}$  при однократном в/в введении крысе в составе препарата Кудесан<sup>®</sup> в дозе 30 мг/кг [4]

Параметр	Значение
Константа распределения $T_{1/2a}$ , ч <sup>-1</sup>	0,0486
Период полураспределения $T_{1/2a}$ , ч	14,14
Константа элиминации $K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	0,0059
Период полуэлиминации $T_{1/2el}$ , ч	117,5
Общий клиренс $Cl_t$ , мл*ч <sup>-1</sup> /кг	1,18
Объем распределения $V_d$ , л/кг	20,4

Фармакокинетические параметры распределения  $CoQ_{10}$  в левом желудочке, печени, головном мозге и почках представлены в табл. 10.

Таблица 10. Фармакокинетические параметры распределения  $CoQ_{10}$  в тканях на протяжении 8 суток после однократного в/в введения  $CoQ_{10}$  в составе препарата Кудесан<sup>®</sup> в дозе 30 мг/кг [4]

Орган	$T_{max}$ , ч	$C_{max}$ , мкг/г	$AUC_{0-\infty}$ , мкг*ч/г	$f_{tiss}$
Левый желудочек	1	62,7	1896	0,075
Головной мозг	2	41,1	542	0,02
Печень	48	649,1	110425	4,36
Почки	0,5	160,2	2087	0,082

Исследования фармакокинетики  $CoQ_{10}$  у человека были проведены Томоно [125]. Исследователь использовал порошок дейтерий-меченного  $CoQ_{10}$  (<sup>2</sup>H- $CoQ_{10}$ ), принимаемый здоровыми добровольцами перорально.

Время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ )  $^2H-CoQ_{10}$  составляло 6,5 часов,  $t_{1/2}$  равнялась 33,19 часов. В исследовании, проведенным Lucker [79], использовался обычный порошок  $CoQ_{10}$ , и полученные результаты были сопоставимы с результатами Tomono.

### **Применение убихинона**

$CoQ_{10}$  применяется для профилактики и в составе комплексной терапии различных сердечно-сосудистых заболеваний: хроническая сердечная недостаточность, дилатационная кардиомиопатия, ишемическая болезнь сердца, ИМ, аритмии, артериальная гипертензия. Многие из перечисленных заболеваний связаны с низким эндогенным уровнем  $CoQ_{10}$  [46, 71, 141].

Langsjoen [65] исследовал диастолическую дисфункцию сердца, являющуюся ранним признаком сердечной недостаточности. При данном заболевании происходит утолщение стенки ЛЖ (гипертрофия). Прием  $CoQ_{10}$  в дозе 200 мг/день привел к уменьшению толщины межжелудочковой перегородки; уменьшились симптомы усталости и одышки. Побочные эффекты не наблюдались.

$CoQ_{10}$  может использоваться для лечения нейродегенеративных заболеваний, связанных с окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией. Убидекаренон является перспективным нейропротектором, замедляющим прогрессирование болезни Альцгеймера, Паркинсона (БП), Хантингтона и атаксии Фридриха [12, 60, 95, 142].

В 2003 году Müller было проведено двойное слепое исследование с определением симптоматики БП при ежедневном приеме 360 мг  $CoQ_{10}$  на протяжении 4 недель. Симптомы БП и зрительная функция контролировались при помощи теста Farnsworth-Munsell. У 28 пациентов при приеме  $CoQ_{10}$  наблюдалось значительное улучшение в течении заболевания по сравнению с группой плацебо [93].

Выявлена корреляция между уровнем  $CoQ_{10}$  в фолликулярной жидкости и морфокинетическими параметрами эмбриона, а также возможностью оплодотворения [73].

CoQ<sub>10</sub> может быть эффективен при заболеваниях мышц. Недостаток коэнзима Q<sub>10</sub> является причиной хронической усталости и чувства нехватки энергии в мышцах. Исследования Fischer подтвердили эту связь: у пациентов, имеющих слабость в мышцах, наблюдалось пониженное содержание CoQ<sub>10</sub> в крови [33].

На сегодняшний момент имеются данные о применении CoQ<sub>10</sub> в комплексной терапии онкологических заболеваний [117]. Высказываются предположения, что пероральный прием CoQ<sub>10</sub> обеспечивает защиту от кардиотоксического действия антрациклиновых препаратов, хотя прямое исследование еще не проводилось. Rusciani L. [108] рассматривал частоту развития метастаз меланомы и выявил, что у больных, принимавших интерферон + CoQ<sub>10</sub>, в 10 раз реже наблюдались случаи метастазирования в сравнении с группой пациентов, принимавших только интерферон. Можно предположить, что механизм действия связан с увеличением количества молекул АТФ, необходимых для адекватного иммунного ответа и производства антител.

Проведены клинические исследования, демонстрирующие, что добавка CoQ<sub>10</sub> уменьшает уровни воспалительных медиаторов, особенно CRP, IL-6 и TNF-α. Добавка коэнзима Q<sub>10</sub> в дозах от 60 до 500 мг в день значительно снижала концентрацию изучаемых биомаркеров в крови [32].

Коэнзим Q<sub>10</sub> способствует заживлению ран после удаления зуба при местном применении у крыс. В исследовании Yoneda продемонстрировано, что нанесение 5% мази CoQ<sub>10</sub> на мягкие ткани альвеолярного гнезда в течение 3 дней способствует снижению уровня экспрессии гена IL-1β, TNF, а также повышает плотность коллагена [136]. Тем самым была показана эффективность местного применения CoQ<sub>10</sub> в заживлении ран в альвеолярном гнезде и ограниченное влияние на ремоделирование кости у крыс.



Эффективность убихинола как самостоятельного фармакологического агента должна быть гораздо выше, ведь антиоксидантная активность коэнзима Q<sub>10</sub> в организме проявляется после восстановления убихинона. Исследования убихинона ведутся уже более 60 лет, в то время как субстанция убихинола исследуется не более 15 лет.

Многие исследования сообщают о более высокой биодоступности препарата убихинола по сравнению с убихиноном. Исследование, проведенное Носое К. на 78 здоровых добровольцах [45], подтверждает данный тезис.

Результаты эксперимента Failla M.L. [31] также продемонстрировали, что биодоступность убихинола превосходит биодоступность убихинона. Обе субстанции подвергали солюбилизации полиэтиленгликолем-60, связанным с гидрированным касторовым маслом [21, 25]. При данном способе солюбилизации продукт обладает низкой токсичностью, тератогенностью и мутагенностью. Предварительные исследования показали, что эффективность мицелляризации убихинола была в 2-3 раза выше, чем убихинона, таким образом, концентрация убихинона в ПЭГилированном касторовом масле была увеличена для получения схожих концентраций действующих веществ в них. Внутриклеточная концентрация коэнзима Q<sub>10</sub> в смешанных мицеллах была на 17% выше ( $p < 0,001$ ) при использовании убихинола по сравнению с убихиноном ( $1,17 \pm 0,02$  vs  $1,00 \pm 0,04$ ). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективности включения восстановленного кофермента в смешанные мицеллы во время пищеварения, более эффективному поглощению и базолатеральной секреции в глутатион-зависимом механизме.

Однократное пероральное введение убихинола (Kaneka QH™) в дозе 150 и 300 мг повышает концентрацию убихинола в плазме крови (рис. 8) [45]. Концентрация убихинола достигала максимума через 6 часов после приема и составляла 1,88 мкг/мл для дозы 150 мг и 3,19 мкг/мл для 300 мг, после чего

на кривых зависимости образовывался плечевой пик 1,76 мкг/мл для 150 мг и 2,20 мкг/мл для 300 мг при 24 и 12 ч соответственно (таб. 11).

Таблица 11. Основные фармакокинетические характеристики препарата убихинола (Канека QH™) после однократного перорального приема добровольцами в двух дозах [45]

Доза убихинола	$C_{max}$ мкг/мл	$AUC_{0-48h}$ мкг*ч/мл
150 мг	1,88	74,61
300мг	3,19	91,76

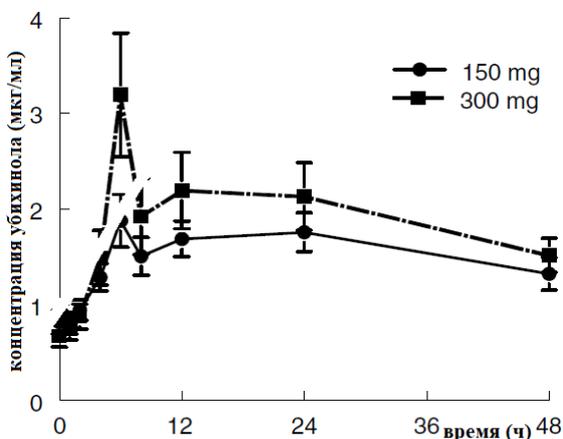


Рисунок 8. Кривая зависимости концентрация-время в плазме крови здоровых добровольцев после однократного перорального приема убихинола (Канека QH™) в дозе 150 (n=10) и 300мг (n=5). Результаты представлены как средние значения±SEM [45].

Средние плазменные концентрации при многократном пероральном приеме убихинола в трех дозах представлены на рисунке 9.

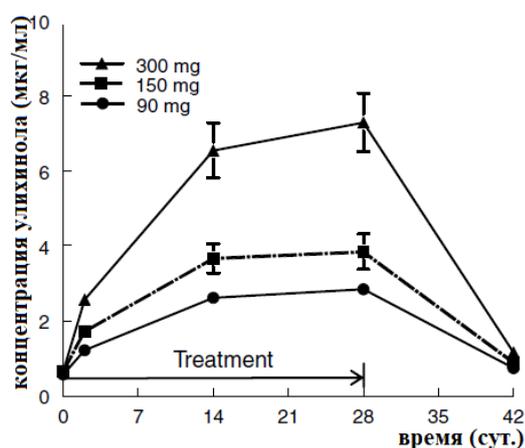


Рисунок 9. Концентрация убихинола (Kaneka QH™) в плазме на протяжении 4 недельного перорального приема препарата (90мг, 150мг и 300мг) и через 2 недели после его отмены. Результаты представлены как средние значения (90 и 150мг n=20, 300мг n=19)±SEM [45].

Средние значения концентраций на протяжении 4 недель представлены в таблице 12.

Таблица 12. Мониторинг концентрации уровня убихинола (Kaneka QH™) в плазме на протяжении 4-недельного перорального приема препарата [45]

Доза (мг)	N (чел)	Концентрация убихинола в плазме (мкг/мл)				
		День 0	День 1	День 14	День 28	Через 14 дней
90	20	0,57±0,04	1,21±0,07	2,61±0,17	2,84±0,20	0,74±0,05
150	20	0,65±0,04	1,71±0,10	3,66±0,39	3,84±0,47	0,89±0,07
300	19	0,66±0,04	2,56±0,18	6,53±0,73	7,28±0,78	1,15±0,09

Ежедневный прием препарата в дозах 90, 150 и 300 мг убихинола приводили к 2,1, 2,6 и 3,9 кратному увеличению уже на следующий день после первого приема препарата; в 4,6, 5,9 и 9,9 раза на 14 день и 5,0, 5,9 и 11,0 на 28 день для каждой из доз. Нелинейность зависимости фармакокинетических уровней от дозы может являться следствием физико-химических свойств субстанции, а именно его большой относительной

молекулярной массы и плохой растворимости в воде. Эти особенности молекулы приводят к длительному периоду полувыведения. Концентрация убихинола в плазме достигала стационарного состояния в течение 2 недель приема и вернулась к базовому уровню через 2 недели после отмены препарата [45].

В экспериментальном исследовании на мышах сравнивали биодоступность водорастворимых форм убихинола и убихинона (Kaneka Corporation, Japan) с декстрином в дозах 240 мг/кг на протяжении 2 месяцев [36]. В исследованиях продемонстрировано, что после перорального приема убихинола или убихинона концентрация  $\text{CoQ}_{10}$  в плазме крови составила 2,06 и 1,36 мкМ соответственно. Концентрация убихинола в головном мозге в 2,5 раза повышалась после приема убихинола, но почти не изменялась при употреблении убихинона.

Биодоступность восстановленной формы коэнзима  $\text{Q}_{10}$  сравнивали с биодоступностью окисленной формы. В исследовании принимали участие 12 здоровых добровольцев, у которых была произведена оценка базовых уровней убихинола, убихинона,  $\text{TCoQ}_{10}$ ,  $\alpha$ -токоферола и общего холестерина, и повторную оценку проводили после 4-недельного приема мягких желатиновых капсул с дозировкой 200 мг/сут препаратов убихинола и убихинона. Полученные результаты свидетельствуют о повышении плазменного уровня  $\text{TCoQ}_{10}$  с 0,9 мкг/мл до 2,5 и 4,3 мкг/мл ( $p < 0,001$ ) в случае приема убихинона и убихинола соответственно. Соотношение  $\text{CoQ}_{10}$ /холестерин повысилось с 0,2 мкмоль/ммоль до 0,7 и 1,2 мкмоль/ммоль после 4-недельного приема препаратов восстановленного и окисленного коэнзима  $\text{Q}_{10}$ . Полученные результаты демонстрируют лучшую биодоступность убихинола. Отношение плазменного уровня  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{TCoQ}_{10}$  было выше ( $p < 0,005$ ) базового уровня при приеме убихинола и оставалось неизменным в случае применения убихинона [66].

## Применение убихинола

На рынке лекарственных средств отсутствуют лекарственные препараты, содержащие убихинол. Но уже проведены исследования, подтверждающие эффективность применения восстановленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> при травмах головного мозга как эффективного нейропротектора, при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, при лечении бесплодия, мышечной атрофии и других заболеваниях.

В исследовании Pierce J.D. [104] крысам Фишера за 30 минут до нанесения черепно-мозговой травмы вводили убихинол или физиологический раствор. В группе животных, получавших препарат, наблюдалось значительное изменение ( $p < 0,0001$ ) в профиле экспрессии мозговых генов, задействованных в механизмах биоэнергетики клетки и продукции свободных радикалов.

Исследование, проведенное Peerapanyasut W. [103] на крысах-самцах Wistar, демонстрирует, что пероральное введение 300 мг/кг убихинола на протяжении 7 дней до 45-минутной ишемии почки с последующими 24 часами реперфузии минимизирует морфологические и функциональные ишемические изменения почки, регулирует маркеры окислительного стресса и уровень воспалительного маркера ФНО- $\alpha$ .

В исследовании Ishikawa A. [47] на циклоспориновой модели нефротоксичности у крыс продемонстрирован положительный эффект 600 мг/кг убихинола, вводимого перорально в течение четырех недель. Систолическое давление, суточный уровень альбумина в моче, уровень супероксид-аниона в ткани почки были значительно ниже в группе животных, получавших препарат. Дополнительное иммуногистохимическое исследование с использованием антител для TGF- $\beta$  продемонстрировало снижение его экспрессии в пароксизмальных почечных канальцах при применении убихинола.

Пероральное введение убихинола и убихинона диабетическим крысам на протяжении 2-х недель в дозах 5мг/кг/день снижало окислительный

стресс, а именно плазменные уровни малонового диальдегида и количество свободных радикалов [36].

На модели геморрагического шока при внутривенном введении крысам 1 мг убихинола на 100 г липосом [15] было показано снижение маркеров оксидативного стресса и уровня апоптоза в легких, диафрагме, сердце и почках. Лейкоцитарные уровни митохондриальных супероксидов были значительно ниже у крыс, получавших убихинол.

В другом исследовании оценивали влияние убихинола в дозировке 1 мг на 100 г липосом внутривенно на снижение микрососудистого воспаления у крыс. В результате назначения убихинола концентрация активных форм кислорода снижалась в два раза относительно группы контроль. Введение убихинола крысам предотвращало повышение уровня адгезии лейкоцитов и снижало дегрануляцию тучных клеток [129].

Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование перорального назначения 150 мг/кг убихинола в сутки 31-у пациенту с синдромом хронической усталости продемонстрировало значительное снижение выраженности депрессии, которое было пропорционально увеличению концентрации убихинола в плазме крови [35].

Более 15 лет ведутся исследования по оценке уровня свободных радикалов, повышение которого является одной из причин мужского бесплодия [112]. Исследование Sakiroglu В. [22] на 62 пациентах с бесплодием, которые получали 100 мг убихинол два раза в день в течение шести месяцев, выявило статистически значимые улучшения в морфологии, подвижности сперматозоидов, а также их количестве.

В исследовании влияния ежедневного назначения убихинола в дозе 150 мг 50-ю женщинам с бесплодием возрастной группы 20-40 лет, на протяжении 4-х месяцев, привело к увеличению концентрации ФСГ с  $3,1 \pm 2,7$  до  $10,09 \pm 6,95$  мМЕ/мл ( $p < 0,05$ , норма 3-12 мМЕ/мл), концентрация ЛГ с  $14,83 \pm 10,48$  до  $28,02 \pm 21,18$  мМЕ/мл ( $p < 0,05$ , норма 0,5-10,5 мМЕ/мл) [121].

В исследовании Sarmiento A. [111] на 100 здоровых добровольцах проведена оценка возможности предотвращения окислительного стресса, связанного с физическими нагрузками. Кратковременный прием убихинола в дозе 200 мг/сутки за две недели перед интенсивными тренировками снижает окислительный стресс и увеличивает продукцию NO, что улучшает функцию эндотелия и восстанавливает мышцы после интенсивных нагрузок.

Исследование, проведенное Milles M.V. [87] по оценке окислительно-восстановительного статуса у 14-ти детей с трисомией по 21 хромосоме (синдром Дауна), сопровождающейся сниженным плазменным уровнем убихинола, показало, что после 3-х месяцев приема убихинола в дозе 10 мг/кг/сут значительно возрос плазменный уровень TCoQ с  $0.76 \pm 0.21$  до  $8.84 \pm 2.98$   $\mu\text{kmol/l}$  ( $p < 0,005$ ) и убихинола с  $0,66 \pm 0.18$  до  $8,20 \pm 2.95$   $\mu\text{kmol/l}$  ( $p < 0,003$ ). Таким образом, окислительно-восстановительное состояние плазмы у детей с синдромом Дауна нормализовалось с добавлением убихинола. Необходимо дальнейшее изучение эффективности убихинола при данной патологии у детей.

Имеются результаты, демонстрирующие эффективность использования убихинола у пациентов с сердечной недостаточностью [13]. Уровень NT-proBNP (N-концевой натрийуретический пептид) является показателем степени сердечной недостаточности. Исследование Onur S. [101] выявило отрицательную взаимосвязь между уровнем убихинола и NT-proBNP ( $p < 0,001$ ) в сыворотке крови. Добавление убихинола у 53-х больных людей в дозе 150 мг/сутки на протяжении 14-ти дней снижает уровень экспрессии гена CLCN6, связанного с уровнем NT-proBNP. Однако до какой степени уровень убихинола в плазме является защитным фактором при сердечной недостаточности, еще предстоит выяснить в перспективных исследованиях.

Результаты доклинических и клинических исследований, имеющиеся на данный момент, демонстрируют перспективность применения восстановленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> (убихинола) при лечении различных патологических состояний. Выявлена необходимость его длительного

применения для оказания должного терапевтического эффекта, что связано с низкой биодоступностью препарата при пероральном применении, что еще раз подтверждает перспективу изучения разработанной лекарственной формы убихинола – 1% солюбилизованного водного раствора препарата.

## **II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **1. Материалы и методы**

#### **Реактивы**

- этанол (Merk, Германия)
- метанол (Merk, Германия)
- натрия тетрагидроборат for analysis (Panreac, Испания)
- n-гексан, 95% Multisolvent, HPLC grade ACS UV-VIS(Scharlau, Испания)
- натрия хлорид (Merk, Германия)
- хлорная кислота 60% (Fluka, США)
- вода дистиллированная, деионизированная (Merck Millipore, США)

#### **Оборудование**

- ВЭЖХ «Environmental Sciences Associate, Inc.» (ESA, США)
- насос модели 580 (ESA, США)
- электрохимический детектор «Coulchem II» с аналитической ячейкой модели 5010 (ESA, США)
- колонка Luna (Phenomex) C18 150x4,6 мм с сорбентом C18 (5 мкм)
- центрифуга MICROCENTRIFUGE CM-50 (ELMI, Латвия)
- спектрофотометр СФ-104 (Аквилон, Россия)
- весы DV – 114С (Ohaus Discovery, Швейцария)
- дозаторы LABMATE Soft LM-20, LM-200, LM-1000 (Аквилон, Россия)
- микрошприц 702 NR 25мкл 700-серии (Hamilton, Швейцария)
- шприц 2,5мл 1002- серия (Hamilton, Швейцария)
- гомогенизатор IKA Ultra-Turrah T25 digita (ИКА, Германия)
- установка «Macintosh – MacLab» («ADInstruments», Австралия)
- аппарат искусственной вентиляции легких Inspira Advanced Safety Ventilator, Volume Controlled 55-7058 (Harvard Apparatus, Великобритания)

➤ интернет ресурс Millisian 2.1 (<http://www.millsian.com>), ALOGPS 2.1 (<http://www.vcclab.org/lab/alogps>), и PubChem Search (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>)

Все приборы и средства измерения, использованные в эксперименте, зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений и имели действительные свидетельства о поверке.

#### **Объекты исследования**

- Субстанция-порошок убихинола (Kaneka, Япония, срок годности 11.2018г.)
- 1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола для внутривенного введения (ЗАО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»), Россия

#### **Экспериментальные животные**

Исследование выполнено на взрослых крысах-самцах Wistar массой 280-330 грамм, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в стандартных условиях при температуре 18-22°C, 12:12 часовом периоде освещения, со свободным доступом к воде и пище. В качестве наркоза использовали внутрибрюшинную инъекцию этаминала натрия (45 мг/кг).

Все процедуры с животными проведены в соответствии с требованиями руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и одобрены биоэтической комиссией Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

#### **Приготовление стандартных растворов**

Для калибровки прибора готовили линейку калибровочных растворов, последующим разбавлением исходного раствора, используя субстанцию-порошок убихинола.

Точную навеску субстанции убихинола 0,010 г (10мг) помещали в пробирку и добавляли 1 мл 95% этанола шприцом Hamilton. Для ускорения процесса растворения содержимое пробирки нагревали до 40°, полученный раствор (А) концентрацией 10мг/мл подвергали последующему разбавлению.

Для этого 500мкл раствора А переносили в следующую пробирку и добавляли 500мкл 95% спирта (1:2), концентрация раствора 5мг/мл(Б). Для получения образца с концентрацией 1мг/мл, 100мкл раствора А переносили в пробирку и добавляли 900мкл 95% спирта (1:10). Дальнейшим разбавлением растворов была получена линейка стандартных спиртовых разведений с концентрацией убихинола 10мг/мл, 5мг/мл, 1мг/мл, 500мкг/мл, 250мг/мл, 100мкг/мл, 50мкг/мл, 10мкг/мл, 5мкг/мл, 1мкг/мл, 500нг/мл, 250нг/мл.

### **Приготовление модельных растворов убихинола в плазме крови крыс для валидации биоаналитической методики**

Модельные растворы готовили методом добавок спиртовых разведений субстанции убихинола к аликвоте плазмы крови крыс. Для этого заранее готовили спиртовую линейку калибровочных растворов способом, аналогичным описанному ранее. Концентрации спиртовых разведений: 2,5мкг/мл, 10мкг/мл, 25мкг/мл, 50мкг/мл, 100мкг/мл, 250мкг/мл, 500мкг/мл. К 100мкл плазмы крови крыс проводили добавку 10мкл стандартного спиртового разведения микрошприцом Hamilton для получения концентрации убихинола в плазме 0,25; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 мкг/мл. К одному образцу плазмы добавку убихинола не проводили, а добавляли 95% спирт в том же объеме. Этот образец использовали для оценки фонового содержания убихинола в плазме крови крысы.

Для экстракции к полученным модельным растворам приливали 190мкл 95% этанола и 500мкл n-гексана. Дозирование реактивов по объему осуществляли с помощью дозаторов LABMATE Soft. Полученные растворы интенсивно встряхивали в течение 10 минут, центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин. Отбирали полностью верхний слой n-гексана, к остатку добавляли 500мкл n-гексана и проводили повторную экстракцию. Полученные слои n-гексана объединяли, упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 100мкл этанола для последующего ВЭЖХ анализа с электрохимическим детектированием.

## **Приготовление модельных смесей убихинола с гомогенатом печени крыс для подтверждения пригодности биоаналитической методики**

Модельные смеси бланк-матрицы гомогената печени готовили методом добавок спиртовых разведений субстанции убихинола к аликвоте гомогената печени крыс. Для этого предварительно готовили описанным ранее способом спиртовую линейку калибровочных растворов убихинола с концентрацией 5мг/мл, 1мг/мл, 500мкг/мл, 250мг/мл, 100мкг/мл, 50мкг/мл.

К 100мкл гомогената печени крыс микрошприцом Hamilton добавляли 10мкл стандартного спиртового разведения для достижения концентрации убихинола в гомогенате 5 мкг/мл; 10 мкг/мл; 25 мкг/мл; 50 мкг/мл; 100 мкг/мл и 500мкг/мл, что при пересчете на грамм печени равно содержанию убихинола 2,5, 5, 12,5, 25, 50, 250мкг/г, соответственно. К одному из образцов добавку убихинола не проводили, а добавляли 95% спирт в том же объеме. Этот образец использовали для оценки эндогенного уровня убихинола в печени крысы.

Для экстракции к полученным модельным растворам приливали 190мкл 95% этанола и 500мкл n-гексана. Дозирование реактивов по объему осуществляли с помощью дозаторов LABMATE Soft. Полученные растворы интенсивно встряхивали в течение 10 минут, центрифугировали 5 минуты при 3000 об/мин. Отбирали полностью верхний слой n-гексана, к остатку добавляли 500мкл n-гексана и проводили повторную экстракцию. Полученные слои n-гексана объединяли, упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 100мкл этанола для последующего ВЭЖХ анализа с электрохимическим детектированием.

## Методика ВЭЖХ-ЭХ анализа $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$

Анализ проводили методом обращено-фазовой ВЭЖХ на оборудовании «Environmental Sciences Associate, Inc.», (США).

<b>Колонка</b>	Luna (Phenomex) C18 150x4,6 мм с сорбентом C18 (5 мкм)
<b>Температура колонки</b>	25±2 <sup>0</sup> С
<b>Подвижная фаза</b>	0,3% NaCl в смеси этанол: метанол: 7% HClO <sub>4</sub> (970:20:10)
<b>Скорость потока</b>	1,4 мл/мин
<b>Объем вводимой пробы</b>	10 мкл
<b>Детектирование</b>	электрохимическое в окислительном режиме, ячейка (ESA 5010) с напряжением -50 мВ; +350 мВ на первом и втором электродах, соответственно
<b>Восстановитель</b>	NaBH <sub>4</sub> спиртовой раствор
<b>Время анализа</b>	12 минут
<b>Время удерживания убихинола</b>	7,8 минут

Регистрацию и обработку хроматографических данных проводили с помощью компьютерной программы фирмы «Environmental Sciences Associate, Inc.» (США).

### **Валидация методики ВЭЖХ-ЭХ анализа $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в растворах и биоматериале**

Целью проведения валидации биоаналитической методики является экспериментальное доказательство пригодности данной методики для решения предполагаемых задач. Валидацию проводили на начальном этапе доклинического исследования инновационной лекарственной формы

препарата на основе убихинола, для последующего использования в фармакокинетическом эксперименте.

Валидацию проводили в соответствии с требованиями стандартной операционной процедуры, разработанной на кафедре фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета, и с учетом требований и рекомендаций Guideline on validation of bioanalytical methods, Guidans for Industry: Bioanalytical method validation, Руководства по доклиническому исследованию лекарственных средств (I том). Процесс валидации биоаналитической методики является требованием GLP и проведен по основным валидационным характеристикам: селективность, линейность, правильность, прецизионность и предел количественного определения (ПКО).

#### **Катетеризация животного**

В стерильных условиях наркотизированным животным имплантировали полиэтиленовый катетер (PE10/PE50) в бедренную вену для внутривенного введения препарата и полиэтиленовый катетер (PE50/PE90) в бедренную артерию для забора образцов крови.

Животное фиксировали на терморегулируемом столе ( $t=37^{\circ}\text{C}$ ). Удаляли шерсть в левой подвздошной области, обрабатывали кожу антисептиком и делали разрез кожи  $\sim 1,5\text{ см}$ . Жировую ткань раздвигали пинцетом, левую бедренную вену и левую бедренную артерию отделяли от окружающих тканей, к каждому сосуду подводили по две лигатуры (шовный материал). На дистальных участках сосудов лигатуру затягивали, на расстоянии 2-4 мм от завязанной лигатуры сосудистыми ножницами надрезали стенки сосудов и вводили через разрез катетеры. Второй лигатурой проводили фиксацию катетеров. Кожу зашивали.

#### **Забор образцов биоматериала**

Животных наркотизировали, проводили катетеризацию бедренной артерии по методике, описанной выше. Кровь собирали в пробирку типа

«Eppendorf» с гепарином, центрифугировали (3000об/мин, 5 минут). Плазму отбирали, замораживали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до последующего ВЭЖХ-анализа.

После забора образцов крови животных подвергали эвтаназии (3М КС1, в/в) и производили забор образцов биоматериала: ЛЖ, печень, почка, селезенка, мозг. Органы помещали в пробирки, маркировали, замораживали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до последующего ВЭЖХ-анализа.

### **Пробоподготовка тканей органов крыс**

Перед проведением ВЭЖХ-анализа все образцы биоматериала размораживали, измельчали ножницами, помещали в пробирку и гомогенизировали с помощью механического гомогенизатора IKA Ultra-Turrax в дистиллированной воде (1:4), за исключением головного мозга, который гомогенизировали в 95% этаноле (1:4). Критерием готовности гомогената была возможность его дозирования с помощью дозаторов LABMATE Soft.

### **Экстракция**

Экстракцию плазмы и гомогената проводили согласно методике Lass A. с модификацией [68]. К 100 мкл полученных гомогенатов приливали 200мкл 95% этанола и 500мкл n-гексана. Полученные растворы интенсивно встряхивали в течение 10 минут, центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин. Отбирали верхний слой n-гексана, проводили повторную экстракцию. Полученные слои n-гексана объединяли, упаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 100мкл этанола для последующего ВЭЖХ анализа с электрохимическим детектированием.

### **Расчет фармакокинетических параметров**

С помощью программы «Kinetic 5.0» были построены индивидуальные фармакокинетические кривые зависимости «концентрация – время» для каждой из доз препарата, а так же фармакокинетические кривые по средним значениям для каждой из экспериментальных групп. С помощью программы Kinetic 5.0 рассчитывали основные фармакокинетические

параметры:  $AUC_{0-48h}$  (мкг\*ч/мл) – площадь под фармакоинетической кривой «концентрация-время»,  $T_{1/2}$  (ч) – время, необходимое для снижения концентрации лекарственного препарата в  $CoQ_{10}$  в плазме крови на 50%,  $Cl$  (мл/мин) – скорость очищения плазмы крови от лекарственного вещества.

### **Моделирование острого инфаркта миокарда**

Наркотизированных животных помещали на термостатируемый стол ( $t=37^{\circ}C$ ), проводили катетеризацию левой бедренной вены (P10/P50). Регистрацию ЭКГ в I отведении осуществляли с помощью установки «Macintosh – MacLab», показатели электрокардиографии регистрировали непрерывно в течение всего эксперимента. Животное интубировали, к интубационной трубке (наружный диаметр 1-1,2 мм, внутренний диаметр 0,6-0,8 мм, длина 25-30 мм) подключали аппарат искусственной вентиляции легких Inspira Advanced Safety Ventilator. Расчетные величины объема и кратности подаваемого воздуха приведены в таблице 13.

Таблица 13. Расчетные величины объема и кратность подаваемого воздуха

<b>Вес крысы, г</b>	<b>Порционный объем, мл</b>	<b>Кратность подаваемого воздуха в минуту</b>
300	1,8	73,2
310	1,9	72,5
320	2,0	71,9
330	2,0	71,4
340	2,1	70,8
350	2,1	70,3

Доступ к сердцу осуществляли путем левосторонней торакотомии с удалением 4-ого ребра. Тупым способом рассекали перикард, с помощью атравматической иглы (Proline 6/0, Ethicon, США) проводили окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Ишемию верифицировали визуально и при помощи ЭКГ. Ложнооперированным

животным («ЛО») проводили аналогичные манипуляции за исключением окклюзии коронарной артерии.

После окклюзии коронарной артерии межреберные мышцы ушивали, мышцы грудной клетки плотно сшивали, края кожной раны сопоставляли и накладывали простой узловый шов. Рану обрабатывали дезинфицирующим раствором. После отключения аппарата ИВЛ и восстановления самостоятельного дыхания эндотрахеальную трубку удаляли. До выхода из наркоза животное оставляли на термостатируемом столе для предотвращения переохлаждения, связанного с наркотизацией, после животное переносили в индивидуальную клетку. В течение 3-х дней после операции животным ежедневно проводили внутримышечную инъекцию гентамицина в дозе 2мг/кг веса животного (0,2% водный раствор).

### **Оценка кардиопротекторной эффективности убихинола**

На 21 сутки после операции животное подвергали эвтаназии, сердце извлекали, промывали в физиологическом растворе. Отделяли правый желудочек от левого.

ЛЖ замораживали (-20°C), замороженный ЛЖ разделяли на 6 срезов по оси от верхушки сердца до основания. Срезы толщиной 1,5-2 мм помещали на 15 минут ( $t=37^{\circ}\text{C}$ ) в 2% раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) в фосфатном буфере (pH=7,4) для визуализации участков некроза (живой миокард окрашивается в ярко-красный цвет, т.к. ТТХ в живых клетках окисляется под действием внутриклеточных дегидрогеназ до продукта красного цвета – трифенилформаза; зона некроза не окрашивается). Прокрашенные срезы фотографировали с двух сторон (рис. 10) при помощи микроскопа («Olympus», Япония) и видеокамеры («Sony», Япония). Оценку степени развития гипертрофии проводили по показателю толщины межжелудочковой перегородки (ТМП). Подсчет зоны повреждения и ТМП проводили на снимках поперечных срезов сердец при помощи программы ImageJ 1.45s.

На каждом изображении в зависимости от типа повреждения измеряли:

- длину наружной поверхности постинфарктного рубца ( $L_{\text{некр}}$ ) и длину окружности всего среза ( $L_{\text{общ}}$ )
- площадь некротизированного сегмента ( $S_{\text{некр}}$ ) и площадь всего среза ( $S_{\text{общ}}$ ).

Оценку степени ишемического повреждения проводили с помощью следующих показателей:

- **наружная длина постинфарктного рубца ( $L\%$ )** – процентное отношение суммарной длины постинфарктного миокарда на всех срезах к суммарной длине окружности всех срезов миокарда;
- **площадь некроза миокарда ( $S\%$ )** процентное отношение суммарной площади некротизированного миокарда к суммарной площади всех срезов ЛЖ.

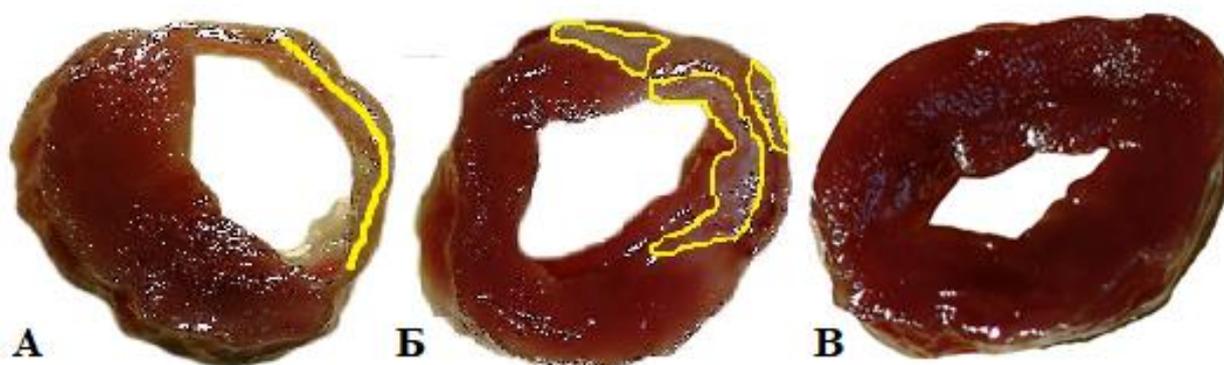


Рисунок 10. Поперечные срезы ЛЖ после окраски раствором ТТХ (2% р-р ТТХ в фосфатном буфере). А – сформированная соединительнотканная аневризма ЛЖ; Б – инфарктный рубец в толще миокарда; В – интактный срез ЛЖ.

## Оценка показателей гемодинамики

На 21 сутки после моделирования инфаркта миокарда проводили измерение показателей гемодинамики левого желудочка. Наркотизированное животное располагали на термостатируемом столе. Выбривали шерсть в области срединной линии шеи, осуществляли надрез кожи размером 1,5-2 см, отсепарировали правую общую сонную артерию, через которую ретроградно в ЛЖ проводили катетер Millar SPR-838 (Millar Instruments, США), подключенный к измерительной системе Pressure Volume Conductance System, для записи объема и давления в ЛЖ. Через 20 минут после постановки катетера данные регистрировались в течение 5 минут. Регистрацию и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Chart 5 for Windows и PVAN 3.5 (Millar Instruments).

Регистрация давления (P) в левом желудочке и его объема (V) была выполнена в виде PV-диаграммы сердечного цикла (рис.11), на которой представлены четыре основные фазы сердечного цикла: наполнения, изоволюмического сокращения, изгнания и изоволюмического расслабления.

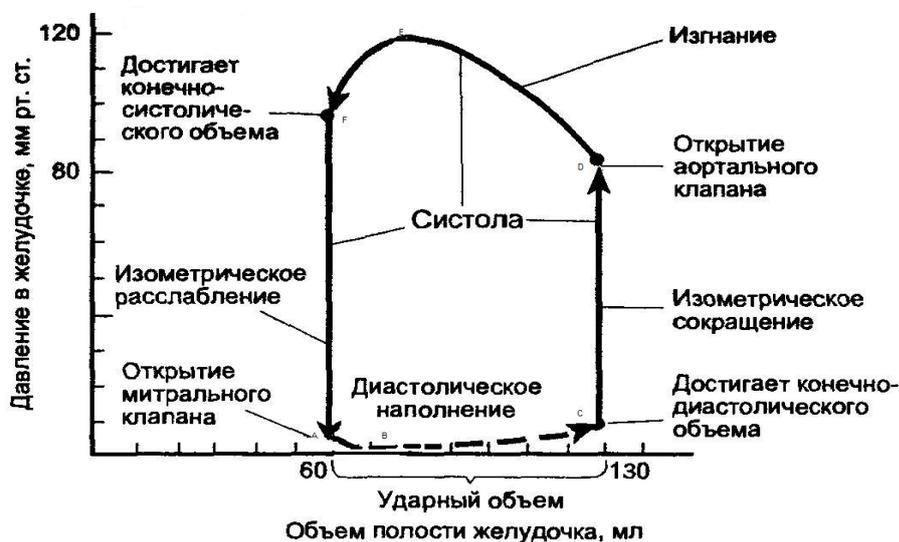


Рисунок 11. Желудочковый цикл: зависимость давления (P) от объема (V). (Д. Морман, Л. Хеллер Физиология сердечно-сосудистой системы. 2000)

Исходя из полученных PV-диаграмм, были рассчитаны следующие показатели:

- конечно-систолический объем (ESV, мкл) – объем камеры ЛЖ, измеренный в конце систолы,
- конечно-диастолический объем (EDV, мкл) – объем камеры ЛЖ, измеренный в конце диастолы,
- ударный объем (SV, мкл) – разница между конечно-диастолическим объемом и конечно-систолическим объемом,
- фракция выброса (EF, %) – отношение ударного объема к конечно-диастолическому объему,
- частота сердечных сокращений (HR, ударов/мин) – число пиков ESP за 1 минуту,
- сердечный выброс (CO, мл/мин) – объем крови, изгоняемый из ЛЖ в аорту за 1 мин; рассчитывали по формуле  $CO = SV \times HR$ ,
- сердечный индекс (CI, мл/г) – отношение значения сердечного выброса к массе животного,
- конечно-систолическое давление (ESP, мм.рт.ст.) – давление в камере ЛЖ, измеренное в конце систолы,
- конечно-диастолическое давление (EDP, мм.рт.ст.) – давление в камере ЛЖ, измеренное в конце диастолы,
- сократимость ЛЖ ( $dPdt_{max}$ , мм.рт.ст./сек) – максимальное значение производной от изменения давления в ЛЖ,
- релаксация ЛЖ ( $dPdt_{min}$ , мм.рт.ст./сек) – минимальное значение производной от изменения давления в ЛЖ,

- константа релаксации (мсек) – индекс изоволюмического расслабления ЛЖ, рассчитанный как регрессия  $\log$  (давление) vs время,
- ударная работа (SW, мм.рт.ст. x мкл) – работа, совершаемая ЛЖ по изгнанию крови: рассчитывали как площадь, ограниченная петлей PV.

Для каждого животного по каждому параметру был рассчитан средний показатель.

### **Статистический анализ и представление данных исследований**

Статистическую обработку данных, полученных в ходе экспериментов, проводили с помощью программного пакета STATISTICA 8.0. Для проверки распределения данных эксперимента на нормальность использовали критерий Колиогорова – Смирнова.

В зависимости от характера данных использовали следующие методы статистического анализа: U–критерий Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса и Джонкхиера. Для установления корреляционных связей использовали коэффициент корреляции Спирмена ( $r$ ). При оценке достоверности использовали 3 стандартных уровня значимости ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Данные представлены на рисунках в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение.

## 2. Протоколы исследований

### 2.1. Протокол валидации биоаналитической методики ВЭЖХ-ЭХ анализа $\text{CoQH}_2$

Процесс валидации биоаналитической методики является требованием GLP и проведен по основным валидационным характеристикам: пригодность системы, селективность, линейность, правильность, прецизионность и предел количественного определения (ПКО).

1) *Пригодность системы* – оценка пригодности хроматографической системы проведена по следующим характеристикам: время выхода, число теоретических тарелок ( $N \geq 2000$ ), коэффициент асимметрии пика ( $T \leq 2$ ).

2) *Селективность* – способность аналитического метода идентифицировать и количественно определить содержание убихинола в препарате.

Критерии приемлемости:

- На хроматограмме ПФ отсутствуют пики, соответствующие диапазону времени удерживания исследуемого компонента
- На хроматограмме стандартного образца присутствует один основной пик
- На хроматограмме испытуемого ЛС наблюдается один основной пик, время удерживания которого соответствует времени удерживания основного пика стандартного образца
- На хроматограмме матрицы пики определяемого вещества, пики примесей и системные пики хорошо разделены между собой

3) *Линейность* – определение диапазона концентраций, в котором существует линейная зависимость между содержанием вещества в образце и откликом сигнала.

Критерии приемлемости:

- Должна наблюдаться линейная зависимость между площадью пика и концентрацией убихинола

- Корреляция должна быть не менее 95%
- 4) *Правильность* – определение точности соответствия получаемых результатов их истинному значению.

$$AC(\%) = (\text{полученное значение} / \text{номинальное значение}) * 100\%$$

Критерии приемлемости:

- Средняя концентрация должна быть в пределах 15% от номинальных значений образцов, за исключением наименьшей концентрации, которая должна быть в пределах 20% от номинального значения.

5) *Прецизионность* – демонстрирует степень близости/разброса результатов для серии измерений, выполненных в предписанных условиях.

$$PR(\%) = (\text{стандартное отклонение} / \text{среднее значение}) * 100\%$$

Критерии приемлемости:

- Внутрисерийный коэффициент вариации (CV) не должен превышать 15% для образцов, за исключением наименьшей концентрации, для которой коэффициент вариации не должен превышать 20%.

6) *Предел количественного определения (ПКО)* – определение наименьшей концентрации анализируемого вещества в образце, которое можно измерить с приемлемой точностью.

Критерии приемлемости:

- Для количественного определения сигнал исследуемого образца для нижнего предела должен, как минимум, в 5 раз превышать диапазон шума «бланк матрицы»

Для подтверждения пригодности использования данной биоаналитической методики в органах использовали упрощенный план валидации в образцах бланк-матрицы печени по показателям: селективность, линейность и ПКО.

## **2.2. Протокол фармакокинетического исследования препарата убихинола при однократном внутривенном введении в 3-х различных дозах (5мг/кг, 10мг/кг и 20 мг/кг)**

Для изучения фармакокинетики препарата при однократном внутривенном введении для каждой из доз использовали по 6 животных. Животных наркотизировали, имплантировали катетеры в бедренную вену и бедренную артерию. Через сутки после операции бодрствующим животным натошак внутривенно вводили 1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола в трех различных дозах: 5мг/кг, 10мг/кг и 20мг/кг. На время проведения эксперимента животным ограничивали доступ к пище без ограничения доступа к воде. С помощью артериального катетера проводили забор образцов крови в пробирку с гепарином до и через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48 часов после введения препарата. Кровь центрифугировали (5000об/мин, 3мин), плазму отбирали, замораживали и хранили при температуре -20°C до последующего ВЭЖХ-анализа.

## **2.3. Протокол исследования распределения CoQ10 в органах крыс после внутривенного введения препарата убихинола (10мг/кг)**

Для изучения фармакокинетики препарата в плазме и распределения в органах крыс в дозе 10мг/кг на каждую временную точку использовали по 5 животных. Животных наркотизировали, имплантировали катетер в бедренную вену, Через сутки после операции бодрствующим животным натошак внутривенно вводили 1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола. На время проведения эксперимента животным ограничивали доступ к пище без ограничения доступа к воде. Забор образцов крови и 5-ти органов проводили через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48 часов после введения препарата. Кровь центрифугировали (5000об/мин, 3мин), отбирали плазму. Плазму и органы (ЛЖ, почка, селезенка, печень, головной мозг) замораживали и хранили при температуре -20°C до последующего ВЭЖХ-анализа.

#### **2.4. Протокол изучения экскреции CoQ10 после однократного внутривенного введения препарата на основе убихинола в дозе 10мг/кг**

Биологический материал получен из ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации». Образцы мочи собраны в интервалах 0-2 ч, 2-4 ч, 4-8 ч, 8-10 ч, 8-24 ч, 24-32 ч, 32-48 ч после внутривенного введения препарата в дозе 10мг/кг. Образцы фекалий подвергали предварительной гомогенизации в дистиллированной воде (1:4). Экстракцию мочи и гомогената фекалий проводили согласно методике Lass A. [68] с модификацией. К 100 мкл образца приливали 200мкл 95% этанола и 500мкл n-гексана. Полученные растворы интенсивно встряхивали в течение 10 минут, центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин. Отбирали верхний слой n-гексана, проводили повторную рекстракцию. Полученные слои n-гексана объединяли, упаривали досуха для последующего ВЭЖХ анализа с электрохимическим детектированием.

#### **2.5. Протокол фармакокинетического исследования препарата убихинола после трехкратного внутривенного введения в 2-х дозах (5мг/кг и 10мг/кг)**

Для изучения фармакокинетики препарата после трехкратного внутривенного введения для каждой из доз использовали по 6 животных. Животных наркотизировали, имплантировали катетеры в бедренную вену и бедренную артерию. Через сутки после операции раз в день на протяжении 3-х дней бодрствующим животным натошак внутривенно вводили 1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола в дозах 5мг/кг и 10мг/кг. На время проведения эксперимента животным ограничивали доступ к пище без ограничения доступа к воде. С помощью артериального катетера проводили забор образцов крови в пробирку с гепарином до и через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48 часов после последнего введения препарата. Кровь центрифугировали (5000об/мин, 3мин), плазму отбирали, замораживали и хранили при температуре -20°C до последующего ВЭЖХ-анализа.

## **2.6. Протокол изучения кардиопротекторной эффективности препарата убихинола для внутривенного введения**

Оценку кардиопротекторной эффективности препарата на модели необратимой ишемии миокарда проводили на 21 сутки после окклюзии коронарной артерии по показателям: смертность, размер зоны повреждения, гипертрофия ЛЖ и содержание  $\text{CoQ}_{10}$  в плазме, ЛЖ и печени.

Протокол исследования включал три группы животных: «ИМ+ $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ » (n=11), «ИМ» (n=10), «ЛО» (n=9). Через 10 минут после окклюзии передней нисходящей ветви левой коронарной артерии, за исключением «ЛО», животных случайным образом распределяли по группам «ИМ+ $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ » и «ИМ» и проводили внутривенную инъекцию:

- в группе «ИМ+ $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ » – препарата убихинола для внутривенного введения в дозе 10мг/кг веса животного
- в группе «ИМ» – физиологического раствора (0,9% водный раствор NaCl) в объеме 1мл/кг веса животного
- в группе «ЛО» – физиологического раствора (0,9% водный раствор NaCl) в объеме 1мл/кг веса животного

На 21 сутки после операции проводили измерения показателей гемодинамики ЛЖ, забор образцов проб биоматериала (плазма, печень, ЛЖ). Оценку степени повреждения, гипертрофии миокарда и количественное содержание убихинола проводили по методикам, описанным ранее.

## III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Физико-химические свойства убихинола

Коэнзим Q<sub>10</sub> в организме присутствует в двух формах: восстановленной – убихинол (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) и окисленной – убихинон (CoQ<sub>10</sub>). На субстанции в Российской Федерации нет нормативной документации, однако на убихинон имеется фармакопейная статья в японской фармакопее.

Для субстанции убихинона характерно ярко-оранжевое окрашивание, в отличие от субстанции убихинола, которая имеет цвет порошка от бледно-желтого до кремового. Яркое окрашивание определяется наличием п-хиноидной структуры в молекуле убихинона.

Наличие гидроксильных групп в бензольном кольце молекулы убихинола (C<sub>59</sub>H<sub>92</sub>O<sub>4</sub>), в отличие от убихинона (C<sub>59</sub>H<sub>90</sub>O<sub>4</sub>), позволяет предположить большую гидрофильность молекулы, что связано с возможностью образовывать водородные связи в более полярных растворителях [82, 135].

Для обоснования имеющихся литературных данных, свидетельствующих о более высокой биодоступности молекулы убихинола [35, 45, 106] в сравнении с убихиноном, нами были рассчитаны коэффициенты распределения веществ вода /масло с помощью программного интернет ресурса Millisian 2.1, ALOGPS 2.1.

Интерес к изучению коэффициента распределения веществ появился в 30-х годах, когда Overton и Mayer, изучая свойства наркотических ЛС, принадлежащих к разным классам органических соединений, обнаружили корреляцию между оказанным наркотическим действием и способностью вещества преимущественно распределяться в органическом слое. В начале 60-х годов был доказан параболический характер зависимости коэффициента распределения и биологического действия молекулы. Таким образом, при достижении оптимальной липофильности молекулы, дальнейшее повышение ее липофильных свойств будет приводить к снижению биологической активности. В дополнение к этому, независимо от стехиометрических или

электронных свойств молекулы, в оказании биологического эффекта на организм коэффициент распределения всегда имеет большее значение для доставки лекарственного препарата.

В подтверждение параболического характера зависимости Хэншем было выведено уравнение зависимости [40]:

$$\log 1/C = k'(\log P) - k(\log P)^2 + \log k + k'',$$

где  $C$  – концентрация препарата, вызывающая биологический ответ;  $P$  – коэффициент распределения;  $k$ ,  $k'$  и  $k''$  – константы, рассчитанные методом наименьших квадратов [41].

В качестве растворителя для определения коэффициента распределения часто используют две несмешивающиеся жидкости – октанол:вода. Октанол имеет свойства близкие к свойствам природных мембран клеток и по сравнению со многими растворителями, в том числе маслами, лучшее соотношение гидрофильных и липофильных свойств, что связано с наличием гидроксильной группы, способной образовывать водородные связи. Существует линейная зависимость между логарифмами коэффициентов распределения органических веществ в двух различных парах растворителей (один из которых всегда вода) [42]:

$$\log P' = a \log P + b,$$

где  $P$  и  $P'$  — коэффициенты распределения одного вещества в двух разных парах растворителей,  $a$  и  $b$  — константы.

Значение  $a$  и  $b$  для октанола равно 1 и 0 соответственно.

Для убихинола и убихинона значения  $\log P$ , полученные с помощью ALOGPS 2.1, составляют 9,68 и 9,94 соответственно. Таким образом, с одной стороны, значения коэффициентов распределения свидетельствуют о практически полном переходе убихинола из водной фазы в органическую фазу. Однако, какая-то часть убихинола остается в водной фазе после наступления равновесия, и она превышает данный показатель убихинона на 0,26. Полученная разница значений очень мала, но несмотря на это дает нам право говорить об изменении растворимости в данных системах.

Значительно большее влияние на распределение и липофильность молекулы оказывает величина углеродного радикала во втором положении, а не наличие гидроксильных групп в бензольном кольце молекулы. Для гомологов коэнзима Q растворимость уменьшается в ряду CoQ<sub>6</sub> - CoQ<sub>10</sub>.

Значение коэффициента распределения напрямую зависит от природы вещества, природы растворителя и температуры. С увеличением температуры в среде полярных растворителей происходит разрыв водородных связей, и тем самым повышается растворимость липофильных молекул.

В результате сравнения растворимости субстанций в этаноле выявлено, что в соответствии с ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость» убихинола можно отнести к умеренно растворимым веществам, т.к. 10мг субстанции растворяются в 1 мл 95% этанола (1:100), и при рассмотрении образца в проходящем свете не обнаруживается частиц субстанции. В случае убихинона данные значения показателя растворимости достигаются при увеличении температуры спирта до 60°-70°С, при дальнейшем понижении температуры вещество выпадает в осадок. Можно предположить увеличение показателя растворимости в пропаноле и его снижение в метаноле из-за снижения силы водородных связей в гомологическом ряду алифатических спиртов, связанного с увеличением длины цепи и снижением электроотрицательности молекулы. Это объясняет высокое значение коэффициента распределения при использовании системы октанола:вода.

Рассчитанный показатель логарифма растворимости субстанций в воде в той же программе имеет отрицательные значения -6,65 и -6,57 для убихинона и убихинола, соответственно. Анализ полученных результатов демонстрирует, что 1г субстанции убихинона растворяется в 10042,68 мл воды, в то время как 1г субстанции убихинола имеет лучшую растворимость и растворяется в 9500,95мл воды. Согласно требованиям ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость» субстанция убихинона относится к практически нерастворимой в воде, т.е. 1г растворим в более чем 10000 мл воды;

полученные результаты согласуются с характеристикой вещества в японской фармакопее. Субстанция убихинола относится к очень мало растворимой в воде, т.е. 1г растворим в диапазоне 1000-10000мл воды.

С помощью программного интернет ресурса Millsian 2.1 был проведен расчет дипольного момента молекулы убихинона и убихинола. Полученные значения составляют для убихинола 0,936828 Д и для убихинона – 1,34945 Д. Дипольный момент характеризуется смещением электронного облака к одному из атомов. Величина дипольного момента молекулы выражается в Д (Д, дебаи) и является произведением заряда электрона на длину химической связи. Полученные значения свидетельствуют о большей длине химической связи в молекуле убихинона, связанной с выходом электронного облака за пределы бензольного кольца и смещением на атомы кислорода хиноидной части. Энергия связи в молекуле убихинола выше чем в молекуле убихинона (662,991 vs 661,799 кДж/моль). Легкость перехода в более стабильную окисленную форму – убихинон обуславливает антиоксидантную активность молекулы убихинола как восстановителя.

Результаты, полученные с помощью открытых интернет ресурсов, позволяют глубже понять литературные данные [45, 106] и данные, полученные экспериментальным путем, о высокой липофильности молекул убихинона и убихинола (что связано с коэффициентом распределения каждой молекулы), о большей биодоступности молекулы убихинола в сравнении с молекулой убихинона и химической природе антиоксидантной активности убихинола (что связано с большей энергией связи в молекуле убихинола). Полученные результаты дают возможность обоснованно интерпретировать особенности фармакокинетики убихинола и ее отличия от убихинона [52].

### **Внутрилабораторный контроль образцов препарата**

Произведена спецификация полученного 1% раствора для внутривенного введения убихинола по показателям: описание, прозрачность, наличие механических включений, рН, подлинность и количественное определение.

Полученные лабораторные образцы препарата при поступлении должны были соответствовать требованиям (табл. 14) и подвергались контролю качества.

Таблица 14. Требования, предъявляемые к лабораторным образцам препарата убихинола

<b>Показатель</b>	<b>Метод</b>	<b>Норма</b>
Описание	визуальный контроль	Раствор от прозрачного до светло-желтого цвета, возможна небольшая опалесценция
Окраска	ГФ XIII ОФС 1.2.1.0006.15 «Степень окраски жидкостей»	Препарат не превышает окраску эталонного раствора $Y_6$ методом 2
Прозрачность и мутность	ГФ XIII ОФС 1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкости»	Жидкость является прозрачной, выдерживает требования ОФС: не отличается по прозрачности от воды и не превышает эталон мутности I
Механические включения	Визуальный контроль	Отсутствуют видимые механические включения
pH	ГФ XIII ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия»	Показатель pH находится в пределах 1,8-3,8
Подлинность	Спектрофотометрия  ВЭЖХ-ЭХ	Снятие спектра препарата при длине волны 200-350нм, max поглощения 290±2нм (прибор спектрофотометр) Получение хроматограммы препарата убихинола с соответствующим временем удерживания пика 7,8 минут
Количественное определение	ВЭЖХ-ЭХ	Концентрация препарата соответствует требованиям 100±2% [9,8; 10,2 мг/мл]

Все лабораторные образцы, полученные от ЗАО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия, соответствовали предъявленным требованиям и выдерживали представленные испытания.

### 3.2. Валидационные характеристики биоаналитической методики ВЭЖХ-ЭХ анализа $\text{CoQH}_2$

Для калибровки прибора, оценки пригодности и линейности отклика детектора готовили линейку стандартных спиртовых разведений субстанции- порошка убихинола (Капека, Япония, срок годности 11.2018г.) в диапазоне концентраций 10нг/мл–100мкг/мл. Растворы готовили согласно методике, описанной ранее. Время выхода убихинола составляет 7,8 минут.

По полученным результатам (табл. 15) строили график зависимости площади пика от концентрации убихинола (рис. 12).

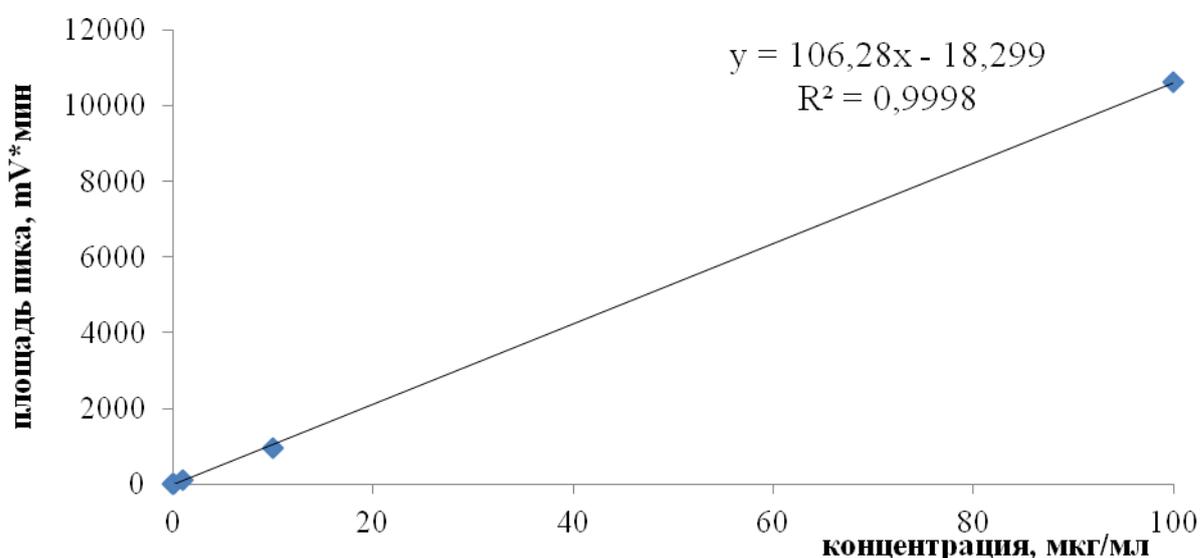


Рисунок 12. Калибровочный график, построенный для стандартных спиртовых разведений убихинола.

В данном диапазоне концентраций наблюдалась линейная зависимость, уравнение аппроксимации имеет вид  $y=106.28x-18.28$  с коэффициентом корреляции  $R^2=0.9998$ .

Таблица 15. Значения площади пика спиртовых разведений убихинола полученные с помощью методики ВЭЖХ-анализа

<b>Инжектируемая концентрация растворов, мкг/мл</b>	<b>Площадь пика, mV*мин</b>
0,01	16,05
0,1	21,3
1	122,4
10	937,5
100	10620

Валидация биоаналитической методики проведена в соответствии с требованиями стандартной операционной процедуры, разработанной на кафедре фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета, и с учетом требований и рекомендаций Guideline on validation of bioanalytical methods, Guidelines for Industry: Bioanalytical method validation, Руководства по доклиническому исследованию лекарственных средств (I том).

Для оценки пригодности хроматографической системы были рассчитаны показатели: число теоретических тарелок и фактор асимметрии пика. Система является пригодной для хроматографического анализа: число теоретических тарелок составляет 8434 тарелки ( $N \geq 2000$ ), фактор асимметрии пика убихинола – 0.805 ( $T \leq 2$ ).

Валидация проведена по основным валидационным характеристикам: селективность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения (ПКО).

Для оценки селективности проводили анализ 6-ти образцов холостой плазмы, полученной от крыс-самцов Wistar, без и с добавлением стандартных растворов убихинола с диапазоном концентрации в плазме 0,25-50 мкг/мл, растворы приготовлены согласно методике приготовления модельных

растворов убихинола в плазме крови крыс. На хроматограммах образцов холостой плазмы с добавлением восстановителя, натрия тетрагидробората, присутствовал пик, соответствующий эндогенному коэнзиму  $Q_{10}$  в плазме крови крыс; в образцах с добавлением стандартных растворов площадь пика убихинола увеличивалась пропорционально внесённому стандартному разведению, дополнительных пиков на хроматограммах не наблюдалось (рис. 13). Время выхода убихинола в плазме составляет 7,8 минут, что соответствует времени выхода убихинола в спиртовом разведении.

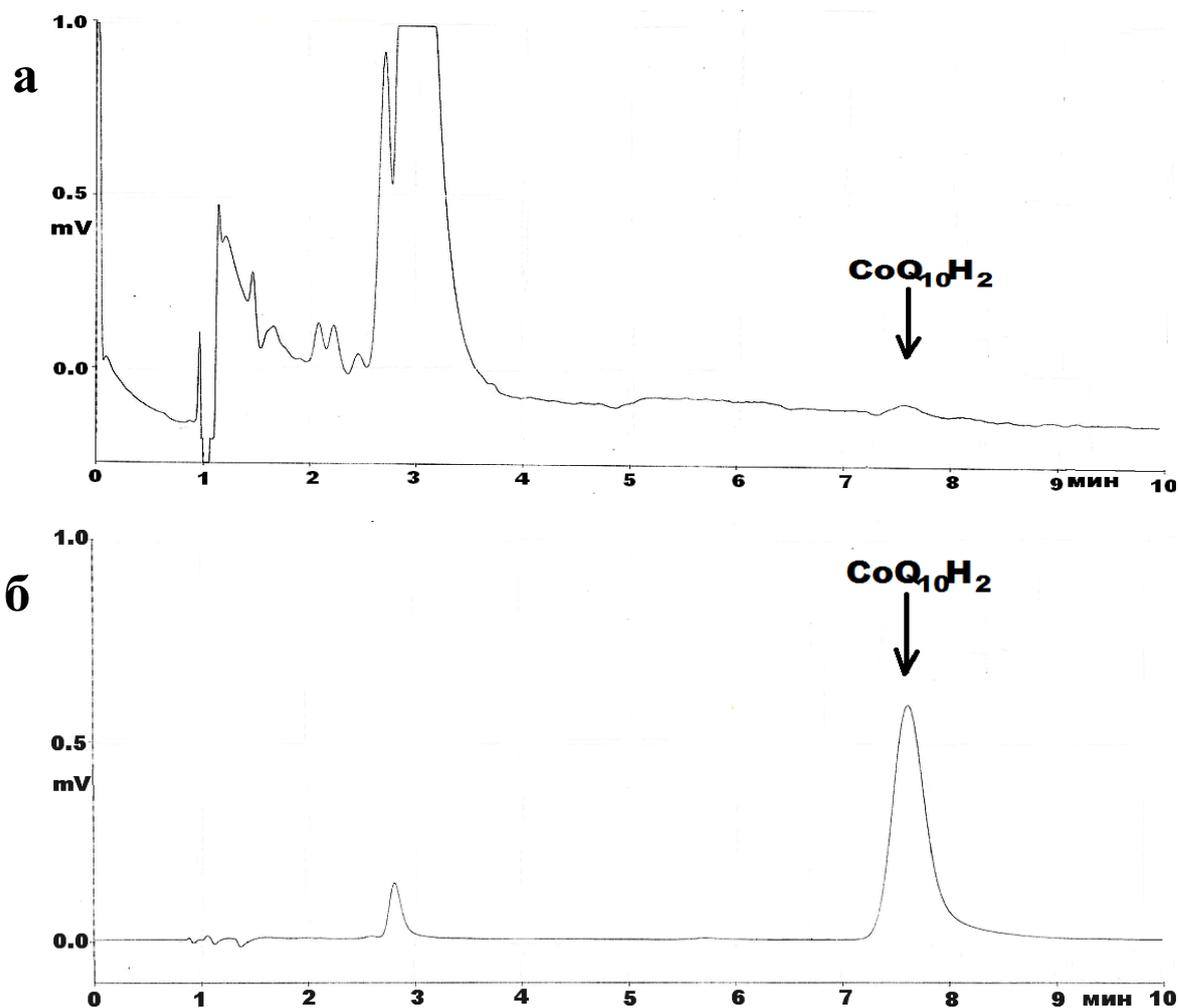


Рисунок 13. Хроматограмма образца холостой плазмы без (а; диапазон 100 нАм) и с добавкой (б; диапазон 1 мкАм) стандартного раствора убихинола (10 мкг в мл плазмы).

Определение линейности проводили на 6 образцах холостой плазмы с добавлением стандартных разведений субстанции до концентрации

убихинола в образцах 0,25; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 мкг/мл. По полученным значениям был построен калибровочный график зависимости площади пика от концентрации (рис. 14). Описывающее калибровочную прямую уравнение регрессии  $y=60,537x-9,843$  имеет коэффициент корреляции  $r^2=0,9996$ . Линейность зависимости площади пика от содержания анализируемого вещества, воспроизводимость и точность результатов определения, а также значение коэффициента корреляции более 0,995 свидетельствует о том, что диапазон от 0,25-50мкг/мл является аналитическим диапазоном данной методики.

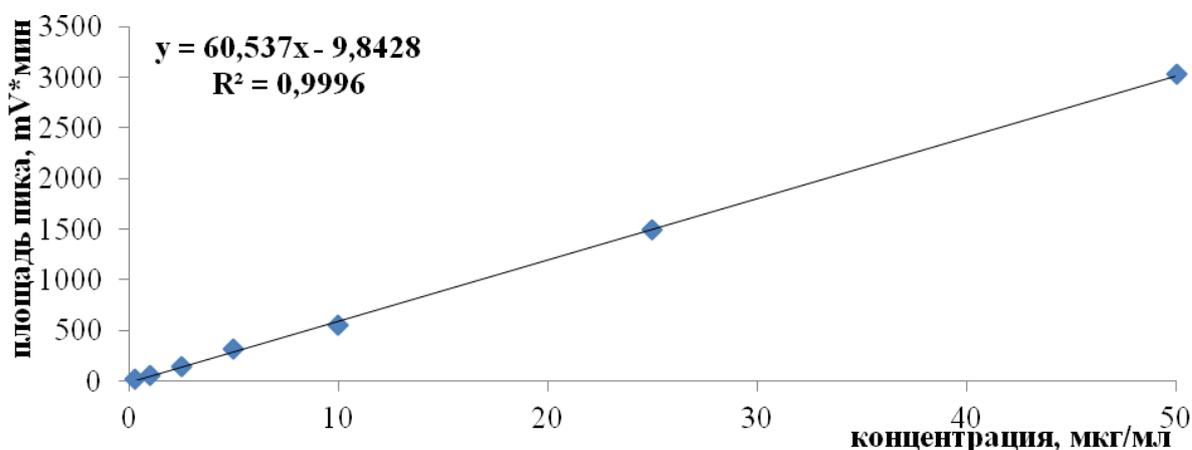


Рисунок 14. Калибровочный график зависимости площади пика убихинола от его концентрации в плазме крови крыс.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблице 16.

Таблица 16. Отклонения рассчитанных концентраций калибровочных растворов ( $C_{рас}$ ) от фактических значений ( $C_{фак.}$ )

<b><math>C_{фак.}</math> мкг/мл</b>	0,25	1	2,5	5	10	25	50
<b><math>C_{рас}</math> мкг/мл</b>	0,24	0,93	2,30	5,29	9,18	24,66	50,01
<b>% отклонения</b>	2,87	7,16	7,82	5,96	8,24	1,35	0,02
<b>Норма</b>	$\leq 20 \%$	$\leq 15\%$					

Правильность и прецизионность оценена на 3-х образцах чистой плазмы с добавлением стандартных растворов убихинола до получения концентрации в плазме 0,25; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 мкг/мл. Каждый полученный раствор анализировали трижды; исследование было проведено в течение одного дня (intra-day). Для полученных площадей пиков были рассчитаны величины стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD), приведенные в таблице 17.

Таблица 17. Значения правильности и прецизионности методики (intra-day)

№ образца	Площадь пика, мV*мин	Среднее значение	SD	RSD, %
0,25	14,85	14,7	0,54	3,68
	14,10			
	15,15			
1	55,35	56,20	0,90	1,61
	57,15			
	56,1			
2,5	138,60	139,5	1,56	1,12
	138,60			
	141,30			
5	321,00	320,00	8,30	2,59
	327,75			
	311,25			
10	582,00	555,50	23,92	4,31
	535,50			
	549,00			
25	1557	1493	88,5	5,92
	1392			
	1530			
50	3090	3028	57,3	1,89
	2977,5			
	3015			

Для оценки предела количественного определения (ПКО) в хроматографическую систему инжесктировали экстракт образца холостой плазмы, определяли диапазон шума базовой линии. После добавки раствора восстановителя ( $\text{NaBH}_4$ ), высота пика эндогенного убихинола в плазме крови

крыс превышала уровень шума в 10 раз, но данные значения не могли быть отвалидированы в связи с присутствием убихинола в холостых образцах плазмы. Таким образом, за ПКО была принята минимальная концентрация убихинола в плазме, для которой возможно определение препарата со значением относительного стандартного отклонения не более 20% в диапазоне линейной зависимости. ПКО данной методики составил 0,25 мкг/мл (рис. 15). Отличные характеристики результатов анализа плазмы с этой концентрацией убихинола (см. табл. 17) позволяют предполагать, что диапазон линейности в предлагаемых условиях анализа может быть расширен в область более низких концентраций.

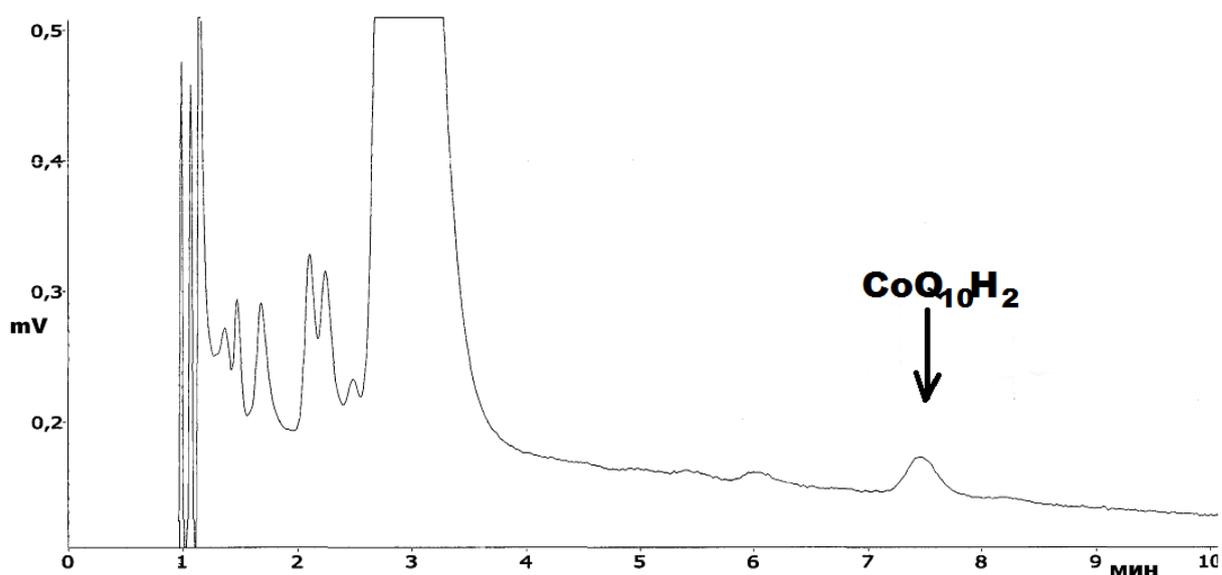


Рисунок 15. Хроматограмма плазмы крови с содержанием убихинола на уровне ПКО (диапазон 200 нАм).

Описанная методика количественного определения убихинола с помощью ВЭЖХ с электрохимическим детектированием была успешно применена в доклиническом фармакокинетическом исследовании инновационной лекарственной формы препарата на основе убихинола для внутривенного введения, разработанного ЗАО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия.

Для подтверждения пригодности использования данной биоаналитической методики в органах использовали упрощенный план валидации по показателям: селективность, линейность и ПКО.

Для оценки селективности и линейности проводили анализ 6-ти образцов холостой бланк-матрицы печени, полученных от крыс-самцов Wistar. На хроматограммах образцов холостой бланк-матрицы печени с добавлением восстановителя, натрия тетрагидробората, присутствовал пик, соответствующий эндогенному коэнзиму Q<sub>10</sub> (рис. 16).

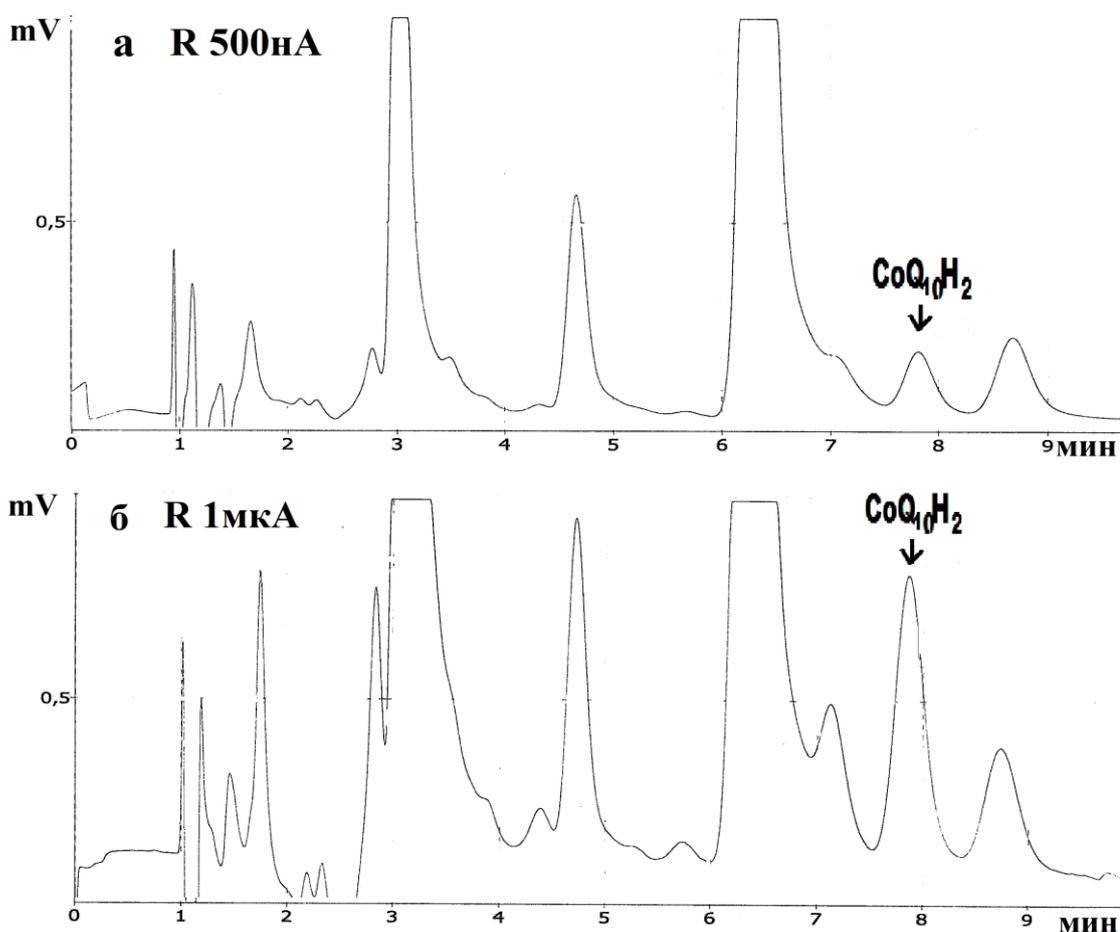


Рисунок 16. Хроматограмма образца холостой бланк-матрицы гомогената печени без (рис. 16а) и после восстановления NaBH<sub>4</sub> (рис. 16б).

Для оценки линейности использовали 6 образцов холостой бланк-матрицы без и с добавлением стандартных растворов убихинола в диапазоне концентрации 2,5-250мкг/г, растворы приготовлены согласно методике приготовления модельных растворов убихинола в гомогенате печени крыс,

описанной ранее. В образцах с добавлением стандартных растворов площадь пика убихинола увеличивалась пропорционально стандартному разведению, дополнительных пиков на хроматограммах не наблюдалось (рис.17).

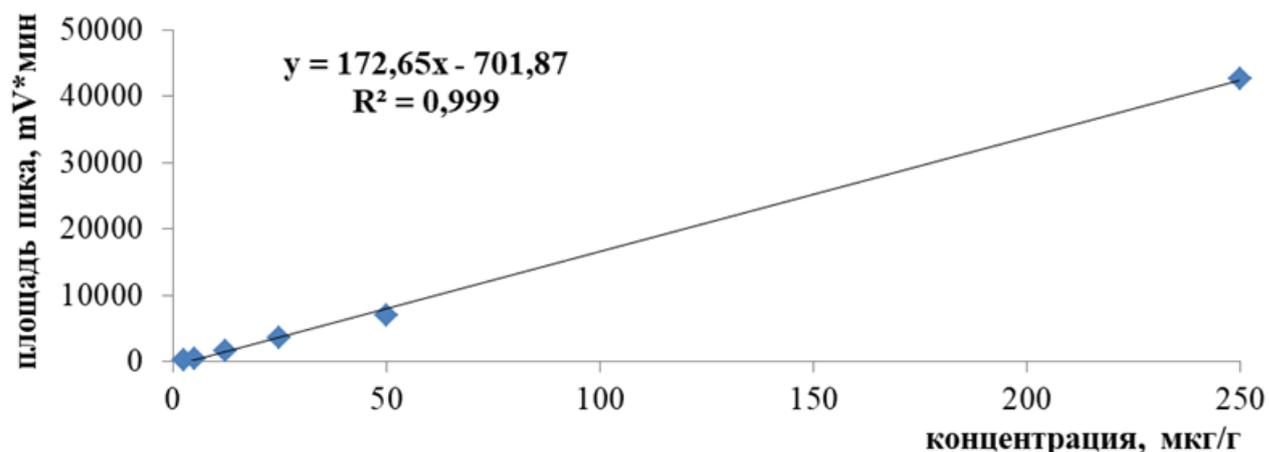


Рисунок 17. Калибровочный график зависимости площади пика убихинола от его концентрации в образцах бланк-матрицы печени.

Описывающее калибровочную прямую уравнение регрессии  $y=172,65x-701,87$  имеет коэффициент корреляции  $r^2=0.999 (>0.995)$ , что позволяет использовать разработанную методику для анализа образцов внутренних органов на содержание коэнзима  $Q_{10}$ .

За нижний предел количественного определения была принята минимальная концентрация убихинола, которая использовалась в ходе данного эксперимента – 2,5 мкг/г печени. Разработанная и валидированная методика оценки содержания коэнзима  $Q_{10}$  была использована для определения содержания аналита в образцах тканей и органов в дальнейших экспериментах.

### 3.3. Фармакокинетика препарата убихинола при однократном внутривенном введении в 3-х различных дозах (5, 10 и 20 мг/кг)

В проведении доклинических исследований инновационной формы лекарственного препарата основную роль играет изучение его фармакокинетики. Изучение фармакокинетических характеристик необходимо для установления зависимости концентрация-время и подбора рационального режима дозирования препарата.

Внутривенное введение является наиболее оптимальным способом введения веществ с низкой биодоступностью *per os*, к которым относится убихинол. Внутривенное введение обладает 100% биодоступностью и практически мгновенно повышает концентрацию действующего вещества в крови, также данный способ обеспечивает большую точность дозирования и быстроту действия.

Исследования, проведенные ранее, показали, что внутривенное введение окисленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> (3% раствор убихинона для приема внутрь, препарат «Кудесан») обладает выраженным кардиопротекторным эффектом у крыс [48–50]. Наблюдалась обратная зависимость содержания коэнзима Q<sub>10</sub> в миокарде и размера зоны повреждения [3]. Быстрое повышение убихинона в тканях и органах позволяет использовать препарат в ургентных ситуациях, однако инъекционные лекарственные препараты на основе CoQ<sub>10</sub> отсутствуют.

В живых системах коэнзим Q<sub>10</sub> содержится в окисленной (CoQ<sub>10</sub>) и восстановленной (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) формах [106]. Антиоксидантным эффектом обладает восстановленная форма CoQ<sub>10</sub>. В ЗАО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Россия разработана инъекционная форма восстановленного коэнзима Q<sub>10</sub> (1% водный раствор убихинола) для внутривенного введения, для которой необходимо изучение фармакокинетики.

С помощью ВЭЖХ-анализа для каждого образца плазмы животного проводили количественную оценку содержания убихинола (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) и

общего пула CoQ<sub>10</sub> (TCoQ<sub>10</sub>) после восстановления [5]. Количественное содержание убихинона (CoQ<sub>10</sub>) рассчитывали по разнице:

$$\text{CoQ}_{10} = \text{TCoQ}_{10} - \text{CoQ}_{10}\text{H}_2$$

Для оценки содержания коэнзима CoQ<sub>10</sub> использовали калибровочные графики зависимости площади пика от концентрации субстанции убихинола в образцах плазмы крови крыс (рис.14).

В таблице 18 (а, б и в) представлены зависимости содержания убихинола и общего пула коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме крови крыс в каждую временную точку после внутривенного введения препарата в дозах 5, 10 и 20 мкг/кг соответственно.

Таблица 18. Содержание убихинола и общего пула коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме крови крыс после внутривенного введения в дозах 5, 10 и 20 мг/кг

5мг/кг	CoQ <sub>10</sub> -H <sub>2</sub> (мкг/кг)									CoQ <sub>10</sub> -H <sub>2</sub> (мкг/кг)								
	До восстановления									После восстановления								
часы № опыта	0,25	0,5	1	2	4	8	24	32	48	0,25	0,5	1	2	4	8	24	32	48
1	92.05	77.3	78.86	53.51	46.81	28.0	2.22	0.49	0.12	108.68	83.69	81.93	55.75	51.49	26.13	2.94	0.69	0.29
2	87.27	83.84	59.84	60.16	44.88	18.49	1.42	0.29	0.1	92.16	90.03	69.56	68.83	54.7	25.2	1.5	0.84	0.44
3	92.73	82.6	75.01	52.16	28.52	12.21	0.78	0.17	0.09	92.54	89.94	85.42	57.4	37.78	15.97	2.15	2.15	0.16
4	76.62	56.1	68.88	66.6	44.78	23.95	3.37	0.9	0.05	102.54	94.23	84.82	71.0	55.73	33.86	5.9	2.16	0.34
5	51.84	48.1	44.78	38.86	21.56	8.99	0.23	0.12	0.02	79.23	68.64	57.65	46.51	28.69	12.74	1.33	0.9	0.34
6	87.53	82.08	71.27	57.14	44.52	25.14	1.84	0.37	0.04	95.06	87.27	74.96	67.58	45.87	28.05	2.61	0.95	0.46
<b>Средн ± станд. откл.</b>	<b>81.34 ± 15,56</b>	<b>71.67 ± 15,53</b>	<b>66.41 ± 12,40</b>	<b>54.74 ± 9,34</b>	<b>38.51 ± 10,70</b>	<b>19.46 ± 7,60</b>	<b>1.64 ± 1,11</b>	<b>0.39 ± 0,28</b>	<b>0.07 ± 0,04</b>	<b>95.04 ± 10,07</b>	<b>85.63 ± 9,02</b>	<b>75.72 ± 10,78</b>	<b>61.18 ± 9,54</b>	<b>45.71 ± 10,65</b>	<b>23.66 ± 7,88</b>	<b>2.75 ± 1,68</b>	<b>1.28 ± 0,68</b>	<b>0.34 ± 0,11</b>

Продолжение таблицы 18

<b>10мг/кг</b>	<u>CoQ<sub>10</sub>-H<sub>2</sub> (мкг/кг)</u> До восстановления									<u>CoQ<sub>10</sub>-H<sub>2</sub> (мкг/кг)</u> После восстановления								
	Часы № опыта	0,25	0,5	1	2	4	8	24	32	48	0,25	0,5	1	2	4	8	24	32
1	231.27	161.65	168.14	148.67	121.53	73.75	5.81	9.79	1.29	238.89	185.2	178.71	149.21	130.92	82.84	26.72	10.5	2.07
2	247.79	213.86	172.55	162.79	126.84	96.17	17.55	8.47	1.73	249.25	225.65	215.92	186.42	144.53	110.31	27.13	10.79	3.15
3	229.5	190.53	167.55	129.79	51.33	69.03	9.56	5.07	1.45	244.76	214.67	219.98	165.11	123.22	96.09	16.91	12.19	1.96
4	104.42	69.62	78.47	54.28	56.64	52.51	0.59	4.1	0.1	156.29	137.41	119.12	106.73	105.55	81.37	48.67	8.86	2.07
5	235.99	227.14	210.62	147.49	139.23	106.49	34.57	15.43	1.64	237.72	234.18	230.64	174.59	147.45	112.64	38.31	15.77	2.13
6	201.56	178.18	135.58	110.13	94.55	85.45	16.6	9.06	0.53	206.54	200.83	157.19	119.27	105.76	103.69	19.37	12.8	1.76
<u>Средн.</u> <u>±</u>	<b>208.42</b>	<b>173.50</b>	<b>155.54</b>	<b>125.53</b>	<b>98.35</b>	<b>80.57</b>	<b>15.78</b>	<b>8.65</b>	<b>1.12</b>	<b>222.24</b>	<b>199.66</b>	<b>186.93</b>	<b>150.22</b>	<b>126.24</b>	<b>97.82</b>	<b>29.52</b>	<b>11.82</b>	<b>2.19</b>
<u>станд.</u> <u>откл.</u>	<b>± 53,18</b>	<b>± 56,13</b>	<b>± 44,67</b>	<b>± 39,35</b>	<b>± 37,38</b>	<b>± 19,52</b>	<b>± 11,19</b>	<b>± 4,02</b>	<b>± 0,66</b>	<b>± 35,64</b>	<b>± 35,15</b>	<b>± 43,34</b>	<b>± 31,55</b>	<b>± 18,24</b>	<b>± 13,48</b>	<b>± 12,00</b>	<b>± 2,38</b>	<b>± 0,49</b>

Продолжение таблицы 18

20мг/кг	<u>CoQ<sub>10</sub>-H<sub>2</sub></u> (мкг/кг) До восстановления									<u>CoQ<sub>10</sub>-H<sub>2</sub></u> (мкг/кг) После восстановления									
	Часы	0,25	0,5	1	2	4	8	24	32	48	0,25	0,5	1	2	4	8	24	32	48
№ опыта																			
1	410.03	399.71	330.38	284.66	268.44	218.29	81.56	44.10	5.78	476.13	408.28	352.24	306.51	291.77	251.94	81.59	44.86	6.9	
2	317.85	300.88	283.92	253.69	250.74	150.44	84.07	37.05	16.14	327.38	320.01	295.67	264.7	263.96	156.29	90.22	42.78	18.53	
3	509.59	481.56	432.15	395.28	294.25	297.2	66.90	43.42	10.97	526.41	495.44	448.24	423.9	306.64	298.53	83.16	45.76	12.9	
4	379.22	356.88	292.47	175.06	248.31	184.94	76.88	41.61	7.82	397.2	383.18	316.1	314.61	284.48	211.23	97.46	47.59	9.62	
5	407.27	406.75	373.51	281.04	233.25	198.96	70.13	28.05	7.22	456.86	422.06	374.78	315.56	262.58	205.43	76.6	30.58	8.63	
6	538.18	333.51	324.16	322.60	244.16	206.23	55.84	30.91	7.09	538.02	374.9	344.78	339.58	258.54	206.59	58.41	33.76	8.41	
<u>Средн</u>	<b>427.02</b>	<b>379.88</b>	<b>339.43</b>	<b>285.39</b>	<b>256.53</b>	<b>209.34</b>	<b>72.56</b>	<b>37.52</b>	<b>9.17</b>	<b>453.67</b>	<b>400.65</b>	<b>355.30</b>	<b>327.48</b>	<b>278.00</b>	<b>221.67</b>	<b>81.24</b>	<b>40.89</b>	<b>10.83</b>	
<u>±</u>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
<u>станд</u>	<b>82.53</b>	<b>63.83</b>	<b>55.43</b>	<b>73.02</b>	<b>21.73</b>	<b>48.95</b>	<b>10.48</b>	<b>6.76</b>	<b>3.83</b>	<b>80.07</b>	<b>58.26</b>	<b>53.35</b>	<b>53.16</b>	<b>19.32</b>	<b>48.37</b>	<b>13.34</b>	<b>7.00</b>	<b>4.27</b>	
<u>откл.</u>																			

На основании полученных результатов построены кинетические кривые зависимости «концентрация  $\text{CoQ}_{10}$ –время» и « $\ln$  концентрации  $\text{CoQ}_{10}$ –время» – рисунок 18, данные представлены по средним величинам для каждой экспериментальной группы животных.

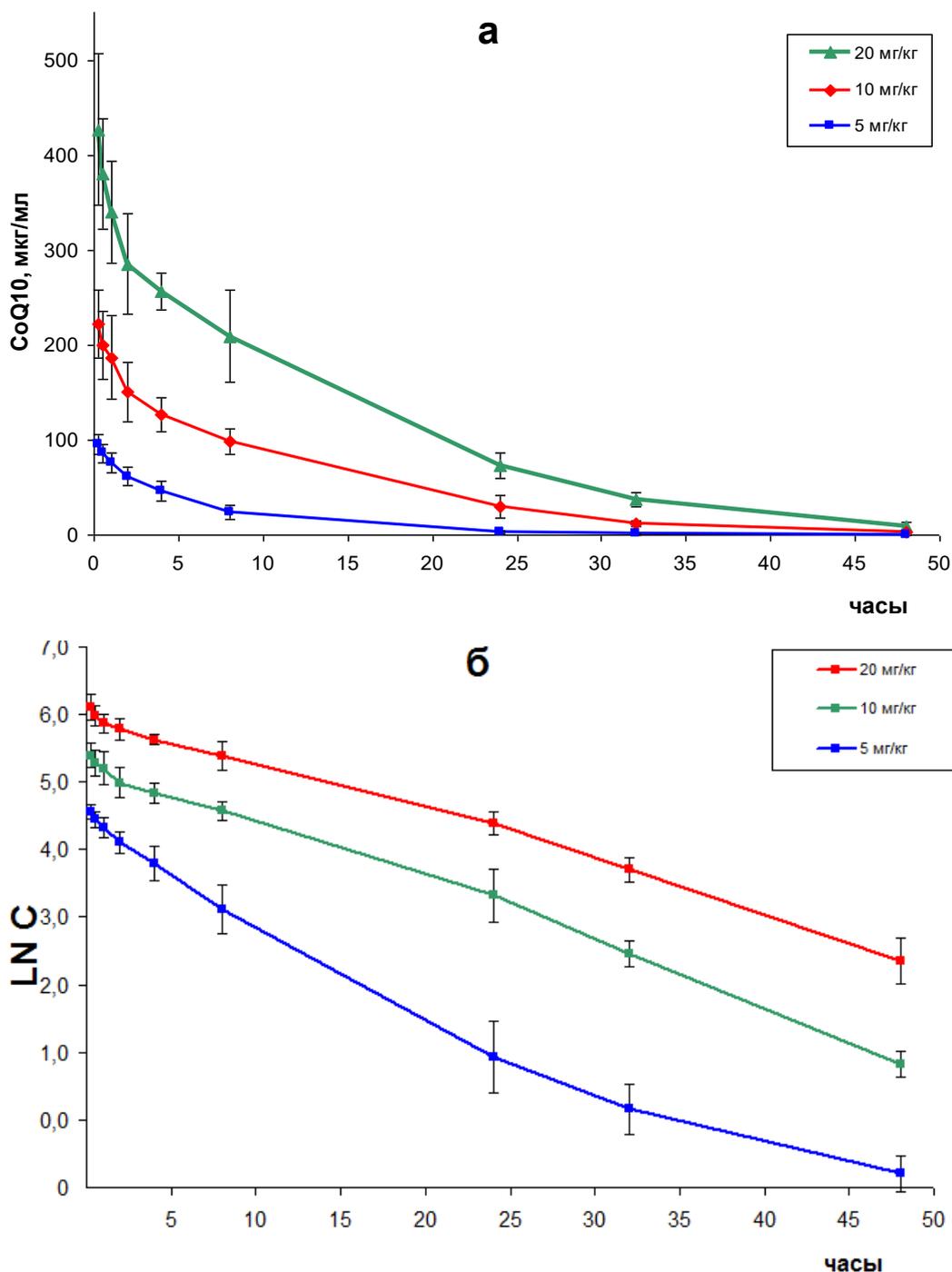


Рисунок 18. Фармакокинетические кривые общего пула  $\text{CoQ}_{10}$  в плазме крови крыс после внутривенного введения препарата  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в трех дозах (5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг): а – в координатах «концентрация  $\text{CoQ}_{10}$ – время», б – в координатах « $\ln$  концентрации  $\text{CoQ}_{10}$  – время».

Данные, представленные в полулогарифмической шкале, свидетельствуют о биэкспоненциальном характере кривых для каждой из доз препарата, что согласуется с результатами, полученными ранее [5], и описывается уравнением:  $C_t = A * e^{-\alpha t} + B * e^{-\beta t}$  (табл. 19). Первая, короткая фаза, по нашим предположениям, соответствует распределению препарата в сильно васкуляризированные органы. Ранее нами показано, что уже в первые 30 минут после внутривенного введения препарата определяется его повышенное содержание в органах-мишенях: миокарде, мозге, а также в печени и др.. Вторая фаза, продолжительная, по предыдущим данным может длиться до 4-х суток и связана в основном с процессами дальнейшего распределения коэнзима CoQ<sub>10</sub> в органы и ткани, что подтверждается ниже данными по распределению [4].

Таблица 19. Уравнения, описывающие фармакокинетические кривые убихинола в дозах 5, 10 и 20 мг/кг

Доза	Уравнение
5 мг/кг	$C_t = 41,81e^{-0,3185t} + 54,58e^{-0,1564t}$
10 мг/кг	$C_t = 120,15e^{-0,2263t} + 102,57e^{-1,8269t}$
20 мг/кг	$C_t = 338,74e^{-0,9690t} + 1134,99e^{-5,4195t}$

Время полувыведения препарата для каждой из трех доз составило 7,8 – 9,1 часов, что соответствует данным, полученным ранее в другом исследовании, посвященном фармакокинетическому изучению убидекаренона при внутривенном введении [4]. В исследовании фармакокинетики убихинона в дозе 10 мг/кг Харитоновой Е.В. [8] было выявлено время полувыведения  $8,3 \pm 1,5$  ч, что также согласуется с результатом, полученным нами. В исследовании Nishimura A. [97] для диапазона доз убихинона 0,025-2,5 мг/кг значения  $t_{1/2}$  не зависели от дозы и находились в диапазоне 7,3-8,1 ч.

Клиренс – скорость очищения биологических жидкостей или тканей организма от вещества в результате его биотрансформации, перераспределения, а также выведения из организма, рассчитывается как отношение дозы препарата к площади под кривой «концентрация-время»:  $Cl = D/AUC$ . В интервале использованных нами доз выявлено, что с увеличением дозы препарата снижается клиренс. Предположительно это связано со снижением скорости экскреции убихинола, происходящей в основном за счет экскреции в желчь [18]. В интервале более низких в/в доз убихинона в работе Nishimura A. [97], о которой мы говорили ранее, демонстрируется обратный эффект: показано, что увеличение дозы с 0,025 до 2,5 мг/кг приводит к росту общего клиренса. По полученным нами результатам и литературным данным построена кривая зависимости величины клиренса CoQ10 от дозы (рис. 19).

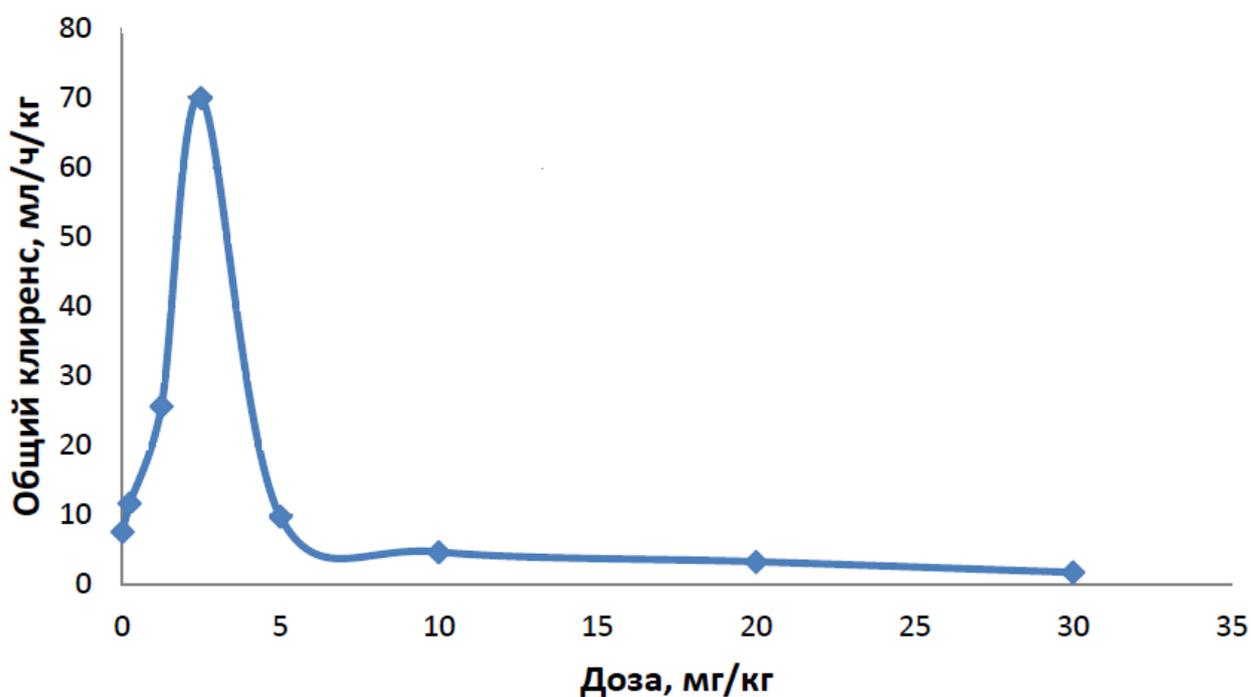


Рисунок 19. Кривая зависимости общего клиренса коэнзима Q<sub>10</sub> от дозы при внутривенном введении [4, 97].

Стоит отметить, что значение параметра  $Cl_t$  при дозе 2,5 мг/кг почти в 7 раз превышает данный показатель при дозе 5 мг/кг. Резкое снижение

клиренса при близких дозах свидетельствует о возможном насыщении механизмов экскреции, обуславливающим падение клиренса при последующем повышении дозы. Что касается диапазона доз 5-20 мг/кг, то наше исследование демонстрирует тенденцию к снижению клиренса и согласуется с результатами Калениковой Е.И. [4]: дальнейшее повышение дозы до 30 мг/кг приводит к дальнейшему снижению общего клиренса. Причем темпы этого снижения замедляются, что также подтверждает предположение о насыщаемой экскреции в желчь.

Полученные фармакокинетические параметры убихинола демонстрируют схожесть свойств убихинола и убихинона, т.е. аналогичный биэкспоненциальный характер зависимости «концентрация-время», сопоставимое время полувыведения и значения клиренса.

После внутривенного введения восстановленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> – убихинола в организме происходило его частичное окисление и превращение в убихинон (рис. 20). Линии тренда, проведенные для каждой дозы, демонстрируют, что с увеличением дозы интенсивность окисления препарата падает. Проведен статистический анализ с использованием критерия Джонхиера с нулевой гипотезой о полной однородности трех выборок, соответствующих трем дозам в каждой временной точке, и альтернативной гипотезой об упорядоченности результатов по возрастанию фактора (в данном случае изменение дозы препарата). Результаты наглядно демонстрируют, что начальные участки кинетических кривых (4 часа) совпадают, а затем статистически значимо расходятся ( $p < 0,05$ ) до конца периода наблюдения. Таким образом, отвергая нулевую гипотезу на конечном участке фармакокинетических кривых, следует сделать вывод о том, что с увеличением дозы препарата доля убихинола, подвергнутого окислению, снижается.

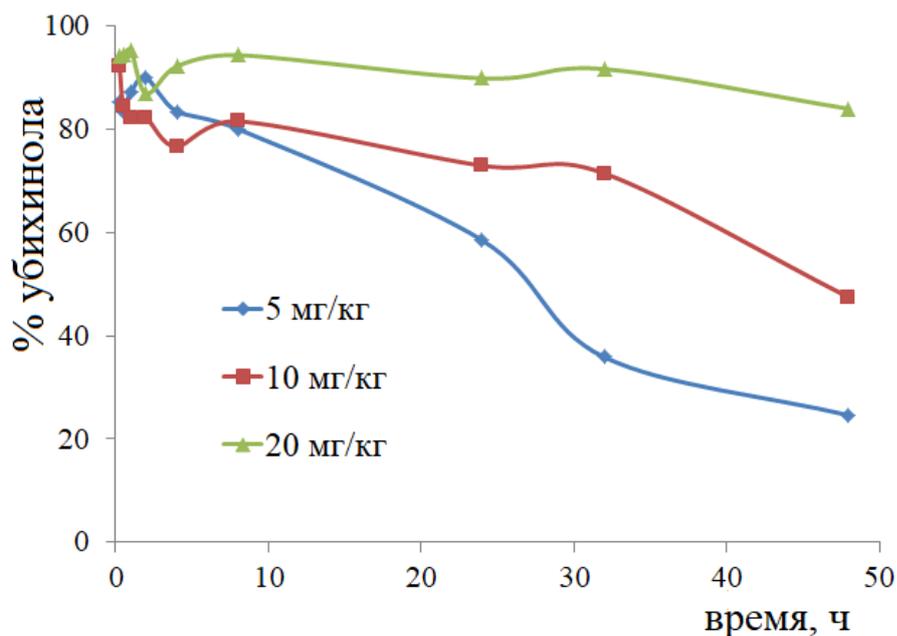


Рисунок 20. Окисление препарата убихинола в плазме крови крыс на протяжении 48 часов после внутривенного введения в трех дозах (среднегрупповые значения).

Показано, что у человека доля окисленной формы коэнзима  $Q_{10}$  в плазме менее 10% [10], в то время как для крыс приводятся другие данные – 34,7-46% [18]. Как видно из рисунка 19, доля окисленной формы убихинона увеличивалась во времени: процент окисленной формы на временные точки 0,25 и 48 часов при дозе 5 мг/кг составил 14,5% и 84,9%, при дозе 10мг/кг 6,2% и 50,4%, при дозе 20мг/кг 5,9% и 16,7%. Через 24 часа после внутривенного введения в дозе 5 и 10мг/кг доля убихинона была менее 50%, в дозе 20мг/кг около 10%. Снижение доли окисленной формы препарата с увеличением дозы может быть связано с насыщением эндогенных окислительно-восстановительных процессов.

Ранее были показаны результаты, подтверждающие включение коэнзима  $Q_{10}$  в эндогенные окислительно-восстановительные процессы. Через 48 часов после внутривенного введения препарата, содержащего убихинон, в дозе 30мг/кг доля восстановленной формы была более 90%, а окисленной формы – менее 10% [52]. По данным этих двух исследований

прослеживается тенденция, что с увеличением дозы доля убихинола, подвергшегося окислению, снижается.

Оценка гипотезы линейности является важным этапом фармакологического анализа, это позволяет предсказать изменение концентрации препарата в организме в ответ на изменение дозы вещества. Значимые различия в значениях общего клиренса и времени полувыведения (таблица 20), рассчитанных для каждой из доз препарата, свидетельствует о нелинейности кинетики в изучаемом диапазоне доз.

Таблица 20. Фармакокинетические параметры  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  после его введения в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг

Параметры Доза	$\text{AUC}_{0 \rightarrow 48\text{ч}}$ (мг*ч/мл)	$\text{Cl}_T$ (мл/ч)	$T_{1/2}$ (ч)
5 мг/кг	0,678	2,58	7,66
	0,680	2,56	13,98
	0,534	3,19	6,10
	0,692	2,59	5,76
	0,851	2,18	6,00
	0,417	4,36	12,07
	<b>0,642±0,061</b>	<b>2,91±0,32</b>	<b>8.60±1.45</b>
10 мг/кг	2,742	1,28	8,18
	2,300	1,58	7,43
	2,233	1,89	8,32
	2,609	1,53	7,73
	2,877	1,32	7,53
	2,225	1,62	7,64
<b>2,498±0,115<sup>#</sup></b>	<b>1,54±0,09<sup>#</sup></b>	<b>7,81±0,15</b>	
20 мг/кг	5,314	1,48	12,64
	7,076	1,12	8,86
	6,083	1,32	6,61
	5,387	1,31	8,60
	5,932	1,19	8,92
	5,219	1,33	8,71
	<b>5,835±0,287<sup>*#</sup></b>	<b>1,29±0,05<sup>#&amp;</sup></b>	<b>9,05±0,80<sup>&amp;</sup></b>

# -  $p < 0,01$ , отличие от дозы 5 мг/кг;

\* -  $p < 0,01$ , & -  $p < 0,05$ , отличие от дозы 10 мг/кг.

Анализ зависимости площади под кинетической кривой (AUC) и дозами препаратов (рис. 20) характеризуется уравнением регрессии  $y=0,344x-1,026$ , коэффициент корреляции  $r^2=0,9997$  ( $p<0,01$ ), что дает возможность предположить линейную зависимость (рис. 21).

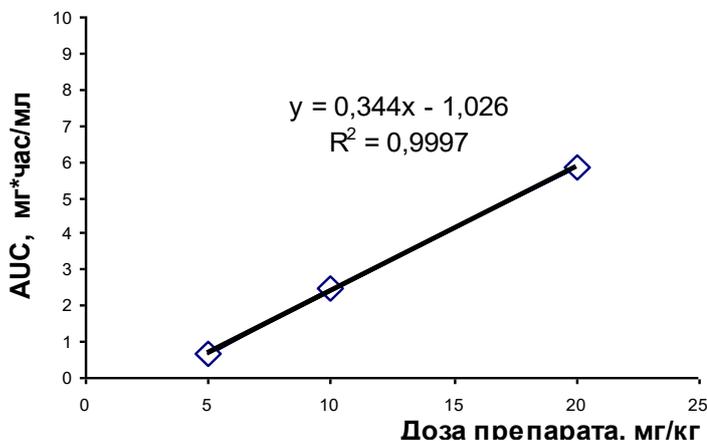


Рисунок 21. Линейная зависимость между площадью под кривыми «концентрация-время» ( $AUC_{0\rightarrow 48ч}$ ) и дозами препарата.

Для дополнительной проверки гипотезы линейности проводили нормирование кривых «концентрация-время» относительно дозы препарата: в случае их совмещения гипотеза линейности принимается. Нормирование проводили делением концентрации вещества в каждой временной точке в дозе 20мг\кг на 2 и 4, по полученным результатам были построены нормированные кривые для доз 10 и 5мг/кг соответственно (рис. 22).

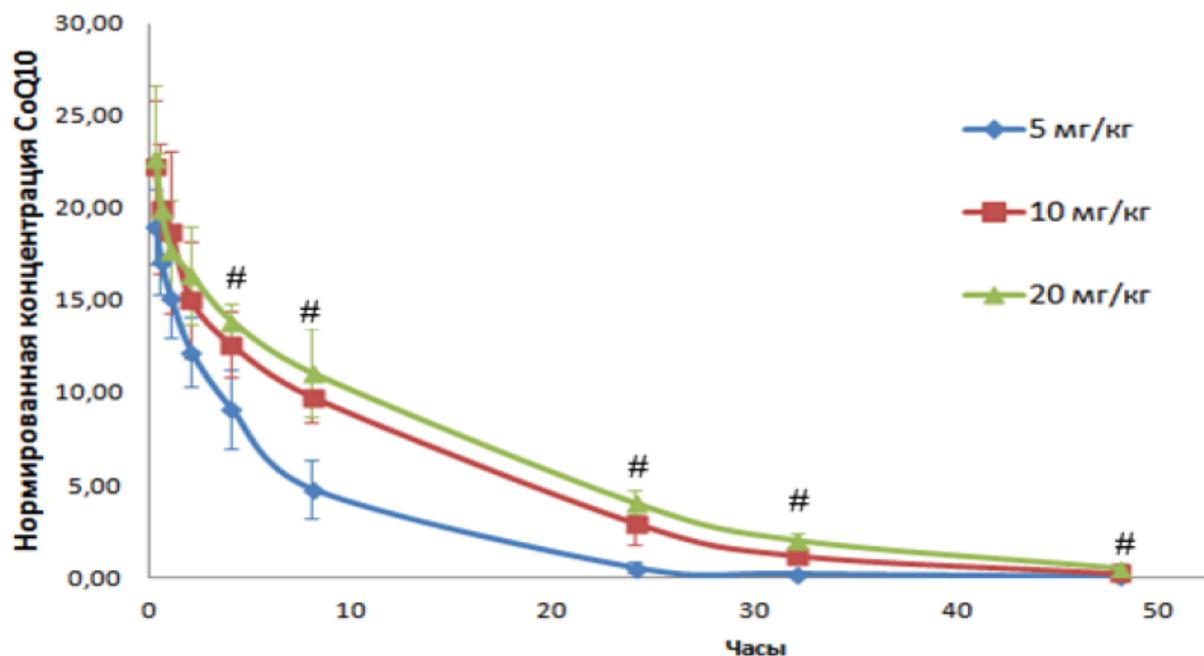


Рисунок 22. Нормированные фармакокинетические кривые препарата коэнзима Q<sub>10</sub> для доз 5, 10 и 20 мг/кг.

# - достоверность различий между тремя группами  $p < 0,01$  (критерий Краскела-Уоллиса)

Сравнение фактической и нормированной кривой в дозе 5 мг/кг показывает, что на начальных участках кривые совпадают, а через час после внутривенного введения препарата они значительно расходятся. Для дозы 10 мг/кг расхождение фактической и нормированной кривой имеет значимые различия ( $p < 0,001$ ) в двух временных точках: 32 и 48 часов.

Результаты изучения зависимости площади под кривой от дозы свидетельствуют о линейности препарата в изучаемом диапазоне доз, однако имеются различия в фармакокинетических параметрах, а нормирование кинетических кривых относительно дозы не привело к их совмещению. Таким образом, можно сделать вывод о нелинейной фармакокинетике препарата в изучаемом диапазоне доз.

### 3.4. Распределение CoQ10 по органам крысы после внутривенного введения препарата убихинола в дозе 10 мг/кг

Данные, полученные при изучении фармакокинетики препарата в плазме и органах крыс при однократном внутривенном введении в дозе 10 мг/кг, представлены в таблицах 21-26 и на рисунках 23, 25-29. Для каждой ткани в каждой временной точке рассчитана доля убихинола в общем содержании CoQ<sub>10</sub>.

Таблица 21. Уровни CoQ<sub>10</sub> (мкг/мл, до и после восстановления) в плазме крови крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub>	CoQ <sub>10</sub> (общее содержание)	Доля CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> в общем содержании CoQ <sub>10</sub> (%)	
0,25	166,75 ± 45,22	196,86 ± 12,09	84,7	
0,5	182,15 ± 36,32	210,36 ± 9,61	86,6	
1	156,54 ± 30,45	186,11 ± 9,6	84,1	
2	137,95 ± 9,36	162,26 ± 8,91	85,0	
4	135,78 ± 28,13	149,90 ± 7,24	90,6	
8	70,20 ± 48,08	100,31 ± 5,23	70,0	
24	15,12 ± 7,16	23,58 ± 1,02	64,1	
32	4,54 ± 3,52	6,87 ± 0,65	66,1	
48	1,31 ± 1,03	2,68 ± 0,56	48,8	
			M ± m	78,9 ± 10,39

\*Данные представлены в виде M ± m

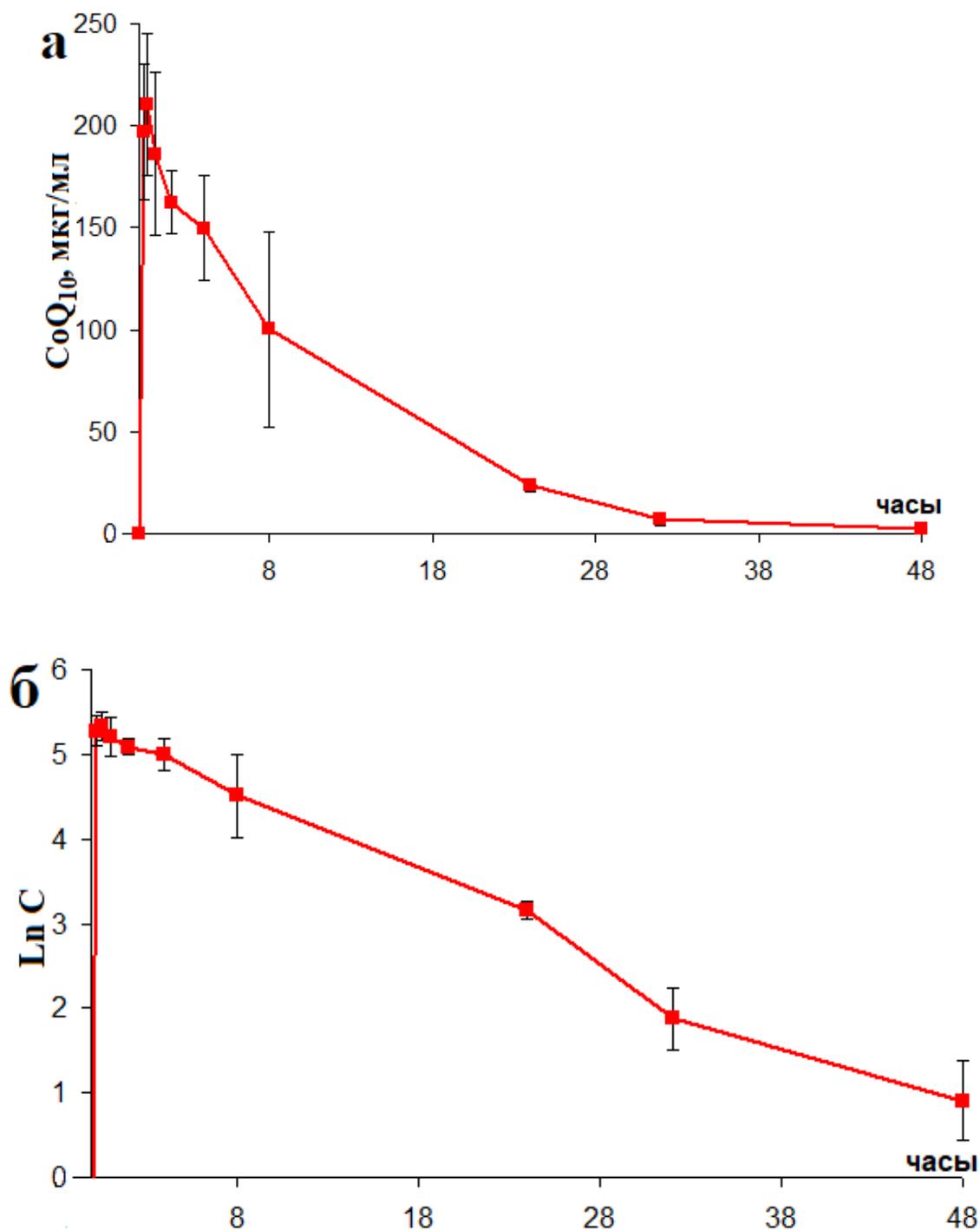


Рисунок 23. Кинетические кривые CoQ<sub>10</sub> в плазме крови крыс после в/в введения CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> в дозе 10 мг/кг: а – в координатах «концентрация – время», б – в координатах «ln концентрации – время».

Сравнение абсолютных концентраций коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме после внутривенного введения убихинона [5] и убихинола позволяет сделать вывод о различии антиоксидантного потенциала данных веществ. В исследовании

Калениковой Е.И. [52] изучен окислительно-восстановительный статус коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме после внутривенной инъекции убихинона в дозе 10 мг/кг. На рисунке 24 показано, что после инъекции препарата на протяжении первых суток выше концентрация убихинола, а в течении следующих динамика изменения концентрации различается не существенно при чуть большей скорости выведения убихинола. Площади под кинетическими кривыми «концентрация-время» в 48-часовом эксперименте для убихинона [52] и убихинола сопоставимы: 2620 мкг\*ч/мл и 2498 мкг\*ч/мл.

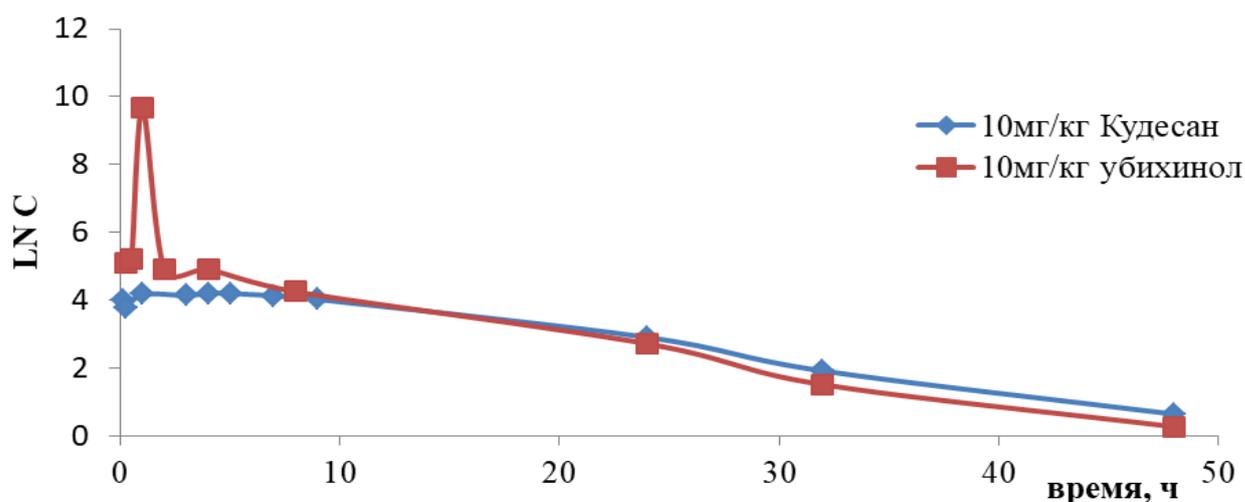


Рисунок 24. Кинетические кривые CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> в плазме крови крыс после в/в введения препарата Кудесан<sup>®</sup> и препарата убихинола в дозе 10 мг/кг, в координатах «ln концентрации-время» [52].

Антиоксидантное действие CoQ<sub>10</sub> проявляет его восстановленная форма, что связано с прямым взаимодействием убихинола с радикалами, регенерацией токоферола и аскорбата [27].

Существенное количество CoQ<sub>10</sub> аккумулируется в печени и может служить долговременным депо для пополнения плазменных уровней [4, 18].

Таблица 22. Содержание убихинола и общего CoQ10 в печени крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата убихинола в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> мкг/г	CoQ <sub>10</sub> (общее содержание) мкг/г	Доля CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> в общем содержании CoQ <sub>10</sub> , %	
0	5,04 ± 2,35	8,72 ± 3,87	57,8	
0,25	9,71 ± 5,71	32,05 ± 15,86 **	30,3	
0,5	16,58 ± 6,51	37,43 ± 25,85 **	44,3	
1	19,34 ± 18,18	43,57 ± 25,92 **	44,4	
2	32,85 ± 20,01	45,84 ± 26,76 **	71,7	
4	39,02 ± 20,09	56,88 ± 27,25 **	68,6	
8	27,77 ± 14,74	62,13 ± 14,85 **	44,7	
24	54,66 ± 19,43	99,89 ± 37,52 **	54,7	
32	45,44 ± 22,54	99,53 ± 9,37 **	45,7	
48	56,46 ± 35,48	117,53 ± 23,65 **	48,0	
			M ± m	51.0 ± 12.43

\*Данные представлены в виде M ± m;

\*\* - p<0,01 vs точки 0

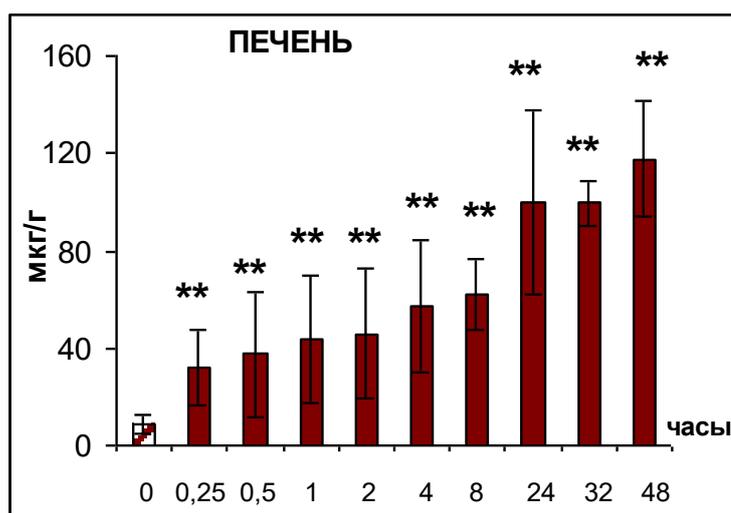


Рисунок 25. Уровни CoQ<sub>10</sub> в печени крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг.

\*\* - p<0,01 vs точки 0

Таблица 23. Содержание убихинола и общего CoQ10 в почках крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>1</sub> H <sub>2</sub> мкг/г	CoQ <sub>10</sub> (общее содержание) мкг/г	Доля CoQ <sub>10</sub> -H <sub>2</sub> в общем содержании CoQ <sub>10</sub> , %
0	6,65 ± 2,05	18,51 ± 2,61	35,9
0,25	8,65 ± 5,09	31,35 ± 14,77 *	27,6
0,5	12,32 ± 2,88	35,49 ± 12,78 **	34,7
1	9,19 ± 3,35	32,61 ± 13,04 **	28,2
2	9,65 ± 4,00	36,35 ± 12,37 **	26,6
4	9,63 ± 8,20	29,03 ± 10,84 **	33,2
8	6,62 ± 3,69	26,43 ± 5,29 *	25,1
24	7,64 ± 3,96	28,54 ± 9,60 **	26,8
32	9,58 ± 4,29	28,01 ± 9,03 *	34,2
48	8,88 ± 4,52	25,65 ± 10,19 *	34,6
			M ± m 30,7 ± 4,18

\*Данные представлены в виде M ± m;

\*- p<0,05 vs точки 0; \*\* - p<0,01 vs точки 0

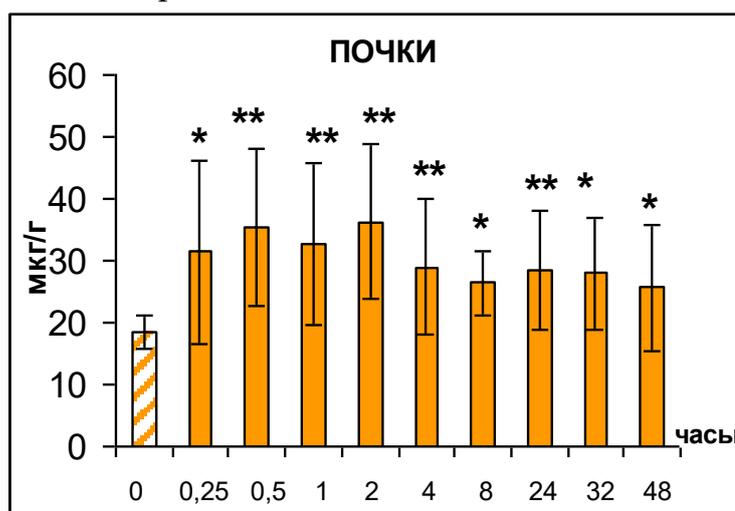


Рисунок 26. Уровни CoQ<sub>10</sub> в почках крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг.

\* - p<0,05 vs точки 0; \*\* - p<0,01 vs точки 0

Таблица 24. Содержание убихинола и общего CoQ10 в ЛЖ сердца крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> мкг/г	CoQ <sub>10</sub> (общее содержание) мкг/г	Доля CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> в общем содержании CoQ <sub>10</sub> , %	
0	2,17± 0,93	9,79 ± 1,94	22,2	
0,25	4,55 ± 5,40	14,43 ± 2,30 **	31,5	
0,5	5,41± 6,30	17,54 ± 7,24 **	30,8	
1	2,59± 2,30	15,00 ± 3,20 *	17,2	
2	3,85± 3,47	15,87 ± 5,12 **	24,2	
4	6,27± 3,49	17,22 ± 5,66 **	36,4	
8	2,27± 2,67	15,09 ± 1,69 **	15,0	
24	1,72± 1,09	14,77 ± 2,61 *	11,7	
32	2,23± 1,72	13,48 ± 2,56 *	16,5	
48	4,41± 5,04	11,83 ± 3,30	37,3	
			М ± m	22,8 ± 8,54

\*Данные представлены в виде М ± m; \* - p<0,05 vs точки 0; \*\* - p<0,01 vs точки 0

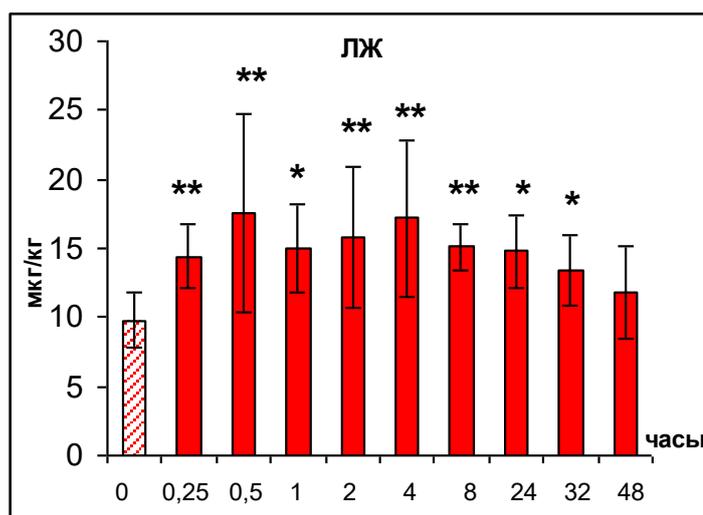


Рисунок 27. Уровни CoQ<sub>10</sub> в ЛЖ сердца крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг.

\* - p<0,05 vs точки 0; \*\* - p<0,01 vs точки 0.

Таблица 25. Содержание убихинола и общего СоQ10 в головном мозге крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	СоQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> мкг/г	СоQ <sub>10</sub> (общее содержание) мкг/г	Доля СоQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> в общем содержании СоQ <sub>10</sub> , %	
0	4,29± 0,89	8,93± 1,89	48,1	
0,25	8,45± 4,60	16,33 ± 5,32 *	51,7	
0,5	4,60± 6,07	16,49 ± 6,41 *	27,9	
1	6,97± 5,04	15,55 ± 4,61 *	44,8	
2	9,13± 2,89	14,41 ± 2,65 **	63,3	
4	4,88± 3,28	15,30 ± 3,80 **	31,9	
8	3,72± 4,65	14,02 ± 3,97 *	26,5	
24	6,28± 3,41	14,59 ± 3,61 *	43,0	
32	7,37± 4,03	16,07 ± 2,09 **	45,9	
48	7,02± 1,80	16,45 ± 3,68 **	42,7	
			М ± m	42,6 ± 11,30

\*Данные представлены в виде М ± m; \* - p< 0,05; \*\* - p<0,01 vs точки 0

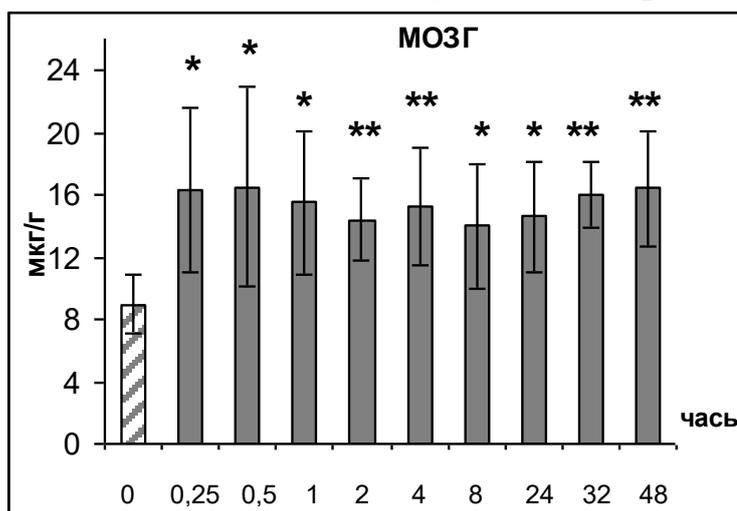


Рисунок 28. Уровни СоQ<sub>10</sub> в головном мозге крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг.

\* - p<0,05 vs точки 0; \*\* - p<0,01 vs точки 0.

Таблица 26. Содержание убихинола и общего CoQ10 в селезенке крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> мкг/г	CoQ <sub>10</sub> (общее содержание), мкг/г	Доля CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> в общем содержании CoQ <sub>10</sub> , %	
0	1,67 ± 1,04	6,47 ± 1,50	25,9	
0,25	5,17 ± 4,73	14,32 ± 2,54 **	36,1	
0,5	5,59 ± 3,79	12,69 ± 3,61 **	44,0	
1	4,24 ± 2,05	14,99 ± 3,49 **	28,3	
2	8,05 ± 7,21	19,62 ± 8,25 **	41,0	
4	3,76 ± 2,93	17,43 ± 2,00 **	21,6	
8	6,45 ± 7,91	21,76 ± 6,48 **	29,6	
24	6,17 ± 8,80	24,14 ± 6,72 **	25,6	
32	8,63 ± 4,50	18,47 ± 1,50 **	46,7	
48	4,99 ± 4,01	23,95 ± 6,13 **	20,9	
			M ± m	33,2 ± 9,03

\*Данные представлены в виде M ± m;

\*\* - p<0,01 vs точки 0

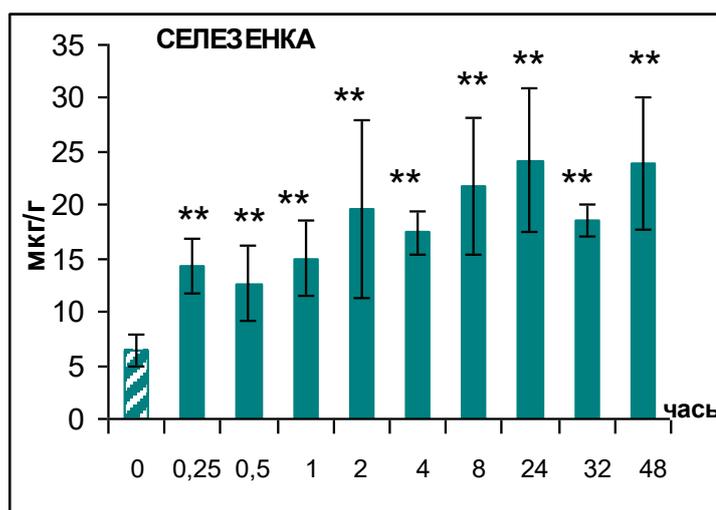


Рисунок 29. Уровни CoQ<sub>10</sub> в селезенке крыс до и через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг.

\*\* - p<0,01 vs точки 0.

Было изучено соотношение окисленной и восстановленной формы коэнзима  $Q_{10}$  в плазме и тканях в различные временные интервалы после введения препарата, что является биомаркером выраженности окислительного стресса [83], с одной стороны, и показателем сохранности препарата, с другой. Препарат на основе восстановленной формы коэнзима  $Q_{10}$  после внутривенного введения частично окисляется. Так, за время наблюдения средний процент убихинола в общем плазменном содержании коэнзима  $Q_{10}$  для дозы 10 мг/кг составил 78,9% при однократном введении (табл. 21). Доля убихинола в общем содержании  $CoQ_{10}$  в различных органах и тканях представлена на рисунке 30.

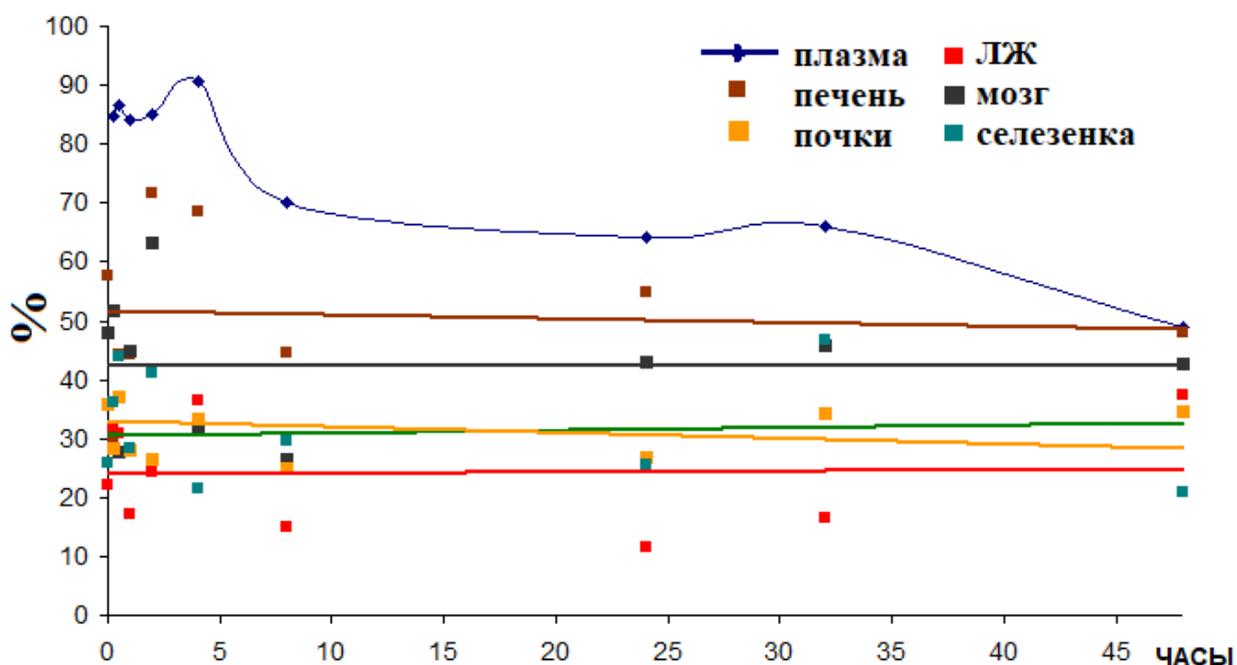


Рисунок 30. Доля  $CoQ_{10}H_2$  в общем содержании  $CoQ_{10}$  (%) в различных органах после внутривенного введения препарата убихинола в дозе 10 мг/кг (для органов приведены линии тренда).

В отличие от плазмы, для каждого органа доля восстановленной формы поддерживалась относительно неизменной на протяжении всего периода наблюдения (рис. 30) [4, 8]. Так, в левом желудочке сердца она составляла около 23%, в мозге — 43%, в печени — 51%, в почках — 31%, в селезенке —

33%. Характерно, что эти средние показатели по каждому органу были близки к таковым для нулевой точки.

Таким образом, в плазме крови препарат наиболее сохранен, т.е. доля убихинола в общем содержании  $\text{CoQ}_{10}$  максимальна среди изученных тканей: среднее значение за период наблюдения составило 79%. Полученные данные соответствуют литературным: по содержанию восстановленной формы в общем пуле коэнзима  $\text{Q}_{10}$  лидирует плазма крови; соотношение убихинол/убихинон индивидуально для каждой ткани организма [128, 140].

Представленные результаты позволяют заключить, что препарат на основе убихинола, являющегося аналогом эндогенного коэнзима  $\text{Q}_{10}$ , в каждом органе и ткани включается в характерное для них окислительно-восстановительное равновесие.

### 3.5. Количественное определение убихинола в моче и фекалиях после однократного внутривенного введения препарата на основе убихинола в дозе 10мг/кг

Проведен количественный анализ коэнзима Q<sub>10</sub> после однократного внутривенного введения препарата в образцах мочи и фекалий, собранных через 0-2 ч, 2-4 ч, 4-8 ч, 8-10 ч, 8-24 ч, 24-32 ч, 32-48 ч. Результаты анализа приведены в таблицах 27-28.

Таблица 27. Уровни CoQ<sub>10</sub> в фекалиях, собранных через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> (мкг/г)	CoQ <sub>10</sub> (общее содержание, мкг/г)	Масса образца (г)	CoQ <sub>10</sub> (выведено за временной интервал, мкг )
0-2	42,52 ± 39,12	85,5 ± 13,53	1,55 ± 1,22	142,8 ± 131,53
2-4	18,76 ± 4,73	75,16 ± 34,27	0,87 ± 0,26	65,46 ± 41,25
4-8	37,11 ± 27,15	95,12 ± 48,96	1,25 ± 0,56	124,64 ± 99,41
8-24	44,01 ± 40,81	183,8 ± 47,19	1,49 ± 0,31	280,95 ± 127,71
24-32	43,11 ± 10,46	80,27 ± 14,03	2,36 ± 1,65	177,68 ± 99,32
32-48	18,22 ± 6,38	139,07 ± 56,37	1,47 ± 1,1	174,06 ± 69,56

Как следует из данных таблицы, выведенные количества препарата за различные временные интервалы не различаются, а продолжительность интервалов возрастает. Следовательно, наиболее интенсивное выведение препарата происходит в первые 8 часов. Общее количество выведенного с фекалиями CoQ<sub>10</sub> за 48 часов (966 мкг) составило около четверти (24%) от введенной дозы (4 мг убихинола при средней массе крыс 400 г).

Таблица 28. Данные количественного определения CoQ<sub>10</sub> в образцах мочи, собранных через различные временные интервалы после в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

<b>Время ч</b>	<b>Масса образца мл</b>	<b>CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> по данным детектора, мВ</b>
0-2	0,43 ± 0,25	57,0 ± 35,51
2-4	0,87 ± 0,98	150,3 ± 61,21
4-8	1,47 ± 2,91	57,0 ± 43,97
8-24	1,43 ± 1,06	19,0 ± 26,87
24-32	2,87 ± 0,64	32,5 ± 14,85
32-48	2,43 ± 3,14	10,0 ± 17,32

Представленные в таблице 28 показания детектора для всех образцов мочи оказались меньше соответствующих нижнему пределу количественного определения препарата. Это позволило сделать заключение о незначительной роли почек в экскреции препарата в неизменном виде.

Результаты количественного анализа коэнзима Q<sub>10</sub> в моче и фекалиях после однократного внутривенного введения препарата согласуются с литературными данными [87] и свидетельствуют о выведении препарата в неизменном виде с желчью: общее количество выведенного CoQ<sub>10</sub> за 48 часов составило 24%. При этом роль почек в экскреции незначительна.

### 3.6. Фармакокинетика препарата убихинола при трехкратном внутривенном введении в 2-х дозах (5мг/кг и 10мг/кг)

Результаты определения уровней убихинола в плазме крови крыс до и после восстановления для каждой из исследуемых доз (5 мг/кг и 10 мг/кг) представлены в таблицах 29-30. Уровни убихинола, детектируемые до восстановления, соответствовали концентрации нативного, неокисленного препарата в образце. Добавление восстановителя переводило окисленную форму в восстановленную и позволяло определить общую концентрацию коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме. Уровни коэнзима Q<sub>10</sub> после восстановления превышали уровни убихинола до восстановления практически для всех проб, что свидетельствует о частичном окислении введенного препарата.

Таблица 29. Уровни CoQ<sub>10</sub> (до и после восстановления) в плазме крови крыс через различные временные интервалы после 3-х кратного в/в введения препарата в дозе 5 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> мкг/мл	CoQ <sub>10</sub> (общее содержание) мкг/мл	Доля CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> в общем содержании CoQ <sub>10</sub> (%)	
0	2,45 ± 1,99	4,93 ± 1,85	49,7	
0,25	60,76 ± 19,55	79,09 ± 12,09	76,83	
0,5	45,26 ± 19,66	64,78 ± 9,61	69,86	
1	37,96 ± 21,09	56,95 ± 9,6	66,65	
2	24,07 ± 11,18	40,79 ± 8,91	59,00	
4	18,86 ± 6,76	28,73 ± 7,24	65,63	
8	10,15 ± 2,47	15,77 ± 5,23	64,34	
24	1,14 ± 0,63	2,86 ± 1,02	39,8	
32	0,57 ± 0,56	1,44 ± 0,65	39,70	
48	0,33 ± 0,40	0,86 ± 0,56	38,06	
			M ± m	56,96 ± 14,11

Данные представлены в виде M ± m

Таблица 30. Уровни CoQ<sub>10</sub> (до и после восстановления) в плазме крови крыс через различные временные интервалы после 3-х кратного в/в введения препарата в дозе 10 мг/кг

Время, Ч	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> мкг/мл	CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> (общее содержание) мкг/мл	Доля CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> в общем содержании CoQ <sub>10</sub> (%)	
0	9,57 ± 6,21	12,38 ± 8,48	77,2	
0,25	187,30 ± 2,04	214,73 ± 48,09	87,2	
0,5	176,81 ± 25,61	210,09 ± 38,08	84,2	
1	131,54 ± 5,84	165,10 ± 36,49	79,7	
2	124,89 ± 6,60	146,42 ± 31,62	85,3	
4	87,25 ± 19,27	113,67 ± 24,33	76,8	
8	50,35 ± 15,07	61,13 ± 19,52	82,4	
24	5,79 ± 2,86	7,24 ± 2,74	79,9	
32	2,59 ± 1,37	3,90 ± 1,66	66,5	
48	0,90 ± 0,42	1,36 ± 0,53	66,0	
			M ± m	78,5 ± 7,3

Данные представлены в виде M ± m

По данным литературы и собственным результатам ранее проведенных исследований содержание эндогенного коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме крысы составляет около 0.1 мкг/мл [53, 68]. Такая концентрация находится за пределами валидированного диапазона, поэтому количественная оценка исходных значений коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме не проводилась. Тем не менее, для учета фоновых уровней коэнзима Q<sub>10</sub> площадь соответствующего пика в нулевой пробе вычитали из площадей пиков во всех пробах для каждого животного.

На основании полученных данных в программе «Kinetic 5.0» были построены индивидуальные кинетические кривые зависимости «концентрация-время» для каждой дозы (рис. 31).

Кинетические кривые зависимости «концентрация коэнзима  $Q_{10}$  в плазме – время», построенные по средним значениям для каждой временной точки, представлены на рисунке 31 в абсолютных (рис. 31а) и в полулогарифмических (рис. 31б) значениях концентраций.

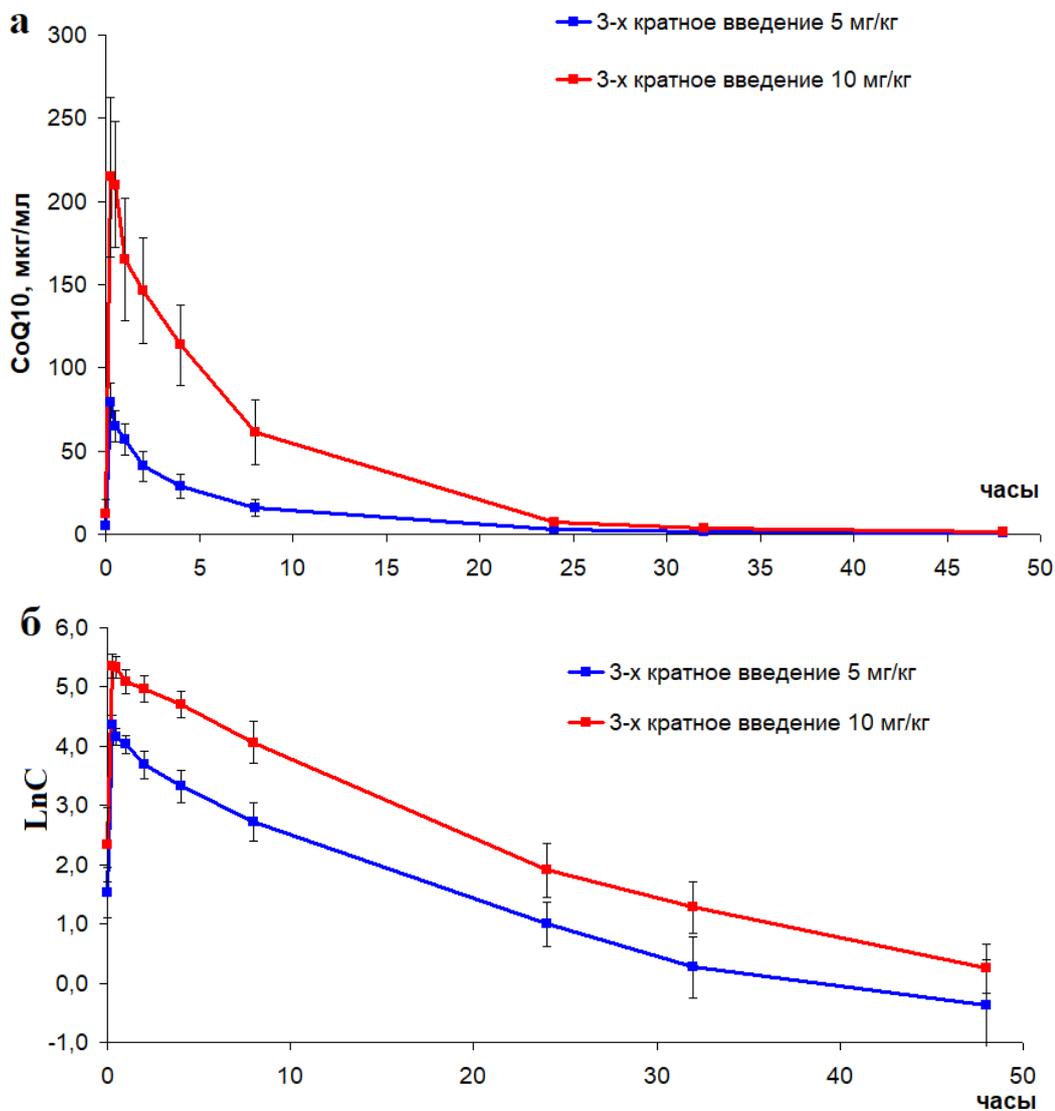


Рисунок 31. Кинетические кривые  $CoQ_{10}$  в плазме крови крыс после 3-х кратного внутривенного введения препарата убихинола в дозе 5 мг/кг и 10 мг/кг в абсолютных (а) и полулогарифмических (б) координатах.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные с помощью программы “Kinetics 5.0” для каждой дозы препарата, представлены в табл. 31.

Таблица 31. Фармакокинетические параметры препарата убихинола после его 3-х кратного введения в дозах 5 мг/кг и 10 мг/кг

Параметры Доза	AUC <sub>0→48ч.</sub> ( мг*ч/мл )	C <sub>1T</sub> (мл/ч)	T <sub>1/2</sub> (ч)
5 мг/кг	0,439	4,36	26,68
	0,358	5,45	9,56
	0,583	3,46	16,72
	0,473	4,12	7,44
	0,530	3,39	10,17
	0,516	3,78	25,44
	<b>0,483± 0,08</b>	<b>4,09±0,76</b>	<b>16,00±8,40</b>
10 мг/кг	2,102	1,39	7,68
	1,589	2,30	10,29
	1,281	3,07	12,38
	2,052	2,03	11,05
	1,059	3,61	10,65
	1,623	2,28	9,92
	<b>1,618±0,412<sup>#</sup></b>	<b>2,45±0,79<sup>#</sup></b>	<b>10,33±1,55</b>

# - p<0,01, отличие от дозы 5 мг/кг

Данные таблицы 31 демонстрируют значимые различия параметров общего клиренса, рассчитанных для двух доз. Это еще раз подтверждает нелинейность фармакокинетики препарата убихинола, выявленную в предыдущем исследовании (п. 3.2). Из-за высокой вариабельности времени полувыведения для дозы 5 мг/кг величина этого параметра статистических различий между дозами не выявлено.

Результаты, представленные на рисунке 32, демонстрируют, что концентрации препарата в плазме крови после 3-х кратного введения оказались ниже, чем после однократного.

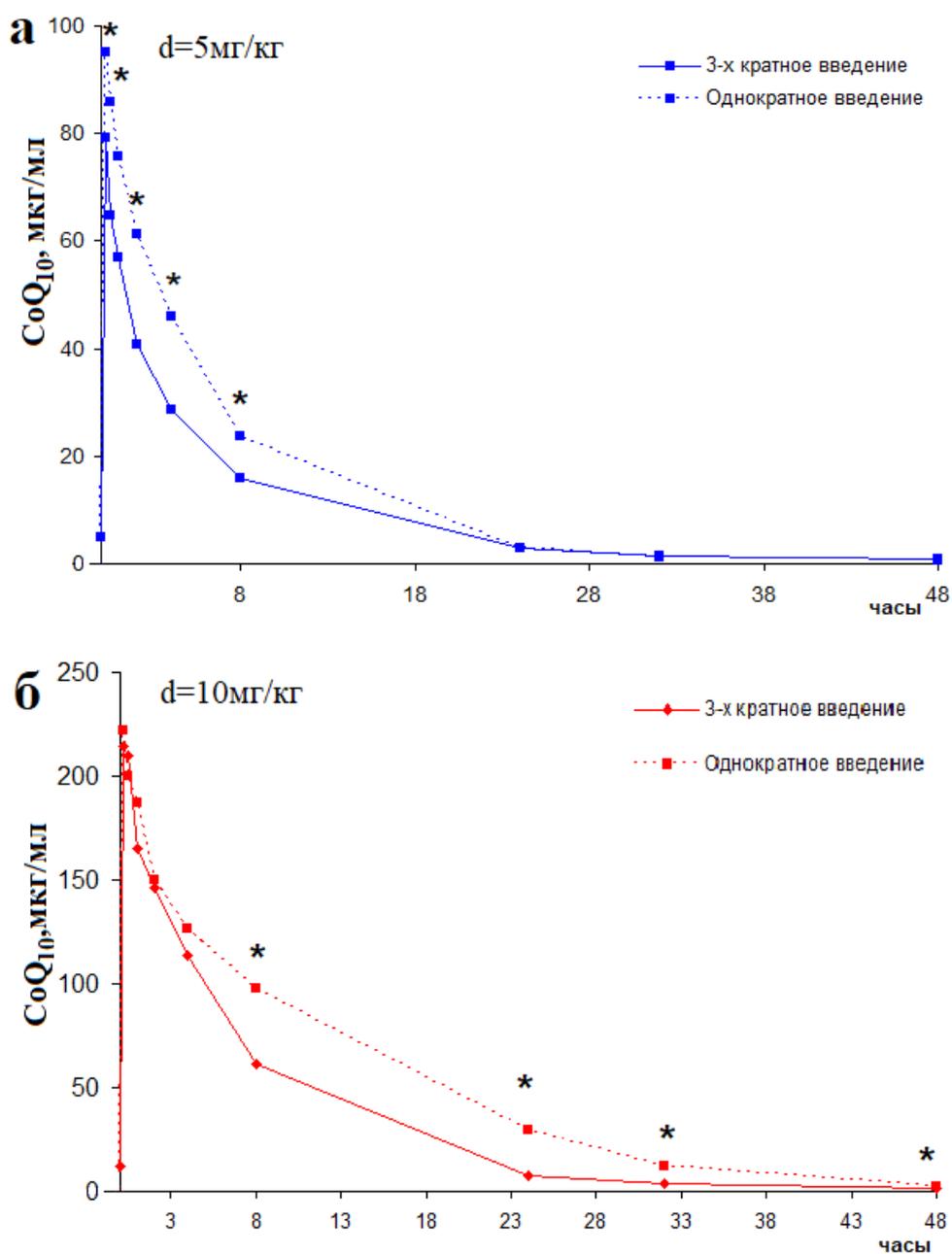


Рисунок 32. Кинетические кривые  $\text{CoQ}_{10}$  в плазме крови крыс после 3-х кратного и однократного внутривенного введения препарата  $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$  в дозе 5 мг/кг (а) и 10 мг/кг (б). \* -  $p < 0,01$

Достоверность различий наблюдалась для концентраций препарата ниже 100 мкг/мл: для дозы 5 мг/кг – в первые 8 часов (рис. 32а), для дозы 10 мг/кг – в период с 8 до 48 часов (рис. 32б) после введения. Соответственно, рассчитанные значения клиренса при 3-х кратном введении были существенно выше ( $p < 0,05$ ), чем при однократном: для дозы 5 мг/кг – 4,09

против 2,91 мл/ч, для дозы 10 мг/кг – 2,45 против 1,54 мл/ч. Возросший клиренс может быть обусловлен как повышенной экскрецией препарата с желчью (что противоречит предыдущим данным о снижении клиренса при увеличении дозы, т.е о насыщенности процессов элиминации), так и более интенсивным поступлением в ткани органов.

Следовательно, в изучаемом диапазоне доз многократность введения способствует возрастанию клиренса, что, в свою очередь, предполагает более эффективное пополнение тканей препаратом.

### 3.7. Кардиопротекторная эффективность препарата убихинола в инновационной лекарственной форме для внутривенного введения

В ходе данного исследования, была проведена проверка кардиопротекторной эффективности препарата убихинола для внутривенного введения.

Эксперимент проведен на 30 крысах-самцах Wistar. В первые часы после операции погибло 7 животных (23%). Смертности в последующие сутки во всех группах животных не было. Данные показатели смертности в течение первых суток не учитывалась, так как причиной этого может являться острый инфаркт миокарда и процессы раннего ремоделирования, происходящие в первые 72 часа [2]. Осложнений, связанных с гнойно-воспалительными процессами, у животных не наблюдалось. В дальнейший анализ были включены 23 животного, данные представлены в таблице 32.

Таблица 32. Смертность животных в каждой экспериментальной группе

Группа	Прооперировано	Погибло		Выжили
		<24ч	24-72ч	
«ИМ»	10	4	-	6
«ИМ+CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> »	11	3	-	8
«ЛО»	9	-	-	9

Препарат убихинола при однократном внутривенном введении в дозе 10 мг/кг в первые минуты после начала ишемии миокарда значительно ограничивает размер зоны повреждения ЛЖ. Через 21 сутки после окклюзии в бассейне передней нисходящей ветви левой коронарной артерии наблюдалось формирование аневризмы, замещающей часть передней стенки ЛЖ, и формирование постинфарктных рубцов, расположенных в толще стенки ЛЖ (рис. 33). В группе «ИМ» размер некроза и аневризмы составлял 14,26% и 31,55%, в группе животных «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>» - 12,8% и 13,19% соответственно ( $p < 0,05$ , табл. 33).

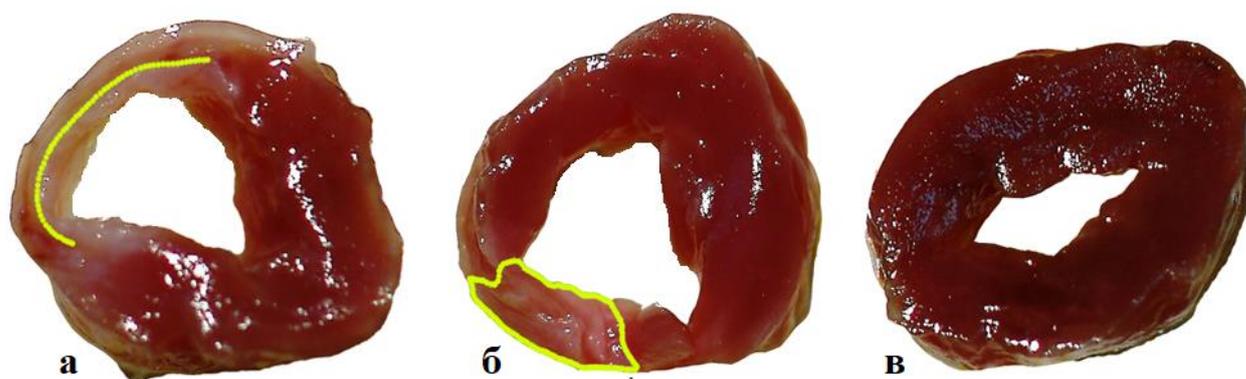


Рисунок 33. Поперечные срезы ЛЖ после окраски трифенилтетразолия хлоридом на 21 сутки после окклюзии коронарной артерии.

а - сформированная соединительнотканная аневризма ЛЖ; б – инфарктный рубец в толще миокарда; в – срез ЛЖ ложнооперированного животного.

Таблица 33. Средние значения размера зоны повреждения ЛЖ в каждой из групп животных

Группа	«ИМ»	«ИМ+CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> »	«ЛО»
аневризма, %	31,55 ± 17,9	13,19 ± 7,13 #	-
некроз, %	14,26 ± 9,5	12,80 ± 6,9	-

# -  $p < 0,05$  vs «ИМ»

Внутривенное введение препарата убихинола в дозе 10 мг/кг ограничивало размер постинфарктной гипертрофии миокарда. Толщина межжелудочковой перегородки в группе «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>» была существенно ниже ( $p < 0,05$ ), чем в группе «ИМ» и статистически не отличалась от группы «ЛО» (табл. 34).

Таблица 34. Средние значения толщины межжелудочковой перегородки (мм) в каждой из групп животных

«ЛО»	«ИМ+CoQ <sub>10</sub> H <sub>2</sub> »	«ИМ»
2,51 ± 0,29	2,61 ± 0,03	2,83 ± 0,27*#

# -  $p < 0,05$  vs «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>», \*-  $p < 0,05$  vs «ЛО»

Только в группе «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>» наблюдается зависимость между концентрацией CoQ<sub>10</sub> в ЛЖ и толщиной межжелудочковой перегородки (ТМП),  $R^2=0,6716$  (рис.34).

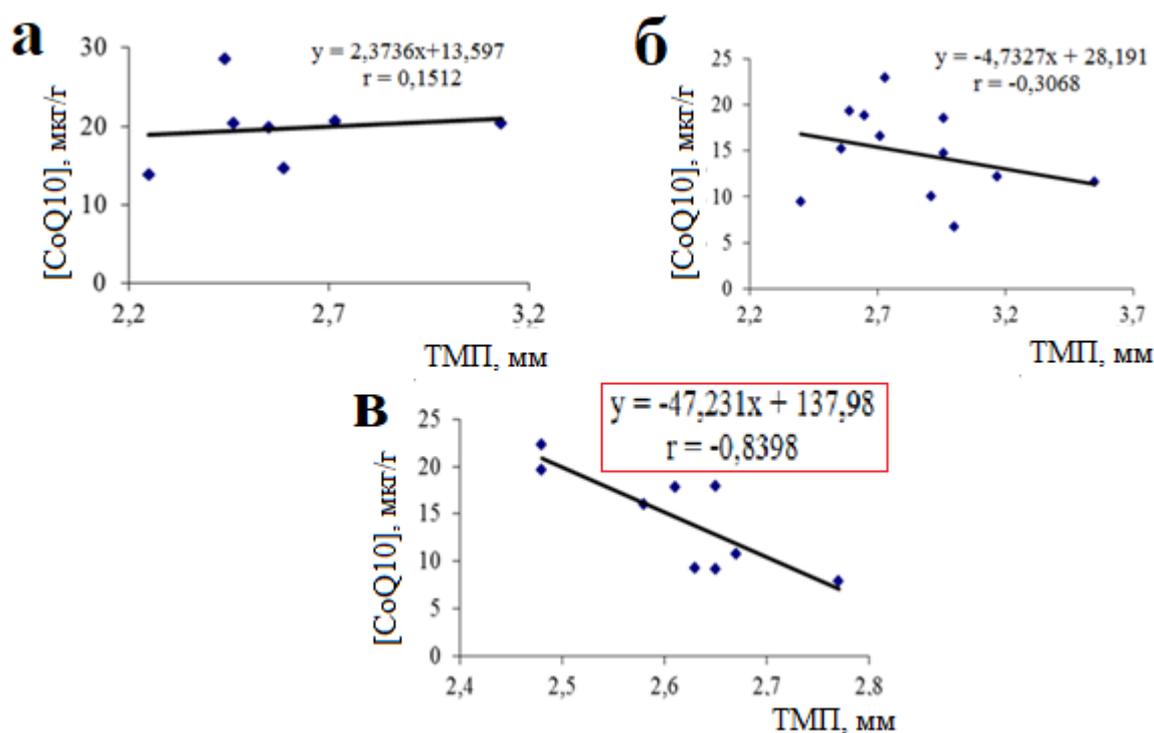


Рисунок 34. Соотношение уровня CoQ<sub>10</sub> в миокарде левого желудочка и толщины межжелудочковой перегородки у животных трех экспериментальных групп на 21 сутки: а – группа «ЛО», б – «ИМ» и в – «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>». Обратная корреляционная зависимость выявлена только в группе «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>».

Полученные результаты сопоставимы с результатами применения однократной внутривенной инъекции окисленной формы коэнзима Q<sub>10</sub> (Кудесан<sup>®</sup>) крысам в первые минуты ишемии в дозе 30 мг/кг [1, 3, 50]. Оклюзия коронарных артерий приводила к развитию левожелудочковой сердечной недостаточности: снижались фракции выброса на 38%, ударный объем на 27%, сердечный выброс на 30%, конечно-систолическое давление на 20% и повышались конечно-систолический объем на 44% и конечно-диастолический объем на 23% относительно группы животных «ЛО» (с достоверностью  $p < 0,05$  для всех показателей).

Внутривенное введение препарата привело к предотвращению снижения сердечного выброса и ударного объема, ограничению снижения фракция выброса (лишь на 11%), конечно-систолического давления (лишь на 17%), а также меньшему повышению конечно-систолического (на 20%) и конечно-диастолического (на 16%) объема (рис. 35).

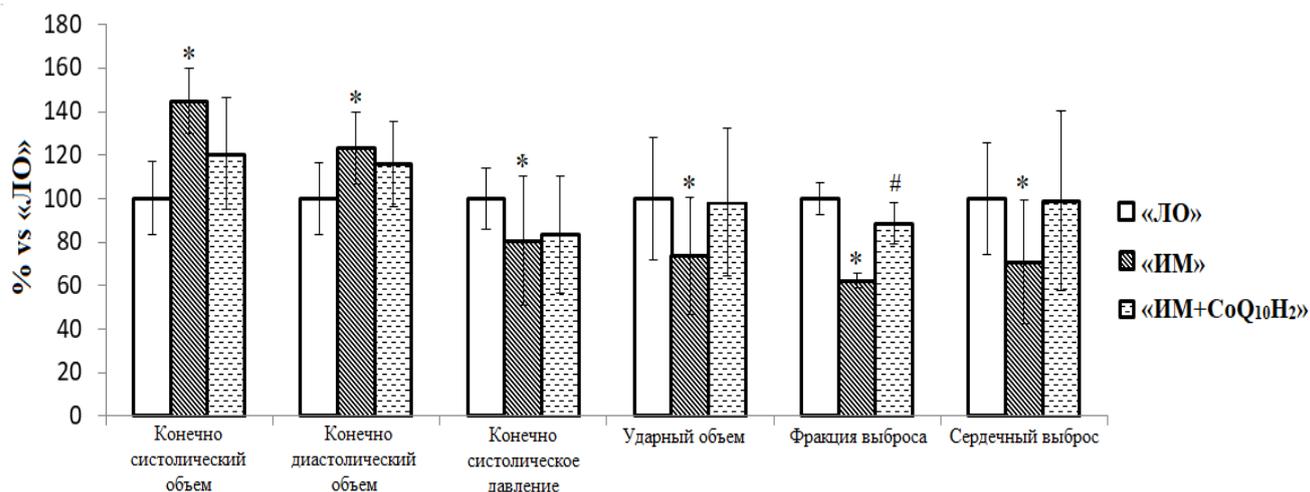


Рисунок 35. Функциональные показатели левожелудочковой гемодинамики в каждой группе животных относительно группы «ЛО» - 100%.

\* -  $p < 0,05$  vs «ЛО», # -  $p < 0,05$  vs «ИМ».

Выявленные ограничения развития систолической и диастолической дисфункции ЛЖ после введения убихинола в дозе 10 мг/кг были сопоставимы с полученными ранее результатами [3, 50] по применению убихинона в дозе 30 мг/кг (таблица 34).

Полученные данные свидетельствуют о более высокой кардиопротекторной эффективности восстановленной формы коэнзима Q10 относительно его окисленной формы.

Таблица 34. Изменение гемодинамических показателей ЛЖ у животных с окклюзией коронарных артерий в результате внутривенного введения убихинола или убихинона [1]

Параметр	Улучшение относительно животных с окклюзией коронарных артерий («ИМ»), %	
	Убихинол, 10 мг/кг	Кудесан <sup>®</sup> , 30 мг/кг
EF	40,3	35,6
ESV	17,0	25,4
EDV	5,8	8,2
SV	31,0	24,7
CO	37,5	37,4

Однократное внутривенное введение препарата, содержащего убихинол, в дозе 10 мг/кг на 21 сутки обеспечивало повышенное содержание CoQ<sub>10</sub> в плазме на 52,4% относительно группы животных «ЛО» (p<0,01) и на 60% относительно группы «ИМ» (p<0,01). Концентрация CoQ<sub>10</sub> на 21 сутки в ЛЖ в группе животных «ЛО» была статистически выше (p<0,05) на 22,9% и на 34,2% относительно группы «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>» и «ИМ» соответственно. В печени концентрация CoQ<sub>10</sub> на 21 сутки после введения препарата была выше на 20,5% (p<0,05) относительно группы «ЛО» и на 24,9% (p<0,01) относительно группы «ИМ» (рис. 36).

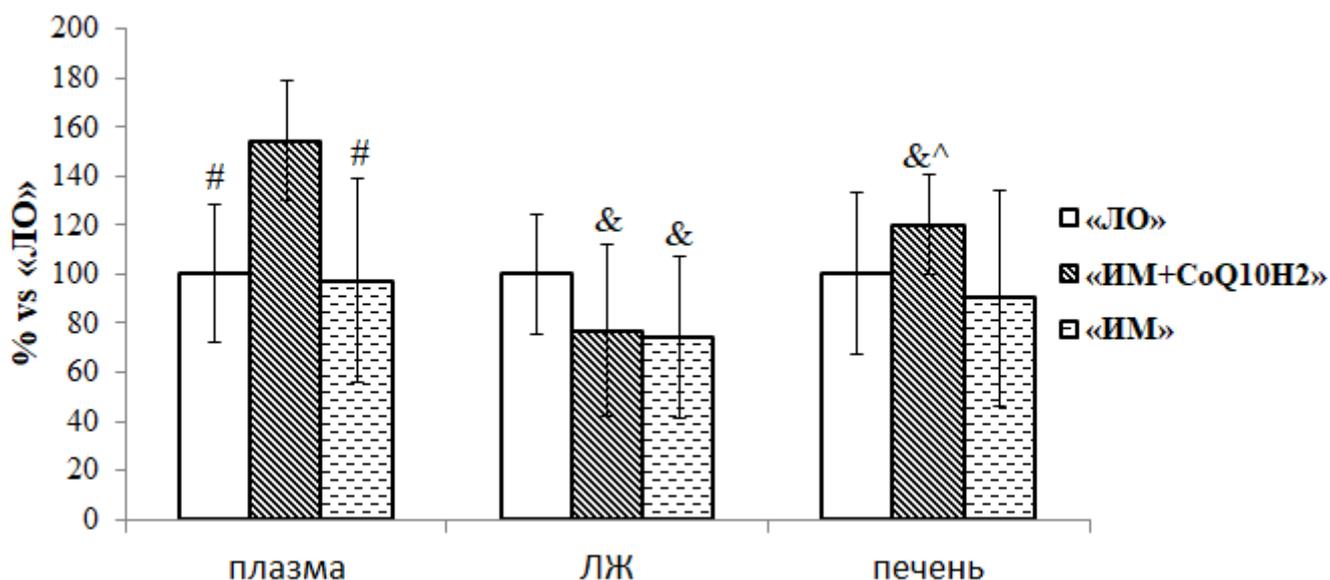


Рисунок 36. Концентрация CoQ<sub>10</sub> в плазме, ЛЖ, печени на 21 сутки после проведения манипуляций.

# -  $p < 0,01$  vs «ИМ+CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>», & -  $p < 0,05$  vs «ЛО», ^ -  $p < 0,01$  vs «ИМ».

Таким образом, однократное внутривенное введение препарата убихинола в дозе 10 мг/кг в первые минуты после возникновения ишемии миокарда ограничивает зону повреждения миокарда, предотвращает развитие гипертрофии ЛЖ, ограничивает развитие систолической и диастолической дисфункции миокарда, что свидетельствует об эффективности препарата у животных с острым ИМ.

Полученные результаты создают предпосылки для клинического исследования данного инновационного лекарственного препарата в ургентной терапии острых сердечно-сосудистых состояний.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терапевтический потенциал коэнзима Q10 давно используется в кардиологии, но не раскрыт полностью из-за отсутствия внутривенных лекарственных форм. Ранее показано, что внутривенное введение коэнзима Q10 в окисленной форме обеспечивает в эксперименте выраженный кардиопротекторный эффект, ограничивая постинфарктное ремоделирование миокарда и снижение насосной функции сердца. Разработка лекарственного препарата для внутривенного введения давно представляется актуальной задачей, реализация которой осложнена крайне низкой растворимостью субстанции коэнзима Q10 – вещества с выраженной липофильностью. Препарат, явившийся объектом данного исследования – 1% водный раствор солюбилизированной субстанции убихинола, представляющего собой восстановленную форму коэнзима Q10, отвечающую за его антиоксидантные свойства. Основанием выбора именно убихинола в качестве действующего вещества явилась также его несколько более высокая растворимость в сравнении с убихиноном.

В данной работе для проведения доклинического фармакокинетического исследования разработана и валидирована методика количественного определения убихинола с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием электрохимического детектора.

Впервые изучена фармакокинетика инновационного лекарственного препарата убихинола для внутривенного введения при однократном введении в трех различных дозах, а также произведена оценка и сравнение с трехкратным введением данного препарата. Существование коэнзима Q10 в живых системах в двух основных редокс-состояниях определило необходимость изучения динамики редокс-статуса убихинола после внутривенного введения в плазме и внутренних органах, в т.ч. в органах-мишенях (сердце, головном мозге).

Доказана способность препарата убихинола надолго повышать содержание коэнзима Q10 в плазме и тканях органов. Показано, что после инъекции препарата доля убихинола в общем тканевом содержании коэнзима Q10 специфична для каждого органа и соответствует его эндогенному редокс-балансу. Произведен расчет и сравнение основных фармакокинетических параметров. Сделан вывод, что в исследованном диапазоне с увеличением дозы препарата величина клиренса снижается, а при увеличении кратности вводимой дозы клиренс увеличивается. Возрастание клиренса, в свою очередь, предполагает более эффективное пополнение тканей препаратом.

Произведена оценка гипотезы линейности препарата, позволяющая оценить изменения концентрации вещества в ответ на изменение дозы. Величина площади под кинетическими кривыми для трех доз препарата с увеличением дозы возрастает и описывается уравнением регрессии  $y=0,344x-1,026$  с коэффициентом корреляции 0,9997. Однако, полученные фармакокинетические параметры различались, и нормирование фармакокинетических кривых относительно дозы не привело к их совмещению. На этом основании сделан вывод о нелинейности фармакокинетики препарата в изучаемом диапазоне доз.

Изучено распределение препарата по тканям и органам крыс при однократном внутривенном введении в дозе 10 мг/кг, наблюдалось значительное повышение уровней коэнзима Q<sub>10</sub> в первые 15 минут после введения, которые сохранялись в плазме, печени, мозге, миокарде, почках и селезенке на протяжении 32 часов.

В исследованиях препарат демонстрировал высокую устойчивость к окислению *in vivo*, через 24 часа после инъекции препарата более 50 % коэнзима Q<sub>10</sub> в плазме сохранялось в неокисленном виде, в форме убихинола; также отмечено, что с увеличением концентрации препарата в плазме доля окисленного коэнзима Q<sub>10</sub> снижается, что может быть результатом насыщения эндогенных окислительно-восстановительных процессов. В

тканях органов, напротив, соотношение убихинол/убихинон оставалось постоянным и индивидуальным для каждого органа весь период наблюдения. Эти различия согласуются с известными данными по редокс-статусу эндогенного коэнзима Q10 и свидетельствуют о включении препарата в окислительно-восстановительные процессы в организме.

Определено, что экскреция препарата в неизменном виде осуществляется главным образом с желчью: общее количество выведенного за 48 часов CoQ<sub>10</sub> составило около четверти от введенной дозы. Роль почек в экскреции препарата в неизменном виде незначительна.

Показана эффективность однократного внутривенного введения препарата убихинола в дозе 10мг/кг в ургентной терапии острого инфаркта миокарда. На 21 сутки наблюдалось ограничение постинфарктных повреждений, ограничение развития гипертрофии ЛЖ. Только в группе животных, получавших препарат, наблюдалась корреляционная зависимость между толщиной межжелудочковой перегородки и общим пулом коэнзима Q<sub>10</sub>, тем самым однократная инъекция препарата предотвращает развитие гипертрофии миокарда. Однократная внутривенная инъекция предотвращает развитие систолической и диастолической дисфункции ЛЖ и снижение сердечного выброса и ударного объема, ограничивает снижение фракции выброса, конечно-систолического давления, способствует меньшему увеличению конечно-систолического и конечно-диастолического объема.

Таким образом, в соответствии с рекомендациями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [6] проведено доклиническое фармакокинетическое исследование нового лекарственного препарата убихинола: изучена его кинетика в плазме крови, распределение по органам и тканям и выявлены основные механизмы экскреции, доказана эффективность использования в качестве кардиопротектора при инфаркте миокарда. Полученные результаты обосновывают целесообразность дальнейшего изучения препарата на этапе клинических испытаний.

## ВЫВОДЫ

1. Проведен сравнительный анализ *in silico* (Millisian 2.1, ALOGPS 2.1 и PubChem Search) физико-химических характеристик окисленной и восстановленной формы коэнзима Q<sub>10</sub>. Показаны различия в коэффициентах распределения, растворимости и дипольном моменте молекул. Более низкие значения logP и K<sub>s</sub> обосновывают отличия фармакокинетических параметров убихинола от убихинона.
2. Разработанная биоаналитическая методика количественного определения убихинола в плазме крови и печени крысы соответствует требованиям FDA и ЕМА по линейности, селективности, правильности, прецизионности и пределу количественного определения.
3. Фармакокинетика препарата убихинола при однократном внутривенном введении в дозах 5, 10 и 20 мг/кг описывается двухчастевой моделью распределения и носит нелинейный характер. При увеличении дозы препарата непропорционально увеличивается AUC<sub>0-48h</sub> и снижается Cl<sub>t</sub>, что может являться результатом насыщения механизмов экскреции препарата.
4. Препарат убихинола уже через 15 минут после внутривенного введения повышает тканевые уровни коэнзима Q<sub>10</sub> в миокарде ЛЖ, головном мозге, печени, почках и селезенке, которые сохраняются не менее 32 часов.
5. Преобладающим путем экскреции препарата убихинола в неизменном виде является его экскреция в желчь; роль почек незначительна.
6. Многократное внутривенное введение препарата убихинола в дозах 5 и 10 мг/кг относительно однократного приводит к возрастанию клиренса, увеличению времени полувыведения и уменьшению площади под фармакокинетической кривой, что может быть обусловлено более интенсивным поступлением убихинола в ткани органов.
7. Препарат убихинола обладает кардиопротекторным действием при внутривенном введении в дозе 10 мг/кг в первые минуты после начала необратимой ишемии миокарда у крыс приводит на 21 сутки к ограничению зоны постинфарктных повреждений (13,19±7,13% vs 31,55±17,9%, p<0,05),

предотвращению развития гипертрофии ЛЖ (ТМП  $2,61 \pm 0,03$  мм vs  $2,83 \pm 0,27$  мм,  $p < 0,05$ ) и сохранению насосной функции сердца (EF 11% vs 38%,  $p < 0,05$ ).

## Список литературы

1. Иванов А.В. [и др.]. Однократное внутривенное введение коэнзима Q10 защищает миокард, подвергшийся необратимой ишемии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. № 6. С. 736–739.
2. Исламов Р.А. Методология эксперимента с использованием лабораторных животных // Вестник Казахского Национального медицинского университета. 2016. № 1. С. 489–492.
3. Каленикова Е. [и др.]. Сравнение кардиопротекторной эффективности коэнзима Q10 и мексикора при экспериментальной ишемии миокарда // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. № 6 (78). С. 12–14.
4. Каленикова Е.И. [и др.]. Многодневный мониторинг уровней убидекаренона в плазме и органах крысы после однократного внутривенного введения // Химико-фармацевтический журнал. 2015. № 11 (49). С. 3–7.
5. Каленикова Е.И. [и др.]. Редокс-статус и фармакокинетика коэнзима Q10 в плазме крови крысы после его однократного внутривенного введения // Биомедицинская химия. 2015. № 1 (61). С. 125–131.
6. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, М.: Гриф и К-е изд., Москва:, 2012. 944 с.
7. Харитоновна Е.В. [и др.]. Фармакокинетика солубилизованного CoQ10 в составе препарата Кудесан при парентеральных путях введения // Сибирское медицинское обозрение. 2013. № 6 (84). С. 26–29.
8. Харитоновна Е.В. Биофармацевтический анализ и фармакокинетика убидекаренона. дис. к.фарм.н.: 14.03.06, 14.04.02 / Харитоновна Екатерина Викторовна. – Волгоград, 2015. –166 с.
9. Abd El-Aal S.A., Abd El-Fattah M.A., El-Abhar H.S. CoQ10 Augments Rosuvastatin Neuroprotective Effect in a Model of Global Ischemia via Inhibition

of NF- $\kappa$ B/JNK3/Bax and Activation of Akt/FOXO3A/Bim Cues // *Frontiers in Pharmacology*. 2017. (8). С. 735.

10. Aberg F. [и др.]. Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992. № 2 (295). С. 230–234.

11. Ayer A., Macdonald P., Stocker R. CoQ<sub>10</sub> Function and Role in Heart Failure and Ischemic Heart Disease // *Annu Rev Nutr*. 2015. (35). С. 175–213.

12. Banno H. [и др.]. Analysis of participant withdrawal in Huntington disease clinical trials // *J Huntingtons Dis*. 2017. № 2 (6). С. 149–156.

13. Bates A. [и др.]. Myocardial energetics and ubiquinol in diastolic heart failure // *Nursing & Health Sciences*. 2014. № 4 (16). С. 428–433.

14. Belliere J. [и др.]. Prerequisites for ubiquinone analogs to prevent mitochondrial permeability transition-induced cell death // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2012. № 1 (44). С. 207–212.

15. Bennetts P. [и др.]. Effects of ubiquinol with fluid resuscitation following haemorrhagic shock on rat lungs, diaphragm, heart and kidneys // *Experimental Physiology*. 2014. № 7 (99). С. 1007–1015.

16. Bentinger M. [и др.]. Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat // *Free Radic Biol Med*. 2003. № 5 (34). С. 563–575.

17. Bentinger M., Tekle M., Dallner G. Coenzyme Q--biosynthesis and functions // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. № 1 (396). С. 74–79.

18. Bhagavan H.N. [и др.]. Assessment of coenzyme Q10 absorption using an in vitro digestion-Caco-2 cell model // *Int J Pharm*. 2007. № 1–2 (333). С. 112–117.

19. Bogeski I. [и др.]. Calcium binding and transport by coenzyme Q // *Journal of the American Chemical Society*. 2011. № 24 (133). С. 9293–9303.

20. Bowry V.W., Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein // *Journal of the American Chemical Society*. 1993. № 14 (115). С. 6029–6044.

21. Burnett C.L. [и др.]. Safety Assessment of PEGylated oils as used in cosmetics // *International Journal of Toxicology*. 2014. № 4 Suppl (33). С. 13S-39S.
22. Cakiroglu B. [и др.]. Ubiquinol effect on sperm parameters in subfertile men who have astheno-teratozoospermia with normal sperm concentration // *Nephrourol Mon*. 2014. № 3 (6). С. e16870.
23. Choi J.-H., Ryu Y.-W., Seo J.-H. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. № 1 (68). С. 9–15.
24. Chopra R.K. [и др.]. Relative bioavailability of coenzyme Q10 formulations in human subjects // *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*. 1998. № 2 (68). С. 109–113.
25. Committee for Veterinary Medicinal Products. Summary Report of Polyoxyl Castor Oil, Polyoxylhydrogenated Castor Oil // *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit*. 1999. С. 1–3.
26. Crane F.L. [и др.]. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. 1957 // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1989. (1000). С. 362–363.
27. Crane F.L. Biochemical functions of coenzyme Q10 // *J Am Coll Nutr*. 2001. № 6 (20). С. 591–598.
28. Dieu Ndikubwimana J. de, Lee B.H. Enhanced production techniques, properties and uses of coenzyme Q10 // *Biotechnology Letters*. 2014. № 10 (36). С. 1917–1926.
29. Dixson D.D., Boddy C.N., Doyle R.P. Reinvestigation of coenzyme Q10 isolation from *Sporidiobolus johnsonii* // *Chemistry & Biodiversity*. 2011. № 6 (8). С. 1033–1051.
30. Ernster L., Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1995. № 1 (1271). С. 195–204.

31. Failla M.L., Chitchumroonchokchai C., Aoki F. Increased bioavailability of ubiquinol compared to that of ubiquinone is due to more efficient micellarization during digestion and greater GSH-dependent uptake and basolateral secretion by Caco-2 cells // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014. № 29 (62). С. 7174–7182.
32. Fan L. [и др.]. Effects of coenzyme Q10 supplementation on inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Pharmacol Res*. 2017. (119). С. 128–136.
33. Fischer A. [и др.]. Coenzyme Q10 Status as a Determinant of Muscular Strength in Two Independent Cohorts // *PloS One*. 2016. № 12 (11). С. e0167124.
34. Fujita T. [и др.]. Metabolic fate of ubiquinone-7. I. Absorption, excretion and tissue distribution in rats // *Journal of Biochemistry*. 1971. № 1 (69). С. 53–61.
35. Fukuda S. [и др.]. Ubiquinol-10 supplementation improves autonomic nervous function and cognitive function in chronic fatigue syndrome // *BioFactors* (Oxford, England). 2016. № 4 (42). С. 431–440.
36. García-Corzo L. [и др.]. Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2014. № 7 (1842). С. 893–901.
37. Greenberg S., Frishman W.H. Co-enzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease // *Journal of Clinical Pharmacology*. 1990. № 7 (30). С. 596–608.
38. Guarás A. [и др.]. The CoQH<sub>2</sub>/CoQ Ratio Serves as a Sensor of Respiratory Chain Efficiency // *Cell Reports*. 2016. № 1 (15). С. 197–209.
39. Gvozdjáčková A. [и др.]. Coenzyme Q<sub>10</sub>,  $\alpha$ -tocopherol, and oxidative stress could be important metabolic biomarkers of male infertility // *Disease Markers*. 2015. (2015). С. 827941.
40. Hansch C. Folate inhibitors: a structure-activity analysis using linear modeling // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1971. (186). С. 235–247.
41. Hansch C., Anderson S.M. The structure-activity relationship in barbiturates and its similarity to that in other narcotics // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1967. № 5 (10). С. 745–753.

42. Hansch C., Fujita T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure // *Journal of the American Chemical Society*. 1964. № 8 (86). С. 1616–1626.
43. Hiji A.K., Kebir H., Hekimi S. Sensitivity of *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants to ubiquinone side-chain length reveals multiple ubiquinone-dependent processes // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. № 42 (278). С. 41013–41018.
44. Hirst J., Roessler M.M. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2016. № 7 (1857). С. 872–883.
45. Hosoe K. [и др.]. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers // *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*. 2007. № 1 (47). С. 19–28.
46. Huynh K. [и др.]. Coenzyme Q10 attenuates diastolic dysfunction, cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis in the db/db mouse model of type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2012. № 5 (55). С. 1544–1553.
47. Ishikawa A., Homma Y. Beneficial effect of ubiquinol, the reduced form of coenzyme Q10, on cyclosporine nephrotoxicity // *Int Braz J Urol*. 2012. № 2 (38). С. 230–234.
48. Ivanov A. [и др.]. Cardioprotection with Intravenous Injection of Coenzyme Q10 is limited by Time of Administration after Onset of Myocardial Infarction in Rats // *Journal of Clinical and Experimental Cardiology*. 2014. № 4 (5).
49. Ivanov A.V. [и др.]. Coenzyme Q10 single intravenous infusion protects rat myocardium against subsequent ischemia/reperfusion // *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*. 2013. № 2 (76). С. 6–8.
50. Ivanov A.V. [и др.]. Single Intravenous Injection of Coenzyme Q10 Protects the Myocardium after Irreversible Ischemia // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013. № 6 (155). С. 771–774.

51. Jeya M. [и др.]. Current state of coenzyme Q(10) production and its applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. № 6 (85). С. 1653–1663.
52. Kalenikova E.I. [и др.]. Redox status and pharmacokinetics of coenzyme Q10 in rat plasma after its single intravenous administration // *Biochemistry( Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2014. № 3 (8). С. 267–272.
53. Kalenikova E.I. [и др.]. Multi-Day Monitoring of Ubidecarenone Level in Rat Plasma and Tissues After a Single Intravenous Injection // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016. № 11 (49). С. 719–723.
54. Kalenikova E.I., Gorodetskaya E.A., Medvedev O.S. Pharmacokinetics of coenzyme q10 // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2008. № 3 (146). С. 313–316.
55. Kashiba M., Terashima M., Sagawa T., Yoshimura S., Yamamoto Y. Prosaposin knockdown in Caco-2 cells decreases cellular levels of coenzyme Q10 and ATP, and results in the loss of tight junction barriers // *J Clin Biochem Nutr*. 2017. № 2 (60). С. 81–85.
56. Katayama K., Fujita T. Studies on lymphatic absorption of 1',2'-( 3 H)-coenzyme Q 10 in rats // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1972. № 12 (20). С. 2585–2592.
57. Kawamukai M. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002. № 6 (94). С. 511–517.
58. Kawamukai M. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2009. № Pt 4 (53). С. 217–226.
59. Kawamukai M. Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2016. № 1 (80). С. 23–33.
60. Kearney M. [и др.]. Pharmacological treatments for Friedreich ataxia // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016. № 8. С. CD007791.

61. Kishi H. [и др.]. Metabolism of exogenous coenzyme Q10 in vivo and the bioavailability of coenzyme Q10 preparations in Japan // *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q*. 1964. (4). С. 131–142.
62. Kobori Y. [и др.]. Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 in patients with oligoasthenozoospermia // *Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia: Organo Ufficiale [di] Societa Italiana Di Ecografia Urologica E Nefrologica*. 2014. № 1 (86). С. 1–4.
63. Laaksonen R. [и др.]. Serum and muscle tissue ubiquinone levels in healthy subjects // *J Lab Clin Med*. 1995. № 4 (125). С. 517–521.
64. Lagoutte E. [и др.]. Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2010. № 8 (1797). С. 1500–1511.
65. Langsjoen P.H. [и др.]. Treatment of hypertrophic cardiomyopathy with coenzyme Q10 // *Molecular Aspects of Medicine*. 1997. (18 Suppl). С. S145-151.
66. Langsjoen P.H., Langsjoen A.M. Comparison study of plasma coenzyme Q10 levels in healthy subjects supplemented with ubiquinol versus ubiquinone // *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2014. № 1 (3). С. 13–17.
67. Lankin V.Z. [и др.]. Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress // *Biochemistry. Biokhimiia*. 2007. № 10 (72). С. 1081–1090.
68. Lass A., Sohal R.S. Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998. № 2 (352). С. 229–236.
69. Lee B.-J. [и др.]. The relationship between coenzyme Q10, oxidative stress, and antioxidant enzymes activities and coronary artery disease // *TheScientificWorldJournal*. 2012. (2012). С. 792756.
70. Lee S.Q.E. [и др.]. Cellular factories for coenzyme Q10 production // *Microbial Cell Factories*. 2017. № 1 (16). С. 39.

71. Lei L., Liu Y. Efficacy of coenzyme Q10 in patients with cardiac failure: a meta-analysis of clinical trials // *BMC cardiovascular disorders*. 2017. № 1 (17). С. 196.
72. Liang S., Ping Z., Ge J. Coenzyme Q10 Regulates Antioxidative Stress and Autophagy in Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. (2017). С. 9863181.
73. Lin S.H., Yan J.Y. [Study of coenzyme Q10 in the liver of preeclampsia pregnant rats] // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2016. № 8 (51). С. 608–615.
74. Linnane A.W. [и др.]. Cellular redox activity of coenzyme Q10: effect of CoQ10 supplementation on human skeletal muscle // *Free Radical Research*. 2002. № 4 (36). С. 445–453.
75. Littarru G.P., Ho L., Folkers K. Deficiency of coenzyme Q 10 in human heart disease. II // *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*. 1972. № 3 (42). С. 413–434.
76. Littarru G.P., Tiano L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments // *Molecular Biotechnology*. 2007. № 1 (37). С. 31–37.
77. Lönnrot K. [и др.]. The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity // *Free Radic Biol Med*. 1996. № 2 (21). С. 211–217.
78. Lu W. [и др.]. Identification and elimination of metabolic bottlenecks in the quinone modification pathway for enhanced coenzyme Q10 production in *Rhodobacter sphaeroides* // *Metabolic Engineering*. 2015. (29). С. 208–216.
79. Lucker P.W. [и др.]. Pharmacokinetics of coenzyme ubiquinone in healthy volunteers. In: Folkers K, Yamamura Y, editors. *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q*. // Amsterdam: Elsevier Science Publishers. № 1984. С. 141–151.
80. Luna-Sánchez M., Hidalgo-Gutiérrez A., Hildebrandt T.M., Chaves-Serrano J., Barriocanal-Casado E., Santos-Fandila Á., Romero M., Sayed R.K., Duarte J., Prokisch H., Schuelke M., Distelmaier F., Escames G., Acuña-Castroviejo D., López L.C. CoQ deficiency causes disruption of mitochondrial sulfide oxidation, a

new pathomechanism associated with this syndrome. - PubMed - NCBI 2017. № 1 (9). С. 78–95.

81. Marbois B. [и др.]. para-Aminobenzoic acid is a precursor in coenzyme Q6 biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *The Journal of Biological Chemistry*. 2010. № 36 (285). С. 27827–27838.

82. Martinefski M. [и др.]. Relative bioavailability of coenzyme Q10 formulation for paediatric individualized therapy // *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017. № 5 (69). С. 567–573.

83. Matsuo K. [и др.]. Stability of ubiquinol-10 (reduced form of coenzyme Q10) in human blood // *Biomedical chromatography: BMC*. 2016. № 4 (30). С. 500–502.

84. Miles L., Miles M.V., Tang P.H., Horn P.S., Quinlan J.G., Wong B., Wenisch A., Bove K.E Ubiquinol: a potential biomarker for tissue energy requirements and oxidative stress // *Clin Chim Acta*. 2005. № 360. С. 87–89.

85. Miles M.V.. [и др.]. Plasma coenzyme Q10 reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults // *Clin Chim Acta*. 2003. № 1–2 (332). С. 123–132.

86. Miles M.V. [и др.]. Plasma coenzyme Q10 reference intervals, but not redox status, are affected by gender and race in self-reported healthy adults // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2003. № 1–2 (332). С. 123–132.

87. Miles M.V. [и др.]. Coenzyme Q10 (ubiquinol-10) supplementation improves oxidative imbalance in children with trisomy 21 // *Pediatric Neurology*. 2007. № 6 (37). С. 398–403.

88. Miles M.V. [и др.]. Bioequivalence of coenzyme Q10 from over-the-counter supplements // *Nutrition Research*. 2002. № 8 (22). С. 919–929.

89. Miyamae T. [и др.]. Increased oxidative stress and coenzyme Q10 deficiency in juvenile fibromyalgia: amelioration of hypercholesterolemia and fatigue by ubiquinol-10 supplementation // *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. 2013. № 1 (18). С. 12–19.

90. Moriyama D. [и др.]. Production of CoQ10 in fission yeast by expression of genes responsible for CoQ10 biosynthesis // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015. № 6 (79). С. 1026–1033.
91. Mu F.-S. [и др.]. Synthesis of the Key Intermediate of Coenzyme Q10 // *Molecules*. 2011. № 5 (16). С. 4097–4103.
92. Mugoni V. [и др.]. Ubiad1 is an antioxidant enzyme that regulates eNOS activity by CoQ10 synthesis // *Cell*. 2013. № 3 (152). С. 504–518.
93. Müller T. [и др.]. Coenzyme Q10 supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. // *Neuroscience Letters*. 2003. № 3 (341). С. 201–204.
94. Murphy A Metabolic engineering is key to a sustainable chemical industry. - PubMed - NCBI 2011. № 1406 *Green Chemistry* (28).
95. Muthukumaran K. [и др.]. Ubisol-Q10 (a Nanomicellar Water-Soluble Formulation of CoQ10) Treatment Inhibits Alzheimer-Type Behavioral and Pathological Symptoms in a Double Transgenic Mouse (TgAPESwe, PSEN1dE9) Model of Alzheimer's Disease. // *J Alzheimers Dis*. 2018. (61). С. 221–236.
96. Nakamura T. [и др.]. Metabolism of coenzyme Q10: biliary and urinary excretion study in guinea pigs // *BioFactors* (Oxford, England). 1999. № 2–4 (9). С. 111–119.
97. Nishimura A. [и др.]. Pharmacokinetic Profiles of Coenzyme Q<sub>10</sub>: Absorption of Three Different Oral Formulations in Rats // *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*. 2009. № 4 (55). С. 540–548.
98. Okada K. [и др.]. Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEBS letters*. 1998. № 2 (431). С. 241–244.
99. Olson R.E. Karl August Folkers (1906-1997) // *The Journal of Nutrition*. 2001. № 9 (131). С. 2227–2230.
100. Onoue S. [и др.]. Novel solid self-emulsifying drug delivery system of coenzyme Q<sub>10</sub> with improved photochemical and pharmacokinetic behaviors //

European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences. 2012. № 5 (46). С. 492–499.

101. Onur S. [и др.]. Association between serum level of ubiquinol and NT-proBNP, a marker for chronic heart failure, in healthy elderly subjects. - PubMed - NCBI // Biofactors. 2015. № 1 (41). С. 35–43.

102. Papucci L. [и др.]. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property // The Journal of Biological Chemistry. 2003. № 30 (278). С. 28220–28228.

103. Peerapanyasut W., Thamprasert K., Wongmekiat O. Ubiquinol supplementation protects against renal ischemia and reperfusion injury in rats // Free Radical Research. 2014. № 2 (48). С. 180–189.

104. Pierce J.D. [и др.]. A pilot study exploring the effects of ubiquinol on brain genomics after traumatic brain injury // Nursing Outlook. 2017. № 5S (65). С. S44–S52.

105. Pierrel F. [и др.]. Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis // Chemistry & Biology. 2010. № 5 (17). С. 449–459.

106. Prangthip P. [и др.]. An Improvement of Oxidative Stress in Diabetic Rats by Ubiquinone-10 and Ubiquinol-10 and Bioavailability after Short- and Long-Term Coenzyme Q10 Supplementation // Journal of Dietary Supplements. 2016. № 6 (13). С. 647–659.

107. Roger A. Sheldon Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art // Green Chemistry. 2014. № 3.

108. Rusciani L. [и др.]. Recombinant interferon alpha-2b and coenzyme Q10 as a postsurgical adjuvant therapy for melanoma: a 3-year trial with recombinant interferon-alpha and 5-year follow-up // Melanoma Research. 2007. № 3 (17). С. 177–183.

109. S. de Vries, K. Dörner, M.J.F. Strampraad, T. Friedrich, Electron tunneling rates in respiratory complex I are tuned for efficient energy conversion, Angew. // Chem. Int. Ed. 2015. № 54. С. 2844–2848.

110. Sahebkar A. [и др.]. Supplementation with coenzyme Q10 reduces plasma lipoprotein(a) concentrations but not other lipid indices: A systematic review and meta-analysis // *Pharmacol Res.* 2016. (105). С. 198–209.
111. Sarmiento A. [и др.]. Short-term ubiquinol supplementation reduces oxidative stress associated with strenuous exercise in healthy adults: A randomized trial // *BioFactors* (Oxford, England). 2016. № 6 (42). С. 612–622.
112. Sharma R.K. [и др.]. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility // *Human Reproduction* (Oxford, England). 1999. № 11 (14). С. 2801–2807.
113. Sheeran F.L., Pepe S. Mitochondrial Bioenergetics and Dysfunction in Failing Heart // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017. (982). С. 65–80.
114. Sheldon R. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art 2014. № 16. С. 950–963.
115. Sies H. *Oxidative Stress: Introductory Remarks* Elsevier, 1985. 1–8 с.
116. Soto-Méndez MJ, Aguilera CM, Mesa MD, Campaña-Martín L, Martín-Laguna V, Solomons NW, Schümann K, Gil Á. Strong Associations Exist among Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in the Circulating, Cellular and Urinary Anatomical Compartments in Guatemalan Children from the Western Highlands // *PLoS One*. 2016. № 20. С. e0149740.
117. Tafazoli A. Coenzyme Q10 in breast cancer care // *Future Oncology* (London, England). 2017. № 11 (13). С. 1035–1041.
118. Tang P.H., Miles M.V. Measurement of oxidized and reduced coenzyme Q in biological fluids, cells, and tissues: an HPLC-EC method // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 2012. (837). С. 149–168.
119. Tarry-Adkins J.L. [и др.]. Coenzyme Q10 prevents hepatic fibrosis, inflammation, and oxidative stress in a male rat model of poor maternal nutrition and accelerated postnatal growth // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2016. № 2 (103). С. 579–588.

120. Tatsuta Y. [и др.]. Imaging mass spectrometry analysis of ubiquinol localization in the mouse brain following short-term administration // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7). С. 12990.
121. Thakur A.S. [и др.]. Effect of Ubiquinol on Serum Reproductive Hormones of Amenorrhic Patients // *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*. 2016. № 3 (31). С. 342–348.
122. Thelin A., Schedin S., Dallner G. Half-life of ubiquinone-9 in rat tissues // *FEBS letters*. 1992. № 2 (313). С. 118–120.
123. Tian Y. [и др.]. Tobacco biomass hydrolysate enhances coenzyme Q10 production using photosynthetic *Rhodospirillum rubrum* // *Bioresource Technology*. 2010. № 20 (101). С. 7877–7881.
124. Tomasetti M. [и др.]. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes // *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. № 9–10 (27). С. 1027–1032.
125. Tomono Y. [и др.]. Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man // *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*. 1986. № 10 (24). С. 536–541.
126. Traber M.G. [и др.]. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins // *Lipids*. 1992. № 9 (27). С. 657–663.
127. Tran U.C., Clarke C.F. Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes // *Mitochondrion*. 2007. (7 Suppl). С. S62-71.
128. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q // *Biochim Biophys Acta*. 2004. № 1–2 (1660). С. 171–199.
129. Venegoni W. [и др.]. The use of antioxidants in the treatment of traumatic brain injury // *Journal of Advanced Nursing*. 2017. № 6 (73). С. 1331–1338.
130. Verkhovskaya M.L. [и др.]. Real-time electron transfer in respiratory complex I // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. № 10 (105). С. 3763–3767.

131. Wang Y., Hekimi S. Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2013. № 1 (48). С. 69–88.
132. Xue R. [и др.]. Coenzyme Q10 inhibits the activation of pancreatic stellate cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway // *Oncotarget*. 2017. № 54 (8). С. 92300–92311.
133. YAMAMOTO Y. Formation of lipid hydroperoxides in the cupric ion-induced oxidation of plasma and low density lipoprotein // *Oxidative Damage and Repair*. 1991.
134. Yamamoto Y Plasma marker of tissue oxidative damage and edaravone as a scavenger drug against peroxy radicals and peroxy nitrite // *J Clin Biochem Nutr*. 2017. № 60. С. 49–54.
135. Yang S. Preparation, in vitro Characterization and Pharmacokinetic Study of Coenzyme Q10 Long-Circulating Liposomes // *Drug Res (Stuttg)*. 2018. № 5 (68). С. 270–279.
136. Yoneda T. [и др.]. Application of coenzyme Q10 for accelerating soft tissue wound healing after tooth extraction in rats // *Nutrients*. 2014. № 12 (6). С. 5756–5769.
137. Yuan Y., Tian Y., Yue T. Improvement of coenzyme Q10 production: mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment and optimization of fermentation conditions // *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2012. (2012). С. 607329.
138. Zaghoul A.A. [и др.]. Bioavailability assessment of oral coenzyme Q10 formulations in dogs // *Drug Dev Ind Pharm*. 2002. № 10 (28). С. 1195–1200.
139. Zhang Y. [и др.]. Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats // *The Journal of Nutrition*. 1995. № 3 (125). С. 446–453.
140. Zhang Y., Turunen M., Appelkvist E.L. Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of alpha-tocopherol into rat organs and cells // *The Journal of Nutrition*. 1996. № 9 (126). С. 2089–2097.

141. Zhao Q. [и др.]. Effect of coenzyme Q10 on the incidence of atrial fibrillation in patients with heart failure // *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*. 2015. № 5 (63). С. 735–739.
142. Zhu Z.-G. [и др.]. The efficacy and safety of coenzyme Q10 in Parkinson's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials // *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2017. № 2 (38). С. 215–224.
143. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative stress // *Anal Biochem*. 1997. № 250. С. 66–73.