

УДК 615.032; 615.033

©Коллектив авторов

РЕДОКС-СТАТУС И ФАРМАКОКИНЕТИКА КОЭНЗИМА Q₁₀ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫСЫ ПОСЛЕ ЕГО ОДНОКРАТНОГО ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Е.И. Каленикова^{1,2}, Е.В. Харитонова¹, Е.А. Городецкая^{1,2},
О.Г. Токарева¹, О.С. Медведев¹*

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

Воробьевы горы, 1, Москва; тел.: 8 (495) 932 99 11; эл. почта: eikaleni@fbm.msu.ru

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава, Москва

Изучена фармакокинетика общего пула коэнзима Q₁₀ (CoQ₁₀), его окисленной (убихинон) и восстановленной (убихинол, CoQ₁₀H₂) форм в плазме крови крысы на протяжении 48 ч после однократного внутривенного введения раствора солиобилизованного CoQ₁₀ (10 мг/кг). Определение CoQ₁₀ в плазме крови проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим и кулонометрическим детектированием. Показано, что на протяжении двух недель хранения при -20°C в образцах плазмы, отобранной в первые минуты после внутривенной инъекции CoQ₁₀, общее содержание коэнзима Q₁₀ и доля CoQ₁₀H₂ остаются неизменными. Кинетическая кривая общего пула коэнзима Q₁₀ соответствует одночастевой модели (R²=0,9932), его окисленной формы – двухчастевой. Показано, что уже в первые минуты после инъекции значительная часть убихинона в плазме восстанавливается, и спустя 7 ч концентрация убихинола становится преобладающей. На фоне снижения общего содержания коэнзима Q₁₀ доля убихинола в плазме неуклонно возрастает и к концу первых суток составляет около 90%. Полученные результаты доказывают способность организма трансформировать высокие концентрации окисленной формы CoQ₁₀ в эффективную антиоксидантную восстановленную форму и обосновывают перспективность разработки парентеральных лекарственных форм CoQ₁₀ для применения в терапии острых патологических состояний.

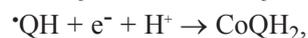
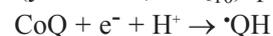
Ключевые слова: коэнзим Q₁₀, CoQ₁₀, убихинон, убихинол, редокс-статус, внутривенное введение, фармакокинетика, ВЭЖХ.

ВВЕДЕНИЕ

Коэнзим Q₁₀ (кофермент Q₁₀, CoQ₁₀, убихинон) – единственный эндогенно синтезируемый жирорастворимый антиоксидант – выполняет в организме множество различных функций, связанных с его окислительно-восстановительным статусом [1, 2]. CoQ₁₀ представляет собой 2,3-диметокси-5-метил-6-декапренил-1,4-бензохинон.

В клетках человека CoQ₁₀ является участником дыхательной цепи митохондрий, где его функция заключается в переносе электронов от NADH-дегидрогеназного и сукцинатдегидрогеназного комплексов (комплексы I, II соответственно) на цитохром b₅ (комплекс III) [2, 3]. В организме CoQ₁₀ существует

в восстановленной (убихинол, CoQ₁₀H₂) и окисленной (убихинон, CoQ₁₀) формах:



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

Именно в восстановленной форме CoQ₁₀ выступает в качестве антиоксиданта, предотвращающего повреждение ДНК, липидов, белков и других молекул [4-6]. Он необходим для нормальной жизнедеятельности живых организмов и, в особенности, для функционирования тканей с высоким уровнем энергетического обмена. Наибольшие концентрации CoQ₁₀ обнаружены в сердечной мышце, почках и печени [7, 8]. Потребности организма в убихиноне обеспечиваются

* - адресат для переписки

за счёт эндогенного синтеза и поступления с пищей. Старение и патологические процессы ведут к снижению уровней убихинона в крови и тканях [9-11], поэтому CoQ_{10} рекомендован для профилактики и в дополнение к традиционной терапии сердечно-сосудистых, неврологических и ряда других заболеваний. Содержащие CoQ_{10} препараты и биологически активные добавки предназначены для приёма внутрь, биодоступность CoQ_{10} при котором крайне мала [12]. Фармакокинетика и редокс-статус CoQ_{10} в плазме крови после внутривенного введения, обеспечивающего максимальную биодоступность, практически не изучены.

Цель работы: изучение фармакокинетики общего пула CoQ_{10} , его окисленной и восстановленной форм в плазме крови крысы после однократного внутривенного введения раствора солюбилизованного CoQ_{10} .

МЕТОДИКА

Протокол фармакокинетического исследования

Исследование выполнено на самцах крыс Wistar ($n=4$) массой 250–300 г. Животным под наркозом (пентобарбитал, 50 мг/кг внутривенно) имплантировали катетеры: в бедренную вену – для введения препарата и в бедренную артерию – для последующего отбора образцов крови. Через сутки после операции бодрствующим животным натошак внутривенно вводили раствор солюбилизованного CoQ_{10} в дозе 10 мг/кг (препарат Кудесан раствор, “Аквилон”, Москва, Россия). На протяжении двух суток после введения CoQ_{10} животных не кормили, не ограничивая доступ к воде. Отбор проб крови (по 0,3 мл) проводили до и спустя 0,1; 0,25; 1; 3; 5; 7; 9; 24; 32; 48 ч после инъекции препарата. Кровь немедленно центрифугировали, плазму отбирали, замораживали и хранили не более двух недель при -20°C до проведения анализа.

Анализ CoQ_{10} в плазме крови

Экстракцию CoQ_{10} из плазмы крови проводили по методике Lass и Sohal [13] с небольшими изменениями [14]. К плазме крови добавляли этанол и *n*-гексан (1:2:5), тщательно встряхивали в течение 10 мин, центрифугировали (4000 g) в течение 3 мин и отбирали верхний слой *n*-гексана. Процедуру экстракции повторяли, добавляя *n*-гексан. Порции экстракта объединяли, упаривали досуха и растворяли в аликвоте этанола.

Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе “Стайер” (“Аквилон”) методом обращённофазовой ВЭЖХ в изократическом режиме, используя колонку Phenomenex, Luna C18, 150×4,6 мм, 5 мкм. Скорость подачи элюента была 1,4 мл/мин.

Общее содержание CoQ_{10} (TCoQ_{10}) в плазме определяли с помощью электрохимического детектора (ЭХ), содержание окисленной формы – с использованием спектрофотометрического детектора (СФ). Концентрации убихинола рассчитаны для каждой пробы по разнице данных электрохимического и спектрофотометрического определений.

При определении общего содержания CoQ_{10} использовали кулонометрический детектор “Coulchem II” с ячейкой модели 5011 (“ESA”, США). Подвижная фаза состояла из 0,3% (масса/объём) NaCl (в/о) в смеси этанол:метанол: 7% HClO_4 (975:15:10). Окисленную форму в экстракте плазмы перед внесением на колонку восстанавливали до $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ добавлением раствора натрия тетрагидробората в этаноле. Полноту восстановления проверяли повторным добавлением аликвоты раствора восстановителя. Время удерживания $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ составляло 10,0 мин (рис. 1а). ЭХ-детектирование $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ осуществляли в окислительном режиме при напряжениях -50 мВ/ $+350$ мВ на первом/втором электродах. Регистрацию и обработку хроматографических данных проводили с помощью компьютерной программы фирмы “Environmental Sciences Associate, Inc.” (США).

При СФ-детектировании убихинона ($\lambda_{\text{max}}=275$ нм) в качестве элюента использовали 96% этанол; время удерживания CoQ_{10} составляло 11,85 мин (рис. 1б). Хроматографические параметры рассчитывали с использованием программы МультиХром, версия 3.X.

Отклик СФ-детектора был линейен в интервале 0,2–500 мкг/мл ($r=0,9999$; рис. 2а), электрохимического – в пределах 0,01–100 мкг/мл ($r=0,9995$; рис. 2б). Предел обнаружения CoQ_{10} в инъектируемой пробе составил 4 нг при СФ-детектировании и 0,1 нг – при ЭХ-детектировании.

Для определения CoQ_{10} в образцах плазмы предварительно были построены градуировочные графики по результатам анализа модельных смесей убихинона с плазмой крови с ЭХ- и СФ-детектированием (рис. 3). Серию стандартных разведений CoQ_{10} в этаноле готовили с использованием субстанции убидекаренона производства фирмы “Kaneka” (Япония).

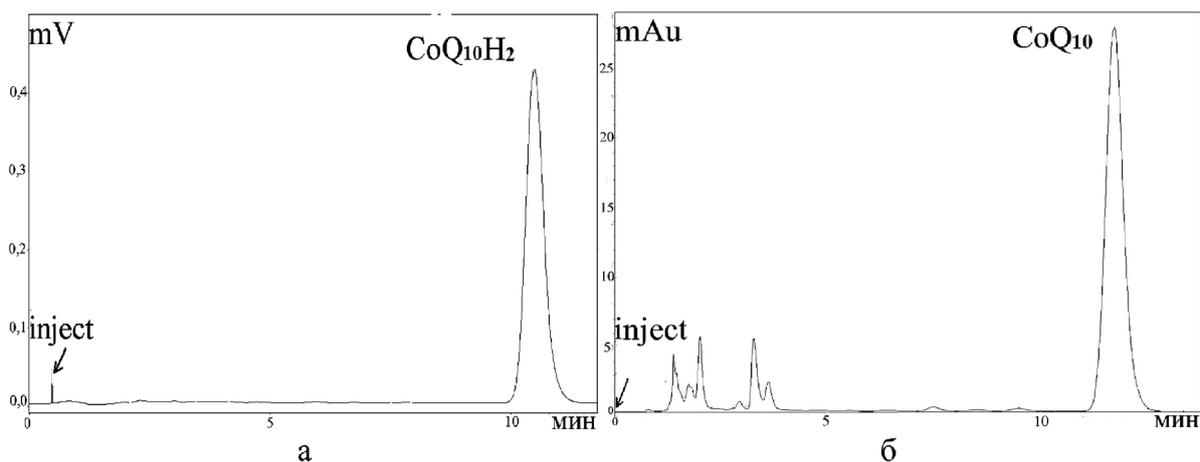


Рисунок 1. Хроматограммы, полученные с электрохимическим детектором при внесении стандартного разведения убихинона (CoQ_{10}) в этанол после предварительного восстановления до $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ (а) и со спектрофотометрическим детектором при $\lambda_{\text{max}}=275$ нм для того же стандартного разведения CoQ_{10} без восстановления (б).

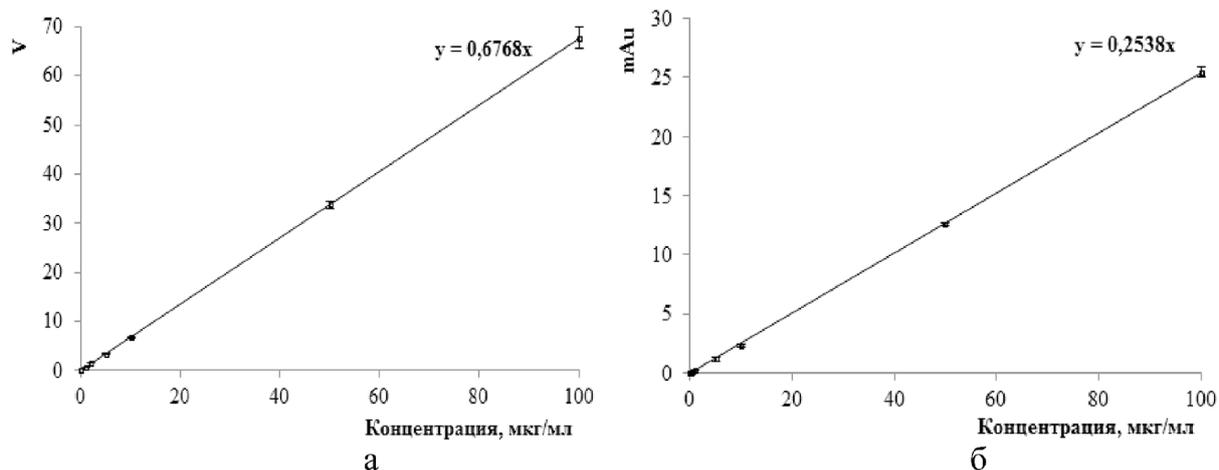


Рисунок 2. Градуировочные графики, построенные для стандартных спиртовых разведений CoQ_{10} с использованием электрохимического детектора (а) и спектрофотометрического детектора при $\lambda_{\text{max}}=275$ нм (б). Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка ($n=4$).

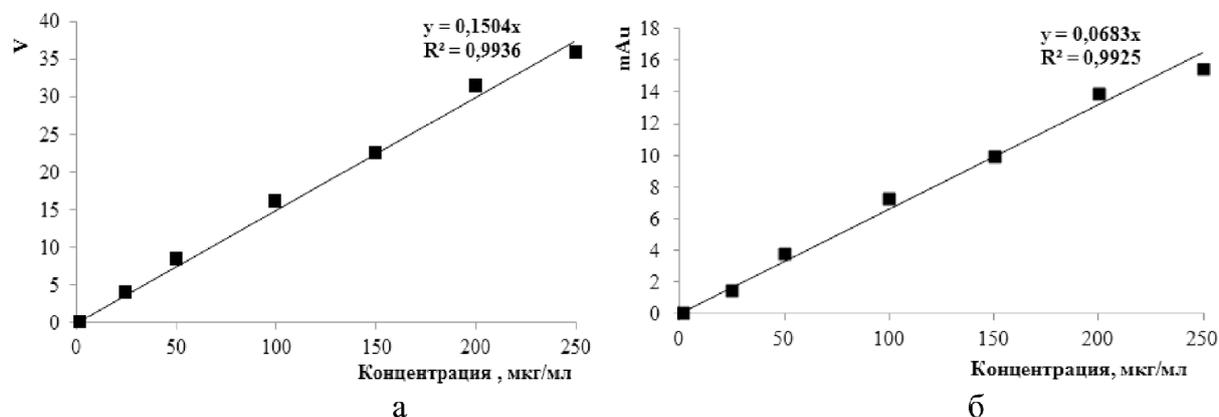


Рисунок 3. Градуировочные графики, построенные по результатам ВЭЖХ-ЭХ (а) и ВЭЖХ-СФ при $\lambda_{\text{max}}=275$ нм (б) анализа модельных смесей убихинона с плазмой крови.

РЕДОКС-СТАТУС CoQ_{10} ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

На хроматограмме можно последовательно обнаруживать и восстановленную, и окисленную формы коэнзима Q_{10} спектрофотометрически, переключая длину волны детектора с 290 нм (λ_{max} для $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) на 275 нм (λ_{max} для CoQ_{10}) (рис. 4). Однако довольно сложно провести калибровку по убихинолу методом добавок $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазму, так как невозможно полностью предотвратить и оценить его частичное окисление в процессе пробоподготовки. Поэтому оценка редокс-статуса CoQ_{10} в плазме крови фактически сводится к оценке редокс-статуса CoQ_{10} в экстракте плазмы.

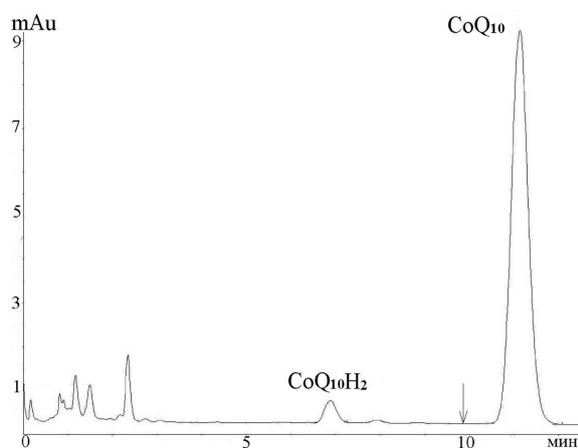


Рисунок 4. Хроматограмма экстракта плазмы, содержащего окисленную и восстановленную формы CoQ_{10} . Спектрофотометрическое детектирование с переключением длины волны детектора с 290 нм на 275 нм (отмечено стрелкой).

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

Стабильность $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в плазме крови при хранении в морозильной камере (-20°C) изучали в отдельной серии экспериментов. Образец плазмы крови, отобранной в первые

минуты после внутривенного введения крысе раствора солюбилизованного CoQ_{10} в дозе 10 мг/кг, был разделен на порции по 100 мкл. Определение $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и TCoQ_{10} в экстрактах плазмы проводили сразу после отбора образца крови и по истечении 2, 3, 4, 6, 9, 14 суток хранения плазмы.

В этой серии экспериментов для анализа экстрактов плазмы использовали возможности электрохимического детектора. Каждый экстракт анализировали дважды: до внесения восстановителя определяли концентрацию $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ и затем, после полного восстановления окисленной формы раствором NaBH_4 , общую концентрацию коэнзима Q_{10} . Данные для каждой пробы представлены как среднее значение трёх измерений (рис. 5). Результаты количественного анализа представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка определения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Графическое сопоставление данных ВЭЖХ-СФ и ВЭЖХ-ЭХ определения CoQ_{10} в серии плазменных разведений в диапазоне 1,7-200 мкг/мл продемонстрировало высокую сходимость результатов ($y=0,909x$; рис. 6), что позволило комбинировать эти две методики в анализе одного и того же образца плазмы.

Определение соотношения окисленной и восстановленной форм CoQ_{10} в биологических объектах является отдельной аналитической задачей, так как убихинол легко окисляется до убихинона под действием различных факторов. Legendijk и соавт. [15] показали, что $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ нестабилен в крови, плазме и в экстракте изопропанола: соотношение $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{CoQ}_{10}$ значительно меняется уже в течении часа после отбора образцов крови. Авторы рекомендуют проводить анализ немедленно после взятия образцов,

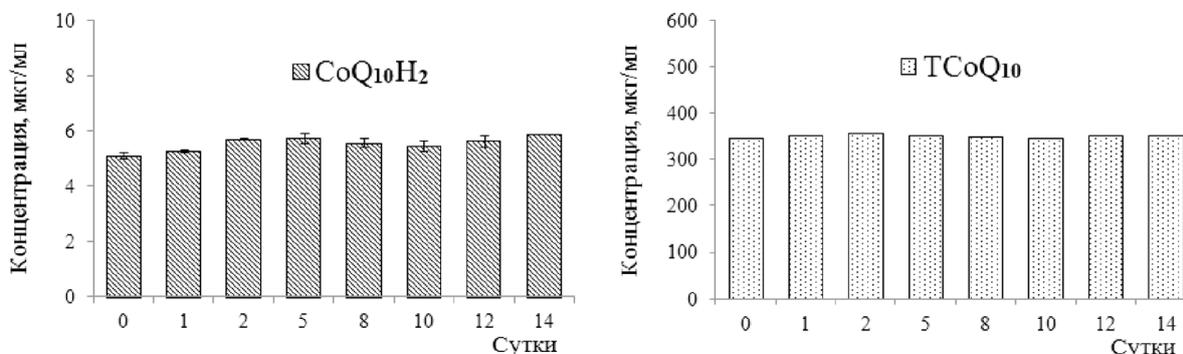


Рисунок 5. Общее содержание CoQ_{10} (TCoQ_{10}) и его восстановленной формы ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) в плазме крови, отобранной после внутривенного введения крысе солюбилизованного CoQ_{10} (10 мг/кг). Представлены данные определения в аликвотах плазмы, полученные сразу после отбора образца крови и на протяжении последующих 14 суток хранения плазмы при -20°C .

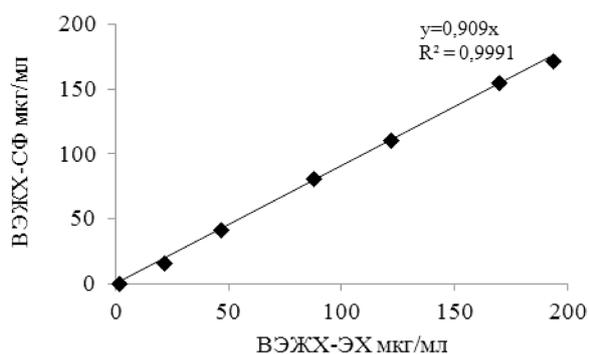


Рисунок 6. Сходимость результатов определения убихинона в искусственных смесях с плазмой крови методом ВЭЖХ с электрохимическим и спектрофотометрическим детектированием.

либо хранить плазму при -75°C , что в течение 13 месяцев сохраняет отношение $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2/\text{CoQ}_{10}$ неизменным. Однако есть исследования, в которых не было отмечено окисления восстановленной формы CoQ_{10} в течение определенного промежутка времени. Так, Tang и соавт. [16] изучали стабильность $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в образцах крови. Эксперимент проводили сразу после отбора венозной крови у людей и по истечении 8 ч хранения при 4°C . Результаты показали, что в холодильной камере на протяжении 8 ч содержание $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в образцах плазмы не меняется.

Wang и соавт. [17] показали, что в свежеприготовленном спиртовом экстракте из плазмы и через 12 ч сохраняется общая концентрация CoQ_{10} и соотношение убихинол/убихинон.

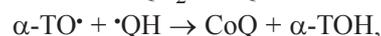
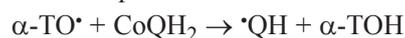
По данным авторов статьи [18], при комнатной температуре (22°C) окисление убихинола происходит с минимальной скоростью ($0,1\%/час$) в течение суток в органических растворителях и крови, в образцах плазмы – на протяжении 3-х ч после центрифугирования.

Данные, представленные на рисунке 5, демонстрируют, что на протяжении двух недель хранения при -20°C плазмы крови, отобранной вскоре после внутривенного введения солилилизированного CoQ_{10} , общее содержание коэнзима Q_{10} и доля $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ остаются неизменными. Этот результат гарантирует объективность определения TCoQ_{10} и $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в образцах плазмы, отобранных в фармакокинетическом эксперименте и хранившихся до анализа в морозильной камере в течение 14 суток.

По результатам анализа образцов плазмы, отобранных на протяжении 2-х суток после внутривенной инъекции убихинона, построены кинетические кривые общего содержания

CoQ_{10} , его окисленной и восстановленной форм (рис. 7а). Кинетическая кривая общего содержания коэнзима Q_{10} после внутривенного введения соответствует одночастевой модели ($R^2=0,9932$), его окисленной формы – двухчастевой (рис. 7б). Первая фаза кинетической кривой убихинона продолжается на протяжении суток и обусловлена, преимущественно, его интенсивным восстановлением (рис. 8); к 24 ч доля убихинола достигает максимума и далее скорость снижения концентрации убихинона в плазме замедляется.

Известно, что у человека плазменный пул CoQ_{10} представлен более чем на 90% его восстановленной формой – убихинолом [19]. Убихинол плазмы распределён преимущественно в липопротеинах различной плотности для защиты их от окисления. Считается, что важнейшей функцией $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ в липопротеинах является регенерация α -токофероксильного радикала – продукта окисления α -токоферола в реакции с липидными радикалами [20]. Восстановление окисленных форм CoQ_{10} в плазме крови происходит при участии аскорбиновой кислоты.



где $\alpha\text{-TO}\cdot$ – токофероксильный радикал.

Внутривенное введение убихинона в окисленной форме, создающее в плазме крови крысы концентрации, на три порядка превышающие эндогенный уровень CoQ_{10} , является своеобразной проверкой ёмкости восстанавливающих механизмов.

Результаты, полученные в данном исследовании, показали, что в первые минуты после внутривенного введения значительная часть убихинона в плазме восстанавливается до убихинола, и спустя 7 ч концентрация $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ становится преобладающей. На фоне снижения общего содержания CoQ_{10} доля $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ постепенно возрастает с 19% на 5-й минуте до своего максимума (89%) через сутки (рис. 8). По истечении 48 ч общая концентрация коэнзима Q_{10} в плазме крыс всё ещё многократно превышает фоновую.

Следовательно, внутривенное введение раствора солилилизированного CoQ_{10} даёт возможность мгновенно достичь высоких концентраций убихинона, который, восстанавливаясь, в течение нескольких часов поддерживает стабильный повышенный плазменный уровень убихинола – одного из самых эффективных и безопасных антиоксидантов эндогенной природы.

РЕДОКС-СТАТУС CoQ_{10} ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

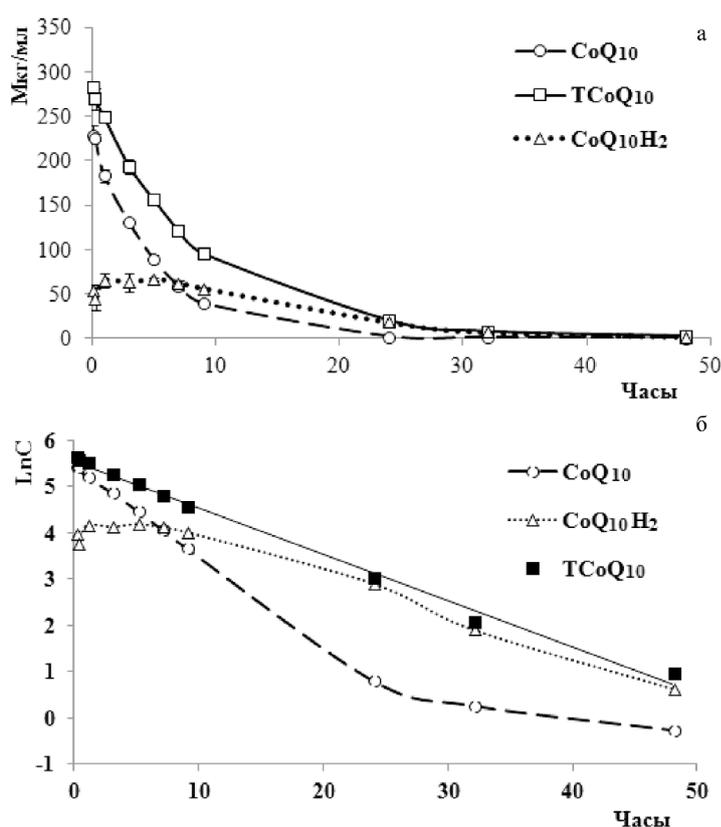


Рисунок 7. Кинетические кривые плазменных концентраций убихинона (CoQ_{10}), убихинола ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) и общего пула (TCoQ_{10}) CoQ_{10} при внутривенном введении раствора солиобилизованного CoQ_{10} в дозе 10 мг/кг (а). Кинетические кривые общего содержания CoQ_{10} и окисленной формы в полулогарифмических координатах (б).

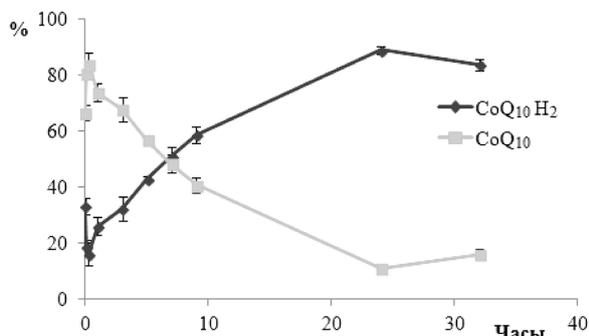


Рисунок 8. Изменения соотношения окисленной (CoQ_{10}) и восстановленной ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$) форм CoQ_{10} в плазме крыс на протяжении 48 ч после внутривенного введения препарата кудесан раствор. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена фармакокинетика общего пула коэнзима Q_{10} , его окисленной и восстановленной форм в плазме крови крыс на протяжении 48 ч после однократного внутривенного введения раствора солиобилизованного

CoQ_{10} (10 мг/кг). Результаты, полученные методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием, доказывают способность организма трансформировать высокие концентрации окисленной формы CoQ_{10} в эффективную антиоксидантную восстановленную форму, что обосновывает перспективность разработки парентеральных лекарственных форм CoQ_{10} для применения в терапии острых патологических состояний.

Исследования проведены при финансовой поддержке грантов РФФИ 11-04-00894а и 12-04-01246а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cluis C.P., Pinel D., Martin V.J.* (2012) *Subcell. Biochem.*, **64**, 303-326.
2. *Crane F.L.* (2001) *J. Am. Coll. Nutr.*, **20**, 591-598.
3. *Crane F.L., Hatefi Y., Lester R.L., Widmer C.* (1957) *Biochim. Biophys. Acta.*, **25**, 220-221.
4. *Belliere J., Devun F., Cottet-Rousselle C., Batandier C., Leverve X., Fontaine E.* (2012) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **44**, 207-212.

5. *Ernster L., Forsmark-Andree P.* (1993) *Clin. Investig.*, **71**(8 Suppl), S60-65.
6. *Littarru G.P., Tiano L.* (2007) *Mol. Biotechnol.*, **37**(1), 31-37.
7. *Zhang Y., Turunen M., Appelkvist E.L.* (1996) *J. Nutr.*, **126**, 2089-2097.
8. *Turunen M., Olsson J., Dallner G.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1660**(1-2), 171-199.
9. *Kalen A., Appelkvist E.L., Dallner G.* (1989) *Lipids*, **24**, 579-584.
10. *Cocchi M.N., Giberson B., Berg K., Saliccioli J.D., Naini A., Buettner C., Akuthota P., Gautam S., Donnino M.W.* (2012) *Resuscitation*, **83**, 991-995.
11. *Lee B.J., Lin Y.C., Huang Y.C., Ko Y.W., Hsia S., Lin P.T.* (2012) *Scientific World Journal*, **2012**, 792756.
12. *Zhang Y., Aberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L.* (1995) *J. Nutr.*, **125**, 446-453.
13. *Lass A., Sohal R.S.* (1999) *Free Radic. Biol. Med.*, **27**(1-2), 220-226.
14. *Kalenikova E.I., Gorodetskaya E.A., Kolokolchikova E.G., Shashurin D.A., Medvedev O.S.* (2007) *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 332-338.
15. *Lagendijk J., Ubbink J.B., Vermaak W.J.* (1996) *J. Lipid Res.*, **37**, 67-75.
16. *Tang P.H., Miles M.V., DeGrauw A., Hershey A., Pesce A.* (2001) *Clin. Chem.*, **47**, 256-265.
17. *Wang Q., Lee B.L., Ong C.N.* (1999) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **726**(1-2), 297-302.
18. *Franke A.A., Morrison C.M., Bakke J.L., Custer L.J., Li X., Cooney R.V.* (2010) *Free Radic. Bio. Med.*, **48**, 1610-1617.
19. *Aberg F., Appelkvist E.L., Dallner G., Ernster L.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**, 230-234.
20. *Mohr D., Bowry V.W., Stocker R.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1126**, 247-254.

Поступила: 26. 04. 2013.

HPLC ESTIMATION OF COENZYME Q₁₀ REDOX STATUS IN PLASMA AFTER INTRAVENOUS COENZYME Q₁₀ ADMINISTRATION

E.I. Kalenikova^{1,2}, E.V. Kharitonova¹, E.A. Gorodetskaya^{1,2}, O.G. Tokareva¹, O.S. Medvedev¹

¹Lomonosov Moscow State University,

1 Vorobyovy Gory, Moscow, Russia; tel.: 8 (495) 932 99 11; e-mail: eikaleni@fbm.msu.ru

²Russian Cardiology Research Center and Production Complex, Moscow, Russia

The pharmacokinetics of the total pool of coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀), its oxidized (ubiquinone) and reduced (ubiquinol, CoQ₁₀H₂) forms have been investigated in rats plasma during 48 h after a single intravenous injection of a solution of solubilized CoQ₁₀ (10 mg/kg) to rats. Plasma levels of CoQ₁₀ were determined by HPLC with spectrophotometric and coulometric detection. In plasma samples taken during the first minutes after the CoQ₁₀ intravenous injection, the total pool of coenzyme Q₁₀ and proportion of CoQ₁₀H₂ remained unchanged during two weeks of storage at -20°C. The kinetic curve of the total pool of coenzyme Q₁₀ corresponds to a one-part model ($R^2 = 0.9932$), while the corresponding curve of its oxidized form fits to the two-part model. During the first minutes after the injection a significant portion of plasma ubiquinone undergoes reduction, and after 7 h the concentration of ubiquinol predominates. The decrease in the total plasma coenzyme Q₁₀ content was accompanied by the gradual increase in plasma ubiquinol, which represented about 90% of total plasma CoQ₁₀ by the end of the first day. The results of this study demonstrate the ability of the organism to transform high concentrations of the oxidized form of CoQ₁₀ into the effective antioxidant (reduced) form and justify prospects of the development of parenteral dosage forms of CoQ₁₀ for the use in the treatment of acute pathological conditions.

Key words: coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀, CoQ₁₀H₂, ubiquinone, ubiquinol, redox status, intravenous administration, pharmacokinetics, HPLC.