

На правах рукописи



Зозина Владлена Игоревна

Разработка методики количественного определения и ВЭЖХ-анализ убихинола и убихинона в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями при назначении отечественного лекарственного средства Кудесан®

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата фармацевтических наук

Москва - 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук

Кондратенко Светлана Николаевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Кукес Владимир Григорьевич

Официальные оппоненты:

Шохин Игорь Евгеньевич, доктор фармацевтических наук, Общество с ограниченной ответственностью «Центр Фармацевтической Аналитики», генеральный директор

Жердев Владимир Павлович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», лаборатория фармакокинетики, заведующий лабораторией

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «23» декабря 2022 г. в 13.00 ч. на заседании диссертационного Совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу 119034 г. Москва, Зубовский бул., д. 37/1 и на сайте организации <http://sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтически наук, профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Кудесан® является зарегистрированным лекарственным средством из фармакологической группы антигипоксантов и антиоксидантов, основным действующим веществом которого является убидекаренон или коэнзим Q10. Коэнзим Q10 (CoQ10) – антиоксидант эндогенного происхождения, защищающий плазматическую мембрану от пероксидного окисления липидов, предотвращающий повреждение ДНК, липидов, белков и других молекул. В организме CoQ10 существует в двух формах: окисленная (убихинон) и восстановленная (убихинол), обладающая непосредственной активностью против окислителей. Отношение концентраций убихинол/убихинон, определяемое как редокс-статус коэнзима Q10, рассматривается как один из важных показателей состояния антиоксидантной системы организма.

В настоящее время достаточно широко изучены эндогенные концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и определен его редокс-статус в плазме крови практически здоровых лиц. Концентрация эндогенного общего CoQ10 в плазме крови взрослых практически здоровых лиц варьирует в достаточно широких пределах: от 0,78 мкг/мл до 1,65 мкг/мл, и зависит от различных факторов. Считается, что у человека плазменный пул CoQ10 представлен более чем на 90% его восстановленной формой – убихинолом, а среднее значение редокс-статуса CoQ10 у здоровых лиц составляет 95/5.

CoQ10 является перспективным кардиопротектором, поддержание его постоянного уровня в организме является необходимым. В ряде исследований показано, что применение препаратов коэнзима Q10 в суточной дозе 100–300 мг сопровождалось улучшением клинико-функционального состояния больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) и повышением плазменной концентрации общего CoQ10. Однако влияние приема лекарственных препаратов коэнзима Q10 на плазменные уровни убихинола, убихинона и редокс-статус CoQ10 изучено только в исследованиях у здоровых добровольцев.

Поэтому представлялось актуальным изучить плазменные концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и оценить его редокс-статус у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (0-I и II-III ФК ХСН по NYHA) на фоне стандартной терапии и при дополнительном назначении отечественного лекарственного средства Кудесан®, содержащего коэнзим Q10, и антиоксиданта Этоксидол. Для этого необходим надежный метод количественного анализа, позволяющий определять плазменную концентрацию как общего CoQ10, так и убихинола и убихинона.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время опубликован достаточно широкий спектр методик количественного определения убихинона и убихинола в плазме крови пациентов. Однако в большинстве случаев

авторы определяют либо только общий CoQ10, прибегая к окислению убихинола или восстановлению убихинона (Mosca F. et al. 2002), либо при одновременном определении убихинона и убихинола пренебрегают добавлением стабилизатора для предотвращения окисления убихинола (Claessans A.J. et al. 2016, Ruiz-Jimenez J. et al. 2007), что может приводить к значительным ошибкам в определении концентрации как убихинола, так и убихинона. Помимо этого, практически ни в одной работе, изучающей влияние препаратов на эндогенную концентрацию CoQ10, при разработке методики количественного определения, не учитывается эффект матрицы и эндогенный фон, что не является корректным для валидации и дальнейшей работы с методом.

Цель исследования

Разработка методики количественного определения убихинона, убихинола и общего коэнзима Q10 в плазме крови методом ВЭЖХ и определение их плазменной концентрации у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, принимающих стандартную терапию, а также при дополнительном назначении антиоксиданта Этоксидол и лекарственного препарата коэнзима Q10 Кудесан® для уточнения их влияния на редокс-статус CoQ10.

Задачи исследования

1. Разработать методики количественного определения убихинола, убихинона, общего коэнзима Q10 в плазме крови пациентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
2. Провести валидацию разработанных методик количественного определения убихинола, убихинона, общего CoQ10 в плазме крови в соответствии с критериями валидации.
3. При помощи разработанных методик провести количественное определение общего коэнзима Q10 в плазме крови практически здоровых лиц, а также убихинона, убихинола и общего CoQ10 в плазме крови больных 0-I и II-III ФК ХСН (по NYHA) методом ВЭЖХ-МС/МС.
4. Апробировать разработанные методики для оценки влияния лекарственных средств различной химической структуры и фармакологического действия – амлодипина (блокатор кальциевых каналов), аторвастатина (статины), этоксидола (антиоксидант) – на эндогенную плазменную концентрацию убихинола, убихинона, общего коэнзима Q10 и его редокс-статус у больных II-III ФК ХСН.
5. Изучить влияние отечественного лекарственного средства Кудесан® (препарат коэнзима Q10) в составе стандартной терапии больных 0-I ФК ХСН на плазменную концентрацию убихинола, убихинона, общего коэнзима Q10 и его редокс-статус с помощью разработанных методик.

Научная новизна

Разработаны методики количественного определения общего CoQ10 методом ВЭЖХ-УФ, а также убихинона, убихинола и общего коэнзима Q10 в плазме крови пациентов при помощи ВЭЖХ-МС/МС. Методом ВЭЖХ-МС/МС изучены эндогенные плазменные концентрации

убихинола и убихинона, определен редокс-статус коэнзима Q10 у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), артериальной гипертензией (АГ) и ХСН. Определены концентрации убихинола, убихинона, общего коэнзима Q10 и его редокс-статус в плазме крови больных 0-I ФК ХСН, принимающих в составе стандартной терапии Кудесан®. Оценено влияние антиоксиданта этоксилола в составе стандартной терапии на эндогенную плазменную концентрацию убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус у больных II-III ФК ХСН. Уточнено влияние аторвастатина (статины) и амлодипина (блокатор Ca каналов) на концентрацию убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус в плазме крови больных II-III ФК ХСН.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, свидетельствуют о статистически достоверном влиянии Аторвастатина, Амлодипина, Этоксидола и Кудесана® на концентрации общего CoQ10, убихинона и убихинола. В исследовании разработан методический подход для количественного определения убихинона, убихинола и расчета редокс-статуса коэнзима Q10. Полученные данные подтверждают перспективность данной темы по дальнейшему изучению влияния различных лекарственных средств на эндогенный уровень как CoQ10, так и его редокс-статуса в плазме крови больных с различными заболеваниями.

Научно обосновано дополнительное назначение к стандартной терапии ИБС, АГ и 0-I ФК ХСН лекарственного средства Кудесан® (содержащего коэнзим Q10), поскольку это позволяет значительно повысить концентрацию убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статус в плазме крови больных, что приводит к усилению антиоксидантной защиты организма и устранению одной из основных причин заболевания – оксидативного стресса.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала систематизацию и анализ литературных данных, оценку существующих методик определения убихинона, убихинола и общего CoQ10, а также исследованию по влиянию различных препаратов на концентрацию CoQ10. В диссертационном исследовании разработаны методики количественного определения убихинола, убихинона, общего CoQ10 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием. При сравнительном анализе двух разработанных методик установлено, что из-за относительно низкой чувствительности разработанная методика со спектрофотометрическим детектированием может быть использована только для определения общего CoQ10, а также в биофармацевтическом анализе. Поэтому концентрацию убихинола, убихинона и CoQ10 в плазме крови больных определяли при помощи разработанной методики с МС-детектированием – как наиболее селективной и чувствительной. Валидация методики ВЭЖХ-МС/МС проводилась согласно отечественным и зарубежным руководствам.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанные методики количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10 в плазме крови при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.
2. Результаты применения расчетного подхода к количественному определению убихинола в плазме крови больных, позволяющего рассчитать его концентрацию как разность концентраций общего коэнзима Q10 и убихинона, измеренных методом ВЭЖХ-МС/МС.
3. Результаты валидации разработанных методик количественного определения общего CoQ10, убихинона и убихинола.
4. Результаты исследования влияния ЛС различной химической структуры и фармакологического действия на эндогенный плазменный уровень убихинола, убихинона, общего коэнзима Q10 и его редокс-статус у больных с II-III ФК ХСН.
5. Результаты изучения динамики изменения концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови больных 0-I ФК ХСН при дополнительном назначении к стандартной терапии лекарственного средства Кудесан®.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточно большим объемом выборки, применением сертифицированного оборудования и современных методов исследования. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи Microsoft Office Excel, Statistica 6 с применением параметрических (t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых групп) и непараметрических (тест Манна-Уитни) методов в зависимости от нормальности распределения, рассчитанного согласно тесту Колмогорова-Смирнова. При сравнении более двух групп был использован анализ ANOVA. Разработанные методики ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС соответствуют критериям приемлемости валидационных параметров: линейность, нижний предел количественного определения, правильность, точность, прецизионность. Выводы и заключения сделаны на основе проанализированных литературных данных, а также полученных собственных результатов исследования.

Апробация результатов исследования

Основные положения диссертационной работы представлены на международной научно-практической конференции «Трансляционная медицина: возможное и реальное», Российская медицинская академия непрерывного образования, Москва, 18-19 апреля 2018 г., XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 8-11 апреля 2019 г., международной научной конференции «Scientific research of the SCo countries: synergy and integration», Пекин, 29 апреля 2019 г., Всероссийском конгрессе, посвященном вопросам клинической фармакологии с позиции основоположника академика Вотчала Б.Е., Москва, 05 июня 2019 г.

Апробация диссертационной работы проведена на совместном заседании кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института Фармации А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 3 от 11.10.2022.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ключевая роль в постановке целей и задач исследования, подборе, систематизации и анализе отечественных и зарубежных источников литературы, разработке схемы проведения исследования и методик количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10, проведении исследования и валидации разработанных методик. Вклад автора является определяющим в отборе фармакологических групп лекарственных средств для последующего изучения их влияния на плазменную концентрацию убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса, в статистической обработке полученных данных, подготовке публикаций, и практическом внедрении основных результатов диссертации.

Внедрение результатов в практику

Разработанные методики количественного определения убихинона, убихинола и коэнзима Q10 внедрены в рабочую практику лаборатории №51 Фармакологии и фармацевтической разработки Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют пунктам 3 и 4 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия и пунктам 7 и 8 паспорта научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с фрагментом разрабатываемой комплексной темы «Разработка и совершенствование клинико-фармакологических технологий персонализированной медицины для повышения эффективности и безопасности фармакотерапии социально-значимых заболеваний» Кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Публикации

По результатам исследования опубликовано 13 научных работ, в том числе в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/

Перечень ВАК при Минобрнауки России – 2 статьи, в изданиях, индексируемых в международных базах данных – 7 статей, в иных рецензируемых изданиях – 1 статья, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературных данных, четырех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложения. Работа изложена на 191 странице машинописного текста, содержит 46 таблиц и 40 рисунков. Список использованной литературы включает 198 источников, из них 163 работы зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Методику определения убихинона в плазме крови при помощи ВЭЖХ-УФ разрабатывали на ВЭЖХ Agilent 1200 с УФ - детектором Agilent 6140. Методику определения убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статуса при помощи ВЭЖХ-МС/МС разрабатывали на ВЭЖХ Nexera LCMS-8040 (QQQ) с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 Shimadzu.

В исследование включены 142 пациента, из них 54 – практически здоровые лица и 88 больных сердечно-сосудистыми заболеваниями (ИБС, АГ, ХСН), которые, в свою очередь, были разделены на две группы (1 и 2). Характеристика пациентов и подробная схема организации исследования представлена в Таблице 1. Протокол исследования больных был одобрен на заседании локального этического комитета Сеченовского Университета (протокол № 14-22 от 07.07.2022).

В первую группу были включены 62 больных с II-III ФК ХСН (по NYHA), во вторую группу включены 26 больных с 0-I ФК ХСН (по NYHA). Распределение больных по подгруппам в зависимости от применяемой терапии представлено в Таблице 2. Больные первой группы были распределены на подгруппы А, Б, В, Г таким образом, чтобы было возможно оценить влияние амлодипина, аторвастатина, этоксилола на эндогенную плазменную концентрацию общего CoQ10, убихинола и убихинона.

Вторая группа больных была разделена на две подгруппы – контрольную (К) и тестируемую (Т). В контрольную группу вошли 12 больных, которым была назначена стандартная терапия (Таблица 2). В тестируемую группу вошли 14 больных, которым была назначена такая же стандартная терапия, а также дополнительно был назначен лекарственный препарат Кудесан® (РУСФИК, Россия) в виде 3% раствора для приема внутрь, по 3 мл в день однократно (суточная доза CoQ10 составила 90 мг) во время утреннего приема пищи.

Таблица 1 – Схема организации исследования

Показатель	Группы пациентов			
	Практически здоровые лица	Больные 1 группы	Больные 2 группы	
			Контрольная группа	Тестируемая группа
Количество пациентов	54	62	12	14
Диагноз	-	II-III ФК ХСН (по NYHA)	0-I ФК ХСН (по NYHA)	
Пол пациентов	Женщины – 48,1 %, Мужчины – 51,9 %	Женщины – 64,5 %, Мужчины – 35,5 %	Женщины – 58,3 %, Мужчины – 41,7 %	Женщины – 57,1 %, Мужчины – 42,9 %
Средний возраст, лет	30,01±4,21	64,2±6,98	66,07±7,14	64,91±6,84
Средний вес, кг	67,18±9,59	66,54±10,14	71,5±10,61	71,35±6,47
Средний рост, см	173,87±7,91	169±6,33	168,25±5,67	167,42±5,97
Применяемые лекарственные средства (фармакологическая группа)	–	Статины и/или Бета-блокаторы и/или Блокаторы Са каналов и/или Антиоксиданты	Бета-блокаторы, Блокаторы кальциевых каналов, Ингибиторы АПФ	Бета-блокаторы, Блокаторы кальциевых каналов, Ингибиторы АПФ, Кудесан®
Схема отбора проб крови	Однократно	Однократно на 3-5 день лечения	I – на 2 день стандартной терапии, II – через 14 дней стандартной терапии	I – на 2 день стандартной терапии, II – через 14 дней лечения (стандартная терапия + Кудесан®)
Анализируемое вещество в плазме крови	Общий CoQ10	Общий CoQ10, Убихинол, Убихинон	Общий CoQ10, Убихинол, Убихинон	Общий CoQ10, Убихинол, Убихинон

Примечание: средние значения представлены в виде $Mean \pm S.E.$, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ФК – функциональный класс, АПФ – ангиотензин-превращающий фермент

Таблица 2 – Дизайн исследования

Группа пациентов	Подгруппа пациентов	Количество пациентов	Применяемые лекарственные средства (фармакологическая группа)	Тестируемая группа	Контрольная группа	Исследуемые лекарственные средства
1	А	15	Аторвастатин (статины), Бисопролол / Метопролол (β-блокаторы)	Б	+	
	Б	17	Аторвастатин (статины), Бисопролол / Метопролол (β-блокаторы), Амлодипин (блокатор Са каналов)	+	А	Амлодипин
				+	В	Аторвастатин
	В	18	Бисопролол / Метопролол (β-блокаторы), Амлодипин (блокатор Са каналов)	Г	+	–
				Б	+	–
Г	12	Бисопролол / Метопролол (β-блокаторы), Амлодипин (блокатор Са каналов), Этоксидол (антиоксидант)	+	В	Этоксидол	
2	Т	14	Капторил/Эналаприл (иАПФ), Бисопролол/метопролол (β-блокаторы), Амлодипин (Блокатор кальциевых каналов), Кудесан®	+	К	Кудесан®
	К	12	Каптоприл/Эналаприл (иАПФ), Бисопролол/метопролол (β-блокаторы), Амлодипин (Блокатор кальциевых каналов)	Т	+	
3	Практически здоровые лица	54	–	І	+	Амлодипин, Аторвастатин, Этоксидол
				ІІ	+	Кудесан®

Кровь для анализа у практически здоровых и больных первой группы отбирали однократно, а у больных 2 группы забор крови осуществляли дважды: I – на 2 день стандартной терапии (исход), II – через 14 дней лечения. При этом больным из тестируемой группы Кудесан® назначали на 2 день стандартной терапии после забора проб крови на анализ, а забор крови через 14 дней лечения (Таблица 1). При этом больным из тестируемой группы Кудесан® назначали на 2 день стандартной терапии после забора проб крови на анализ, а забор крови через 14 дней лечения осуществляли утром до очередного приема Кудесана®.

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка проводилась при помощи программы Statistica 6.0. Соответствие нормальности распределения определяли при помощи непараметрического теста Колмогорова-Смирнова. Распределение считалось нормальным при условии $p > 0,05$. В этом случае сравнения выборок проводились при помощи t-критерия Стьюдента для зависимых и независимых групп. При условии отсутствия нормального распределения между выборками использовали непараметрический тест Манна-Уитни для оценки статистически значимых различий между группами. Избранным уровнем статистической значимости определяли $p=0,05$. При сравнении трёх и более независимых групп для выявления статистически значимых различий средних использовали метод однофакторного дисперсионного анализа: ANOVA с использованием апостериорных сравнений при помощи критерия Тьюки-Крамера. Данные представлялись в виде следующих параметров: Mean – среднее значение, SD – стандартное отклонение среднего результата, SE – стандартная ошибка, C.V. – коэффициент вариации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка методики количественного определения убихинона в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ

Для изолирования убихинона из плазмы крови был использован метод жидкостной экстракции с использованием диэтилового эфира. Эффективность экстракции составила 84%. При разработке методики, исходя из времени удерживания, а также формы пиков, были выбраны следующие хроматографические условия: элюент – смесь этанола и пропанол-2 (90:10), скорость элюирования – 0,8 мл/мин, хроматографическая колонка Eclipse XDB-C18 (150x4,6мм, 5μм) (Agilent, США), температура на колонке – 40 °С, длина волны детектирования – $\lambda=275$ нм для убихинона, $\lambda=290$ нм для убихинола. Время удерживания убихинона составило $12,9 \pm 0,2$ минут, убихинола – $8,2 \pm 0,2$ минут. Схематично этапы пробоподготовки представлены на Рисунке 1.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки. Калибровочная зависимость была линейной в диапазоне 0,5 – 10,0 мкг/мл, коэффициент корреляции (r) составил 0,9985, что соответствует критерию приемлемости для

биоаналитических методик ($r > 0,99$).

Валидация. Валидацию методики проводили по следующим параметрам: линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения. Метрологические характеристики разработанной методики представлены в Таблице 3. Относительная погрешность среднего результата не превышала 13,8% для концентрации 0,5 мкг/мл (LOQ) убихинона и 5,0% на остальных точках концентрации при оценке внутрисуточной точности, а также не превышала 14,1% для концентрации 0,5 мкг/мл и 14,0 % на остальных концентрациях при оценке междневной точности. Стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) не превышало 5,5 %. НПКО для убихинона составил 0,5 мкг/мл.

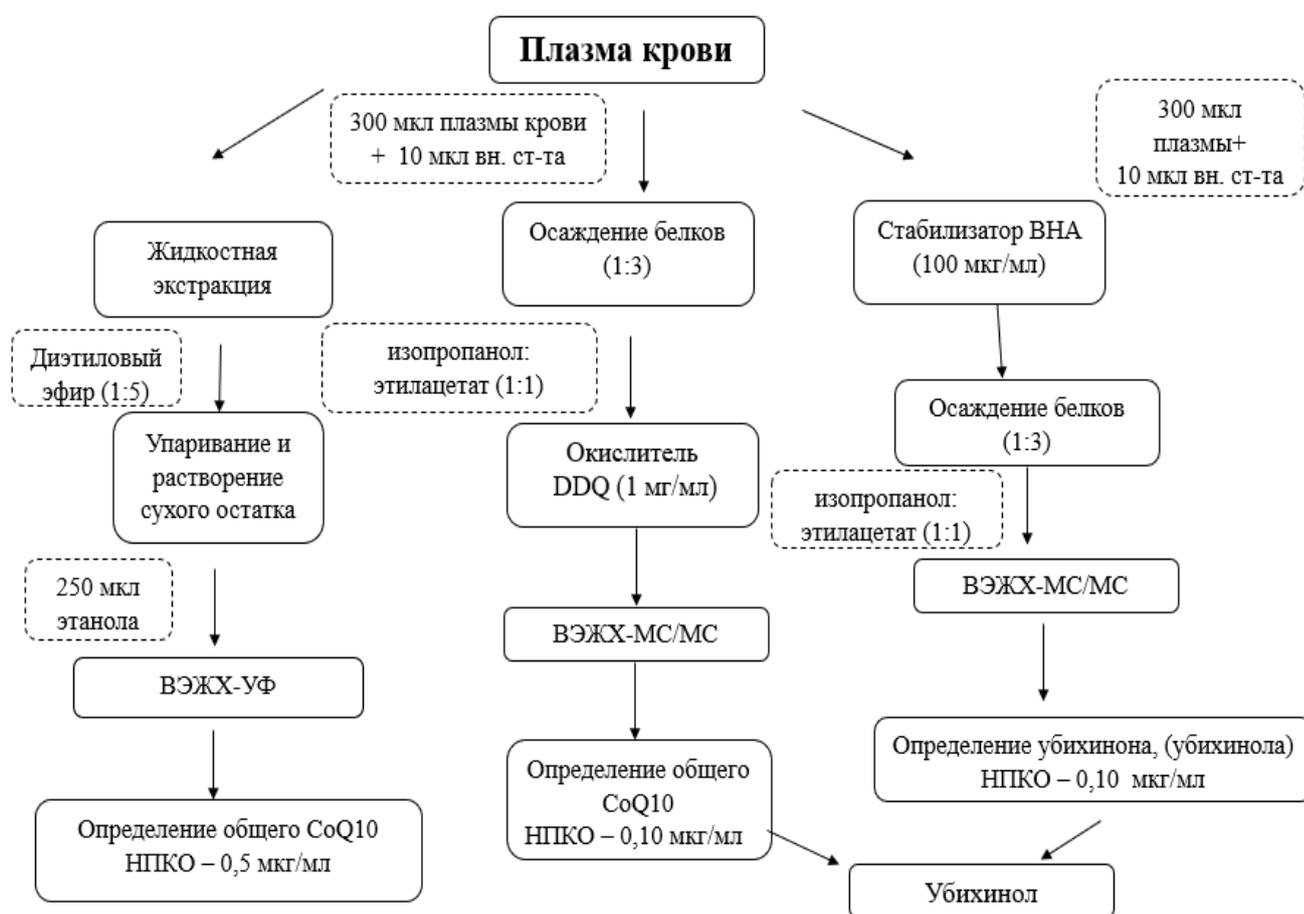


Рисунок 1 - Схема пробоподготовки для количественного определения убихинола, убихинона и общего СоQ10 в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС

В связи с относительно низким пределом обнаружения, данная методика может применяться для количественного определения плазменной концентрации только общего СоQ10 у практически здоровых лиц, а для определения убихинола, убихинона и общего СоQ10 в плазме крови больных необходимо разработать более чувствительные методики – с применением метода ВЭЖХ-МС/МС.

Разработка методики количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Изолирование из плазмы крови убихинола и убихинона проводили методом осаждения белков (Рисунок 1). Степень извлечения из биологической жидкости составила 82,3% для убихинола и 88,5% для убихинона. Было обнаружено, что эффект матрицы (ЭМ) находился в диапазоне 96,4 – 103,1%, а коэффициент вариации ЭМ, нормализованного по внутреннему стандарту, не превышал 8,3%, что свидетельствует о стабильности и воспроизводимости аналитического сигнала.

Были разработаны две модификации методики количественного определения, а именно: для определения убихинона (со стабилизацией убихинола при помощи бутилгидроксианизола) и определения общего CoQ10 (с окислением убихинола до убихинона). Окисление убихинола до убихинона проводили при помощи 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (DDQ). Поскольку убихинол быстро окисляется до убихинона несмотря на то, что в методике использовали добавление стабилизатора, было принято решение использовать расчётный метод для количественного определения убихинола. Концентрация убихинола рассчитывалась по разности концентраций общего CoQ10 и убихинона. Данный подход обеспечивает возможность достоверно и надёжно определять концентрацию убихинона, убихинола и редокс статус CoQ10 в плазме крови пациентов. Схема количественного анализа убихинона, убихинола и общего CoQ10 в плазме крови пациентов представлена на Рисунке 1.

При разработке метода ВЭЖХ-МС/МС наилучшим вариантом в отношении времени удерживания, а также разделения пиков стала подвижная фаза в виде раствора муравьиной кислоты (0,1 %, об.) и концентрированного раствора аммиака (0,04 % об.) в деионизированной воде – элюент А и раствора муравьиной кислоты (0,1 % об.) и концентрированного раствора аммиака (0,04 %, об.) в смеси метанол:этилацетат (9:1) – элюент Б. Для хроматографического разделения в градиентном режиме была выбрана колонка Luna C18 (50x4,6, 5µм). Температура колонки поддерживалась на уровне 40°C. Время удерживания убихинона составило $10,6 \pm 0,2$ мин, а убихинола – $8,0 \pm 0,2$ мин. В качестве внутреннего стандарта был выбран токоферола ацетат, время удерживания которого составило $5,2 \pm 0,2$ мин.

Детектирование проводилось в режиме MRM. Ионы-прекурсоры соответствовали 880,7 m/z для убихинона и 882,7 m/z для убихинола, а фрагментный ион для обоих веществ был одинаковым – 197,1 m/z. Поток газа-распылителя составил 20 л/мин, поток осушающего газа – 3 л/мин, а напряжение на источнике ионизации – 3000 В для убихинона и убихинола и 4500 В для токоферола ацетата. Температура десольватирующего капилляра линии десольватации составила 200 °C, а температура нагревательного блока – 400 °C.

Типичная хроматограмма разделения убихинола и убихинона в плазме крови человека в

калибровочной пробе, а также хроматограмма общего CoQ10 после окисления убихинола до убихинона в той же пробе плазмы крови представлена на Рисунке 2.

Количественное определение убихинона и общего CoQ10 проводили методом внутреннего стандарта с использованием токоферола ацетата. Калибровочная зависимость (Рисунок 3) была линейной в диапазоне концентрации 0,1 – 2,0 мкг/мл убихинона, убихинола и 0,1 – 5,0 мкг/мл общего CoQ10, коэффициент корреляции составил $r=0,9958$ для убихинона и $r=0,9951$ для убихинола, $r=0,9972$ для общего CoQ10. НПКО составил 0,10 мкг/мл.

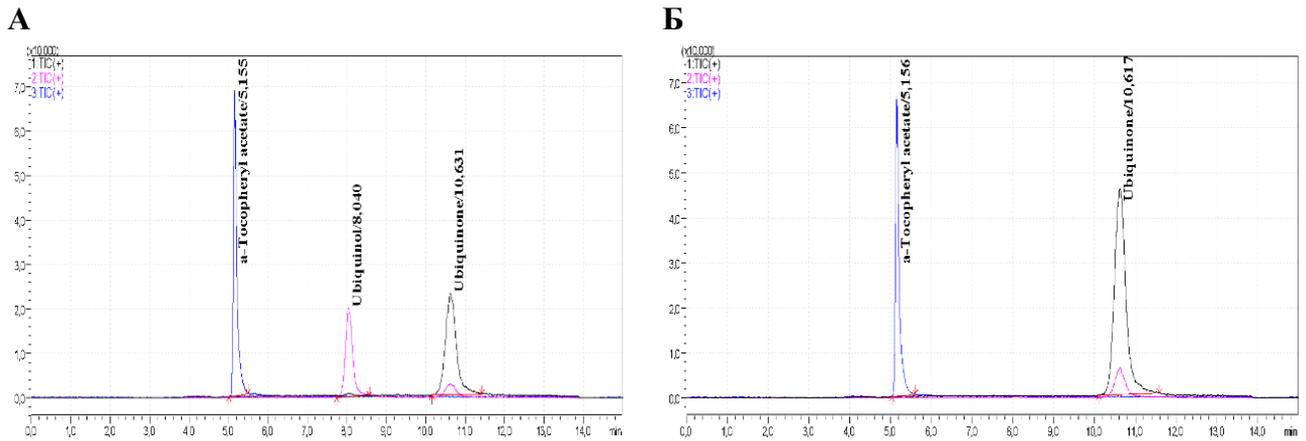


Рисунок 2 - Хроматограмма определения убихинона и убихинола (А) и общего CoQ10 после окисления убихинола (Б) в плазме крови в калибровочной пробе методом ВЭЖХ-МС/МС

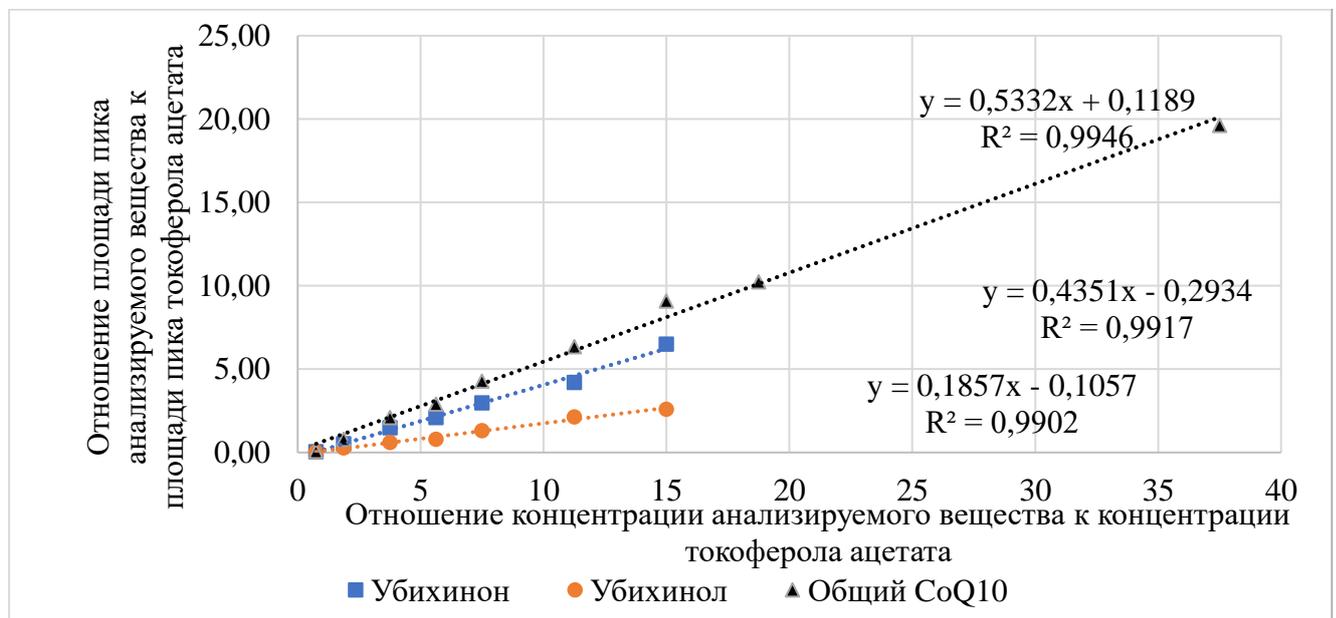


Рисунок 3 - Калибровочные графики зависимости отношения площади хроматографических пиков анализируемых веществ и внутреннего стандарта от отношения концентрации анализируемых веществ и внутреннего стандарта

Валидация. Установлено, что относительная погрешность среднего результата для концентрации в пробе 0,1 мкг/мл не превышала 11,1% для убихинона, 13,2% для общего CoQ10

и 17,0% для убихинола при оценке внутрисуточной точности (Таблица 3). Для остальных точек концентрации погрешность не превышала 9,7% для убихинона, 10,9 % для общего СоQ10 и 10,0% для убихинола. При оценке междневной точности для концентрации 0,1 мкг/мл относительная погрешность не превышала 17,3% для убихинона, 14,7% для общего СоQ10 и 19,0% для убихинола. На остальных точках концентрации погрешность не превышала 12,5% для убихинона, 10,9 % для общего СоQ10 и 12,3% для убихинола. Стандартное отклонение среднего результата (воспроизводимость) для убихинона не превышало 6,7 %, для общего СоQ10 – 5,7% и для убихинола – 7,4%.

Таким образом, разработанные методики отвечали основным требованиям, предъявляемым к методикам для количественного определения эндогенных веществ и лекарственных средств в плазме крови (EMA Guideline on bioanalytical method validation 2011, FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation 2013, Оценка биоэквивалентности лекарственных средств: Методические указания. Москва, 2008, Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза 2016).

Таблица 3 - Метрологические характеристики разработанных методик количественного определения убихинона, убихинола и общего СоQ10 в плазме крови

μ , мкг/мл	F	\bar{x}	S^2	S (n=6)	$S\sigma$	P%	$t_{\text{табл.}}$	$t_{\text{выч.}}$	Δx	$\Delta \bar{x}$	ξ , %	ζ , %	$S\sigma$, %
Внутридневная валидация													
ВЭЖХ-УФ													
Убихинон													
0,5	5	0,55	0,005	0,072	0,03	95	2,57	1,54	0,18	0,08	33,71	13,76	5,35
0,75	5	0,77	0,001	0,023	0,01	95	2,57	1,98	0,06	0,03	7,80	3,18	1,24
5,0	5	5,15	0,022	0,15	0,06	95	2,57	2,49	0,38	0,15	7,26	3,00	1,15
ВЭЖХ-МС/МС													
Убихинон													
0,1	5	0,101	0,0001	0,011	0,004	95	2,57	0,12	0,03	0,01	27,20	11,1	4,32
0,5	5	0,53	0,002	0,049	0,02	95	2,57	1,69	0,13	0,05	23,77	9,71	3,78
0,75	5	0,73	0,0008	0,029	0,01	95	2,57	1,67	0,07	0,03	10,15	4,14	1,61
1,0	5	0,99	0,002	0,043	0,02	95	2,57	0,86	0,11	0,04	11,16	4,56	1,77
Общий СоQ10													
0,1	5	0,097	0,0002	0,012	0,01	95	2,57	0,71	0,03	0,01	32,26	13,17	5,12
0,5	5	0,54	0,002	0,040	0,02	95	2,57	2,39	0,10	0,04	19,01	7,76	3,02
1,0	5	1,04	0,012	0,107	0,04	95	2,57	0,84	0,28	0,11	26,59	10,86	4,22
5,0	5	4,59	0,210	0,453	0,19	95	2,57	2,23	1,17	0,48	27,40	10,37	4,03
Убихинол													
0,1	5	0,096	0,0002	0,016	0,01	95	2,57	0,58	0,04	0,02	41,56	16,97	6,60
0,5	5	0,51	0,0006	0,024	0,01	95	2,57	1,44	0,06	0,03	12,05	4,92	1,91
0,75	5	0,69	0,004	0,064	0,03	95	2,57	2,38	0,16	0,07	23,72	9,68	3,77
1,0	5	1,01	0,009	0,096	0,04	95	2,57	0,14	0,25	0,10	24,47	9,99	3,89

Продолжение Таблицы 3

Междневная валидация													
ВЭЖХ-УФ													
0,5	5	0,56	0,006	0,075	0,03	95	2,57	2,04	0,19	0,079	34,45	14,06	5,47
0,75	5	0,76	0,005	0,073	0,03	95	2,57	0,21	0,19	0,077	24,73	10,10	3,93
5,0	5	5,0	0,44	0,662	0,27	95	2,57	0,09	1,70	0,70	34,22	13,97	5,44
ВЭЖХ-МС/МС													
Убихинон													
0,1	5	0,11	0,0003	0,018	0,007	95	2,57	1,02	0,05	0,02	42,31	17,27	6,72
0,5	5	0,52	0,004	0,061	0,030	95	2,57	0,63	0,16	0,06	30,60	12,49	4,86
0,75	5	0,72	0,001	0,035	0,014	95	2,57	2,24	0,09	0,04	12,66	5,17	2,01
1,0	5	0,99	0,005	0,069	0,028	95	2,57	0,37	0,18	0,07	18,00	7,35	2,86
Общий СоQ10													
0,1	5	0,095	0,0002	0,013	0,005	95	2,57	0,98	0,03	0,014	36,04	14,71	5,73
0,5	5	0,516	0,003	0,054	0,022	95	2,57	0,72	0,14	0,056	26,80	10,94	4,26
1,0	5	0,927	0,015	0,121	0,049	95	2,57	1,48	0,31	0,127	33,44	13,65	5,31
5,0	5	4,815	0,323	0,569	0,232	95	2,57	0,80	1,46	0,60	30,35	12,39	4,82
Убихинол													
0,1	5	0,099	0,0003	0,018	0,007	95	2,57	0,16	0,046	0,019	46,67	19,05	7,41
0,5	5	0,497	0,0008	0,027	0,012	95	2,57	0,25	0,071	0,029	14,17	5,79	2,25
0,75	5	0,694	0,003	0,057	0,023	95	2,57	2,41	0,146	0,059	20,97	8,56	3,33
1,0	5	1,010	0,014	0,119	0,049	95	2,57	0,21	0,305	0,125	30,20	12,33	4,80

Примечание: μ – истинное значение измеряемой величины, f – число степеней свободы, S – стандартное отклонение, S^2 – дисперсия, σ – стандартное отклонение среднего результата, P – доверительная вероятность, t – критерий Стьюдента, Δx – граничное значение доверительного интервала результата отдельного определения; $\Delta \bar{x}$ – граничные значения доверительного интервала среднего результата, ξ – относительная ошибка результата отдельного определения; $\bar{\xi}$ – относительная ошибка среднего результата, $S\sigma, \%$ – относительное стандартное отклонение среднего результата

Исследование особенностей распределения убихинола, убихинона, общего СоQ10 и его редокс-статуса у больных первой и второй групп

Усредненные значения концентрации общего СоQ10, убихинола, убихинона и редокс-статуса в плазме крови здоровых лиц и больных представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Усредненные значения концентрации (мкг/мл) общего СоQ10, убихинола, убихинона и редокс-статуса в плазме крови пациентов

Параметр	Больные 1 группы	Больные 2 группы				Здоровые лица
		Контрольная группа		Тестируемая группа		
		Исход	14 дней лечения	Исход	14 дней лечения	
n	62	12		14		54
Общий СоQ10						
Mean	0,569 ¹	0,741 ^{1,2}	0,784 ^{1,2}	0,772 ^{1,2}	0,980 ^{3,4,5}	1,116 ^{3,4,5,6}
S.D.	0,116	0,237	0,224	0,239	0,258	0,423
S.E.	0,014	0,069	0,064	0,064	0,069	0,057
C.V., %	20,5	32,1	28,7	31,0	26,4	37,9

Продолжение Таблицы 4

Убихинол						
Mean	0,192	0,486 ²	0,557 ²	0,521 ²	0,799 ^{3,4,5}	90–95 % от содержания общего CoQ10 *
S.D.	0,087	0,170	0,207	0,208	0,247	
S.E.	0,011	0,049	0,060	0,056	0,066	
C.V., %	45,1	35,2	37,1	39,9	31,0	
Убихинон						
Mean	0,378	0,256	0,227	0,252 ²	0,181 ³	5–10 % от содержания общего CoQ10 *
S.D.	0,077	0,184	0,134	0,152	0,124	
S.E.	0,010	0,053	0,039	0,040	0,033	
C.V., %	20,5	71,9	58,9	60,3	68,7	
Редокс-статус						
Mean	0,530	2,753 ²	3,123 ²	2,737 ²	5,814 ^{3,4,5}	от 6,7 до 30,2±8,8 *
S.D.	0,282	1,676	1,945	1,755	3,358	
S.E.	0,036	0,483	0,561	0,469	0,897	
C.V., %	53,3	60,9	62,2	64,1	57,8	

Примечание: ¹ – статистически достоверные различия по сравнению с практически здоровыми лицами, ² – статистически достоверные различия по сравнению с тестируемой группой на фоне лечения, ³ – статистически достоверные различия по сравнению с тестируемой группой в исходе, ⁴ – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой в исходе, ⁵ – статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой на фоне лечения, ⁶ – статистически достоверные различия по сравнению с больными первой группы, * – средние значения по литературным данным (Bhagavan H.N. et al., 2007; Tang P.H. et al., 2001; Miles M.V. et al. 2003)

Представленные данные свидетельствуют о том, что у больных 1 и 2 групп эндогенная плазменная концентрация общего CoQ10 статистически достоверно ниже, чем у практически здоровых лиц (в среднем -49,0 и -32,1 Δ% соответственно). Отмечено, что полученные значения плазменной концентрации общего CoQ10 у практически здоровых лиц аналогичны литературным данным для здоровых добровольцев (Miles M.V. 2003, Niklowitz P. et al. 2004), а полученные значения концентрации общего CoQ10 в плазме крови больных 1 группы согласуются с литературными данными у больных с ХСН (Keogh A. et al. 2003, Folkers K. et al. 1985).

У больных 1 группы выявлено статистически достоверное снижение концентрации общего CoQ10 (в среднем -24,8 Δ%), убихинола (в среднем -62,0 Δ%), повышение концентрации убихинона (в среднем +48,8 Δ%) и резкое снижение редокс-статуса CoQ10 (в среднем -80,7 Δ%) по сравнению с больными 2 группы в исходе, что обусловлено более тяжелой степенью оксидативного стресса у больных с III-IV ФК ХСН. Отметим, что полученные значения редокс-статуса CoQ10 у больных 1 и 2 групп резко отличаются от литературных данных для здоровых добровольцев (Niklowitz P. et al. 2016, Miles M.V. et al. 2003).

**Исследование влияния некоторых лекарственных средств на эндогенный уровень
убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статус
в плазме крови больных первой группы**

Для уточнения влияния амлодипина, аторвастатина и этоксида на эндогенный уровень общего CoQ10, убихинола, убихинона и редокс-статус проводили сравнительный анализ значений концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и его редокс-статуса в плазме крови больных контрольной и тестируемых групп (Таблица 2), динамика изменения их плазменных концентраций представлена на Рисунке 4.

Для анализа воздействия аторвастатина сравнивали полученные концентрации анализируемых веществ у больных подгруппы Б (изучаемая группа) и больных из подгруппы В (контрольная группа). Установлено, что прием аторвастатина статистически достоверно снижал эндогенную плазменную концентрацию убихинола и общего CoQ10, а также приводил к умеренному снижению редокс-статуса. Выявленные различия могут быть обусловлены способностью статинов ингибировать ГМГ-КоА-редуктазу, что предотвращает не только синтез холестерина, но и синтез CoQ10.



Рисунок 4 – Динамика изменения плазменной концентрации общего CoQ10, убихинола, убихинона и редокс-статуса у больных первой группы при применении различных лекарственных средств по сравнению с контрольной группой (* – статистически достоверные различия)

Для оценки влияния амлодипина сравнивали полученные значения концентраций

анализируемых веществ у больных из подгруппы Б (тестируемая группа) и подгруппы А (контрольная группа). В тестируемой группе наблюдали статистически достоверное увеличение уровня убихинона и общего CoQ10, а также положительные изменения в динамике убихинола и редокс-статуса. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с предотвращением уменьшения уровня глутатиона, а также нарушения синтеза простаглицлинов под действием амлодипина. Таким образом, возможно, амлодипин способен в небольшой степени нивелировать отрицательное воздействие статинов на окислительно-восстановительный баланс организма.

Для оценки влияния антиоксиданта этоксидола проводили сравнительный анализ полученных концентраций анализируемых веществ у больных подгруппы Г (тестируемая группа) и подгруппы В (контрольная группа). При назначении этоксидола у больных статистически достоверно увеличивалась плазменная концентрация убихинона, убихинола и общего CoQ10, что, по-видимому, обусловлено способностью антиоксидантов поглощать активные формы кислорода (АФК) и останавливать радикальные цепные реакции, что подразумевает меньший расход CoQ10.

Исследование влияния Кудесана® на плазменные концентрации убихинона, убихинола, общего CoQ10 и его редокс-статус у больных второй группы

При сравнении данных, полученных у больных контрольной и тестируемой групп в исходе (Таблица 4), следует отметить, что они практически совпадали и статистически достоверно не различались (рисунок 5). Это делает правомочным дальнейшее сравнение результатов, полученных в ходе исследования у этих двух групп больных.

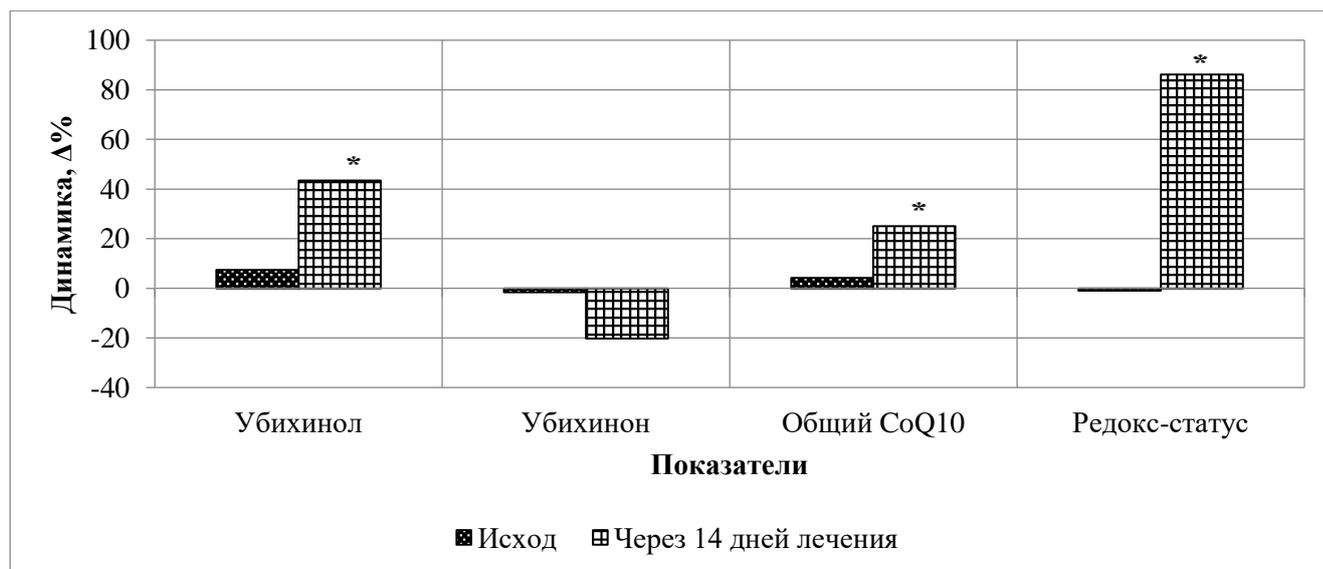


Рисунок 5 – Динамика изменения концентрации убихинола, убихинона, общего CoQ10 и редокс-статуса в плазме крови больных тестируемой группы по сравнению с контрольной группой (* – статистически достоверные различия)

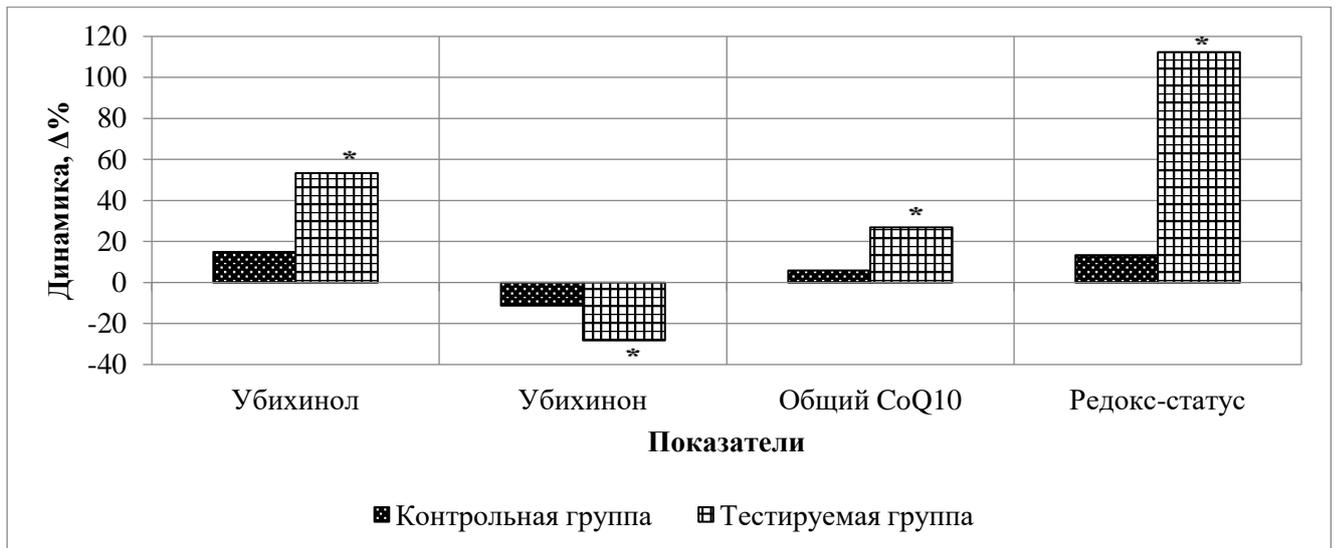


Рисунок 6 – Динамика изменения концентрации убихинола, убихинона, общего СоQ10 и редокс-статуса в плазме крови больных на фоне лечения по сравнению с исходом (* – статистически достоверные различия)

Из представленных данных видно, что при дополнительном назначении к стандартной терапии лекарственного препарата Кудесан® у больных наблюдалось статистически достоверное умеренное повышение плазменной концентрации общего СоQ10, умеренное снижение концентрации убихинона, значительное повышение концентрации убихинола и резкое увеличение редокс-статуса СоQ10 по сравнению как с исходом (Рисунок 5), так и по сравнению с больными контрольной группы на фоне стандартной терапии (Рисунок 6). При этом концентрация общего СоQ10 в плазме крови больных уже статистически достоверно не отличалась от таковой у практически здоровых лиц (Таблица 4), а повышение плазменного уровня общего СоQ10 обусловлено за счет увеличения концентрации его восстановленной формы – убихинола, которая и обладает непосредственной активностью против окислителей. Это резко повышает редокс-статус СоQ10 у больных и таким образом значительно повышает антиоксидантный потенциал организма, помогая бороться на молекулярном уровне с одной из основных причин развития ИБС, АГ и ХСН – оксидативного стресса.

Таким образом, изучение редокс-статуса коэнзима Q10 с помощью разработанных методик количественного определения убихинола и убихинона в плазме крови больных методом ВЭЖХ-МС/МС позволяет выявлять оксидативный стресс у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также может быть использовано для оценки эффективности проводимой фармакотерапии различными лекарственными средствами, в том числе антиоксидантами.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики количественного определения убихинона методом ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим и убихинона, убихинола, общего СоQ10 методом ВЭЖХ с МС/МС

детектированием. Методика ВЭЖХ-УФ может быть использована для определения убихинона в биофармацевтическом анализе и при контроле качества препаратов, содержащих коэнзим Q10. Методика ВЭЖХ-МС/МС с аналитическим диапазоном определения изучаемых веществ от 0,1 до 5 мкг/мл плазмы крови является чувствительной, простой и воспроизводимой методикой. Одношаговое изолирование изучаемых веществ из плазмы крови путём осаждения белков делает методику легко применимой в рутинной практике.

2. Разработанные методики количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10 в плазме крови валидированы и соответствуют отечественным и международным критериям валидации. Стандартное отклонение среднего результата не превышало 6,7% для убихинона, 5,7% для общего CoQ10, 7,4% для убихинола, а относительная ошибка среднего результата не превышала 11,1% для убихинона, 13,2% для общего CoQ10, 17,0% для убихинола. Коэффициент корреляции калибровочных графиков для разработанных методик составлял $r > 0,99$, что соответствует установленным требованиям.

3. При помощи разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС определена эндогенная концентрация общего CoQ10 у больных 0-I ФК ХСН ($0,757 \pm 0,015$ мкг/мл) и у больных II-III ФК ХСН ($0,569 \pm 0,015$ мкг/мл). Выявлено, что у больных 0-I ФК ХСН концентрация эндогенного CoQ10 статистически достоверно ниже ($-32,2 \Delta\%$ и $-49,0 \Delta\%$ соответственно), чем у практически здоровых лиц ($1,116 \pm 0,057$ мкг/мл). При этом у больных II-III ФК ХСН концентрация общего CoQ10 статистически значимо ниже ($-24,8 \Delta\%$), чем у больных 0-I ФК ХСН.

При проведении ВЭЖХ-МС/МС-анализа также установлено, что плазменная концентрация убихинола составила $0,504 \pm 0,037$ и $0,192 \pm 0,011$ мкг/мл, концентрация убихинона – $0,254 \pm 0,032$ и $0,378 \pm 0,010$ мкг/мл, а значения редокс-статуса составили $2,745 \pm 0,330$ и $0,530 \pm 0,036$ соответственно у больных 0-I ФК ХСН и II-III ФК ХСН. Выявлено значительное статистически достоверное снижение концентрации убихинола, повышение концентрации убихинона и резкое снижение редокс-статуса CoQ10 у больных II-III ФК ХСН по сравнению с больными 0-I ФК ХСН, что обусловлено более тяжелой степенью оксидативного стресса у больных II-III ФК ХСН.

4. Доказано, что при добавлении в терапию больным II-III ФК ХСН амлодипина статистически достоверно умеренно увеличивалась концентрация общего CoQ10 и убихинона, наблюдалась тенденция повышения концентрации убихинола и редокс-статуса. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с предотвращением уменьшения уровня глутатиона, а также нарушения синтеза простагландинов под действием амлодипина. Установлено, что при назначении аторвастатина статистически значимо снижалась эндогенная концентрация убихинола и общего CoQ10, а также наблюдалась тенденция умеренного снижения редокс-статуса в плазме крови больных. Это может быть обусловлено способностью статинов

ингибировать ГМГ-КоА-редуктазу, что предотвращает не только синтез холестерина, но и синтез CoQ10. Показано, что при введении в терапию больным II-III ФК ХСН этоксида, статистически достоверно увеличивалась концентрация убихинола, убихинона и общего CoQ10, наблюдалась тенденция незначительного повышения редокс-статуса, что, по-видимому, обусловлено усилением общей антиоксидантной защиты организма и меньшим потреблением CoQ10.

5. Установлено, что при назначении лекарственного препарата Кудесан® в составе стандартной терапии у больных 0-I ФК ХСН, наблюдалось статистически достоверное умеренное повышение плазменной концентрации общего CoQ10, умеренное снижение концентрации убихинона, значительное повышение концентрации убихинола и резкое увеличение редокс-статуса CoQ10. При этом повышение плазменного уровня общего CoQ10 обусловлено за счет увеличения концентрации его восстановленной формы (убихинола), которая и обладает непосредственной активностью против окислителей. Это резко повышает редокс-статус CoQ10 у больных и таким образом значительно повышает антиоксидантный потенциал организма, помогая бороться на молекулярном уровне с одной из основных причин развития АГ, ИБС и ХСН – оксидативного стресса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанные методики количественного определения убихинона, убихинола, общего CoQ10 в плазме крови могут использоваться для изучения фармакокинетики лекарственных препаратов коэнзима Q10, для оценки редокс-статуса CoQ10 у больных с различными заболеваниями с целью уточнения необходимости назначения им лекарственных средств, содержащих коэнзим Q10, или других антиоксидантов, а также для оценки эффективности и безопасности проводимой фармакотерапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для уточнения возможности применения предложенного подхода определения редокс-статуса коэнзима Q10 с помощью разработанных методик количественного определения убихинона, убихинола и общего CoQ10 для определения глубины оксидативного стресса у больных в дальнейшем необходимо провести исследование корреляции значений концентрации CoQ10 и его редокс-статуса с общепринятыми маркерами оксидативного стресса, а также определить их пороговые значения для каждого ФК ХСН.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Зозина В.И.** Современные методы анализа окисленного и восстановленного коэнзима Q10 в биоматериале (обзор)/ **В.И. Зозина**, О.А. Горошко, Л.М. Красных, В.Г. Кукес // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2018. – №1. – С.84-88.
2. **Зозина В.И.** Разработка методики количественного определения коэнзима Q10 в плазме крови, позволяющая оценивать безопасность приема статинов/**В.И.Зозина**// IX Конференция молодых ученых с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное» (19-20 апреля 2018, Москва). – Т.1. – С.158-160.
3. **Zozina V.I.** Coenzyme Q10 in Cardiovascular and Metabolic Diseases: Current State of the Problem/ **V.I. Zozina**, S. Covantsev, O.A. Goroshko [et al.]//**Current Cardiology Reviews**. – 2018. – Vol.14. – №3. – P.164-174. [**Scopus, PubMed**]
4. **Зозина В.И.** Значение редокс-статуса коэнзима Q10 как биомаркера окислительного стресса/ О.А. Горошко, Л.М. Красных, В.Г. Кукес, **В.И. Зозина** // Вестник НИЦЭСМП. – 2019. – №3. – С.146-151.
5. **Зозина В. И.** Определение убихинона и убихинола в плазме крови человека при помощи ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС/ **В.И. Зозина**, Е.С. Мельников, В.Г. Кукес// Сборник тезисов XXVI Российского Национального Конгресса «Человек и лекарство», 8-11 апреля 2019, Москва. – С.114.
6. **Зозина В.И.** Влияние сердечно-сосудистых и бронхолегочных заболеваний на концентрацию коэнзима Q10 в плазме крови/ **В.И. Зозина**, Е.С. Мельников, Л.М. Красных [и др.]//**Сеченовский вестник**. – 2019. – Т.10. – №1. – С.16-21.
7. **Зозина В.И.** Сравнение методик количественного определения CoQ10 в плазме крови/ **В.И. Зозина**, Е.С. Мельников, Л.М. Красных [и др.]//**Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2019. – №5. – С.10-15. [**Chemical abstracts**]
8. **Zozina V.I.** Analytical Method Development for Coq10 Determination in Human Plasma Using HPLC-UV and HPLC/MS/MS/ **V.I. Zozina**, E.S. Melnikov, O.A. Goroshko [et al.]//**Current Pharmaceutical Analysis**. – 2019. – Vol.15. – №7. – P.795-807. [**Scopus, Chemical Abstracts**]
9. **Zozina V.I.** Redox state of CoQ10 in patients with cardiovascular diseases/ **V.I. Zozina**, L.M. Krasnykh, V.G. Kukes// Scientific research of the SCO countries:synergy and integration 上合组织国家的科学研究:协同和一体化, 29 апреля 2019, Пекин. – С.62-67.
10. **Zozina V.I.** The Mechanism of Action of Ethoxidol on Oxidative Stress Indices in Heart Failure and Hypotension/ V.G. Kukes, O.K. Parfenova, B.K. Romanov, A.B. Prokofiev, E.V. Parfenova, N.G. Sidorov, A.A. Gazdanova, L.I. Pavlova, **V.I. Zozina** [et al.] // **Sovremennye tehnologii v medicine**. – 2020. – Vol.12. – №2. – P.67-72. [**Scopus, Web of Science**]

11. **Zozina V.** The particulars of certain drugs' effect on the endogenous coenzyme Q10 plasma level in patients with cardiovascular diseases/ E. Shikh, **V. Zozina**, S. Kondratenko, [et al.]// **Drug Metabolism and Personalized Therapy**. – 2020. – Vol.35. – №2. – P.20200106 [Scopus, PubMed]
12. **Zozina V. I.** Coenzyme Q10 in COPD: An Unexplored Opportunity?/ **V.I.Zozina**, S. Covantev, V.G. Kukes, A. Corlateanu// **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. 2021. – Vol. 18. – №1. – P.114-122. [Scopus, PubMed, Web of Science]
13. **Zozina V.I.** Quantitative Determination of Ubiquinone and Ubiquinol in Blood Plasma by HPLC with Mass-Spectrometric Detection / L.M. Krasnykh, **V.I. Zozina**, E.S. Melnikov [et al.]// **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2022. – Vol.56. – P.994-998. [Scopus, Chemical Abstracts, Web of science]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВНА – бутилгидроксианизол

CoQ10 – коэнзим Q10

DDQ – 2,3-дихлоро-5,6-дициано-пара-бензохинон

АГ – артериальная гипертензия

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

иАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента

ИБС – ишемическая болезнь сердца

НПКО – нижний предел количественного определения

ФК – функциональный класс

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭМ – эффект матрицы